

Procesos microbianos

Lillian Frioni

Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto

Lillian Frioni (*)

PROCESOS MICROBIANOS

EDITORIAL DE LA FUNDACION UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
ARGENTINA

1999

Esta Editorial es miembro de la Red de Editoriales
Universitarias Nacionales
General Paz 1141 - Telefax (058) 4642727
(5800) Río Cuarto

Armado e Impresión: Departamento de Imprenta y Publicaciones

U.N.R.C. 1999

ISBN: 950-665-109-4

ISBN: 950-665-110 (Obra completa)

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723

Impreso en Argentina - Printed in Argentina

Queda prohibida la reproducción total o parcial del texto de la presente obra en cualquiera de sus formas,
electrónica o mecánica, sin el consentimiento previo y escrito del autor y del Editor.

(*) **Lillian Frioni** es Profesora Titular de Microbiología en la Facultad de Agronomía (Universidad de la República del Uruguay). Trabajó por más de 10 años en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto y en la de Rosario, Santa Fe. Colaboró también con la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Nacional de Córdoba, en la Argentina.

Realizó estudios en la Universidad de la República de Uruguay, en la Universidad de Orsay (París), en el Centro de Pedología Biológica de Nancy (Francia), en el Instituto Pasteur de París y en el Laboratorio de Sistemas Simbióticos Fijadores de Nitrógeno Tropicales de Nogent sur Marne, Francia.

Procesos Microbianos es su segundo libro. El primero: **Ecología Microbiana del Suelos** fue editado en diciembre de 1990 por la Universidad de la República del Uruguay, luego de obtener un premio de la Colección Reencuentro (Universidad-Banco de la República Oriental del Uruguay).

Procesos Microbianos fue editado por la Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Argentina) en 1999. Como la edición se encuentra agotada, se decidió brindar la presente versión electrónica, mientras se edita el próximo texto: **Microbiología**, versión ampliada y corregida del anterior, prevista para el 2005.

Dirección: Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Av. Garzón 780, Montevideo, Uruguay
Correo electrónico: lfioni@fagro.edu.uy
FAX: 598 2 3590436

Indice

Prólogo

Los microorganismos

1) Caracteres generales de los microorganismos, células procariota y eucariota y su presencia en los microorganismos. Los virus. Transferencia de material genético en procariotas

2) Estrategias nutritivas y bioenergéticas en los microorganismos. Fotosíntesis, respiraciones y fermentaciones en procariotas y eucariotas. **Efecto del ambiente**: temperatura, pH, presión osmótica, gases, sustancias químicas

3) Los protistas inferiores: bacterias típicas, actinomicetes y cianobacterias, las arqueobacterias. Criterios taxonómicos, efecto del ambiente, principales funciones en la naturaleza

4) Los protistas superiores: algas, hongos, protozoos. relaciones evolutivas, características nutricionales, efecto del ambiente y funciones en ecosistemas naturales

Ecología microbiana

5) Nociones de jerarquía ecológica. Ambientes microbianos: acuáticos, terrestres. **Métodos de estudio en ecología microbiana**: actividad biológica global, enzimática, metabólica. Grupos fisiológicos. Biomasa microbiana. Reconocimiento de los microorganismos por técnicas moleculares

Procesos microbianos en la conservación y producción de alimentos

6) Fermentaciones láctica y alcohólica. Aplicaciones biotecnológicas: leche y derivados, ensilados. Uso de las levaduras, producción de etanol. Los microorganismos como fuentes de proteínas

Procesos microbianos en los ciclos biogeoquímicos

7) Transformaciones de la materia orgánica y mineral por procesos microbianos de: mineralización-inmovilización, oxidación-reducción, solubilización-precipitación, fijación-volatilización. **Características de los ciclos del carbono y del nitrógeno**

8) Degradación de la materia orgánica. Glúcidos simples, polímeros de reserva y de pared vegetal: almidón, celulosa, sustancias pécticas. Sustancias aromáticas: fenoles y derivados, lignina, taninos. Los hidrocarburos. **Humificación**: procesos de humificación y deshumificación

9) Mineralización-inmovilización del nitrógeno: Amonificación y nitrificación. Microorganismos, ecología y rol para los vegetales y el ambiente. Ciclo interno del nitrógeno, biomasa microbiana. Pérdidas de nitrógeno, desnitrificación

10) Ciclos de otros elementos; azufre, fósforo, hierro: Procesos microbianos, microorganismos y ecología

Los microorganismos y los animales

11) Microorganismos del rumen: métodos de estudio, bacterias, protozoos y hongos. Actividad biológica y asociaciones microbianas.

Procesos microbianos en las interacciones con los vegetales

12) La rizosfera, filosfera, esfermatosfera, mantillos. Métodos de estudio. Compuestos liberados por las raíces y metabolitos microbianos. Efectos rizosférico sobre grupos microbianos. Ecología

13) Interacciones biológicas entre microorganismos. Neutralismo. Sinergismo: comensalismo, protocooperación o simbiosis nutricional, simbiosis. Antagonismo: competencia, amensalismo, predación, parasitismo. Funciones en los ecosistemas

14) Fijación biológica del nitrógeno (FBN) por diazotrofos en vida libre y en la rizosfera. Bioquímica de la FBN, la nitrogenasa. Protección frente al oxígeno. Fijación por autotrófos: bacterias fotosintéticas anoxigénicas, cianobacterias. Por heterótrofos: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*.

15) Fijación de nitrógeno por la simbiosis rizobio-leguminosa. Las leguminosas. La bacteria: taxonomía, requerimientos nutritivos. Nodulación y estructura nodular. Genética y factores limitantes de la FBN: físicos, nutrientes, el N-combinado, otros microorganismos. Inoculación.

16) Simbiosis fijadoras de nitrógeno en no-leguminosas. Nódulos tipo *Cycas*, tipo *Parasponia*. Asociaciones con *Frankia* (actinorrizas). Especies noduladas, distribución y usos. Aislamiento y cultivo del endofito. Nodulación, fijación de nitrógeno, perspectivas.

17) Las micorrizas. Tipos más importantes: ectomicorrizas y endomicorrizas del tipo arbuscular. Interacción entre los hongos y las raíces. Hongos simbióticos, posibilidades de cultivo y formulación de inoculantes. Ecología y manejo de estas simbiosis.

Procesos microbianos promotores del crecimiento vegetal

18) Promoción del crecimiento vegetal por mecanismos directos: liberación de sustancias probióticas, fitohormonas, mineralización, solubilización de nutrientes

Por mecanismos indirectos: Control biológico de microorganismo fitopatógenos. Selección de antagonistas (bacterias, hongos), evaluación de efectos. Formulaciones comerciales.

Procesos microbianos en la protección ambiental

19) Biodegradación de restos orgánicos. En aerobiosis: residuos líquidos (piletas y reactores), sólidos: **compostaje:** fases del mismo, microflora, productos finales y aplicaciones. **En anaerobiosis:** metanogénesis, etapas del proceso, metanobacterias. Aplicaciones del biogás y del biofertilizante.

20) Biodegradación de xenobióticos. Inorgánicos: metales pesados, orgánicos: pesticidas, moléculas recalcitrantes. Biorremediación de suelos: procesos microbianos en la degradación de sustancias sólidas.

21) Anexo Práctico

Indicadores biológicos de la calidad del suelo: actividades respiratorias, enzimáticas, biomasa microbiana (Fumigación-inoculación, Fumigación-extracción).

Recuentos microbianos: microflora heterotrófa total, actinomicetes, hongos, algas, protozoos,

Ciclo biológico del carbono: celulolíticos, amilolíticos

Ciclo biológico del nitrógeno: FB por organismos en vida libre y en la rizosfera: aislamientos y recuentos, efectos rizosféricos (R/S), actividad nitrogenasa. **Simbiosis fijadoras de N₂:** selección de cepas de rizobio, reconocimiento y recuentos: totales, viables en caja, en planta. Inoculación de leguminosas. Aislamiento de *Frankia*, medios de cultivo, inoculación.

Mineralización del N y pérdidas: amonificación, nitrificación, desnitrificación. Técnicas ecológicas.

Ciclo biológico del azufre: aislamiento de sulfooxidantes y sulfatorreductores, recuentos.

Ciclo biológico del fósforo: aislamiento de mineralizantes del P-orgánico, solubilizadores del P-insoluble. Técnica ecológica.

Asociaciones micorríticas: ectomicorrizas: aislamiento y cultivo de hongos, endomicorrizas arbusculares, producción de inoculantes en plantas trampa.

Compostaje y vermicompostaje: parámetros de evaluación del grado de madurez: C/N, pH, amonio y nitratos, hidratos de carbono

Prólogo

El objetivo de este libro es despertar inquietudes en los estudiosos de diferentes disciplinas como Microbiología, Ciencias de la Tierra, Biología y en todos aquellos interesados en aspectos relacionados a procesos microbianos que contribuyen a la dinámica de los ecosistemas naturales. Las transformaciones de materiales orgánicos de muy diferente origen que se depositan en la biosfera, como los restos vegetales, animales y productos de la actividad del hombre, son de origen biológico. La polución consiguiente provocada por la acumulación de numerosos productos, preocupa a la comunidad científica que busca soluciones para mejorar la calidad de la vida.

Los procesos de óxido-reducción que alteran la disponibilidad de importantes nutrientes vegetales, como el N, P, S, P, Fe, Mn, etc. son realizados por equipos enzimáticos contenidos en los microorganismos.

Un capítulo especial de este libro está dedicado a procesos fermentativos responsables de la conservación de alimentos para el hombre y los animales (ensilados).

La promoción del crecimiento vegetal por los microorganismos que se realiza por mecanismos directos: producción de sustancias probióticas, aumento de la disponibilidad de nutrientes por procesos de mineralización, solubilización, fijación de N₂ y aquellos indirectos, debido al control biológico de microorganismos patógenos, merece un tratamiento especial, por las potencialidades de incidencia que el hombre posee por técnicas de manejo que incluyen inoculación con organismos seleccionados.

Finalmente, un apéndice práctico permite la realización de experiencias sencillas para poner de manifiesto y evaluar los procesos realizados por los microorganismos.

Deseamos que esta contribución ayude al desarrollo de futuros experimentadores.

Río Cuarto, diciembre de 1999

Montevideo, mayo de 2005

Capítulo 1

Caracteres generales de los microorganismos

Introducción

Los microorganismos constituyen un importante grupo de organismos primitivos y simples, la mayoría unicelulares microscópicos y otros macroscópicos filamentosos o cenocíticos, capaces de realizar innumerables procesos biológicos, que han surgido muy temprano en la evolución, pero que se han adaptado a las condiciones ambientales actuales.

El grupo está integrado por las bacterias, algas, hongos, protozoos. Estos organismos cumplen con los 5 principios característicos de las células vivas:

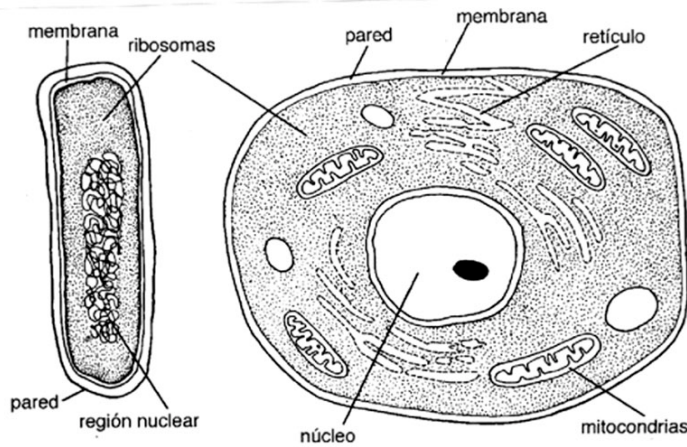
1. **autoalimentación o nutrición:** las células toman las sustancias químicas del ambiente, las transforman, liberan energía y productos de desecho
2. **autoduplicación o desarrollo:** las células son capaces de dirigir su propia síntesis. Al crecer, se dividen dando dos células cada una idéntica a la original.
3. **diferenciación:** la mayor parte de las células pueden presentar cambios en su forma o función. La diferenciación suele ser parte del ciclo de vida celular: se forman estructuras especializadas comprometidas con la reproducción sexual, la dispersión, la sobrevivencia en condiciones desfavorables (esporas, cistos, etc).
4. **señalamiento químico:** interactúan o se comunican con otras células, por señales químicas
5. **evolución:** es la introducción de cambios hereditarios como resultado de la selección natural. Consecuencia de estos cambios (que ocurren a velocidad baja pero regular en todas las células) es la selección de los organismos mejor capacitados para vivir en determinado ambiente.

Los estudios con el microscopio electrónico permitieron reconocer diferencias en la organización subcelular de los organismos. Existen dos tipos de células: la **eucariótica**, unidad estructural de animales, vegetales, protozoos, hongos y la mayoría de las algas, y la **procariótica**, característica de los organismos más simples, las bacterias, incluyendo entre éstas a las cianobacterias

A pesar de la extraordinaria diversidad de células **eucarióticas**, resultante de la especialización evolutiva de los distintos grupos, su arquitectura básica es común: compartimentalización por sistemas membranosos (RE y Golgi), corrientes citoplasmáticas, mitocondrias y cloroplastos. El núcleo de los eucariotes está rodeado por una membrana nuclear, contiene varias moléculas de ADN y se divide por **mitosis** o por una completa reproducción sexual, que incluye fusión de células, formación de cigote diploide y segregación de células haploides luego de la **meiosis** (figura 1).

La **célula procariota**, por el contrario, no posee membrana nuclear, posee una sola molécula de ADN y la división asexual es por bipartición, **amitótica**. La célula no está atravesada por membranas, no posee organelos, excepto sacos muy simples que alberguen a los pigmentos fotosintéticos y a veces vesículas de gas para flotar en el agua.

Figura 1- Esquemas de una célula procariota (a) y una eucariota (b)



Los estudios a nivel de funciones celulares mostraron que estas diferencias estructurales son la expresión de mecanismos diferentes de:

- **transmisión de la información genética**
- **del metabolismo bioenergético**
- **de los procesos de entrada y salida de sustancias**

Uno de los hechos más sorprendentes en la historia de la evolución debe ser sin duda la aparición de la primera célula eucariótica. Se está lejos de comprender las causas de este gran salto en la evolución, sobre todo por la ausencia de fósiles, que permitan reconocer intermediarios. Cavalier-Smith (1981) postula a un hongo hemiascomicete como el primer organismo eucariota, que fue adquiriendo los 22 caracteres universalmente presentes en los eucariotas y ausentes en los procariotas, a partir de una bacteria aerobia. Esta hipótesis se contradice con la creencia general de que este organismo primitivo fuera una cianobacteria (Stanier *et al.*, 1976).

Ya desde la segunda mitad del siglo XIX se vislumbraban diferencias entre animales y vegetales con los organismos más simples, como las bacterias, hongos, algas y protozoos. El zoólogo alemán Haeckel propuso incluir a estos últimos organismos en un nuevo reino, el de los **Protistas**: integrado por organismos muy simples, la mayoría unicelulares, microscópicos, y otros macroscópicos filamentosos o cenocíticos, conocidos vulgarmente como **microorganismos**.

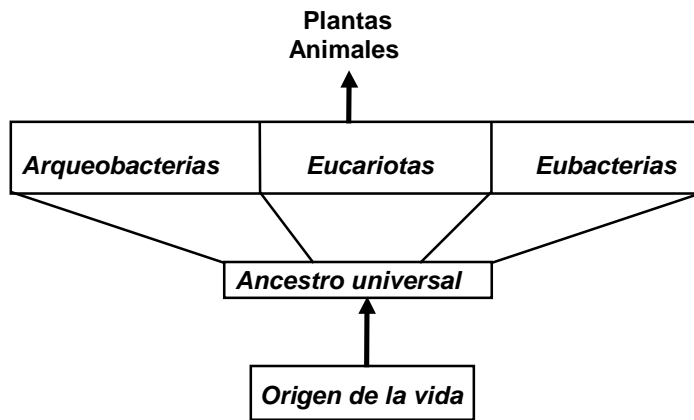
No se diferencian en tejidos ni órganos, ni presentan especialización funcional, excepto, tal vez, para la reproducción. Luego de la evidencia de la existencia de los dos tipos de células, el reino de los protistas se dividió en: **Protistas inferiores**, con célula procariota, que incluye a las bacterias, con las cianobacterias y actinomicetes y a los **Protistas superiores**, con estructura eucariota, que comprende a las algas, protozoos y hongos.

La figura 2 muestra un esquema de la evolución del mundo vivo basado en la estructura del ARN de los ribosomas (Brock y Madigan, 1993). Desde el punto de vista evolutivo los organismos se pueden dividir en tres grupos principales: **arqueobacterias, eubacterias y eucariotes**.

Aunque las eubacterias y las arqueobacterias son procariotas, desde un punto de vista evolutivo no están más estrechamente relacionadas entre sí como lo están con los eucariotas.

Las arqueobacterias (**Aecheaeae**) comprenden un grupo muy primitivo que incluye organismos halófitos y termófilos extremos y a las bacterias metanogénicas, anaerobias estrictas

Figura 2- Evolución del mundo vivo basada en la estructura del ARN de los ribosomas



Parecería que los tres grupos bacterianos divergieron temprano en la historia de la tierra a partir de un organismo primitivo común, el "**ancestro universal**".

Debido a que las células de los animales y de las plantas son eucariotas, se ha considerado en forma general que han derivado de algún tipo de microorganismo, en tanto que los procariotas representan una rama que nunca superó la etapa microbiana.

A los virus les faltan muchos de los atributos de las células entre los cuales el más importante es que no son sistemas abiertos dinámicos. Una partícula viral es una estructura estática, incapaz de cambiar o reponer sus partes. Carecen de organización celular, de capacidad metabólica y de autoduplicación, no se los considera microorganismos, sino **entidades biológicas** y serán tratados brevemente al final del capítulo, por el rol que ejercen en ecosistemas naturales, sobretodo en la transferencia de material genético.

La célula procariota

Una célula bacteriana típica posee las siguientes estructuras:

- **permanentes:** pared celular, membrana, ribosomas, región nuclear
- **accesorias,** que aparecen en algunas especies e incluyen: cápsulas y capas mucosas, flagelos, pigmentos fotosintéticos, endosporas, fimbrias o pilis, vesículas de gas, materiales de reserva.

La **membrana** es la barrera selectiva que separa a la célula del ambiente, no difiere en composición química y función de la del resto de los organismos. Se habla de la **membrana unitaria, de 8 nm** de espesor, doble capa fosfolípida con proteínas incluidas en la matriz. Suele invaginarse formando los **mesosomas**, sobre los cuales se asientan actividades enzimáticas, CTE y pigmentos fotosintéticos.

La membrana de las arqueobacterias difiere en composición con las de las eubacterias: los lípidos poseen enlaces éter en lugar de ésteres para unir los ácidos grasos al glicerol y en lugar de los ácidos grasos poseen compuestos derivados del hidrocarburo **isopreno** lo que le confiere propiedades diferentes a las del resto de los organismos.

La **pared celular** es una estructura rígida por fuera de la membrana y le brinda a la célula protección mecánica y física. Presenta también carácter antigénico. Esta estructura distingue a los protistas superiores de los inferiores. Se aprecia al microscopio de luz cuando la célula se plasmoliza y en el electrónico. Se distinguen bacterias **Gram positivas y Gram negativas** en base a la respuesta a una tinción diferencial. Las diferencias se basan en la estructura y arquitectura de las paredes bacterianas.

La pared de bacterias G^+ consta principalmente de un sólo tipo de molécula : el **peptidoglicano**, llamado también **mureína**, formado por cadenas de dos aminoazúcares: N-acetil glucosamina (G)

y ácido N-acetil murámico (M) , que no se encuentran en eucariotas, con puentes tetrapeptídicos de aminoácidos que le dan a esta molécula única una estructura de malla y gran rigidez (figura 4). El ácido diamino pimélico (DAP) es un aminoácido presente en todas las bacterias Gram negativas y en algunas especies Gram positivas.

Figura 3 - Esquema de paredes de células Gram positivas y Gram negativas

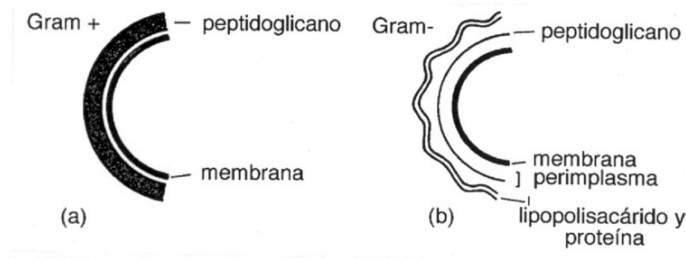
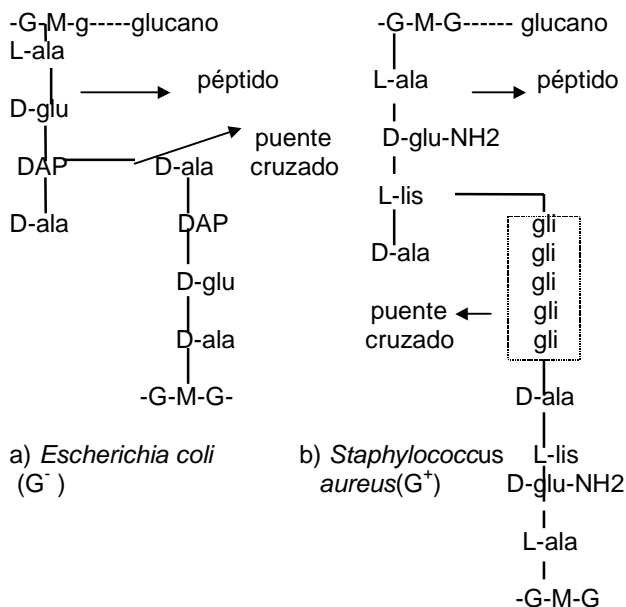


Figura 4- Estructura del peptidoglicano



Otros componentes de las paredes son lipopolisacáridos, proteínas, ácidos teicoicos (polisacáridos con residuos de glicerofosfato o fosfato de ribitol). Estos polioles está conectados por ésteres fosfato y suelen unirse a otros azúcares y a la D-alanina.

La pared de bacterias G^- presentan una capa externa (a veces llamada membrana externa) de **lipopolisacáridos (LPS)**. En el lado interno se ubica una lipoproteína. Algunas de esas proteínas, llamadas **porinas**, sirven de canales para entrada y salida de sustancias de bajo PM.

Una bacteria Gram negativa resiste más la lisis osmótica cuando la célula se trata con **lisozima**, enzima que hidroliza los enlaces beta 1-4 del peptidoglicano por mantener la envoltura formada por la capa externa (forman **esferoplastos** en medio isotónico), el peptidoglicano representa sólo un 15-20% del peso seco de sus paredes. En una célula Gram $^+$ cuya pared está formada en un 80% por peptidoglicano, los **protoplastos** esféricos formados en medio isotónico, estallan al pasar a un medio hipotónico (**plasmoptisis**).

Las paredes de **protistas superiores** cuando están presentes (hongos, algunas algas y protozoos) son más simples, formadas por polímeros de una misma subunidad, como la celulosa, quitina, a veces mineral, con sílice como en las diatomeas (cuadro 1).

Cuadro 1 - Resumen de los constituyentes principales de las paredes microbianas

Tipo de Célula	Constituyentes
Procariota	
eubacterias	péptidoglicano, ácido teicoico
G +	péptidoglicano
G -	y lipopolisacárido
arqueobacterias	pseudopeptidoglicano, glucoproteína polisacárido, proteína
Eucariotas	
algas	celulosa, hemicelulosa
	pectinas, sílice (algunas)
hongos	quitina, otros polisacáridos
	celulosa (en algunos)
protozoos	ninguno o sílice, carbonato de calcio

El citoplasma de células procariotas está empaquetado con gran número de **ribosomas**, partículas esféricas formadas por proteínas y ARN responsables de la síntesis proteica. Son de menor tamaño que los de los eucariotas (70S en lugar de 80S). Los eucariotas presentan ribosomas del tipo bacteriano en sus organelos (mitocondrias, cloroplastos).

Otras estructuras a tener en cuenta en las bacterias son:

Endosporas: cuando las condiciones del ambiente se tornan desfavorables, ciertos géneros de bacterias (*Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*) son capaces de formar estructuras terminales o intercalares, llamadas esporas. Están formadas de gruesas paredes que la hacen resistentes a radiaciones, desecación, luz UV. El escaso citoplasma se encuentra en un estado "**criptobiótico**" sin actividades enzimáticas. Una nueva molécula, el ácido dipicolínico que quelata metales como el Ca, Mg, etc. impidiendo que actúen como cofactores de enzimas. Este ejemplo de **ciclo celular** se revierte cuando las condiciones se hacen favorables. La célula retoma su morfología típica y las funciones fisiológicas.

Cápsulas y capas mucosas: son deposiciones de materiales polimerizados, hidratos de carbono, péptidos, que la célula libera al medio cuando las fuentes exceden a las necesidades. Las células encapsuladas son resistentes a la fagocitosis por protozoos o glóbulos blancos, en el caso de los patógenos del hombre.

Apéndices citoplasmáticos: las bacterias se mueven por **flagelos**, de estructura más simple que los eucariotas, formados por 3 haces de fibrillas de proteínas entrelazadas y un haz central. Las **fimbrias** son apéndices similares a los flagelos, pero más cortos y más abundantes, no son para la locomoción y sirven para adherir a la célula a superficies sólidas. Los **pelos** son estructuras semejantes a las fimbrias pero más largos, se encuentran pocos en la superficie celular y están relacionados a la transferencia de material genético (plasmidios, trozos del cromosoma) y se llaman **pelos sexuales o pili**.

ADN en procariotas: la mayor parte del ADN de una bacteria forma una sola molécula muy enrollada. Se habla de **nucleoide**, o falso núcleo. Pueden presentarse una o más moléculas pequeñas en el citoplasma llamados **plasmidios**, que llevan información no vital para la célula, como resistencias a antibióticos, pesticidas y pueden perderse y transferir las resistencias a células sensibles que se convierten en resistentes.

División celular: usualmente las células se dividen por

- **fisión binaria o bipartición:** la membrana celular juega un importante rol separando las dos moléculas de ADN y sintetizando a su paso la nueva pared. El **septo** formado separa finalmente a las dos células hijas. Se la designa también como amitótica.
- **recombinación:** existen mecanismos de intercambio genético entre procariotas que es muy diferente al de los eucariotas: el proceso es fragmentario, no intervienen los complementos cromosómicos completos de ambas células y el ADN se transfiere en una sola dirección, del donador al recipiente (se habla de diplíodes parciales) Los mecanismos son especializados.

Se reconocen tres procesos:

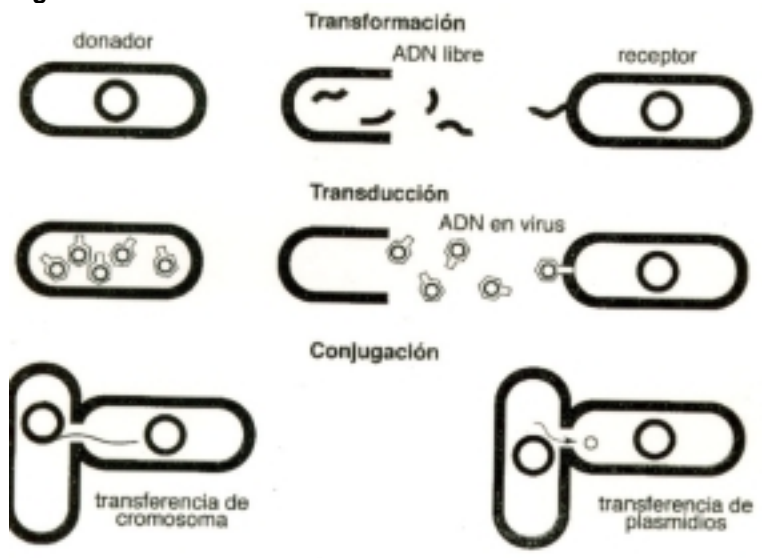
1. **conjugación** : la transferencia es resultado de un contacto célula-célula (se parece al proceso sexual en eucariotas). El segmento de ADN transferido depende del tiempo de contacto y se realiza a través de un pelo sexual.
2. **transducción**, donde la transferencia está mediada por partículas virales
3. **transformación**, donde participa el ADN libre en pequeños trozos que penetran por la membrana. La célula dadora en general se lisa y el ADN queda en la naturaleza expuesto a la biodegradación, acción de ADNasa, etc. Pero en ambientes muy colonizados, como la rizosfera (zona del suelo en contacto con las raíces) puede llegar a células receptoras y recombinarla.

Cuando en la transferencia de genes se involucran aspectos nutritivos, de resistencias a antibióticos, etc. es posible detectar los recombinantes por siembra en medios selectivos donde no crecen la célula receptora pero si el recombinante. Por ejemplo, si la célula receptora no sintetiza triptofano (Trp^-), no se desarrollará al sembrarla en caja de Petri con medio sin el aminoácido, pero al recibir ADN de células Trp^+ , las recombinantes formarán colonias en el mismo medio.

Un dispositivo muy sencillo permite determinar el mecanismo por el cuál se formaron recombinantes cuando dos cultivos se ponen en contacto: en un tubo doblado en U se siembran los cultivos, uno en cada rama, separados por un filtro bacteriológico, que deja pasar los bacteriófagos, pero no a las células.

- Si los cultivos se tratan previamente con ADNasa y no ocurre recombinación, el proceso fue por transformación ya que el ADN libre está expuesto a la acción de la enzima. Si ésta ocurre, debe ser por alguno de los otros mecanismos.
- Sin ADNasa, la recombinación debe ocurrir por transducción ya que el filtro deja pasar virus pero no bacterias. Si no ocurre es que se requiere contacto célula-célula (conjugación).

Figura 5- Transferencia de ADN de célula bacteriana donadora a la receptora



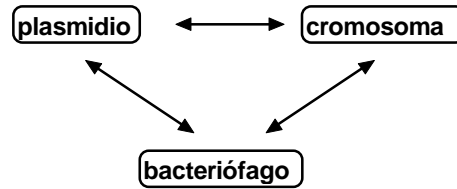
Los virus

Se aplica el término **virus** a entidades biológicas submicroscópicas muy simples, desprovistas de actividad metabólica e incapaces de reproducirse fuera del organismo que parasitan. Alternan su ciclo de vida en dos fases: la extracelular, donde se comporta como partícula inerte, aunque infecciosa, el virión; y la intracelular, en la cual el virus se presenta como ácido nucleico replicable y la célula del huésped (animal, vegetal o microbiana) gobernada por este ácido nucleico, réplica todos los componentes virales, provocando la infección, daños celulares e incluso la lisis de las mismas.

En algunas bacterias el ADN se integra al genoma y se replica ordenadamente con la célula (lisogenia).

Los constituyentes esenciales son: un solo ácido nucleico ADN o ARN de cadena simple o doble y una envoltura protectora o cápside de arquitectura helicoidal o polihédrica, formada de

subunidades proteicas (figura 6). Algunos virus poseen envolturas adicionales con lípidos y polisacáridos. Las proteínas poseen carácter antigénico y permiten su reconocimiento. El ADN de varios virus bacterianos, llamados **bacteriófagos**, es circular, como los plasmidios y el cromosoma bacteriano, elementos genéticos muy relacionados a los virus.



Ciclo lítico de infección

Se distinguen varias fases:

- **de adsorción:** el ciclo lítico comienza cuando una partícula fágica tiene posibilidad de colisionar con una célula huésped; si el virión posee un sitio de adsorción químicamente complementario de un sitio receptor de la superficie celular, ocurre una adsorción irreversible. Estos receptores se encuentran en bacterias G⁻ en la capa externa lipoproteica de la pared o bien a nivel de la capa lipopolisacárida. Para algunos fagos el receptor se encuentra en los apéndices, flagelos o pili.
- **la fijación y penetración:** se realiza por las fibras de la cola y una enzima (la lisozima) comienza a actuar, rompiendo los enlaces glucosídicos del peptidoglicano. Luego el bacteriófago inyecta su ADN en la célula mediante una contracción de las fibras de la cola, quedando afuera el resto del virión (cabeza y cola).

Se comprobó radioquímicamente que sólo el ADN penetra en la célula, marcándolo con P³² (la radioactividad del ADN viral queda en las bacterias); las proteínas, marcadas con S³⁴, se detectaron fuera de las células.

- **fase de eclipse** con varias etapas:

* **formación de proteínas tempranas:** el virus dentro de la célula deja de existir como entidad independiente, se dice que entra en fase vegetativa y se habla de fago vegetativo. Parte del ADN viral es transcrito por ARN polimerasa del huésped para formar ARN mensajero viral. Los ribosomas del huésped traducen este mRNA y forman nuevas enzimas (las tempranas), incluyendo las necesarias para la replicación del ADN viral y una nueva ADN polimerasa y desoxirribonucleasa que destruye el ADN del huésped.

* **replicación del ADN del fago:** la de una molécula de ADN circular puede ocurrir de dos maneras: en el modelo simétrico, las dos cadenas tienen igual papel, mientras que en el modelo asimétrico, una cadena no se rompe y la otra se hace lineal. En fagos con ADN monocatenario, éste es rápidamente convertido en doble hélice por una ADN polimerasa bacteriana.

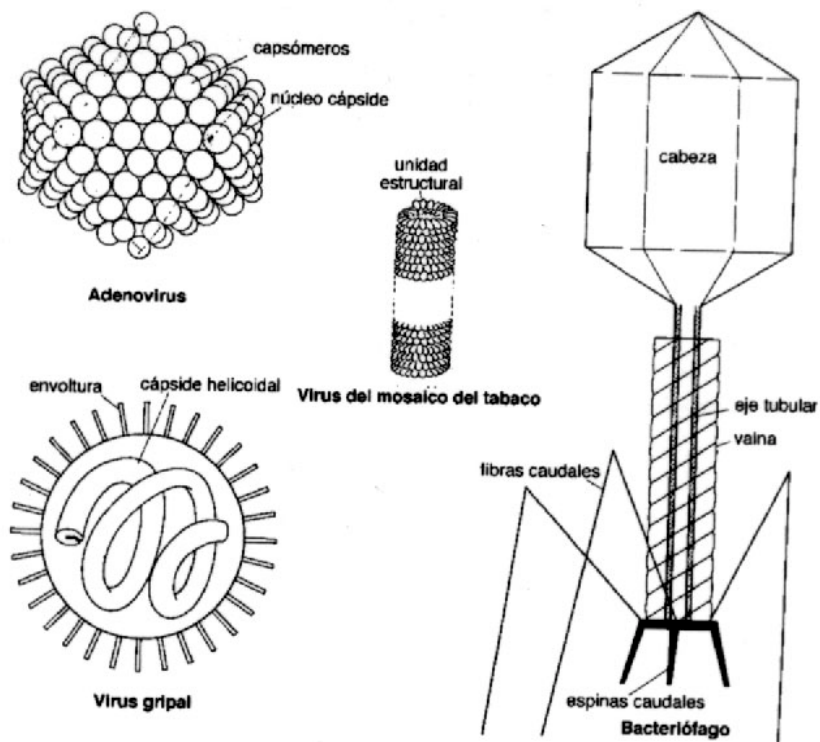
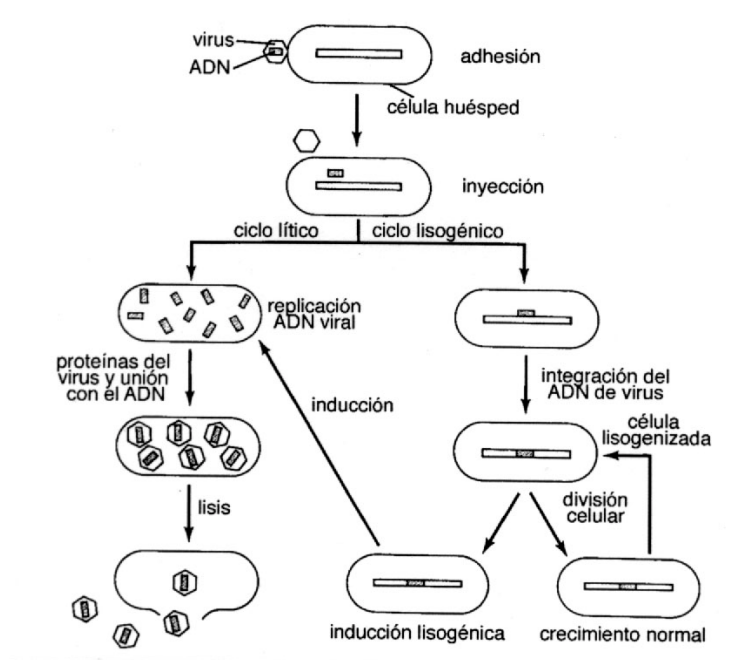


Figura 6- Estructura de algunos virus

Las moléculas de ADN pueden sufrir mutaciones con ruptura y unión de pares de bases; si la bacteria estuviera infectada por dos fagos diferentes pero genéticamente relacionados, se pueden producir moléculas recombinantes de ADN fágico.

- **maduración**, luego que la replicación del ADN del fago comienza, la parte no transcrita es usada para gobernar la síntesis del mRNA viral "tardío" con la consiguiente formación de un segundo grupo de proteínas, entre ellas las subunidades de la cápside. Simultáneamente, las moléculas del ADN viral sufren condensación: tomando forma polihédrica.
- **liberación de viriones maduros**: al final del período latente de infección lítica, otra proteína viral "tardía" aparece en la célula: la **lisozima** que ataca al peptidoglicano de la pared celular, la que va siendo debilitada hasta su ruptura por la presión osmótica interna. La progenie fágica se libera al medio ambiente con los otros constituyentes celulares. La figura 7 muestra los ciclos líticos y lisogénicos

Figura 7- Ciclos líticos y lisogénico de un bacteriófago



Lisogenia

Muchos bacteriófagos son capaces de una interacción no lítica con sus huéspedes: luego de la penetración, el genoma viral puede reproducirse sincrónicamente con el huésped, el que sobrevive y se divide normalmente para dar origen a un clon de células infectadas. En la mayoría de las células de la progenie no se forman proteínas virales, la mayoría de los genes virales se han reprimido. En una célula determinada, puede ocurrir derrepresión espontáneamente y el genoma viral inicia un ciclo lítico de desarrollo; la célula se lisa y libera los viriones maduros.

Esta relación virus-huésped se conoce como **lisogenia** y las células que poseen la capacidad latente de producir partículas maduras de fago, se llaman lisogénicas. Los fagos que realizan esta interacción se dicen temperados y el genoma viral en una célula lisogénica se denomina **profago**. Este es un importante mecanismo de transferencia de material genético en procariotes, ya que algún virus puede encapsular trozos del ADN de la célula infectada (defectuoso) y transferirlo a una célula receptora (**transducción**).

Bibliografía

BROCK, T. D. y M. T. MADIGAN 1991 **Microbiología**, Prentice Hall Hispanoamericana, México.
 CAVALIER-SMITH, T. 1981 The origen and early evolution of the eukariotic cell, en : **Molecular and Cellular Aspects of Microbial Evolution**, Soc. Gen. Microb. Symp, 32, Cambridge Univ. Press: 33-84
 STANIER, R. Y., E. A. ADELBERG, y J. INGRAHAM 1976 **The Microbial World**, 4th ed., Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, Nueva Jersey.

Capítulo 2

Estrategias nutritivas y bioenergéticas en los microorganismos Efecto del ambiente

Clasificación nutricional de los microorganismos

Los microorganismos se clasifican nutricionalmente por la naturaleza de su fuente de energía, por la fuente principal de carbono y por la naturaleza de los donadores de electrones.

Cuadro 1 - Clasificación nutricional de los microorganismos

Fuente de energía	Luz	Fototrofos
	Reacciones químicas	Quimiotrofos
Fuente de carbono	Inorgánico - CO ₂	Autotrofos
	Orgánico	Heterótrofos
Donadores de electrones	Inorgánico	Litotrofos
	Orgánico	Organotrofos

Ejemplos de algunos grupos

Fotoautolitotrofos Algas, bacterias fotosintéticas sulfurosas, cianobacterias

Fotoautoorganotrofos Bacterias fotosintéticas no sulfurosas (emplean sustancias orgánicas simples como donadores de electrones en la fotosíntesis)

Quimioautolitotrofos Bacterias oxidantes del amonio, del nitrito, del azufre, del hierro, del hidrógeno (aerobias), denitrificantes autótrofas (anaerobias).

Quimioheterotrofas La mayoría de los microorganismos usan materia orgánica como fuente de energía, de carbono y donadores de electrones (la sustancia que se oxida). En general la misma sustancia puede cumplir todas estas funciones. Todos los hongos, protozoos y la mayoría de las bacterias pertenecen a esta categoría.

Formas de obtención de energía por los microorganismos

Los microorganismos emplean los tres tipos de generación de energía : **fermentación, fotosíntesis, respiración.**

Fotosíntesis

Proceso redox en donde la energía se obtiene de la luz, por organismos aerobios y anaerobios.

Tipos de fotosíntesis en los microorganismos

- 1) $\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (oxigénica)
- 2) $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S} \longrightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + \text{S}^0$ (anoxigénica)
- 3) $\text{CO}_2 + \text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + \text{H}_2\text{O}$ "
- 4) $\text{CH}_3\text{COOH} \longrightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + \text{H}_2\text{O}$ "

La **oxigénica** (tipo 1) es la realizada por los vegetales y entre los microorganismos por las **algas** (protistas superiores) y las **cianobacterias** (protistas inferiores), libera oxígeno y 2 ATP y 2 NADPH⁺ por vuelta y emplea agua como donador externo de electrones (litotrofos). Es considerada más reciente en la evolución en relación a la anoxigénica. Los microorganismos poseen dos fotosistemas: I generador de ATP y poder reductor y en II que libera O₂ consecuencia de la fotólisis del agua.

Es curiosa la posición de las cianobacterias, que poseyendo estructura celular procariota han evolucionado en la función fotosintética, al emplear el agua como donador externo de electrones.

La **anoxigénica** es más primitiva, es conocida como fotosíntesis bacteriana, o cíclica, los electrones de la clorofila bacteriana, o bacterioclorofila, que absorbe en el infrarojo (700nm), vuelven a ella por lo que genera sólo 1 ATP por vuelta de los electrones. Se realiza en **anaerobiosis** y surgió cuando en la atmósfera no había oxígeno. La figura 1 resume estos dos procesos. El poder reductor se produce por un flujo inverso de electrones que consume energía y por reacciones redox independientemente de la luz:

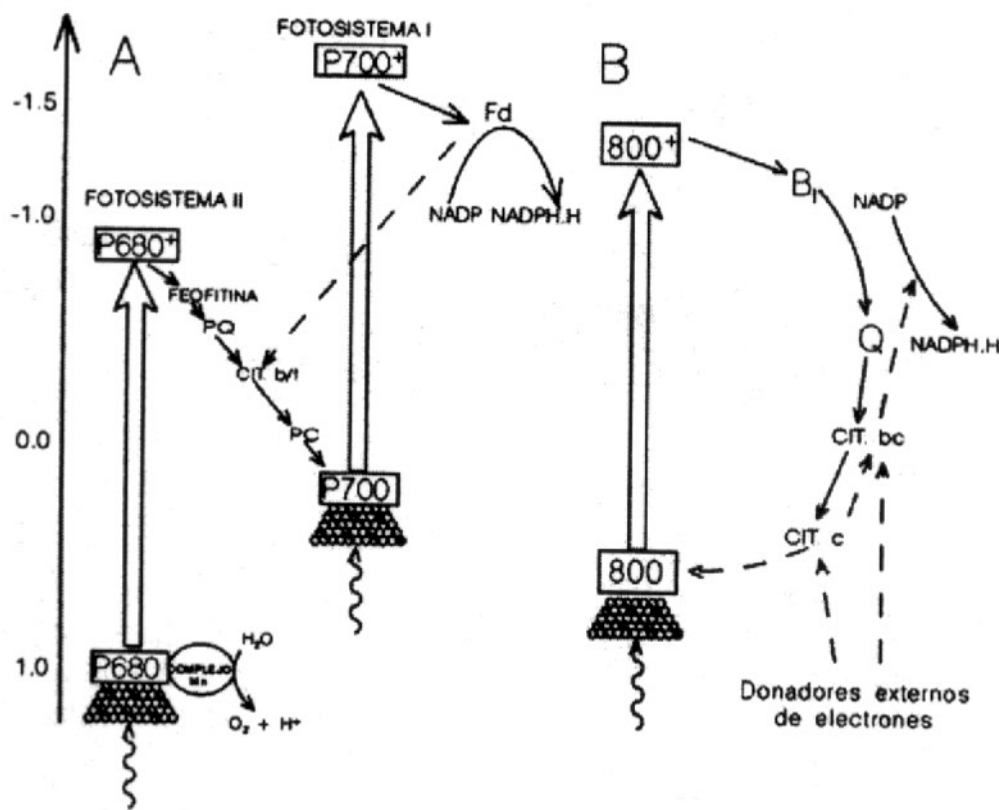


Figura 1 - Flujo de electrones en la fotosíntesis oxigénica (a) y en la anoxigénica (b)

El tipo 2) es realizado por las bacterias fotosintéticas sulfurosas purpúreas y verdes: *Chromatiaceae* y *Chlorobiaceae* (géneros más conocidos: *Chromatium* y *Chlorobium*) distinguibles por sus pigmentos. Usan H₂S o H₂ como donadores de electrones. El S⁰ acumulado en las células puede ser empleado como fuente de energía cuando crecen en quimiotrofia, sin luz. Crecen en barros o aguas en donde hubo anaerobiosis (producción de H₂S).

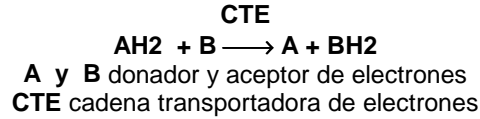
El tipo 3) y 4) lo realizan integrantes de una sola familia de bacterias fotosintéticas no sulfurosas: *Rhodospirillaceae* (género *Rhodospirillum*). No pueden emplear H₂S ni H₂ como donadores de electrones, pero sí moléculas orgánicas simples, como ácidos o alcoholes. El tipo 4) no puede reducir el CO₂ (la forma más oxidada del carbono) con la energía de la fotosíntesis, la que sólo le alcanza para reducir moléculas de estado de oxidación intermedio (ácidos) hasta carbohidratos. Son **fotoheteroorganotrofas**.

La mayoría de las bacterias fotosintéticas se desarrollan en ambientes anegados, barros, capas subsuperficiales de suelos, sucediendo a las bacterias sulfatoredutoras, que liberan ácido sulfhídrico en anaerobiosis. También la mayoría es capaz de fijar N₂, por lo que constituyen una importante herramienta de estudio; el flujo electrónico de la fotosíntesis es capaz de reducir CO₂ y N₂ en anaerobiosis.

Respiraciones

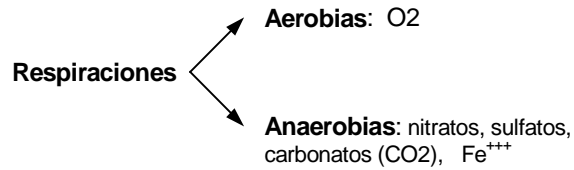
Proceso redox de obtención de energía en donde los donadores de electrones pueden ser compuestos orgánicos o inorgánicos, pero los aceptores son siempre inorgánicos (O₂ o compuestos distintos al O₂).

La ecuación general de las respiraciones se puede esquematizar:



La figura 2 muestra el flujo de electrones y de compuestos carbonados en las respiraciones, el metabolismo litotrófico y el fototróficos (Brock y Madigan, 1993)

Todos los organismos que la realizan son quimiotrofos ya que obtienen la energía de reacciones redox. Según la naturaleza de los aceptores de electrones se distinguen dos tipos de respiraciones:



En cualquiera de los casos los donadores de electrones pueden ser orgánico (lo más frecuente y eficiente) o inorgánicos.

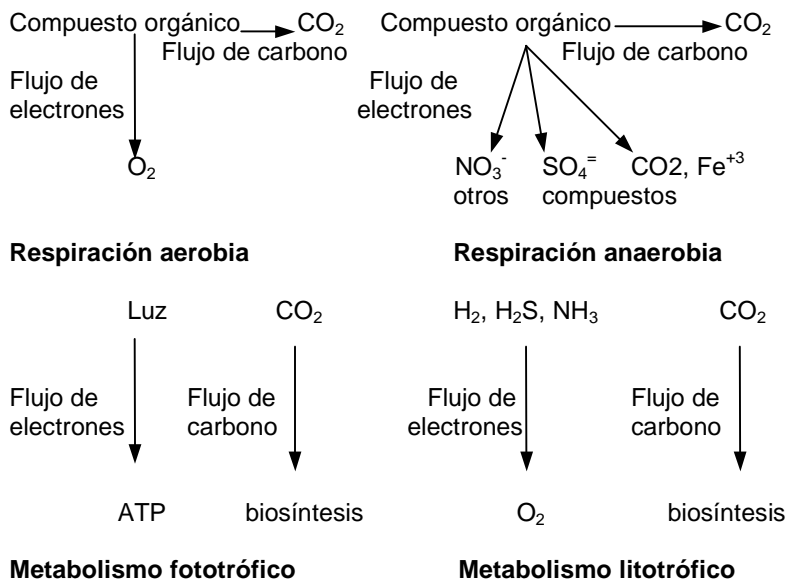
Respiraciones aerobias

Con sustrato orgánico

Los microorganismos son capaces de respirar moléculas orgánicas de naturaleza muy diversa, en orden decreciente de empleo se pueden señalar: azúcares, alcoholes, proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, hidrocarburos, almidón, pectinas, celulosa, lignina, pesticidas. La presencia de una cadena transportadora de electrones (**CTE**) que incluye varias moléculas como NAD, FAD, citocromos y culmina en el O₂, es característica de este proceso. La degradación de un mol de glucosa por esta vía rinde 38 ATP, luego del acople con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

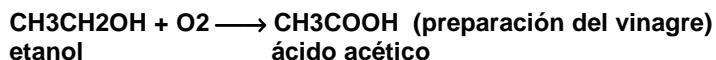


Figura 2- Flujos de carbono y de electrones en las respiraciones y metabolismo autotrófico



Esta es una respiración aerobia **completa**, ya que el sustrato es oxidado completamente a CO₂ y agua, liberando toda la energía de la molécula. Los sustratos orgánicos son degradados muy rápidamente por esta vía.

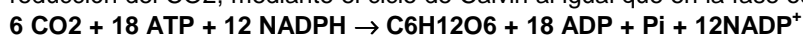
Existen casos en los que los organismos carecen de enzimas del ciclo de Krebs y no pueden llevar el sustrato a CO₂, son las respiraciones con sustrato orgánico **incompletas**:



Poseen importantes aplicaciones biotecnológicas por los productos formados, ácidos glucurónicos, ácido acético, etc.

Con sustrato inorgánico

Proceso sólo realizado por bacterias quimioautotróficas que pueden generar energía en la oxidación de compuestos minerales, en aerobiosis. Estas reacciones están acopladas con la reducción del CO₂, mediante el ciclo de Calvin al igual que en la fase oscura de la fotosíntesis:



Reconocemos 5 grupos de respiraciones aerobias con sustrato inorgánico (cuadro 2):

Cuadro 2 - Bacterias quimioautotrofas aerobias

Oxidantes	Ecuación (ATP)	Grupo Fisiológico
amonio	$\text{NH}_4^+ + 1,5\text{O}_2 = \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	Nitritantes
nitrito	$\text{NO}_2^- + 0,5 \text{ O}_2 = \text{NO}_3^- + \text{H}^+$	Nitratantes
azufre	$\text{H}_2\text{S}, \text{S}^0, \text{S}_2\text{O}_3^{2-}, \text{S}_3\text{O}_6^{2-} = \text{SO}_4^{2-}$	Sulfooxidantes
hierro	$\text{Fe}^{++} + \text{O}_2 = \text{Fe}^{+++} + \text{H}_2\text{O}$	Ferroidantes
hidrógeno	$\text{H}_2 + \text{O}_2 = \text{H}_2\text{O}$	oxidantes del H ₂

La energía que liberan estas reacciones es escasa, ya que los electrones entran a nivel de los **citocromos a y b** liberando entre 1 y 2 ATP. Como se aprecia las cadenas son más cortas que en las respiraciones aerobias y las coenzimas NADH son reoxidadas mediante un transporte inverso de electrones, con consumo de energía.

Estas bacterias crecen por lo tanto muy lentamente, su tiempo de generación es alto y la turbidez en medios de cultivo es apreciable luego de más de 3 semanas de crecimiento.

En los litótrofos la generación de ATP es en principio similar que en los organotrofos, excepto que los donadores de electrones son sustancias inorgánicas. Así, el ATP se acopla a la **oxidación del donador de electrones** y la energía de reducción se obtiene directamente a partir del compuesto inorgánico, si tiene potencial redox suficientemente bajo, o por reacciones de transporte inverso de electrones.

El cuadro 3 resume los potenciales redox en estas respiraciones que indica que varios compuestos inorgánicos que pueden dar al oxidarse con el O₂, energía suficiente para la síntesis de ATP.

Cuadro 3 - Producción de energía a partir de la oxidación de varios donadores inorgánicos de electrones

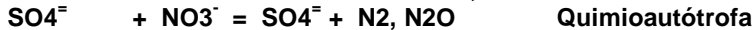
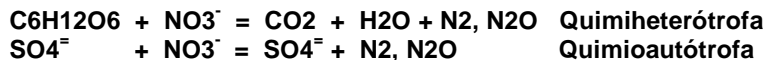
Reacción	ΔG° (kJ/reacción)
HS ⁻ + H ⁺ + 0,5O ₂ --->S ⁰ + H ₂ O	-203,2
S ⁰ + 0,5O ₂ + H ₂ O-->SO ₄ ⁼ + 2H ⁺	-589,1
NH ₄ ⁺ + 0,5O ₂ ----->NO ₂ ⁻ + 2H ⁺ + H ₂ O	-260,2
NO ₂ ⁻ + 0,5 O ₂ ----->NO ₃ ⁻	- 75,8
Fe ⁺⁺ + H ⁺ + 0,25 O ₂ ->Fe ⁺⁺⁺ + 0,5 O ₂	- 71,2
En Fe ⁺⁺ se calculó a pH 2-3, las otras a pH 7,0 - Los datos son valores promedios a los efectos de comparación.	

Su rol puede resultar muy importante en la naturaleza por la liberación de iones fundamentales para las plantas: nitratos, sulfatos. La oxidación del hierro conduce a la formación de Fe(OH)₃ insoluble, indisponible para los cultivos. Esta sustancia produce obstrucciones en las cañerías de hierro atacadas por las ferrobacterias (capítulo 10).

Respiraciones anaerobias

Procesos realizados solamente por protistas inferiores (bacterias) en anaerobiosis.

Aceptor nitratos (desnitrificación)



Proceso **perjudicial para las plantas** ya que utiliza a los a los nitratos, que se reducen a N₂ que se pierde en la atmósfera pero el proceso es **benéfico para el ambiente**, ya que es la forma de eliminar los nitratos (tóxicos para el hombre y animales) hacia la atmósfera. La desnitrificación cierra el ciclo del nitrógeno en la naturaleza.

La desnitrificación heterótrofa es la más difundida y es realizada por bacterias capaces de realizar la **reducción desasimilativa** de los nitratos, en ausencia de O₂. Estas bacterias son **anaerobias facultativas**, es decir que poseen dos cadenas transportadoras de electrones para la oxidación del mismo sustrato: una aerobia, que le rinde más energía y otra anaerobia, más corta, que rinde entre 2 y 3 ATP por mol de glucosa (capítulo 9).

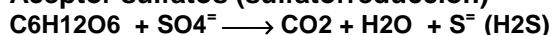
La desnitrificación autótrofa la realizan integrantes de la especie *Thiobacillus denitrificans*, únicos representantes de los *Thiobacillus* capaces de metabolismo anaerobio.

Condiciones para maximizar el proceso

- **alto nivel de donadores de electrones** (de preferencia orgánicos)
- **alto nivel de de nitratos**
- **anaerobiosis**

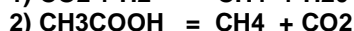
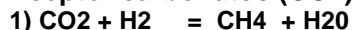
Como los nitratos se forman en aerobiosis, una **alternancia** de períodos de aerobiosis y de anaerobiosis (lluvias y anegamiento seguidos de aireación en suelos) estimula mucho este proceso que resulta muy importante en la depuración de aguas altamente contaminadas: el nitrógeno orgánico se mineraliza a nitratos en aerobiosis y se desnitrifica volatilizándose a la atmósfera como N₂ por respiración anaerobia.

Aceptor sulfatos (sulfatorreducción)



Este proceso es realizado por un grupo de bacterias **anaerobias estrictas**, es decir que sólo pueden crecer en anaerobiosis. Los géneros más conocidos son *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*. El proceso perjudica a las plantas que emplean sulfatos, pero es favorable en la depuración de cursos de aguas contaminadas, pues volatiliza formas combinadas de azufre, como gas H₂S.

Aceptor carbonatos (CO₂) Metanogénesis



Proceso muy importante en la naturaleza, permite la degradación de moléculas orgánicas hasta la producción de gas metano. Es de hecho una respiración anaerobia.

1) donde el CO₂ (carbonatos) actúa como donador y el H₂ como aceptor de electrones (autotróficas)

2) representa la metanogénesis acetoclástica, en donde bacterias quimioheterótrofas pueden desdoblar el ácido acético en metano y CO₂.

La mayoría de las bacterias metanogénicas son **Archeobacterias**, o sea las bacterias más primitivas, que sólo crecen en ambientes desprovistos de O₂, muchas veces actúan más de una especie, sinérgicamente y resulta difícil su aislamiento en cultivo puro. Las especies más estudiadas son *Methanosarcina*, *Methanococcus*.

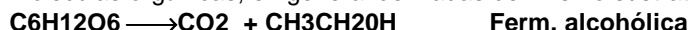
Una importante aplicación de este proceso microbiano lo constituye la biotransformación de residuos orgánicos en:

- **biogás** (mezcla de gases donde predomina el metano, con H₂, CO₂, etc) y
- **biofertilizante** un resto no contaminante que contiene la fracción lignocelulósica de los restos orgánicos y biomasa microbiana que lo hace apto para uso como mejorador de suelos.

Este proceso es muy aplicado en el tratamiento de residuos de tambos (estiércol), restos de cosechas y en la depuración de efluentes de fábricas, en anaerobiosis (capítulo 19).

Fermentaciones

Proceso redox de generación de ATP en donde los donadores y aceptores de electrones son moléculas orgánicas, en general derivadas del mismo sustrato. Ejemplos:

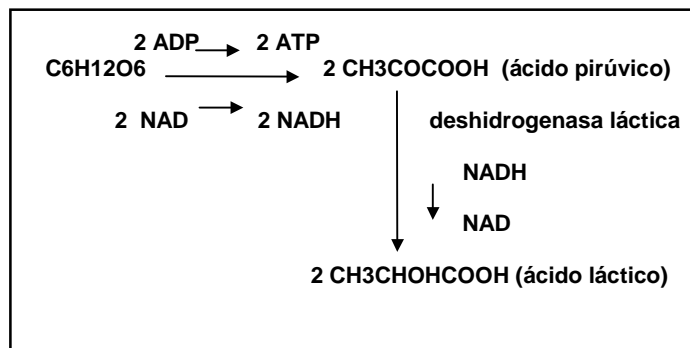


La molécula clave en este proceso es el **ácido pirúvico** producido en la vía glicolítica, donde se generan los donadores de electrones para las distintas fermentaciones (triosa-P). El tipo de fermentación dependerá de las enzimas que posea el microorganismo y de las condiciones del ambiente (cuadro 4).

Cuadro 4 - Fermentaciones alcohólica y láctica

Fermentación	don e ⁻	acep e ⁻	enzimas	prod final
alcohólica	triosa-P	acetaldehído	deshidrog. alcohólica	CO ₂ , etanol
láctica	triosa-P	ác.pirúvico	deshidrog. láctica	ác.láctico

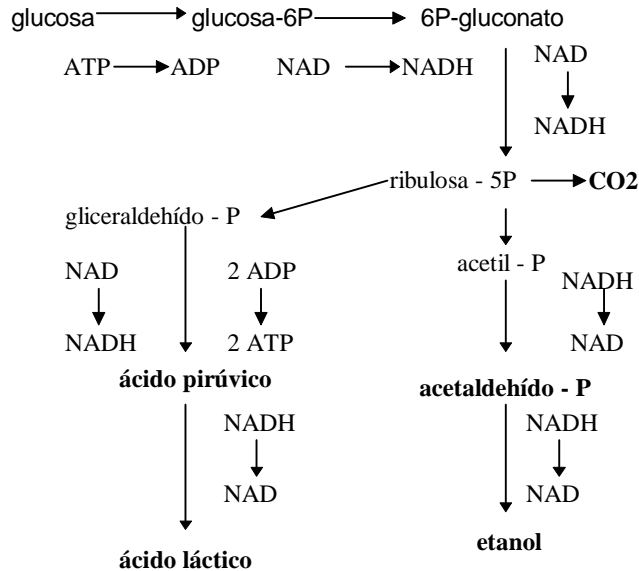
Homoláctica



Heteroláctica

Las bacterias carecen de enzimas de la vía glicolítica (aldolasa y triosafosfato isomerasa) y la degradación de la glucosa se realiza por la vía de las pentosas: oxidan glucosa-6P a 6-fosfogluconato que luego decarboxilan a pentosa-P. Esta se transforma en triosa-P y acetil-P por la enzima **fosfocetolasa**. La triosa da ácido láctico con la formación de un mol de ATP, mientras que el acetil-P acepta electrones a partir de los NADH generados en la producción de pentosa-P y se convierte en etanol sin producción de ATP. El rendimiento energético es menor: 1 solo mol de ATP, en lugar de 2 como en los homofermentadores que producen el doble de biomasa por mol de azúcar fermentado.

No se acumula poder reductor.



La producción de CO₂ es una forma sencilla de distinguir un grupo de otro. Importantes productos son formados en estos procesos, que el hombre ha aprovechado desde muy antiguo, incluso antes de conocerse el rol de los microorganismos en el proceso (capítulo 6).

El balance energético es muy bajo, 2 ATP en las fermentaciones alcohólica y láctica y 1 en la heteroláctica. No se genera poder reductor, por lo cual el microorganismo debe oxidar gran cantidad de sustrato para lograr desarrollarse. Se cree que es el metabolismo bioenergético más antiguo, cuando no existía el O₂. Los microorganismos fermentadores se han adaptado a las nuevas condiciones de la atmósfera, realizando el mismo proceso que sus ancestros.

Otras **fermentaciones** producen moléculas de gran valor económico: acetona, butanol, propanol, ácido acético, butírico, etc. y resulta más económico su producción vía fermentaciones que por síntesis química. A modo de **resumen**, en el cuadro 5 se presentan los distintos tipos nutricionales de los microorganismos y se indican sus estrategias bioenergéticas en aerobiosis y en anaerobiosis.

Cuadro 5 - Clasificación nutricional de los microorganismos

Fuente de energía:	Carbono: CO ₂ (autótrofos)
Luz (fotótrofos)	orgánico (heterótrofo)
Reacciones químicas	Donadores de e⁻: inorgánico (litotrofo)
(quimiotrofos)	orgánico (organotrofo)

Electromagnética: **FOTOTROFOS**

Fotoautolitotrofos * Bacterias sulfurosas purpúreas y verdes <i>(Chromatiaceae y Chlorobiaceae)</i> $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + \text{S}^0 + \text{H}_2\text{O}$ * cianobacterias $\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$	Fotoautoorganotrofo * Bacterias no sulfurosas purpúreas <i>(Rhodospirillaceae)</i> $\text{CO}_2 + \text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + \text{H}_2\text{O}$ Fotoheteroorganotrofo * Bacterias no sulfurosas $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + \text{H}_2\text{O}$ No pueden reducir el CO_2
---	--

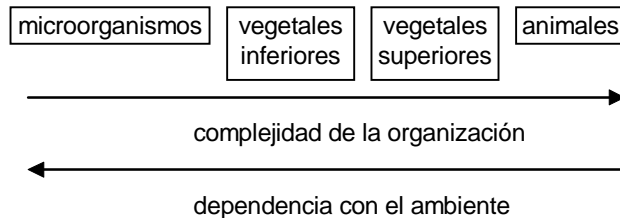
Reacciones químicas: **QUIMIOTROFOS**

Quimioautolitotrofo Bacterias: aerobias oxidantes del amonio: $\text{NH}_4^+ + 1,5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$ oxidantes del nitrito: $\text{NO}_2^- + 0,5\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$ oxidantes del azufre: $\text{S}^0 + 1,5\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 4\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ oxidantes del hierro: $\text{Fe}^{++} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+++} + \text{H}_2\text{O}$ oxidantes del hidrógeno: $\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ Bacterias anaerobias: $\text{SH}_2 + \text{NO}_3^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{N}_2$	Quimioheteroorganotrofo La mayoría de las bacterias, todos los hongos, protozoos Respiraciones aerobias $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ Respiraciones anaerobias $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{NO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$ Aceptores de electrones: Nitrato: desnitrificantes Sulfato: sulfatoreducción $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CO}_2, \text{H}_2\text{O}, \text{H}_2\text{S}$ Hierro: reducción del Fe^{+++} $\text{CO}_2/\text{carbonatos}$: metanogénesis $\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$ Fermentaciones: Donadores y aceptores de e^- : moléculas orgánicas (bacterias, hongos) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ Fermentación láctica
Grupo pequeño, gran especificidad por el sustrato, bajo rendimiento energético, por respiraciones aerobias y anaerobias con sustrato inorgánico. Crecimiento lento. Productos importantes para las plantas.	La mayoría de los microorganismos de la naturaleza. Los más eficientes: respiraciones aerobias con sustratos orgánicos.

Efecto del ambiente sobre los microorganismos

Los microorganismos están muy distribuidos en la naturaleza, en ambientes tan variables como los suelos, aguas, aire, superficie de vegetales, en animales e incluso en el hombre.

El carácter mayoritariamente unicelular o muy simple de los microorganismos los hace muy vulnerables a cambios en el ambiente:



Se aprecia una relación inversa entre complejidad de la organización de los distintos organismos y su dependencia con el ambiente. En los microorganismos toda su superficie celular está en contacto con el ambiente y cambios muy marcados en factores como la temperatura, acidez, presión osmótica, concentración de sustancias químicas, pueden detener procesos microbianos. Si los microorganismos pueden esporular, lo harán en condiciones adversas, otras veces su número decae marcadamente.

Por comodidad se dividen los **factores del ambiente** en:

- **físicos**, como la temperatura, gases, presión osmótica, pH
- **químicos**, o físico-químicos: nutrientes, sustancias antimicrobianas
- **biológicos**, otros organismos: microorganismos, micro y meso fauna, la vegetación, afectan también las actividades microbianas

Los distintos factores actúan simultáneamente y resulta difícil el estudio integrado de los efectos. En general, se varía uno de los factores, por ejemplo la temperatura de incubación y se dejan los restantes factores a niveles constantes y óptimos. Se evalúa el crecimiento del microorganismo en estudio determinando su velocidad de crecimiento, tiempo de generación o la cosecha máxima (log N° de células a las que llega con y sin la incidencia del factor en estudio).

Efecto de algunos factores del ambiente

Físicos

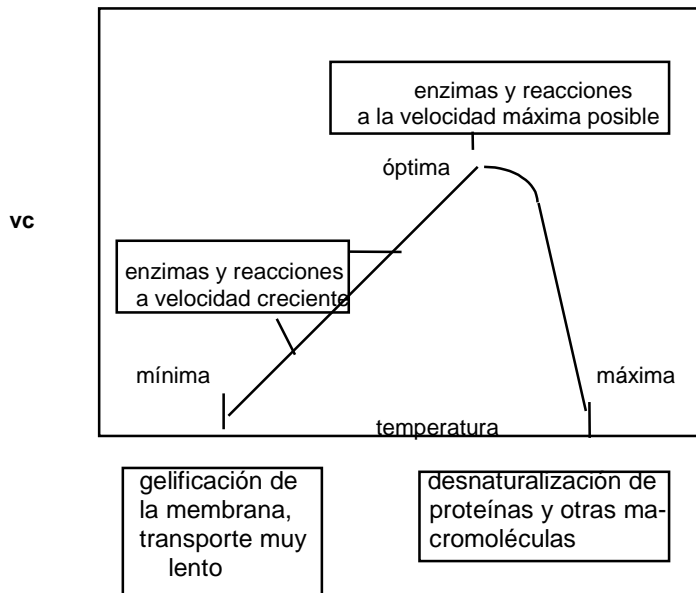
Temperatura: según los rangos de temperatura en que pueden desarrollarse los distintos grupos microbianos, se los clasifica en:

tipos	rango de temperatura	óptimo
sicrófilos	0-20°C	15°C
mesófilos	15-45°C	35°C
termófilos	40-70°C	55°C

La mayoría de los habitantes de los ecosistemas naturales son **mesófilos**, incluidos los patógenos de animales y el hombre. Se encuentran sicrófilos sobre glaciales, suelos congelados, a los que colorean con sus pigmentos, son sobre todo algas y cianobacterias. La mayoría de los microorganismos activos en suelos en períodos fríos del invierno se consideran mesófilos resistentes, más que verdaderos sicrófilos. Algunos hongos se desarrollan en heladeras (5°C) donde deterioran alimentos.

Los **termófilos** son los más activos metabólicamente, sabemos que las reacciones químicas duplican su velocidad por cada aumento de 10°C de la temperatura, hasta un valor en que se desnaturalizan macromoléculas importantes, como ácidos nucleicos, proteínas, etc. La figura 3 muestra el efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano. La curva no es simétrica precisamente por la desnaturalización rápida que ocurre no bien se excede la temperatura óptima de crecimiento. Los termófilos son reponsables de importantes procesos microbianos en pilas de restos orgánicos, en el compostaje, etc., donde la temperatura se eleva localmente (capítulo 19).

Figura 3- Efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano (vc = velocidad de crecimiento)



Las **bajas temperaturas** se emplean para **conservar** alimentos, microorganismos, etc. Estos se mezclan con una sustancia que baja el punto de congelamiento, como el glicerol (30-50% en volumen) a los efectos de no inducir lesiones en las membranas por los cristales de hielo formados y se conservan en pequeños tubos a -70°C .

Las **altas temperaturas** se usan para **esterilizar**. La destrucción de los microorganismos por el calor se realiza por:

- **calor seco**, en hornos, estufas a $160-180^{\circ}\text{C}$ por dos horas, se emplea en materiales de vidrio, utensilios.
- **calor húmedo**, en autoclaves, a $115-120^{\circ}\text{C}$ (1 atmósfera de sobrepresión) por 20 minutos. El aumento de la presión sobre la atmosférica eleva el punto de ebullición del agua. El vapor de agua asegura la rápida difusión del calor en los medios de cultivos, materiales, etc.

En ambos casos los materiales deben acondicionarse para evitar su contaminación posterior: cajas de Petri envueltas en papel, pipetas en estuches especiales, etc.

Muchos materiales termolábiles se esterilizan por **tindalización**: aplicación de calor a 100°C durante media hora por tres días consecutivos. Las esporas resistentes al calor germinan en los períodos entre los calentamientos y son eliminados luego a 100°C .

pH

Si bien el pH interno de las células es neutro, los microorganismos poseen mecanismos de control de entrada y salida de protones y cationes a nivel de la membrana y pueden desarrollarse en amplios rangos de concentración hidrogeniónica:

tipos	rango de pH	óptimo
acidófilos	0-7	5
neutrófilos	5-12	7
basófilos	9-14	10

En ambientes de pH bajo dominan bacterias fermentativas, como las lácticas, las anaerobias y hongos, que si bien son neutrófilos como grupo, se favorecen en ambientes ácidos por falta de competencia de las bacterias. Los medios de cultivo se acidifican con ácidos orgánicos, láctico, acético, ya que penetran en la célula sin disociarse y dentro liberan los protones que alteran el pH interno de las células.

Por el efecto sobre el **pH del ambiente** se distinguen microorganismos:

- **acidófilos:** bajan el pH de restos vegetales en los silos, de suelos, en la leche, por producción de ácidos (láctico, etc.) o por consumo de álcalis, como el amonio.
- **alcalinizantes:** suben el pH del ambiente por consumo de ácidos (deterioro de los silos al metabolizarse el ácido láctico), o por liberación de bases, como aminas, amonio.

Presión osmótica

Los microorganismos deben desarrollarse en medios con adecuadas concentraciones de solutos. Si ésta no se controla, los organismos no se desarrollan e incluso se llega a la lisis celular. El cuadro 4 muestra el efecto de la concentración de solutos.

Cuadro 4 -Efecto de la presión osmótica en los microorganismos

medios	efectos
isotónico	turgente , la célula se divide
hipotónico	plasmoptisis , la célula se llena de agua y si la membrana y pared no resisten la presión osmótica, la célula estalla (irreversible)
hipertónico	plasmólisis: la célula pierde agua el citoplasma se retrae. Algunas células pueden recuperarse al colocarlas en medio isotónico. Caso de conservación de alimentos por alta concentración de sal o azúcares

Gases

El oxígeno afecta a los microorganismos y éstos se clasifican por sus relaciones con este gas (cuadro 5)

Otros gases que inciden en los microorganismos con el N₂, CO₂, H₂, CH₄. Algunos de ellos, como el N₂ es reducido biológicamente solamente por un grupo bacteriano: los fijadores de N₂ que son analizados en otro capítulo.

Medios y condiciones de cultivo

Los microorganismos son aislados de la naturaleza colocándoles en **medios de cultivo** líquidos o sólidos que son formulaciones que incluyen todos los **nutrientes** que los microorganismos requieren como fuentes de energía, de C, N, S, P, Na, K, etc. Se debe tener en cuenta además, las **condiciones de cultivo**, que incluyen niveles adecuados de O₂, CO₂, N₂, isotonía dada por los solutos en solución, radiaciones, pH adecuados

Cuadro 5 - Relaciones entre los microorganismo y el O₂

grupo	efecto del O ₂
Aerobios	
obligados	lo requieren
facultativos	no lo requieren pero el desarrollo es mejor con O ₂
microaerófilicos	lo requieren pero a niveles menores que el atmosférico
Anaerobios	
aerotolerantes	no lo requiere y el desarrollo es mejor con O ₂
anaerobios obligados (estrictos)	los dañan o es letal

Muchas veces se aprecian fracasos en aislamientos de organismos debido a pequeñas variaciones en los niveles de nutrientes o en las condiciones de cultivo.

Químicos

Las sustancias químicas pueden ejercer distintos efectos sobre el desarrollo de los microorganismos:

- **no afectarlo**
- **estimularlo, se les llama nutrientes**
- **inhibirlo, sustancias microbiostática y microbicida, con y sin lisis (microlítica)**

La figura 4 muestra alguno de estos efectos en un cultivo bacteriano creciendo exponencialmente en un medio líquido. En el momento indicado por la flecha se ha agregado una concentración inhibitoria de la sustancia en estudio. Se aprecia diferencia en los recuentos de células totales y viables, consecuencia de la lisis celular.

La ubicación de una sustancia química en alguna de estas categorías es muchas veces arbitraria ya que una misma sustancia puede ser nutriente o bacteriostático dependiendo de la concentración, como es el caso de los azúcares que al 1% son nutrientes para la mayoría de los microorganismos, pero a altas dosis prevén el crecimiento por plasmólisis (conservación de alimentos).

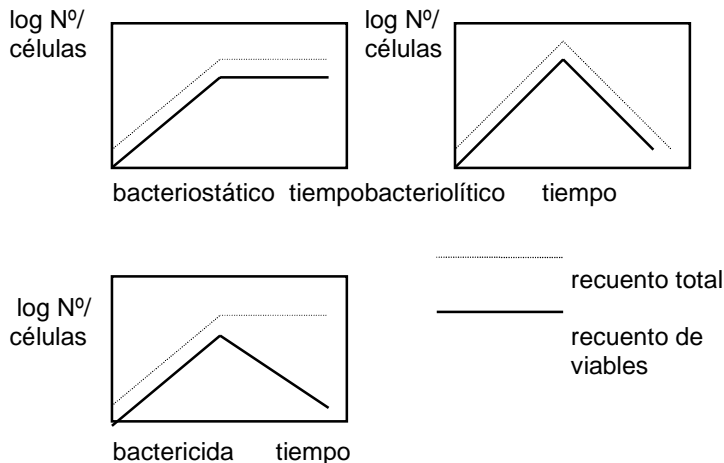
Características de un nutriente:

- poder atravesar la membrana celular por transporte pasivo o activo
- ser utilizada por alguna enzima de la célula
- proveer energía o sub-unidades de las macromoléculas

Prácticamente cualquier sustancia orgánica de origen biológico es utilizada por algún grupo de microorganismo.

Figura 4- Tres tipos de acción de agentes microbianos

- a) bacteriostático, b) bactericida sin lisis,
c) bactericida con lisis



Aquellas sustancias naturales o artificiales que se acumulan en los ecosistemas a concentraciones no deseables para las comunidades naturales, se denominan **recalcitrantes** (capítulo 20).

Por su **toxicidad**, las sustancias químicas se clasifican en:

- **toxicidad no-selectiva**, el agente actúa sobre todo tipo de células: microbianas, del hospedante. Son conocidos los **antisépticos**, que son efectivos sobre mucosas (colorantes, sales de mercurio, etc.) y los **desinfectantes** aplicados sobre superficies inertes (alcoholes, jabones, cresoles). Esta separación también es arbitraria, pues los efectos dependen de la concentración. Actúan, en general, a altas concentraciones.
- **toxicidad selectiva**, son más tóxicos para las células microbianas (incluso para Gram positivas y no para Gram negativas) y son inocuas para las células del hospedante. Estos son los agentes **quimioterapéuticos**, de gran empleo en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Son efectivas a muy bajas concentraciones.

Por sus efectos en el equilibrio biológico en ambientes naturales volveremos en el estudio de algunas de estas sustancias: las **bacteriocinas, las toxinas, enzimas, antibióticos** en el capítulo 13.

Ambiente biológico

Por la importancia de las interacciones entre los microorganismos y otros organismos en los ecosistemas naturales (ejemplo en el ecosistema suelo-planta), el tema es analizado desde el capítulo 13 al 17.

Bibliografía

BROCK, T. D. y M. T. MADIGAN 1993 **Microbiología** Prentice Hall Hispanoamericana S. A. México

STANIER, R. Y. , E. A. ADELBERG y J. INGRAHAM 1976 **Microbial World**, Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, Nueva Jersey

Capítulo 3

Los Protistas inferiores

En el presente y en el siguiente capítulo analizaremos a los microorganismos que juegan importante rol en la naturaleza, comparando sus caracteres nutritivos, su distribución y las transformaciones de la materia orgánica y mineral que llevan a cabo en ambientes naturales.

Las bacterias típicas

Constituyen el grupo de organismos más abundante en la naturaleza y se ven favorecidas por su rápido desarrollo y capacidad para atacar innumerables sustancias. **No existe prácticamente sustancia de origen biológico que no sea atacada por algún tipo de bacteria.** Materiales como la celulosa o la lignina son más lentamente degradados en relación a otros sustratos, como proteínas, azúcares simples, almidón.

Más de 250 especies han sido aisladas del suelo y si a esta cifra se agregan las asociadas a los restos vegetales, el número de especies bacterianas reconocidas en el suelo, supera las 800.

Presentan tamaño reducido (cerca de $0,5-1,0 \mu\text{m} \times 1,0-1, \mu\text{m}$ y sus células se pueden presentar de tres formas:

- **células esféricas o cocos**
- **cilindros o bastones (bacilos)**
- **espiraladas o helicoidales (espirilos)**

Los diferentes tipos de arreglos de las células luego de la división binaria en medio líquido, presentan carácter taxonómico y así encontramos:

Cocos: diplococos (de a dos), tétradas (4), sarcinas (8), estreptococos (en cadena), estafilococos (en racimo).

Bacilos: diplobacilos (de a dos), estreptobacilos (en cadena), en empalizada (uno a continuación de otro divididos por plano longitudinal)

Espirilos: célula con curvatura o en vibrio (forma de coma)

Criterios taxonómicos

Taxonomía clásica

Se aplica desde hace más de 100 años y tiene en cuenta los caracteres:

- **morfológicos**, incluyen el tamaño, la forma y los tipos de agrupación luego de la división binaria. Dado el pequeño tamaño de las bacterias estos datos resultan a veces limitantes.
- **tintoriales**, reacciones frente a la coloración de Gram, otras coloraciones (esporas, flagelos).
- **fisiológicos y bioquímicos**, requerimientos nutritivos, fuentes de C, N, S, vitaminas, etc., energía, resistencias
- **patológicos y serológicos**, producción de enfermedades, reacciones inmunoquímicas por producción de antisueros en animales de sangre caliente, como conejos, cobayos. Los anticuerpos generados reconocen a los antígenos bacterianos (de pared, flagelos) en reacciones muy sensibles.

Entre los distintos arreglos taxonómicos de las bacterias se emplea mucho la norteamericana contenida en el **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Allí se ubican a las bacterias:

Reino: Prokaryotae

División 1 Gracilicutes

- Clase 1 **Scotobacteria, bacterias Gram negativas**
- Clase 2 **Anoxyphotobacteria, bacterias fotosintéticas**
- Clase 3 **Oxyphotobacteria, principalmente cianobacterias**

División 2 Firmicutes

- Clase 1 **Firmibacteria, bacilos Gram positivos**
Thallobacteria, Gram positivas ramificadas

División 3 Tenericutes

- Clase 1 **Mollicutes, bacterias sin pared**

División 4 Mendosicutes
Clase 1 Archaeobacteria, Archeobacterias

Se nombran por un sistema binomial, por ejemplo: *Bacillus subtilis* (mayúscula para el género y minúscula para la especie, en letras itálicas o subrayadas)

Taxonomía genética

Las técnicas de biología molecular abrieron nuevas perspectivas en la caracterización de los protistas inferiores. Se analizan:

- **composición de bases del ADN** (guanina/citosina %)
- **hibridación de ADN, ARN, con empleo de sondas**
- **estudio de polimorfismo** de segmentos de ADN o ARN amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se obtiene, luego de separación electroforética, un código de líneas según los trozos de ADN que permite identificar bacterias y hongos y seguirlos en ambientes altamente colonizados, como el suelo y aguas.

La composición de bases del ADN expresada como el porcentaje de moles de GC varían dentro de límites muy amplios: tan bajos como 20% y tan altas como 78% ocurren en los procariotas. En general, organismos con fenotipos muy semejantes suelen tener, pero no siempre, relaciones de bases en el ADN semejantes, pero si se encuentra que 2 organismos están estrechamente relacionados por criterios fenotípicos, pero poseen relaciones de bases complementarias muy diferentes, un examen más profundo mostrará que no estaban tan próximos. Puede ocurrir lo contrario, ya que una misma proporción de bases puede reflejar una gran variedad de **secuencias** diferentes.

Taxonomía numérica

Esta técnica permite analizar gran número de caracteres, cada uno con igual importancia, por ejemplo: presencia de esporas, flagelos, tipo de coloraciones, empleo de sustratos, resistencias, nodulación, y finalmente la presencia o ausencia de las bandas de los segmentos de ADN amplificados. Ejemplo para pocos caracteres:

Carácter	Cepas	A	B	C	D	Homología entre 2 cepas		
1		+	+	-	0	A		
2		+	+	+	+	B	+	-
3		0	+	-	+	+	a(32)	b(4)
"		"	"	"	"	-	c(6)	d(8)

$$\text{Coeficiente de similitud: } \frac{a}{a+b+c} = \frac{32}{32+4+46} = 76\%$$

La construcción de matrices y su análisis en computación permite el agrupamiento de organismos por su semejanza. Aquellos aislamientos con similitud superior al 80% se denominan **fenones** y podrían estar muy relacionados filogenéticamente.

Otras formas de agrupamiento

Las bacterias se pueden clasificar según otros criterios. Del punto de vista **ecológico**, se reconocen las

- **autóctonas** son los verdaderos residentes del ambiente en estudio, como el suelo, su número no varía mucho en el año y son en general formas cocoides o coco bacilos, capaces de esporular.
- **las alóctonas** (o **zimógenas**) son fermentadoras más activas y su número es reflejo del tratamiento que sufrió el suelo. Llegan a él por precipitaciones, tejidos enfermos, abonos, aguas y pueden permanecer en estado latente, desarrollándose por cortos períodos de tiempo.

Son muy empleados los **grupos fisiológicos**, integrados por organismos muchas veces de taxonomía muy diferente (bacterias, aerobias o anaerobias, hongos, etc.), pero que poseen una función metabólica común. Así estudiaremos a los microorganismos nitrificantes, desnitrificantes, fijadores de N₂, celulolíticos, solubilizadores de fosfatos, etc. La evaluación de la actividad de estos grupos fisiológicos, sin detallar la composición taxonómica de sus integrantes, constituye una herramienta muy útil en estudios sobre ecología microbiana.

Ecología

El número y actividad de las bacterias en un ambiente natural, como suelo, aguas, están afectados por el habitat, las prácticas culturales, las condiciones ambientales.

La materia orgánica es uno de los factores que más inciden en la distribución de las bacterias del suelo, que, como vimos, son en su gran mayoría heterótrofas. Suelos ricos en humus poseen mayor densidad bacteriana y la incorporación de restos frescos (abonos verdes) o pajas inicia una rápida estimulación microbiana, muy marcada en los primeros meses, disminuyendo a medida que el sustrato se degrada. Suelos de pastura presentan también densidades bacterianas superiores a las de suelos arados y cultivados con maíz u otros cereales, como consecuencia de la mayor masa radical (descamación, exudación). La mayoría de los cuadros siguientes pertenecen a Waksman, (1952).

El cuadro 1 presenta resultados de recuentos de varios grupos microbianos, en el perfil del suelo, y se observa que la materia orgánica es uno de los principales factores que explican la disminución de los grupos heterótrofos, con la profundidad.

En el cuadro 2, en otro estudio en el suelo, se observa el efecto de los mismos factores sobre la población bacteriana.

Cuadro 1- Grupos microbianos en el perfil de un suelo

horizonte (cm)	bacterias		actinomicetes	hongos	algas	protozoos
	aerobias	anaerobias				
Ao (0-10)	1.116.915	1.000	11.335	303.000	500	640
A1 (10-12)	1.111.000	70.000	16.000	165.000	5.000	320
A2 (12-20)	317.640	181.000	11.950	77.500	100	40
B (20-49)	19.750	700.000	7.250	14.740	100	10
C (50-100)	463	10.000	197	1.850	0	0

Cuadro 2- Efecto de la materia orgánica sobre bacterias

horizonte (cm)	M.O%	bacterias (10^6 /g)	
		aerobias	anaerobias
A1 (0-6)	8,00	149,2	1,0
A2 (6-12)	3,11	131,8	1,8
B1 (12-24)	2,41	108,3	10,0
B2 (26-48)	1,70	45,3	1,0
C (48-80)	0,80	6,0	0,01

La humedad afecta la actividad microbiana en dos aspectos: un cierto nivel es necesario ya que el agua es un nutriente esencial y las reacciones bioquímicas se realizan solamente en medio acuoso, pero cuando el aporte es excesivo se limita la difusión del oxígeno, creándose condiciones anaerobias. La máxima densidad bacteriana se encuentra en niveles de humedad comprendidos entre el **50 y el 75% de la capacidad de campo**. La saturación trae aparejada disminución en las bacterias aerobias y aumento de las anaerobias.

El cuadro 3 muestra el efecto de humedad sobre la densidad de bacterias de un suelo.

Cuadro 3- Humedad del suelo y número de bacterias

% humedad	% de la capacidad de campo	bacterias totales (miles/g)	%relativo a la microflora total
6,5	30	9.980	33
10,0	50	11.890	40
16,1	65	16.410	55
17,4	70	29.960	100
21,7	100	25.280	84

La temperatura es un factor de primer orden, ya que regula todos los procesos biológicos, afecta tanto el número como la composición cualitativa de una comunidad. La mayoría de las bacterias del suelo y de las aguas son **mesófilas**. En el suelo no son frecuentes las bacterias sicrofílicas

(desarrollo mejor debajo de 20°C), sino que las encontradas en los meses fríos de invierno son más bien **mesófilas tolerantes** al frío. Las termófilas (que crecen rápidamente a 45-65°C, los verdaderos termófilos son incapaces de reproducirse debajo de 40°C) son abundantes en hábitat donde ocurren fermentaciones y la temperatura se eleva localmente.

pH. La acidez o la alcalinidad inhiben a muchas bacterias del suelo; el óptimo de la mayoría de las especies es la neutralidad. En bajos pH se reduce el número de bacterias y el encalado generalmente favorece el desarrollo bacteriano. El pH del medio actúa modificando la asimilación de compuestos nutritivos minerales u orgánicos.

El cuadro 4 muestra el efecto del tipo de suelo y su pH en ciertos grupos microbianos.

Cuadro 4- Efecto del tipo de suelo y su pH en los microorganismos

suelo	pH	bacterias	actinomicetes	hongos
gris margoso	7,8	18.209	2.230.250	36.000
pardo arcilloso	7,6	2.230.000	1.700.000	59.000
arcilloso	6,4	1.650.000	245.000	74.500
suelo tropical	4,4	127.000	75.000	245.000
podzol arenoso	3,8	16.000	22.000	125.000

Nutrientes inorgánicos. Son necesarios para el desarrollo de la población microbiana, la que responde a la aplicación de fertilizantes amoniacales que se oxidan a nitratos.

El laboreo altera la estructura y porosidad del suelo, favoreciendo el movimiento del aire y el régimen hídrico. Las partículas de humus se exponen a la acción bacteriana. En áreas en donde la erosión eólica es muy marcada y el suelo puede perderse entre el período de arada y siembra, se aplican prácticas de **labranza mínima y cero**. La actividad biológica es aquí menos afectada y la materia orgánica está menos expuesta a la biodegradación. El uso de herbicidas para eliminar las malezas puede afectar algunos procesos, como la nitrificación, la fijación del N₂, y la solubilización de fosfatos.

Variaciones estacionales: inciden numerosos factores, los más importantes son la humedad, la temperatura y los aportes de sustancias energéticas por parte de los vegetales: mantillos, exudados radicales, restos de cosechas, etc. Resulta difícil demostrar fehacientemente las variaciones estacionales en los distintos grupos de microorganismos del suelo; es necesario efectuar numerosos muestreos pues muchas veces el elevado error experimental enmascara los efectos estacionales. Además, en bacterias, los cambios en densidades ocurren en pocas horas.

En general, puede decirse que en regiones de clima templado la mayor actividad se registra en primavera, cuando la temperatura aumenta y los restos vegetales son fácilmente degradados. Algo similar ocurre en otoño, debido al aumento de la humedad y al aporte de residuos y tejidos aéreos, con declinación en invierno y en los meses cálidos y secos del verano. Existen, por supuesto, importantes diferencias zonales, en donde los picos de actividad pueden desplazarse en el año, de acuerdo a las variaciones de temperatura y humedad.

Funciones en la naturaleza

Las bacterias constituyen el grupo de microorganismos con mayor versatilidad metabólica. En efecto, son **autótrofas**: foto o quimioautótrofas y **heterótrofas** (aerobias o anaerobias). El primer grupo, menos numeroso en el suelo, interviene en procesos de producción de materia orgánica y en reacciones redox liberando compuestos que favorecen la nutrición vegetal: nitratos, sulfatos. Las heterótrofas intervienen en los procesos biológicos de degradación de compuestos carbonados y de síntesis de humus. Intervienen también activamente en interacciones sinérgicas o antagónicas con otros microorganismos y con los vegetales.

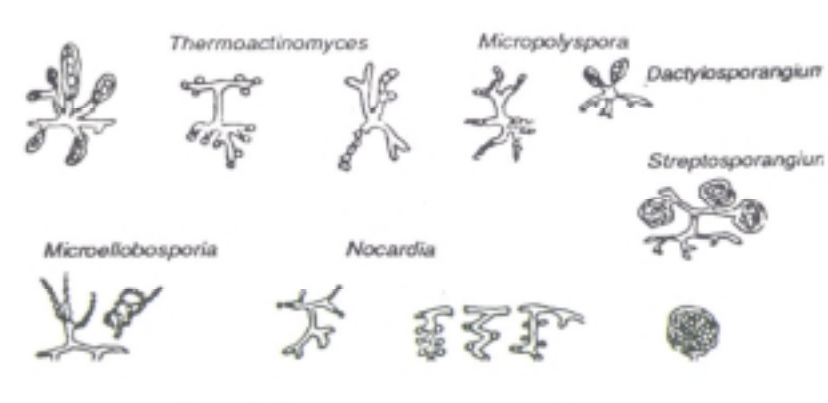
Los actinomicetes

Las bacterias verdaderas se diferencian marcadamente de los hongos filamentosos. Los actinomicetes se encuentran entre ambos grupos, aunque pertenecen formalmente a las bacterias, al orden *Actinomycetales* y son organismos Gram positivos, de estructura vegetativa de tipo miceliar (Stanier *et al*, 1976), desarrollo confinado sólo a bacterias Gram positivas. Algunos de

estos organismos, los **Euactinomicetes**, se desarrollan sólo en estado miceliar, reproduciéndose por formación de esporas unicelulares diferenciadas en el extremo de la hifa. En un segundo grupo, el de los **Proactinomicetes**, el desarrollo miceliar es transitorio, no se producen esporas y la reproducción ocurre primariamente por fragmentación miceliar en células cortas de tipo bacilar.

Los euactinomicetes: los ambientes naturales contienen una gran población, que se agrupan en pocas familias (figura 1).

Figura 1 - Principales grupos de actinomicetes



1. **Streptomycetaceae:** las hifas usualmente fragmentan, micelio aéreo extensivo y cadenas de esporas con 5-50 o más conidios por cadena. Géneros típicos: *Streptomyces*, *Microellorobosporia*, *Sporichthya*.
2. **Nocardiaceae:** hifas típicamente fragmentadas para dar pequeñas esporas.
3. **Micromonosporaceae:** hifas que no se fragmentan, los conidios se presentan solos, en pares, o en cortas cadenas. Géneros: *Micromonospora*, *Microbispora*, *Micropolyspora*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Actinobifida*.
4. **Actinoplanaceae:** esporas en esporangios, diámetro de la hifa 0,2- 2 μ m. Géneros: *Streptosporangium*, *Actinoplanes*, *Planibispora*, *Dactylosporangium*.
5. **Dermatophilaceae:** los fragmentos de hifas se dividen para dar gran número de estructuras redondas, móviles. Género: *Geodermatophilus*.
6. **Frankiaceae:** habitan nódulos radicales en ciertas no-leguminosas. Se han logrado reproducir fuera del huésped. Género: *Frankia*.
7. **Actinomycetaceae:** no forman verdadero micelio, comúnmente anaerobias facultativas. Género: *Actinomyces*.

De los numerosos géneros de euactinomicetes, el más amplio es *Streptomyces*, que pueden representar más del 70-90% de las colonias desarrolladas en medio sólido. Son muy abundantes en el suelo, al cual le confieren el olor característico a tierra húmeda, atribuible a sustancias volátiles que producen. Este grupo ha adquirido importancia económica, por el gran número de antibióticos formados como metabolitos secundarios. Las esporas tienen rol reproductivo y son diseminadas por el aire o el agua. *Thermoactinomyces* produce esporas extremadamente resistentes al calor, similares a las endosporas de las bacterias típicas y la temperatura máxima de crecimiento es de 65-68°C. Son activos en compostajes (capítulo 8, tomo 2), o abonos. Los representantes del género *Frankia* se asocian simbióticamente a especies de no-leguminosas (capítulo 16).

Actividades y ecología

- la densidad de este grupo en el suelo es por lo general de 3 a 15 veces menor que la de las bacterias, dominando sobre todo los géneros *Streptomyces* y *Nocardia* (Dommergues, Mangenot, 1970)
- la mayoría de las especies son **mesófilas** (óptimo 25-30°C, aunque hay especies termófilas)

- abundan en suelos de **pH 6,8-8,0** y sólo excepcionalmente en suelos de pH inferior a 5,0. Esta sensibilidad a pH ácidos es empleada en el control de organismos fitopatógenos
- si la humedad es abundante y la temperatura no muy elevada, se los encuentra en forma **vegetativa**
- en condiciones extremas de desecación y/o altas temperaturas, dominan en forma de **conidios**
- dominan en suelos alcalinos
- disminuyen con la profundidad, aunque el porcentaje de actinomicetes en relación a la microflora total aumenta con la profundidad y constituyen gran proporción de la población en horizontes inferiores
- disminuyen con la inundación (la mayoría son aerobios)
- por su capacidad para sobrevivir en condiciones desfavorables, constituyen uno de los grupos más distribuidos en los suelos

Funciones

- **Degradación de compuestos resistentes:** responden al agregado de materiales carbonados varias semanas más tarde, pues son débiles competidores frente a bacterias y hongos, cuando abundan los compuestos simples. Su participación aumenta cuando quedan materiales resistentes
- **Formación de humus:** muchas especies producen en medio de cultivo moléculas complejas, a las que se presume muy importantes en la humificación
- **Transformaciones a altas temperaturas:** sobre todo en la podredumbre y calentamiento de abonos verdes, heno, compost abonos animales. Los termófilos son el grupo dominante y las superficies de los composts toman color blanco o gris típico de este grupo
- **Enfermedades en vegetales:** como la podredumbre negra de la papa y la viruela de la batata, por *Streptomyces scabies* y *Streptomyces ipomoeae*, respectivamente
- **Infecciones en el hombre y animales:** por ejemplo, por *Nocardia asteroides* y *Nocardia otitidis-caviarum*
- **Antagonismos microbianos:** síntesis de antibióticos, enzimas líticas (quitinasas, celulasas, hidrolasas)
- **Producción de sustancias probióticas,** como vitaminas (B1, B2, B6, B12, biotina, ácido fólico)
- **Fijación biológica de N₂:** el género *Frankia* forma nódulos con no-leguminosas

Las cianobacterias

Este grupo considerado como cianofíceas en la taxonomía antigua, ha sido incluido entre las bacterias, ya que poseen estructura y organización de protistas inferiores (figura 2). Es un caso bastante sorprendente, en donde la evolución fisiológica (fotosíntesis oxigénica) precedió a la evolución estructural (Carr y Whitton, 1982). Son organismos unicelulares, filamentosos o cenocíticos, sin flagelos. Poseen clorofila tipo a, ficocianina (azul) y ficoeritrina (rojo) cuyas combinaciones les dan la coloración característica.

Algunos integrantes del grupo pueden crecer en la oscuridad a expensas de materiales orgánicos simples, como la glucosa, aunque más lentamente que a la luz (respiración aerobia). No poseen las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sobretudo la enzima clave, la alfa ceto-glutarato deshidrogenasa, por lo que deben degradar los compuestos por la vía oxidativa de las pentosas-fosfato. Las fotoautótrofas obligadas, carecen de permeasas específicas para la incorporación de azúcares, pero poseen las enzimas del ciclo de las pentosas-P (Stanier *et al*, 1976) y no se pueden desarrollar en la oscuridad.

Muchos integrantes del grupo poseen la doble capacidad de fijar carbono y nitrógeno (reducen el CO₂ y el N₂) y por su importancia ecológica, como colonizadoras de suelos quemados, erosionados, degradados, donde se desarrollan a partir de sales, agua y luz, serán tratadas en el capítulo 3, tomo 2. Es de destacar también las asociaciones con vegetales: con briofitas, helechos (*Azolla*) y con hongos (líquenes), en donde la fijación del N₂ es más eficiente. Se encuentran en habitats cuyos rangos son más amplios que los del resto de los procariotas fotosintéticos: suelo, mar, aguas frescas, ambientes pobres en nitrógeno. Muchas especies son termófilas y crecen

abundantemente en aguas termales neutras o alcalinas, incluso hasta 70°C. En general son inhibidas por pH bajos.

Los suelos desérticos son ambientes en donde la población microbiana fotosintética consiste casi enteramente en cianobacterias unicelulares protegidas de la intensa insolación y desecación entre partículas de cuarzo.

En lagos eutróficos (abundancia de minerales) se observa un desarrollo masivo de estas bacterias en los meses cálidos. Poseen vacuolas de gas que les permiten flotar en la superficie dando las densas matas gelatinosas (*bloom*).

Figura 2- *Anabaena*, cianobacteria heterocística fijadora de N₂



Bibliografía

- ALEXANDER, M., 1977 **Introduction to Soil Microbiology**, Wiley & Sons, Nueva York.
- CARR, N.G. y WHITTON, B.A., 1982 **Biology of cyanobacteria**, Botanical monographs, vol. 19, Univ. California Press, Berkeley.
- DOMMERGUES, Y. y MANGENOT, F., 1970 **Ecologie Microbienne du Sol**, Masson et Cie., París.
- LECHEVALIER, H.A. y PRAMER, D. 1971 **The Microbes**, Lippincott (ed.), Filadelfia.
- STANIER, R. Y., ADELBERG, E. A. y INGRAHAM, J., 1976 **The Microbial World**, 4a ed., Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, Nueva Jersey.
- WAKSMAN, S. A., 1952, **Soil Microbiology**, Wiley & Sons, Nueva York.

Capítulo 4

Los Protistas superiores

Introducción

Este grupo comprende a un conjunto muy diverso de organismos cuyo estudio ha sido abordado por distintas disciplinas: **Ficología, Micología y Protozoología**. Esta diversificación se explica por el hecho de que los botánicos reconocieron a las algas y a los hongos como plantas y los zoólogos a los protozoos como animales.

Actualmente se reconocen como microorganismos, muy simples, que han permanecido a través de la evolución adaptándose a las condiciones modernas. Los representantes más especializados, como un alga de mar, un ciliado, un moho, pueden ser asignados rápidamente a las algas, protozoos y a los hongos, respectivamente. Sin embargo, existen numerosos protistas incluidos arbitrariamente en algún grupo, como el caso del género *Euglena*, ubicado entre las algas y los protozoos.

En términos generales, un **alga** puede definirse como un organismo que realiza fotosíntesis oxigénica y posee cloroplastos. Pueden ser unicelulares, filamentosas o cenocíticas, algunas poseen aspecto de planta debido al extensivo desarrollo multicelular, pero no se diferencian en tejidos ni órganos; por lo general la especialización celular se da en el caso de la reproducción (Brock y Madigan, 1993).

Los protozoos y los hongos son organismos no fotosintéticos y la diferencia entre ellos es de carácter estructural; los protozoos son predominantemente unicelulares y los hongos, sobre todo cenocíticos, se desarrollan dando origen a una estructura filamentosa y ramificada, el **micelio**.

El **cloroplasto** es un organelo clave en las relaciones entre los tres grupos. Se puede perder irreversiblemente, dando origen a las algas incolores o **leucofitos** que se desarrollan con nutrientes minerales simples, a la luz. Así, a partir de algas unicelulares, es fácil distinguir formas que dependen de procesos fermentativos o respiratorios para su nutrición, como los protozoos.

La separación es muy marcada entre algas y protozoos en estructura celular y fisiología, pero a los evolucionistas les resulta más difícil vincular a los protozoos con los hongos: los primeros son uniformemente unicelulares y móviles y los hongos predominantemente cenocíticos e inmóviles, y su hábitat fundamental es el suelo. No obstante, es necesario recordar que las formas primitivas son acuáticas y poseen esporas flageladas (zoosporas). Para los hongos del suelo, el viento es la principal forma de propagación

Las algas

El suelo no es un hábitat óptimo para las algas, que prefieren los ambientes acuáticos. Sin embargo, la ficoflora terrestre está integrada por numerosas especies unicelulares y filamentosas, cuya distribución está ligada a tipos pedológicos y a la cubierta vegetal. En condiciones extremas, estos **productores primarios (PP)** de materia orgánica pueden desempeñar un rol fundamental. La taxonomía que se emplea es la de los botánicos (*Thallophytas*) y se basa en propiedades celulares:

- **naturaleza química de la pared, si está presente**
- **los materiales orgánicos de reserva**
- **la naturaleza de los pigmentos fotosintéticos**
- **la naturaleza y posición de los flagelos, en el caso de algas móviles.**

El cuadro 1 muestra las divisiones en que se ubican las algas. (Stanier *et al.*, 1976).

Las divisiones no son equivalentes en lo relacionado al rango de estructura de sus integrantes. Por ejemplo, *Euglenophyta* consiste enteramente en organismos unicelulares organizados en colonias simples, mientras que las *Phaeophyta* (algas pardas) son enteramente organismos multicelulares, de aspecto de planta. El mayor y más variado grupo es el de las algas verdes (*Chlorophyta*), de

los cuales se originaron probablemente las plantas; incluye organismos unicelulares y hasta multicelulares con aspecto de vegetal.

Cuadro 1- Principales grupos de algas

grupo características de los pigmentos, pared celular, materiales de reserva, nº y tipos de flagelos, organización celular

<i>Chlorophyta</i>	clorofila a y b, celulosa, almidón, 2 flagelos, unicelulares
algas verdes	filamentosas, de gran tamaño
<i>Euglenophyta</i>	a y b, sin pared, paramilón y grasas, 1,2,3 flagelos por célula, unicelulares
<i>Phyrrhophyta</i>	a y c y carotenoides especiales, celulosa, almidón y aceites, 2 flagelos diferentes en forma y posición, la mayoría unicelulares, pocas filamentosas
dinoflagelados	
<i>Chrysophyta</i>	a+/-c y carotenoides especiales, 2 mitades superpuestas de sílice, otras sin pared, aceites, 2 flagelos por célula, unicelulares, filamentosas, cenocíticas
<i>Phaeophyta</i>	a y c, carotenoides especiales, celulosa y algina, grasas
algas pardas	y luminarina, 2 flagelos de distinta longitud, pluricelulares
<i>Rhodophyta</i>	a, ficobilinas, celulosa, almidón, s/flagelos, unicelulares,
algas rojas	pluricelulares con forma de planta

Es muy extensa la laguna biológica que existe entre las cianobacterias y las algas. En cambio, las plantas superiores presentan relación con las algas verdes: la disposición específica de los pigmentos del cloroplasto, las paredes celulares formadas con celulosa y la capacidad de almacenar almidón.

La mayoría de las algas multicelulares son inmóviles en estado maduro. Sin embargo en su reproducción, frecuentemente se forman esporas móviles, ya sea asexuales (zoosporas) o gametos, lo que revela su relación con algún grupo particular de flagelados unicelulares.

Varias divisiones de algas poseen miembros unicelulares inmóviles o que se desplazan por mecanismos diferentes a los flagelos. Los **desmídios**, miembros de las *Chlorophyta*, presentan células grandes, aplanadas, con simetría bilateral.

Las **diatomeas** (*Chrysophyta*) poseen paredes orgánicas impregnadas con sílice, de arquitectura muy compleja, con dos valvas superpuestas como las de una caja de Petri. La división es longitudinal, cada célula hija retiene la mitad de la vieja pared y sintetiza una nueva mitad.

A pesar de estar desprovistos de flagelos, estos organismos pueden moverse lentamente sobre sustratos sólidos. El mecanismo en los desmídios no se conoce y en las diatomeas la locomoción se realiza por modificación del movimiento ameboide. Poseen un orificio en la pared, el **rafe**, a través del cual el protoplasma se adhiere al sustrato, empujando a la célula. Grandes depósitos de paredes de diatomeas se han acumulado y se usan como abrasivos y en filtros.

Distribución de las algas

La mayoría son organismos acuáticos, en donde habitan en vida libre o asociadas simbióticamente con invertebrados, como esponjas, corales, larvas, en cuyas células crecen. En el suelo, su número es inferior al de las bacterias, actinomicetes u hongos. Es precisamente su bajo número, su nutrición autotrófica y su dependencia frente a la luz, humedad y nutrientes minerales, que hicieron pensar a los microbiólogos que su rol en los ecosistemas agrícolas no era muy significativo. Los trabajos recientes permitieron comprender su importancia. Su desarrollo es visible a simple vista en la superficie de suelos vírgenes o cultivados y su aislamiento es sencillo en medio líquido, con sales minerales, a la luz. El enriquecimiento se puede seguir por el color de los pigmentos. Los recuentos en suelos superficiales pueden variar desde algunos miles a millones/gramo (biomasa entre 20-40 kg/ha). Valores más altos se encuentran por períodos breves, luego de una lluvia.

Nutrición

- **fototrófas**, la fotosíntesis es el mecanismo principal de obtención de energía. Algunas especies requieren vitaminas y en la naturaleza son las bacterias las que proveen estos factores de crecimiento. Muchas algas tienen un tipo mixto de metabolismo, pudiendo emplear

fuentes orgánicas. Aun en la luz, ciertas algas no pueden emplear CO₂ como su principal fuente de carbono y dependen de acetato u otras formas orgánicas. Este hecho es causado por un defecto en la maquinaria fotosintética; si bien pueden obtener energía de su actividad fotosintética, no pueden obtener el poder reductor para convertir el CO₂ en materiales celulares.

- **osmotrófas**, muchas algas que realizan fotosíntesis normal en la luz, pueden crecer en la oscuridad a expensas de variedad de compuestos orgánicos, derivando su metabolismo hacia la respiración. Las algas completamente encerradas en pared celular dependen exclusivamente de sustratos orgánicos disueltos en la oscuridad
- **fagotrófas**, aquellas células desprovistas de pared o que no están completamente encerradas en ella, pueden preda bacterias u otros microorganismos.

No es correcto, entonces, describir a las algas como grupo exclusivamente fotosintético, ya que muchos de sus miembros unicelulares poseen las características nutricionales de los protozoos y de los hongos.

Los leucófitos que se forman por la pérdida irreversible del cloroplasto, son organismos no pigmentados derivados de grupos flagelados, de diatomeas y de formas inmóviles de las algas verdes unicelulares. No pueden fotosintetizar. En el laboratorio, esta transición pudo ser demostrada experimentalmente, en ciertas cepas de *Euglena*, al ser tratadas con estreptomycinina o cuando son expuestas a pequeñas dosis de luz ultravioleta o a altas temperaturas. La clasificación de los leucófitos es un problema difícil: por su estructura pueden ser asignados a una división particular de algas, como representantes no fotosintéticos. Pero como son protistas unicelulares no fotosintéticos, pueden ser mirados como protozoos, y son incluidos entre ellos por los zoólogos. Constituyen un grupo de transición entre las algas y los protozoos.

Ecología

Los principales factores que inciden en la distribución de las algas en el suelo son: **la humedad, los nutrientes minerales, el CO₂ y la luz**. El CO₂ y los elementos nutritivos no son limitantes. La **luz** determina la distribución de los organismos fototrofos: las algas son más numerosas en los 5-10 cm del perfil y disminuyen marcadamente con la profundidad. Se pueden encontrar en horizontes más profundos (10³/g) llevadas por las prácticas culturales (arrastre mecánico), por la fauna o el agua (nutrición heterótrofa o permanecen en estado latente).

En ambientes con **insolación muy intensa**, las algas tienden a concentrarse algunos centímetros debajo de la superficie. Allí se protegen debajo de minerales translúcidos como cuarzo o dolomita, de las radiaciones solares y de la desecación (sobre todo la ficoflora de los desiertos) y contra el frío intenso en las regiones polares. Las radiaciones ultravioleta no son perjudiciales y son empleadas en su aislamiento, eliminando los contaminantes bacterianos.

La **humedad**: las algas verdes son muy exigentes en agua y a medida que aumenta la aridez, el número de especies y su densidad disminuyen. Otras algas, por el contrario, soportan mal la inundación. El óptimo se sitúa, como para otros grupos de microorganismos, alrededor del 40-60% de la capacidad de campo. En la superficie de suelos agrícolas de la zona templada, la disponibilidad de agua para las algas suele ser limitante. Las células se recubren de capa mucilaginosa muy higroscópica que puede retener 10-15 veces su volumen en agua, la que es perdida muy lentamente.

El efecto de la **estación** del año es marcado, en primavera su número es bajo; el congelamiento las perjudica y en invierno la población declina.

El efecto del **pH** varía con el tipo de suelo; en general las algas son poco sensibles a las variaciones de pH. Los valores próximos a la neutralidad o ligeramente alcalinos, son más favorables. En suelos ácidos dominan las clorofíceas, que se pueden encontrar a pH 5,0 y aun 4,0 (el óptimo para su desarrollo se sitúa entre pH 6,8 y 8,5), aunque se encuentran en pH 9,3-10 y toleran hasta pH 13.

Antagonismos: muchas especies son sensibles al ataque por bacterias, hongos, estreptomicinas, que con enzimas específicas destruyen la pared celular. Otros antagonismos ocurren con nemátodos, termitas.

Funciones

Aporte de materia orgánica: son **productores primarios** muy importantes en suelos desnudos, pobres, erosionados, quemados, salinos o desérticos. Los **líquenes** (asociación alga-hongo) constituyen el estado inicial de vegetación sobre rocas o suelos minerales.

Meteorización de rocas: una fina capa de células de algas recubre las rocas, y a la muerte de las algas, esta materia orgánica posibilita el desarrollo de bacterias y ocasionalmente de hongos (los colonizadores secundarios). La meteorización parece ser favorecida por la formación de bicarbonatos (del CO₂ de la respiración) o por metabolitos de los microorganismos heterótrofos y de los líquenes.

Fijación del suelo: en suelos minerales sin estructura, las costras de líquenes y algas, fijan el suelo, retardando la erosión y modificando el régimen hídrico. Se reduce la evaporación y los muscílagos contribuyen a aumentar la estabilidad estructural.

Liberación de oxígeno: por su fotosíntesis oxigénica aumentan la aireación en suelos inundados de arrozales y en suelos pesados. Por el consumo del CO₂ y la liberación de sustancias alcalinas, tienden a elevar el pH combatiendo la acidez. Liberan vitaminas, auxinas, que favorecen a los cultivos así como sustancias inhibitorias sobre parte de la microflora del suelo.

Los protozoarios

Constituyen un grupo muy heterogéneo de protistas superiores, unicelulares y móviles, cuyo tamaño varía entre algunas micras hasta centímetros. Los habitantes del suelo son de talla más pequeña y aplanados, ya que deben moverse en el film de agua que llena los poros. Presentan semejanzas con varias divisiones de algas de las cuales derivan. Los varios tipos de leucofitos proveen de pruebas sobre el origen de muchos grupos de protozoos.

La pérdida de la capacidad fotosintética reduce abruptamente la potenciabilidad nutricional y es seguida de una serie de eventos a nivel celular que posibilitan al organismo el desarrollo de nuevos mecanismos de nutrición osmotrófico o fagotrófico. Estos cambios pueden impedir el reconocimiento del origen algal de estos microorganismos, los que se ubican entonces, entre los protozoos.

El **ciclo de vida** de estos organismos consiste en una fase activa y una fase de reposo o **cística**, en la que el organismo segrega una espesa capa protectora, pudiendo resistir por muchos años en ambientes adversos. La reproducción es usualmente por fisión longitudinal o transversal. Unas pocas especies poseen reproducción sexual.

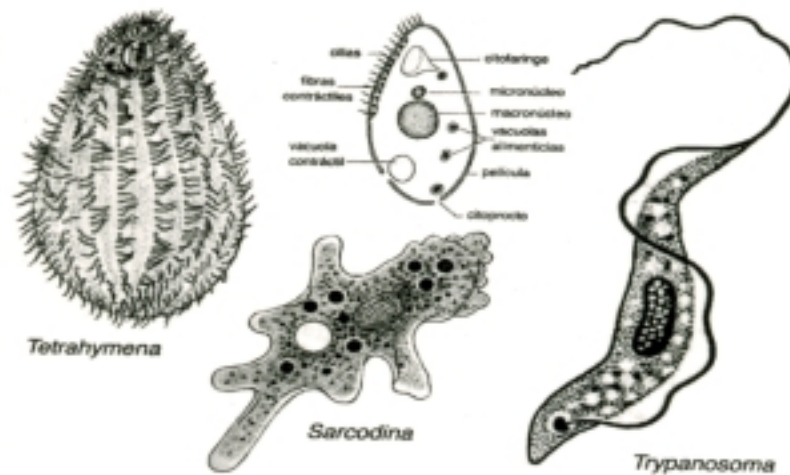
Subdivisiones

1. **Clase Mastigophora:** flagelados, división longitudinal. Los Phytoflagelados-representantes de varias divisiones de algas- y los Zooflagelados, no fotosintéticos, no reconocibles como leucocitos, poseen sobretodo nutrición osmofílica.
2. **Clase Rhizopoda:** ameboideos, móviles por pseudópodos, pero muchos pueden presentar flagelos. Fisión binaria y nutrición fagotrófica.
3. **Clase Sporozoa:** está integrado por un grupo diverso de organismos parásitos, inmóviles o con movimiento reptante. Se reproducen por fisión múltiple. Nutrición osmofílica.
4. **Clase Ciliata:** movimiento por numerosas cilias organizadas en un sistema locomotor coordinado. Células con dos núcleos, diferentes en estructura y función. División siempre transversal. Nutrición sobre todo fagotrófica.

Los protozoarios de la clase *Mastigophora* poseen 1 a 4 flagelos. En el suelo poseen pequeña talla (5-20 micras) y son los más abundantes (3.000 a 200.000/g de suelo) y los géneros más comunes son: *Allation*, *Bodo*, *Cercobodo*, *Cercomonas*, *Entosiphon*, *Heteromita*, *Monas* y los con clorofila *Euglena* y *Chlamydomonas*.

Los *Sarcodina* o *Rhizopoda* emiten pseudópodos que facilitan su desplazamiento y por lo tanto la célula cambia constantemente de forma. Algunos poseen una envoltura rígida pero con orificio para emisión de los pseudópodos. Los géneros más comunes en el suelo son: *Amaeba*, *Biomyxa*, *Englypha*, *Hartmanella*, *Lecytium*, *Naegleria*, *Trinema*, *Nuclearia*.

Figura 1- Representantes de tres clases de protozoos



Los ciliados se mueven por numerosos apéndices (cilios). Las especies terrestres son también menores que las acuáticas (10 a 80 micras) y los géneros más comunes son: *Balantiophorus*, *Colpidium*, *Colpoda*, *Enchelys*, *Halteria*, *Pleurotricha*, *Tetrahymena*, *Vorticella*.

Nutrición

Se distinguen tres formas de nutrición:

- Fotosintéticos:** son los *Phytomastigophora*, con pigmentos clorofilianos difusos o localizados. Su importancia práctica es muy limitada, el género más extendido es *Euglena* y su aislamiento se realiza en los medios para algas y en muchas clasificaciones se reconocen como tales.
- Saprofitos:** su nutrición depende de la provisión de sustancias orgánicas solubles (osmotróficos); incluyen a los flagelados y a algunos ciliados. Se pueden desarrollar en medios sintéticos con peptona, glúcidos, aminoácidos o con extracto de suelo.
- Holozoicos:** representan sobre todo a los ciliados; se nutren por ingestión de partículas sólidas (fagotróficos) y otros microorganismos: bacterias, levaduras, algas, e incluso algunos protozoos. Es una de las formas predominantes de nutrición en el suelo. Muchas células bacterianas deben ingerirse en cada división celular. *Sarcodina* requiere cerca de 40.000 células bacterianas/división. La bacteria debe multiplicarse rápidamente para no ser eliminada por los predadores.

El significado en el suelo del modo de vida saprofita es desconocido; los protozoos no se destacan en las transformaciones de la materia orgánica. Se considera que el modo dominante de nutrición es la fagocitosis, sobretudo entre los **ciliados** que representan la máxima diferenciación a nivel celular, y al mismo tiempo es un grupo evolucionario terminal. En efecto, el desarrollo de un sistema biológico más complejo ocurre con el establecimiento de pluricelularidad, e involucra la diferenciación de células en el desarrollo del organismo (animales o vegetales).

Un rol muy importante lo realizan los protozoos del **rumen**, donde contribuyen a la degradación de sustancias orgánicas, como la celulosa a ácidos grasos volátiles absorbidos por el animal.

Influencias del ambiente

Uno de los factores que limita el desarrollo de este grupo en el suelo es la distribución discontinua de la **materia orgánica y de la microflora** (nutrientes para los protozoos) en la solución del suelo dentro de los poros. El pequeño tamaño de muchos puede reflejar esta deficiencia nutricional.

La mayoría de los protozoos son cosmopolitas, distribuidos en todos los suelos del mundo, y es difícil correlacionar su presencia con áreas geográficas particulares. Se los encuentra en suelos de zonas árticas, templadas o tropicales. En suelos agrícolas el máximo número se encontró a los 10-

12 cm y pocas especies llegan al subsuelo. Los nutrientes que favorecen el desarrollo de las bacterias, constituyen los factores más importantes en la distribución de los protozoos. Su biomasa en bosques y pasturas de la región fría puede llegar a 20 g/m², pero en zona templada no supera a los 5 g/m².

La humedad es uno de los principales factores ecológicos, esencial para su proliferación, su fisiología y desplazamientos, pero pueden resistir la desecación enquistándose.

En general, su metabolismo es **aerobio**, pero hay especies que soportan concentraciones bajas de oxígeno y aun la anaerobiosis (por ejemplo, los patógenos del hombre y animales y los del rumen).

El **pH** del suelo afecta poco el espectro de especies, los hay en ambientes ácidos y también en extremos alcalinos.

Existe evidencia de **predación** por parte de hongos filamentosos sobre amebas y de otros organismos que pueden parásita a los protozoos, pero su rol en la naturaleza, contribuyendo a la declinación de este grupo, no está claramente establecido.

Rol en el suelo

- **Limitación en el número de bacterias**, se han realizado experiencias con modelos simplificados: suelo estéril con protozoos y con bacterias y protozoos conjuntamente. Se demostró que la densidad bacteriana disminuye en presencia de protozoos. Se pensó que este hecho traería aparejada una disminución en la fertilidad del suelo, por disminución de la actividad biológica. Esta idea no es mantenida actualmente, sino que más bien se piensa que la destrucción de una parte de la población bacteriana estimula la actividad metabólica de los sobrevivientes, que compensarían la pérdida del resto de la población.

Una de las hipótesis más aceptada postula un rejuvenecimiento celular, con síntesis de sustancias estimulantes para las poblaciones de bacterias que resisten a la predación.

- **Diseminación de esporas fúngicas**, ya que muchos son incapaces de digerirlas y las transportan en su superficie.

Su rol efectivo en el suelo es entonces difícil de determinar: tienen poco efecto en las etapas de mineralización e inmovilización de la materia orgánica. Muchas especies son parásitas del hombre, aunque no encuentran en el suelo ambiente apropiado.

Los hongos

Comprenden un grupo muy amplio de protistas superiores, incluidos por los botánicos entre las *Talofitas* (vegetales, sin clorofila). Son todos heterótrofos y representan la última etapa en la escala de evolución de los protistas; su hábitat más frecuente es el suelo, aunque los hongos más primitivos son acuáticos.

El talo está constituido por el micelio (figura 2) -agregado de hifas filiformes-con tubos de paredes delgadas que envuelven a la masa citoplasmática continua (micelio cenocítico) y con tabiques (micelio tabicado) aunque en este caso existe continuidad citoplasmática por poros de comunicación.

Por su función se distinguen las hifas:

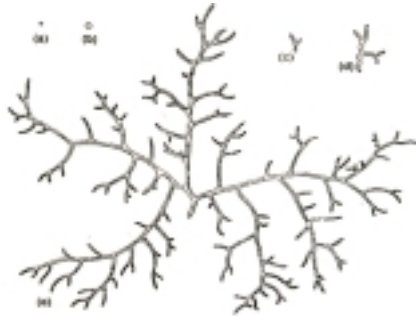
- **vegetativas**, que penetran a los sustratos para absorber los nutrientes
- **fértiles**, que dan origen a estructuras de fructificación.

Los hongos primitivos tienen semejanzas con los protozoos flagelados, que luego han evolucionado a estructuras biológicas distintas, adaptadas al suelo. Su desarrollo está sólo limitado por la disponibilidad de nutrientes, pudiendo llegar en los *Basidiomycetes* hasta 10m de radio.

Estructuras de resistencia: en condiciones desfavorables para la subsistencia o cuando los parásitos rodean al organismo, aparecen estas estructuras especializadas:

- **esclerocios:** bien delimitados, de corteza oscura, según el grado de cutinización, conjunto apretado de hifas con materiales de reserva. En condiciones favorables, entran en germinación dando origen a fructificaciones de menor tamaño: son los bulbillos (menos de 1 mm) y menos cutinizados.

Figura 2 - Formación de micelio a partir de una espora



- **clamidosporas:** elementos asexuados, de paredes gruesas, con materiales de reserva. Pueden presentarse intercalares, laterales o terminales, de alto contenido lipídico, de forma y tamaño diverso (esporas asexuadas).

Estructuras de fijación: estolones y apresorios, el estolón es una hifa aérea que se extiende a gran distancia, luego por su peso se curva, encuentra un soporte con el cual se pone en contacto y se convierte en órgano de fijación más complicado, el apresorio, unido firmemente al sustrato.

Haustorios: los hongos parásitos y simbióticos que penetran en las células vegetales aumentan la superficie de absorción, por ramificación de las hifas. Su rol es muy importante en las micorrizas, asociaciones simbióticas entre raíces y hongos. También se los llama **arbúsculos**.

Resumiendo: las estructuras de resistencia incluyen a los conidios (esporas asexuadas externas), clamidosporas y esclerocios, las oosporas (sexuadas), los esporangios y esporangiosporas, ascosporas y los rizomorfos. Los conidios de muchas especies son de vida breve y pierden viabilidad rápidamente cuando se forman o penetran en el suelo (caso de los patógenos) resultando difícil reaislarlos luego de algunas semanas. Otras especies poseen conidios muy resistentes, pudiendo permanecer en suelo seco mucho tiempo y germinar cuando este se rehumedece. Algunas especies requieren para germinar sustancias orgánicas o excreciones radicales. Este hecho tiene importancia en los hongos patógenos cuyas clamidosporas pueden sobrevivir hasta épocas favorables (*Fusarium*, *Phytophthora*). Los esclerocios tienen un rol similar. Las oosporas de *Phytium* permanecen en el suelo más de 16 meses y se producen sólo en contadas ocasiones por los hongos.

Hay evidencia de que gran número de hongos surgen de esporas durmientes (ascosporas), que son activadas por el calor. Ciertas sustancias previenen la germinación de conidios y otros tipos de esporas, fenómeno conocido como **fungiostasis**.

En general, la espora germina cuando se libera algún tipo de materia orgánica en su vecindad. La fungiostasis depende también de la densidad de esporas. Entre los agentes antifúngicos, se cita el amonio en suelos alcalinos, los taninos del mantillo, el aluminio. Por este fenómeno la espora queda protegida, pues si germina en condiciones desfavorables para su nutrición y desarrollo, es fácilmente atacada por otros microorganismos.

Muchos hongos se protegen de la lisis provocada por enzimas liberadas por otros microorganismos, mediante la producción de pigmentos oscuros, del tipo de las **melaninas** y con polisacáridos formados por azúcares resistentes a la degradación.

Fisiología y nutrición

Se reconocen tres categorías de hongos por su relación con la materia orgánica:

- **saprófitos**, utilizan los sustratos orgánicos inanimados;
- **parásitos** atacan organismos vivos
- **simbióticos**, asociados con otros organismos: alga o vegetal, para su nutrición.

Las fuentes de **carbono** son variables, emplean de preferencia azúcares, almidón y algunos celulosa y lignina. Con respecto al nitrógeno, asimilan formas minerales y/o orgánicas (las últimas de preferencia). Almacenan glucógenos y aceite. Especies de *Penicillium* (moho verde) y de *Rhizopus* (moho negro) se desarrollan sobre cualquier tipo de sustrato húmedo (aun en el refrigerador a 5°C); otros utilizan sustratos más específicos, encontrándose en el extremo de la escala a los parásitos obligados, que requieren determinada variedad vegetal.

Habitat

Los hongos están muy distribuidos en todos los ecosistemas, desde 0 a 25°C, aunque pocos a 0°C y con un máximo de 50°C. Para los hongos del suelo el óptimo se ubica entre **20-30°C**, en pH muy variados: el óptimo para el grupo estaría en la vecindad de **pH 6** y **dominan en ambientes ácidos**, por falta de competencia por parte de las bacterias. La luz es esencial para la esporulación de muchas especies y para la dispersión de esporas fototróficas. Las esporas permiten una amplia distribución.

Como grupo son **aerobios** pero algunos soportan la anaerobiosis (los patógenos).

Su **rol** es muy variado, desde la degradación de moléculas orgánicas muy complejas hasta la formación de humus.

Métodos de estudio: se emplean numerosas técnicas, pero ninguna puede englobar a todas las especies presentes ni a su biomasa. El más empleado es el recuento en caja a partir de suspensiones-diluciones de suelo. Acidificando el medio con ácidos orgánicos débiles (pH 4,2) o con el uso de agentes bacteriostáticos (penicilina, novobiocina, rosa de Bengala, estreptomycin) se elimina la competencia de las bacterias. El problema radica en que el hongo puede reproducirse a partir de fragmentos de micelio, y de esporas (asexuadas o sexuadas). Una sola pieza de micelio puede disgregarse en la agitación en innumerables porciones, cada una de las cuales dará origen a una colonia. Resulta así muy fácil aislar especies de *Penicillium* o *Aspergillus* que esporulan profusamente.

Los recuentos en caja deben ser tomados con precaución.

La **microscopía fluorescente** ayuda mucho en la visualización en el suelo. Los datos obtenidos por el empleo de distintas técnicas varían mucho. Por recuentos en medio sólido se tienen datos desde 20.000 hasta 10^6 o más propágulos/(hifas, esporas, fragmentos de hifas capaces de dar una colonia).

La **biomasa** puede ser mayor que la de las bacterias y su micelio se puede extender 10-100 m/g de suelo superficial. Valores hasta de 500 a 1000 m (500-5.000 kg/ha) han sido citados, aunque muchas de las hifas pueden estar vacías (no viables).

Reproducción

La reproducción **asexual** o somática no incluye unión de núcleos y se realiza por fragmentación del talo, por fisión binaria y gemación (caso de las levaduras) y por producción de esporas. Esta última es la forma más frecuente de reproducción; el número, disposición, forma, color y origen de las esporas son característicos de las especies.

Por el lugar en donde se originan, se distinguen las:

1. Talosporas, se forman en filamentos miceliales, no son caducas:

artrosporas: se producen por desarticulación de la lámina media, los tabiques luego se gelifican simultáneamente y los distintos filamentos se separan y se redondean.

blastosporas: se forman por brotación de elementos preexistentes, se pueden separar y luego brotar; la separación se efectúa por constricción del istmo y no del tabique (micelio levaduriforme).

dictiosporas: son esporas pluricelulares, de más de 50 células, con apariencia reticulada.

2. Fialosporas, se originan en fructificaciones asexuadas bien definidas, son caducas y externas (terminales o laterales). Se distinguen las **esporangiosporas**, originadas dentro de estructuras especiales, el esporangio, como en *Rhizopus*, *Mucor* y los **conidios** que se originan en extremos de las hifas (externas) o bien lateralmente.

Los conidios pueden encontrarse en estructuras especiales (acérvula, esporodoquio) que los protegen dentro de tejidos vegetales (se da en general en hongos patógenos).

Reproducción sexual

Comprende las tres etapas fundamentales:

- **plasmogamia** (unión de dos protoplastos y los núcleos haploides)
- **cariogamia** (formación de un cigoto diploide)
- **división meiótica** (reducción cromosómica).

Los hongos se dividen por su **sexualidad** en:

- **hermafroditas** (órganos + y - en el mismo talo)
- **dioicos** (en talos distintos)
- **indiferenciados** (no se diferencian los sexos)

Por su **compatibilidad** en:

- **homotálico**, cada talo es sexualmente autofértil y se puede reproducir por sí mismo
- **heterotálicos**, que requieren la ayuda de otro talo compatible

La **reproducción sexual** puede ser:

- **heterogámica**, con gametos morfológicamente diferentes **y homotálicos** (autofértil)
- **isogámica** (gametos iguales) y **heterotálica** (ubicados en talos distintos).

Taxonomía

Los criterios empleados en la clasificación de este grupo heterogéneo incluyen caracteres morfológicos casi exclusivamente:

- **naturaleza del micelio** (tabicado o no)
- **tipo de reproducción sexual**
- **naturaleza de las esporas asexuadas** (internas en gametangio) y externas (conidios) (cuadro 2 y figura 3).

Cuadro 2- Taxonomía de los hongos

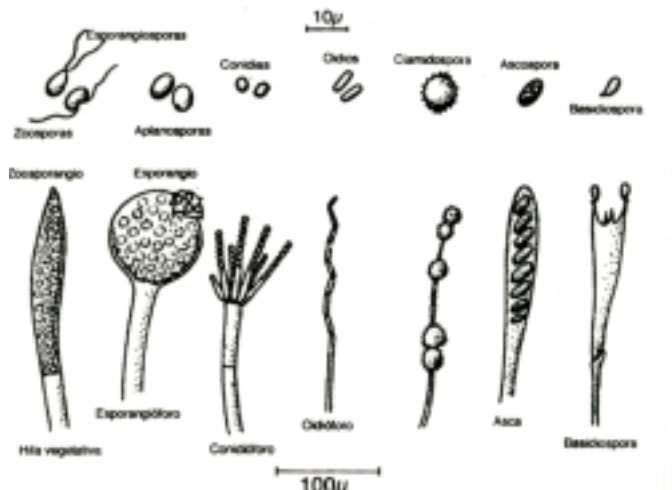
División	Subdivisión	Clase	Subclase
Mixomycota	Mixomycotina	Plasmodiophoromycetes	
Eumycota	Mastigomycotina	Chytridiomycetes	
		Oomycetes antiguos	
		Phycomycetes	
	Zygomycotina	Zygomycetes	
	Ascomycotina	Ascomycetes	Hemiascomycetidae
	Basidiomycotina	Heterobasidiomycetes	antiguos Basidiomycetes
	Deuteromycotina	Hyphomycetes	antiguos Deuteromycetes

Myxomycota

Subdivisiones: *Myxomycotina*: clases como *Myxomycetes*, sin pared celular, cuerpo ameboide (plasmodios de vida libre), masa multinuclear de protoplasma sin paredes definidas. Diploides, fructifican dando oosporas flageladas en la meiosis. Parecidos a los protozoos con nutrición holozoica.

Eumycota Hongos verdaderos, con paredes de celulosa o quitina, estructura típicamente filamentosa, algunos unicelulares. Reproducción sexual o asexual, esporas sin flagelos. Se distinguen las clases:

Figura 3 - Esporas de hongos



- a. **Chytridiomycetes:** variedad de talos, células móviles con un solo flagelo posterior tipo látigo, acuáticos, parásitos.
- b. **Oomycetes:** hongos con micelio cenocítico bien desarrollado, cuyas células móviles poseen dos flagelos dirigidos en direcciones opuestas: uno de tipo látigo y el otro cepillo. Reproducción sexual: se forma una espora de resistencia (oospora) a partir de la oósfera fecundada, con pared celulósica. Parásitos y saprófitos acuáticos.
- c. **Plasmodiophoromycetes:** hongos parásitos multinucleados, no celulares (sin pared celular), viven en las células huésped. Espora de resistencia en masa, pero no en cuerpos de fructificación especiales. Células móviles por 2 flagelos.
- d. **Zygomycetes:** hongos saprófitos o parásitos con micelio cenocítico o septado bien desarrollado. Reproducción sexual por fusión de gametangios generalmente iguales que forma una espora de resistencia (zigospora). No producen células móviles.
- e. **Trichomycetes:** hongos con talo cenocítico filamentosos simple o ramificado adherido al tracto digestivo y cutícula externa de artrópodos vivos. Reproducción asexual por variedad de esporas. Reproducción sexual conocida como en los *Zygomycetes*.
- f. **Ascomycetes:** hongos que forman esporas dentro de estructuras especiales en forma de saco (Asca) como resultado de la cariogamia y meiosis. Las Ascas se presentan libres o en fructificación más generalmente en el tejido infectado.
- g. **Basidiomycetes:** hongos que forman esporas resultantes de cariogamia y meiosis sobre la superficie de estructuras especiales llamadas basidios.
- h. **Deuteromycetes:** grupo en el cual se coloca a los hongos que por su estructura general y reproducción asexual se parecen a los *Ascomycetes*, pero no se ha observado el estado sexual. También llamado **Fungi imperfecti**, incluyen a numerosas levaduras.

Función en el suelo

Activos degradadores de sustratos carbonados y su rol esencial es la mineralización de fuentes complejas de carbono, atacando gran volumen de residuos con poco nitrógeno. Predominan así en suelos pobres, sobre restos vegetales frescos y sobre todo en plantas maduras donde la C/N puede ser muy alta.

Los hongos participan en la **humificación**, degradando restos de animales y vegetales.

Contribuyen a la **agregación del suelo**; la penetración de sus hifas permite compactar agregados, unir partículas.

Algunos forman **asociaciones simbióticas** con raíces de vegetales (**micorrizas**) que favorecen la nutrición vegetal (capítulo 17).

Según los **sustratos** que emplean se distinguen los:

- **hongos glucófilicos**, sobre todo al estado de esporas con alto poder germinativo y rápido crecimiento. Son los primeros en atacar sustratos frescos; cuando las fracciones fácilmente atacadas se agotan, el hongo fructifica y permanece en estado de latencia (*Mucorales*, *Penicillium*).
- **hongos que degradan la lignina**, las fracciones más resistentes, sobre todo *Basidiomycetes*
- **patógenos verdaderos**; sólo una fracción pequeña de los hongos que crecen o sobreviven en el suelo, como *Fusarium*, *Phytium*, *Ophiobolus*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Verticillum*..
Hongos patógenos del hombre puede llegar al suelo, sobre todo en la zona tropical y la infección se generaliza fácilmente en la población. Una técnica común para detectarlos y aislarlos es colocar una hebra de cabello estéril en el suelo, el hongo lo coloniza, pues emplea la queratina.
- **predadores**: es practicada por muchos hongos, con protozoos, otros hongos, nemátodos. La hifa penetra en la presa, disminuyendo la movilidad, el hongo digiere el contenido celular y asimila las sustancias liberadas. Estos hongos participan en el equilibrio biológico del suelo, limitando el tamaño y actividad de ciertos grupos (capítulo 18).

Ecología

Los factores ecológicos más importantes son: nivel y naturaleza de la materia orgánica, pH, fertilizantes orgánicos y minerales, humedad, aireación, temperatura, profundidad, estación del año y cubierta vegetal.

El número de hongos filamentosos varía directamente con el contenido de materia orgánica. El agregado de restos vegetales estimula la población fúngica y altera la composición de la flora; ciertos géneros se hacen dominantes: *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*. Algunas especies mantienen su número alto por períodos relativamente largos, en medios ácidos los hongos son la microflora dominante cuando se agrega materia orgánica y el nivel de nitrógeno es adecuado.

El **pH** es uno de los factores principales que gobiernan su actividad y composición. Muchas especies se desarrollan en amplio rango de pH, en medio de cultivo lo hacen desde pH 2-3 hasta 9,0 o superior. Dominan en ambientes ácidos por falta de competencia de bacterias. Algunas especies son más sensibles a la acidez que el resto de la comunidad y la acidificación del suelo puede ser un método de lucha, cuando se trata de hongos fitopatógenos. Otros hongos prefieren la neutralidad o bien ambientes alcalinos. El óptimo como grupo se sitúa en la vecindad de pH 6.

Humedad: si ésta es muy excesiva y la difusión del oxígeno está limitada, los hongos son los primeros perjudicados (método también empleado en la lucha contra fitopatógenos). Como se observa en el cuadro 3, en condiciones de sequedad, las especies que pueden esporular, lo hacen y la mayor proporción de estructuras fúngicas las constituyen las esporas. La humedad favorece la germinación de éstas y el desarrollo del micelio.

Cuadro 3 - Cambios poblacionales de hongos en suelo de pastura a varios niveles de humedad

hongos (10 ³ /g)				
H%	total	hifas	esporas	esporas % del total
8,9	99	60	39	79
18,9	142	113	29	20
24,2	149	133	16	10
27,1	173	153	20	12

Aereación: algunas especies pueden desarrollarse a bajos niveles de O₂, pero en general un extremo de la hifa accede al aire. Son aerobios y su dependencia frente a este gas explica su mayor concentración en los primeros centímetros del suelo y su ausencia en niveles inferiores en suelos mal drenados, en barros y estuarios. Las esporas pueden soportar largos períodos de inundación; al drenar el suelo, los hongos retornan rápidamente a su posición de importancia.

Temperatura: la mayoría son mesófilos, pero el desarrollo termófilo no es infrecuente. En el suelo los termófilos son escasos, pero son abundantes cuando la temperatura asciende por fermentación (*compost*).

Profundidad: en suelos cultivados, los hongos son más abundantes en las capas superiores, pero pueden alcanzar gran densidad en los horizontes B de pasturas (más de 1 m), siguiendo la concentración de la materia orgánica: son cepas adaptadas a bajas concentraciones de O₂ o altas de CO₂. El efecto de la profundidad sobre la abundancia y composición de la flora fúngica está asociado con la concentración de materia orgánica y la composición de la atmósfera del suelo.

Estación del año: los meses cálidos de primavera son usualmente benéficos pero el excesivo calor y sequedad del verano y los extremos de temperatura del invierno los afectan.

La materia orgánica fluctúa con la estación, es más abundante en otoño, el recuento tiende a ser alto en esta época y en primavera y declina en períodos secos del verano, aunque algunas localidades pueden tener ocasionalmente comunidades activas en verano. La acción de los hongos es baja en regiones con inviernos fríos.

La cubierta vegetal afecta cuali y cuantitativamente a la ficroflora, algunas especies están asociadas a ciertas comunidades vegetales, mientras que otras no parecen afectadas por ellas.

Levaduras

Si bien el término levadura no tiene significado taxonómico, es muy empleado para designar a aquellos hongos de estructura unicelular y que se reproducen por fisión binaria o gemación. Los

géneros más encontrados en el suelo son: *Cándida*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Pullularia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Torula*, *Zygosaccharomyces*.

Ciertas cepas tolerantes a altos niveles de azúcares, capaces de realizar activas fermentaciones, se describieron en el suelo, pero no parecen ser habitantes normales, sino que llegan a él con frutos y restos vegetales. Generalmente se describen poblaciones de $10^3/g$ en áreas templadas, pero no es posible correlacionar su número con características climáticas o de suelo, y su rol en las transformaciones de la materia orgánica o mineral no está definido.

Muchas levaduras realizan fermentación alcohólica de azúcares y han sido empleados desde la antigüedad por el hombre. Pertenecen a las tres clases de hongos superiores: *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* y *Deuteromycetes*.

Saccharomyces cerevisiae, principal agente de la fermentación alcohólica, es una levadura ascomicete. En cierto estado de su desarrollo la gemación cesa y la célula vegetativa se transforma en un asco, cada uno con 4 ascosporas. La formación del cigote tiene lugar en un momento particular de su ciclo de vida, inmediatamente después de la germinación de las ascosporas haploides: pares de éstas se fusionan para formar células vegetativas diploides. El estado diploide se mantiene en todo período de desarrollo vegetativo y la meiosis ocurre inmediatamente antes de la formación de las ascosporas. Otras levaduras ascomicetes forman cigotes por fusión entre células vegetativas inmediatamente antes de la formación de ascosporas, que al germinar dan lugar a la progenie vegetativa haploide.

Levaduras del género *Sporobolomyces* forman basidiosporas y en este caso toda la célula vegetativa se transforma en un basidio. La descarga de basidiosporas es un proceso violento, y las colonias se detectan rápidamente en cajas incubadas en posición invertida, la tapa de la caja se cubre con las esporas descargadas formando una imagen como el espejo de la colonia sobre el agar.

La mayoría de las levaduras del suelo se multiplican solamente por gemación: *Cándida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon*. Son poco numerosas en el suelo y para ponerlas en evidencia es necesario emplear técnicas de enriquecimiento en medios selectivos (10^3 - $10^4/g$). Son abundantes en suelos con vid, llegan a ellos desde la superficie de frutos (especies activamente fermentadoras) y pueden subsistir poco tiempo en el suelo, excepto las ascosporas más resistentes.

Las levaduras típicas del suelo serían especies distintas a las epífitas, pero se conoce poco sobre sus fluctuaciones y su repartición; se sabe que son abundantes en suelos ricos en materia orgánica fresca o poco descompuesta, y también en los mantillos forestales. En suelos turbosos pueden representar hasta un 50% de la población total (entre 20 y 50 cm de profundidad). Se explica esta distribución por la aptitud a desarrollarse en anaerobiosis (cuando fermentan).

El efecto de la vegetación se manifiesta del punto de vista cuali y cuantitativo; ciertas especies estimulan preferencialmente a algunos géneros, la rizosfera es también un ambiente favorable a su multiplicación.

Rol en el suelo

No es bien conocido: se los considera como organismos glucofílicos relacionados a la materia orgánica poco transformada, utilizan nitratos y azúcares simples u oligosacáridos, pero son incapaces de degradar glúcidos complejos, tal vez con excepción de las pectinas. Las levaduras del género *Lipomyces* parecen una excepción ya que pueden desarrollarse a débiles dosis de nitrógeno, con lo que pueden degradar mucho más carbono orgánico, y parecen favorecidas por ácidos húmicos. En la naturaleza se las encuentra frecuentemente asociadas a bacterias fijadoras de N_2 aerobias, sobre las que ejercen efecto estimulante.

Bibliografía

- ALEXANDER, M., 1977 **Introduction to Soil Microbiology**, Wiley & Sons, Nueva York.
BROCK, T. D. y M. T. MADIGAN 1993 **Microbiología**, Prentice Hall Hispanoamericana, S. A. México
DOMMERGUES, Y y F. MANGENOT, 1970 **Ecologie Microbienne du Sol**, Masson & Cie, París.
STANIER, R. Y.; E. A. ADELBERG; y J. INGRAHAM, 1976 **Microbial World**, Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, Nueva Jersey.

Capítulo 5

Los microorganismos en la naturaleza Métodos de estudio en ecología microbiana

En este capítulo analizaremos las actividades de los microorganismos en la naturaleza en algunos ambientes de importancia para el hombre: el suelo, aire y aguas, las plantas, materiales en deposición.

Ecología microbiana

El término **ambiente** se refiere a todo lo que rodea a un organismo: los factores físicos, químicos y biológicos. Los microorganismos desempeñan roles más importantes de lo que podría inferirse por su pequeño tamaño. Desde una perspectiva ecológica los microorganismos son parte de las comunidades de los llamados **ecosistemas**. Cada organismo en un ecosistema interactúa con su entorno modificando marcadamente en algunos casos las características del ecosistema.

La ecología microbiana estudia las interrelaciones entre los microorganismos y el ambiente y determina las leyes generales que gobiernan estas interacciones. Se puede dividir en dos aspectos:

Sinecología: que analiza las interacciones en un determinado lugar, considerando las especies, los factores bióticos y abióticos en ese lugar (suelo, mar, estanque).

Autoecología: en contraste con la anterior, comprende el estudio de una especie y el efecto que sobre ella en particular ejerce el ambiente (ejemplo: estudio de una cepa de *Rhizobium*, de patógenos vegetales, etc.) Nociones de jerarquía ecológica

Ecosistema: es el sistema limitado en el espacio constituido por el conjunto de condiciones energéticas, físicas, químicas y biológicas que rodean a estos organismos (ambiente). La energía penetra a los ecosistemas sobretodo en forma de luz solar y los organismos fototrófos la emplean para sintetizar nueva materia orgánica. Esta contiene todos los elementos (C, N, S, P, Fe, etc.) y cuando el organismo muere se libera la energía de sus constituyentes químicos que queda disponible para el ecosistema permitiendo el desarrollo de nuevos organismos. Estos realizan importantes procesos de síntesis y degradación, los autótrofos generan materia orgánica a partir de CO₂ y los otros son organótrofos y participan en la biodegradación y reciclado de la materia orgánica e inorgánica.

Se define para los elementos un ciclo biogeoquímico, en el cual el elemento experimenta cambios en su estado de oxidoreducción a medida que se mueve en el ecosistema.

El término ecosistema puede aplicarse a conjuntos de extensión variable:

microecosistema, como un cultivo microbiano, agregado de un suelo

macroecosistema complejo, por ejemplo, un océano

mesoecosistema, como el estudio de un suelo, un estanque y su vegetación.

Comunidad o biocenosis: está constituida por todos los organismos que habitan el ecosistema

Población: está formada por las especies u organismos de tipo distinguible, por ejemplo la población de bacterias, de esporulados

Individuo: componentes únicos de la población: células, hifa, cuerpo de reposo de hongo, espora microbiana

Resumiendo, un ecosistema está integrado por:

comunidad o biocenosis - poblaciones - individuos
factores abióticos

Los microorganismos se encuentran en hábitat extremos, la diversidad es enorme y especies de bacterias, algas, hongos, protozoos, se aíslan en todos los tipos de suelos, en alimentos, aguas, restos orgánicos, animales. La proporción relativa de las distintas especies está afectada en cierto grado por el ambiente: los hongos dominan en medios ácidos de bosques, las bacterias predominan en suelos inundados, los actinomicetes en ambientes secos, las algas son las primeras colonizadoras en suelos quemados, erosionados, cuando éste se humedece.

A pesar de su gran ubicuidad (los microorganismos son fácilmente transportados y dispersados, su tiempo de generación es generalmente corto y existen todos los tipos metabólicos), las comunidades de un ecosistema son características: el investigador, cuando busca un determinado microorganismo, no analiza todos los ecosistemas, sino que tiene idea aproximada sobre donde hallarlo. Esto se debe a

que el ambiente regula la composición de la comunidad bajo la presión de los factores físicos, químicos y biológicos.

El ambiente interactúa con el microorganismo y se llega a un equilibrio dinámico, ya sea naturalmente, por cambio de estaciones, por ejemplo, o artificialmente, por prácticas agrícolas como arado, aplicación de pesticidas, abonos, etcétera. El ambiente selecciona a las especies que se adaptan a las condiciones propias del ecosistema

Del punto de vista ecológico, los habitantes de una comunidad se pueden agrupar en: indígenas o autóctonos e invasores o alóctonos.

Criterio de autoctonía:

posibilidad de aislamiento repetido de la especie en distintas muestras de un mismo ecosistema

habilidad para usar los nutrientes comunes del medio y para soportar variaciones del ambiente

alta densidad del organismo, que será mayor en lugares con abundantes nutrientes y condiciones favorables como en el suelo en la vecindad de raíces (aspecto cuantitativo).

Una comunidad puede ser poli o monopoblacional. Por ejemplo polipoblacional, en el suelo, en una laguna, en el desierto, en cambio, una comunidad integrada por un patógeno vegetal es monopoblacional; estas cualidades reflejan el aspecto cualitativo de la comunidad.

Especie dominante: es la que exhibe una alta población o abundancia de filamentos. En general, la comunidad puede poseer dos o más especies codominantes.

Habitat

Es un área que posee cierto grado de uniformidad y cuyas características se supone que son de significado ecológico: superficie de una hoja, plantas o animales, el mar, una parcela de suelo fértil, porción de arena de desierto, etc. Su tamaño varía. Denota un conjunto de condiciones favorables o desfavorables para la vida, y es más específico que el término ambiente.

Las superficies son de importancia considerable como habitats microbianos, los nutrientes se pueden concentrar sobre ellas y estimular el desarrollo de numerosas especies. El empleo de láminas experimentales está muy extendido: éstas se sumergen solas o con algún aditivo nutritivo, en el suelo, en aguas.

Luego de algún tiempo se aprecia en el microscopio la formación de microcolonias, que se adhieren a la película, muy semejantes a las que se forman en superficies naturales.

Nicho ecológico

Interesa conocer las actividades de los microorganismos. El que un organismo esté presente en un ecosistema no quiere decir que esté activo. Así, la existencia medible de una transformación bioquímica específica es una buena prueba de que el grupo existe y está activo. Se aplica el término nicho a las funciones que el organismo realiza. El ambiente es como la dirección y el nicho la función del organismo.

Los microorganismos en la naturaleza

Los microorganismos se encuentran en todos ambientes naturales. En muchos ambientes donde los organismos superiores están ausentes, debido a extremos físicos o químicos, gran variedad de microorganismos existen y se desarrollan como en los casos de acidez extrema, desecación, salinidad.

Los factores del ambiente afectan a los microorganismos en la naturaleza tanto como lo hacen en el laboratorio. En ambientes naturales, en general, es el nivel y la naturaleza de los nutrientes disponibles, quien determinará los niveles de crecimiento bacteriano. Como estos niveles son en general mucho menores que en el laboratorio, la producción de células en la mayor parte de los ambientes naturales es menor que en los cultivos de laboratorio.

En la naturaleza los microorganismos sufren períodos de abundancia (restos de cultivos, animales muertos), seguido de períodos de limitación, en los cuales aprovechan de los polímeros intracelulares de reserva (ácido beta-OH-butírico, polifosfatos, etc). Son escasos los períodos de crecimiento exponencial.

Por ejemplo, el tiempo de generación de *Escherichia coli* en el intestino es de unas 12 horas (dos duplicaciones por día), mientras que en el laboratorio puede ser de sólo 20 minutos.

Brock y Madigan (1993) estiman que ciertas bacterias del suelo se desarrollan a menos del 1% de la tasa que muestran en medios de laboratorio, como reflejo de:

* bajo suministro de nutrientes

* la distribución de los mismos no es uniforme

* los microorganismos no crecen solos, salvo excepciones, en los ambientes naturales y sufren activa competencia de otros microorganismos.

En lugar de competir por el mismo sustrato, algunos microorganismos cooperan para realizar una transformación particular, que no realizarían si actuaran solos.

La figura 1 ubica a los organismos productores, consumidores y degradadores en el ecosistema suelo-planta y la figura 2 presenta un esquema de las interacciones entre los integrantes de la comunidad. Las del tipo 1 ocurren entre la comunidad microbiana y los componentes del suelo, las del tipo 2 entre los microorganismos entre si, las del tipo 3 entre las comunidades vegetales y microbianas y finalmente las interacciones del tipo 4, que involucran al suelo y la vegetación, interesan sólo accesoriamente al biólogo del suelo y son dominio de la fisiología y patología vegetal.

Figura 1 - Organismos en el ecosistema suelo-planta

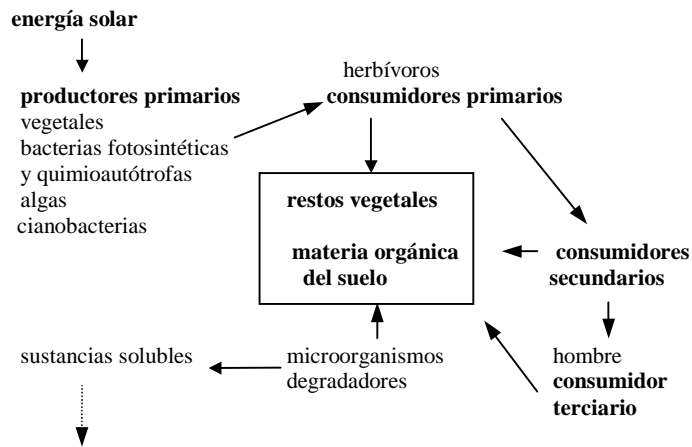
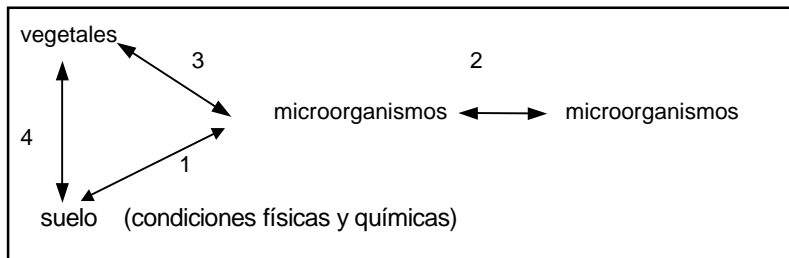


Figura 2- Interacciones en el ecosistema suelo-planta



Ambientes microbianos

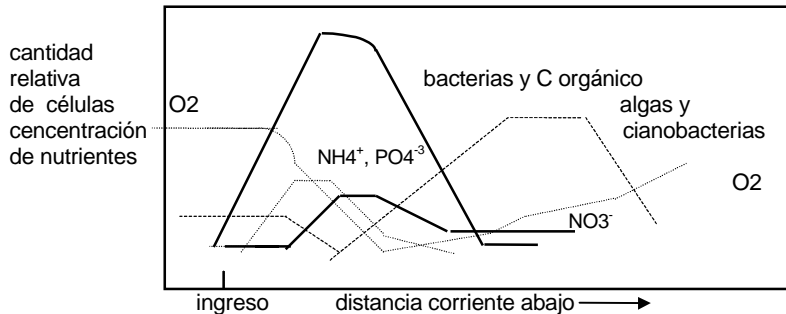
Habitats acuáticos

Los entornos típicos son los océanos, estuarios, pantanos, lagos, ríos y manantiales. Difieren mucho entre sí en propiedades físicas y químicas en las especies microbianas activas. Los organismos fotosintéticos predominantes son cianobacterias y algas en las zonas aeróbicas y bacterias fotosintéticas en las anaerobias.

Las algas que flotan reciben el nombre de fitoplancton y las de los lechos se dicen algas bentónicas. Son los productores primarios de estos ambientes. Los océanos abiertos son muy bajos en productividad primaria, mientras que las áreas en los océanos interiores son altas, siendo los lagos y manantiales los de mayor productividad, donde la concentración de nutrientes minerales requeridos por las algas es abundante y facilitan el desarrollo de peces y mariscos.

Las relaciones del oxígeno en un río son de interés, sobretudo cuando éstos reciben mucha materia orgánica como aguas servidas y desechos de la industria. Puede ocurrir un marcado déficit de O_2 , como se ve en la figura 3, consecuencia del incremento en bacterias heterótrofas. Si hay mucho amonio, éste es oxidado a nitratos por las bacterias nitrificantes. El incremento en algas y cianobacterias es una respuesta primaria a los nutrientes inorgánicos, sobretudo el fosfato.

Figura 3 - Efecto de la llegada de aguas con materia orgánica a un río



A medida que el agua se aleja de la entrada del drenaje, la materia orgánica se consume gradualmente y el contenido de O_2 regresa a la normalidad. La disminución del oxígeno es indeseable ya que la mayoría de los organismos superiores requieren este gas y mueren en anaerobiosis. Se forman además compuestos de mal olor (aminas, amidas, mercaptanos, H_2S) por bacterias anaeróbicas, algunas de las cuales son también tóxicas para animales y plantas.

Ambientes terrestres

El comportamiento de una población y sus efectos sobre el suelo están gobernados en gran parte por las características físicas y químicas de éste.

Del punto de vista **edafológico**, el suelo es la capa más externa de la superficie de la tierra, diferente a la roca madre de la cual tomó origen, por la acción combinada de factores muy diversos como el clima, roca madre, vegetación, microflora, en el transcurso del tiempo pedológico.

Del punto de vista **agrícola**, el suelo es la región de la tierra que permite la vida de las plantas, del cual obtienen el soporte mecánico y los nutrientes necesarios.

Del punto de vista del **microbiólogo**, el suelo constituye un medio único, ya que contiene gran población de bacterias, actinomicetes, algas, hongos, protozoos, virus, es uno de los lugares en donde las interacciones biológicas son más intensas y donde ocurren los procesos bioquímicos vinculados a la degradación de la materia orgánica, las transformaciones de los elementos minerales muy importantes para la nutrición de las plantas, como el N, P, S, Fe, Mn, etc.

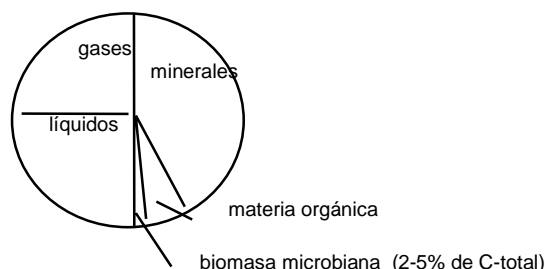
De un punto de vista **más general**, el suelo se describe como un organismo vivo, ya que nace por la pedogénesis de la roca madre, se desarrolla por múltiples procesos de degradación y síntesis, almacena reservas y puede llegar a morir por mineralización gradual si no se conserva su reserva de materia orgánica: el humus.

Las actividades de los microorganismos en este ambiente altamente heterogéneo, difieren drásticamente del comportamiento manifestado en medios clásicos de laboratorio. Los microorganismos no actúan solos; otros microorganismos, la micro y meso fauna, la vegetación y las propiedades físicas y químicas del suelo y la acción del clima y el hombre, contribuirán a exaltar o a inhibir un determinado proceso biológico.

Descripción general del suelo

Los componentes del suelo son: la fracción mineral, la orgánica, agua, aire y organismos vivos. El esquema siguiente resume las proporciones de cada uno, aunque los valores varían con los suelos y con la profundidad. De la fracción inanimada, la cantidad de materia orgánica y mineral es relativamente constante en un sitio dado, mientras que el aire y agua fluctúan (representan aproximadamente la mitad del volumen del suelo y constituyen el espacio poroso) (figura 4)

Figura 4- Principales componentes del suelo



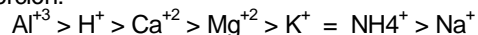
La fracción mineral

Esta fracción, generalmente menos que el 50% del volumen del suelo, se originó por desintegración de la roca madre, meteorizada en el curso del tiempo. Ejerce gran importancia en la disponibilidad de nutrientes, la aireación, la retención y el movimiento del agua y afecta a la microflora. Las partículas varían desde gravas de más de 2 mm hasta las arcillas, menores a 2 micras, visibles sólo al microscopio. Forman agregados con la materia orgánica que contribuyen a la estructuración del suelo. Químicamente están constituidos por aluminosilicatos, óxidos y carbonatos. Las arcillas presentan la mayor reactividad ya que poseen una gran relación superficie/volumen.

La fracción mineral presenta propiedades químicas y actividades variables según el tamaño de las partículas. La arena y el limo están formados por cuarzo, feldspatos, micas, y otros silicatos. Su actividad química es casi nula a corto plazo. La arcilla está constituida por silicatos de estructura foliacea semejante a las micas y se caracterizan por presentar propiedades coloidales, con gran relación superficie a volumen con predominio de cargas electrostáticas negativas. Están formadas por minerales secundarios del grupo de la montmorillonita, illita, caolinita, etcétera.

Las arcillas y el complejo arcilla-humus retienen iones de signo contrario, generalmente cationes. Estos están en equilibrio con la solución del suelo, con los que se pueden intercambiar. Cuando aumenta la concentración de un catión en la solución, por ejemplo al agregar un fertilizante, el catión agregado desplaza una parte de los otros cationes retenidos por el coloide, que a su turno pasan a la solución.

La cantidad total de cationes que puede retener un suelo constituye su capacidad de intercambio (**CIC**), que se expresa en miliequivalentes/100 g de suelo. Los cationes se pueden ordenar por su capacidad de adsorción:



Muchas sustancias asimiladas por los microorganismos son aniónicas, como los bicarbonatos, nitratos, fosfatos, sulfatos, molibdatos, pero la capacidad de intercambio aniónico no es apreciable. El amonio es fácilmente retenido por los coloides del suelo, pero los nitratos, formados por la oxidación biológica de aquellos son, por el contrario, muy móviles, desplazándose tanto lateralmente como en profundidad.

La fracción orgánica

Materiales orgánicos de origen animal o vegetal llegan o son formados en el suelo, donde son descompuestos por las actividades microbianas. La materia orgánica que no es completamente degradada contribuye a la formación del humus, material amorfo, formado por una mezcla compleja de

sustancias altamente polimerizadas. Dentro de esta fracción, una pequeña proporción es soluble en agua (azúcares, aminoácidos), pero la mayor parte consiste en materiales oscuros, insolubles.

El humus constituye la reserva nutritiva de un suelo (capítulo 8), por sus propiedades coloidales retiene e intercambia cationes básicos, se asocia a minerales coloidales y puede ser adsorbido en la superficie de partículas minerales

Componentes líquidos y gaseosos

El agua del suelo está sujeta a fluctuaciones que afectan profundamente a las poblaciones microbianas y a las raíces. Contiene solutos como sustancias minerales y orgánicas además de gases y constituye el medio nutritivo líquido para los microorganismos.

Si el suelo está saturado con agua, el exceso drenará por gravedad. La cantidad de agua retenida luego de un escurrimiento de 2-3 días se denomina capacidad de retención de agua o capacidad de campo y según la textura, esta tensión puede variar entre 0,1 y 0,5 barías para suelos de textura gruesa o fina, respectivamente. En general, se toma como promedio una succión de 0,33 barías. Cuando el suelo se seca, los espacios porosos se llenan progresivamente con aire, hasta que toda el agua capilar es removida, quedando el agua más fuertemente retenida: osmótica e higroscópica.

A medida que el suelo se seca, resulta más dificultoso remover el agua residual. Es posible medir, por variedad de métodos, la presión de succión necesaria para llevar el suelo a un determinado nivel de humedad. Esta presión es normalmente medida en cm de succión de agua, o más convenientemente como su \log_{10} , conocida como escala de pF, cuyos valores varían entre 0 y 7.

Algunos niveles de importancia biológica:

400 barías (aproximadamente 400 atmósferas, pF 5,6), tensión sobre la cual cesa toda actividad microbiológica en el suelo

15 barías (aproximadamente 15 atm; pF 4,2), tensión en la cual la mayoría de los vegetales alcanza el punto de marchitamiento permanente

1/3 de baria (aproximadamente 1/3 atm; pF 2,5), humedad correspondiente a la humedad equivalente en suelos de textura media a gruesa, es decir la humedad de una muestra de suelo que luego de haber sido saturado, se somete por 30 minutos a una fuerza centrífuga de 1000 g (aproximadamente 2.440 rpm).

La aireación y la humedad están directamente relacionados ya que la porción del espacio poroso que no contiene agua está ocupada por gases, que constituyen la atmósfera del suelo. Comúnmente, la concentración de CO₂ excede a la atmosférica en un factor de 10 o 100 y el O₂ es menos abundante. Estas variaciones están relacionadas con la actividad respiratoria de la población del suelo: vegetal y microbiana.

Un suelo bien aireado, desde el punto de vista microbiológico, es aquel en el cual los procesos que requieren O₂ proceden a rápida velocidad.

Un suelo mal aireado está asociado a un mal drenaje y saturación como ocurre en general en suelos pesados, con muchas arcillas que poseen gran proporción de microporos que retienen fuertemente el agua. El oxígeno es poco soluble en agua y nuevos procesos ocurren, muchos de ellos perjudiciales para los vegetales, por ejemplo, se libera N₂ o CH₄, aparecen inhibidores orgánicos y se acumulan S⁻, Fe⁺⁺, Mn⁺⁺.

Vemos así que las características del suelo determinan:

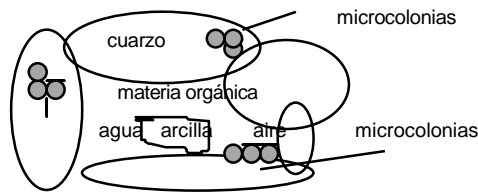
* el ambiente donde se encuentran los microorganismos

* la composición de la población microscópica tanto cuali como cuantitativamente.

Toman del suelo el agua, gases, nutrientes minerales y orgánicos, y el suelo les sirve como tampón en los cambios bruscos que pueden ocurrir en el pH. Los microorganismos contribuyen, con otros organismos, a la alteración de la roca madre, formando la reserva orgánica (humus), pero participan también a su degradación.

El desarrollo microbiano más extensivo ocurre como microcolonias en la superficie de las partículas del suelo, como se aprecia en la figura 5.

Figura 5- Microorganismos en un agregado de suelo



Métodos de estudio en ecología microbiana

La ecología microbiana enfoca los estudios de los microorganismos en diferentes aspectos:

1. la determinación de su forma y arreglo *in situ*
2. su aislamiento, identificación y cuantificación
3. evaluación de actividades: biológica global, enzimática, metabólica
4. evaluación de la biomasa microbiana
5. reconocimiento y seguimiento de microorganismos en ambientes naturales por técnicas genéticas y moleculares

Estos estudios brindan información sobre los tipos microbianos, biomasa (material vivo) y la función y se realizan tanto en comunidades en su ambiente natural (sinecología) como sobre especies aisladas en condiciones de laboratorio (autoecología). Pero, para lograr una comprensión completa de los microorganismos, se combinan ambas aproximaciones. (Lynch, 1983; Campbell, 1983, Stotzky *et al*, 1993, Pepper *et al*, 1995).

El estudio de los microorganismos *in-situ* tiene la ventaja de permitir al ecólogo microbiano medir los efectos de cambios físicos y químicos en una muestra del ambiente aislado para su estudio. Sin embargo, los estudios de identificación y aislamientos de especies activas, contribuyen a completar estudios sobre su número y actividades.

El hombre no estudia estos temas por simple curiosidad, sino por su vinculación con la fertilidad del suelo, depuración de aguas, deterioro de alimentos, bioremediación de ambientes. Puede luego emplear estos conocimientos para dirigir estos procesos en su beneficio.

Determinación de la forma y ordenamiento de los microorganismos *in situ*

Esta técnica es la base de todo estudio ecológico ya que nos ofrece evidencia directa de la presencia de los organismos ambientes particulares. Se emplean procedimientos microscópicos para la observación *in-situ*, incluso se filman eventos en el tiempo.

El suelo no debe alterarse y la estructura se mantiene por impregnación con gelatina o resinas. Cortes finos permiten la observación al microscopio luminoso o en el electrónico por transmisión o por barrido de superficies.

La **microscopía fluorescente** permite visualizar las relaciones de bacterias y hongos con partículas orgánicas e inorgánicas. Como algunos colorantes no dañan a las células es posible efectuar aislamientos con micromanipulador; las bacterias ofrecen más dificultad por su pequeño tamaño y mayor espaciamiento. La rizosfera ofrece un hábitat muy favorable para su proliferación y se han desarrollado técnicas muy precisas que muestran la relación de células de la raíz con microorganismos de interés (*Rhizobium*, *Azotobacter*, etc.), empleando anticuerpos fluorescentes específicos.

La **microscopía óptica**: la clásica técnica de Rossi y Cholodny (1930) de la lámina enterrada permite observar cambios de la distribución espacial de los microorganismos en el tiempo. Los portaobjetos se tratan con gran variedad de sustratos orgánicos o inorgánicos. Son empleados otros materiales transparentes como celulosa, cutina, quitina.

Aislamiento y recuento de los microorganismos en medios selectivos

Rara vez un ambiente natural contendrá un sólo tipo de microorganismo, en la mayor parte de los casos existe una gran variedad. Los microorganismos se aíslan de la naturaleza en cultivos puros para su identificación y el estudio de su autoecología. Los medios empleados son muy numerosos:

no selectivos, o de amplio espectro que permiten el desarrollo de muchos microorganismos. Como se supone, aislar la mayoría de los organismos es tarea imposible. Se denomina microflora

total al conjunto de los heterótrofos capaces de crecer en medio con extracto de suelo y una fuente de carbono y energía, como la glucosa (Anexo Práctico).

Otros medios son más aptos para el desarrollo de los hongos: sales minerales, sacarosa, nitratos, acidificado por ácidos orgánicos y con antibióticos que inhiben la proliferación de bacterias. Los actinomicetes pueden atacar nutrientes más complejos que las bacterias, como caseína, quitina, almidón, ácidos húmicos, etcétera.

selectivos, o de limitado espectro, están formulados para favorecer el desarrollo de un grupo particular de microorganismos a expensas del resto de la población

Así, la puesta en evidencia de los **grupos fisiológicos** -conjunto de organismos taxonómicamente a veces no relacionado, pero que presentan la misma aptitud para efectuar reacciones de biodegradación o de biosíntesis-, como los celulolíticos, los amonificantes, etc., se realiza por siembra en medios selectivos apropiados.

El aislamiento puede ser:

directo: con ayuda de ansa se siembra la superficie del medio sólido. Cuando la densidad es alta (caso de la mayoría de los heterótrofos) se logran colonias aisladas. La ayuda de micromanipuladores permite aislar bajo el microscopio una célula o propágulos claramente visibles como hongos muy pigmentados, pero resulta más difícil en el caso de las bacterias.

por enriquecimiento previo: si la población es baja se inocular la muestra en el medio selectivo líquido y por libre competencia predominarán los grupos capaces de emplear los sustratos. Luego de sucesivos pasajes por medio fresco se logra el aislamiento sembrando en la superficie del mismo medio, pero sólido.

Los medios se hacen **selectivos** por:

Contener un sustrato específico, como fosfato insoluble, celulosa, sales de amonio como única fuente de nitrógeno y energía, N₂, etc.

Cambio del pH, la acidificación inhibe el desarrollo de la mayoría de los neutrófilos y se posibilita el crecimiento de especies resistentes (*Lactobacillus*, *Thiobacillus*, etc.).

Con sustancias inhibidoras selectivas: actidiona, antibióticos, p-nitroitrobenzoceno, que inhibe a la mayoría de los hongos, pero no a *Fusarium sp.*

Modificando las condiciones de incubación (altas temperaturas, por ejemplo) se facilita el desarrollo de termófilos, la anaerobiosis inhibe a los aerobios, etc. Estos procedimientos son muy útiles para aislar bacterias difíciles de identificar por simple examen microscópico. En cambio, en otros grupos de protistas como hongos y algas, la diversidad morfológica facilita su reconocimiento.

Estos procedimientos permiten el aislamiento o bien el recuento de viables (medios líquidos o sólidos). El cuadro 1 presenta algunos ejemplos en el aislamiento de bacterias.

Se evalúan actividades potenciales, ya que la presencia de una alta población perteneciente a un determinado grupo fisiológico no significa que el proceso se esté realizando. Una población abundante puede resultar inactiva, si no se reúnen las condiciones necesarias.

Las actividades reales se evalúan *in situ*.

El éxito del enriquecimiento requiere el uso de una fuente apropiada de "inóculo". Si bien los microorganismos son muy ubicuistas se encuentran en todos lados, el investigador busca aquellos ambientes en donde predomina el organismo deseado. La pasteurización del inóculo (80°C, 15 minutos) al matar células vegetativas permite aislar muchos organismos esporulados en distintos medios de enriquecimiento.

Cuadro 1 - Técnicas de enriquecimiento para aislar bacterias

Fototrófas a la luz, principal fuente de carbono: CO₂

Aerobiosis	organismos enriquecidos	inóculo
N ₂ como fuente de nitrógeno	cianobacterias	agua de pozo, lodos, tierra húmeda a la luz
Anaerobiosis		
H ₂ , ác.orgánicos,N ₂	bacterias purpúreas no sulfurosas	lodos ricos en
H ₂ S donador de e ⁻	bacterias sulfurosas purpúreas y verdes	sulfuros

Quimiautolitotróficas en la oscuridad: fuente de C, CO₂

Aerobiosis			
Donador de e⁻	aceptor de e⁻	.organismos	inóculo
NH ₄ ⁺	O ₂	<i>Nitrosomonas</i>	tierra, lodos
NO ₂ ⁻	O ₂	<i>Nitrobacter</i>	aguas servidas
H ₂	O ₂	bacterias del H ₂	
H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ⁼	O ₂	<i>Thiobacillus spp</i>	
Fe ⁺³ , pH bajo	O ₂	<i>T. ferrooxidans</i>	

Anaerobia			
S⁰, S₂O₃⁼	NO ₃ ⁻	<i>T. denitrificans</i>	suelos, lodos
H ₂	CO ₂	<i>metanogénicas</i>	biodigestor
H ₂	NO ₃ ⁻	<i>Paracoccus denitrificans</i>	lodos, rumen

Quimiorganotróficas en la oscuridad, fuente de C compuestos orgánicos
aerobiosis, respiración aerobia

Componentes	aceptor de e ⁻	organismos	inóculo
lactato, NH ₄ ⁺	O ₂	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	tierra, lodo
Vegetación en descomposición:	pasteurizar	(80°C) para enriquecer en <i>Bacillus</i>	"
almidón, NH ₄ ⁺	O ₂	<i>Bacillus polymyxa</i> , otros <i>Bacillus spp</i>	"
etanol (4%)+ 1%	O ₂	<i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i>	"
ext.levad.,pH 6 hidrocarburos (ej.aceite mineral), Amonio	O ₂	<i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i>	"
Celulosa, amonio	O ₂	<i>Cytophaga</i> , <i>Sporocytophaga</i>	"
Azúcares, N ₂	O ₂	<i>Azotobacter</i>	"

anaerobiosis, respiración anaerobia

Componentes	aceptor e ⁻	organismos	inóculo
ácido orgánico	KNO ₃ (2%)	<i>Pseudomonas</i> (especies denitrificantes)	tierra, lodo, sedimentos de lagos
extrac.levadura	KNO ₃ -10%	<i>Bacillus</i>	suelo
ácidos orgánicos	Na ₂ SO ₄	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfotomaculum</i>	suelo, aguas
CH ₃ OH	Na ₂ CO ₃	<i>Methanosarcina barkeri</i>	suelo
CH ₃ NH ₂	KNO ₃	<i>Hyphomicrobium</i>	suelo

anaerobiosis, fermentación

Glutamato	<i>Clostridium</i>	lodo, sedimentos,	
histidina	<i>Tetanomorphum</i>	vegetales en descomp., lácteos rumen, aguas servidas	
almidón, amonio	<i>Clostridium spp</i>	"	"
almidón, N ₂	<i>C. pasteurianum</i>	"	"
glucosa, extracto de levadura, pH 5	<i>bacterias del ácido láctico, Lactobacillus Streptococcus</i>	"	"

Winogradsky (microbiólogo soviético, 1856-1953) fue el primero en evaluar la actividad de un grupo de especies en el suelo mismo, en lugar de hacerlo con una especie aislada, en medio artificial. El suelo se humedece convenientemente hasta formar una pasta (técnica de la tierra **empastada**) con el

agregado de alguna sustancia nutriente para el grupo microbiano que se desea exaltar. El suelo se incubaba en cajas de Petri hasta el desarrollo de colonias en su superficie. Esta técnica se sigue empleando actualmente, por ejemplo, para poner en evidencia rápidamente la carencia del suelo en ciertos nutrientes como fósforo o calcio. *Azotobacter*, muy exigente en fósforo, crece alrededor de las fuentes de este elemento.

La columna de Winogradsky se emplea aun para el aislamiento de bacterias fotosintéticas purpúreas y verdes y otros anaerobios: un cilindro de vidrio se llena hasta la tercera parte con sustrato rico en sustancias orgánicas, con fuente de sulfuro (lodos, tierra mezclados con papel, aserrín, hojas o raíces molidas, carne, etc.) y CO_3Ca y SO_4Ca que actúan controlando el pH y como fuente de S. Se coloca una delgada capa de lodo en la parte superior, luego se llena con agua, se tapa con papel de aluminio y se coloca a la luz indirecta durante unas semanas.

Las sucesiones microbianas que se apreciarán son:

- algas y cianobacterias aparecen rápidamente en la parte superior de la columna de agua (producen O_2 y mantienen aireada esta zona)
- las fermentaciones en el lodo producen ácidos orgánicos, alcoholes e H_2 , sustratos para las bacterias reductoras de sulfatos. El sulfuro producido se visualiza por precipitados negros de sulfuro ferroso y permite además el desarrollo de bacterias fotosintéticas anaerobias en las capas exteriores del lodo expuestas a la luz
- en la interfase lodo-agua puede aparecer color rojo y verde de las bacterias fotosintéticas

Este modelo se ha empleado mucho para enriquecer variedad de procariotes, tanto aerobios como anaerobios: la columna se enriquece con un sustrato particular cuya degradación se desea estudiar y se deja un tiempo para que estos microorganismos se seleccionen. Al enriquecimiento en la columna sigue el aislamiento en cultivo puro sobre agar, pudiéndose obtener especies de crecimiento lento, quizá ecológicamente más importantes.

Cultivos puros

Todo aislamiento termina en **medio sólido**, dando colonias originadas por la progenie a partir de una sola célula. Se pueden obtener cultivos puros de varias maneras, pero los métodos más empleados son:

- la siembra en superficie (estrías con ansa)
- la siembra por inclusión en tubo con medio en agar sobrefundido o en caja de Petri vacía (medio en sobrefusión sobre el inóculo que se mezcla íntimamente)
- los métodos de dilución en medio líquido

El primero es el más empleado cuando el microorganismo se desarrolla bien sobre el agar. Siembras repetidas permiten obtener cultivos puros a partir de una colonia bien aislada que se conservan en heladera en tubos de agar inclinado o liofilizados.

El método de **siembra en inclusión** consiste en la dilución de un cultivo mixto en tubos con medio de agar fundido, luego de la mezcla se siembra en caja de Petri. Aparecen colonias incluídas en el agar más que en la superficie de la placa.

Para organismos que no se desarrollan bien en o sobre el agar la purificación se puede lograr por diluciones sucesivas de una suspensión de células en medio líquido hasta más allá de la dilución en que no aparece crecimiento. Repitiendo la operación se puede llegar a obtener cultivos puros al sembrar en medios sólidos.

Recuentos

Las densidades microbianas se evalúan por diferentes métodos (Anexo Práctico), entre ellos los:

recuentos de viables en medios líquidos o sólidos o en plantas en caso de simbiosis. No existe un medio de cultivo que permita el desarrollo de la población microbiana heterótrofa. Se usa medio con extracto de suelo y una fuente de carbono y energía (glucosa). Más frecuentemente se determinan las poblaciones de bacterias de acuerdo a los grupos fisiológicos de interés para el investigador, para los cuales es posible formular medios y condiciones de cultivo selectivos.

recuento directo (microscópicos o totales) son también empleados, reflejando poblaciones viables y no viables de bacterias en suelos: en general 10^8 - 10^9 células/g de suelo seco. Los recuentos de viables no representan un 10% de estas cifras, y muchas veces menos del 1% (Alexander, 1977).

Las bacterias del suelo raramente se encuentran aisladas, sino que se agrupan en colonias y muchas veces resulta difícil separarlas al efectuar las suspensiones-diluciones, para los recuentos de viables. Otra limitación es la adsorción sobre partículas de humus o arcillas, que disminuye los recuentos de bacterias.

Actividad biológica global

Sin detenernos en el estudio de grupos particulares de organismos de un ecosistema particular, interesa muchas veces conocer globalmente su actividad mediante el empleo de técnicas que evalúan la actividad de la micropoblación en su conjunto:

Actividad respiratoria, por evolución del CO₂, absorción de O₂., en sistemas cerrados

Actividad enzimática, por ejemplo, las deshidrogenasas, amplio conjunto de enzimas que catalizan la transferencia de protones y electrones desde sustratos reducibles hasta el oxígeno o en su defecto aceptores artificiales. Otras enzimas: proteasas, ureasa, celulasa, glucosidasas, etc., son también evaluadas

Actividad bioquímica global evaluada mediante ensayos de mineralización y/o percolación

Actividad respiratoria

Son técnicas comparativas empleadas para informar rápidamente sobre la potenciabilidad biológica de estos ambientes. En el caso del suelo se correlaciona esta actividad con el contenido de materia orgánica, humedad y prácticas de manejo. Pero se incluye el CO₂ de la mesofauna y de las raíces, resultando difícil distinguir la contribución de cada uno en ensayos de campo. La actividad *in situ* se determina evaluando volúmenes conocidos de la atmósfera sobre una superficie determinada de terreno (m²).

La determinación del CO₂ se realiza por:

absorción en solución alcalina (KOH) y determinación gravimétrica o volumétrica (Anexo Práctico)

conductividad eléctrica en solución alcalina

espectrometría en la zona del infrarrojo

cromatografía gaseosa, con detector de conductividad térmica

La absorción del oxígeno se mide por electrodos específicos o en modificaciones del aparato de Warburg, con recipientes internos que permiten muestras de suelos de 10-20 g, los cambios de presión se miden a volumen constante, el CO₂ se recoge en solución alcalina.

Actividad enzimática

Las actividades de los microorganismos requieren la participación de un conjunto de enzimas. La actividad de una de ellas, bien escogida, puede reflejar la actividad biológica global.

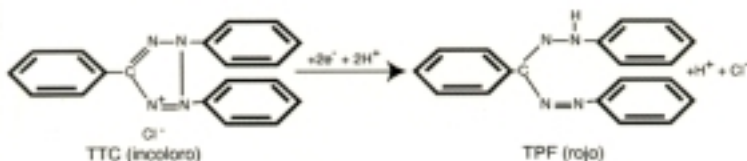
Agregando un antiséptico, como el tolueno, se logra en parte detener la proliferación microbiana durante el período de incubación y pueden evaluarse las enzimas liberadas por los microorganismos, los vegetales y animales.

Entre las **hidrolasas** se evalúan la sacarasa, amilasa, celulasa, incorporando a muestras de suelo solución con el sustrato específico. Luego de una incubación apropiada en condiciones controladas, se extraen los productos de la hidrólisis, determinándose los de azúcares reductores, durante el tiempo de incubación. Es muy empleado el diacetato de fluoresceína como sustrato para numerosas hidrolasas. Se evalúa la fluoresceína liberada.

Otras enzimas evaluadas son: **fosfatasas**, con glicerofosfato como sustrato, **proteasas**, **ureasas**, **ARNasa**, **ADNasa**. En la evaluación de enzimas que catalizan reacciones redox, se trabaja en ausencia de antiséptico, pues las enzimas son endocelulares.

La determinación de la **actividad deshidrogenásica** de los suelos es muy empleada por los distintos grupos de trabajo, eliminando completamente el oxígeno y reemplazándolo por un aceptor artificial de electrones, como el tricloro fenil tetrazolio (TTC) o el iodo nitrofenil tetrazolio (INT), que se reducen a tricloro fenil formazán (TPF) o iodo nitroformazán (INP), rojos, que se extraen con acetona o metanol y se evalúan a 485 nm frente a curva patrón (figura 6).

Figura 6 - Actividad deshidrogenasa con triclorofeniltetrazolio (TTC) como aceptor artificial de electrones



Es necesario trabajar al abrigo de la luz, pues estos aceptores de electrones son fotosensibles (Anexo Práctico).

Se encontraron correlaciones significativas entre consumo de oxígeno y el número de bacterias con la actividad deshidrogenasa. La evolución de las deshidrogenasas y el CO₂ fueron las determinaciones que permitieron evaluar más rápidamente respuestas de la microflora del suelo frente a diferentes manejos del suelo (Frioni, 1986).

Actividad bioquímica global

Se compara la capacidad de degradación de un sustrato particular midiendo su desaparición por pérdida de peso o análisis químico o indirectamente siguiendo la producción de metabolitos, o por respirometría. La muestra (suelo, agua, restos orgánicos, alimentos) se incuba con la sustancia cuya biodegradación se desea evaluar: proteína, ácidos, húmicos, almidón, en condiciones controladas de laboratorio (actividad potencial) o en el campo (actividad real) y se sigue la desaparición de la sustancia o la aparición de productos del metabolismo: amonio, nitratos, sulfatos.

Estas técnicas evalúan la actividad de un grupo grande de microorganismos (grupos fisiológicos) sin detenerse en la caracterización de géneros o especies responsables.

El empleo de modelos computabilizados constituye una invaluable ayuda para el ecólogo y su empleo facilita las interpretaciones.

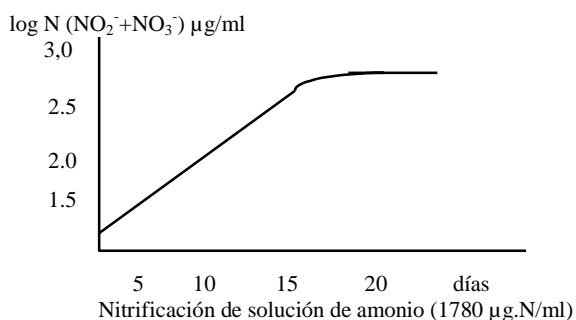
El empleo de **radioisótopos**, microelectrodos e isótopos estables ha contribuido mucho en la evaluación de la actividad microbiana en ambientes naturales.

Así, en medidas de la fotosíntesis se mide la captación del CO₂-C¹⁴ en las células, la reducción del sulfato a sulfuros con empleo de S³⁵. La metanogénesis en ambientes naturales se puede evaluar por la conversión del CO₂ marcado a metano marcado en presencia de H₂. El N¹⁵ es otra de las herramientas más empleadas en las transformaciones del N en ambientes naturales.

Como los ambientes microbianos son en general muy pequeños, microambientes, se emplean microelectrodos (de O₂, S²⁻, pH, amonio) para evaluar procesos biológicos en la naturaleza.

La técnica de **percolación** se emplea en evaluación de la cinética de algunos procesos de mineralización o de oxidorreducción. Se simula el perfil del suelo colocándolo en una columna de vidrio. El metabolito en estudio se recicla a través del suelo (cíclica o acíclicamente) y la población se investiga como una unidad biológica. Se empleó para el estudio de la oxidación del amonio, pero su uso está muy generalizado. Periódicamente se extraen muestras del líquido percolante y se analizan metabolitos, en función del tiempo.

Figura 7 - Actividad bioquímica en suelos
Percolación cíclica de una sal de amonio



La figura 7 indica que la reacción de oxidación del amonio es una actividad bacteriana ya que los hongos o actinomicetes no exhiben incrementos logarítmicos en la actividad bioquímica. La velocidad de reacción se puede medir mejor por la acumulación de nitrito y nitrato, que por la desaparición del amonio, que puede ser adsorbido a los coloides.

Evaluación de la biomasa microbiana

La fracción de la materia orgánica de un ambiente presente en las células de la micropoblación se emplea mucho como parámetro de actividad biológica ya que son los microorganismos los agentes que catalizan los procesos biológicos. Su determinación constituye uno de los métodos más interesantes propuestos en los últimos años para evaluar la fracción viva de la microflora del suelo y refleja variaciones debidas a prácticas de manejo, uso de pesticidas, etc.

La biomasa microbiana se determina por:

Recuento del número de células o midiendo la longitud de micelio presente en una muestra, calculando el volumen y peso de tales propágulos, al multiplicarlo por el peso específico, se puede calcular el peso de los microhabitantes de una muestra de suelo, agua, alimentos.

Técnica de **fumigación y reinoculación**. Jenkinson y Powlson (1976) encontraron que al desinfectar el suelo con cloroformo la mayoría de los microorganismos muere y sus restos son mineralizados al reinocularlo con suelo fresco. Evaluaron los picos de CO₂ de ambas muestras luego de un período de incubación.

Una pequeña fracción de la materia orgánica es rápidamente convertida en CO₂ (2,3-3,4% del carbono del suelo) y representa la biomasa. También se emplea la técnica de fumigación-extracción: el C, N, P, lábil contenido en la biomasa es evaluado por procedimientos analíticos corrientes

Idea de biomasa de los diferentes grupos microbianos

Una forma útil de expresar la densidad de los distintos grupos microbianos en el suelo, es señalando su biomasa en kg materia viva/ha.

Ejemplo, por recuentos: 1 g de suelo fértil puede contener 5m de micelio fúngico, 1×10^8 células bacterianas, 1×10^6 esporas de actinomicetes. Si consideramos el peso de una bacteria o actinomicete como $1,5 \times 10^{-12}$ g y que 1m de micelio fúngico puede alcanzar $9,4 \times 10^{-5}$ g, la biomasa total de esta microflora llegaría a $6,0 \times 10^{-4}$ g, la que representa menos del 0,06% del peso total del suelo (1 g). Este dato puede ser en realidad menor, ya que el peso promedio celular se determinó en ensayos de laboratorio, en condiciones nutricionales más favorables que las de campo.

Un suelo arenoso, con área superficial de partículas baja ($72 \text{ cm}^2/\text{g}$), tendría sólo el 0,02% de la superficie de sus partículas colonizadas por bacterias. Se comparan las imágenes al microscopio electrónico de partículas de suelo colonizadas con la observación de la vegetación desde un avión, en un desierto. En el ejemplo anterior vimos que 1 g de suelo fértil puede contener 10^9 bacterias/g; si el volumen de cada una de ellas es de 1 micra^3 y su densidad media de $1,5 \text{ g/cm}^3$ tenemos que su peso será:

$$P = V \times d = 10^{-12} \text{ cm}^3 \times 1,5 \text{ g/cm}^3 = 1,5 \times 10^{-12} \text{ g}$$

y el de las contenidas en 1 g:

$$\text{Biomasa de bacterias/g suelo} = 1,5 \times 10^{-12} \times 10^9 = 1,5 \times 10^{-3} \text{ g}$$

Este dato que representa 0,15% del peso del suelo, puede llevarse a kg/ha: una hectárea de suelo de 0,20 m de profundidad pesa:

$10.000 \text{ m}^2 \times 0,2 \text{ m} = 2.000 \text{ m}^3$ (d aprox. = 1), que equivale a un peso de 2.000.000 kg de suelo. La biomasa bacteriana será de:

$$2,0 \times 10^6 \text{ kg} \times 1,5 \times 10^{-3} \text{ kg} = 3.000 \text{ kg/ha}$$

De esta forma se ha calculado para los distintos integrantes de la comunidad del suelo una biomasa aproximada de:

bacterias: 1-10 ton/ha

hongos: 0,5-5 ton/ha

protozoos, nemátodos: más de 100 kg/ha, estreptomicetes: 0,1-1 ton/ha.

Indicadores de la calidad del suelo

Los cambios en la calidad del suelo son evaluados por indicadores y éstos deben ser comparados con los valores deseables (niveles umbral o límites críticos) a diferentes intervalos de tiempo, en el agroecosistema seleccionado. El problema que se presenta, como se comprenderá, es determinar cuales son los valores que se consideran deseables, los de un suelo saludable. En general el umbral de comparación se obtiene de los ecosistemas no perturbados, por ejemplo las actividades de un suelo bajo bosque se comparan con las del mismo suelo no alterado (campo natural).

En áreas donde ya no existen ecosistemas naturales, el establecimiento de los umbrales de equilibrio o deseables de un indicador, se efectúa a partir de los valores medios resultantes de estudios realizados con anterioridad, en los mismos suelos. La determinación de estos límites de comparación constituye una limitante en muchos estudios

El cuadro 2 señala las determinaciones más corrientes en la evaluación de la actividad biológica de suelos y aguas, que incluyen análisis físicos, químicos y biológicos, a los cuales se van agregando aquellos que analizan presencia de microorganismos sin aislarlos (biodiversidad).

La selección de parámetros como indicadores biológicos de la calidad del suelo, sensibles a cambios en el uso y manejo del mismo y que se correlacionen con las clásicas determinaciones físicas y químicas, es motivo de numerosos estudios (Pankhurst *et al*, 1997, van Bruggen y Semenov, 2000, Frioni *et al*, 2003, Albanesi *et al*, 2003, Sicardi *et al*, 2004).

Cuadro 2- Parámetros empleados como indicadores de la calidad del suelo

Indicadores físicos	Indicadores químicos	Indicadores biológicos
textura	C-orgánico total	Recuentos, biomasa microbiana
capacidad de campo	pH	enzimas, respiración
profundidad	conductividad eléctrica	Medida de la biodiversidad: perfil de ácidos nucleicos, de ácidos grasos, perfiles metabólicos
densidad	N, P, K, extraíbles	N-mineralizable

Reconocimiento de microorganismos por técnicas genéticas y moleculares

El reconocimiento de microorganismos en ambientes naturales se ha tornado un desafío en los últimos años tanto en estudios ecológicos como en el seguimiento de organismos que son liberados al ambiente en el control biológico de plagas (capítulo 18), en la biorremediación de sustancias tóxicas (capítulo 20), etc.

Históricamente una variedad de métodos bioquímicos, serológicos y fenotípicos se han empleado para caracterizar bacterias, tales como rizobios y otras asociadas a las plantas: perfil de proteínas totales, de plásmidos, análisis de ácidos grasos, resistencia intrínseca a antibióticos, sensibilidad a bacteriófagos e isoenzimas. Más recientemente el desarrollo y la aplicación de métodos moleculares, basados en estudios de ácidos nucleicos, han permitido avances en la identificación y determinación de relaciones filogenéticas de organismos de importancia para la agricultura y el medio ambiente (Schneider y De Bruijn, 1996). Los métodos más recientes pueden agruparse en dos categorías (Jansson, 1995):

- los protocolos basados en la caracterización de los ácidos nucleicos, que permiten agrupar cepas en grupos coherentes, pudiendo establecerse relaciones filogenéticas y diferenciar cepas de igual género y especie.
- los basados en la detección fenotípica de marcadores genéticos, como resistencia a antibióticos, enzimas metabólicas, proteínas fluorescentes, perfil de ácidos grasos, etc.

Caracterización de ácidos nucleicos

Algunas de las técnicas utilizadas para caracterizar ácidos nucleicos incluyen: digestión total del ADN genómico con endonucleasas, que producen fragmentos de restricción cuyo polimorfismo se establece luego de amplificación con oligonucleótidos iniciadores cortos y arbitrarios (RAPD); y la caracterización de la secuencia de genes en el ARN ribosomal 16S. Estas técnicas se están utilizando últimamente para obtener información en la clasificación de los microorganismos a nivel especie/subespecie/cepa.

Numerosos trabajos señalan la utilidad y limitaciones de estos métodos basados en caracteres genotípicos, sobre todo en estudios de microorganismos asociados a plantas. El aislamiento del ácido nucleico no siempre es requerido para la aplicación de métodos de detección molecular, que involucran tratamientos enzimáticos o amplificación de trozos de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*). Para este estudio puede utilizarse una colonia bacteriana entera, un trozo de planta colonizada por un hongo micorrízico, o un nódulo entero en el caso de rizobios (Schneider y De Bruijn, 1996).

Polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP)

El método emplea enzimas de restricción que rompen el ADN en determinados lugares produciendo lo que se llaman “fragmentos de restricción”. Estos numerosos fragmentos pueden ser separados por su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa y ser comparados entre distintos microorganismos. Posteriormente pueden ser transferidos a una membrana de nylon por la técnica de “*Southern*” y uno o más fragmentos pueden ser detectados por hibridación con una sonda específica. Este fragmento puede ser de tamaño diferente en los individuos de una población, caracterizando un polimorfismo. Las sondas son diseñadas para detectar determinados fragmentos polimórficos, asociados a ciertos genes. Algunas secuencias polimórficas se repiten innumerables veces una luego de la otra a lo largo del ADN y el número de repeticiones varía de cromosoma a cromosoma.

Existen **sondas específicas** para estos *loci* que en análisis por RFLP proporcionan bandas de ADN en forma de código de barras (*DNA fingerprinting*) (Hungria, Araújo, 1994).

Reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, *Polymerase chain reaction*)

Constituye una reciente y poderosa tecnología desarrollada en los últimos años de gran aplicación en: diagnóstico clínico, microbiología ambiental, inmunología y muchos otros campos de investigación.

La enzima aislada de *Thermus aquaticus* (**Taq polimerasa**), es capaz de polimerizar eficientemente el ADN a 72°C y no se desnaturaliza a altas temperaturas. Esta enzima puede alargar *in vitro* un pequeño oligonucleótido (*primer*), adicionando nucleótidos en su secuencia si éste está hibridizado a una hebra de ADN complementario llamado molde (*template*), siguiendo las reglas de complementariedad de Watson y Crick. Para esto es necesario un exceso de nucleótidos en solución que sirven de unidades de montaje de la hélice a complementar en el molde.

El proceso de polimerización del ADN en el *PCR* comprende, por lo tanto, 3 pasos:

- El ADN contenido en la secuencia a ser amplificada es desnaturalizado por el calor, generalmente a 95°C
- Los oligonucleótidos (*primers*) se adhieren a secuencias complementarias del ADN molde. Este paso se realiza a una temperatura menor, que varía según el *primer* utilizado
- La Taq polimerasa polimeriza el segmento flanqueado por dos *primers* contiguos, siguiendo el orden dado por la hebra complementaria, en el sentido 5'-3'.

El ciclo se repite muchas veces hasta llegar al nivel deseado de amplificación, la que ocurre exponencialmente. Un ADN de doble cadena producirá dos hélices dobles luego de un ciclo, cuatro luego de 2 ciclos, 8 luego de 3, 1024 luego de 10 ciclos y así sucesivamente. De esta forma se pueden conseguir muchas copias de una zona específica de ADN. El producto de la amplificación se somete a separación electroforética en gel de agarosa, y es coloreado con bromuro de etidio, que al intercalarse entre las bases del ADN puede ser fácilmente visualizado al ser expuesto a luz ultra-violeta.

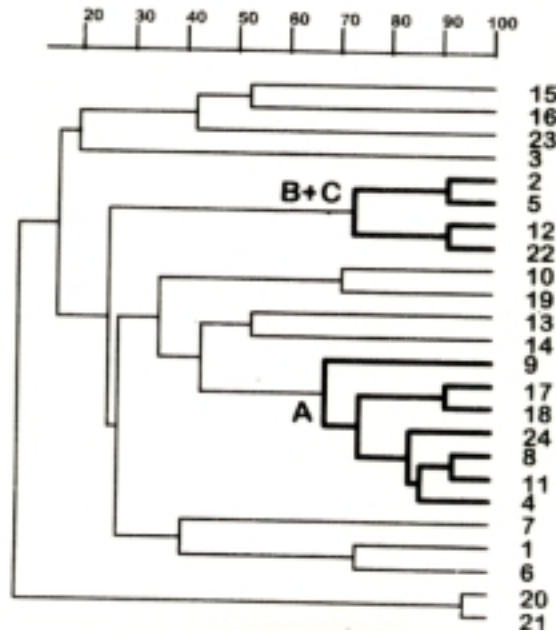
En el caso de bacterias, pueden utilizarse *primers* que reconocen secuencias repetidas en el genoma (*rep-PCR*). Con esto se obtiene una serie de bandas de amplificación de distinto tamaño que son características de cada cepa en particular. Esta técnica ha permitido caracterizar rizobios que nodulan leguminosas arbóreas nativas de Uruguay (Rodríguez y Frioni, 2003). La distribución de las bandas se analiza en programas de computación que emplean el principio de la taxonomía numérica, agrupando individuos según relaciones de homología, que aparecen en dendogramas (figura 8, Schneider y De Bruijn, 1996).

Detección fenotípica de marcadores genéticos

Un gran número de marcadores genéticos se han descrito, entre ellos genes de resistencia a antibióticos, como el *nptII* que codifica resistencia a kanamicina, que fue el primer gen usado como marcador. Este método presenta el riesgo de expandir resistencias a otros organismos en la naturaleza.

Genes que codifican enzimas se usaron como marcadores no selectivos, como el *xylE* que codifica catecol 2,3 oxigenasa, el *lacZY* (codifica beta-galactosidasa y lactosa permeasa) y el *gusA* (beta-gluconidasa GUS) muy usado en estudios de rizobios en nódulos donde no existe producción endógena de GUS. Puede utilizarse la hibridización de ADN para detectar estos marcadores fenotípicos.

Figura 8- Análisis de fragmentos de restricción en *Rhizobium loti* y *Bradyrhizobium que nodulan Lotus*. (dendograma con las cepas ordenadas de 1 a 24).



El uso de marcadores que codifican para la proteína luciferasa se ha extendido mucho ya que la formación de luz es fácilmente detectable. Bacterias marcadas con genes que codifican estas proteínas pueden ser monitorizados en el ambiente por varios métodos, por ejemplo en *Rhizobium meliloti* por siembra de contenidos nodulares, autoradiografía y visualización directa de colonias luminiscentes.

El avance en la puesta a punto de todas estas técnicas moleculares conducirá a facilitar el seguimiento de un microorganismo en ambientes altamente colonizados, como la rizosfera, restos orgánicos en degradación y seguramente conducirá a importantes avances en los estudios de interacciones entre microorganismos y entre microorganismos con plantas, animales y el hombre.

Bibliografía

- ALBANESI, A. 2003 Calidad de suelo: propiedades biológicas y evolución en ecosistemas semiáridos. En: **Microbiología Agrícola: Un aporte de la investigación argentina**. Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina: 7-22
- ALEXANDER, M., 1977, **Introduction to Soil Microbiology**, Wiley & Sons, Nueva York.
- BROCK, T. D. y M. T. MADIGAN 1993 Ecología Microbiana, en **Microbiología**, Prentice Hall Hispanoamericana, México: 655-685
- CAMPBELL, R., 1983, **Microbial Ecology**, Blackwell Scientific Publish, Oxford, Londres.
- DOMMERGUES, Y. y F. MANGENOT, 1970 **Ecologie Microbienne du Sol**, Masson et Cie, París.
- FRIONI, L., 1986: Efecto de enmiendas orgánicas sobre la actividad biológica de un suelo cultivado con maní, en Ciencia del Suelo, 2: 139-145.

- FRIONI, L., SICARDI, M., PEREYRA, C. 2003, Indicadores biológicos de la calidad del suelo sensibles a prácticas de manejo. En: **Microbiología Agrícola: Un aporte de la investigación argentina**, Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina: 23-37
- HUNGRIA, M. y R. S. ARAUJO 1994 Caracterização das estirpes por técnicas moleculares: o uso dos métodos de PCR a RAPD, en: **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**, EMBRAPA, Brasília, DF:183-199-
- JANSSON, J.K. 1995 Tracking genetically engineered microorganisms in nature. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 275-283
- JENKINSON, D. S. y D. S. POWLSON, 1976: The effect of biocidal treatments on metabolism in soil, Method for measuring soil biomass, *Soil Biol. Biochem.*, 8: 209-213.
- LYNCH, J. M., 1983: **Microbial Factors in crop productivity**, Soil Biotechnology, Blackwell Scientific Publish, Oxford, Londres.
- PANKHURST, C.E., DOUBE, B. M., GUPTA, V.V.S.R. 1997, **Biological Indicators of soil health**. CAB International, USA, UK
- PEPPER, I. L., CH.P. GERBA y J. W. BRENDENCKE, 1995 **Environmental Microbiology- A Laboratory Manual**, Academic Press, New York, USA
- RODRIGUEZ, A. y FRIONI, L. 2003, Caracterización de rizobios que nodulan leguminosas arbóreas nativas de Uruguay por la técnica de *rep-PCR*. *Rev. Argentina de Microbiología* 35: 193-197
- SCHNEIDER, M. y F. J. De BRUIJN 1996 Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *World J. of Microbiology & Biotechnology* 12: 163-164
- SICARDI, M., GARCIA-PRECHAC, F. y FRIONI, L. 2004 Soil microbial indicators sensitive to land use conversion from pastures to commercial *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) plantations in Uruguay. *Applied Soil Ecology* 27:125-133
- STOTZKY, G., M. W. BRODER, J.D. DOYLE, y R. A. JONES 1993 Selected methods for the detection and assessment of ecological effects resulting from the release of genetically engineered microorganisms to the terrestrial environment, *Advances in Applied Microbiology*, vol 38, Academic Press, London: 1-98
- VAN BRUGGEN, A. H. C., SEMENOV, A .M. 2000, In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Appl. Soil Ecol* 15(1): 13-24

Capítulo 6

Fermentaciones láctica y alcohólica Aplicaciones biotecnológicas: leche y derivados, ensilados

Desde muy antiguo el hombre empleó aun sin conocerlos a los microorganismos en la producción y conservación de alimentos. Los métodos más antiguos, empleados antes de la introducción de la refrigeración, radiaciones, aditivos, etc. son:

salado

secado al aire o ahumado

fermentaciones ácidas

Así, se conservaban frutas, hortalizas, pasturas, granos.

El empleo de otra fermentación, la alcohólica, permitió la conversión de frutas en productos estables y derivó en aplicaciones económicamente muy importantes de otro proceso microbiano.

Fermentación láctica

Es uno de los procesos microbianos más empleados a nivel mundial ya que involucra a la leche y sus derivados: manteca, yogur, leches ácidas, quesos, producción de caseína, otros subproductos, en los ensilados (forrajes, granos, pescado, etc.), en la conservación de frutas y hortalizas. La fermentación láctica puede ser como vimos en el capítulo 2, homo o heterofermentativa.

En la fermentación homoláctica, las bacterias degradan la glucosa por la vía glicolítica y el producto final es en un 90% ácido láctico. En la fermentación heteroláctica los productos finales son ácido láctico, etanol y CO₂, en cantidades equimoleculares. Las bacterias carecen de enzimas de la vía glicolítica (aldolasa y triosafofato isomerasa) y la degradación de la glucosa se realiza por la vía de las pentosas. El rendimiento energético es menor: 1 solo mol de ATP, en lugar de 2 como en los homofermentadores que producen el doble de biomasa por mol de azúcar fermentado. No se acumula poder reductor.

La producción de CO₂ es una forma sencilla de distinguir un grupo de otro.

Las bacterias del ácido láctico

Pertenecen a la familia *Lactobacteriaceae*: Gram positivas, comúnmente no móviles, no esporuladas que producen ácido láctico como producto final y único del metabolismo fermentativo. Los integrantes de este grupo carecen de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones y obtienen energía solamente por fosforilación a nivel del sustrato. Todas las bacterias del grupo crecen en anaerobiosis, pero la mayor parte de ellas no son sensibles al O₂ y pueden crecer con o sin O₂, por lo que son anaerobios aerotolerantes.

Algunas cepas pueden tomar O₂ por el sistema de flavoproteína oxidasa, dando H₂O₂, pero la mayoría carecen de catalasa y deben eliminar el agua oxigenada por otras enzimas, como las peroxidasas.

La mayoría de las bacterias acidolácticas obtienen energía sólo del metabolismo de los carbohidratos y su distribución está restringida a ambientes con azúcares. Exigen además aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas.

Los géneros han sido definidos en base a la morfología y al tipo de metabolismo fermentativo (cuadro 1).

Como se aprecia los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* presentan relaciones de bases en su ADN bastante similares y existe pequeña variación entre cepas. El género *Lactobacillus*, por el contrario posee miembros con diversa composición del ADN y no constituye un grupo homogéneo.

***Streptococcus*:** se presentan en cadenas de cocos, son mesófilos (óptimo entre 20 y 30°C), por lo que el calentamiento los destruye con facilidad, son homofermentativos y presentan una amplia variedad de especies con habitats muy diversos, algunos son patógenos. Constituyen la flora normal de la leche.

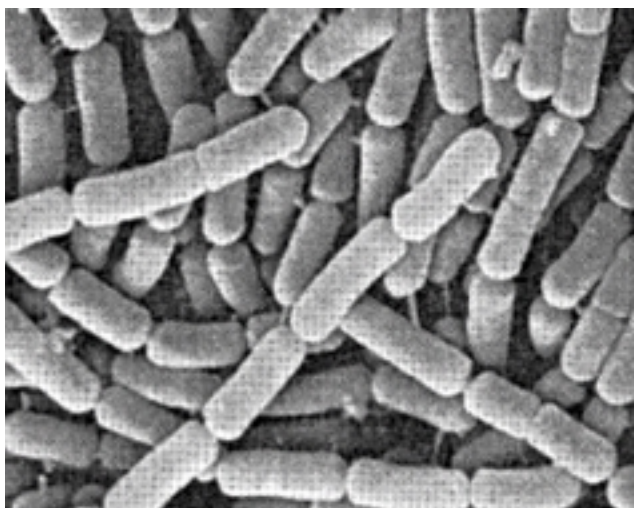
Cuadro 1- Principales géneros de bacterias lácticas

género	forma y agrupaciones	fermentación	ADN (mol GC%)
<i>Streptococcus</i>	cocos en cadena	homofermentativo	34-46
<i>Leuconostoc</i>	cocos en cadena	heterofermentativo	38-41
<i>Pediococcus</i>	cocos en tétrada	homofermentativo	34-42
<i>Lactobacillus</i>	bacilos en cadena	homofermentativo	32-53
	bacilos en cadena	heterofermentativo	34-53
<i>Enterococcus</i>	cocos en cadena	homofermentativo	38-40
<i>Lactococcus</i>	cocos en cadena	homofermentativo	38-41

***Leuconostoc*:** son diplococos o en cadenas, heterofermentativos, por lo que son poco acidificantes. Su habitat natural lo constituyen los vegetales y también se encuentran en la leche. Se emplean mucho como cultivos iniciales en la industria láctica por sus propiedades aromatizantes (diacetil y acetoina al descomponer el citrato), aunque han sido desplazados por el *S. diacetylactis*. Algunas cepas producen grandes cantidades del polisacárido dextrano (alfa 1,6-glucano), de uso médico.

***Lactobacillus*:** son bastones que varían de largos y delgados a cortos y curvos (figura 1). La mayoría son homofermentativos, pero algunas especies son heterofermentativas. El género se ha dividido en tres subgrupos principales (cuadro 2). Se los encuentra en la leche, ensilados, frutas y hortalizas conservadas, en la saliva, en el intestino humano y de animales. Producen grandes cantidades de ácido láctico, resisten altas temperaturas, son termodúricos. *L. delbrueckii* se emplea en la producción de yogur, *L. acidophilus* en la de leche ácida y otras especies participan en la producción de repollo fermentado, ensilaje y pickles. Resisten los pH bajos por lo que continúan creciendo cuando el pH descendió e inhibió a otras bacterias lácticas. Son, por lo tanto responsables de las etapas finales de las fermentaciones acidolácticas. Raramente son patógenos.

Figura 1- Micrografía electrónica de barrido de un centrifugado de cultivo de *Lactobacillus* spp (x 7.000)



Aplicaciones de la fermentación láctica

La fermentación láctica acidifica el medio a valores menores de 5,0, eliminando la posibilidad de crecimiento de microorganismos que alteran los alimentos. Esta práctica se emplea en la preparación de alimentos para el hombre, como los derivados de la leche y en la conservación de frutas y hortalizas y en alimentos para animales, como los ensilados.

Cuadro 2 - Características del género *Lactobacillus*

características	especies	ADN (mol%GC)
Homofermentativos		
Ac.láctico principal producto (más 85% de la glucosa, no dan gas,aldolasa)		
1) crecen a 45°C pero no a 15°C bacilos cortos	<i>L.delbrueckii</i> <i>L. acidophilus</i>	50 32-37
2) crecen a 15°C, variable a 45°C, bacilos cortos y coreniiformes	<i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. curvatus</i>	45-46 42-44
Heterofermentativos		
producen cerca del 50% de ác. láctico, CO ₂ y etanol, sin aldolasa, fosfocetolasa presente, bacilos largos y cortos	<i>L. fermentum</i> <i>L. brevis</i> , <i>L.buchneri</i> <i>L. kefir</i>	53 45 41

Leche y derivados

La leche se define como el producto íntegro de ordeño total de una hembra lechera sana, descansada y bien alimentada, recogida higiénicamente y sin calostro. Su composición (g/L) indica que es un muy buen sustrato para la microflora:

agua	905	sales	9
glúcidos:lactosa	49	del ácido cítrico	2

lípidos	35	del ác. fosfórico	2,6
materia grasa	34	otras	4,4
lecitina	0,5	compuestos diversos	
fracción insaponificable	0,5	extracto seco total	127
proteínas	34	extracto seco desgrasado	92
caseína	27		
proteína soluble	5,5		
N no proteico	1,5		

Se deben incluir carotenoides, vitaminas, enzimas, esteroides, que se encuentran en pequeñas cantidades pero ejercen un efecto relevante. El pH neutro es adecuado para la mayoría de los microorganismos, por lo que este alimento es atacado por una micropoblación variada. La temperatura regulará la composición y velocidad de crecimiento de la misma.

A medida que aumenta la temperatura de conservación de la leche hasta 35-40°C se evidencia mayor desarrollo microbiano.

Por encima de 40°C se desarrollan especies termófilas como *Bacillus*, *Clostridium* y *Streptococcus*.

Entre 20 y 40°C predominan mesófilos como *Streptococcus*. A bajas temperaturas predominan psicrófilos como *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Achromobacter*.

Alteración natural

Por tratarse de un producto muy rico en nutrientes y poseer un azúcar fácilmente degradable, la leche es muy alterable.

Se evidencian 4 etapas:

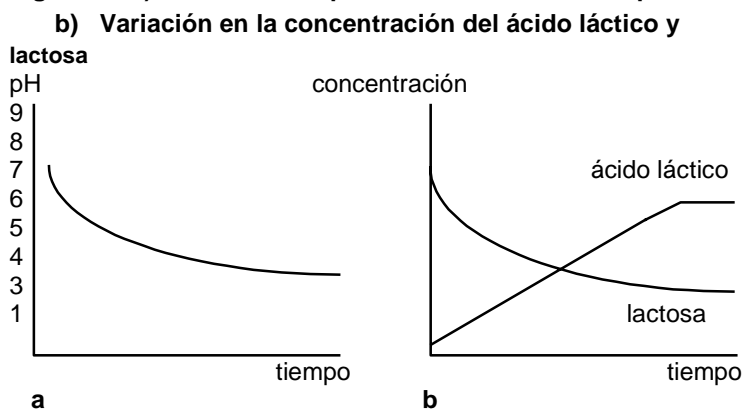
Período germicida: luego de ordeñada no se detecta crecimiento microbiano por la presencia de sustancias inhibitorias como **lactoperoxidasa y aglutininas**. Este período varía de pocos minutos a 2 horas dependiendo de condiciones de temperatura.

Período de acidificación, en el que se desarrollan activamente los microorganismos productores de ácido láctico a partir de lactosa hasta que su concentración llega a un 1%. La figura 2 a) muestra la variación de pH del sustrato a medida que la fermentación progresa. A pH cercanos a 4,0 la acidificación se detiene por autoinhibición de la flora láctica. En la figura 2 b) se aprecia las variaciones de la lactosa, azúcar de la leche, y el ácido láctico, en el tiempo.

Fase de neutralización: el ácido estabiliza al producto pero pueden prosperar hongos y levaduras si la temperatura es adecuada, que consumen el ácido láctico. En la superficie se aprecia densa capa de hongos. El producto se desestabiliza y el resto de las fracciones orgánicas son degradadas.

Fase de putrefacción llevada a cabo por bacterias y hongos que permanecieron al estado latente a pH bajo y ahora atacan la caseína (proteolisis) y luego los lípidos (lipolisis), descomponen totalmente la leche dejando un líquido claro, que puede poseer sustancias tóxicas.

Figura 2 - a) Evolución del pH del sustrato en el tiempo



Fermentaciones específicas de la leche

1. **Fermentación láctica**, que como vimos es producida por enzimas microbianas que liberan ácido láctico de la lactosa. Las bacterias más importantes son *Streptococcus lactis* y *S. cremoris*, mesófilos y presentes en la leche. Se produce la precipitación de la caseína (**cuajada**). *Leuconostoc citrovorum* también produce ácido láctico, *L. dextranicum* produce ácido acético, etanol y CO₂. *Lactobacillus casei* es usado en la preparación de quesos, *L. acidophilus*. *L. bulgaricus* y *L. plantarum* son importantes en la elaboración de leches ácidas.
2. **Fermentación gaseosa**: otros microorganismos no deseables producen ácidos y gases: micrococos, coliformes. *Escherichia coli* y *Aerobacter aerogenes* liberan CO₂ e H₂ a partir de lactosa. Otros microorganismos pueden ser *Clostridium butyricum* y levaduras como *Candida* y *Torulopsis*.
3. **Producción de aromas y sabores agradables**: *Streptococcus citrovorus*, *S. paracitrovorus* que dan productos volátiles como el ácido acético o el diacetilo a partir de ácido cítrico.
4. **Fermentación proteolítica**: producida por microorganismos que desdoblan proteínas dando olores y sabores desagradables. Los organismos son *Streptococcus liquefaciens*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas putrefaciens*.
5. **Fermentación lipolítica**: causada por microorganismos que desdoblan las grasas en glicerol y ácidos grasos y en consecuencia se produce rancidez: *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter lipoliticum*, levaduras (*Candida lipolitica*), hongos (*Penicillium spp.*, *Geotrichum candidum*).

Derivados de la leche

Los productos fermentados son consecuencia de la actividad controlada de un conjunto de microorganismos. Con la pasteurización de la leche fue necesario sustituir la microflora natural por cepas seleccionadas y controladas que aseguren la estandarización de los productos.

La pasteurización elimina a la mayoría de los microorganismos que alteran el producto.

Tipos: **baja 62°C durante 30'**
alta 72°C durante 15"
ultrapasteurización 140°C durante 1"

Esterilización: se incrementa la distribución de leches esterilizadas (larga vida), las que son sometidas a 143°C durante 3 segundos, en tubos concéntricos y enfriada rápidamente.

En la última parte del siglo 19 se aislaron por primera vez los microorganismos responsables de la fermentación láctica.

En la actualidad se emplean grandes volúmenes de ellos como **inoculantes**, adecuadamente seleccionados por criterios:

- * temperatura de crecimiento y actividad
- * acidificación : nivel de ácido láctico y velocidad de formación
- * actividad proteolítica, importante en la preparación de quesos
- * estabilidad genética de las cepas
- * resistencia a bacteriófagos

Muchos de estos microorganismos empleados como iniciadores (*starter*) contienen numerosos plásmidos de particular importancia porque codifican propiedades esenciales como: fermentación de la lactosa, actividad proteinasa, metabolismo del citrato, propiedades antagonistas, resistencia a bacteriófagos. Algunas especies poseen estos genes en el cromosoma. La pérdida de estos plásmidos explica la inestabilidad de algunas de estas propiedades esenciales (Varnam, 1993). El análisis molecular de los plásmidos que albergan los genes que codifican estas propiedades hace posible aplicar los conocimientos de la genética de las bacterias lácticas para mejorar cepas existentes o producir nuevas. La inclusión de estos genes en el cromosoma es otra de las orientaciones para incrementar la estabilidad de los cultivos.

Los inóculos se producen en la actualidad en general en laboratorios especializados y se comercializan como cultivos liofilizados:

La ampolla que los contiene se llena con leche estéril descremada, se agita enérgicamente para suspender el cultivo y se incuba a 23-24°C por 16-18 horas

- Estos cultivos se repican en leche descremada (1 litro) en condiciones asépticas y se incuban 12 horas a 23-25°C (primer subcultivo), luego se logran subcultivos a razón del 2% de inóculo y 18 horas de incubación. Uno de ellos se usa para mantener la cepa en el refrigerador

Un cultivo puro no se puede repicar indefinidamente sin que se alteren sus características. Debe procurarse nuevamente un cultivo puro. El cuadro 3 resume algunos de los productos obtenidos por fermentaciones a partir de la leche.

Leches ácidas

Yogur

Se prepara a partir de leche con poca grasa inoculada con cultivo mixto de:

Streptococcus thermophilus, para la producción de ácido láctico y *Lactobacillus bulgaricus*, que contribuye al sabor y aroma

La fermentación se realiza a 45°C durante varias horas, (figura 3) la acidez coagula la leche produciendo también la digestión parcial de la caseína que facilita su asimilación. Las formas sólidas se preparan con leche concentrada y se fermentan durante 2-3 horas en los envases de venta. El yogur líquido se incuba a una temperatura más baja y por un tiempo mayor, luego se mezcla y se enfría antes del envasado.

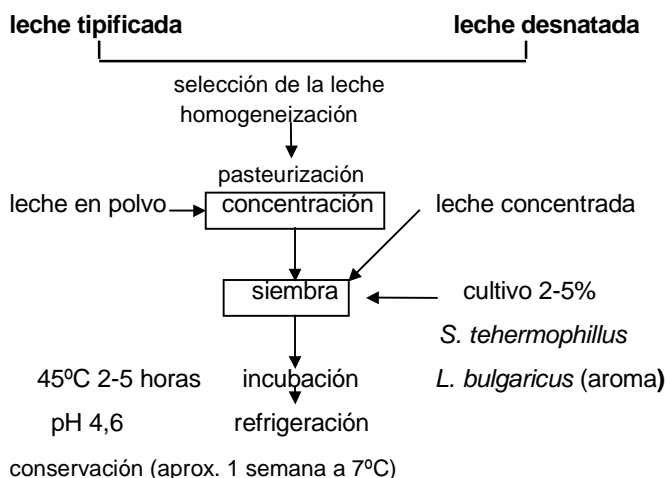
Leche ácida

Es otro tipo de leche fermentada preparada con cultivos de *Lactobacillus acidophilus* a la que se le atribuye mayor efecto dietético debido a que la bacteria sobrevive en el estómago y produce ácido láctico en el intestino lo que inhibe el desarrollo de microorganismos de la putrefacción. Crece más lentamente y coagula la leche dentro de las 4 a 8 horas.

Cuadro 3 - Alimentos obtenidos por fermentación láctica

producto	materia prima	microorganismo
queso	cuajo de leche	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Leuconostoc spp.</i>
Kefir	leche	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Saccharomyces kefir</i>
yogur	leche desnatada y leche en polvo	<i>Streptomyces thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
leche ácida	leche	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
manteca	crema de leche	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>

Figura 3- Esquema en la preparación de yogur



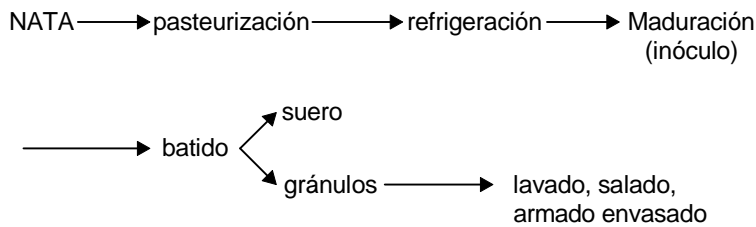
Kefir

Esta leche ácida se consume mucho en Europa Oriental. Las bacterias lácticas se suplementan con una levadura fermentadora de la glucosa que le proporciona a esta bebida contenido alcohólico de 1-2%. La levadura es *Saccharomyces kefir* y las bacterias *Lactobacillus caucasicus* y *Streptococcus spp.* El alimento se prepara agregando a la leche gránulos de kefir de una fermentación anterior.

Manteca

Su preparación es en parte microbiológica ya que el agriado inicial de la leche por *Streptococcus* es necesario para la separación de la grasa. Estos organismos producen pequeñas cantidades de acetoina que es oxidada a diacetilo ($\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$), compuesto responsable del sabor. Es común inocular crema pasteurizada con cultivos puros de *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. citrovorum* y *L. diacetylactis*.

Esquema



Quesos

Es el producto resultante de la concentración de la materia seca de la leche por coagulación a través de la acción de microorganismos lácticos. La leche posee microorganismos propios y provenientes del ambiente. Algunos son perjudiciales y otros se usan para elaborar quesos en forma artesanal. La leche pasteurizada asegura la estandarización de la producción al destruir microorganismos patógenos y saprofitas, colibacterias, levaduras y enzimas de la leche.

Etapas

Fermentación, con o sin inoculación con *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. casei*, *Lactobacillus spp.*

Aunque hay innumerables tipos de quesos todos requieren la formación de la cuajada, que se separa de la fracción líquida o suero. La caseína sufre cambios físico-químicos y precipita como paracaseinato de calcio.

Como coagulante se puede usar **cuajo o ácido**. El primero es más usado y se obtiene de estómago de terneros lactantes y su principio activo es una proteína, la renina, que es activa a pH ácidos (pH 3,8) que se logra por el ácido láctico de las lactobacterias al fermentar la lactosa. El ácido láctico produce además sabores característicos de estos productos.

La cuajada pasa por un proceso de **maduración**, excepto en algunos quesos frescos o **ricotta**. La dureza del queso se obtiene en esta etapa: cuanto más agua pierda la cuajada y más se comprima, más duro será el producto. También ocurre hidrólisis de grasas por enzimas microbianas y la renina.

Los quesos livianos maduran por enzimas de bacterias, levaduras y hongos que crecen en su superficie

Los semiblandos como Limburger maduran por bacterias y otros contaminantes de su superficie. El Roquefort lo hace por acción de mohos del género *Penicillium* cuyas esporas se inoculan en la superficie, luego se aprecia el color de las hifas (verde, azul, blanco) penetrando en la pasta. El Camembert madura en pequeños envases para que las enzimas del *Penicillium* que ha crecido aeróbicamente en la superficie, difundan a interior para realizar la maduración. *Propionibacterium* produce en el queso tipo suizo los típicos "ojos" producidos por la liberación de gases.

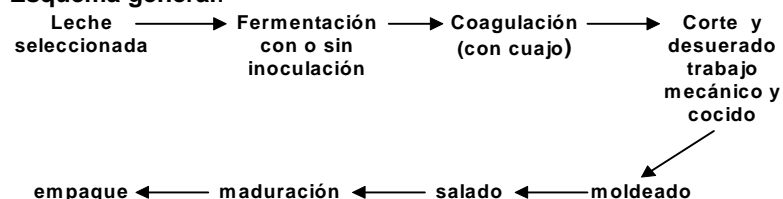
Los quesos de pasta dura, como Cheddar o Suizo, las bacterias lácticas crecen anaeróbicamente en su interior, mueren y se autolizan.

El cuadro 4 muestra características de procesos microbiológicos y bioquímicos y los microorganismos responsables de la producción de distintos tipos de quesos.

Cuadro 4 - Microbiología de distintos tipos de queso

tipos	proceso	microorganismo
quesos (en general)	temperatura de fermentación: 35°C 42°C	<i>S. lactis o cremoris</i> <i>Lactobacillus</i> (termófilo)
quesos duros (Cheddar, suizo)	proteolisis, lipolisis	bacterias lácticas dentro del queso
quesos frescos (Camambert)	proteolisis, lipolisis	crecimiento superficial de hongos: <i>Penicillium spp.</i> Seguidos de bacterias <i>Bacterium</i>
queso suizo	ferm. propiónica, lipolisis y producción pigmento azul	<i>Propionibacterium spp.</i> <i>Penicillium roqueforti</i>

Esquema general:



Para finalizar, los subproductos lácteos se pueden agrupar según **su contenido de agua**:

- * con alto porcentaje de agua: la leche
- * con alto contenido de grasa: la manteca y crema de leche
- * con alto porcentaje de proteínas: el queso.

Conservación de frutas y hortalizas por fermentación láctica

Por fermentación ácida se conservan hortalizas de hoja, hortalizas subterráneas y frutas, las más usadas son: pepinos, repollos, cebollas, tomates verdes. El producto resultante se denomina *pickle* o encurtido.

Pickle

Producto acidificado resultante de la fermentación láctica de ciertos vegetales.

La fermentación láctica la realizan las bacterias que se encuentran en la superficie de los vegetales. En el proceso de conservación se procura favorecer el desarrollo de las bacterias lácticas e impedir el desarrollo de otros microorganismos que pueden alterar la calidad del alimento. Las condiciones que favorecen el desarrollo de la flora láctica son: anaerobiosis y concentración de sal a 5%. Se produce la siguiente secuencia de microorganismos:

Leuconostoc mesenteroides, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*
Leuconostoc mesenteroides realiza fermentación heteroláctica y los productos finales son ácido láctico, ácido acético, alcohol y CO₂. El CO₂ desaloja el O₂ del medio y asegura la anaerobiosis. El ácido láctico baja el pH del medio, lo que inhibe la actividad de la restante microflora presente en los vegetales. Se estimula así la acción de las bacterias lácticas completándose la secuencia. *Pediococcus cerevisiae* fermenta manitol y dextranos producido por *Leuconostoc mesenteroides*. *Lactobacillus plantarum* es el principal productor de ácido láctico de esta secuencia microbiana.

Chucrut

Es otra técnica de conservación de vegetales por acidificación. En este caso el vegetal usado es el repollo que se corta en tiras, se sala en seco y se deja fermentar en recipientes adecuados. El iniciador del proceso fermentativo es *Leuconostoc mesenteroides* que produce las condiciones necesarias para la actuación de las restantes bacterias lácticas.

Alimentos vegetales conservados por fermentación láctica

alimento	materia prima	microorganismo
pickle	ciertas hortalizas y frutas	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus cerevisiae</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i>
chucrut	repollo	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>

Ensilados

La conservación de forrajes o alimentos, granos, tubérculos, pescado, etc. en ausencia del aire, ha sido empleada por el hombre desde hace miles de años. En el caso de alimentos para el ganado, la finalidad del proceso es conservar los forrajes con la mayor calidad posible, por un lapso más o menos prolongado, de forma de emplearlos en el momento en que se los necesite. Conserva el valor nutritivo del forraje a diferencia del proceso de secado al aire (heno).

El forraje verde que se desea conservar por vía húmeda es cosechado por una máquina especial, que lo corta y pica en trozos pequeños que se transportan y acumulan sobre el terreno o se coloca en construcciones especiales, llamados silos.

Primera fase: respiración aerobia, los carbohidratos presentes en el forraje cortado son respirados en presencia de aire; la fotosíntesis continúa mientras las plantas estén expuestas al sol.

$\text{azúcares} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{calor}$

Efectos: disminución de carbohidratos
producción de CO_2 y H_2O
aumento de la temperatura
disminución del O_2 en la masa

Si esta etapa se prolonga el forraje será degradado por una variedad de microorganismos. La intensidad de la misma se puede evaluar por el calor liberado. La detención de la respiración y la muerte rápida de las células se puede lograr por distintas vías:

artificialmente, por el agregado de ácidos (ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, etc.) naturalmente, permitiendo la evolución de los procesos naturales, como es la fermentación. La rapidez y eficacia de la eliminación del aire depende de varios factores; estado de madurez, contenido de humedad, sistema de cosecha del forraje, método empleado. Cuando el silo está bien construido, sin posibilidad de entrada de aire, esta etapa es breve, se anula la actividad de microorganismos aerobios, se liberan los jugos celulares y la temperatura comienza a disminuir.

Segunda fase, fermentación, en ausencia de aire: si el forraje está bien compactado en los silos se elimina rápidamente el exceso de aire y comienza el proceso de ensilaje. En esta etapa se desarrollan microorganismos fermentadores, favorecidos por la baja disponibilidad de O_2 y la difusión del contenido celular con azúcares fermentescibles. Los principales productos son ácidos láctico, acético, butírico, que acidifican el medio.

Un buen ensilado se caracteriza por poseer (figura 4):

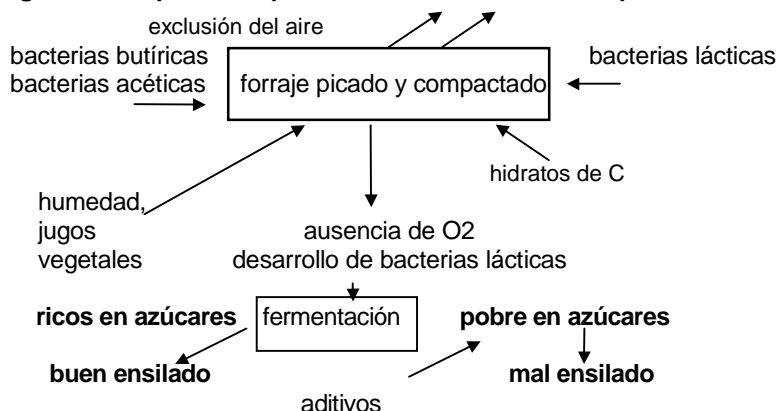
- * alta proporción de ácido láctico
- * niveles variables, pero bajas de ácido acético
- * muy bajo o nula cantidad de ácido butírico
- * ínfima proporción de N-amoniaco, su presencia significa que las proteínas han sido degradadas con disminución del valor nutritivo del silo

Los microorganismos fermentadores se encuentran en la superficie de los vegetales, en el suelo y se desarrollan una vez que las condiciones les son favorables. Cada grupo posee condiciones óptimas de temperatura, humedad y presencia y/o ausencia de aire para su mejor desarrollo (cuadro 5).

La fermentación láctica homo y heterofermentativa es realizada por la microflora presente en forraje, granos, etc.

La figura 5 (Jonsson, 1989) esquematiza las fases del proceso en forrajes: una fase aeróbica en el campo, una fase de fermentación inicialmente aerobia, una de almacenamiento y descarga que resulta en estabilización o deterioro, dependiendo del nivel de pH obtenido y el grado de entrada del aire.

Figura 4- Etapas en la producción de un ensilado a partir de un forraje verde



Cuadro 5 - Procesos microbianos en el silo

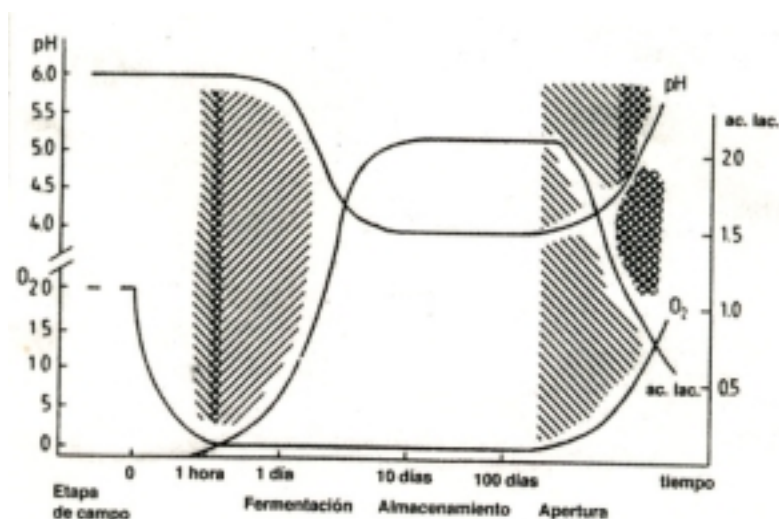
fermentación	temperatura	pH	organismo
láctica	5 a 60°C óptimo 35°C	3 y 4	<i>L. plantarum</i> <i>L. brevis</i> <i>L. casei</i> <i>S. lactis</i>
acética	18-25°C		grupo coliforme
butírica	20-40°C	4 y 5	<i>Clostridium</i>

La producción de ácido acético, causada por microorganismos del grupo coliforme es de escaso significado en los silos. La fermentación butírica no es deseada, pues causa sabores desagradables, sobre todo para el hombre. Los animales pueden tolerarlo. Se puede producir también mezcla de ácido acético, etanol e H₂. La temperatura más favorable para especies de *Clostridium* es entre 20 y 40°C y no soportan pH inferiores a 4,0.

Ventajas de la fermentación láctica

- asegura alta concentración de ácido láctico, elemento nutritivo y conservador, sin la formación de productos secundarios no palatables o innecesarios.

Figura 5- Principales cambios en el ensilaje y fases críticas en el deterioro y anaerobio según el pH, nivel de O₂ y concentración de ácido láctico ■ aerobio ■ anaerobio



- **conservación de un mayor porcentaje de elementos nutritivos**, al desarrollarse a bajas temperaturas se minimizan las pérdidas por respiración. Los microorganismos responsables se encuentran normalmente en número suficiente en el exterior de forrajes y su sabor y olor son apetecidos por el ganado
- no causa efectos secundarios o perjudiciales en la salud del ganado, ni altera sabor o apariencia de derivados de la leche, como manteca, queso.

Condiciones para un rápido ensilaje

Medio anaerobio: se debe excluir rápidamente el aire atrapado en la masa

Temperatura entre 5 y 60°C; entre 5 y 20°C las únicas bacterias que pueden desarrollarse son las lácticas, impidiendo la fermentación butírica. El cuadro 6 muestra las proporciones relativas de ambos ácidos.

Cuadro 6 - Ensilados a distintas temperaturas

temperatura °C	% ác. láctico	% ác. butírico
45	0,4	3,7
30	1,9	0,1
22	1,2	0,1

Facilitar rápido contacto entre las bacterias y los carbohidratos; el picado o triturado de los forrajes permite la exclusión del aire y el contacto con las bacterias. El proceso se acelera.

Contenido de humedad de los forrajes entre 60 y 75% asegura una alta concentración de azúcares fermentescibles, como por ejemplo 60% en sorgo, 70% en maíz y 75% en pasturas. Debajo de estos niveles se corre el riesgo de alcanzar altas temperaturas por mala compactación y expulsión del aire con la consiguiente pérdida de carbohidratos y digestibilidad de proteínas.

Mantener en la masa un pH de 3 a 4, que asegura la permanencia del ácido láctico e impide la proliferación de otros organismos.

- Impedir la entrada de aire al silo una vez terminado el proceso, pues se crearía un ambiente favorable para el desarrollo de organismos butíricos.

Cultivos a ensilar

Dentro de la gran variedad de plantas aptas para ensilar, debemos señalar sus diferencias en cuanto a su disponibilidad en azúcares:

forraje	carbohidratos	proteínas
maíz o sorgo	elevado	muy bajo
gramíneas (pasturas)	alto	regular
gramíneas +leguminosas	mediano	mediano
leguminosas	muy bajo	elevado

Valores válidos cuando los cultivos se cosechan en el momento aconsejado para ensilar. El forraje a ensilar deberá contener elevado contenido de glúcidos y bajo de proteínas, ya que éstas al ser degradadas producen amonio que neutraliza al ácido láctico, restándole calidad al producto. El cuadro 7 muestra características de silos a partir de diferentes plantas.

Cuadro 7 - Características de los materiales iniciales y de los tres silos obtenidos

forraje	materia seca %	proteína bruta %	azúcares solubles %	azúcares/ proteínas
alfalfa	24,4	25,2	3,9	0,15
sorgo	35,2	9,4	10,4	1,10
maíz	24,1	8,6	15,9	1,80

silo	%M.S.	% Prot	% Azúcares	pH	L	ácidos %		
						A	P	B
sorgo	34,7	8,5	2,8	4,2	1,8	0,6	0,0	0,0
maíz	22,4	10,2	3,8	3,9	1,7	0,6	0,0	0,0
alfalfa	21,2	16,7	1,3	5,7	0,0	1,1	0,5	1,9

ácidos: L=láctico, A=acético, P=propiónico, B=butírico

En el momento del corte, el maíz y sorgo presentan entre 30 y 40% de materia seca, que coincide con el estado fenológico de grano lechoso a grano pastoso y la producción de carbohidratos es elevada asegurando el desarrollo de microorganismos fermentadores.

Aditivos

Se recomienda el uso de estas sustancias cuando la escasez o el exceso de algún elemento en la planta hace insegura la conservación del silo, o cuando se desea mejorar el valor nutritivo, la apetibilidad, o ambos. La correcta distribución de estas sustancias en toda la masa del silo asegura su eficacia.

- **Productos ricos en carbohidratos:** se agregan a materiales pobres en ellos, como las leguminosas:

melaza, subproducto de la refinera de la caña de azúcar, se presenta como un líquido oscuro, espeso, con olor característico que es muy empleada por su bajo costo. Se mezcla en partes iguales con agua y puede agregarse a la cosechadora que va regando el forraje (3-5% en peso), con este aditivo.

granos: poseen almidón, poco empleado por la flora láctica hasta desdoblamiento enzimático en azúcares. Se aconseja más la harina de granos (70 a 100 kg/ton forraje).

sueros de leche: posee entre 4 y 5% de lactosa, pero los volúmenes a manejar son grandes (250 l/ton forraje). Se usan más sueros desecados (20-30 kg/ton)

papas, remolacha azucarera, desechos de frutas, etc. son también empleados.

- **Conservadores:** agregado de ácidos directamente al forraje hasta bajar su pH a menos de 4,0. **Método AIV:** 4 partes de ácido sulfúrico y 6 de ácido clorhídrico, que se mezcla en el momento de ensilar diluyendo en 5-6 veces su peso en agua. Se

Vinificación

El vino se produce por la fermentación alcohólica del mosto de uva y el microorganismo responsable es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La uva colectada debe tener un contenido adecuado de azúcar (160 a 180 g/l) para posibilitar un buen sustrato para la fermentación. En la superficie de las uvas existen levaduras salvajes que están naturalmente presentes, pero que no hay que dejar prosperar porque no producen buenas fermentaciones. Para eliminarlas se trata la superficie vegetal con sustancias como dióxido de azufre o metabisulfito de potasio. Luego de formado el mosto se le agrega el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* aereando el contenido de la cuba para que la levadura se reproduzca rápidamente por respiración.

Luego se debe obtener la **anaerobiosis** dejando en reposo el contenido de la cuba, para que se produzca la fermentación. Se debe tener en cuenta el pH, temperatura y concentración de azúcar del medio, para posibilitar el buen trabajo de las levaduras. El alto contenido de alcohol y bajo pH, hacen al vino un medio inapropiado para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos pero a veces se puede alterar (cuadro 9).

Pasteur fue el primero que describió estas alteraciones:

1. si el vino queda expuesto al aire pueden actuar levaduras no deseadas y bacterias que producen ácido acético transformando al vino en vinagre
2. si el vino se mantiene en condiciones de anaerobiosis pueden actuar bacterias lácticas que fermentan azúcares residuales produciendo mal gusto. Hay levaduras que pueden crecer en vinos dulces que no alteran el sabor pero enturbian el producto. Para prevenir las alteraciones se puede pasteurizar, pero este proceso disminuye la calidad, pues se alteran los azúcares y disminuye el contenido alcohólico. También se puede esterilizar el producto por filtración o agregando aditivos químicos (S02).

Elaboración de cerveza

Esta bebida se produce por fermentación de granos sin azúcares fermentables. El almidón debe ser hidrolizado a azúcares como la maltosa y glucosa, antes de usarse como sustrato por las levaduras para su fermentación. Este proceso se llama **sacarificación**. Los granos usados pueden ser de cebada, arroz o maíz. Granos de arroz se usan en Asia, mientras que el maíz es utilizado en algunas regiones de América. La más común es la cebada. Etapas en la producción de cerveza:

Malteado: es la conversión de los granos de cebada en malta. Los granos se dejan germinar, luego son secados y molidos. La malta contiene amilasas que son las enzimas necesarias para degradar el almidón en azúcares fácilmente fermentables. Posteriormente se muele la malta y se deja hidrolizar su suspensión en agua. Algunos productos incluyen la hidrólisis de proteínas, entonces esta mezcla se somete a altas temperaturas para detener estos cambios enzimáticos y se filtra

Agregado de lúpulo (inflorescencia del vegetal *Humulus lupulus*), a la malta para impartirle el característico sabor amargo de la cerveza por la presencia de una resina soluble que además actúa previniendo el desarrollo de microorganismos no deseados.

Fermentación: la maltosa y la glucosa son fermentados por cepas seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* conocidas como levaduras cerveceras. Este proceso se realiza a baja temperatura por espacio de 5 a 10 días produciéndose etanol y CO₂.

Maduración: luego de la fermentación la cerveza se almacena a 0°C y precipitan las proteínas, resinas y el líquido se aclara.

Enfermedades

Se pueden producir durante el proceso de fermentación, en la maduración y en el embotellamiento. Un agente nocivo muy común lo constituye la levadura salvaje *Saccharomyces pasteurianus* que provoca un sabor amargo y desagradable. Si la temperatura se hace demasiado alta durante el proceso de maduración y almacenamiento se desarrollan bacterias lácticas produciendo ácido láctico y enturbiamiento. Las enfermedades pueden evitarse por pasteurización o esterilización por filtración antes del embotellado.

Panificación

En la elaboración de pan se usan levaduras para leudar la masa. La levadura usada es *Saccharomyces cerevisiae* que por fermentación alcohólica de los azúcares produce etanol y

dióxido de carbono. En el caso del pan lo que interesa es la producción de dióxido de carbono que hace que aumente el volumen de la masa.

Cuadro 9 - Lista parcial de microorganismos involucrados en la producción y alteración del vino

organismo	rol en producción y/o alteración	cambios
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var <i>ellipsoideus</i>	1. ferm.ólica primaria 2. carbonatación de vinos espumantes en fermentación secundaria 3. enturbiamiento en vinos dulces	glucosa y/o fructosa etanol y CO ₂
<i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> y <i>Lactobacillus</i>	fermentación maloláctica	I. ác.málico ác. Láctico y CO ₂ II. mejor sabor
Levaduras superficiales <i>Saccharomyces beticus</i> <i>Botrytris cineres</i>	pesado crecimiento superficial y producción de sabor a Jerez	I. etanol,acetaldehido II. sabores
	crecen en ciertas regiones (Sautemes) en superficie de uvas que dan vinos dulces	I. deseca la uva II. oxida málico a CO ₂ y H ₂ O III. agrega color y sabor
Bacterias del ácido acético y levaduras superficiales	alteran vinos expuestos al aire	oxidan etanol a ácido acético
Bacterias lácticas <i>Lactobacillus trichodes</i>	alteran el vino anaeróbicamente	mal gusto

El etanol se volatiliza en el horneado. La levadura se obtiene a partir de un cultivo puro original que se replica a nuevos medios de cultivo para aumentar la biomasa. Con esos cultivos se inoculan medios adecuados para la reproducción del cultivo a escala industrial. Mediante centrifugado se elimina el líquido y se obtienen los *pellets* celulares a los que se les agrega aceites vegetales y se forman los panes de levadura.

Los microorganismos como fuente de proteínas

Por su rápido crecimiento, alto contenido proteico y capacidad para emplear sustratos carbonados de bajo costo, los microorganismos constituyen una importante fuente de alimento. Se desarrolló una industria basada en el cultivo de levaduras para uso como suplemento en alimento animal. Se usan levaduras estrictamente aerobias, como las del género *Candida* en lugar de las fermentativas, para lograr maximizar el crecimiento en condiciones de aireación forzada.

Producción de levaduras a partir de derivados del petróleo

Primeramente se emplearon **melazas y residuos de cosechas**. Actualmente se emplea **petróleo**, que resulta más barato que otras fuentes carbonadas. Existen unidades industriales en países petroleros para el cultivo de *Candida lipolytica* en emulsión acuosa de petróleo crudo (la levadura puede oxidar hidrocarburos alifáticos de cadena larga, de C₁₂ a C₁₈). El petróleo que queda es más fácilmente refinado. Otro sustrato potencial es el gas **metano**, derivado de la industria petroquímica. Las velocidades de crecimiento son relativamente lentas en las bacterias oxidantes del metano y tienen tendencia a acumular mucílago extracelulares.

Producción de aminoácidos específicos

Las proteínas sintetizadas por los microorganismos son deficientes en ciertos aminoácidos requeridos por los mamíferos. Las proteínas vegetales carecen también de estas sustancias: la de trigo es baja en lisina, la de arroz, en lisina y treonina. La suplementación con estos aminoácidos

es práctica corriente y la producción microbiana de aminoácidos específicos ha sido muy estudiada. Muchas cepas microbianas o sus mutantes son defectivas en los mecanismos de regulación de los metabolismos específicos de biosíntesis y por lo tanto, excretan grandes cantidades de algunos aminoácidos al medio. Este ejemplo constituye una importante aplicación de un proceso microbiano.

Uso de bacterias del ácido acético

Es conocida la acidificación que sufren bebidas alcohólicas expuestas al aire: se oxida el etanol a ácido acético, por bacterias estrictamente aerobias. De este hecho derivó la industria del vinagre, que permanece bastante empírica, sobre todo en los vinagres de mayor calidad, la conversión lleva varias semanas y la limitante del proceso es la lenta difusión del aire en el líquido (gruesa película superficial de bacterias). Se airea y regula la temperatura pero no es controlado microbiológicamente. Actualmente se produce vinagre en grandes fermentadores con circulación de líquido y aireación. Esta oxidación es un ejemplo de respiración aerobia incompleta.

Otras bacterias acéticas son usadas en industria: el ácido glucónico (uso farmacéutico) se produce por oxidación de la glucosa. Muchos azúcares-alcoholes son convertidos en los azúcares por estas bacterias (sorbosa producido a partir del sorbitol).

Los hongos comestibles

Varias clases de hongos se emplean como fuentes de alimento humano, de los cuales los más importantes son las setas. Estos hongos filamentosos forman grandes cuerpos de fructificación, llamados setas. Durante la mayor parte de su vida estos hongos se propagan como micelio simple en el suelo, madera en descomposición, pajas. Cuando las condiciones son favorables se inicia la formación de este cuerpo de reproducción que emerge del sustrato y son cosechados, produciéndose sucesivos ciclos sobre sustratos lignocelulósicos (rastrosos, maderas) complementados con nutrientes, no se emplean medios ricos para evitar el desarrollo de hongos contaminantes saprofitas. Hongos hipogeos globulosos como las trufas, son muy codiciadas por su sabor y aroma particular, su cultivo requiere suelos alcalinos. Muchos de estos hongos son además ectomicorríticos (capítulo 17), de modo que el productor forestal los recoge en la vecindad de los árboles, como pino, eucalipto, roble.

Bibliografía

- BROCK, T. D. y M. T. MADIGAN, 1991 **Microbiología**, Prentice Hall Hispanoamericana, México
- FRAZIER, W. C. , D. C. WESTHOFF 1985 **Microbiología de los Alimentos**, Ed. Acribia, Barcelona
- JONSSON, A. 1989 The role of yeasts and clostridia in silage deterioration, Sveriges lantbruksuniversitet, Inst. för Mikrobiologi, Rapport 42, Uppsala: 1-51
- NATIONAL ACADEMY of SCIENCES, 1979 **Microbial processes**: Promising Technologies for Developing Countries, Washington DC
- PEÑAGARICANO, J. A. , W. ARIAS y N. J. LLANEZA **Ensilaje**, Ed. Hemisferio Sur
- SALMINEN, S. y A. von WRIGHT, 1993 **Lactic Acid bacteria**, Marcel Dekker, New York
- VARNAM, A. H. 1993 The exploitation of microorganisms in the processing of dairy products, en : **Exploitation of Microorganisms**, D. Gareth Jones (ed), Chapman & Hall, London,: 273-296

Capítulo 7

Transformación de la materia orgánica y mineral por procesos microbianos

Características de los ciclos del carbono y del nitrógeno

Introducción

Los microorganismos participan en las transformaciones de los elementos en la naturaleza. Si bien cuando un sustrato complejo llega a un ambiente particular, aguas, suelos, aire, comienza a degradarse en su globalidad, es frecuente realizar el estudio en base a los **ciclos biogeoquímicos de los distintos elementos**. Así, realizaremos esta abstracción mental para estudiar las transformaciones que sufren los compuestos carbonados, nitrogenados, azufrados, fosforados, con hierro, etc., en ecosistemas naturales, en particular en el ecosistema suelo-planta-hombre.

Un ciclo biológico abarca todas las posibles vías que un elemento puede seguir en la naturaleza (figura 1) aunque no obligatoriamente todas las etapas deben cumplirse en un ecosistema dado. Así, la nitrificación de sales amoniacales puede detenerse por falta de oxígeno, el pH puede limitar la entrada del N_2 a la tierra por fijación biológica, la solubilización de fosfatos puede inhibirse por escasa actividad biológica.

Los microorganismos cuando actúan sobre la materia orgánica y mineral lo hacen con el propósito de obtener:

- **energía**
- **subunidades para sus macromoléculas**

Procesos microbianos

Los microorganismos participan en los ecosistemas naturales de una serie de 4 pares de procesos simultáneos y opuestos que podemos resumir:

- **Mineralización-inmovilización**

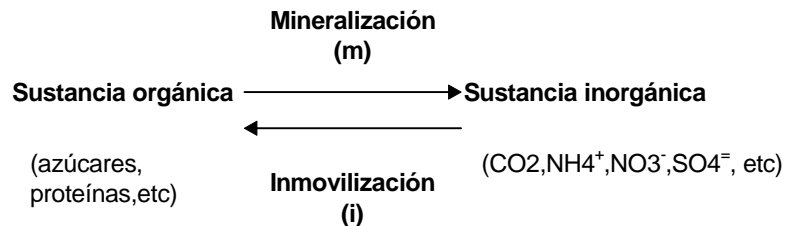
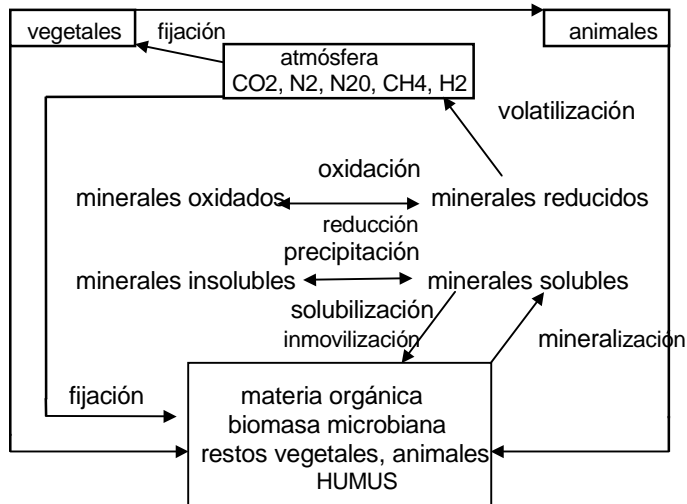


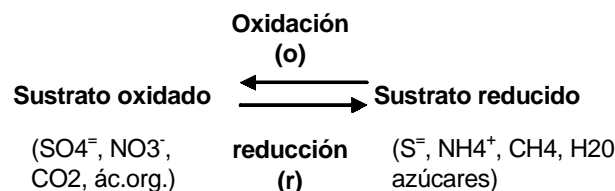
Figura 1 - Esquema general de un ciclo biogeoquímico



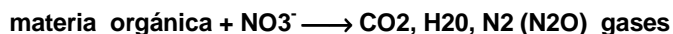
La mineralización, pasaje de formas orgánicas a minerales, es un proceso muy general y ocurre prácticamente en todas las condiciones ecológicas. No hay sustancia orgánica de origen biológico que no sea degradado por algún grupo de microorganismos. Existen sustancias naturales de mineralización muy lenta, llamadas **recalcitrantes**, caso de la lignina, algunos biocidas naturales. Numerosas sustancias orgánicas producto de las actividades del hombre llegan a los ecosistemas naturales y son muy difícilmente degradadas, caso de los pesticidas. Estas sustancias que producen serias poluciones, se denominan **xenobióticas** y serán analizadas en el capítulo 20.

Se habla de **inmovilización** cuando las sustancias inorgánicas son **asimiladas** por los microorganismos para integrarlas a su biomasa (proteínas, fosfolípidos, etc.). Se produce una competencia con las plantas y animales, quienes pueden sufrir carencias temporales. La biomasa microbiana a su turno será biodegradada y los nutrientes vuelven a formas inorgánicas.

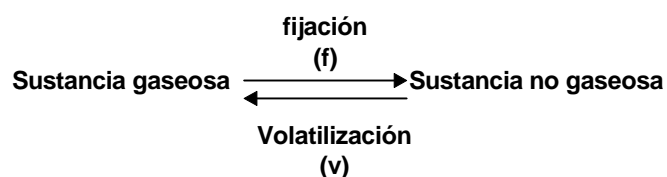
- **Oxidación-reducción**



Numerosos procesos de este tipo involucran a elementos importantes para ecosistemas naturales (N,S,P,Fe) como la nitrificación, sulfooxidación, desnitrificación, sulfatoreducción, metanogénesis, oxidación y reducción de compuestos con hierro, carbonados, etc. Las plantas dependen de estos procesos para obtener los nutrientes asimilables a partir de la reserva orgánica del suelo (**humus**), si no existen aportes exógenos. Estos cambios en el estado de oxido-reducción de ciertos elementos pueden convertirlos en formas no disponibles para los cultivos e incluso perderlos a la atmósfera.



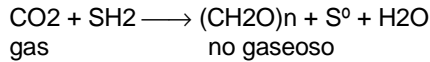
- **Fijación-volatilización**



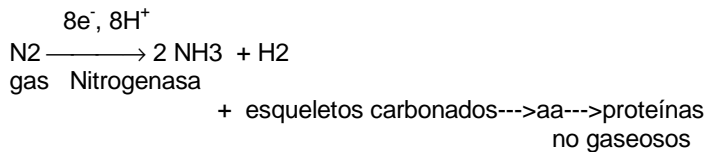
La **fijación** es la conversión de sustancias volátiles en no volátiles y los ejemplos más típicos son:

- **fijación biológica del C (fotosíntesis o quimiosíntesis)**
- **fijación biológica del nitrógeno (FBN)**, muchas veces realizados en la misma célula (cianobacteria y bacterias fotosintéticas fijadoras de N₂):

Fotosíntesis bacteriana:



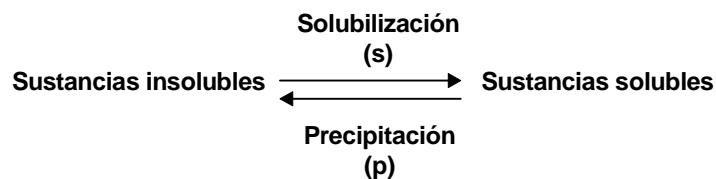
FBN



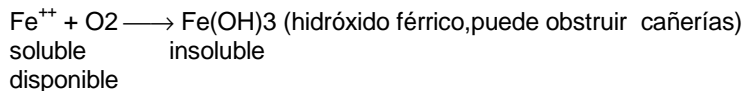
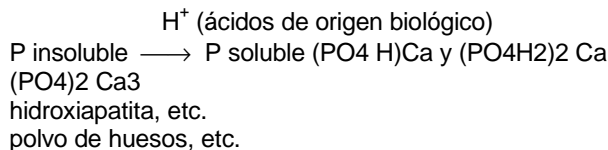
La **volatilización** es un proceso físico que puede llevar a la atmósfera productos formados por vía biológica. Un ejemplo es el caso del amonio producido por amonificación, que en suelos alcalinos, de baja capacidad de intercambio catiónico, puede perderse a la atmósfera. Otros ejemplos son las pérdidas de nitrógeno como N₂, N₂O, por desnitrificación. Compuestos azufrados se pueden perder también como H₂S, mercaptanes, etc.

• Solubilización-precipitación

La solubilización es un proceso muy importante ya que permite hacer disponible a muchos elementos insolubles, como el caso del fósforo. Por el contrario, la precipitación elimina de la solución del suelo nutrientes de las plantas, como el caso del hierro. Son también procesos físico-químicos pero involucran pasos previos de acción microbiológica.



Estas reacciones se observan en el caso de compuestos con P, Fe, etc.:



Ciclos biológicos del C y del N

Analizaremos brevemente en este capítulo los ciclos del carbono y del nitrógeno, los detalles sobre la población microbiana activa, el efecto del ambiente (ecología) serán analizados en próximos capítulos.

Ciclo del carbono

La figura 2 muestra las transformaciones que sufre este elemento en ecosistemas terrestres.

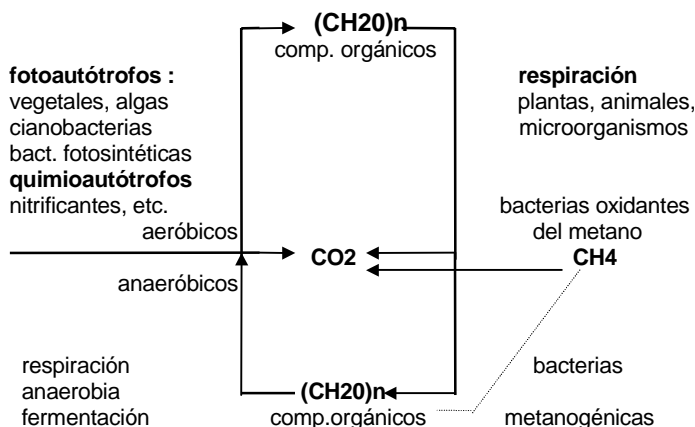
A nivel mundial, el carbono se cicla a través de los 4 depósitos principales de C: la atmósfera, los suelos, los océanos y otros ambientes acuáticos, así como los sedimentos y las rocas. El mayor depósito se encuentra en los sedimentos y las rocas de la corteza terrestre, pero el tiempo de

renovación es demasiado largo, insignificante a escala humana. Desde el punto de vista de los organismos, una gran cantidad de carbono se encuentra en las plantas terrestres (fijación del CO₂).

Sin embargo hay más carbono en la materia orgánica muerta (**humus**) que en los organismos vivos. Las formas más rápidas de transferencia global del carbono son por vía del CO₂ de la atmósfera. Este constituye un depósito muy importante, pero su tiempo de residencia es muy corto.

Este ciclo no es muy complejo: la fotosíntesis y la quimiosíntesis autótrofa y la respiración y/o fermentación son los principales procesos en que están involucrados los compuestos carbonados.

Figura 2- Transformaciones biológicas de moléculas carbonadas



Carbono en suelos, agua y atmósfera

El contenido de carbono de los **suelos** varía, como es de suponer, con los tipos pedológicos, regiones climáticas, prácticas de manejo, vegetación, etc. Los valores oscilan entre 1-3% en suelos minerales, entre 6-10% en praderas y en turbas, los valores superan 30-40% del peso seco. En las células, el carbono constituye un 40 al 50% del peso seco de las mismas.

La fuente principal de este elemento se encuentra en la atmósfera, la que a pesar de contener bajo nivel de CO₂ (0,03%) alberga sobre la tierra cantidades enormes de este gas (4,0x10¹⁴ kg).

Carbono en aguas: su contenido varía con la naturaleza de los cauces de aguas y con la deposición que vierten sobre ellos. Así, en los ríos la cantidad de materia orgánica puede ser muy grande y llegar a polucionarla si recibe aguas servidas domiciliarias, efluentes de la industria, desechos agrícolas.

Una parte del carbono puede depositarse como carbonatos insolubles, constituyendo verdaderos depósitos de este elemento.

Primera etapa del ciclo: fijación del CO₂ o CH₄

La reducción del CO₂ la realizan los organismos **autotróficos: (foto y quimiosintéticos)**

- en primer lugar los vegetales
- las algas
- las cianobacterias, las bacterias fotosintéticas anoxigénicas
- bacterias quimioautótrofas

Estas últimas emplean la energía liberada en la oxidación de los compuestos minerales, como el amonio, sulfuros, iones ferrosos, para reducir el CO₂. Si el ambiente fuera rico en CH₄ consecuencia de procesos de anaerobiosis, serán los microorganismos **metanofílicos** los encargados de convertirlo en metanol para luego asimilarlo en su biomasa.

Estos **productores primarios** de materia orgánica contribuyen a incrementar su nivel en ecosistemas naturales que constituye la fuente de nutrientes y de energía para la mayoría de los habitantes del suelo, que son heterotrófos.

Los valores citados sobre el aporte del carbono en la tierra por la fotosíntesis vegetal ($9,0 \times 10^{13}$ kg) son seguramente superados en lagos y océanos.

Segunda etapa: mineralización

La materia orgánica que llega al suelo a través de residuos de cosechas, la percolación en el follaje, las raíces y sus productos de descamación y exudación, los restos animales y microbianos, sufre una serie de procesos de degradación, que aseguran la continuidad de los ciclos geoquímicos (capítulo 8).

Los procesos degradativos realizados por los microorganismos dependerán del nivel de O_2 :

- **aerobiosis:** respiración y algunas fermentaciones, como la láctica que no se afecta por el O_2
- **anaerobiosis:** fermentaciones y respiraciones anaerobias (sulfatos, nitratos, CO_2 , Fe^{+++} , como aceptores de electrones) La actividad de los organismos del suelo devolverían a la atmósfera un 40-75% del carbono fijado (Dommergues, Mangenot, 1970). La diferencia con la productividad primaria, o sea la **productividad neta**, podría llegar a $2,0 \times 10^{13}$ kg de C orgánico/año.

Esta cifra debe mineralizarse en el mismo período, de otro modo la gran reserva de la atmósfera se agotaría rápidamente. Son los consumidores primarios (herbívoros) y los secundarios (carnívoros) y finalmente el hombre, los que aseguran una débil mineralización. Los consumidores primarios no mineralizan más de un 10% de la productividad primaria, devolviendo al suelo importantes fracciones de materia orgánica, como producto de desecho, y los carnívoros, sólo mineralizan 1/100 de ella.

Se presume que la cantidad de materia orgánica proveniente de animales y microorganismos es pequeña en el suelo en relación a la biomasa vegetal. La biomasa de los principales grupos de invertebrados en suelos de pastura ha sido calculada en unos 2.300 kg/ha, mientras que se ha estimado en 4.500 kg/ha la biomasa de bacterias u hongos en la capa arable.

La distribución de estos grupos difiere; la microfauna se localiza más en el mantillo, mientras que los microorganismos migran a todo el perfil.

Resumiendo: en las transformaciones de este elemento en la naturaleza encontramos los pares de procesos (capítulo 8):

- **mineralización-inmovilización**
- **óxido-reducción**
- **solubilización-precipitación (caso de los carbonatos depositados en suelos y aguas)**

El ciclo del nitrógeno

De los nutrientes fundamentales para el desarrollo vegetal, el nitrógeno constituye uno de los elementos sobre cuyas transformaciones en el suelo se han realizado más investigaciones en los últimos años. Se presenta frecuentemente como limitante del crecimiento vegetal ya que es removido en cantidades superiores al resto de los nutrientes y además su nivel en los suelos es generalmente bajo. Se emplea en la síntesis proteica, de ácidos nucleicos, aminoazúcares y de otras moléculas de importancia en la célula. Favorece el crecimiento vegetativo, el tamaño de los granos y su porcentaje de proteínas; aumenta la absorción del fósforo y potasio.

Importancia del nitrógeno en:

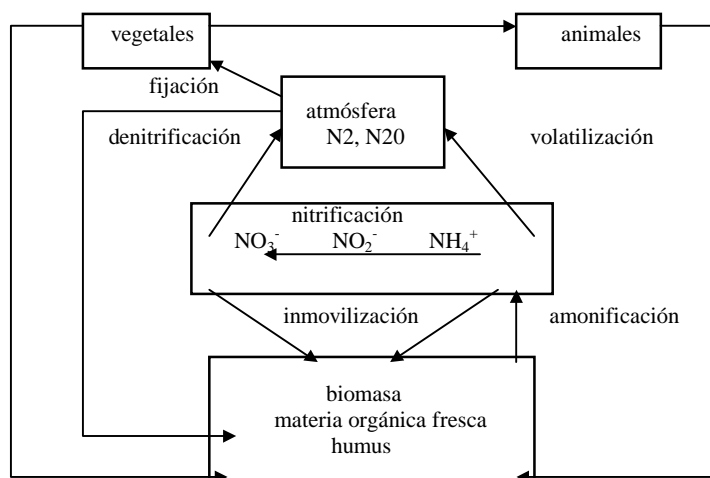
- **la agricultura**, incrementando los rendimientos, modificando la composición química y calidad de los vegetales
- **el ambiente:** los problemas ambientales asociados a los compuestos del nitrógeno son variados y abundantes. Las principales fuentes de contaminación de aguas y suelos con dichos compuestos es la atmósfera y las prácticas agrícolas. La industria vierte aguas con elevada concentración de óxidos de N o amoníaco que contamina los cursos de agua. Se puede llegar a la eutrofización de las mismas y a la contaminación de fuentes de agua potable con nitratos, muy tóxicos.

Las transformaciones del nitrógeno en la naturaleza se aprecian en la figura 3.

Formas de nitrógeno en el suelo

En la capa arable se encuentran valores entre 0,02 a 0,4%, y más de 2% en suelos muy orgánicos. En suelos minerales en clima templado puede medirse 2-3% de materia orgánica en 0-20 cm y 0,12-0,15% de nitrógeno, cantidad equivalente a 2000-3000 kgN/ha que asegura las necesidades de los vegetales por muchos años.

Figura 3 - Ciclo biológico del nitrógeno



f = fijación biológica del N2 (FBN)

m = mineralización i = inmovilización v = volatilización

n = nitrificación a = amonificación d = desnitrificación

Sin embargo el agregado de 100 kgNO₃⁻/ha, que corresponde a menos del 1% del N de la capa arable, puede favorecer el desarrollo vegetal. Este fenómeno se atribuye al hecho de que la mayor parte del nitrógeno no puede ser asimilado directamente por los vegetales. Gran proporción del humus es resistente al ataque microbiano y solamente una pequeña fracción del N orgánico (1-3%) se mineraliza cada año.

La estabilidad del nitrógeno del suelo se explica por la formación de compuestos con constituyentes orgánicos (taninos, fenoles, lignina) o por adsorción a arcillas.

La mayor proporción del nitrógeno del suelo es **orgánica** (98% del total) y menos del 2% son formas minerales, de las cuales depende la nutrición vegetal.

De la fracción orgánica:

- 20-40% se reconoce como aminoácidos
- 5-10% como aminoazúcares
- las bases púricas y pirimídicas no exceden al 1%.

La naturaleza química del resto del nitrógeno del suelo es difícil de determinar, integra los heterociclos de las moléculas húmicas, lentamente degradadas. Es probable que el N-aminoácidos provenga de peptidoglicanos y ácidos teicoicos, constituyentes de paredes bacterianas y sólo se detectan trazas en los suelos, pues son rápidamente biodegradados. En la fracción de los **ácidos húmicos**, un 20-50% del N está constituido por aminoácidos, un 3-10% de aminoazúcares y una pequeña cantidad de bases derivadas de ADN y ARN bacteriano, sobre todo. En la fracción fúlvica, un 20-30% es N-aminoácido y 8-10% son aminoazúcares.

La **fuentes primaria** de nitrógeno para el suelo la constituye la **atmósfera**, en donde el N₂ representa un 79%. En el cuadro 1 (Burns, Hardy, 1974) se observa que la mayor reserva de nitrógeno la constituyen las rocas primarias (98% de todo el N₂), le sigue la atmósfera, luego las rocas sedimentarias, los sedimentos marinos y el reservorio más pequeño lo constituye el suelo (sobre cada hectárea de suelo se acumulan 80.000 ton de N₂), de la litósfera (37 kg/cm²) y de las rocas sedimentarias (872 kg/cm²).

Cuadro 1 - Reservas de nitrógeno en el ecosistema terrestre

rocas primarias	40-190 x 10 ¹⁵ ton N2 (97,8%)
atmósfera	3,9 x 10 ¹⁵ ton N2 (2%)
rocas sedimentarias	0,8-4 x 10 ¹⁴ ton N2 (0,2%)
mar	22 x 10 ¹² ton N2
	5,4 x 10 ¹¹ ton N2 en sedimentos
suelo	6,5 x 10 ¹¹ ton N-NO3 ⁻
	5,5 x 10 ¹¹ ton N en restos vegetales y animales
	11 x 10 ⁹ ton de N en vegetales
	1 x 10 ⁹ ton de N inorgánico soluble

Como se observa, existe una gran masa de nitrógeno atrapado en las rocas pero no directamente aprovechable por los vegetales. El cuadro 2 cuantifica procesos que involucran a compuestos con nitrógeno.

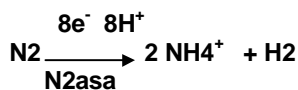
Cuadro 2 - Procesos biológicos y abiológicos que involucran al N

naturaleza del proceso	denominación	estimación cuantitativa
biológico	fijación biológica del N2	175 x 10 ⁶ tonN/año
	asimilación, inmovilización	
	mineralización, desnitrificación	
físico-químico	fijación industrial	30-35 x 10 ⁶ ton N/año
	lavado	15 x 10 ⁶ ton N/año
	sedimentación	15 x 10 ⁶ ton N/año
	solubilización	5 x 10 ⁶ ton N/año
	volatilización	165 x 10 ⁶ ton N/año
	precipitación	60 x 10 ⁶ ton N-NO3 ⁻ /año

Entradas de N a los ecosistemas

1. de naturaleza biológica: constituye la fijación biológica del nitrógeno (FBN), realizada por protistas inferiores dotados de un complejo equipo enzimático, **la nitrogenasa**, capaz de reducir los triples enlaces de la molécula del N2 a amonio, el que luego es incorporado en cetoácidos para formar aminoácidos y luego proteínas.

La ecuación global no refleja cabalmente los mecanismos involucrados y los intermediarios que se postulan.



Los **requisitos** para que el proceso ocurra se resumen:

- **nitrogenasa:** enzima responsable de la reducción
- **energía:** en forma de ATP que el organismo debe generar a partir de moléculas orgánicas (heterótrofos) o de la luz (fotótrofos). En asociaciones simbióticas el hospedante fotosintético brinda la energía y demás requisitos
- **minerales:** la enzima posee Mo, Fe, se requiere también Mg para el complejo Mg-ATP
- **poder reductor:** los electrones que salen del sustrato y pasan por los distintos componentes de la N2asa para reducir el triple enlace del N2 por pasos de 2 electrones por vez
- **esqueletos carbonados:** requeridos para fijar el NH3 que no se detectó libre ya que rápidamente pasa a aminoácidos o ureídos. También brindan la energía y poder reductor

El proceso es patrimonio de algunas bacterias, que fijan en vida libre o se asocian con raíces, tallos, hojas, en combinaciones simbióticas o en asociaciones rizosféricas y filosféricas (capítulos 14,15 y 16).

2. De naturaleza no biológica: las aguas de lluvia aportan nitrógeno combinado como amonio, nitrito, sustancias albuminoides, que provienen del suelo o aguas, de la contaminación en zonas industriales o de la fijación no biológica por radiaciones o reacciones fotoquímicas.

El hombre ha logrado la reducción del N₂ (**proceso Haber-Bosch**)

Fijación industrial (FI) $\text{N}_2 + 3\text{H}_2 \longrightarrow 2\text{NH}_3$

catálisis inorgánica, 200-300 atm, 1000°C

Este proceso se realiza a altas temperaturas y presiones en plantas industriales muy sofisticadas que pueden producir unas 1000 toneladas de N por día (Hardy y Havelka, 1975). Pero resulta un proceso oneroso para los países sin reservas petroleras o de gas. El H₂ proviene de reservas de gas natural o del petróleo, que se agotan rápidamente.

Mineralización-inmovilización

Las formas inorgánicas minerales: amonio, nitrito y nitrato se producen continuamente en el suelo por procesos de mineralización y son la fuentes de nutrientes para los vegetales: amonio y nitratos, los nitritos resultan tóxicos. La mayor parte es soluble en agua y son desplazados con ésta a horizontes no alcanzados por las raíces. La fracción más retenida es el amonio que puede estar adsorbido en forma intercambiable en el complejo arcilla-humus o fijado dentro de las hojuelas y puede representar importante fracción en horizontes inferiores y hasta 3,5-8% del N-total en la capa arable.

Las determinaciones de estos iones poseen un valor relativo ya que son múltiples las vías que pueden seguir en el suelo:

- volatilización del NH₃
- desnitrificación de nitratos
- asimilación por vegetales
- inmovilización en células microbianas
- fijación a coloides
- lavado, erosión

Sólo las mediciones periódicas pueden proveer información sobre la dinámica de las formas del nitrógeno en ecosistemas naturales.

La mineralización del nitrógeno orgánico comprende dos etapas:

- **amonificación** que libera NH₃ a partir de moléculas orgánicas
- **nitrificación**, proceso por el cual se liberan nitritos o nitratos, iones solubles en agua a partir de combinaciones minerales u orgánicas.

Este proceso es contrabalanceada por la **inmovilización**, por la cual las formas minerales: amonio, nitrito o nitrato entran a formar parte de combinaciones orgánicas en el citoplasma microbiano.

Salidas de N del ecosistema

La desnitrificación es una de las causas más importantes de pérdida de nitrógeno por vía biológica y consiste en una respiración anaerobia de sustratos orgánicos, con nitrato como aceptor de electrones en la cadena respiratoria. El producto final: N₂, N₂O, se pierde a la atmósfera (capítulo 9). El amonio también se puede volatilizar en condiciones de pH y temperaturas altas.

Resumiendo: este elemento sufre numerosas transformaciones de origen biológico: **mineralización-inmovilización, óxido-reducción, fijación-volatilización**. No se encuentran las etapas de solubilización-precipitación ya que los compuestos nitrogenados minerales son solubles en agua

El **hombre** incide en estas transformaciones por el manejo que realiza de los ecosistemas, por la tecnología de depuración de efluentes altamente contaminados y en el caso de suelos, por la aplicación de fertilizantes y sustancias biocidas, la inoculación de microorganismos fijadores de N₂.

Bibliografía

BURNS, R. C., R. W. F. HARDY, 1974 **Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants**, Springer-Verlag, Nueva York.

DOMMERGUES, Y. y F. MANGENOT, 1970 **Ecologie Microbienne du Sol**, Ed. Masson et Cie, París

HARDY, R. W. F., U. D. HAVELKA, 1975 **Nitrogen fixation research: a key to world food**, Science, 188: 633-643.

FRENCH, T. G.M. KING & T.H. BLACKBURN 1998 **Bacterial Biogeochemistry**, Academic Press, NY

STEVENSON, F. J. & M. A. COLE, 1999 **Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients**. Wily & Sons, N. York

SYLVIA, D. M., J. J. FUHRMANN, P. G. HARTEL, D. A. ZUBERER 1998, **Principles and Applications of Soil Microbiology**, Prentice Hall, New jersey

Capítulo 8

Degradación de la materia orgánica. Humificación

Biosíntesis

Los organismos autotrófos son los responsables de la síntesis de materia orgánica a partir de CO₂ o CH₄ por actividad: quimiosintética de bacterias autotróficas aerobias y anaerobias fotosintética de plantas, algas, cianobacterias, bacterias fotosintéticas anaerobias.

Son los productores primarios de materia orgánica: en los ecosistemas terrestres los vegetales son los principales responsables mientras que en mares y océanos lo hace el fitoplancton (algas y cianobacterias).

Biodegradación

Para facilidad en el estudio dividiremos a la materia orgánica en dos categorías.

La materia orgánica fresca, constituida por los aportes de la vegetación, hojas, tallos, raíces, exudados, células microbianas muertas y restos de animales. Todos estos componentes, de origen biológico, son sometidos a una serie de procesos que conducen a su biodegradación con participación de equipos enzimáticos especializados de los microorganismos.

La fauna ejerce un efecto acelerador del proceso, reduciendo el tamaño de las partículas (acción abrasiva o de molienda).

La materia orgánica nativa o humus, formada por procesos de descomposición y resíntesis posee estructura diferente a la materia orgánica original. Su estabilidad frente a la descomposición es mayor que los demás componentes orgánicos del suelo.

Analizaremos las distintas categorías de moléculas contenidas en la materia orgánica fresca, cuya complejidad química condicionará en parte la actividad biológica y por lo tanto, su biodegradación y más adelante aspectos de la humificación y mineralización de estas complejas moléculas.

El cuadro 1 presenta composición química de algunos organismos y tejidos. Las mayores diferencias se encuentran entre las sustancias encargadas de mantener la estructura celular.

Cuadro 1 - Composición química de algunos organismos y tejidos

	g/100 g peso seco			
	Células levadura	Tejido vegetal	Músculo mamífero	Tegumento insecto
Mananos y glucanos	28	?	-	-
Quitina	?	-	-	25-55
Celulosa	-	15-60	-	-
Hemicelulosas	-	10-30	-	-
Lignina	-	5-30	-	-
Proteínas y ácidos nucleicos	24	2-15	80	25-37
Aminoácidos	1,3	?	?	?
Ácidos alifáticos	?	5-30	4,8	?
Azúcares solubles	0,5	?	?	?
Glicógeno	18	-	2,0-7,2	-
Lípidos	9	1-25	5,2	4-5
Cenizas	17	1-13	4,4	1
no determinados	2,2	?	?	pigmentos, fenoles, etc

Glúcidos

Azúcares simples y oligósidos que llegan al suelo o se originan en él por síntesis y degradación de poliósidos. Representan menos del 2% del carbono total del suelo y su presencia es muy efímera, excepto tal vez, el caso de la sacarosa (remolacha o caña). Su concentración refleja el equilibrio entre las velocidades de aparición y degradación. Distintas vías metabólicas han sido reconocidas en los suelos: la de la glicólisis (exosa di-fosfato), el ciclo de la exosa monofosfato (Enter-Doudoroff), que originan azúcares de 3, 4, 5 o 6 carbonos. En la célula microbiana, los glúcidos proveen de energía y subunidades para su biosíntesis. La gran mayoría de los microorganismos del suelo pueden emplear los ácidos orgánicos producidos por oxidaciones de hidratos de carbono y proteínas, de modo que el nivel de ácidos orgánicos de cadena simple es muy bajo y sólo pueden acumularse en condiciones de anaerobiosis.

Poliósidos de reserva como almidón, glucógeno o los provenientes de paredes celulares: celulosa, hemicelulosas y compuestos pécticos, polímeros de aminoazúcares, como la quitina.

Sustancias aromáticas: simples como los fenoles, o polimerizadas como los taninos o la lignina. Constituyentes hidrófobos: ceras, cutina, grasas.

Métodos de estudio

El análisis de la biodegradación de una sustancia orgánica se realiza por alguno de los métodos de estudio discutidos en el capítulo 5: actividad respiratoria, análisis de enzimas involucradas en el proceso, pérdida de peso de los sustratos incorporados al suelo, aparición de productos del metabolismo, recuentos de grupos fisiológicos (Anexo Práctico, Frioni, 1990).

Los estudios se realizan en:

* *in vitro*, en condiciones controladas, cuando se desea conocer el efecto de algún factor de interés, en recipientes estáticos o mediante la técnica de percolación

* *in situ*, en el campo, siguiendo desaparición de sustancias y/o aparición de productos finales

Almidón

Representa una reserva para los vegetales que se encuentra transitoriamente en hojas y es movilizado hacia los tallos, bulbos, rizomas, frutos y semillas. Integra en pequeña proporción las paredes de algas. Como es movilizado en las células antes de la muerte llega al suelo en poca cantidad. Está formado por amilosa y amilopectina; el primer componente posee estructura lineal, con varios cientos de unidades glucosa unidas por enlaces glucosídicos alfa 1-4. En la amilopectina se presenta esta misma organización, pero la molécula está ramificada, con cadenas laterales unidas por enlaces alfa 1-6. El almidón contiene un 70-90% de amilosa, pero esta proporción varía en distintas especies vegetales.

La biodegradación en el suelo es rápida, superando a la velocidad de la desaparición de la celulosa, hemicelulosa y otros polisacáridos, y se realiza tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (liberación de ácidos orgánicos y metano).

Microflora

La microflora amilolítica de los suelos es abundante, los recuentos en medio sólido presentan valores de 10^5 a 10^7 /gramo de suelo. Una multiplicidad de bacterias poseen las enzimas específicas, y son Gram positivas o negativas, esporuladas o asporógenas, aerobias o anaerobias. Numerosos actinomicetes pueden emplear este polisacárido así como muchos hongos filamentosos. Otros sustratos pueden ser empleados por estos microorganismos, incluida la celulosa.

La hidrólisis es catalizada por **amilasas (alfa glucosidasas)** inducibles: se reconocen tres tipos: la alfa, la beta amilasa y una glucosidasa.

La alfa amilasa es una endoenzima que actúa al azar sobre amilosa y amilopectina. Con amilosa se acumulan grandes cantidades de maltosa y pequeñas cantidades de glucosa y del trisacárido maltotriosa. En la amilopectina esta enzima detiene su hidrólisis en las ramificaciones, acumulándose fracciones de alto peso molecular (dextrinas). La beta amilasa es exoenzima, actuando desde los extremos de la molécula, liberándose maltosa y dextrinas. Al llegar a una ramificación se detiene la hidrólisis.

Otros organismos poseen otra exoenzima, la **alfa amilo 1-6 glucosidasa** (glucoamilasa) capaz de hidrolizar la molécula en puntos de ramificación, liberando al medio dextrinas y oligosacáridos; los que no permanecen mucho tiempo en el suelo pues otras enzimas los llevan a glucosa, asimilada por las células.

Estas enzimas son **inducibles**, pero la habilidad para producirlas depende del tipo de almidón de diferentes especies vegetales. La naturaleza exocelular las hace sensibles al ambiente y pueden ser muy adsorbidas por los coloides. Los azúcares simples solubles penetran en la célula donde son metabolizados.

Ecología

Fuera de los casos descritos de inhibición de la degradación por adsorción de enzimas, el almidón es descompuesto en todos los ambientes por acción de una microflora poco específica. Los productos finales dependerán no solamente de la microflora dominante sino también de las condiciones ecológicas. Algunos autores han señalado velocidades diferentes de degradación según el origen del almidón: el de arroz parece ser atacado por un gran número de microorganismos.

Inulina

Constituye otro polisacárido de reserva, formado por unidades de fructosa (25-28) o fructosano, unidos a la cadena lateral por enlaces 2-1. Numerosos microorganismos: bacterias, actinomicetes, hongos, poseen inulasa, enzima extracelular y exoenzima que libera un disacárido de fructosa. Su degradación ocurre simultáneamente con la del almidón.

Glúcidos de paredes celulares

Las paredes celulares de los vegetales superiores poseen una estructura compleja que al ser tratada con lejía de soda (NaOH al 17,5%) libera glúcidos secundarios: las mal llamadas hemicelulosas y compuestos pécticos, dejando un residuo insoluble formado por celulosa y distintas proporciones de lignina, la que a medida que la planta envejece va invadiendo las paredes primarias y secundarias a partir de la lámina media.

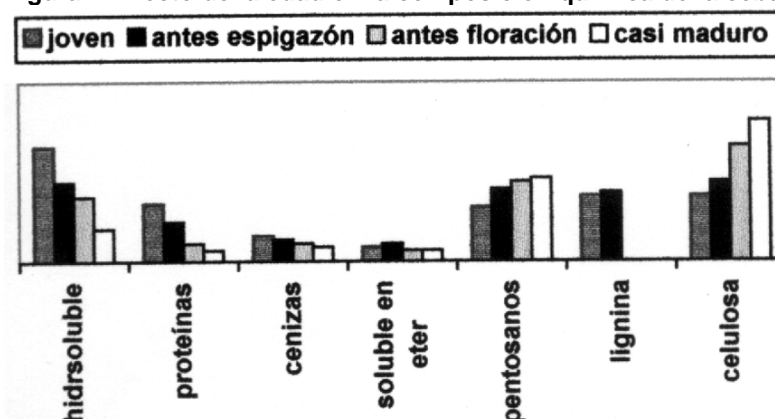
Los restos vegetales cuando llegan al suelo están formados en gran parte, salvo en el caso de la incorporación de abonos verdes, por paredes celulares. La celulosa, hemicelulosas, pectinas y lignina representan aproximadamente el 45% de la materia seca en centeno joven y alfalfa en floración, 55% en acículas de pino, alcanzando un 75% en paja de centeno luego de la cosecha, como se aprecia en el cuadro 2 y en la figura 1.

Las paredes de los microorganismos contienen distintos polisacáridos: los hongos primitivos poseen celulosa que luego es reemplazada por quitina y otros poliósidos con o sin nitrógeno, comparables por su solubilidad a las hemicelulosas de los vegetales. Especies filamentosas contienen en sus paredes pigmentos amorfos y oscuros, las melaninas. En las bacterias, el péptidoglicano formado por aminoazúcares y péptidos está acompañado en las Gram positivas por ésteres fosfatados, los ácidos teicoicos y lipoproteínas y lipopolisacáridos en las Gram negativas.

Cuadro 2 - Composición química de distintos vegetales

Constituyentes	% materia seca al aire		
	centeno joven	Alfalfa	acículas de pino
Grasas y ceras	2,35	10,41	23,92
Solubles en agua	29,54	17,24	7,29
Hemicelulosas	12,67	13,14	18,98
Celulosa	17,84	23,65	16,43
Lignina	10,61	8,95	22,68
Proteínas	12,26	12,81	2,19
Cenizas	12,55	10,30	2,51

Figura 1- Efecto de la edad en la composición química de la cebada



Celulosa

Como vimos, la celulosa es uno de los constituyentes vegetales más importantes, representando un 15% del peso seco de leguminosas y gramíneas jóvenes y más de 50% en materiales leñosos (en promedio representa 1/3 del CO₂ fijado por las plantas).

Sin embargo, los análisis de suelos indican que sólo representa una pequeña fracción (menos del 1%) de la materia orgánica.

La celulolisis tal vez constituya la etapa mejor conocida del ciclo del carbono. Las investigaciones en estos aspectos han sido estimuladas por los graves problemas ocasionados por los microorganismos celulolíticos en la industria textil y papelera. Se calcula que anualmente unas 10 millones de toneladas de carbono se fijan como celulosa, cantidad que los suelos deben degradar en el mismo período.

La celulosa está constituida por **unidades de glucosa**, unidas en largas cadenas por enlaces beta 1-4 glucosídicos. Pueden presentarse entre 2.000 a 10.000 y hasta a veces más de 15.000 unidades de glucosa en la molécula, según la especie vegetal. La estructura física también varía, las cadenas se reúnen en microfibrillas entre las cuales se distinguen mallas cristalinas separadas por regiones amorfas. Las mallas están fuertemente unidas por puentes H o por fuerzas de Van der Waals. Según la estructura, la orientación de las fibrillas, la proporción de constituyentes secundarios, la celulosa se comporta diferentemente frente a la biodegradación. Además, los tratamientos mecánicos a que se somete a las preparaciones industriales afectan la biodegradación: papel, celofán, celulosa precipitada, carboximetilcelulosa (CMC) son empleados en los medios de cultivo, o llegan al suelo. Estos preparados difieren en estructura y propiedades físicas de la celulosa natural.

Microorganismos

Este polisacárido es hidrolizado por un complejo enzimático, no completamente caracterizado, conocido como celulasa, presente en una variedad de bacterias, actinomicetes, hongos y protozoos. Las especies celulolíticas no son muy numerosas dentro de cada grupo. El cuadro 3 presenta las características de los microorganismos celulolíticos.

La celulosa es en ocasiones degradada más rápidamente en cultivos mixtos, aun cuando los organismos asociados sean incapaces de atacar el polisacárido. La microflora primaria se favorece por la remoción de los productos de la degradación o por la eliminación de sustancias inhibitoras (comensalismo).

Las bacterias son activas degradadoras, algunas especies actúan como celulolíticos verdaderos (atacan a la celulosa nativa) como los géneros *Cytophaga* y *Sporocytophaga*.

Dentro de los *Actinomycetales* numerosos *Streptomyces* son capaces de emplear celulosa como fuente de carbono y energía, pero actúan como pobres competidores frente a otros grupos microbianos.

Los hongos son activos degradadores en ambientes desfavorables para las bacterias: pH ácidos, alta humedad. Numerosas especies participan en la degradación del resto lignocelulósico de restos vegetales.

Los protozoos son activos degradadores en el rumen, en anaerobiosis; en el suelo y aguas prefieren la fagocitosis de pequeños organismos.

Celulolisis

Las bacterias se observan a nivel de las regiones amorfas, pero no penetran en el lumen de las fibras salvo que éstas estén lesionadas. Los hongos pueden atravesar las paredes a nivel de puntuaciones o fisuras: las fibras se hinchan y se observan estrías profundas. Cambia la reacción frente al iodo, se altera la estructura física y el material se transforma en una masa mucilaginosa hasta su desaparición total.

La celulasa cataliza la conversión de la celulosa insoluble en mono, di, tri o tetrasacáridos. Los dos primeros son solubles en agua y penetran en la célula integrando las vías metabólicas que rinden energía o proveen de subunidades para sus macromoléculas. La figura 2 (Dommergues, Mangenot, 1970) esquematiza la degradación. Se han determinado hasta 14 componentes en el complejo enzimático, arreglados en cuatro tipos básicos de enzimas:

C1, pobremente caracterizada, actúa sobre la celulosa nativa y la contienen los organismos denominados celulolíticos verdaderos. Está integrada por proteínas con ligeras diferencias estructurales, entre los distintos grupos microbianos.

- El complejo conocido como Cx **es de acción** beta 1-4 glucanasa, no hidroliza la celulosa nativa sino que ataca a los polímeros parcialmente degradados y está muy distribuida entre los hongos, bacterias y actinomicetes. La hidrólisis incluye adición de agua al sustrato insoluble con rupturas de enlaces entre azúcares.

La acción se realiza al azar (acción endoglucanasa), liberándose productos solubles como la celobiosa, aunque los productos finales dependen del tipo de organismo (otros oligosacáridos y a veces glucosa)

Si el ataque se produce desde los extremos de la molécula (acción exoenzimática), la celobiosa es el producto dominante. Estos términos no deben confundirse con la acción a distancia de la célula productora (la C1 y Cx deben actuar extracelularmente dada la insolubilidad de los sustratos y sus grandes dimensiones). La beta glucosidasa que cataliza la última etapa de la degradación, es una hidrolasa que lleva la celobiosa, celotriosa y otros oligosacáridos de bajo peso molecular hasta glucosa. El antiguo término de celobiasa es inapropiado pues la celobiosa no constituye su único sustrato.

En la mayoría de los organismos el sistema celulasa es inducible y se sintetiza en presencia de celulosa y carbohidratos relacionados y está sometida a represión catabólica, los productos de la reacción inhiben o reprimen la síntesis de la enzima. Por la acción extracelular, esta enzima está muy sometida a factores del medio. Un alto contenido de arcillas puede inactivarla, fenómeno que junto a la adsorción del sustrato puede explicar en parte el efecto protector de la montmorillonita sobre materiales celulósicos.

Cuadro 3 - Microflora celulolítica

grupo	orden	género	ecología
bacterias	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Vibrio</i>	aerobios, en mantillos, mesófilos y termófilos, con pigmentos
	<i>Cellvibrio</i>		
	<i>Eubacteriales</i>	<i>Cellulomonas</i> <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i>	aerobias, G- bacilos pigmentados aerobios, a veces pleomórficos anaerobios, en suelos inundados, turbas
	<i>Mixobacteriales</i>	<i>Cytophaga</i> <i>Sporocytophaga</i>	bacilos aerobios, en suelos con pajas o abonos orgánicos.
	<i>Actinomycetales</i>	<i>Streptomyces</i>	crecen en agar mineral y celulosa con halo de hidrólisis, pigmentos
protozoos		<i>Micromonospora</i> , <i>Nocardia</i> <i>Hermella</i>	descomponen celulosa en cultivo puro. Importantes en el rumen, menos en el suelo
	hongos	<i>Ascomycetes</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Humicola</i> , <i>Botrytrichum</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Rhizopus</i>
		<i>Basidiomycetes</i> <i>Deuteromycetes</i>	innumerables especies principales agentes en suelos húmedos, mantillos

Ecología

Entre los factores más importantes que afectan a este proceso en la naturaleza citaremos el nivel de nitrógeno disponible, la temperatura, aireación, humedad, pH, presencia de otros carbohidratos en los restos.

Nitrógeno: la aplicación de N-inorgánico estimula la celulolisis, hecho explicable ya que la celulosa no contiene este elemento y la microflora lo requiere junto a otros minerales para satisfacer sus necesidades plásticas.

La figura 3 publicada por Frioni, 1990, muestra el empleo de diferentes fuentes de nitrógeno por la microflora celulolítica y la figura 5 el efecto de dosis crecientes de fertilizante nitrogenado. Altas dosis, donde el nitrógeno agregado supera el requerido, no incrementan la degradación, pues otros son los factores limitantes del proceso.

Los microorganismos requieren una parte de nitrógeno por cada 35 partes de celulosa, datos que reflejan el hecho de que 3 partes de nitrógeno se incorporan al citoplasma microbiano por cada 100 partes de celulosa descompuesta (5-10% N) posibilitando la síntesis de 30-60 unidades de biomasa (Alexander, 1977). En algunos suelos el fósforo puede ser factor limitante del proceso.

Figura 2- Degradación de la celulosa

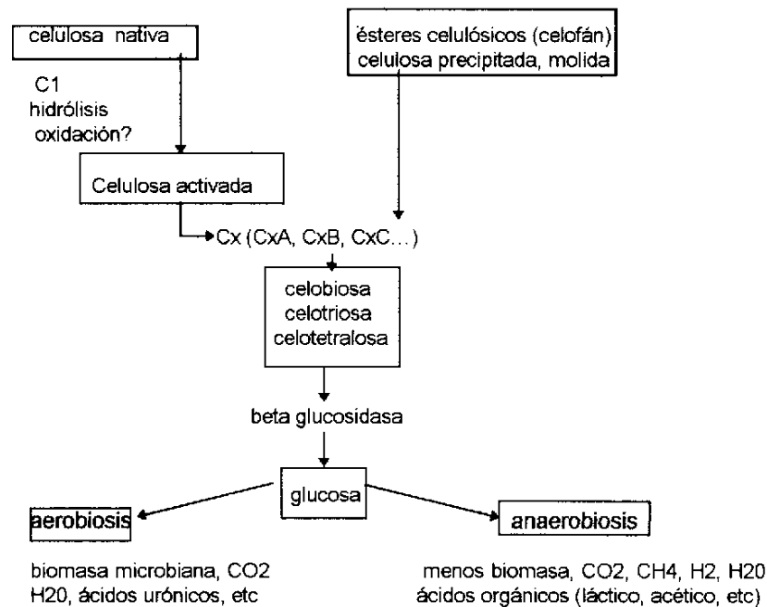
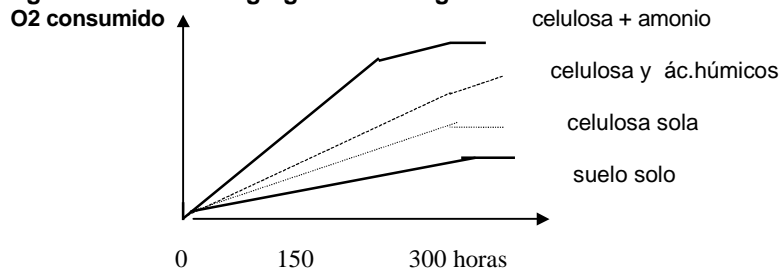


Figura 3- Efecto de agregado de nitrógeno en la celulolisis

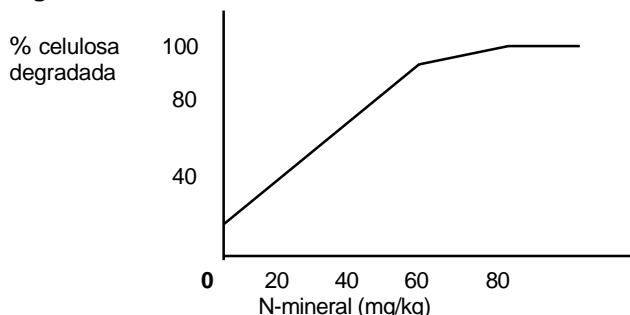


Temperatura: el proceso ocurre desde temperaturas cercanas al punto de congelamiento hasta aproximadamente 65°C. Los aumentos de temperatura inducen variaciones en la composición de la población con incrementos de la velocidad de degradación. En el rango termófilo son *Clostridium*, actinomicetes y hongos, las poblaciones dominantes, aunque estos organismos son considerados más bien como mesófilos resistentes. En el suelo la mayoría de las especies son mesófilas.

pH: los microorganismos celulolíticos menos afectados por los cambios de pH son las bacterias anaerobias. En general se puede decir que la celulolisis es más activa en suelos bien provistos de

bases, neutros y que la composición de especies dominantes varía con este factor. En ambientes ácidos son las bacterias anaerobias y los hongos los grupos dominantes, mientras que los actinomicetes prefieren la neutralidad o escasa basicidad. Resulta evidente que el encalado de suelos ácidos estimula el proceso.

Figura 4- Efecto de dosis creciente de N mineral en la celulolisis



Humedad y aereación: como vimos, la microflora específica puede ser aerobia o anaerobia, de modo que el nivel hídrico de los suelos condicionará la actividad de cada uno de estos grupos. Por su rendimiento energético el proceso es más lento en ambientes anegados o en suelos con pobre intercambio de gases.

El cuadro 4 muestra el efecto del pH y de la aereación del suelo en el coeficiente de mineralización del carbono (a) y del cultivo y la profundidad (b). Como puede apreciarse, un pH neutro y condiciones de buena aireación en los suelos favorecen este proceso.

Las bacterias serán en estas condiciones los agentes dominantes de la celulolisis. El proceso disminuye con la profundidad en correlación directa con el descenso de la actividad biológica y del nivel de materia orgánica. Los cultivos son fuente permanente de celulosa a nivel rizosférico por la decamación y muerte de tejidos.

Cuadro 4 - Efecto de algunos factores en la celulolisis

a) pH y aereación			
pH	aereación	% celulosa degradada	Coeficiente de mineralización
en 15 días			
4,5	Aerobiosis	62,5	3,6
	Anaerobiosis	14,0	0,1
7,0	Aerobiosis	81,2	11,2
	Anaerobiosis	21,0	0,15
b) profundidad del suelo y cultivo			
% celulosa descompuesta			
profundidad (cm)	no cultivado	cultivado	
0-20	48	91	
20-40	16	72	
40-60	0	34	

Otros nutrientes: se pensaba que los celulolíticos verdaderos (con la enzima C1) no podían emplear otra fuente de carbono y energía que no fuera la celulosa. Pero actualmente se sabe que la presencia de otras fuentes de carbono más simples favorece a estos microorganismos.

Los azúcares simples, los compuestos pécticos o las hemicelulosas, incrementan la actividad celulolítica. La microflora estimulada por el sustrato simple induce la celulasas al agotarse el mismo.

La proporción de **lignina** en los restos es otro de los factores que afectan a la celulolisis. El cuadro 5 presenta el efecto de dosis crecientes de lignina.

El efecto inhibitor sobre la celulolisis se debería al problema físico resultante de la estrecha unión entre estos dos polisacáridos en las paredes celulares. Las enzimas encontrarían una barrera mecánica. A medida que los restos se enriquecen en lignina la celulolisis se hace más lenta.

Cuadro 5 - Degradación de preparaciones de yute con diferentes cantidades de celulosa y lignina (a los 21 días)

Preparado	celulosa	Lignina	% celulosa descompuesta
A	99,2	0,0	100,0
B	95,5	3,3	95,6
C	89,3	6,3	83,1
D	82,7	11,9	37,9
E	75,6	12,6	17,7

En resumen: este importante proceso biológico que asegura la degradación de la gran masa de celulosa que cada año llega a suelos y aguas es realizado por una microflora variada (bacterias y actinomicetes, hongos, protozoos), aunque el número de especies celulolíticas no es muy amplio. El proceso ocurre en todos los ambientes tanto en condiciones de aerobiosis como de anegamiento. En ambientes ácidos dominan los hongos; en los cultivados y neutros, las bacterias; bajo desecación y ligera alcalinidad, los actinomicetes.

La fauna: ácaros, colémbolos, termitas, actúa moliendo y macerando a la celulosa nativa, pero no poseen celulasas. La microflora de su tracto digestivo puede iniciar la degradación. En aguas el proceso es activo.

Otros polímeros: mananos, xilanos, pectinas (Las hemicelulosas)

Este grupo incluye a las mal designadas hemicelulosas: un conjunto heterogéneo de compuestos formados por una cadena principal poliósida, más o menos larga y en general formada por una misma unidad elemental (pentosa, hexosa). Puede haber ramificaciones en la molécula, a veces muy numerosas, con unidades diferentes a las de la cadena principal (hexosas, pentosas, metiladas o no, ácidos urónicos).

Es más correcto hablar de:

- * xilanos (unidades de xilopiranosas con enlaces beta 1-4 con o sin cadenas laterales de arabinosa o ácido glucónico unidas al carbono 3)

- * mananos, glucanos, galactanos, en lugar de emplear el término hemicelulosas

- * compuestos pécticos (figura 1) formados por unidades de ácido galactourónico unidos por enlaces beta 1-4

Resulta difícil aislar y purificar cada uno de estos compuestos por su íntima asociación con otras sustancias en los restos vegetales y son muy frecuentes las alteraciones en la estructura durante la extracción. Cuando restos vegetales se incorporan al suelo la fracción hemicelulósica desaparece inicialmente a alta velocidad, pero luego el proceso se hace más lento (cuadro 6).

Cuadro 6 - % de descomposición de algunos constituyentes de la paja de cebada, en aerobiosis

días	hemicelulosa	celulosa
0-4	43,5	2,3
4-8	6,5	9,1
8-16	5,4	25,0

La heterogeneidad de esta fracción puede explicar este hecho, las sustancias clasificadas como hemicelulosas no son igualmente lábiles: los xilanos y mananos desaparecen primero, mientras que los galactanos son más resistentes. Además, la microflora sintetiza sustancias de este tipo: glucanos y pentosanos en las paredes de los hongos, mananos en levaduras, glucanos y levanos en cápsulas bacterianas, poliurónidos en *Cytophaga*. Esta síntesis microbiana puede reflejarse en una aparente disminución en la degradación de los polisacáridos vegetales. La degradación puede dificultarse cuando están muy unidas a otras sustancias como a la celulosa.

Muchas enzimas están involucradas:

xilanasas, arabanasas, etc., actuando tanto sobre cualquier punto de la molécula (endoenzimas) o desde los extremos de aquella (exoenzima). Las xilanasas pueden liberar el dímero xilobiosa o

xilosa que penetra en las células glicosidasas actúan sobre los disacáridos u oligósidos resultantes de la acción de las enzimas anteriores, liberando azúcares simples o ácidos urónicos metabolizables dentro de las células.

La degradación de esto polímeros está más extendida que la celulolisis. Las glucanasas han sido poco estudiadas a pesar de su rol importante en la lisis de los micelios fúngicos. Para aislar a los microorganismos responsables se introducen en el suelo trampas de caolinita con paredes de diversos hongos. La microflora dominante está formada por hongos y actinomicetes.

Las mananases son producidas extracelularmente por hongos y bacterias, en algunos es constitutiva, en otros inducible y atacan a heteroglicanos con manosa.

Estas enzimas extracelulares sufren degradación biológica y son altamente inhibidas por adsorción a arcillas y como las celulasas, están sometidas a represión catabólica cuando la hidrólisis excede la magnitud de asimilación.

Microflora

Es muy variada: hongos, actinomicetes y bacterias típicas atacan a alguna fracción de este complejo grupo en cultivo puro, empleando el polisacárido como fuente de carbono y/o energía. Trabajos que inoculan microorganismos sobre materiales vegetales esterilizados demostraron que ésta es una actividad muy extendida entre los microorganismos del suelo. La actividad es estimulada cuando además del polisacárido se incorporan azúcares simples y la ecología es similar a la de la celulolisis.

Sustancias pécticas

Se encuentran en la lámina media de las paredes vegetales y su rol es unir las células, aunque también se localizan en paredes primarias y secundarias. Existen diferencias en longitud de la cadena y solubilidad:

- * la protopectina es insoluble en agua
- * la pectina, soluble y parcialmente esterificada con metanol
- * los ácidos pécticos, son solubles en agua pero no esterificados

Tres enzimas están involucradas en la degradación de estos materiales:

- * protopectinasa, que convierte protopectina en pectina soluble
- * pectin-metil esterasa, que ataca las uniones metil éster de la pectina para dar ácido péctico y metanol
- * poligalactouronasa, que ataca uniones entre unidades de ácido galactourónico tanto de la pectina como de los ácidos pécticos

Muchos organismos del suelo poseen estas enzimas: *Erwinia*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y numerosos patógenos que pueden penetrar los tejidos.

La diversidad de grupos microbianos y la habilidad para colonizar una variedad de suelos y sustratos, indica que la microflora pectinolítica es amplia (10^5 - 10^6 /g de suelo), aerobia y anaerobia.

Los hongos y actinomicetes parecen ser los grupos más extendidos. Estas sustancias son atacadas desde el momento en que los restos vegetales llegan al suelo por los primeros colonizadores. Su asociación a otros constituyentes de las paredes pueden protegerlos (celulosa, polifenoles).

Quitina

Este polisacárido está constituido por largas cadenas de glucosamina, a diferencia de la celulosa que contiene glucosa (figura 1). Constituye un elemento importante del exoesqueleto de artrópodos, paredes de hongos y de algunas algas y huevos de nemátodos. La degradación no está limitada como en los polisacáridos anteriores por el nitrógeno, ya que su molécula posee 6,9% de este elemento. Se obtiene fácilmente glucosa y amonio. Los quitosanos han perdido los grupos acetilos -COCH₃ y están formados por largas cadenas glucosamina (C₆H₉O₄NH₂). La quitina llega al suelo por aporte de insectos, hongos y otros integrantes de la comunidad. Si se compara el ataque de películas de quitina y celofán se observa que este último permanece sin degradar por largos períodos de tiempo, mientras que la quitina es colonizada rápidamente (12 días en medio acuático y 12-32 semanas en suelo de bosque).

Numerosos hongos, bacterias y actinomicetes son responsables de la degradación. Los actinomicetes dominan en suelos agrícolas, las bacterias en los inundados y los hongos en clima templado y ligera acidez.

Las sustancias aromáticas

El suelo recibe cantidades importantes de sustancias aromáticas que son aportadas por la vegetación o sintetizadas por la microflora, sobre todo por hongos. Estas sustancias están, sobre todo, constituidas por heterósidos con aglicona variada:

- * con un solo anillo bencénico: fenoles, ácidos bencénicos de molécula tipo C6-C1 o C6-C3, como en cumarinas y ácidos cinámicos
- * con dos anillos bencénicos unidos por una cadena de tres carbonos o un heterociclo oxigenado (C6-C3-C6): antocianos, flavonas, chalconas
- * compuestos fenólicos condensados: lignina, taninos, sustancias húmicas

Entre los productos de síntesis microbiana se encuentran fenoles simples, pigmentos de estructura variada y ciertos antibióticos.

El anillo bencénico es una estructura bastante estable:

- * su oxidación puede conducir a la apertura del ciclo dando ácidos alifáticos que serán metabolizados en el ciclo de los ácidos tricarbónicos
- * su condensación da lugar a la formación de sustancias coloreadas, del tipo del humus.

Las enzimas son **oxigenasas** que catalizan la fijación del oxígeno al sustrato y oxidasas que transfieren al oxígeno los electrones del sustrato con formación de agua. Los compuestos aromáticos simples son llevados al estado de difenoles. La degradación de flavonoides en C6-C3-C6 es menos conocida y son más resistentes a la degradación.

La apertura del anillo está asegurada por dioxigenasas que fijan los átomos de una molécula de oxígeno al sustrato; la ruptura puede hacerse entre dos funciones fenol en posición orto o bien en meta. La figura 5 publicada por Dommergues, Mangenot, (1970) muestra algunos de los posibles caminos en la degradación.

Los procesos de condensación oxidativa son de importancia considerable pues conducen a la formación de taninos, melaninas, sustancias húmicas. Las enzimas, no bien caracterizadas, se clasifican en dos grupos: la lacasa y la tirosinasa que oxidan fenoles con formación de radicales libres que pueden condensarse entre ellos dando origen a productos oscuros, muy polimerizados. Bacterias, levaduras, hongos filamentosos producen en el laboratorio sustancias condensadas del tipo de las moléculas húmicas.

En resumen: la apertura del ciclo conduce a mineralización y la condensación oxidativa a la acumulación de polímeros resistentes que protegen a otras sustancias de la biodegradación. El nivel de oxígeno es de gran importancia:

- * en anaerobiosis el anillo bencénico no es degradado, *Arthrobacter* no produce pigmentos pardos si no es cultivado en baja presión de O₂
- * en aerobiosis la degradación puede ser completa

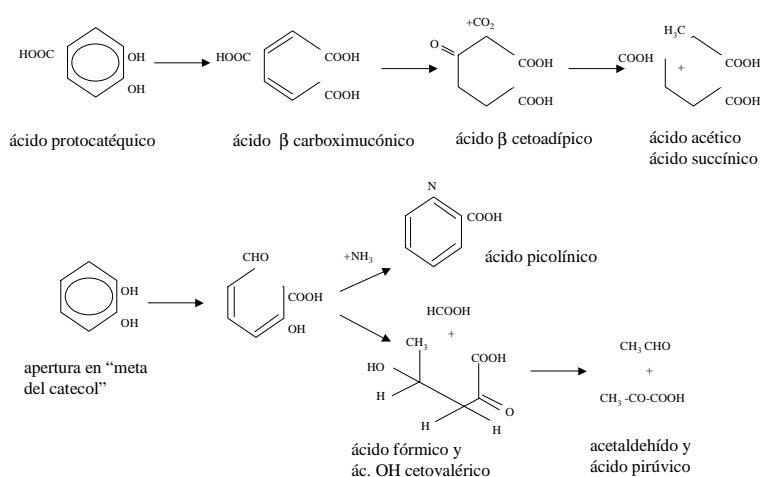
La importancia de los fenoles en el suelo es más cuali que cuantitativa: el nivel de carbono involucrado en estas combinaciones es bajo, pero constituyen moléculas de gran actividad biológica. Los polifenoles son responsables de la resistencia de vegetales a hongos parásitos y están involucrados en fenómenos de alelopatía -una especie vegetal inhibe la germinación o el crecimiento de otra-. Por ejemplo, pocos ppm de cumarina en el suelo pueden inhibir el desarrollo de raíces de numerosas especies. También ejercen efectos tóxicos sobre la microflora del suelo.

Lignina

La lignina constituye otro polímero natural muy importante responsable del 25% de la fitomasa seca producida anualmente en la biosfera (Reddy, 1984). Se encuentra en tejidos esenciales como el xilema y el esclerénquima y también en hongos como *Humicola*, *Aspergillus* y *Gliocladium*.

Representa un 60% del peso de la celulosa, con la cual está íntimamente asociada. Las dificultades para su extracción y purificación son enormes por lo que los datos cuantitativos presentados en la bibliografía son aleatorios. Dommergues, Mangenot (1970) citan valores de 18-35% en bosques, 21-31% en pajas, 10-24% y hasta 35% del peso seco en mantillos forestales. Como se aprecia, importantes cantidades de esta sustancia fuertemente polimerizada e insoluble en agua, deben ser degradadas cada año.

Figura 5- Modalidades de apertura del anillo bencénico



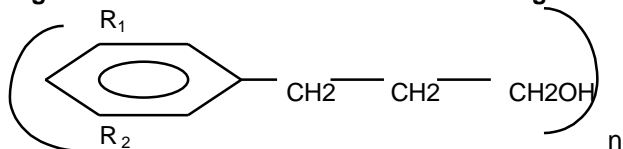
Las ligninas no constituyen un grupo homogéneo de compuestos y su estructura varía con los vegetales y dentro de una especie, con su grado de madurez. Resisten la hidrólisis ácida, en agua caliente y solventes orgánicos, pero se solubilizan en álcalis.

El espectro de absorción en el ultravioleta (máxima absorción en la vecindad de los 280 nm) indica que la lignina es un derivado modificado del benceno y contiene sólo 3 elementos: C, H y O. La estructura básica es aromática, formada por polímeros de unidades de fenilpropano (C6-C3) (figura 6), con grupos alifáticos hidroxilos y carbonilos. Pertenecen a la misma familia de compuestos que ciertos pigmentos flavonoides y antocianos en C6-C3-C6 y de los aminoácidos fenilalanina y tirosina.

La biosíntesis de la lignina se realiza en tejidos jóvenes por hidrólisis de heterósidos aromáticos con liberación de agliconas, las que se transforman en radicales libres por acción de oxidasas, condensándose al azar para dar complejos tridimensionales muy ramificados, de peso molecular difícil de determinar, en general superior a los 10.000.

Se han publicado numerosos modelos tendientes a explicar la complejidad de estos compuestos con unidades básicas de fenilpropano, con núcleos aromáticos, grupos metoxilo, puentes de oxígeno, ricos en C (67,5%), en grupos metoxilo (15-16% en coníferas y más de 25% en dicotiledóneas) y en -OH alcohólicos y fenólicos (Adler, 1977).

Figura 6 - Unidad básica de la molécula de lignina



- **protolignina** o lignina natural a los polímeros insolubles en agua formada por polimerización deshidrogenativa de alcoholes coniferil, cumaril o sinapil, iniciada por enzimas

- **las ligninas industriales**, maderas modificadas química o físicamente, altamente polimerizadas. Difieren como sustratos de las naturales; poseen en general menor peso molecular, mayor solubilidad, con lo que aumenta su biodegradación: los lignosulfonatos se obtienen por tratamientos con soluciones ácidas de NaHSO_3 , las álcali ligninas son el resultado de la extracción con soda y sulfuro de sodio, las fenol ligninas o etanol ligninas aluden al procedimiento de extracción, contienen una variedad de compuestos orgánicos (azúcares, polisacáridos, aldehídos, etc.) y pueden variar considerablemente en estructura física. Los trabajos que estudian la degradación de la lignina emplean estos preparados, dada la imposibilidad de obtener la protolignina en estado inalterado (en solución acuosa y en autoclave a 100°C se logró solubilizar sólo un 10% en 50 días)
- **los modelos de lignina**, compuestos aromáticos solubles en agua sintetizados a partir de derivados del alcohol cinámico que poseen uniones intermonómeras presentes en la lignina natural.

Los residuos de industrias papeleras y de las que preparan pulpa para papel, las aguas servidas y los desechos resultantes de una ganadería extensiva, presentan serios problemas de contaminación por su alto contenido en lignina, lignocelulosa, celulosa, de lenta biodegradación.

Estos productos deben ser descompuestos antes de su deposición en gran escala en el ambiente: los ríos que reciben afluentes de la industria del papel se colorean intensamente y poseen grandes sedimentos de lignina.

A diferencia de los otros biopolímeros, los estudios microbiológicos han avanzado poco por la complejidad de esta molécula: el producto natural más recalcitrante, es decir escasamente biodegradable por su alto PM y estructura tridimensional aromática, que en algunos ambientes origina lignitos y carbón, las principales formas de materia orgánica fosilizada.

Es también importante **precursor de las moléculas húmicas** al incorporarla a un sílico-gel nutritivo, la lignina se transforma espontáneamente por desecación en sustancias pardas, del tipo del humus.

La lignina es considerada por algunos ecólogos microbianos como un plástico natural ya que la polimerización de los precursores no está mediatizada por enzimas y el polímero posee muchos enlaces intermonómeros, que no son directamente hidrolizables por enzimas (Zeikus, 1981). Se le considera como un producto de desecho que la célula deja de eliminar y lo deposita en paredes secundarias y lámina media de plantas superiores, como metabolito secundario (no es esencial para el crecimiento, a pesar de beneficiar al organismo que lo posee). El mismo autor sostiene que la lignina actuaría de un modo similar a las envolturas protectoras de la piel, de los vegetales y animales y quizá como las capas protectoras de las esporas.

Microflora ligninolítica

Entre los organismos estudiados, sólo los microorganismos eucarióticos mostraron capacidad para degradar completamente a la protolignina. La acción de los distintos organismos en el proceso son variados, como muy bien lo resume Zeikus (1981). Los métodos empleados para cuantificar la degradación incluyen estudios con especies aisladas sobre ligninas específicamente marcadas con C^{14} (en fracciones alquílicas, arílicas o en los grupos metoxilo) y análisis químico y estructural de maderas en decaimiento inoculadas y no inoculadas con especies fúngicas de interés. La degradación de la celulosa es cerca de tres veces superior a la de la lignina.

Por la dificultad en la preparación de medios selectivos, el aislamiento de especies responsables es muy dificultoso. Incluso, una disminución en la concentración del sustrato, no siempre es índice de degradación. La molécula puede ser adsorbida a micelios o células microbianas, e incluso la degradación puede enmascarse por la síntesis de sustancias del tipo de la lignina por numerosos hongos.

Los organismos más activos son los hongos responsables de las podredumbres de la madera: blanca, parda y blanda, que han sido muy estudiadas por sus consecuencias en el deterioro de postes, vigas, de madera. Son sobretodo *Basidiomycetes* y algunos *Ascomycetes*.

Los hongos de la podredumbre blanca son los más activos degradadores de la lignina, pudiendo convertir la madera en CO_2 y H_2O . Degradan lignina y otros polisacáridos, con pérdida de peso rápida: *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus anceps*

Los hongos de la podredumbre parda degradan extensivamente polisacáridos y causan modificaciones químicas limitadas de la lignina. Son incapaces de metabolizar anillos aromáticos y son más eficientes en la degradación de celulosa y hemicelulosas. Atacan cadenas laterales, dejando fenoles que se oxidan dando pigmentos marrones o pardos.

Estudios con *Lenzites trabea* demostraron que la descomposición es sobre todo oxidativa y que la demetilación de unidades fenólicas y no fenólicas de la madera constituyen las principales reacciones degradativas. Otros hongos activos: *Poria cocos*, *Lentinus lepideus*, *Poria monticola*.

Los hongos de las podredumbres blandas degradan los principales componentes de la madera. El material se transforma en una masa oscura, desorganizada, con poca pérdida de peso y la lignina sufre alteraciones parciales. Se comprobó con algunas especies, como *Preussia fleshkii* y *Chaetomium piluliferum*, descomposición de anillos marcados (3% a CO₂ en 25 días) y demetoxilación significativa. Son sobretodo *Ascomycetes* y Hongos Imperfectos.

Pocas referencias se encuentran sobre la actividad degradativa de la lignina entre otros organismos eucariotas. El moho *Fusarium solani* crece sobre ligninas sintéticas y las degrada. Es interesante examinar la capacidad de otros hongos para degradar ligninas naturales o industriales.

Entre los organismos procarióticos, algunas bacterias han sido referidas como ligninolíticas, sobre todo en cultivos mixtos, en el suelo. Especies de *Azotobacter* son capaces de degradar tanto los anillos como los grupos metoxilo cuando crecen con compuestos aromáticos solubles, aunque a velocidad menor que la actividad de poblaciones mixtas de bacterias.

Algunos actinomicetes poseen capacidad de degradar lignina, rompen enlaces beta-aril éter, presentes en ligninas naturales, pero se requieren mayores conocimientos sobre los mecanismos de degradación de estos organismos. Las bacterias atacan sobretodo las cadenas laterales alifáticas.

El rol que juegan **los animales** en la descomposición de la lignina no puede ser ignorado, aunque su principal actividad sea una disminución del peso molecular como consecuencia de destrucción mecánica. Insectos, invertebrados y rumiantes contribuyen a la despolimerización física de la lignina e incrementan la digestibilidad de la lignocelulosa, atacada por los microorganismos asociados a sus tractos gastrointestinales (anaerobiosis).

Sólo los microorganismos son capaces de degradar completamente este polímero.

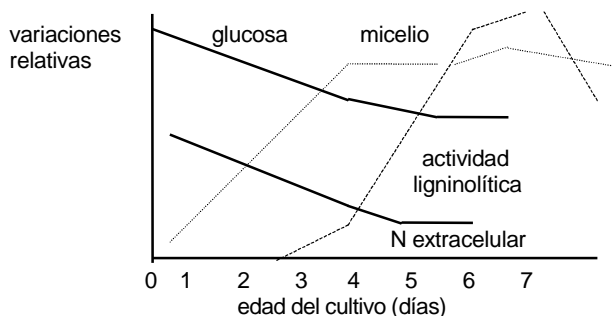
En resumen: son sobre todo los hongos imperfectos y los basidiomicetes, los organismos más activos en la degradación de ligninas naturales. Algunas bacterias y actinomicetes demostraron habilidad para atacar ligninas sintéticas marcadas (cadenas laterales) (Martin *et al.*, 1982). Las interacciones microbianas estimulan frecuentemente la degradación y el proceso es realizado por poblaciones complejas.

Degradación

La mayoría de los estudios se realizaron con cultivos de hongos de la podredumbre blanca, por su reconocida habilidad de degradar completamente a este polímero. Los trabajos no son sencillos; se emplearon ligninas libres de otros compuestos carbonados, como madera molida, o ligninas sintéticas marcadas. En *Phanerochaete chrysosporium*, uno de los hongos mejor estudiados, se encontró que éste no podía crecer con lignina sola y requería un sustrato rápidamente metabolizable, como celulosa o glucosa. Incluso en la naturaleza, la presencia de celulosa estimula la actividad ligninolítica de este hongo en mayor grado que el succinato o glicerol. *P. chrysosporium* prefiere pH ácidos: 4,0-4,5, temperaturas óptimas relativamente altas, las fuentes de nitrógeno pueden ser amonio, nitratos o aminoácidos, pero altas concentraciones en medio de cultivo inhiben la degradación de la lignina y se requieren altas presiones parciales de O₂ (Ghosh y Singh, 1993).

La figura 7 (Keyser *et al.*, 1978) presenta las relaciones entre el crecimiento, el agotamiento en las fuentes de nitrógeno y la actividad ligninolítica de *P. chrysosporium*. El sistema ligninolítico de este hongo es: i) constitutivo, ii) se expresa sólo en el metabolismo secundario, iii) afectado por limitaciones en carbono, sulfato y nitrógeno, iv) es marcadamente afectado por la concentración de oxígeno. Si bien el crecimiento no es afectado por el nivel de O₂, la degradación de la lignina fue 2-3 veces superior a 100% de O₂ que en el aire (21%), lo que corrobora la creencia de que la degradación es un proceso oxidativo.

Figura 7- Agotamiento de nutrientes, crecimiento y degradación de la lignina por el hongo *Phanerochaete chrysosporium*



Como se observa, la lignina es descompuesta en la fase estacionaria (crecimiento nulo), en presencia de un co-sustrato, pero en ausencia de fuentes de nitrógeno (la adición de amonio retarda la aparición de la actividad ligninolítica).

El agotamiento de las fuentes de nitrógeno inicia un segundo metabolismo en el hongo asociado a la degradación de la lignina. Se entiende por metabolismo primario el que está directamente acoplado a actividades del crecimiento, mientras que los denominados secundarios (cometabolismo) están asociados a la sobrevivencia. Zeikus (1981) ejemplifica muy bien el rol de la actividad ligninolítica con una expresión que dice: los hongos degradan lignina para alimentarse de la celulosa de la madera.

Se piensa que la degradación de la lignina brinda energía al microorganismo en muy bajo nivel, suficiente para sobrevivir, pero no para crecer. Esto explica la ausencia de un mecanismo enzimático específico para la despolimerización de la lignina. Se piensa que también intervienen procesos degradativos de naturaleza química. El nivel de enzimas que participan es bajo y algunos autores comparan el proceso con una erosión del polímero mediatizada por enzimas:

oxigenasas, que rompen anillos aromáticos, fenol oxidasas, incluyendo lacasas, tirosinasas y peroxidasas. La formación de radicales libres por acción de fenol oxidasas pueden ocasionar ruptura de enlaces entre anillos aromáticos y la cadena lateral con propano.

celobiosa-quinona oxidoreductasa, activa en la degradación de celulosa y lignina por hongos de la podredumbre blanca.

No se conoce bien la naturaleza de las enzimas que son activas en los enlaces C-C y C=O, que contribuyen a la despolimerización.

Como resumen analizaremos la figura 8 donde se muestra las relaciones del complejo lignocelulosa en el ciclo del carbono. En efecto, la mayoría del carbono orgánico de la tierra está en forma de compuestos lignocelulósicos, sintetizados a partir del CO₂ y en productos de su degradación (humus, turba, lignitos y carbón), lentamente mineralizada en la naturaleza ya que la lignina, comparada a un material plástico, aunque de naturaleza biológica, actúa como efectiva barrera que impide la degradación de los otros componentes.

En ambientes aeróbicos, el polímero de lignina es erosionado biológicamente por enzimas microbianas no específicas a productos más simples y CO₂ o sufre una complexación con otros constituyentes para formar humus.

En ambientes anaeróbicos, la lignina y el humus son productos difíciles de degradar (recalcitrantes), se acumulan y contribuyen a la formación de turbas, lignitos y carbón. La madera, producto de la fotosíntesis en bosques, posee tiempos de renovación tan largos como 35-45 años, ya que contiene un 25% en peso de lignina, que limita su biodegradación.

Los taninos

Son compuestos muy abundantes en ciertas plantas, sobre todo en las coníferas. Son moléculas de gran tamaño con múltiples funciones fenoles que les permiten formar complejos estables con proteínas, celulosa, etcétera.

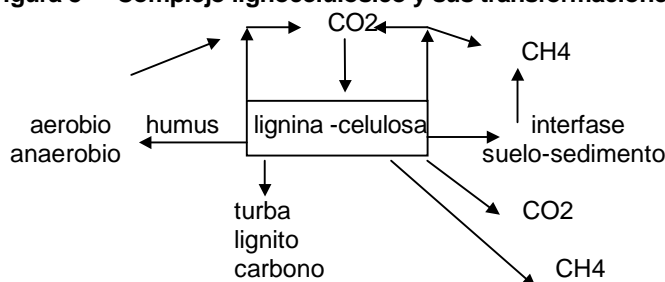
Los taninos pueden ser:

solubles en agua que poseen molécula glucídica con funciones alcohólicas esterificadas por ácido gálico o sus derivados; son hidrolizables química o enzimáticamente por tanasas

condensados: son moléculas de alto peso molecular

insolubles en agua, algunos resisten la hidrólisis ácida y recuerdan a los flavonoides que se polimerizan para dar pigmentos pardos

Figura 8- Complejo lignocelulósico y sus transformaciones



Un alto nivel de taninos en el suelo puede disminuir la degradación de moléculas orgánicas, sea por toxicidad directa sobre la microflora activa o por la inactivación de enzimas o formación de complejos resistentes con el sustrato.

Su degradación es obra sobre todo de los hongos y los mecanismos enzimáticos no han sido del todo dilucidados.

Constituyentes hidrófobos

Numerosas sustancias de carácter lipídico llegan al suelo con los restos vegetales y animales: ceras, grasas, cutina. En su conjunto se extraen con mezclas de alcohol-benceno, representan un escaso porcentaje de la materia seca de vegetales (1-2%) pero son más abundantes en ciertos microorganismos (10%).

Las grasas son ésteres complejos de ácidos grasos y glicerol, mientras que las ceras constituyen ésteres con alcoholes superiores. Aparecen rápidamente en el suelo los ácidos y alcoholes por acción de esterasas (lipasas) de una variedad de microorganismos, sobre todo bacterias. Los productos de la degradación son empleados como fuentes de nutrientes y energía por los microorganismos, pero muchos de los ácidos grasos son incorporados como lípidos de reserva (ácido poli beta-OH-butírico).

Más información se posee en la degradación de los lípidos de la superficie vegetal, como **la cutina**, que es secretada a partir de células epidérmicas oxidándose por el O₂ atmosférico. Puede recubrirse con ceras. También puede formarse sobre la lámina media péctica o estar mezclada con la celulosa, protegiendo a esas sustancias de la biodegradación.

La composición química de la cutina no se conoce acertadamente, se sabe que la molécula contiene 16-18 ácidos grasos unidos por enlaces éster y puentes de O.

Se reconocen dos enzimas: la cutin-esterasa que ataca los ésteres y la carboxicutina peroxidasa, que rompe los puentes de oxígeno. Levaduras y hongos son activos degradadores en la filosfera, pero bacterias, incluidos los actinomicetes también participan.

Los hidrocarburos

La síntesis de sustancias hidrocarbonadas y su degradación en el suelo son etapas importantes del ciclo del carbono. Muchos pesticidas están formados por hidrocarburos modificados y de su biodegradación depende la duración de su acción biocida. Detergentes sintéticos poseen también esta estructura molecular.

La formación de metano (CH₄) en los suelos es frecuente en la descomposición anaerobia de rastrojos en donde se produce abundante cantidad de H₂ empleado por las metanobacterias como fuente de energía: $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$

Los ácidos orgánicos simples acumulados en estos ambientes anaeróbicos son empleados también por las metanobacterias (capítulo 18). La biosíntesis de metano está limitada a un grupo especializado de bacterias anaerobias que habitan suelos inundados, pantanos, abonos en fermentación, sedimentos marinos y tracto intestinal de animales superiores. Son difíciles de aislar en cultivo puro y la producción de CH₄ es muy activa en poblaciones mixtas. *Methanobacterium*, *Methanosarcina* y *Methanococcus*, son los principales géneros encontrados en el suelo y actúan al final de una cadena trófica.

Otro hidrocarburo simple liberado por el suelo es el etileno, liberado por numerosas especies de hongos, bacterias esporuladas y actinomicetes. Produce elongación de raíces y desarrollo de raíces laterales.

Otros hidrocarburos volátiles: etano, propano, propileno, son formados en atmósferas anaerobias, a partir de miembros de la microflora del suelo. Los de mayor importancia son el metano y el etileno.

Hidrocarburos de alto peso molecular

Son formados por bacterias, algas y esporas fúngicas, o llegan a los ecosistemas naturales con el petróleo, parafinas y sus derivados. Los solventes de muchos pesticidas tienen estructura de hidrocarburos y llegan al suelo o aguas donde deben ser degradados.

Los compuestos de cadena alifática son atacados por una variada micropoblación muy extendida en los suelos: densidades de 10^5 /g suelo son referidas por Alexander (1977) cuando se emplea parafina como sustrato. La velocidad de la degradación está relacionada con la longitud de la cadena y al grado de ramificación de la molécula. Muchos microorganismos degradan hidrocarburos alifáticos pero no los pueden usar como fuentes de carbono. Este fenómeno conocido como cometabolismo implica que las células deben metabolizar una segunda fuente orgánica. Los productos de la descomposición del hidrocarburo, al no ser asimilados, quedan en el medio: alcoholes, aldehídos, ácidos grasos. El ácido acético se origina desde un extremo de la cadena por beta-oxidación. Pueden acumularse también cetonas.

Los hidrocarburos aromáticos: benceno, tolueno, xileno y sus derivados son atacados por numerosos microorganismos del suelo. La ausencia de toxicidad en un ambiente dado indica que los organismos heterótrofos están actuando como agentes desintoxicantes. La evolución del CO_2 o la consumición del O_2 verifican estos hechos en ensayos de laboratorio.

Una microflora más especializada descompone moléculas como fenol, naftaleno, antraceno, con 1, 2 y 3 anillos bencénicos. Son sobre todo bacterias típicas y actinomicetes. Los organismos filamentosos son importantes en la degradación de constituyentes aromáticos derivados del humus. El O_2 es fundamental en los procesos de apertura del anillo.

Las primeras etapas del metabolismo comprenden la remoción de cadenas laterales y la introducción de grupos $-\text{OH}$. Los grupos metilo se convierten en carboxilo antes de la apertura del anillo.

Resumiendo: La degradación de la materia orgánica (MO) es un proceso muy complejo y se han propuesto modelos matemáticos para estudiar su dinámica. Así, Jenkinson y Rayner (1977) separaron la MO en varios componentes en función de su estabilidad química y determinaron la vida media (tiempo para reducción a la mitad) de cada fracción:

- a. material vegetal descomponible, vida media 0,16 años
- b. biomasa microbiana, vida media 1,69 años
- c. material vegetal resistente, vida media 2,31 años
- d. MO estabilizada físicamente, vida media 49-50 años
- e. MO estabilizada químicamente, vida media 1980 años
- f. humus en suelos alofánicos, vida media 2-5000 años.

El cuadro 7 (Burns 1983) resume la acción microbiana en la degradación de diferentes fracciones de la materia orgánica.

Humus

La materia orgánica fresca desaparece rápidamente en ambientes naturales. El siguiente esquema muestra las posibles vías metabólicas en el suelo (figura 9).

El humus está constituido por mezcla de sustancias amorfas, que es originado de la fitomasa parcialmente descompuesta y de la síntesis microbiana. Son moléculas elásticas, de carácter ácido, de alto peso molecular y naturaleza coloidal, de gran superficie interna y externa, originadas por la acción de procesos físico-químicos y biológicos a expensas de productos de la degradación de la materia orgánica.

Su lenta mineralización (1-2% al año) hace de estas sustancias el verdadero reservorio de nutrientes del suelo, liberándose lentamente los iones minerales aprovechables por los vegetales.

El contenido y calidad de estas sustancias está en relación directa con la fertilidad del suelo por sus propiedades (cuadro 8) y es inclusive empleado en formulaciones comerciales de los llamados "bioestimulantes orgánicos".

Caracterización de las sustancias húmicas

La naturaleza de estas sustancias varía con los suelos, el clima, la cubierta vegetal, las prácticas agrícolas. La extracción del humus sin provocar alteraciones resulta muy difícil. Algunos autores emplean solventes de alta densidad (bromoformo-benceno de densidad 2) para separar la materia orgánica poco transformada y más liviana, del humus y la fracción mineral, que decantan. Los compuestos húmicos se extraen con soluciones alcalinas, aunque se corre el riesgo de extraer también el humus libre que puede condensarse (neoformación). Otros solventes empleados incluyen oxalato de amonio, FNa , pirofosfato de sodio.

Cuadro 7- Principales componentes de la fracción orgánica del suelo, las enzimas responsables y los productos formados

Componentes	enzimas	productos
Celulosa Hemicelulosa	celulasa, glucosidasas hemicelulasas	ác. Orgánicos, azúcares ácidos urónicos
Pectina	pectinmetilesterasa galactouronasa	ác. péctico, etanol ác. Galactourónico, glucosa, arabinosa
Almidón Quitina	amilasas, glucosidasas quitinasa, quitinobiasa	glucosa, maltosa glucosamina, ácido. Acético glucosa, NH ₃
ác.nucleicos	nucleasas, nucleosidasas nucleotidasas, aminohidrolasa	bases nitrogenadas, PO ₄ ⁻³
Proteínas y péptidos	proteinasas, peptidasas, deshidrogenasas y oxidasas	aminoácidos, ácidos orgánicos, NH ₃
Ésteres fosfatados	fosfatasas, fitasas	alcohol, inositol, HPO ₄ ⁻²
Ésteres sulfatados	arilsulfatasa	alcohol, SO ₄ ⁼
Lignina	lacasa, peroxidasa fenoloxidasas	ácidos aromáticos, compuestos fenólicos

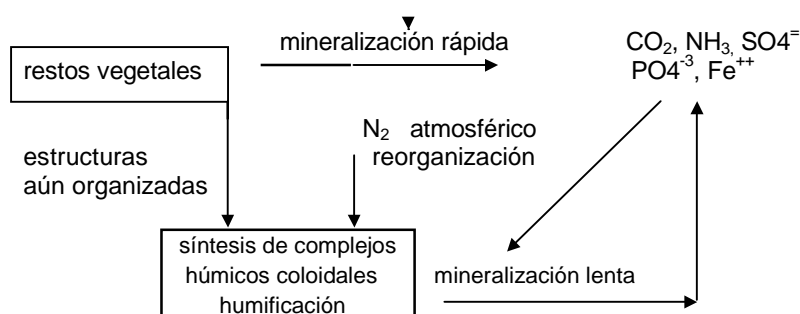
Por hidrólisis ácida se liberan aminoácidos, azúcares, aminoazúcares y una fracción permanece no hidrolizable, con núcleos parecidos a los de la lignina, sólo degradados por tratamientos muy drásticos como pirólisis ácida o alcalina, fusión alcalina, H₂O₂ en caliente, etc.

Los análisis elementales indican en promedio:

45-65% en carbono, 30-40% en oxígeno, gran abundancia de grupos metoxilo (-OCH₃), fenoles (-OH), carboxilo (-COOH), poco nitrógeno (para algunos autores se trataría de impurezas) y S, P, Fe, etc.

Esta composición elemental se parece a la de la turba, pero el origen y la actividad difieren mucho.

Figura 9- Degradación y humificación de restos vegetales



Cuadro 8 - Principales efectos del humus en el suelo y las plantas

mejora condiciones físicas, como agregación, aireación, retención de agua, intercambio calórico y permeabilidad del suelo
aumenta la superficie específica, la CIC o el efecto tampón
actúa como agente de complexación, quelación y retención de nutrientes y xenobióticos
ejerce efectos fisiológicos, como aumento en la permeabilidad de membranas, absorción de nutrientes, actividad enzimática y fotosíntesis
ejerce acción protectora y actúa como fuente de nutrientes para los microorganismos
actúa como reservorio de N, P, S, micronutrientes

Se distinguen varias fracciones:

los ácidos fúlvicos que quedan dispersos o disueltos luego de acidificar el extracto alcalino con HCl o H₂SO₄

los ácidos húmicos, extraíbles en álcali pero que precipitan a pH 2,5 y dan una fracción soluble en etanol

los ácidos himatomelánicos

Los ácidos húmicos pardos están poco polimerizados y débilmente ligados a la fracción mineral, los ácidos húmicos grises son muy polimerizados y están ligados a los himatomelánicos

- la humina residuo insoluble en ácidos y bases, materia orgánica muy evolucionada y difícil de separar de la materia orgánica fresca: una fracción es soluble en HCl 5N; el resto se une a arcillas, por lo que se requiere el empleo de HF para su extracción

En las sustancias húmicas más condensadas predominarían los núcleos, con iso o heterociclos, como derivados del benceno, antraceno, furano, piridina, que pueden condensarse por puentes alifáticos, oxígeno, nitrógeno o por unión directa entre anillos. Estos enlaces le dan a la molécula gran estabilidad química y biológica.

El nitrógeno: -de las cadenas laterales representa un 30-35% del total, es fácilmente hidrolizable y es de origen proteico, el resto de N del humus estaría condensado como pirrol, indol, etc. o bien formaría puentes entre bencenos y es más resistente a la degradación.

Precusores del humus y proceso de humificación

Varias hipótesis tratan de explicar los procesos que conducen a la formación de estas macromoléculas:

Las sustancias rápidamente degradables como la celulosa, hidratos de carbono simples, juegan un importante rol en la formación del humus. Luego de 7 días en el suelo, un 70-75% del C¹⁴ de la glucosa se localizó en fracciones húmicas, mientras que el C¹⁴ de acetato se distribuyó luego de 6-9 horas en la humina, ácidos fúlvicos y húmicos, en forma similar al carbono de la paja.

La lignina se reconoce como precursora del humus que se condensa con materiales proteicos de origen microbiano. Su participación ha sido señalada en numerosos trabajos: un 34% de la radioactividad de los ácidos húmicos se originó en la lignina, mientras que sólo un 6% lo hizo a partir de la celulosa.

El carbono de células microbianas contribuye a la fracción más simple del humus, los aminoácidos.

La figura 10 presenta un esquema de formación de moléculas húmicas. En los últimos 50 años se han realizado numerosos estudios sobre la síntesis de la fracción orgánica del suelo. En el laboratorio una serie de reacciones condujeron a distintos tipos de humus artificial (Allison, 1973). Los microorganismos se consideran intermediarios en estos procesos; los restos de sus células y sus productos metabólicos constituyen etapas en una serie de reacciones. Los pigmentos microbianos como las melaninas son muy estables a la degradación, son parcialmente solubles en soda y se extraen en la fracción humus.

En el suelo los procesos son más lentos que en el laboratorio, pero las reacciones se aceleran por:

la gran actividad superficial de las partículas (catálisis inorgánica)

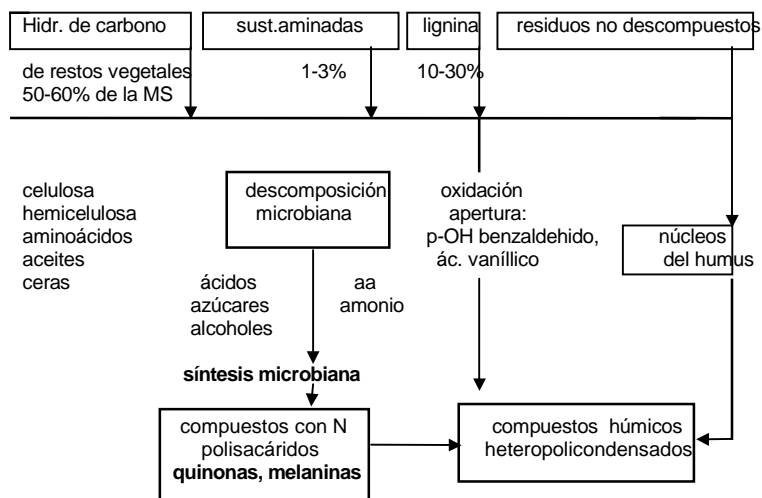
los sinergismos microbianos que posibilitan la formación de los mismos productos finales

La estabilidad del humus es muy grande. En turbas congeladas de Alaska se estimó la edad de estas moléculas entre 1.775 +/- 110 y 11.005 +/- 350 años (a 1 m de profundidad). A los 2 metros esta edad podría llegar a 25.300 +/- 300 años. En suelos templados esta edad es menor como consecuencia del mayor reciclamiento de la materia orgánica.

En resumen, se piensa que el humus es el producto de neosíntesis a partir de compuestos más o menos solubles originados en la descomposición de la materia orgánica fresca, mediante la combinación de procesos biológicos y físicoquímicos.

La adición de materia orgánica al suelo puede provocar estimulación de la descomposición de la materia orgánica nativa. Este fenómeno se refiere como efecto renovador (*priming effect*) y fue observado luego del enriquecimiento del suelo con materia orgánica simple o restos vegetales.

Figura 10- Esquema del proceso de humificación



Microbiología de la humificación

Los microorganismos participan en la formación de moléculas húmicas, catalizando distintas reacciones bioquímicas. Algunos autores discuten si su rol es directo o indirecto y una de las preguntas es cómo se concilia la rápida mineralización de las sustancias vegetales con su humificación.

Hipótesis:

se postula la humificación de los restos que quedan en microporos donde no llegan las bacterias, pero sí sus enzimas, aunque no se puede olvidar la adsorción que pueden sufrir las enzimas en su camino hacia el sustrato

las moléculas son rápidamente policondensadas o polimerizadas a partir de radicales

libres formados por la acción enzimática a altas concentraciones de sustancias monoméricas, cuando los organismos capaces de atacarlos están ausentes. Se puede seguir la humificación de hojas al microscopio

se sostiene que la humificación comienza en los restos inmediatamente luego de la muerte celular, cuando las enzimas autolíticas están activas, pero la destrucción aún no ha comenzado (condensación de aminoácidos de la hidrólisis proteica con quinonas y polifenoles).

Las sustancias pardas aparecen en las células antes que los tejidos lignificados presenten alteraciones visibles. Cuando las células se descomponen, estas sustancias se liberan al suelo, pudiendo adsorberse a arcillas y protegerse del ataque microbiano.

Rol de los microorganismos

Se señala la importancia de los microorganismos y de la fauna en los distintos procesos que conducen a la humificación (Kirk *et al*, 1980):

mineralización de materiales originales, formación de subunidades estructurales y su posterior condensación

Especies de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Actinomyces* en medios con azúcares acumulan sustancias oscuras del tipo del humus, con péptidos y polifenoles. Los tipos más maduros se formarían a partir de estas moléculas por acción microbiana y procesos químicos y físicoquímicos.

La condensación es estimulada por oxidasas producidas por microorganismos del suelo o aguas o del tracto digestivo de la fauna. La acumulación de pigmentos marrones oscuros es evidenciada en bacterias como *Pseudomonas* sp. en medio con extracto de levadura, glucosa y tirosina. Sustancias fenólicas y quinonas se transforman en polímeros tipo humus en las mismas células bacterianas por

acción de fenoloxidasas. El espectro IR de las mismas es similar a los de los ácidos húmicos sintéticos y se fraccionaron en ácidos húmicos y fúlvicos.

Tanto la biosíntesis como la biodegradación de moléculas del tipo de las del humus ocurren simultáneamente por acción de una variada micropoblación que pone en juego un complejo y no bien identificado equipo enzimático.

Factores que afectan a la humificación

Entre los principales factores que afectan el proceso citaremos: vegetación, actividad biológica del suelo, clima, tipos de suelos, actividad del hombre.

La vegetación aporta materias primas y es fuente de energía y nutrientes para los microorganismos. El cultivo afecta el microclima del suelo, la estructura por acción de las raíces y la atmósfera del suelo, por respiración de órganos subterráneos.

C/N de los restos

Relación C/N menor de 25/1 estimulan rápida mineralización, limitando el potencial de humificación

Relaciones altas conducen a acumulación de humus libre, la relación más favorable para la formación de humus estable parece ubicarse en la vecindad de 20/1 (los mantillos mejoradores, ricos en nitrógeno que se descomponen rápidamente)

Es necesario también tener en cuenta la relación entre los constituyentes lábiles y estables, así como que un predominio de compuestos solubles estimulan una rápida mineralización, y que altos contenidos de lignina facilitan la humificación.

Los abonos verdes, ricos en nitrógeno y constituyentes solubles y pobres en lignina, son rápidamente metabolizados, enriqueciendo poco en carbono al suelo y activando la mineralización de la materia orgánica nativa.

Los cultivos anuales enriquecen menos al suelo en carbono que los perennes. Un monocultivo de maíz posee menos poder de humificación al compararlo con gramíneas forrajeras.

Las pajas de cereales con alto contenido de lignina favorecen la humificación.

El clima influye en la productividad (cantidad y calidad del material vegetal) y directamente en la actividad biológica. La degradación del N del humus disminuye 2-3 veces por cada 10°C de disminución de la temperatura. En regiones frías aumenta considerablemente el nivel de humus. El congelamiento y descongelamiento disminuyen la estabilidad de las moléculas húmicas. Por el contrario, un congelamiento prolongado aumenta la estabilidad. La desecación favorece la polimerización de sustancias prehúmicas (maduración). Suelos permanentemente húmedos presentan formas poco condensadas y móviles (ácidos fúlvicos).

Suelos: el contenido y calidad de las arcillas facilita la humificación. Un pH alto favorece la actividad mineralizante y la humificación por bacterias. El calcio facilita la floculación y maduración de las moléculas prehúmicas.

La humedad más favorable para la humificación se sitúa en la vecindad del 60% de la capacidad de campo. La saturación no favorece al proceso; los suelos saturados son pobres en humus. Un insuficiente drenaje conduce a humus bruto o a turba.

Ocurrirá máxima humificación cuando los procesos aerobios y anaerobios estén correctamente balanceados. Si la anaerobiosis es permanente, la humificación es prácticamente nula. El proceso parece tener el óptimo en microaerofilia o en condiciones de alternancia de períodos de aerobiosis y anaerobiosis.

Actividad del hombre: el laboreo disminuye el nivel de materia orgánica al romper los agregados y exponer la materia orgánica a la biodegradación, pero el efecto de mezclado favorece la calidad.

Alternancias de cultivo y barbecho favorecen la humificación. Los suelos cultivados presentan un humus más evolucionado, pero menos abundante, que puede descender por debajo de niveles críticos.

Enterrar restos vegetales activa su mineralización y una aplicación más profunda favorece la humificación (condiciones micraerófilas).

Deshumificación

Se encuentran gran número de dificultades en la investigación de biodegradación del humus: los microorganismos pueden crecer con ácidos húmicos pero emplean solamente los compuestos asociados, como los aminoácidos, dejando la estructura aromática intacta, hecho que sumado a la falta

de datos sobre la estructura exacta de la molécula (si es que tienen una estructura básica común), toman las comparaciones muy difíciles.

Además, las zonas claras alrededor de las colonias desarrolladas en medios con ácidos húmicos no indican necesariamente la degradación de los mismos; muchas veces, ellos son precipitados alrededor de las células.

A pesar de estos inconvenientes parece correcto afirmar que ciertos hongos, sobre todo *Ascomycetes* y *Basidiomycetes*, pueden degradar ácidos húmicos en el laboratorio por reducción enzimática de grupos aromáticos carboxilo a aldehído y luego hasta alcoholes. Los sistemas enzimáticos son adaptativos. En filtrados de cultivos de hongos creciendo sobre ácidos húmicos se detectaron alcohol salicílico y salicilaldehído.

Las técnicas respirométricas son muy útiles en el estudio de la mineralización del humus.

Se cuenta con poca información sobre la descomposición de los ácidos húmicos en la naturaleza. Intervienen poblaciones complejas con especies que atacan sustancias aromáticas, reuniendo en su conjunto al equipo enzimático necesario para degradar a las sustancias húmicas.

Las bacterias son activas sobre todo atacando las cadenas laterales alifáticas. Los actinomicetes pueden además degradar moléculas aromáticas provocando decoloración del medio.

Los hongos son activos degradadores de moléculas húmicas. Entre los productos de la degradación de los ácidos húmicos se han detectado residuos de la degradación de la lignina bastante incambiables, como ácidos vanílico y siríngico. En suelo donde la lignina está ausente, caso de suelos antárticos cubiertos de helechos, no se encontraron estos productos. Otras sustancias que aparecen en la degradación, como flavonoides, pueden derivar de síntesis microbiana o de la vegetación.

Ecología

Carbono: fuentes de carbono fácilmente degradables (0,5-2%) estimulan el crecimiento microbiano favoreciendo la degradación del humus en el laboratorio. Para otras especies la celulosa es más eficiente. El efecto sobre la humificación es el mismo que analizamos en la degradación de otros biopolímeros: el aumento microbiano provoca agotamiento de nutrientes y la población induce el equipo enzimático para degradar moléculas más complejas.

Nitrógeno: el de las cadenas laterales es asimilado por los microorganismos aunque en menor grado que las formas inorgánicas u orgánicas simples del suelo. Otras fuentes nitrogenadas ejercen efecto variable según las especies.

Calcio: los humatos cálcicos son más fácilmente degradados *in vitro* que los de sodio (efecto también favorable para la actividad enzimática).

Arcillas: ejercen efecto protector: la oxidación de los ácidos húmicos es más lenta con illita y montmorillonita. El aluminio refuerza el efecto estableciendo enlaces más estrechos entre los coloides orgánicos y minerales.

La tasa anual de descomposición de la materia orgánica es del orden de 1,8% en suelos pesados y de 2,2% en livianos, en el Norte de Francia (Dommergues, Mangerot, 1970).

Resumen y conclusiones

Aumentar y/o mantener el nivel de materia orgánica de un suelo es un objetivo prioritario en todo manejo agrícola. La aplicación de abonos orgánicos (restos de cosechas, subproductos industriales) contribuye a evitar la pérdida de humus en suelos sometidos a intensa explotación.

Los principales factores a tener en cuenta para elevar el contenido de materia orgánica de los suelos son:

1. cantidad de materia orgánica aplicada
2. tipo de abono orgánico empleado,
3. duración de la experiencia.

Para finalizar y a modo de resumen se presentan las figuras 11 y 12 publicadas por Siquiera y Franco (1988).

Figura 11- Velocidad de degradación de restos orgánicos en el suelo.

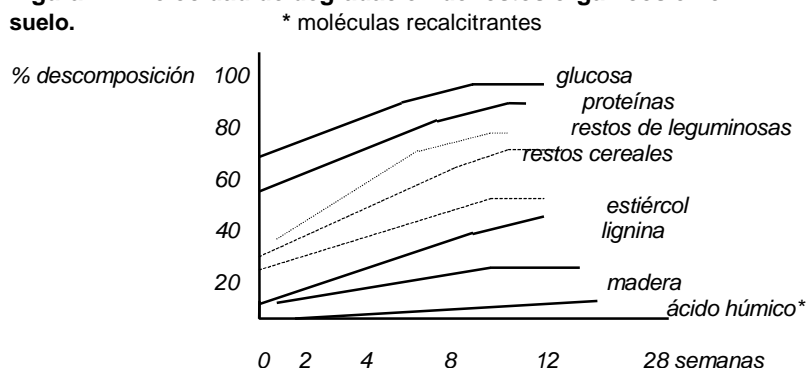
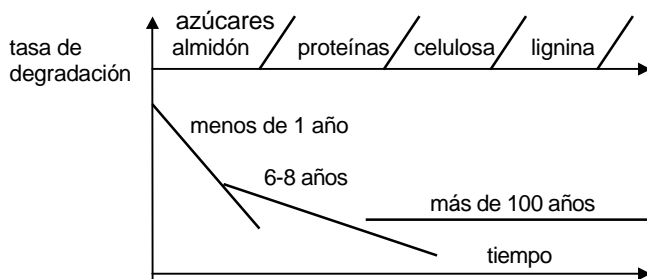


Figura 12- Cinética de la degradación de restos vegetales en el suelo



La figura 11 muestra las tasas de descomposición de diferentes materiales orgánicos en el suelo y en la figura 12 se esquematiza la cinética de esta degradación. Se verifica que la fracción activa del residuo, La figura 11 muestra las tasas de descomposición de representada principalmente por azúcares, proteínas, amidas y celulosa es descompuesta en menos de un año, en tanto que otras fracciones resisten la degradación.

Bibliografía

- ADLER, T., 1977, **Lignin chemistry-past present and future-**. Wood Sci. Technol., 11: 169-218.
- ALEXANDER, M. 1977 **Introduction to Soil Microbiology**, Wiley & Sons, New York
- ALLISON, F. E. 1973 The nature and composition of soil organic matter, en : **Soil organic Matter. Its role in crop production**, Elsevier, Amsterdam: 139-161
- BURNS, R. G. 1983 Extracellular enzyme-substrate interactions in soil, en: **Microbes in their Natural Environments**, Slater, J. H., Whittenbury & Wimpenny, J. W. T. (eds), Soc. for General Microbiology, Cambridge: 249-298
- DOMMERGUES, Y. y F. MANGENOT, 1970: Le cycle du carbone, en : **Ecologie microbienne du sol**, Ed. Masson et Cie., París: 92-154.
- FRIONI, L. 1990 **Ecología Microbiana del Suelo**, Depto. Publicaciones, Universidad de la República, Montevideo, 517 pp
- GHOSH, P. y A. SINGH 1993 Physicochemical and Biological Treatments for Enzymatic/Microbial Conversion of lignocellulosic Biomass, en : **Advances in Applied Microbiology**, vol 39, Academic Press, London: 295-333
- GROSS, G. G., 1977: Biosynthesis of lignin and related monomers, en: **The Structure, Biosynthesis and Degradation of Wood**, F. A. Loewus, V. C. Runeckles (eds.), Recent Adv. Phytochemistry, vol. II, Plenum Press, Nueva York, pp. 141-184.
- JENKINSON, D. S. y J. H. RAYNER, 1977 The turn over of soil organic matter in some of the Rothamsted classical experiments. Soil Science, Baltimore, 123: 298-305

KEYSER, P.; T. K. KIRK y J. G. ZEIKUS, 1978: Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium* synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation, J. Bacteriol.: 790-797.

KIRK, T. K.; T. HIGUCHI y H. M. CHANG, 1980, **Lignin Biodegradation: Microbiology**, Chemistry and Potential Applications, CRC Press, Boca Raton,

KUNK, F. 1974 Stimulatory effect of glucose on the microbial decomposition of native soil organic matter, Restlina Vyroba, 20 (XLVII): 853-860

MARTIN, J. P.; H. ZUNINO; P. PEIRANO; M. CAIOZZI y K. HAIDER, 1982, Decomposition of C14 labeled lignins, model humic acid polymers and fungal melanins in allophanic soils, Soil Biol. Biochem., 14: 289-293.

REDDY, C. A. 1984 Physiology of lignin degradation, en: **Microbial Ecology**, Klug, M. J. y C. A. Reddy (eds), Amer. Soc. for Microbiol, Washington: 558-571

SIQUEIRA, J. O. y A. A. FRANCO 1988 **Biotechnologia do Solo**, MEC-ESAL-FAEPE-ABEAS, Brasília, 235 pp

SIQUEIRA, J. O., F.M. de S. MOREIRA, B. M. GRISI 1994 **Microorganismos e Processos Biológicos do Solo**, EMBRAPA-SPI, Brasília, DF.

ZEIKUS, J. G., 1981: Lignin metabolism and the carbon cycle. Polymer biosynthesis, biodegradation and environmental recalcitrance, en: **Advances in Microbial Ecology**, M. Alexander (ed.), Plenum Publishing Corporation, Nueva York: 211-243.

Capítulo 9

Mineralización e inmovilización del nitrógeno

Biomasa microbiana

Perdidas de nitrógeno

Mineralización

La mineralización del nitrógeno es el proceso biológico que convierte formas orgánicas de este elemento a combinaciones minerales. Se distinguen dos procesos: **amonificación y nitrificación**. La amonificación es realizada por un gran número de microorganismos heterótrofos que atacan distintas moléculas orgánicas: urea, aminoácidos, proteínas, aminoazúcares, ácidos nucleicos, sustancias húmicas. La nitrificación es la producción biológica de nitritos o nitratos a partir de amonio o de combinaciones orgánicas.

Amonificación

Sustrato: es muy variado, cualquier tipo de molécula orgánica nitrogenada

Microflora: está integrada por innumerables especies de bacterias, incluidos los actinomicetes, hongos, protozoos, algas

Ambiente: como consecuencia de la falta de especificidad de sustratos, la amonificación es uno de los procesos menos sensibles a los cambios del ambiente y se realiza tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, bajo un rango de pH compatible con actividad biológica, en regiones frías, como en el rango termófilo.

Cmineralizado/Nmineralizado: en ecosistemas en equilibrio, la relación C-CO₂/N mineral es aproximadamente 10/1. Con aportes de sustancias orgánicas, esta relación se altera de acuerdo a la relación C/N de las mismas: una relación alta provocará más liberación de CO₂, si el N% de los restos vegetales es alto, la proporción de amonio y nitrato será mayor.

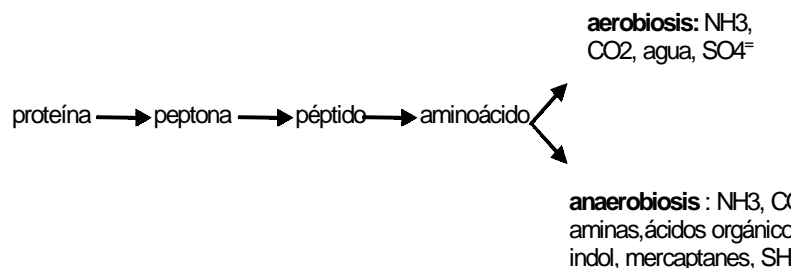
Amonio: se considera un producto de **desecho** celular. Una vez satisfecha la demanda microbiológica por el nitrógeno, el resto metabolizado es eliminado como NH₃.

Energía: la desaminación no provee de energía al microorganismo, pero la misma puede obtenerse del catabolismo del esqueleto carbonado de la molécula: proteína, ácidos húmicos, etc.

Evaluación: La evolución del amonio en suelos y aguas, enriquecidos o no con sustancias orgánicas nitrogenadas se determina en el campo o en el laboratorio. Como el amonio puede seguir distintas vías en la naturaleza lo que evaluamos es la **amonificación neta**, o sea la diferencia entre el amonio producido y el que siguió otras vías en el suelo. El empleo de compuestos con N¹⁵ permite evaluar **amonificación real**.

Amonificación de aminoácidos y proteínas

Las proteínas constituyen un buen sustrato para la microflora, a la que brindan la mayoría de los elementos para la síntesis de macromoléculas: C, H, O, N, S. Son atacadas por enzimas extracelulares según el siguiente esquema:

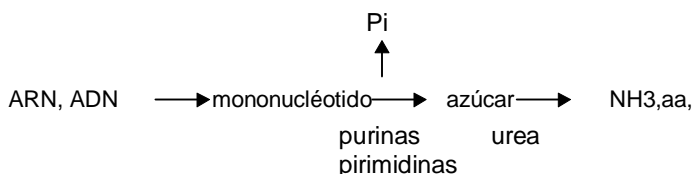


Los **aminoácidos** son degradados rápidamente en suelos y aguas. Se encuentran libres en pequeña proporción, producto de la actividad microbiana sobre proteínas, o son excretados por las raíces. La

actividad es mayor en capas superficiales, en las más profundas la adsorción a coloides puede ser importante y la nitrificación menor.

Amonificación de ácidos nucleicos

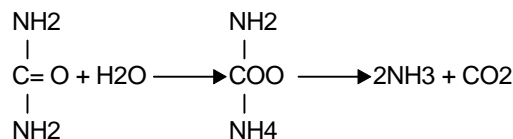
Numerosos microorganismos del suelo poseen enzimas extracelulares capaces de degradar ácidos nucleicos, ADNasa y ARNasa, provenientes de células vegetales, animales y microbianas con liberación de los mononucleótidos, que son fácilmente atacadas por la microflora.



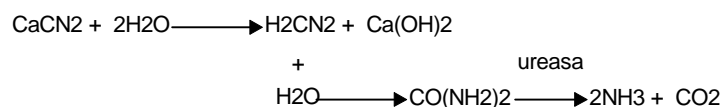
Se liberan fosfatos por acción de fosfatasa vegetales o microbianas. Las bases púricas o pirimidicas y el azúcar resultante son empleados por una variada microflora apareciendo en el medio amonio, aminoácidos, ácidos orgánicos, urea, dependiendo de las condiciones y de los organismos dominantes. Ácidos orgánicos y alcoholes acompañan a aminas, amidas, CO₂ y agua, en anaerobiosis.

Otros sustratos: urea, cianamida y fertilizantes de amonificación progresiva

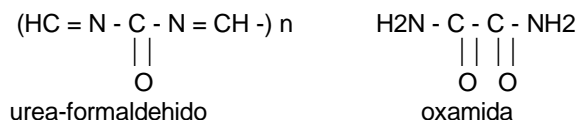
La urea se encuentra frecuentemente en los ecosistemas naturales (fertilizantes, excreciones de animales o de la hidrólisis de los ácidos nucleicos). Su degradación es muy rápida y la microflora ureolítica es muy numerosa: comprende aerobios y anaerobios facultativos, cocos y bacilos que soportan pH elevados resultantes de la liberación de amoníaco:



La cianamida cálcica es otro fertilizante empleado comúnmente. Por hidrólisis no biológica se forma urea, la que es mineralizada por la población ureolítica:



A los efectos de retardar esta hidrólisis y permitir que los cultivos dispongan del nitrógeno a medida que lo requieren, se emplean complejos a base de urea, como la urea-formaldehído y la oxamida:



La aplicación de estos fertilizantes, así como el empleo de inhibidores de la nitrificación, posibilitan la toma gradual de amonio por los cultivos, evitando su rápida oxidación a nitratos, muy móviles en suelos donde el régimen hídrico es intenso. El amonio es adsorbido en forma intercambiable en el complejo coloidal del suelo, disminuyendo su lixiviación y resultan fertilizantes más seguros que los nítricos.

Ecología

Como hemos visto este es un proceso muy poco específico, realizado por gran número de microorganismos heterótrofos adaptados a las más variadas condiciones ecológicas.

La amonificación ocurre en todas aquellas condiciones compatibles con la vida.

Temperatura: como con todas las reacciones biológicas, una elevación de temperatura estimula el proceso. El óptimo del amplio grupo de amonificantes se ubica en el rango **termófilo**.

pH: puede llevarse a cabo desde pH muy bajos (3,5-4,0) a superiores a 9,0. Una fuerte acidez retarda el proceso y son sobre todo las bacterias anaerobias y los hongos los activos en esas condiciones. A pH superiores dominan los actinomicetes y algunas algas que pueden emplear fuentes de nitrógeno orgánicas.

Cultivos vegetales: ejercen un doble efecto, por un lado proveen restos orgánicos nitrogenados por descamación de raíces, exudados, percolados a través de las hojas y follaje, estimulan la amonificación real o bruta, pero también absorbe a los iones amonio: la amonificación neta se ve así inhibida.

En resumen: la actividad sería máxima en aerobiosis, temperaturas en el rango termófilo, neutrofilia y humedades medias.

Estabilidad de compuestos nitrogenados orgánicos

Numerosos investigadores han remarcado la estabilidad de la fracción nitrogenada orgánica del suelo. En efecto, en una estación de crecimiento se mineraliza entre 1 y 5% del N total; pero al agregar al suelo una proteína, aminoazúcar u otras formas de nitrógeno orgánico, éstas desaparecen muy rápidamente. Diversas hipótesis tratan de explicar esta estabilidad y han sido analizadas por Dommergues, Mangenot (1970).

- **Formación de complejos entre proteínas y fracciones orgánicas** del suelo, como lignina, compuestos fenólicos o sustancias del tipo del humus.
- **Complexación con minerales arcillosos:** la adsorción externa al complejo de intercambio del suelo (más firmemente si en la proteína dominan las cargas electropositivas) o la inclusión dentro de las hojuelas, posibilitan un retardo en la biodegradación. Esta hipótesis explica también la inhibición de enzimas extracelulares.
- **Toxicidad del ambiente:** la vegetación o el metabolismo microbiano producen sustancias inhibitoras cuya concentración aumenta con la concentración hidrogeniónica del medio y la anaerobiosis: cumarinas, taninos, resinas, contribuyen a estabilizar la materia orgánica en suelos forestales.

La liberación se realiza gradualmente a medida que la vegetación las requiere, evitando pérdidas importantes por lavado o desnitrificación. Pero en algunos ecosistemas este bloqueo puede ser negativo para la nutrición de las plantas, como ocurre en horizontes superficiales (A_0) de formaciones forestales.

Nitrificación

La nitrificación se define como la reacción o conjunto de reacciones que conducen a la formación de nitrito o nitrato.

Representa la conversión biológica del nitrógeno en compuestos orgánicos o inorgánicos desde un estado reducido a otro más oxidado, por microflora auto y heterótrofa.

Es un proceso biológico conocido desde hace mucho tiempo que se realiza en el suelo, en ambientes marinos, abonos, y en los procesos de depuración de aguas servidas. Ya en la época napoleónica se producía el nitrato de Chile en pilas de suelo, con abonos orgánicos y carbonato de calcio. Pasteur postuló la naturaleza microbiana del proceso y hacia 1890 Winogradsky aisló a los microorganismos responsables. Confirmó la naturaleza biológica calentando una columna de suelo o tratándola con cloroformo: el proceso cesaba y los nitratos volvían a formarse al reinocular este sistema con suspensión de suelo fértil.

Efectos sobre:

- **cultivos:** constituye un proceso fundamental para la nutrición vegetal, los nitratos son fácilmente absorbidos, en menor grado el amonio y los nitritos resultan tóxicos.
- **ambiente:** una intensa nitrificación resulta muchas veces perjudicial para la población. Los iones nitrito y nitrato son solubles y por lo tanto móviles con el agua que puede llevarlos lejos de la zona de absorción radical. El amonio, al ser fijado en el complejo de intercambio, resulta menos móvil. La polución de las aguas por los nitratos resulta un problema en los países que emplean grandes dosis de fertilizantes.

Los nitratos se reducen a nitritos en la sangre, uniéndose a la hemoglobina que se convierte en metahemoglobina que no funciona en la transferencia del O_2 , enfermedad conocida como

metahemoglobinemia. Los estándares para consumo humano son inferiores a 10 mg/L de N-NO₃⁻ para el agua potable.

Nitrificación autótrofa

La nitrificación autótrofa puede dividirse en dos pasos, cada uno realizado por un grupo particular de organismos:

Nitritación: $\text{NH}_4^+ + 1,5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$ $\Delta G = 84 \text{ cal/mol}$

Nitratación: $\text{NO}_2^- + 0,5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$ $\Delta G = 17,8 \text{ cal/mol}$

Son procesos metabólicos generadores de energía (ATP): **respiraciones aerobias con sustratos inorgánicos** (amonio y/o nitrito). Los microorganismos son **quimioautótrofos** que aprovechan la energía y las coenzimas reducidas en la cadena respiratoria para sus necesidades plásticas, sobre todo para reducir el CO₂ a material celular.

Por los rendimientos energéticos se aprecia que más de cuatro veces de concentración celular se pueden originar de la oxidación de una cantidad equivalente de N oxidado por el grupo I. Esto se verificó en columnas de suelo percoladas con amonio. En la naturaleza, en general, las densidades para ambos grupos no difieren tanto.

Nitrificantes autótrofos

Bacterias muy relacionadas pertenecientes a la familia *Nitrobacteriaceae*, gram negativas, asporógenas, bacilos, cocos o espirilos, en general móviles por flagelos polares. **Autótrofos obligados**, muchos compuestos orgánicos les resultan tóxicos, por alteraciones producidas en la esterilización en autoclave

Carbono: del CO₂, bicarbonatos y carbonatos

Energía: de la oxidación de sales amoniacales o nitrosas El cuadro 1 (Focht y Verstraete, 1977) resume las características de los 4 géneros de bacterias oxidantes de amonio y de los 3 oxidantes del nitrito.

Especies más representativas: son *Nitrosomonas europea* y *Nitrobacter winogradsky*. Los nitrificantes autotróficos secundarios, es decir, el resto de los que figuran en el cuadro 1 aparecen en general en bajo número y presentan rangos más estrechos de temperatura y pH para su desarrollo. Otra importante diferencia la constituye la habilidad para crecer heterotróficamente de algunas especies del segundo grupo. *Nitrobacter agilis* puede crecer heterotróficamente y es estimulado por extracto de levadura. *Nitrobacter winogradsky* posee mayor potencial para crecer heterotróficamente que *Nitrococcus* y *Nitrospina*. Piruvato y aminoácidos estimulan el crecimiento de *Nitrosomonas europea*.

Velocidad de crecimiento: comparada con la de la mayoría de las bacterias heterotróficas, la v_c de las bacterias nitrificantes es baja. Tiempos de generación de 8 horas han sido informados en medio de cultivo. Se piensa que en la naturaleza se sobrepasan las 20-40 horas. El desarrollo en medio de cultivo se acelera con sales de bicarbonato solubles o de álcali para contrarrestar la caída del pH. El rendimiento celular es también bajo (0,15 kg biomasa/kg N-NH₄⁺ oxidado para la nitritación y de 0,02kg de biomasa/kg N-NO₂⁻ oxidado para la nitratación).

Eficiencias bioquímicas (N inorgánico oxidado/C-CO₂ asimilado) de 14-70/1 para *Nitrosomonas* y de 76-135/1 para *Nitrobacter* (gran capacidad sintética, la mayoría no requieren factores de crecimiento). Como vimos, los oxidantes del amonio obtienen más energía de la reacción y deben metabolizar menos nitrógeno por unidad de carbono asimilado.

Aislamiento: resulta difícil y la presencia de contaminantes muy relacionados morfológicamente es frecuente: *Pseudomonas*, *Hyphomicrobium*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*. El crecimiento lento dificulta la eliminación de estos contaminantes. El aislamiento puede ser:

Directo: en sílico-gel nutritivo con solución salina, sales de amonio o nitritos, carbonato de calcio. Las microcolonias se detectan por el halo transparente por disolución del carbonato por los ácidos producidos

Cuadro 1 Bacterias nitrificantes autotrofas

género	morfología	G+C%	crecimiento	habitat
oxidantes del amonio				
Nitrosomonas	bacilos rectos, 1-2 flagelos subpolares o inmóviles	47,4-51	5-40°C pH 5,8-9,5	aguas frescas suelo, mar
Nitrospira	espirales, flagelos peritricos o inmóviles	54,1	25-30°C	suelo
Nitrosococcus	cocos en pares o tétradeas, móviles con un flagelo o peritricos o inmóviles	55,5-51	2-30°C pH 6,0-8,0	suelo, mar agua fresca
Nitrosolobus	pleomórficos, membranas internas, flagelos peritricos	53,6-55,1	15-30°C pH 6,0-8,2	suelo
oxidantes del nitrito				
Nitrobacter	bacilos cortos, móviles con flagelo polar o inmóvil	60,7-61,7	5-40°C pH 5,7-10,2	suelo, mar aguas frescas
Nitrospira	bacilos largos, inmóviles	57,7	20-30°C	mar
Nitrococcus	cocos con citomembranas muy ramificadas	57,7	20-30°C pH 7-8	mar

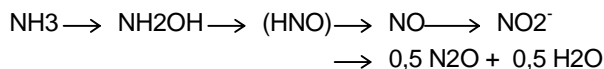
Por **enriquecimiento** previo en el mismo medio selectivo líquido y varios pasajes a medio fresco, facilita el aislamiento en medio sólido (**Anexo Práctico**). La actividad es estimulada por burbujeo o agitación de los cultivos líquidos ya que son aerobios estrictos. El pH óptimo es ligeramente alcalino, pero pueden tolerar rangos más amplios de pH en el suelo. Son mesófilos, la temperatura óptima se sitúa entre los 24 a 30°C.

Mecanismo de la nitrificación autótrofa

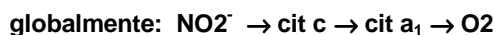
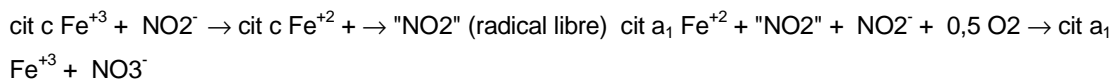
La oxidación del amonio a nitrato implica la transferencia de 8 electrones (-3 a +5). La conversión de amonio a nitrito ocurre en por lo menos dos pasos:



Como se observa, la disminución de la energía libre en la oxidación del amonio es pequeña comparada con la de oxidación de la hidroxilamina. El proceso se estudió en células intactas y en extractos libres de células. Se aisló una oxidasa de la hidroxilamina relacionada al **citocromo c**. Se sugiere que la hidroxilamina es convertida en un intermediario que se descompone espontáneamente en óxido nitroso, no oxidado por *N. europaea*:



En la nitratación participa una nitrito oxidasa, inhibida por cianuro e involucra el sistema citocromos:



El poder reductor (NADH) se genera en estas bacterias por transporte de electrones en sentido inverso en la cadena respiratoria, con consumo de ATP ya que el potencial redox de los pares amonio-nitrito y nitrito-nitrato no son suficientemente negativos para reducir el NAD^+ .

Nitrificación heterótrofa

Nitrificantes heterótrofos: grupo menos especializado lo que requieren medios con sustratos orgánicos con amonio o nitritos y pueden acumular nitritos o nitratos cuando el crecimiento cesó. Los organismos son bacterias y actinomicetes, y hongos. *Aspergillus flavus* es reconocido en la oxidación

del amonio hasta nitrato, a partir de nitropropionato con un equipo enzimático especializado, con nitrito intermediario:

peroxidasa

3 nitropropionato \longrightarrow NO₂⁻

Energía: su principal fuente proviene de sustratos orgánicos pero la energía liberada es escasa y no satisface los requerimientos plásticos de los microorganismos (no está acoplada a procesos de biosíntesis)

Sustratos: pueden ser **amonio, nitrofenoles, oximas, amidas, hidroxilamina, nitropropionato**. Algunos de ellos tienen carácter de **factores de crecimiento**, sobre todo los ácidos hidroxámicos, involucrados en la toma de hierro, por formación de quelatos (**sideróforos**). Otro grupo tiene carácter **biocida** como la actidiona, ácido aspergílico (lucha biológica) y otros poseen carácter mutagénico como nitrito, hidroxilamina y derivados nitrosos.

El cuadro 2 (Focht y Verstraete, 1977) resume datos sobre la nitrificación heterótrofa, comparándola con la autótrofa. Como se aprecia, la velocidad del proceso autótrofo es 10³-10⁴ veces mayor que el heterótrofo y la capacidad de formación de productos finales es del orden de 10² a 10³ veces inferior.

El rol de los nitrificantes heterótrofos en la provisión de nitratos para los vegetales es controvertido. Si bien su eficiencia es baja, su densidad puede ser alta en ciertas condiciones, acumulándose cantidades importantes de nitrógeno mineral. Pueden además, actuar cuando los autótrofos no pueden sobrevivir: altas temperaturas, bajo nivel de O₂, pH ácidos.

Ecología

Se analizarán aspectos ecológicos de la nitrificación autótrofa por su importancia cuantitativa y por el hecho de estar más afectada por las condiciones del medio. La gran similitud fisiológica de las especies actuantes explica en parte la sensibilidad a condiciones ecológicas: el proceso puede no ocurrir o ser extremadamente lento en suelos anegados, de pH muy bajo, o bajo temperaturas muy altas. Como la amonificación es un proceso menos específico, en el suelo se acumulará **amonio**. Analizaremos el efecto de los principales factores (Schmidt, 1982, Walker, 1978).

Nivel de nutrientes: el sustrato energético puede ser el factor limitante: amonio o nitrito. *Nitrosomonas* generalmente oxida 35 unidades de nitrógeno y *Nitrobacter* unas 100 unidades de nitrógeno por cada C-CO₂ asimilado. La producción de nitratos es proporcional al amonio disponible. El carbono no es una limitante ya que lo toman del CO₂, carbonatos, bicarbonatos. El nitrito puede acumularse cuando se inhibe la actividad de los oxidantes del nitrito, como ocurre luego de aplicar altas dosis de urea, amoníaco anhidro o sales de amonio, a pH alto.

La autoecología de estos grupos nos explica ya esta inhibición (cuadro 3). Se observa que el primer paso de la oxidación es más versátil. Condiciones adversas de pH, temperatura o dosis altas de fertilizantes amoniacales, conducen a la acumulación de nitritos, tóxicos para los vegetales y la mayoría de los microorganismos.

Cuadro 2 Nitrificación heterótrofa y autótrofa

organismo	sustrato	producto final	velocidad ugN/día/g célula	conc.máxima µgN/ml
Arthrobacter spp.	NH ₄ ⁺ succinato	hidroxilamina	12	0,2
		nitrito	375	0,2
		nitrato	250	
	NH ₄ y N-orgánico	nitrito	-	1,6
		nitrato	-	14,1
	NH ₄ y acetato	hidroxilamina	4.500	15,0
		nitrito	9.000	18,0
		nitrato	650	2,0
		ác. hidroxámico	600	6,0
		1-nitroetanol	300	10,0
Pseudomonas aeruginosa	acetaldoxina	nitrito	2.000	150,0
Hansenula marakii	nitroetano	nitrito	1.680	2,8
Aspergillus flavus	NH ₄ y sacarosa	nitropropano		
		ác.3 nitropropiónico	1.400	45,0
		nitrato	1.350	75,0
Nitrosomonas spp.	NH ₄	nitrito	1,3 x 10 ⁶	2-4 x 10 ⁻³
Nitrobacter	NO ₂ ⁻	nitrato	5,7 x 10 ⁶	2-4 x 10 ⁻³

Cuadro 3 - Autoecología de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*

	pH	temperatura	N-amoniaco
<i>Nitrosomonas</i>	tolera pH altos y bajos	aun activo a bajas temperat.	tolera altas dosis
<i>Nitrobacter</i>	inhibido a pH: superiores a 9,0 inferiores a 5,0	inactivo sobre 40° e inferior a 5°C	inhibido a altas dosis

Muchos suelos fijan grandes cantidades de amonio en los coloides. El potasio, catión que también es fijado, interfiere en la nitrificación del amonio atrapado entre las hojuelas de las arcillas. A medida que se incrementa el nivel de potasio agregado, disminuye la nitrificación del amonio fijado. Los nutrientes que afectan a la amonificación, como el nivel y calidad de la materia orgánica, afectan indirectamente a la nitrificación.

pH: existe alta correlación entre la nitrificación y el pH del suelo. En medios ácidos, la nitrificación está inhibida o es muy lenta (debajo de pH 6,0). Mientras que el pH óptimo de *Nitrosomonas* se ubica en el rango de 7 a 9 y aún más alcalino, para *Nitrobacter* se sitúa en la neutralidad o ligeramente alcalino. La nitrificación a bajos pH se explica por:

- cepas adaptadas a pH ácidos
 - el proceso se realiza en microhabitats donde el pH es neutro a diferencia del resto del suelo.
- La población nitrificante autótrofa es mayor en suelos neutros o ligeramente alcalinos y el encalado favorece el proceso en suelos ácidos (ejemplo de la incidencia favorable del hombre sobre un proceso microbiano). Morril y Dawson (1967) trabajando con 116 suelos cuyos pH variaban desde 4,4 a 8,8, determinaron 4 modelos típicos de oxidación del amonio agregado: (figura 1)

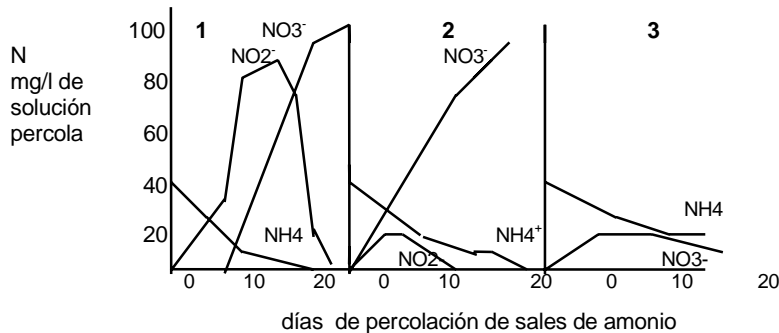
1. el amonio es rápidamente oxidado a nitrito el que se acumula un largo período antes de oxidarse a nitrato
2. el amonio y el nitrito producidos son rápidamente oxidados
3. el amonio es oxidado lentamente a nitrato sin aparición de nitritos
4. no se detecta oxidación del amonio por aparición ni de nitrito ni de nitrato (pH 5,12)

Los autores modificaron el comportamiento nitrificante de los suelos que respondían al modelo 3) y al 4), los que mediante encalado se comportaron como los del tipo 2) y el tipo 1) en el 2) al pre-percolarlos con sales amoniacaes o inoculando con microorganismos nitratantes. El bajo número de estos organismos en estos suelos explica la fase de latencia en la aparición de nitratos.

La figura 2 presenta resultados de percolación con diferentes sustancias:

- **un aminoácido**, que presenta una fase de latencia en la aparición de los nitratos requerida para la amonificación previa
- la nitrificación de **sales amoniacales** presenta un período de corta latencia correspondiente a su oxidación a nitrito
- **los nitritos** son inmediatamente oxidados

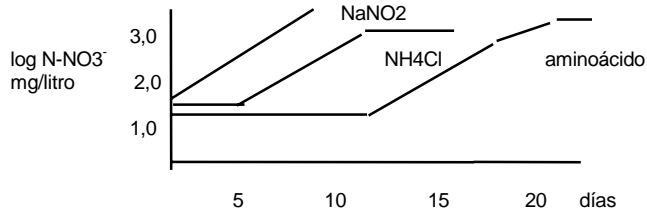
Figura 1 Modelos de nitrificación y pH del suelo



Oxígeno: es un requerimiento obligado en el proceso. La estructura del suelo tiene gran efecto: la nitrificación es inversamente proporcional al tamaño de los agregados

Humedad: es otro de los factores que afectan profundamente a la nitrificación autótrofa ya que regula el nivel de oxigenación del suelo. La formación de nitratos cesa cuando el nivel de humedad es inferior al punto de marchitamiento permanente, mientras que la amonificación es aún activa.

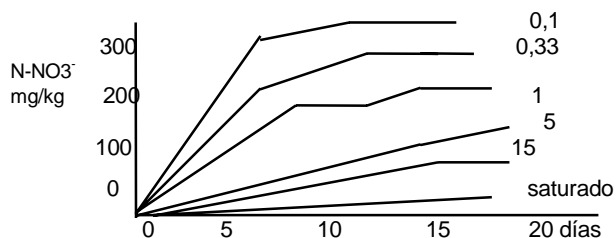
Figura 2- Nitrificación de varios sustratos



La figura 3 publicada por Frioni (1990) presenta la nitrificación en suelo franco limoso con 500 mg/kg de N-NH4⁺ como fosfato diamónico y sometido a diversas tensiones de succión desde 0 (saturado) hasta 15 barías e incubado a 21°C. En general, se podría aceptar la siguiente escala de tensiones de humedad para una máxima acumulación de nitrato:

0,1 > 0,33 > 1 > 5 > 15 > 50 > 0 barías

Figura 3- Nitrificación a diferentes tensiones de humedad (barías)



Temperatura: la temperatura óptima tanto en el suelo como en medios de cultivo se ubica entre **28 y 36°C**, aunque pueden aparecer nitratos por encima de 40°C por acción de cepas adaptadas. Varios autores determinaron que aún a temperaturas tan bajas como 2°C la nitrificación puede alcanzar valores considerables si el amonio y la densidad de microorganismos nitrificantes no son limitantes.

Efecto rizosférico: la atmósfera en la vecindad de las raíces es más pobre en O₂ y más rica en CO₂ que la atmósfera sobre el suelo, debido a la actividad respiratoria de la mayoría de los heterótrofos. La nitrificación, por lo tanto, será menor. Se cita también la inhibición de algunos cultivos sobre este proceso, sobre todo de los bosques de coníferas, ricos en sustancias fenólicas. La intensa inmovilización de formas minerales del nitrógeno por microorganismos heterótrofos explica también la disminución de nitratos en rizosferas. Se evitan así pérdidas por lavado o desnitrificación de los nitratos formados, en ambientes de baja tensión de O₂.

Estación: el efecto de la estación está condicionado por la interacción de numerosos factores como la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la humedad, la aireación, etc. No puede predecirse en que épocas del año el nivel de nitratos será mayor. En general, en la región templada la producción de nitratos es más activa en primavera y otoño, más lenta en verano e invierno (Giambiagi, 1969). Pero las fluctuaciones de temperatura y humedad y las prácticas culturales pueden alterar este comportamiento.

En resumen: la nitrificación es rápida en suelos húmedos, bien drenados y de buena estructura, lenta en suelos pesados. El óptimo de humedad varía considerablemente con los suelos, se citan óptimos entre **1/2 y 2/3 de la capacidad de campo**.

El rehumedecimiento de suelos secos estimula la nitrificación. Se explica este hecho por la acción de enzimas liberadas por células muertas en la desecación, que permanecerían adsorbidas a la fracción organo-mineral del suelo que se sumarían a las presentes en las células vivas (Giambiagi *et al*, 1992). La temperatura favorece el proceso.

Inhibidores de la nitrificación

Para disminuir pérdidas de nitrógeno por lavado o desnitrificación en suelos sin cubierta vegetal importante o que sufre frecuentes períodos de anegamiento, se han desarrollado investigaciones tendientes a inhibir la nitrificación.

Es sabido que:

- **los herbicidas e insecticidas** empleados en dosis normales no afectan al proceso
- **los fungicidas y fumigantes** ejercen gran acción como inhibidores de la nitrificación, aun en dosis normales
- **otras sustancias** son empleadas como el 2 Cl 6 (tri Cl metil) piridina, conocido comercialmente como **N-serve**; 2-amino-4 Cl-6 metilpiridina (**AM**); dicianodiamida; tiourea; 2-sulfanilamidotiazol (**ST**); los tiazoles; triazinas; isocianatos, etc. El N-serve es uno de los más frecuentemente empleados que inhibe a los autótrofos pero no a los nitrificantes heterótrofos y se usa mucho en áreas arroceras sometidas a alternancias de secado e inundación.

El inhibidor es con el tiempo degradado y la nitrificación recomienza. Lo ideal es que esto coincida con el activo desarrollo del vegetal. El éxito del método está vinculado a la velocidad a la que la microflora degrada al inhibidor.

Ciclo interno del nitrógeno (mineralización-inmovilización) Biomasa microbiana

El nitrógeno mineral es asimilado por los microorganismos y pasa a formar parte de combinaciones orgánicas en las células. Como deja de estar por un tiempo disponible para los vegetales, se dice que ha sido **inmovilizado**. Este bloqueo del N mineral es transitorio, ya que las moléculas orgánicas son liberadas al ecosistema por procesos de excreción o a la muerte celular, donde son rápidamente mineralizadas.

La **biomasa microbiana** producida representa una inmovilización temporaria de energía, carbono y elementos minerales.

A las transformaciones cíclicas de mineralización-inmovilización que ocurren simultáneamente se les agrupa en el llamado **ciclo interno del nitrógeno**, ya que ocurren en el interior de los microorganismos, mientras que las transformaciones que ocurren con la participación de los vegetales, la atmósfera, etc. se agrupan en el **ciclo externo o ciclo biogeoquímico**. La figura 4 presenta un esquema de las transformaciones de los nutrientes en ecosistemas terrestres (Siqueira y Franco, 1988)

Mineralización bruta o real: es la cantidad total de nitrógeno mineral producido. Se puede evaluar también la amonificación y/o nitrificación bruta. Estos iones no constituyen productos finales estables y pueden seguir múltiples vías en el suelo (cuadro 4) y resulta difícil evaluar estos procesos si no se emplean elementos marcados (N^{15}).

Mineralización neta: se evalúan las cantidades presentes en el ecosistema en el momento del análisis que resultan de la diferencia entre lo producido (mineralización bruta) y aquellos procesos que se detallan en el cuadro 4. Globalmente, se puede representar el N mineral evaluado como:

N mineral evaluado = N total producido - (Ni + Na + Nv + Nd + NI + ...)

(donde: Ni = inmovilizado; a = lavado; v = volatilizado; f = fijado; d=denitrificado; l = lavado, etc.).

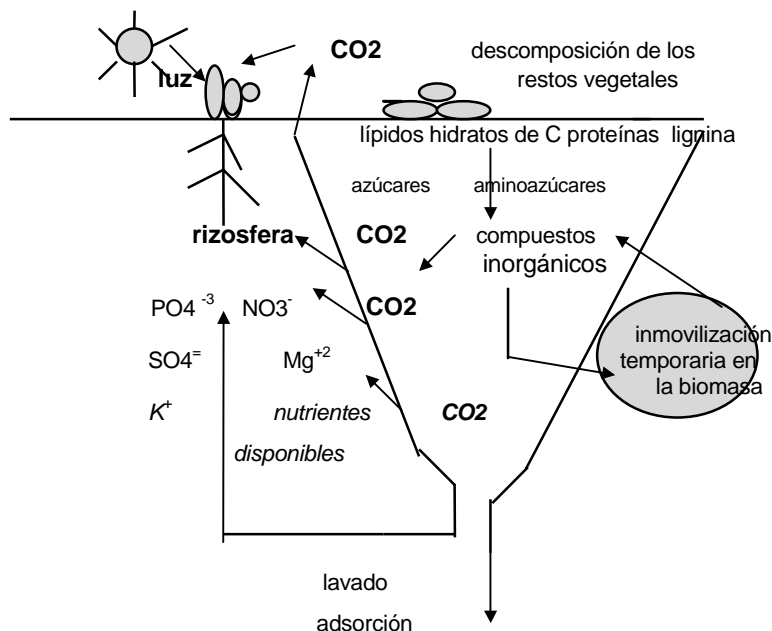
El N mineral disponible para los vegetales en un momento dado depende de la magnitud relativa de procesos simultáneos y opuestos : la **mineralización y la inmovilización**. La competencia entre vegetales y microorganismos por el N mineral es importante cuando éstos disponen de abundante sustrato energético. La mayor parte es entonces incorporado al ciclo interno (**biomasa**) ya que los microorganismos son activos competidores de las plantas.

Agregado de restos vegetales

Pajas de cereales

Analizaremos los procesos que ocurren cuando se incorpora al suelo un resto vegetal con bajo nivel de N%, por ejemplo una **paja de cereal** (C = 40% y N = 0,5%). La relación C/N es alta, 80/1 y la microflora del suelo degrada este resto con el objeto de obtener subunidades para sus macromoléculas y energía. La velocidad de degradación y los productos finales dependerán de las condiciones del suelo, clima, dosis, forma de aplicación (en superficie, enterrado, picado, molido, etc.).

Figura 4 - Descomposición de restos vegetales y ciclo interno de nutrientes en suelo agrícola



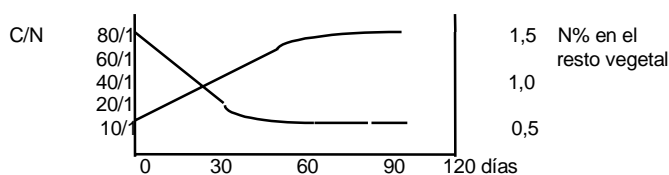
Cuadro 4 - Procesos biológicos y abiológicos con N mineral

NH_4^+	NO_2^-	NO_3^-
nitrificación(NO_2^- , NO_3^-)	nitratación(NO_3^-)	denitrificación(N_2)
inmovilización(Norg)	idem	idem
asimilación(Norg)	idem	idem
adsorción a coloides	lavado	lavado
Fijación a coloides	reducción(N_2)	idem (NO_2^- , NH_4^+)
lavado, menos	lavado	lavado
Erosión	idem	idem
volatilización	-	-

Como el nitrógeno está en baja proporción, los microorganismos inmovilizarán el amonio y nitrato surgidos de la mineralización, que conjuntamente con formas minerales de S, P, Fe, etc. integrarán las moléculas de las nuevas células. Por algún tiempo no se detectará N mineral en el suelo ya que la demanda biológica excede al aporte (domina la **inmovilización neta**). Con la fracción carbonada la situación es diferente, pues ocurren pérdidas gaseosas como CO_2 , CH_4 , a partir de respiraciones, fermentaciones, decarboxilaciones.

La figura 5 (publicada por Alexander, 1977) presenta la evolución de la relación C/N en residuos pobres en N% a medida que se van degradando. La C/N disminuye y llega asintóticamente a valores del orden de las de la microflora dominante y del humus de ese ambiente (10-15/ 1).

Figura 5 - Cambios en la relación C/N y en el N% durante la descomposición de paja de cebada



El N% de los restos (vegetal y microbianos) aumenta a medida que la degradación procede, ya que no existen pérdidas importantes de este elemento que se mineraliza y pasa inmediatamente a moléculas orgánicas en las células de la población que hizo eclosión con el agregado del sustrato orgánico.

- **Relación C/N de equilibrio o crítica**, la degradación de las fracciones carbonadas y nitrogenadas proceden paralelamente, la demanda iguala a la oferta y en el medio aparecen iones amonio y nitrato. Se citan relaciones críticas de **20-25/1**, es decir, más altas que las relaciones C/N frecuentes de los suelos.
- **Relaciones más altas que la crítica** favorecen la inmovilización neta
- **Relaciones más bajas** favorecen la mineralización neta

La naturaleza química de las fracciones carbonadas y nitrogenadas puede hacer variar esta relación. Así, restos ricos en lignina, difícilmente degradables, pueden considerarse con relaciones críticas superiores.

En el cuadro 5 se efectúa un cálculo teórico, para predecir cuál de los procesos (mineralización-inmovilización) dominará en un suelo cuando el resto de paja es atacado por poblaciones puras, por ejemplo, por bacterias aerobias, actinomicetes, u hongos, cuya C/N promedio y la eficiencia en la asimilación del carbono, se determinó:

$$\text{Eficiencia} = (\text{C celular formado} / \text{C total atacado}) \times 100$$

Las poblaciones más ineficientes en la asimilación del C son las bacterias anaerobias (liberan ácidos, alcoholes, gases). A partir de estos datos se pueden calcular las unidades de C asimiladas, las de N necesarias y si el resto vegetal provee de este nitrógeno o si, por el contrario, las células deben tomarlo también del ambiente.

Ejemplo: los hongos al atacar 100 partes de la paja asimilarán 30-40% del carbono que representa 40 partes en 100 partes del resto (C= 40%). O sea que incorporarán 12 a 16 unidades de carbono al

citoplasma, lo que requerirá 1,2 a 1,6 partes de nitrógeno, si su C/N es en promedio 10/1. La paja provee sólo de 0,5 partes, de modo que habrá déficit y el resto debe tomarse del ambiente. Dominará la **inmovilización (i neta)** del N y el proceso será lento.

Como ejercicio complete el resto del cuadro.

Cuadro 5 - Cálculo teórico en la degradación de paja de cereal (C=40% y N=0,5%), por cultivos puros de microorganismos

organismo	eficiencia	C/N	C asim	N asim	déficit/exceso
Hongos	30-40%	10/1	12-16	1,2-1,6	-0,7, -1,1 (i neta)
bacterias aerobias	10-30	10/1			
actinomices	15-30	5/1			

Abonos verdes

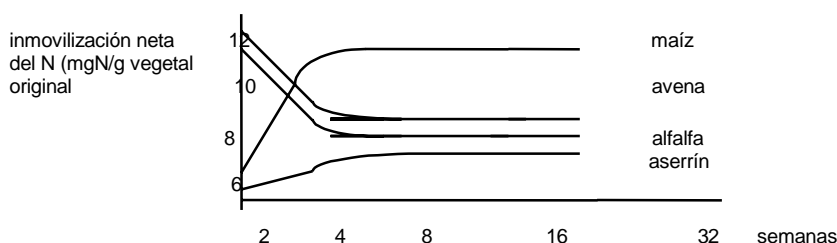
Materiales ricos en N% como los abonos verdes, las leguminosas (2-3% N%), no presentan esta limitante y el nitrógeno mineral puede aparecer en el suelo desde el comienzo de la degradación. Estas consideraciones teóricas basadas en datos de nutrición microbiana resultan difíciles de aplicar a la población microbiana en ambientes naturales ya que allí la heterogeneidad es enorme, en tipos de organismos, estado fisiológico y resulta difícil calcular las relaciones C/N y la eficiencia media en la utilización del carbono.

En general se admite que sustratos con más de 1,8% de N favorecen la mineralización neta; niveles entre 1,2 y 1,8% representan relaciones C/N entre 20 y 30/1 y contenidos entre 0,5 y 1,2% N favorecen la inmovilización neta.

Como dato, recordemos que las maderas contienen entre 0,1-0,5% de nitrógeno, las pajas de cereales y tallos de maíz entre 0,5 y 1,5% y restos de leguminosas entre 1,5 y 3%.

La figura 6 muestra los cambios de inmovilización neta en materiales descompuestos con distinto contenido de N%. Para acelerar el proceso es frecuente fertilizar con nitrógeno.

Figura 6- N inmovilizado en el suelo en la descomposición de algunos restos vegetales



Como consecuencia de la predominancia de la inmovilización sobre la mineralización en la primera etapa, el N mineral descende (inmovilización neta). Luego y a medida que la C/N disminuye y se llega a la relación crítica, el N mineral comienza a aumentar, pudiendo incluso superar el nivel inicial (etapa de mineralización neta). Se acostumbra a medir el **tiempo de renovación o reciclaje del N mineral**, o sea el tiempo que transcurre entre la inmovilización y la aparición de N mineral nuevamente en el suelo. Este período es variable, se citan datos del orden de una jornada hasta varios años.

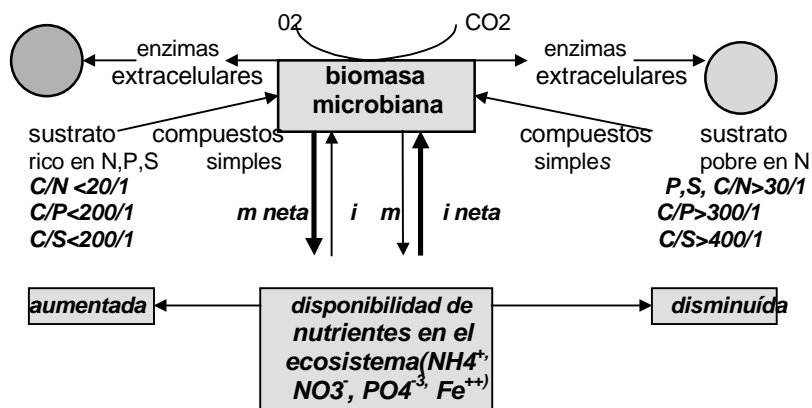
Con los demás elementos minerales ocurren procesos similares, pero las relaciones críticas C/P, C/S son más altas que para el nitrógeno.

La figura 7 publicada por Siqueira y Franco (1988), esquematiza los flujos de N, S, P en sustratos orgánicos ricos y pobres en nutrientes, en la descomposición y su disponibilidad para los cultivos.

La inmovilización de nutrientes en la biomasa microbiana puede alcanzar valores elevados, del orden de 100 kg de N, 80 kg de P, 70kg de K y 11 kg de Ca por ha. Como la biomasa es reciclada cerca de

10 veces más rápido que la fracción orgánica muerta, gran parte de estos nutrientes son liberados en su reciclamiento. El cuadro 6, de los mismos autores, presenta valores de esta fracción como % del carbono total.

Figura 7- Flujo de nutrientes a través de la biomasa microbiana



Cuadro 6 - Valores medios estimados de parámetros relacionados a la dinámica del carbono orgánico del suelo, en diferentes ecosistemas

ecosistema	b	m	a	k	C	C-biomasa
bosque tropical	5,0	50	2,5	2,7	4,2	4,0
bosque templado	2,2	40	0,8	0,7	2,0	3,0
savana tropical	0,9	45	0,4	1,2	0,8	1,5
pradera	1,4	35	0,5	0,4	3,0	3,0
suelo cultivado	5,0	40	2,0	7,0	2,0	2,0

b → MO fresca adicionada al suelo cada año (t/ha)

m → tasa de conversión (%) de b para el C orgánico del suelo (COS)

a → adición anual de C al humus = $b \cdot m$ (t/ha)

k → tasa anual de descomposición de COS (%/año)

C → carbono en el suelo en equilibrio (%)

C → biomasa- proporción del COS en la biomasa microbiana

Factores que afectan el ciclo de mineralización-inmovilización del nitrógeno

- **Estado del resto orgánico:** el material fresco y picado favorece su mineralización mientras que el secado provoca un aumento en la C/N de la fracción soluble en agua.

- **Temperatura,** las bajas temperaturas no afectan de la misma manera las distintas etapas de la mineralización. Así, vimos que las bajas temperaturas afectan más a la nitrificación que a la amonificación, que puede ocurrir en suelos a 5°C y se duplica a 10°C.

- **La humedad:** conjuntamente con la temperatura constituye una de las variables que más afecta al ciclo de mineralización-inmovilización del nitrógeno. La mayoría de los estudios analizan aisladamente el efecto de estos factores sobre la nitrificación y pocos sobre el proceso global de mineralización. La nitrificación es muy lenta a humedades cercanas al punto de marchitamiento donde se acumula amonio o nitrito. El óptimo se sitúa alrededor de 0,1 baria de tensión. El amonio se acumula tanto en sequedad como en inundación, mientras que a valores intermedios la producción de nitratos supera a la de amonio.

En suelos secos, la menor actividad biológica trae aparejada menor inmovilización, al igual que en suelos sumergidos.

- **Fertilización nitrogenada:** la inmovilización es mayor en suelo cultivado dado que más materiales energéticos (raíces, exudados) y microorganismos, están presentes. Los primeros estudios con N^{15} ya mostraron que gran proporción del fertilizante permanecía en el suelo inmovilizado en combinaciones orgánicas. Es necesario tener en cuenta la adsorción del amonio a los

coloides del suelo; en muchos ensayos todo el amonio no recuperado se atribuye a la inmovilización. El amonio es más inmovilizado que el nitrato ya que es fuente preferencial de N para los microorganismos.

- **pH:** la inmovilización del nitrógeno es escasa en suelos ácidos, en donde los procesos de mineralización se detienen en amonio. El encalado del suelo favorece la mineralización en detrimento de los procesos de reorganización, aunque es necesario tener en cuenta la interacción de este factor con otros como la humedad, la temperatura, etc. Los pH neutros favorecen ambas etapas del ciclo de mineralización-inmovilización.

- **La vegetación:** es frecuente observar nivel de nitratos inferior en la rizosfera en relación al suelo sin cultivos. Los procesos de inmovilización son allí estimulados por acción de la población heterótrofa aumentada. Pero los nitratos también disminuyen por aumento de la actividad desnitrificante y la presencia de sustancias inhibidoras de los nitrificantes excretadas por ciertos cultivos o producidas en la incubación del suelo.

En resumen: la degradación de los restos vegetales en el suelo es un fenómeno complejo y la dominancia de las etapas de mineralización o de inmovilización del nitrógeno depende de muchos factores, entre ellos, de la complejidad química de los sustratos, de las interacciones de la temperatura y la humedad, del tipo de suelo, del pH, de la incorporación simultánea de fertilizantes nitrogenados y otros nutrientes.

En el campo ocurre inmovilización que afecta el desarrollo de cultivos posteriores, pero la magnitud y la duración de la misma son menores que las evaluadas en ensayos de laboratorio e invernáculo, y el nitrógeno puede ser aprovechado por los cultivos desde las primeras etapas de la descomposición.

Pérdidas de nitrógeno

En esta sección analizaremos las causas más importantes por las cuales las distintas formas químicas del nitrógeno son volatilizadas o convertidas en formas no aprovechables por los vegetales y la mayoría de los microorganismos.

Abiológicas

Volatilización del NH₃, puede ocurrir a partir del agregado de abonos a base de urea, amonio anhidro, sales amoniacales, pero también luego de la incorporación de restos vegetales. Las pérdidas son particularmente importantes a:

- pH superior a 8,0 (suelos calcáreos o aquellos cuyo pH local se eleva por amonificación intensa)
- temperatura elevada y desecación
- aplicación de fertilizantes en la superficie del suelo
- suelos de baja capacidad de intercambio catiónico.

Las mayores pérdidas ocurren en suelos livianos, arenosos. Conviene mezclar los fertilizantes que liberan amonio con los primeros 5 cm del suelo.

Reacciones que involucran a los nitritos



Ciertos elementos, Cu y Mn, en suelos ácidos, reaccionan con los nitritos, liberando NO (óxido nítrico), que es bastante estable y puede pasar a la atmósfera: $\text{NO} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{NO}_2$ o N_2O_4 , o ser absorbido por el suelo.

Los óxidos de nitrógeno reaccionan con el agua del aire, a pH inferior a 5,5: $\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O} + 0,5 \text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{HNO}_3$

Estas causas de pérdidas de N no son importantes, ya que poco nitrato puede formarse en pH ácido.

$\text{HNO}_2 + \text{RNH}_2 \longrightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{ROH}$ (reacción de Van Slyke). También poco importante pues requiere acidez y aerobiosis.



Reacción importante a pH alcalino.

Lavado, como vimos, parte del amonio, los nitritos y nitratos son solubles en agua y pueden por lo tanto ser llevados a horizontes fuera del contacto con las raíces.

Erosión, constituye en ciertas zonas una causa importante de pérdida de nitrógeno para el suelo, por voladura de suelos superficiales (erosión eólica) o por anegamiento con el consiguiente lavado y/o desnitrificación (erosión hídrica).

Biológicas- Desnitrificación

Los nitratos sufren una serie de procesos microbianos en ambientes naturales (aguas, suelos, barros) conocidos genéricamente con el nombre de «**reducción de los nitratos**». Pueden dividirse en dos grandes categorías:

a. Reducción asimilativa, realizada por microorganismos y vegetales y que conduce a la formación de amonio empleado en la biosíntesis de constituyentes nitrogenados de la célula. No implica pérdida de N para el ecosistema, sino una **inmovilización transitoria** hasta que se mineralicen las células o los productos nitrogenados excretados.

b. Reducción desasimilativa o respiración del nitrato: muchos microorganismos en anaerobiosis total o parcial sustituyen el O₂ por los nitratos como aceptor de electrones en respiraciones anaerobias, generando ATP y poder reductor. De acuerdo al organismo y a las condiciones del medio, los productos finales pueden ser: **NO**, **N₂O**, **NO₂⁻**, **N₂** y aún otras formas del nitrógeno, que serán excretados por las células al medio. Si el **N₂** o el **N₂O** son los productos formados en la respiración de los nitratos, el proceso recibe el nombre de **desnitrificación**. Las reacciones pueden iniciarse con nitritos o nitratos y los productos finales se pierden a la atmósfera.

La cromatografía de gases permite seguir con mucha precisión el contenido de N₂ y N₂O en la atmósfera del suelo y el empleo de N¹⁵-NO₃⁻ permite evaluar con exactitud estas causas de pérdidas de nitrógeno.

Efectos en la naturaleza

- **los vegetales** se perjudican ya que los nitratos son su principal fuente de nitrógeno
- **el ambiente** se beneficia ya que los nitratos altamente tóxicos y solubles son lavados del suelo y llevados a cauces de agua. La desnitrificación es vital en la continuidad del ciclo del nitrógeno. Si no ocurriera este proceso, el nitrógeno de la tierra, incluyendo el N₂ atmosférico, se acumularía en los océanos, impidiendo la vida terrestre. La desnitrificación mantiene también la potabilidad de las aguas, ya que altas concentraciones de nitratos son tóxicas.

Microorganismos responsables

Los microorganismos vinculados a la desnitrificación no dependen de los nitratos para su desarrollo. Muchos de ellos son también activos en la proteólisis, amonificación y otras transformaciones biológicas. La presencia de una alta población desnitrificante en suelos, aguas, no implica que las condiciones sean las óptimas para el proceso; se refleja solamente un gran **potencial desnitrificante**.

Así, la capa arable de suelos contiene más de 10⁶ desnitrificantes/g suelo seco. La población es mayor en la vecindad de las raíces y el potencial de volatilización es grande, pero deben reunirse las condiciones para que los organismos cambien su metabolismo aerobio por una respiración anaerobia, con nitrato como aceptor final de electrones.

Son bacterias anaerobias facultativas, con dos cadenas transportadoras de electrones, auto y heterotróficas que:

- **en aerobiosis** realizan respiraciones aerobias del sustrato, por ejemplo, glucosa
- **en anaerobiosis** degradan el mismo sustrato por respiración anaerobia con nitrato como aceptor de electrones.

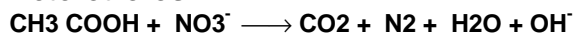
Un 85% de las especies testadas pueden reducir nitratos a nitritos. El grupo que reduce los nitratos hasta amonio es también amplio, un 45% del total, e incluye a la mayoría de las especies amonificantes, que también pueden reducir nitratos. Estos grupos no ocasionan pérdidas de N, ya que nitrito y amonio son empleados por la microflora.

Los **desnitrificantes verdaderos** que reducen nitratos hasta N₂ u óxido nitroso, sólo representan un 4% de las especies testadas y son bacterias típicas. Ningún protista superior es capaz de obtener energía de esta reacción. Son especies de pocos géneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Micrococcus*.

Son anaerobias facultativas, que emplean nitratos en condiciones de anaerobiosis o de muy baja concentración de O₂ (0,2 mg/l en medio líquido). El O₂ reprime la formación nitrato, nitrito y óxido nitroso reductasa y además inhibe la función de la que ya está sintetizada.

Aislamiento: en condiciones de anaerobiosis, con nitrato y donadores de electrones, en general orgánicos, ya que la mayoría de las especies son heterótrofas. Luego de un enriquecimiento producen gran cantidad de gas y alcalinizan la solución. Muchas especies de *Bacillus* son termófilas y se aíslan a 55-65°C.

Heterótrofos



Sustrato: innumerables moléculas resultantes de la degradación de polímeros: celulosa, hemicelulosas, almidón se usan como fuente de carbono, así como algunos compuestos aromáticos y sintéticos.

Las asociaciones **comensaliásticas** entre los degradadores de estos polisacáridos y las bacterias desnitrificantes han sido descriptas como muy frecuentes. Con raras excepciones los desnitrificantes son incapaces de fermentar azúcares y no pueden crecer en anaerobiosis sin nitratos ni nitritos. Ninguno es anaerobio estricto.

Autótrofos

Se citan en la bibliografía unas pocas especies de bacterias autótrofas facultativas, que realizan desnitrificación oxidando un sustrato mineral, H₂, S⁰, que se desarrollan en el aire o anaeróticamente con compuestos inorgánicos como fuente de energía y O₂ o NO₃⁻ como aceptores de electrones, respectivamente.

Thiobacillus denitrificans oxida S⁰, H₂S y difiere de los otros tiobacilos por su capacidad para crecer anaeróticamente cuando están presentes los nitratos:



Hydrogenomonas agilis y *Micrococcus denitrificans* oxidan el H₂ con reducción de nitratos. *Sporovibrio ferrooxydans* reduce nitrato en anaerobiosis, oxidando Fe⁺⁺.

El rol de estos organismos en naturaleza no se puede inferir a partir de estudios en cultivo puro. De todos modos, su número no es nunca alto en ecosistemas naturales y las mayores pérdidas de nitratos se producen por los heterótrofos.

Ecología

La restricción de la actividad desnitrificante a pocos géneros hace que la magnitud del proceso esté marcadamente afectada por el ambiente. Los cambios en éste pueden estimular o bien inhibir las pérdidas de nitratos.

Las condiciones que deben reunirse para que el proceso heterótrofo sea estimulado:

- **alto nivel de nitratos**
- **sustancias donadoras de electrones** (materia orgánica)
- **anaerobiosis**

Los nitratos se producen por nitrificación o son aportados en fertilizantes nítricos, amoniacales u orgánicos que pueden ser llevados a nitratos. También pueden provenir de otros horizontes arrastrados por el agua. Incluso en suelos de arrozales donde en general se fertiliza con amonio, éste puede oxidarse a nitrato en las capas superiores del agua y luego ser desnitrificado más abajo.

La anaerobiosis se logra fácilmente en aguas, a unos pocos centímetros de la superficie y en los suelos existen microagregados en los cuales la demanda biológica agota rápidamente el O₂ y como éste es un gas que difunde lentamente por los poros del suelo y es poco soluble en agua, se crean ambientes anaerobios en el seno de suelos bien estructurados. Pero el oxígeno ejerce además un rol indirecto, ya que es requerido para la producción de nitratos. La desnitrificación se favorece en agregados de más de 4 mm de diámetro ya que resulta difícil al O₂ llegar por difusión hasta el centro

donde ocurrirá la desnitrificación. El suelo está constituido por un mosaico de habitats, coexistiendo los oxigenados para la oxidación del amonio y los anaerobios, donde se reducen los nitratos.

La **alternancia** de períodos de buena y mala aireación, o períodos de lluvia intermitentes pueden facilitar la formación y la reducción consiguiente de los nitratos.

El cuadro 7 muestra la relación entre el nitrógeno perdido como gas y la atmósfera de incubación de los nitratos.

Cuadro 7 - Efecto de la composición de la atmósfera en la desnitrificación

N perdido como % del N-NO ₃ ⁻ agregado		
atmósfera	agitado	estacionario
aire	28,2	81,0
oxígeno	0,0	28,0
nitrógeno	80,1	79,2
vacío	78,6	80,0

La materia orgánica estimula la desnitrificación, pues como ya vimos la mayoría de las especies activas son heterótrofas. Ejerce doble rol:

directamente, actúa como fuente de carbono y de electrones

indirectamente, provoca una eclosión de microorganismos en su mayoría aerobios, que disminuyen el nivel de oxígeno facilitando las pérdidas por desnitrificación.

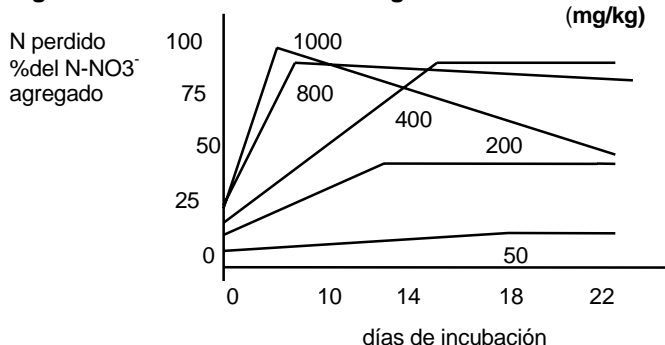
La figura 8 presenta las pérdidas de N en el suelo incubado con nitratos (5 mg de N-NO₃⁻) en anaerobiosis a 25°C y diferentes dosis de paja de trigo. Las sustancias rápidamente descomponibles favorecen el proceso: azúcares simples, ácidos orgánicos. Los abonos verdes estimulan el proceso y las pajas en menor proporción.

Otros factores

Humedad: en suelos bien drenados la desnitrificación se correlaciona con el nivel de humedad. Los nitratos se reducen en altos niveles de agua y en suelos mal drenados. Pueden coexistir, como vimos, habitats anaerobios (interior de agregados, rizosfera) en suelos aereados.

La alternancia de períodos de buena y mala aireación ejerce un efecto acelerador de las pérdidas de N por desnitrificación. La figura 9 publicada por Frioni (1990) muestra la evolución del nitrógeno total (Nt) y del N-NO₃⁻ en un suelo incubado a 35°C durante 60 semanas en tres condiciones:

Figura 8- Efecto de la materia orgánica en la desnitrificación



- mantenido constantemente a 16-20% de humedad
- mantenido siempre saturado en agua
- saturado en agua la primera mitad del ciclo (3 semanas) y secado hasta 18% de humedad y mantenido así la segunda mitad del ciclo (3 semanas).

Se repite el procedimiento en cada uno de los ciclos. El suelo permanentemente saturado volatiliza los nitratos pero no puede producirlos más en anaerobiosis. La alternancia de saturación y drenaje

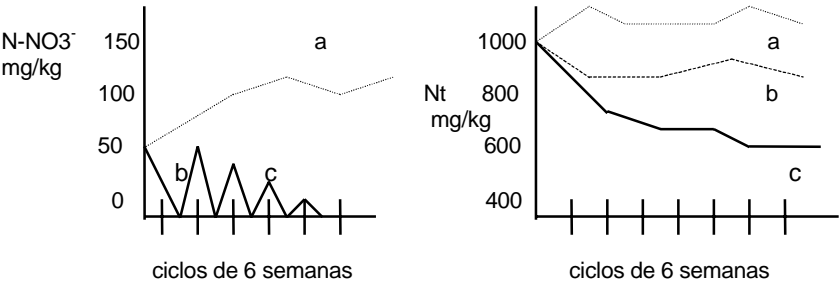
causa la mayor pérdida de Nt: en saturación el humus se mineraliza lentamente a amonio, que es oxidado a nitrato en la segunda parte del ciclo, perdiéndose en el período de anegamiento.

Como consecuencia parte del N del humus se volatiliza.

Este principio se aplica en las plantas de **tratamientos de aguas servidas**; ciclos de aerobiosis y anaerobiosis eliminan prácticamente todo el nitrógeno orgánico por nitrificación y desnitrificación. En columnas de suelo se observó que en ciclos de 10 días húmedos y 10 días secos se pueden remover un 67% del N de la materia orgánica.

pH: la desnitrificación es sensible a la acidez y las pérdidas en ambientes muy ácidos no pueden atribuirse directamente a causas biológicas. Sobre el pH 6,0 se forma N2O pero se reduce a N2 que es el gas dominante. Debajo de pH 6,0 la reducción es inhibida y predomina el óxido nitroso: la producción de N2O es máxima en suelos ácidos y mínima en neutros. La reducción ulterior N2O a N2 se produce en todos los casos. El óptimo del grupo se sitúa en el rango **neutrófilo: 7,0 - 8,2** coincidente con la máxima actividad bacteriana, pero los rangos se extienden desde **pH 4,5 a 10,0**.

Figura 9- Pérdidas de N en suelo sometido a distintos tratamientos



Temperatura: el proceso ocurre lentamente a bajas temperaturas (2°C) y la velocidad de pérdida de nitratos aumenta con la temperatura. El óptimo para algunos autores se sitúa en el rango **termófilo** (40-75°C). La desnitrificación a bajas temperaturas tiene gran significado agrícola ya que posibilita pérdida de nitrógeno en las estaciones frías cuando el suelo no posee una cubierta vegetal que absorba a los nitratos. Es aconsejable mantener una vegetación extendida que puede luego ser enterrada evitando pérdidas de nitrógeno.

El cuadro 8 muestra el efecto de la temperatura de incubación en la desnitrificación de nitratos en 30 días en suelo inundado con glucosa. Se verifica el óptimo en el rango termófilo.

Cuadro 8 - Pérdidas de N en un suelo inundado con nitratos y glucosa a distintas temperaturas (% N-NO3⁻ agregado)

temperatura °C	2	10	13	16	20	25	30	40	50	60	70
N-perdido	20	80	80	83	85	87	92	91	90	92	0

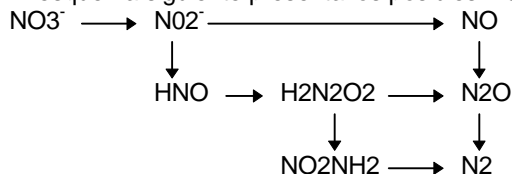
La vegetación ejerce también un doble efecto sobre la desnitrificación: aporta donadores de electrones por exudación, restos de raíces, mantillo y, por otro lado, compite con las bacterias por el nitrato disponible, reduciendo las pérdidas por volatilización. El efecto neto parece ser **estimulante** y el número de bacterias desnitrificantes es elevado en la rizosfera. La profundidad limita el proceso por disminución de la materia orgánica.

En resumen La desnitrificación requiere aporte de compuestos orgánicos rápidamente metabolizables, o bien minerales, para los autótrofos (S⁰, Fe⁺⁺, H₂), alto nivel de nitratos y pobre drenaje. Pero la magnitud del proceso está también gobernada por la temperatura, el pH, la humedad, que regula la aireación. La volatilización es importante en aguas estancadas y en suelos bien drenados y con activa nitrificación, que sufre períodos de anaerobiosis parcial en épocas de lluvias o luego de la aplicación de restos orgánicos. Es menor en suelos permanentemente anegados por la imposibilidad de formación de nitratos. Las pérdidas son importantes en zona tropical y en la zona templada en praderas. Cerca de la superficie del suelo el nivel de materia orgánica, nitratos y microflora activa es mayor y se sugiere que allí es donde se forma mayor cantidad de nitratos que se pueden desnitrificar antes de llegar a la zona radical, en anaerobiosis.

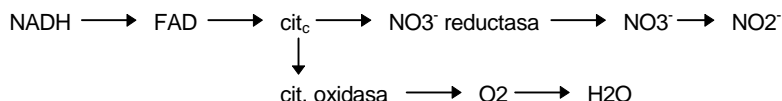
Como práctica agrícola conservacionista se aconseja agregar los donadores de electrones: materia orgánica como abonos verdes, rastrojos, etc. fraccionadamente en el tiempo, evitando su acumulación y el empleo de fertilizantes amoniacales y no nítricos e incluso el empleo de inhibidores de la nitrificación.

Bioquímica de la desnitrificación

El esquema siguiente presenta los posibles mecanismos:



La reducción de nitrato a nitrito es catalizada por un **nitrato reductasa**. En bacterias esta conversión constituye la primera etapa de dos vías metabólicas diferentes: una respiratoria que conduce a N₂O o N₂ (desnitrificación) y la otra asimilativa que lleva a NH₃. Algunas especies asimilan y respiran los nitratos: *Aerobacter aerogenes*, *Micrococcus denitrificans*. La nitrato reductasa de *P. aeruginosa* es una sulfhidril molibdo flavoproteína específica para NADH y funciona con el citocromo c:



La nitrato reductasa (Mo-Fe proteína no hemínica) es inhibida por el O₂ que reprime su biosíntesis. El paso siguiente: NO₂NO es mediatizado por una nitrito reductasa, que según el organismo es una hemoproteína con dos hemos de tipo c y d o una cuproproteína, ambas solubles, que emplean el NADH o FADH. Se formaría un intermediario hipotético, el nitroxilo, tal vez en forma de complejo con la enzima.

Bibliografía

- ALEXANDER, M., 1977 **Introduction to soil microbiology**, 2a. ed., Wiley and Sons (eds.), Nueva York.
- DOMMERGUES, Y. y F. MANGENOT, 1970 **Ecologie Microbienne du Sol**, Ed. Masson et Cie., París.
- FOCHT, D. D. y W. VERSTRAETE, 1977 Biochemical ecology of nitrification and denitrification, en **Advances in Microbial Ecology**, vol. 1, Alexander (ed.), Plenum Press, Nueva York, PP. 135-214.
- FRIONI, L. 1990 **Ecología Microbiana del Suelo**, Ed. Universidad de la República, Montevideo, 517 pp.
- GIAMBIAGI, N. 1969 Bacterias nitrificadoras, su actividad real y potencial en el curso del año en suelos de Pergamino y Marcos Juárez (Rep.Arg.) Rev.Ecol.Biol.Sol 6(3): 277-290
- GIAMBIAGI, N., M. Rimolo, y T. Pirolo 1993 Influence of drought on the production of mineral nitrogen in a typical Argiudol of the Pampas. Soil Biol Biochem 25(1): 101-108
- MORRIL, L. G. y J. E. DAWSON 1967 Patterns observed for the oxidation of ammonium to nitrate by soil organisms. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 31: 757-760
- NIELSON, D. R. y J. G. Mac DONALD (eds) 1978 Methods for analysis of denitrification in soils, en: **Nitrogen in the Environment**, vol 2, Academic press, New York
- SCHMIDT, E. L., 1982: Nitrification in soil, en: **Nitrogen in Agricultural Soils**, Agr. Monograph., 22 254-288.
- SIQUEIRA, J.O y A. A. FRANCO 1988 **Biotechnologia do Solo**. MEC-ESAL-FAEPE-ABEAS, Brasília, 235 pp.
- STEVENSON, F.J. 1986 **Cycles of Soil-Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients**, J.Wiley & Sons, New York
- WALKER, 1978: On the diversity of nitrifiers in nature en: **Microbiology**, D. Schlessinger (ed.), Am. Soc. Microb., Washington, D. C.

Capítulo 10

Ciclos biológicos del azufre, fósforo, hierro

Ciclo biológico del azufre

El azufre es otro elemento esencial para los organismos, integra la composición de:

- proteínas en los aminoácidos, metionina (21% de S) y cistina (27% de S), formando además puentes de azufre
- factores de crecimiento, como la biotina y tiamina.

En el suelo, la mayor reserva de este elemento es orgánica y en muchos casos constituye un factor limitante al desarrollo vegetal, que presentan claros síntomas de deficiencia. La respuesta a fertilizantes azufrados es rápida en esos casos. Los vegetales se nutren de preferencia de sulfatos, pero pueden asimilar también ciertos aminoácidos y formas volátiles de azufre por las hojas.

La atmósfera puede contener compuestos con azufre: SO₂, SH₂, provenientes de la actividad industrial, de la polución en las grandes ciudades y también de una actividad biológica intensa (Freney *et al*, 1983). La figura 1 presenta las transformaciones biológicas que sufren los compuestos con azufre que incluyen procesos de:

- **mineralización-inmovilización**
- **óxido-reducción**

Los procesos de fijación-volatilización no son importantes en el suelo, excepto las pérdidas de H₂S o anhídridos de azufre, en ciertas circunstancias. Tampoco son citadas reacciones de precipitación-solubilización de compuestos con azufre.

Como se observa las transformaciones que sufre este elemento en el suelo tienen mucha similitud con las del nitrógeno:

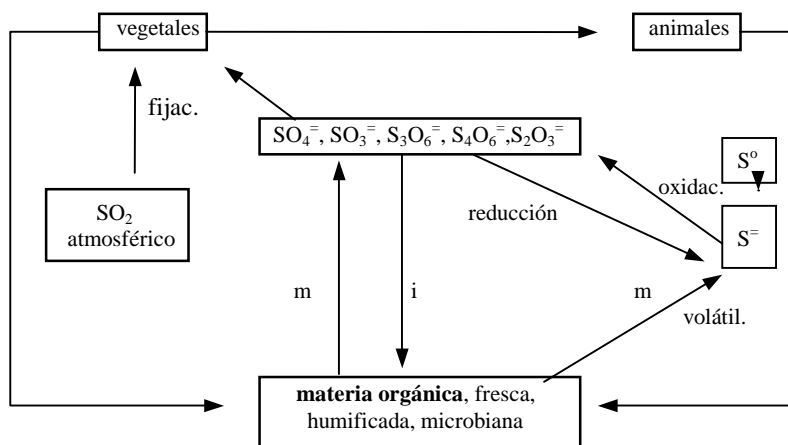
- la reserva en el suelo es orgánica
- la nutrición vegetal depende de la actividad mineralizante de la microflora del suelo
- la sulfooxidación es un proceso similar a la nitrificación en el plano bioquímico y ecológico
- la sulfhidrización, mineralización de compuestos azufrados orgánicos hasta sulfuros o H₂S, es muy similar a la amonificación
- la sulfatorreducción es una respiración anaerobia, como la desnitrificación, con las mismas consecuencias negativas en la nutrición vegetal pero importante para eliminar a la atmósfera sulfatos en aguas.

Sin embargo, ambos ciclos presentan algunas diferencias:

- la fuente primaria del nitrógeno del suelo lo constituye la atmósfera y en el caso del azufre, es la roca madre la que al meteorizarse provee de este elemento al suelo.
- el del azufre es considerado un ciclo **más complejo**; muchas de las transformaciones, sobre todo la sulfooxidación de innumerables compuestos con grado de oxidación intermedio entre sulfuros y sulfatos, no están bien dilucidadas.

El azufre retorna al suelo en residuos vegetales, animales, fertilizantes, lluvia; ciertos gases, como SO₂, H₂S llegan al suelo en cantidades importantes en zonas fabriles. Alexander (1977) cita valores de 100 kg/ha/año en regiones industrializadas de Europa y Estados Unidos.

Figura 1 - Transformaciones biológicas del azufre



Mineralización-inmovilización

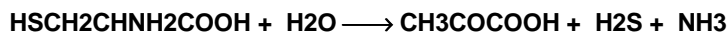
Los vegetales requieren sulfatos como fuente de azufre, el que deben reducir a forma sulfhidrilo (-SH) en sus células. La **mineralización** de las formas orgánicas de este elemento es un importante proceso microbiológico que asegura la provisión de sulfatos en la zona radical. Formas orgánicas como proteínas, aminoácidos, antibióticos como la penicilina, compuestos húmicos, ésteres sulfúricos, etc. son transformados en compuestos cada vez más simples por una micropoblación muy variada, en condiciones muy amplias de aireación, temperatura, pH, liberando finalmente compuestos inorgánicos, sulfatos y/o sulfuros.

La **inmovilización** incorpora estos iones a las células microbianas que compiten por ellos con los vegetales.

Como en el caso del nitrógeno, las combinaciones del azufre en el humus, conducen a una estabilización. Los productos finales están en parte gobernados por las condiciones del medio:

- **en aerobiosis** el producto final es el sulfato, acompañado de nitratos, CO₂, H₂O, fosfatos, etc.
- **en anaerobiosis**, como ocurre en el caso de la putrefacción de proteínas, se acumula H₂S y productos de mal olor como los **mercaptanes**: metilmercaptán (CH₃-SH), metil-etil-mercaptán (CH₃S-C₂H₅), tóxicos para los vegetales, junto a aminas, amidas, NH₃, fosfatos, sales ferrosas, CO₂, CH₄, ácidos orgánicos, alcoholes.

Los **aminoácidos** son rápidamente degradados en suelos bien aireados, con liberación de sulfatos. Los microorganismos heterótrofos pueden también liberar sulfatos de compuestos de estructura R-SH. La cisteína desulfhidrasa es responsable de la liberación de sulfuros a partir de **cistina**:



En el caso de la **metionina** puede aparecer sulfato luego de su incorporación al suelo, o bien la degradación puede ocurrir con formación de productos finales volátiles, metilmercaptán (CH₃-SH) y dimetildisulfuro (CH₃SSCH₃), realizado por bacterias y hongos.

La mineralización de compuestos azufrados y la liberación de formas minerales, reducidas u oxidadas (mineralización neta) depende, como en el caso del nitrógeno, del contenido de S%, de la relación C/S y a veces de la N/S.

La **relación crítica C/S** debajo de la cual el azufre excede las necesidades de la microflora y se libera al medio, varía como en el caso ya considerado del nitrógeno, con los materiales orgánicos que llegan al suelo, pero se puede establecer valores entre **100 a 150/1** (Dommergues, Mangenot, 1970). En general, las relaciones críticas son altas y sólo excepcionalmente los vegetales se ven perjudicados por la acción microbiana. En ese caso resulta favorable fertilizar con compuestos con azufre. Algunos microorganismos, sobre todo los anaerobios, que no pueden emplear sulfatos, porque no son

formados en ambientes carentes de oxígeno, pueden asimilar formas orgánicas del azufre, como los aminoácidos, proteínas, etc.

Las condiciones que favorecen a la **inmovilización** son las mismas que afectan a la **mineralización**, pero en sentido inverso:

- pH y temperatura bajas, humedades elevadas, restos vegetales con menos de 0,1-0,2% de S.

La **microflora** activa en la mineralización es muy amplia, una multiplicidad de especies de bacterias, hongos, protozoos, algas. Es la misma población que interviene en la mineralización de restos vegetales y animales que llegan al suelo y actúan en todas las condiciones compatibles con la actividad biológica.

Los factores que favorecen el crecimiento microbiano, favorecerán la liberación de sulfatos:

- aumento de temperatura en el rango mesófilo, la liberación de sulfatos es escasa debajo de 10°C y se eleva con la temperatura hasta 35°C
- encalado en suelos ácidos, una mejor aireación y humedades medias
- la desecación provoca liberación de sulfatos de la materia orgánica por vías no biológicas

En general, se piensa que el azufre se mineraliza al mismo rango que el nitrógeno, es decir entre un 1 al 3% al año en suelos de la zona templada.

Sulfooxidación

Numerosos compuestos inorgánicos del azufre con estado de oxidación menor que el sulfato (+ 6) pueden ser oxidados biológicamente o químicamente hasta sulfato:

sulfuros (-2); S⁰ (0); tiosulfato (+ 6 y -2); sulfitos (+ 4)

A diferencia de lo que ocurre en la nitrificación, en donde sólo un grupo pequeño de microorganismos autótrofos muy eficientes y una multiplicidad de heterótrofos poco eficientes son los responsables de la formación de nitratos, en la sulfooxidación intervienen:

1. **organismos quimioautótrofos** del género *Thiobacillus* aerobios y anaerobios
2. **bacterias quimiolitotrofas filamentosas** y sobre todo acuáticas de la familia *Beggiatoaceae*
3. **bacterias fotosintéticas sulfuradas purpúreas y verdes** de las familias *Chromatiaceae* y *Chlorobiaceae*
4. **un amplio número de microorganismos quimioheterótrofos variados.**

En el suelo son los thiobacilos y los organismos heterótrofos los que desempeñan un rol cuantitativamente más importante, los otros dos grupos son sobre todo acuáticos y las bacterias fotosintéticas requieren anaerobiosis y dosis altas de sulfuros.

1. **Thiobacteriaceae:** estas bacterias sulfooxidantes poseen la capacidad de obtener energía y poder reductor para su biosíntesis celular de la oxidación de compuestos inorgánicos del azufre. La actividad metabólica de las bacterias oxidantes del azufre y del hierro juega importante rol en distintos campos de importancia económica como son la purificación de minerales con uranio, cobre y otros metales, la corrosión de cañerías metálicas, en la tecnología del petróleo, polución de aguas y fertilidad de suelos.

Además de la habilidad para producir ácido sulfúrico, algunos de sus integrantes son capaces de reducir nitratos y otros óxidos del N hasta N₂, limitando la provisión de uno de los más importantes nutrientes nitrogenados. Mucha atención han recibido las transformaciones realizadas por miembros del género *Thiobacillus*, pero aún restan sin dilucidar mecanismos enzimáticos y la naturaleza de muchos intermediarios en la oxidación.

Los **thiobacilos** son:

- Gram negativos
- no esporulados
- algunos móviles por flagelo polar
- depositan el S⁰ fuera de la célula.

El género comprende 9 especies, de las cuales 5 son bien conocidas:

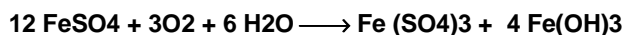
- 4 son autótrofas: *T. thiooxidans*, *T. thioparus*, *T. denitrificans* y *T. ferrooxidans*
- el *T. novellus* es autótrofo facultativo, que puede oxidar compuestos orgánicos e inorgánicos con azufre.

Aleem (1975) analiza las transformaciones de compuestos reducidos:

	$\Delta(\text{kcal/mol})$
1. $\text{H}_2\text{S} + 2^\circ\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$	- 160
2. $+ 1,5 \text{ O}_2 + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$	- 118
3. $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$	- 211
4. $5\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 8\text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 10\text{SO}_4^{2-} + 4\text{N}_2 + 2\text{H}^+$	- 893
5. $\text{SO}_3^- + 0,5 \text{ O}_2 \longrightarrow \text{SO}_4^-$	- 60
6. $+ \text{HS}^- + \text{H}_2\text{S} + 3\text{H}_2\text{O} + 3\text{NAD(P)} \rightarrow \text{SO}_3^- + 3\text{NAD(P)H} + 5\text{H}^+$	+ 186
7. $\text{SO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD(P)} \longrightarrow \text{SO}_4^- + \text{NAD(P)} + \text{H}^+$	+ 34

T. thiooxidans y *T. novellus* pueden realizar la reacción 3), *T. thiooxidans*, la 2). *T. denitrificans* obtiene energía de la reacción 4) utilizando también en anaerobiosis el S^0 como donador de electrones. En aerobiosis (es anaerobio facultativo) puede oxidar según las ecuaciones 2) y 3).

T. ferrooxidans puede realizar las reacciones 2) y 3) pero puede desarrollarse empleando la energía de la oxidación de sales ferrosas, en lugar de las formas reducidas del azufre:



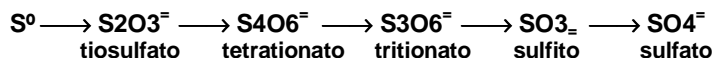
Todos los thiobacilos, con excepción del *T. novellus*, emplean CO_2 como fuente de carbono y sales amoniacales como fuente de N, incluso el *T. denitrificans* que no es capaz de asimilar nitratos.

El pH óptimo de las especies varía:

- para *T. thiooxidans* y *T. ferrooxidans* en la vecindad de pH 2,0 a 3,5
- para el resto predominan las preferencias en la neutralidad o ligeramente alcalino.

Salvo el *T. denitrificans* son **aerobios obligados**.

Se han propuesto diferentes esquemas metabólicos en la oxidación de compuestos con azufre. Algunos autores suponen pasajes por politionatos:



El rápido crecimiento de estos organismos, 2 horas de tiempo de generación cuando crecen a expensas de tiosulfato, y la relativa versatilidad del grupo, los hacen muy útiles para estudios fisiológicos asociados a modos quimioautótrofos de vida.

La **autotrofia obligada**, más extendida entre los nitrificantes, es una propiedad variable entre los oxidantes del azufre y está completamente ausente entre las bacterias del hidrógeno. Muchos estudios se realizan para tratar de explicar esta característica distribuida al azar entre los principales grupos de procariotas:

- la incapacidad de estos organismos de emplear fuentes orgánicas exógenas puede deberse a la ausencia de **permeasas** específicas que incorporen a las moléculas orgánicas. Pero esta teoría ha sido cuestionada pues se observó que muchos thiobacilos pueden incorporar el C^{14} -acetato cuando metabolizan sulfuros, aunque esta fuente contribuye con muy poco del carbono recientemente sintetizado
- la explicación más aceptada se basa en la ausencia de un **ciclo de ácidos tricarboxílicos** funcional por falta de la enzima **alfa-cetoglutarato deshidrogenasa** y a niveles muy bajos de succínico y málico deshidrogenasas. Al no poder mediatizar la oxidación de la acetil-CoA, el ciclo funciona como dos metabolismos separados puramente biosintéticos.
- los electrones en los organismos quimioautótrofos con excepción de las bacterias del hidrógeno, entran en la CTE por los **citocromos** con la intervención de piridín nucleótidos. La oxidación de la mayoría de los compuestos orgánicos es vía NADH, que podría estar impedida en estos organismos.

La cadena transportadora de electrones de los microorganismos autótrofos es poco conocida en detalle.

2. Las bacterias filamentosas deslizantes del grupo *Beggiatoa-Thiotrix* son características de medios ambientes acuáticos ricos en sulfuros o suelos hidromórficos. Contienen frecuentemente inclusiones de azufre en sus células que pueden oxidar a sulfato.

3. Las bacterias fotosintéticas sulfurosas purpúreas de la familia *Chromatiaceae* y las sulfurosas verdes de la familia *Chlorobiaceae* emplean sulfuros y acumulan S^0 en las células que puede ser luego oxidado a sulfatos. Dominan en barros y en anaerobiosis donde se acumulan sulfuros.

4. Microorganismos heterótrofos: numerosas especies de bacterias aerobias, hongos y levaduras pueden oxidar formas reducidas de azufre, aunque la energía liberada sólo representa una pequeña porción de la que la célula necesita. Numerosos hongos pueden liberar sulfatos de moléculas orgánicas como proteína-tiourea, con rendimiento energético menor que los thiobacilos. Se discute el rol de los microorganismos heterótrofos en la oxidación de compuestos azufrados pues si bien su rendimiento es bajo, éste puede ser compensado por su alta densidad en algunos ambientes.

Ecología de la sulfooxidación

- En suelos inundados son las bacterias fotosintéticas y las *Beggiatoaceae* los principales organismos en la oxidación del azufre
- En aireación estos grupos no son los dominantes y los thiobacilos y los organismos heterótrofos son los responsables del proceso.
- La humedad debe favorecer los intercambios gaseosos ya que la microflora es aerobia, excepto el *T. denitrificans* que debe encontrar alto nivel de nitratos y anaerobiosis para reducir sulfuros y otros compuestos reducidos.
- El encalado de suelos ácidos favorece la acción de la población sulfooxidante. En general el pH no desciende demasiado en los suelos pues la vegetación se encarga de asimilar los sulfatos a medida que éstos se van produciendo. Existen situaciones en las cuales la acumulación puede ser importante y entonces el pH puede descender algunas unidades con el consiguiente inconveniente en el desarrollo vegetal.

El suelo puede recibir grandes cantidades de **azufre en polvo** cuando se desea corregir suelos alcalinos o en la lucha contra actinomicetes patógenos de papa o batata, como el *Streptomyces scabies*. En ambos casos la actividad de los thiobacilos asegura rápida formación de ácido sulfúrico que baja el pH a niveles no soportados por estas especies. Ciertos ambientes anegados, ricos en materia orgánica y sulfuros de piritita (FeS_2), cuando son drenados y expuestos al aire los oxidan hasta sulfatos, el pH cae debajo de 4,0 y los vegetales pueden perjudicarse.

La aplicación de **inoculantes** granulados con **azufre elemental y fosfato de roca inoculado con thiobacilos** permiten aportar a las pasturas sulfatos y fosfatos más rápidamente en el trópico húmedo que en regiones templadas y áridas. El ácido sulfúrico formado ayuda en la solubilización de:

- **fosfatos tricálcicos**, llevándolos a fosfato di y monocalcico, asimilables por las plantas
- compuestos de manganeso (a partir de Mn^{+4}), K, Ca, Al, Mg

La sulfooxidación tiene consecuencias nefastas en la **corrosión aerobia** de diversos materiales, como cemento, piedra y metales por la intervención de un conjunto de especies que llevan la oxidación hasta la formación de ácido sulfúrico. Estos materiales se disuelven literalmente con el consiguiente deterioro en monumentos, edificios, etc. Los sulfuros provienen del suelo o de la polución atmosférica.

Sulfatorreducción

La **reducción asimilativa** de sulfatos es similar a la de los nitratos y es realizada por la biomasa microbiana.

La **reducción desasimilativa** la realizan las bacterias sulfatorreductoras, que oxidan compuestos orgánicos e H_2 y emplean a los sulfatos como **aceptores de electrones** en la cadena transportadora anaerobia. Su rol en el ciclo del azufre es similar al de las bacterias desnitrificantes, con la diferencia que éstas son estrictamente anaerobias y aquéllas, anaerobias facultativas. Esta actividad es muy

evidente en zonas de barro, en el fondo de estanques y lagos y a lo largo de la costa del mar. Signos de este proceso son:

- **fuerte olor a sulfhídrico**
- **manchas negras** de los barro y suelos donde ocurre a causa de la precipitación del sulfuro ferroso (SFe)

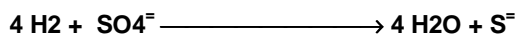
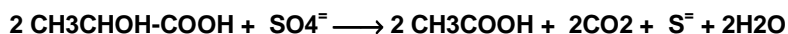
En ciertas zonas donde la acumulación de materia orgánica es importante y el nivel de sulfatos en aguas freáticas es muy alto, la sulfatorreducción puede convertir en inhóspita la región para la vegetación a causa de la toxicidad del H₂S.

La **rizosfera** de muchos cultivos puede favorecer el proceso por la exudación de materiales carbonados. Estos cultivos no se desarrollan normalmente en suelos salinos, con alto nivel de sulfatos, anegados y donde la temperatura es alta, y los pH neutros. El proceso es retardado por aereación o el agregado de nitratos, sales férricas o mangánicas, que permiten elevar el potencial de óxido-reducción.

La **microflora** responsable está confinada a dos grupos de anaerobios estrictos: formadores de esporas del género *Desulfotomaculum* y asporógenas del género *Desulfovibrio*. Son típicos habitantes de sedimentos anaerobios con materia orgánica y sulfatos, resultando en una masiva generación del gas H₂S. Esta actividad permite, también en anaerobiosis, la actividad de las bacterias fotosintéticas sulfurosas (púrpuras o verdes) que emplean el H₂S como donador de electrones en la fotosíntesis, reoxidándolo en anaerobiosis y a la luz, constituyendo un verdadero ciclo.

Los sulfatorreductores del género *Desulfovibrio* son Gram negativos, asporógenos, bacilos curvados o vibrioides, con flagelos polares. No pueden emplear el acetato, que se acumula como producto final en la oxidación de sustratos orgánicos. Emplean malato y lactato, obtienen energía por fosforilación a nivel del sustrato con participación de la acetil Co-A. En ausencia de sulfatos, algunos de estos microorganismos pueden fermentar piruvato, malato o fumarato.

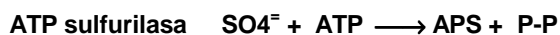
Las especies más conocidas son *D. desulfuricans*; *D. vulgaris*; *D. africanus* y algunos pueden emplear además de los donadores de electrones orgánicos, el H₂, aunque son incapaces de crecer en medio estrictamente mineral con CO₂ y requieren adición de acetato. La ecuación general es:



Los compuestos menos oxidados que los sulfatos (sulfitos, politionatos, tiosulfatos, S⁰) son reducidos más fácilmente que los sulfatos, ya sea en la vía asimilativa o en la desasimilativa.

Mecanismo enzimático

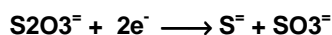
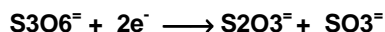
La reducción de SO₄²⁻ a S²⁻ implica la transferencia de 4 pares de electrones y en la vía desasimilativa se reconocen tres enzimas:



La conversión es similar a la oxidación de SO₃²⁻ a SO₄²⁻ por thiobacilos y bacterias sulfurosas purpúreas, con el APS intermediario, mientras que la vía asimilativa emplea adenilsulfato. La reducción del SO₃²⁻ a S²⁻ ha sido establecida recientemente con la identificación de una sulfito reductasa:



Otras dos enzimas (tritionato y tiosulfato reductasas) reducen tritionito a S²⁻ con producción de sulfito:



Los esporulados del género *Desulfotomaculum* realizan los mismos metabolismos, difiriendo solamente en la composición química de la sulfito reductasa. La vía que conduce a la asimilación de los sulfatos es más sencilla y no se acumulan intermediarios entre sulfito y sulfuro. La síntesis de ATP en la sulfatorreducción desasimilativa se forma en una cadena transportadora de electrones de la cual

se conocen varios componentes: **citocromo c3, citocromo del tipo b, quinonas, una flavoproteína, la ferredoxina.**

Ecología del proceso

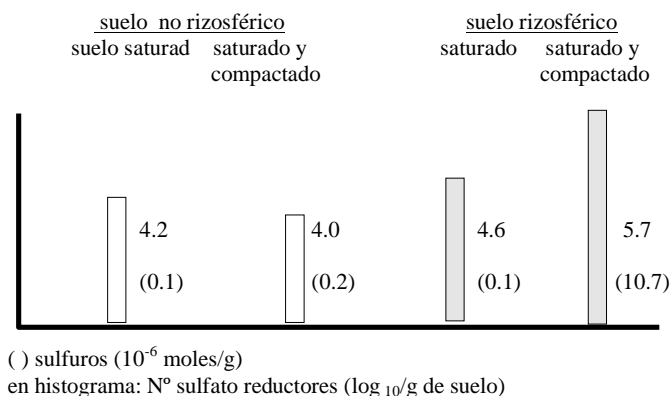
Las condiciones que deben reunirse para que el proceso ocurra son similares a las de la desnitrificación:

- **alto tenor en sulfato**
- **donadores de electrones orgánicos**
- **anaerobiosis** que se logran en suelos sometidos a hidromorfismo muy reductor, en suelos salinos con alto nivel en sulfatos y en la rizosfera.

Se aprecia el precipitado negro característico del sulfuro ferroso. El proceso es de consecuencias desfavorables para las plantas pues consume sulfatos, uno de los principales nutrientes y además el H₂S es tóxico para la mayoría de las especies. La precipitación como SFe elimina esta toxicidad. El suelo se alcaliniza localmente, los sulfuros dan origen a bases que forman carbonatos o bicarbonatos de sodio. En aguas, se favorece la eliminación de sulfatos, depurando los cauces de agua.

La figura 2 presenta resultados en suelo no rizosférico salino y en la rizosfera de plántulas de maíz creciendo en el mismo suelo. Se observa el efecto positivo en la interacción de un factor biológico: presencia o ausencia de raíces y factores físicos del suelo: saturación y compactación. Los donadores de electrones y las condiciones de anaerobiosis se reunieron en el suelo rizosférico, naturalmente salino.

Figura 2 - Sulfatorreducción en la rizosfera de maíz en suelo salino



Este proceso es responsable también de la **corrosión anaerobia de metales**. Los desulfobios actúan como agentes de despolarización, al consumir el H en las zonas catódicas de los metales, facilitando la reducción de los sulfatos a sulfuros.

Volatilización de compuestos azufrados

La carencia de métodos sensibles apropiados para la determinación de las distintas formas: H₂S; SO₂; metanotiol (CH₃SSCH₃), etanotiol (CH₃CH₂SH), disulfuro de carbono (CS₂), carbonil sulfuro (COS) de origen microbiano a partir de descomposición de restos vegetales, abono de granja, limitaron los estudios.

La cromatografía de gases permite determinaciones y mostró que la liberación se produce sobretodo en condiciones de anaerobiosis y no en todos los suelos. Dimetilsulfuro y pequeñas cantidades de carbonil sulfuro, S₂C, metilmercaptán y dimetildisulfuro, fueron los principales productos.

En condiciones normales de campo pequeñas pérdidas pueden atribuirse a esta causa. Gran cantidad de SO₂ llega a la atmósfera, pero proviene de fuentes de polución, industrias, automóviles, etc. Algo de SO₂ toma origen en la oxidación del H₂S liberado biológicamente. Este gas es muy tóxico para ciertas cianobacterias y líquenes y son empleados como indicadores biológicos de polución.

Las actividades del hombre contribuyen con más de la mitad de los compuestos azufrados en la atmósfera, con incrementos en los próximos años. En zonas industrializadas esta polución superará a la originada por vía biológica.

Ciclo biológico del fósforo

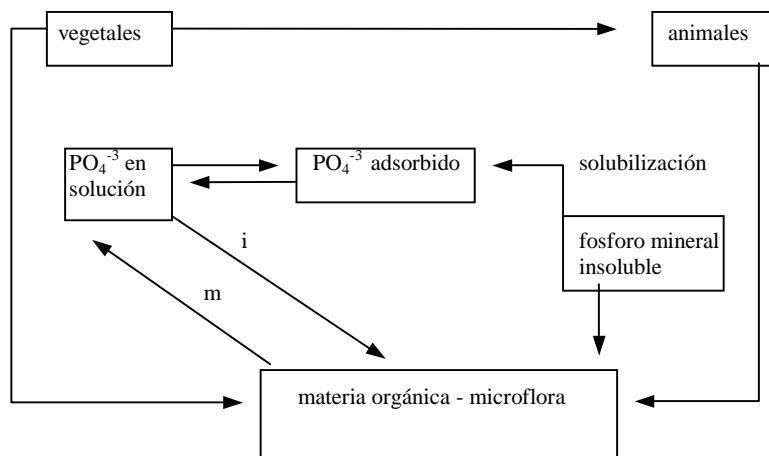
La figura 3 presenta los procesos de origen biológico involucrados en las transformaciones de este elemento. No son importantes los movimientos desde y hacia la atmósfera y en ciertas ocasiones, los compuestos fosforados pueden migrar hacia el mar donde se depositan como sedimentos insolubles.

El P constituye el segundo elemento en importancia para los vegetales y microorganismos, sólo superado por el nitrógeno. Forma moléculas ricas en energía (ATP, UTP, etc.). En el suelo es la fracción orgánica la que contiene la mayor proporción de fósforo (30 al 85% del P total), más alto en suelos ácidos:

- entre un 30-50% consiste en **fitina**, sobre todo como fosfato de inositol
- un 3% se encuentra en ácidos nucleicos
- un 1% en fosfolípidos, los más comunes: **lecitina**, **cefalina**, el fosfato es esterificado con una base.

Los cultivos agrícolas contienen aproximadamente 0,05 a 0,5% de P en sus tejidos y alrededor del 1% de todo el P de un ecosistema se encuentra en componentes vivos. En todas las combinaciones orgánicas e inorgánicas el P se encuentra como **fosfato (P+5)** de modo que los vegetales, animales o microorganismos no deben reducir a este elemento como lo hacen con compuestos oxidados de N o S.

Figura 3- Transformaciones biológicas de compuestos con fósforo



La mayoría del P orgánico integra **moléculas húmicas** formadas a partir de fracciones orgánicas de la vegetación, de los microorganismos y animales. En general se observa una buena correlación en los suelos entre los contenidos de C, N y P orgánicos (aproximadamente 100/10/1) y las relaciones C/P orgánicos varían entre 100-300/1 y el N/P varía entre 5-20/1 (Alexander, 1977).

Los procesos microbianos involucrados en las transformaciones del fósforo son:

- **mineralización-inmovilización**
- **solubilización-precipitación**

Mineralización-inmovilización

Un grupo amplio de microorganismos posee las enzimas necesarias (**fosfatasas**) para liberar fosfatos de moléculas orgánicas. Escasos estudios se han realizado con compuestos individuales fosforados y se cuenta con pocos detalles sobre la descripción de la microflora involucrada. Numerosas evidencias

indican importante rol del P orgánico (Porg) en la nutrición vegetal, se ha observado que esta fracción es la que disminuye en mayor proporción, por procesos de mineralización.

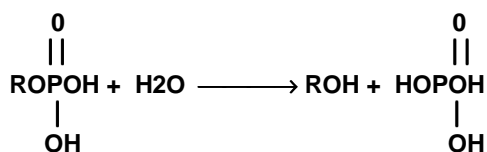
La parte del ciclo de mayor importancia para las plantas está resumida en el siguiente equilibrio (Tate, 1984):



La mineralización del P-orgánico depende en primer lugar de la actividad de los microorganismos, pero también de los invertebrados, sobre todo lombrices, que ejercen importante función acelerando hasta 2-3 veces la liberación de Pi en materiales vegetales por molienda y humectación. El flujo de P a través de la **biomasa microbiana** ha sido calculado en $4,6 \text{ kg P ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, del mismo orden del removido en grano y paja, en un suelo arable no abonado.

Se observa correlación entre la conversión del N y P a formas inorgánicas (8-15 partes de N mineral/1 de fosfato) y también se correlacionan la liberación de CO₂ y la mineralización de P (100-300 / 1); valores vinculados a las proporciones de estos elementos en el **humus**.

Las **fosfatasas** catalizan reacciones cuyo esquema general es:



Los sustratos pueden ser: **etilfosfato**, **glicerofosfato**, **fenilfosfato**. Las moléculas con diésteres (fosfolípidos, ácidos nucleicos) requieren diferentes enzimas para su degradación. Por comodidad, estas fosfatasas son designadas de acuerdo a los sustratos que atacan:

Fitasas: hidrolizan la unión éster-fosfato de sales solubles de ácido fítico o de sus sales de Mg o Ca: la **fitina**, liberando inositol y ortofosfato. Los fosfatos se liberan de a uno, dando penta, tetra, tri, di y monofosfato, para liberar finalmente inositol libre. Esta actividad enzimática está ampliamente distribuida entre los microorganismos del suelo: hongos, bacterias, actinomicetes.

La adición de materia orgánica aumenta la actividad por incremento de la población específica. El pH ácido y la adsorción a arcillas limitan la degradación. Fitasas vegetales contribuyen a la degradación de la fitina y ácido fítico.

Nucleasas: están ampliamente distribuidas y la liberación de ortofosfato es rápida en el suelo a partir tanto de ARN como de ADN. Para muchos microorganismos heterótrofos los ácidos nucleicos pueden ser empleados como única fuente de nutrientes y de energía y la liberación de Pi ocurre luego de la acción de enzimas despolimerizantes.

Fosfolipasas: los fosfolípidos más comunes en el suelo como la **lecitina** (fosfatidil colina) y la **fosfatidiletanolamina**, liberan Pi luego de hidrólisis enzimática, la población emplea el esqueleto orgánico de la molécula y el P necesario, el que excede la demanda microbiológica, es liberado.

Es frecuente evaluar la actividad fosfatasa incubando el suelo con sustrato apropiado como glicerofosfato, fenilfosfato y se determina el ortofosfato liberado por distintos procedimientos, como por colorimetría. La actividad es pronunciada en la rizosfera y es afectada también por la profundidad, la estación.

La presencia de fosfatasas y fitasas ha sido verificada en **ectomicorizas** de árboles y en endomicorizas V-A, que absorben más P-orgánico. a partir de suelos deficientes en este elemento (capítulo 17).

Las formas más solubles son directamente asimilados por las plantas. Los inositol-polifosfatos son considerados resistentes al ataque enzimático en el suelo por su capacidad para formar derivados insolubles con hierro y aluminio. Amonio y aminos pueden, sin embargo, formar complejos solubles con fitatos férricos.

Los ácidos orgánicos producidos por bacterias y otros microorganismos pueden ser también causa de liberación de fosfatos a partir de P-orgánico.

Las bacterias y actinomicetes acumulan mayor proporción de P (1,5-2,5%) en peso seco que los hongos (0,5-1%) o los vegetales (0,05-0,5%). En suelos cultivados se estima que las bacterias solas **inmovilizan entre 4 y 10 kg P/ha**. Si se considera que también lo toman hongos y actinomicetes, se aprecia que los valores inmovilizados son similares a los que son removidos por los cultivos. Las **relaciones críticas C/P** en los restos son altas, **100 a 300/1**, aproximadamente 0,2% en P (Alexander, 1977, Stevenson, 1986).

La deficiencia puede aparecer en caso de incorporación de grandes cantidades de restos carbonados, en donde una fertilización puede evitar la falta de este nutriente en los cultivos posteriores, pero en general los problemas graves de inmovilización se presentan en contadas situaciones con la incorporación masiva de rastrojos de muy pobre contenido en fósforo.

Procesos de óxido-reducción

Poca atención se ha prestado a los procesos de óxido-reducción llevados a cabo por la microflora del suelo en compuestos fosforados. Este elemento, como en nitrógeno, puede encontrarse en combinaciones desde fosfina (P^{-3}) a ortofosfato (P^{+5}). Algunos microorganismos heterótrofos pueden asimilar fosfito (HPO_3^{-2}) y oxidarlo a fosfato. En suelos húmedos, *Clostridium butyricum* puede reducir fosfato a fosfito e hipofosfito. Estas reacciones son biológicas ya que no ocurren al agregar inhibidores como el tolueno, al suelo.

En presencia de nitrato o sulfato la reducción de fosfato es más lenta ya que los primeros iones son empleados de preferencia como aceptores de electrones. Como estas reacciones no son importantes en la naturaleza, no han recibido mayor atención y son muy pocas las referencias bibliográficas.

Solubilización

Una proporción importante de fosfatos solubles agregados a suelos ácidos puede insolubilizarse o fijarse a coloides (adsorción). Muchos suelos contienen minerales, como la fluorapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6F_2$) o hidroxiapatita que se usan como fertilizantes, como el polvo de huesos, roca molida. Sin embargo, estas formas insolubles del fósforo pueden ser aprovechables por los vegetales luego de la acción **solubilizadora** de una microflora variada.

Gran número de especies bacterianas, de hongos y actinomicetes son capaces de solubilizar fosfato tricálcico y otras formas insolubles y su número puede alcanzar 10^5 - 10^7 /g. En la rizosfera la actividad puede ser muy intensa como consecuencia de la activa proliferación microbiana que puede disolver los fosfatos a lo largo de la raíz los que son inmediatamente absorbidos.

Los ácidos pueden ser:

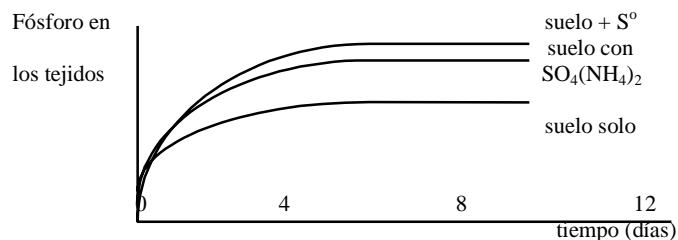
- **orgánicos y CO₂ (ácido carbónico)** producidos por la microflora y por las raíces
- **inorgánicos**, como nítrico, sulfúrico, también producidos por procesos microbianos

Se aislaron microorganismos solubilizadores de fosfatos en semillas y raíces de diferentes plantas. Un halo que rodea a la fuente insoluble de P_i en la superficie de cajas de Petri permite reconocer a los organismos solubilizantes. La detección de la acción de hongos puede ser dificultosa; el agregado de estreptomycin (50 mg/L) permite evidenciarlos sin la interferencia de las bacterias.

Mecanismos: la quelación (formación de complejos organo-metálicos) del calcio, hierro y aluminio por ácidos orgánicos, la formación de complejos fosfohúmicos y la competencia entre iones humatos y fosfatos por superficies adsorbentes, explican la solubilización.

La figura 4 muestra los resultados de una experiencia en la que se incorporó a un suelo azufre elemental y sulfato de amonio y se comparó el nivel de fósforo soluble por la absorción de este elemento en un cultivo.

Figura 4 - Asimilación de P por vegetales a partir de fosfato tricálcico



Thiobacillus producen ácido sulfúrico a partir de azufre elemental y se emplea este principio en la formulación de un fertilizante fosforado, el "**biosuper**", en gránulos con 5 partes en peso de fosfato de roca molida, una parte de S⁰ y un inóculo de thiobacilo (0,1%), de gran éxito en climas muy húmedos y resulta una alternativa en países que no pueden preparar superfosfato en cantidades importantes.

La producción de ácido nítrico por los microorganismos nitrificantes es otra manera de incrementar la solubilización de fosfatos, como se observa en la experiencia de la figura 3 y de ácido sulfhídrico en condiciones anaerobias facilita la solubilización ya que se forma sulfuro ferroso insoluble y se libera ácido fosfórico. Este proceso explica la gran disponibilidad de fosfatos en suelos inundados de arroz.

El **efecto rizosférico** favorable a la solubilización ha sido puesto en evidencia en numerosos trabajos. La inoculación de vegetales con cultivos solubilizantes del fósforo ha sido aplicado en algunos países como España (Azcon *et al.*, 1976) quienes inocularon con **hongos micorríticos y bacterias solubilizadoras del fósforo**. No hubo respuesta en otros ensayos, debido presumiblemente a la abundancia natural de organismos solubilizadores en los suelos.

Conclusiones: La **mineralización** está asegurada por una micropoblación poco específica que emplea al P en sus necesidades plásticas y libera el exceso como ortofosfato. La inmovilización, proceso simultáneo y opuesto, no es un peligro de competencia con los vegetales salvo en el caso de la incorporación de grandes cantidades de rastrojos con muy bajo nivel de P%. El nivel crítico se considera **0,2% en P total, y las relaciones C/P críticas son altas**.

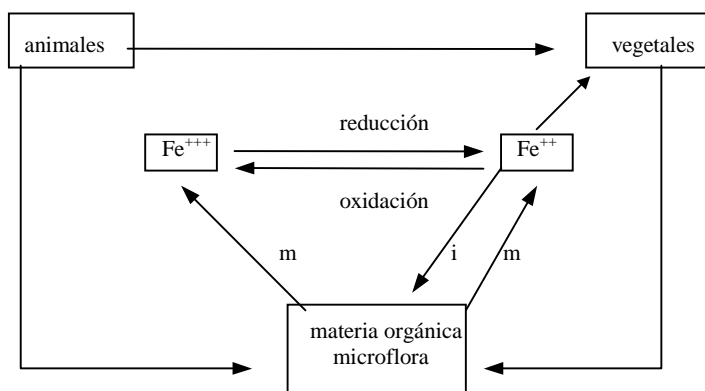
Los procesos de **oxidorreducción** no tienen gran importancia en la naturaleza. El proceso más importante lo constituye la **solubilización** de formas insolubles del P como fosfato tricálcico, hidroxiapatita, etc., que es realizado por una población inespecífica por la liberación de ácidos orgánicos o minerales.

Ciclo biológico del hierro

Las transformaciones microbiológicas de gran número de minerales tienen gran importancia en la recuperación de subproductos de la minería, actuando como verdaderos concentradores de metales que se encuentran en pequeñas dosis. Procesos microbianos transforman nutrientes minerales en formas disponibles para otras formas de vida.

El **hierro** sufre una serie de procesos de naturaleza física, química o biológica y a pesar de ser uno de los principales constituyentes de la corteza terrestre, se presenta frecuentemente en forma no disponible para los vegetales como (Fe^{+++}) y los ejemplos de carencias son frecuentes. La figura 5 presenta las transformaciones de origen biológico que ocurren entre los compuestos con hierro.

Figura 5 - Transformaciones biológicas del hierro



Los procesos biológicos de compuestos con hierro pueden resumirse:

- **mineralización** \longleftrightarrow **inmovilización**
- **oxidación** \longleftrightarrow **reducción** (el Fe^{+++} precipita como hidróxido)
- **solubilización** \longleftrightarrow **precipitación**

Resultante de la actividad biológica el hierro puede ser: **precipitado** en la naturaleza por acción de bacterias oxidantes del Fe^{++} , por la acción de heterótrofos que degradan la fracción orgánica de complejos organo- metálicos, por la liberación de O_2 por algas y por la creación de medios alcalinos

- **solubilizado** por la formación de ácidos, la presencia de condiciones de reducción o por la formación de ciertos complejos.
- **mineralización e inmovilización** son procesos realizados por variada microflora heterótrofa activa en amplios rangos de condiciones ambientales. No se señalan casos de problemas en la inmovilización de iones ferrosos en parte por el hecho de que los restos vegetales requieren este elemento en pequeñas cantidades.

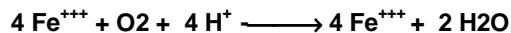
Oxidación

Químicamente, el ión ferroso predomina en solución debajo de pH 5 y el férrico sobre 6. Los cambios de pH de la solución del suelo pueden alterar el estado de oxidación de este elemento. El potencial de oxidorreducción también determina la forma dominante: debajo de 0,2 voltios es el ion ferroso el que predomina. Es difícil entonces, en este elemento, determinar cuándo los procesos son biológicos o simplemente físico-químicos.

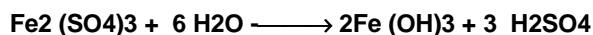
Las llamadas **bacterias del hierro** oxidan sales ferrosas con generación de ATP en CTE aerobia. Precipita hidróxido férrico alrededor de las células, frecuentemente en cápsulas o vainas dando colonias floculentas que típicamente crecen adheridas a las paredes de tubos con medio líquido. Se desarrollan de preferencia en aguas pobres en materia orgánica soluble, provistas de O₂ y con sales ferrosas o manganosas.

Los géneros más conocidos son: *Sphaerotilus* en cuyas vainas se deposita óxido férrico. Pueden crecer rápidamente como quimioheterótrofos y así se aíslan en cultivo puro. No se conoce el rol de la deposición de hidróxido férrico: si es un proceso de significado fisiológico y si pueden desarrollarse quimioautotóricamente. La quimioautotrofia es más evidente en otra bacteria no relacionada a la anterior: *Gallionella* que no crece en medios orgánicos y sí en medio mineral con depósito de SFe como fuente de Fe⁺⁺. Resulta difícil obtenerla en cultivo puro. La mayoría de las colonias algodonosas obtenidas están formadas en su mayor parte por hidróxido férrico y las bacterias están localizadas en ramificaciones terminales de los depósitos de Fe (OH)₃.

Otros microorganismos comprometidos en la oxidación: *Leptothrix*, quimioautótrofo facultativo, puede obtener energía también de la oxidación de compuestos orgánicos; *Thiobacillus* y *Ferrobacillus*. Obtienen energía de la oxidación:



El organismo está frecuentemente recubierto por vaina de Fe (OH)₃ que se origina posiblemente por vía biológica:



Muchas cepas pueden emplear en lugar de sales ferrosas, compuestos de azufre reducidos: S⁰, S⁻ o S₂O₃⁻. La oxidación del hierro es realizada por sistema transportador de electrones localizado en la membrana e incluye **citocromos del tipo c y a**. No se sabe si la actividad está confinada en la membrana interna o si reside en ambas: externa e interna. Ciertos thiobacilos (formalmente llamados *Ferrobacillus*) son incapaces de oxidar tiosulfato, y otros son incapaces de oxidar S⁻. Otras cepas que aparentemente están adaptadas a crecer con glucosa, pierden la habilidad para crecer autotóricamente con hierro. Esta variabilidad entre bacterias relacionadas estaría ligada a la presencia de un plásmido.

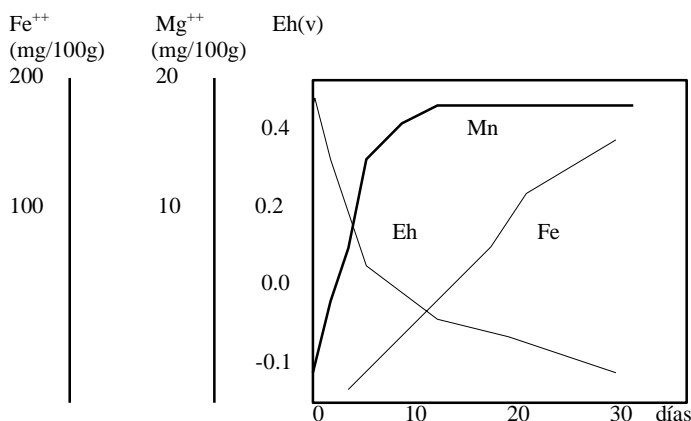
Microorganismos **heterótrofos** están también vinculados a la oxidación y precipitación del hierro, pero resulta difícil determinar si el proceso es biológico y puramente físico-químico. Poco o nada de la energía liberada es utilizada por los organismos. Muchas veces el hidróxido férrico se deposita en la superficie creando una masa compacta mezclada con materia orgánica en desagües instalados en suelos mal drenados. El mismo proceso ocurre en el interior de gasoductos produciendo serias oclusiones.

Reducción

En suelos mal drenados o sometidos a períodos de anaerobiosis el hierro al estado ferroso se hace predominante. El proceso de reducción del ion férrico a ferroso es casi exclusivamente biológico, ya que no se detectan mayores cambios en suelos estériles o con agregados de inhibidores metabólicos.

La figura 6 publicada por Frioni, (1990) muestra lo que ocurre en ambientes sometidos a anegamiento: el potencial de óxido-reducción (Eh) desciende provocando la reducción rápida del hierro y del manganeso. La materia orgánica estimula el proceso, comparable desde el punto de vista metabólico con la denitrificación y la sulfatorreducción, es decir respiraciones anaerobias con sustratos orgánicos. En medios ácidos no se requieren potenciales redox tan bajos para solubilizar el hierro.

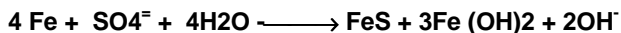
Figura 6 - Potencial redox e iones Fe^{++} y Mn^{++} en suelo anegado



Otro mecanismo biológico indirecto está relacionado a la liberación de sustancias orgánicas de carácter reductor por parte de los microorganismos del suelo: ácidos orgánicos, aldehídos, que provocarían ligera reducción del hierro. El consumo de O_2 por microorganismos aerobios, provoca descenso del potencial redox del suelo y reducción del hierro.

La **microflora** responsable de la reducción de iones férricos en anaerobiosis es muy numerosa en el suelo y su densidad puede alcanzar valores de 10^4 - 10^6 células/g. Entre las bacterias se citan especies de *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Serratia*. Muchas son anaerobias facultativas y pueden emplear además del oxígeno, nitratos y manganatos como aceptores de electrones.

Consecuencia de este fenómeno es la **corrosión anaerobia** de materiales de hierro o acero enterrados en períodos de deficiencia en O_2 . Gasoductos, oleoductos y cañerías pueden inutilizarse en pocos años. Cuando se reúnen condiciones de anaerobiosis, temperaturas medias pH superiores a 5,5 y presencia de sulfatos, las consecuencias son más graves. Bacterias anaerobias del género *Desulfovibrio* contribuyen a la corrosión produciendo H_2 y electrones libres:



Otra consecuencia del proceso es la aparición en suelos hidromórficos de horizontes de reducción, o **gley**, de coloración **gris verdosa o azulada**, debida fundamentalmente al hierro ferroso. Puede precipitar sulfuro ferroso, de color negro. La presencia de donadores de electrones orgánicos es necesaria en la reducción. Este fenómeno puede reproducirse en una columna de suelo enriquecida con un azúcar en anaerobiosis parcial o completa (columna de Winogradsky, capítulo 3).

El líquido toma las coloraciones típicas del hierro al estado reducido y la velocidad de desaparición del azúcar y la aparición de Fe^{++} tienen la forma sigmoide típica del crecimiento bacteriano.

Formación de complejos orgánicos

Productos del metabolismo microbiano: ácidos orgánicos, aminoácidos, etc., metabolitos de origen vegetal y microbiano y moléculas derivadas del humus pueden formar una variedad de complejos con

iones metálicos entre ellos, con el hierro. Estas moléculas tienen mucha importancia en el plano pedológico pues explican la migración en el perfil de éste y otros elementos. Las moléculas como **citrato férrico, lactato o succinato férrico** pueden migrar en un suelo a pH 5,0 mientras que en estado libre, este ion es insoluble.

Las sustancias complexantes de origen microbiano: ácidos cítrico, oxálico, fumárico, 2-cetoglucónico, láctico, pueden solubilizar diversos elementos, como el potasio, calcio, fósforo, hierro y numerosos oligoelementos, sobre todo acumulados en suelos en anaerobiosis o microaerofilia.

Los **sideróforos** son moléculas de gran afinidad por el Fe^{+++} producidos por microorganismos y plantas y contribuyen a la toma de este elemento en ambientes de baja disponibilidad. Proteínas de membrana permiten la entrada del complejo organo metálico. En la célula éste se desdobla liberando el ion férrico que es oportunamente reducido por enzimas microbianas y asimilado. Estas sustancias juegan importante rol en la **lucha biológica**, en competencia por el hierro con microorganismos fotopatógenos (capítulo 18).

Cuando el complejo organometálico se mineraliza por acción de heterótrofos, el hierro es liberado y precipita como sales insolubles férricas. La reacción puede ocurrir tanto en anaerobiosis como en ausencia de aire y es realizada por un gran grupo de bacterias, actinomicetes y hongos.

Bibliografía

ALEEM, M. I. H., 1975: Biochemical reaction mechanisms in sulfur oxidation by chemosynthetic bacteria, *Plant and Soil*, 43: 587-607

ALEXANDER, M., 1977: **Introduction to Soil Microbiology**, 2a. ed., Wiley and Sons, Nueva York.

AZCON, R.; J. M. BAREA y D. S. HAYMAN, 1976: Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizae fungi and phosphate solubilizing bacteria, en *Soil Biol. Biochem.*, 8(2): 135-138.

DOMMERGUES, Y.; F. MANGENOT, 1970: **Ecologie Microbienne du Sol**, Masson et Cie., París.

FRENEY, J. R.; M. V. IVANOV y H. RODHE, 1983: The sulphur cycle, en: **The major Biogeochemical Cycles and their Interactions**, B. Bolin y R. B. Cook (eds.), *Scope* nº 21, Wiley and Sons, Chichester: 56-65.

FRIONI, L. 1990 **Ecología microbiana del suelo**, Depto. Publicaciones de la Universidad de la República, Montevideo, 517 pp.

STEVENSON, F.J. & M. A. COLE 1999 **Cycles of Soil-Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients**, J.Wiley & Sons, New York

TATE, K. R., 1984: The biological transformation of P in soil, *Plant and Soil*, 76: 245-256.

Capítulo 11

Procesos microbianos en el rumen

Los microorganismos que habitan el tracto gastrointestinal de vertebrados herbívoros son los principales agentes de la asimilación de hidratos de carbono complejos ingeridos por el animal. La biología y ecología de esta población microbiana es muy similar en la mayoría de las especies animales. La selección de especies y la adaptación de las poblaciones microbianas está determinada más por la dieta y el tiempo de retención que por el huésped, sea éste rumiante o no-rumiante.

Analizaremos en forma sumaria el rol de la microflora en un ambiente muy particular, con muchos caracteres de un sistema de **cultivo continuo** y conocido como **rumen**, los principios de la degradación anaerobia por fermentaciones de materiales vegetales, principalmente celulósicos y amiláceos contenidos en la alimentación y el rol de varias especies de bacterias, protozoos y hongos, en este proceso.

Todos los animales herbívoros poseen una porción dilatada en su tubo digestivo donde los alimentos fibrosos voluminosos, que forman gran proporción de su dieta, pueden ser detenidos y sufrir una serie de fermentaciones, que los hacen disponibles para su asimilación.

En los rumiantes, esta porción está representada por el **rumen**, que es un pre-estómago complejo de tamaño considerable, y en menor grado por el ciego y el colon. Otros herbívoros, como el conejo y el caballo presentan un ciego muy agrandado, donde ocurren los procesos microbianos.

El **rumen** ha sido comparado a un **fermentador**: su temperatura y estado anaerobio son estables, las fluctuaciones de pH son limitadas. Pero se diferencia de un dispositivo industrial en que la composición química y la estructura de los sustratos ingeridos, varían amplia y rápidamente.

El **rumen**, es en esencia, un sistema anaerobio muy reductor en un medio ligeramente ácido, de pH fijo, isotérmico, de una temperatura de unos 39°C y con una fase gaseosa compuesta principalmente de CO₂, metano y nitrógeno. El pH se mantiene relativamente constante (6-7) por la absorción de los ácidos grasos por la pared del rumen o por neutralización por sistemas tampones de la saliva.

Los microorganismos que colonizan a los jóvenes animales por la ingesta, saliva, aire, heces son **estrictamente anaerobios**, aunque algo de O₂ es tolerado y si la fermentación es activa el Eh se mantiene en límites normales (-250 a -450mV).

Las **enzimas** para la fermentación son provistas por un significativo número de especies de bacterias, hongos y protozoos y el número relativo de las distintas especies varía con la composición y estructura del alimento. Por otra parte, las interacciones biológicas que se dan entre ellas son altamente complejas.

La proliferación continua de los microorganismos está asegurada por la ingestión periódica de los alimentos y el flujo continuo de saliva, el paso del contenido a lo largo del tracto digestivo y por la absorción de los productos finales del metabolismo a través de la pared del rumen. La autólisis de microorganismos asegura el desarrollo de otros microorganismos que se nutren de los productos liberados (canibalismo).

En general, los organismos sobreviven en este ecosistema si su tiempo de generación es menor que el tiempo de retención en este órgano. Muchos microorganismos pueden sobrevivir en situaciones de rápido tránsito por adhesión a las paredes o a partículas grandes de alimentos.

Generalmente, las especies dominantes en el rumen convierten la energía del sustrato en **biomasa**, resultando en menor formación de ácidos por unidad de sustrato. La selección natural también favorece el **máximo trabajo bioquímico** (Hungate, 1966), en general en relación inversa al tamaño celular.

Si bien la proporción de los productos finales varía, ellos consisten principalmente en: **CO₂, CH₄ y tres ácidos grasos volátiles (AGV): acético, propiónico y butírico, junto a amonio, trazas de otros ácidos grasos y algunas veces, ácido láctico.**

Microorganismos anaerobios con adaptaciones ecológicas y requerimientos nutritivos similares existen en silos, aguas servidas, en la biodegradación anaerobia de restos orgánicos. La diferencia más marcada es que en la biodegradación anaerobia en silos o aguas el tiempo de retención es mayor, con más eficiencia en la extracción de la energía del sustrato y proliferación de bacterias metanogénicas que poseen un tiempo de generación mayor (4 días) que el tiempo de retención de los sustratos. El resultado es que en estos ambientes no se acumulan ácidos grasos y los productos se degradan a CH₄ y CO₂ (capítulo 8).

Metodología de estudio

Se han empleado numerosas técnicas para estos estudios. **Suspensiones lavadas:** un gran volumen de contenido ruminal se filtra por tela y luego se centrifuga primero lentamente para eliminar los protozoos grandes y luego a mayor velocidad por 30' y se incuba con solución de fosfatos para regular el pH, en anaerobiosis con el sustrato a analizar. Se siguen procesos como la decarboxilación del ácido succínico y la reducción de los nitratos. Se aprecia generalmente correlación con los resultados obtenidos *in-vivo*. Esta técnica constituye un medio útil para estudiar con detalle las propiedades de la flora mixta del rumen luego de la eliminación de complicaciones como la absorción a partículas y la presencia de varios sustratos.

Rumen artificial: existen numerosos dispositivos para realizar los estudios *in-vitro* que tienden a simular las condiciones físico-químicas y ambientales del rumen natural. Estos se perfeccionan de modo de analizar efectos de poblaciones microbianas, condiciones vinculadas a la nutrición y factores ambientales. Constituyen verdaderos reactores con controles de entrada y salida de metabolitos, regulación de condiciones de incubación, como temperatura, pH, presión osmótica, etc. y permiten estudiar la degradación de diferentes sustancias por poblaciones microbianas solas o asociadas.

Aislamiento y cultivo de bacterias del rumen

La mayor dificultad en estos estudios radica en el mantenimiento de las condiciones de anaerobiosis durante el muestreo, siembra y cultivo de los microorganismos, muchos de los cuales viven asociados entre sí lo que dificulta su aislamiento.

Muestro y cultivo

El contenido ruminal se obtiene por succión luego de efectuar una homogeneización manual y después de una agitación suave bajo CO₂ y se filtra por gasa y se liberan las células adheridas a las partículas (0,1% de Tween 80, con 6-8 horas a 0°, o 0,1% de metilcelulosa). Se efectúan suspensiones-diluciones decimales en diluyente en anaerobiosis las que se inoculan e incuban en los medios escogidos para efectuar el recuento de bacterias, manteniendo siempre la **anaerobiosis**.

Se usan diferentes cámaras de incubación con atmósfera controlada, en general con suficiente CO₂, que mantiene el pH a niveles adecuados y es empleado por numerosas bacterias. Una mezcla con 95% de CO₂ y 5% de H₂ ha sido también empleada.

Stewart y Bryant (1988) resumen la composición de los medios **no selectivos** más empleados para recuento, aislamiento y mantenimiento de bacterias del rumen. Los recuentos se hacen en tubos con medio sólido, previamente fundido a 45°C antes de inocular, girado sobre las paredes hasta que el agar solidifica (*roll-tubes*). Las colonias quedan incluidas en el agar, a lo largo del tubo.

Además de los medios no selectivos, se emplean gran número de **medios selectivos**, que permiten evaluar grupos particulares, como amilolíticos, pectinolíticos, lipolíticos, metanogénicos.

Población microbiana

El cuadro 1 (van Soest, 1994) presenta los organismos descriptos en el rumen. Las bacterias pequeñas constituyen la mitad de la biomasa en rumen normal, pero son responsables de la mayor actividad metabólica (generalmente en relación inversa al tamaño celular).

Bacterias del rumen

Las bacterias del rumen son integrantes de un **consorcio** que realiza varias funciones vitales para el desarrollo del huésped (Stewart, y Bryant, 1991):

1) Las fibras y otros restos de polímeros vegetales no degradados por enzimas del animal, son fermentados a ácidos grasos volátiles, CO₂ y CH₄. Los AGV pasan las paredes del rumen hacia el sistema circulatorio y son oxidados en el hígado, constituyendo la mayor parte de la energía requerida por el huésped. También se usan en la síntesis de materiales celulares.

2) La fermentación está acoplada al crecimiento microbiano y las proteínas de la biomasa constituyen la principal fuente de nitrógeno para el animal.

Cuadro 1. Número y volumen relativo de microorganismos en el rumen

grupo	Nº/mL	vol celular μ ³	biomasa mg/100ml	tg	%de biomasa total
Bacterias pequeñas	1x10 ¹⁰	1	1.600	20min	60-90
<i>Selenomonas</i>	1x10 ⁸	30	300		
<i>Oscillospira flagellates</i>	1x10 ⁶	250	25		
Protozoos, ciliados					10-40
<i>Entodinia</i>	3x10 ⁵	1x10 ⁴	300	8h	
<i>Dasytricha</i> + <i>Diplodinia</i>	3x10 ⁴	1x10 ⁵	300		
<i>Isotricha</i> + <i>Epidinia</i>	1x10 ⁴	1x10 ⁶	1100	36h	
Hongos	1x10 ⁴	1x10 ⁵		24h	5-10

3) Los microorganismos del rumen sintetizan vitaminas, sobretodo del complejo B, empleadas por el huésped.

4) Algunas bacterias degradan componentes tóxicos de la dieta. Ejemplo son los aminoácidos **mimosina** y sus derivados, componentes del forraje de *Leucaena*, fenoles vegetales, como la **cumarina** (1,2 benzopirona), la **canavanina**, análoga de la arginina, componente de la leguminosa *Canavalia ensiformis*, que inhibe a algunas bacterias del rumen, pero es hidrolizada por otras.

El rumen incluye frecuentemente entre 10¹⁰ y 10¹¹ bacterias/ml, y más del 75% se asocia con partículas alimenticias. La densidad general no varía mayormente con la dieta pero el número relativo de las diferentes especies es afectado por la disponibilidad de sustratos para la fermentación. Orskov y Ryle (1990), señalan que probablemente varios cientos de especies de bacterias ocurren en este ambiente, pero sólo un 30% está presente en densidades de 10⁷/ml, en una o más especies de rumiantes.

Las bacterias del rumen son predominantemente **anaerobias estrictas**, pero coexisten **anaerobias facultativas**, adheridas a las paredes del rumen, que usan el O₂ que difunde del torrente circulatorio. Son más fáciles de aislar, aunque no son importantes en las funciones del rumen, pero se hacen dominantes en disfunciones de este sistema. Las más importantes son las que fermentan la celulosa.

Las **actividades bioquímicas** de las bacterias del rumen han sido estudiadas con cierto detalle. Los estudios *in-vivo* brindan información sobre el tipo de fermentación dominante, pero no sobre las actividades de cada especie. El examen microscópico directo del contenido ruminal proporciona considerable información, pero poca sobre las actividades de los microorganismos.

Muchas bacterias del rumen son muy especializadas con numerosos requerimientos nutricionales que deben ser aportados por el sistema. Gran número de ellas han sido aisladas en cultivo puro (Hungate, 1966). Algunas emplean pocas fuentes de energía, pero otras son más versátiles.

Microorganismos que emplean productos liberados por otros pueden representar más del 60% del número de especies y constituyen un importante grupo funcional. Productos liberados en cultivo puro no han sido detectados en el rumen: como etanol, succinato y formiato, debido al metabolismo compartido, relaciones sintróficas.

El concepto de **sintrofia** difiere del de simbiosis, en que más de 2 especies están involucradas y el beneficio mutuo se relaciona a las fuentes nutritivas de energía. Los grupos sintróficos relacionados a la degradación de fibras, incluye, por ejemplo, a los celulolíticos, hemicelulolíticos y microorganismos que los suceden, como las bacterias metanogénicas. Las más competitivas presentan adhesión al sustrato y almacenamiento efectivo de la energía dentro de la célula.

Las **Eubacterias** del rumen se caracterizan en base a : morfología y Gram, productos de la fermentación, rango de sustratos usados, relación molar (G+C)% de su ADN y en menor grado por la composición de ácidos grasos en los fosfolípidos. El cuadro 2 presenta las características de bacterias Gram negativas y Gram positivas del rumen (Stewart, 1991).

Veillonella parvula, por ejemplo, crece principalmente en lactato y *Anaerovibrio* en glicerol (liberado de los lípidos por lipasas) y fructosa. Las celulolíticas, como *Ruminococcus* y *Fibrobacter* crecen sobretodo en celulosa, aunque muchas especies hidrolizan hemicelulosas, pero en general no emplean los productos de la hidrólisis. *Bacteroidamylophilus* degrada almidón y azúcares derivados del almidón.

Bacterias versátiles incluyen *Butyrivibrio*, algunas de cuyas especies son celulolíticas, *Bacteroides ruminicola* y *Selenomonas*. *Clostridium polysaccharolyticum* es uno de las pocas bacterias del rumen capaces de emplear celulosa y almidón como sustratos.

Cuadro 2 Algunas bacterias G+ y G⁻ del rumen

especie	morfología	(G+C)%	productos	nicho
Gram positivas				
<i>Bacteroides ruminicola</i>	bacilo	49-50	AS	amplio: hidrol.proteínas
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	"	40-42	FAS	almidón
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	"	47-49	AS	celulosa
<i>Selenomonas ruminantium</i>	variada	54	LPA	amplio
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	bac. curvo	36-41	FBA	amplio
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	bacilo	ND	PSA	lipolítico
<i>Veillonella parvula</i>	cocos	38-41	AP H2	lactato
<i>Succinimonas amylolytica</i>	cocos	ND	S	almidón
Gram negativas				
<i>Ruminococcus albus</i>	cocos	42-46	A2 H2 CO2	celulosa
<i>R. flavefaciens</i>	cocos	39-44	AS H2	celulosa
<i>Streptococcus bovis</i>	cocos	37-39	L CO2	almidón
<i>Lachnospira multiparus</i>	bacilos	ND	FAL H2 CO2	pectina
<i>Eubacterium ruminantium</i>	bacilos	ND	FBL CO2	xilano
<i>E. oxidoreducens</i>	"	36	L H2	aromáticos ?
<i>Lactobacillus ruminis</i>	bacilos	44-47	L	azúcares
<i>L. vitulinus</i>	bacilos	34-37	L	azúcares
<i>Clostridium polysaccharolyticum</i> (esporas)	bacilos		FBA H2	celulosa/almidón
F=formiato; A=acetato; P=propionato; B=butirato; V=valerato; S= succinato; L= lactosa; ND= no determinado				

Las bacterias pequeñas constituyen más de la mitad de la biomasa y son muy activas: digieren hidratos de carbono: celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón y azúcares. Otras emplean celulodextrinas, pentosas, glucosa, lactato, succinato, formiato, H₂, como fuentes de energía.

Bacterias celulolíticas

La degradación de la celulosa es definida usualmente como la principal función del rumen. Las enzimas responsables de la degradación de la celulosa la presentan principalmente en bacterias. Los vertebrados carecen de estas enzimas.

Las bacterias activas en el rumen incluyen: *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Bacteroides succinogenes*, que se adhieren firmemente a fragmentos vegetales y segregan las enzimas hidrolíticas que liberan oligosacáridos solubles, sobretodo **celobiosa**, empleada por la microflora celulolítica y por otros microorganismos que no degradan a la celulosa. Si ésta no se hidroliza puede llegar a inhibir la adhesión de *B. succinogenes* a la celulosa y suprimir la actividad celulolítica de *R. albus*. La glucosa, otro producto de la celulolisis, puede inhibir también la actividad de algunas enzimas.

Muchas de las especies celulolíticas pueden también degradar la fracción mal llamada hemicelulosa.

En medios de cultivo, las bacterias producen metabolitos diferentes que en el rumen, ya que allí las bacterias están asociadas y los productos finales de una son empleados por otras. Así, *B. succinogenes* libera succinato a partir de celulosa, pero *in vivo*, éste es convertido por otras especies en **propionato**, uno de los principales productos de la fermentación.

Las bacterias celulolíticas colonizan la superficie de restos vegetales en los 5 minutos de su entrada al rumen. Como existe amoníaco, ellas se multiplican rápidamente. El agregado de urea al alimento, favorece esta multiplicación. Sin embargo, si el pH del rumen cae debajo de 6,0 el crecimiento de las bacterias y la celulolisis se hacen más lentas. Debajo de 5,6 su desarrollo cesa, de modo que la presencia en la dieta de productos que favorecen la acidez, inhiben la digestión de materiales fibrosos. Disminuyen también en presencia de sustratos competitivos, como el almidón.

Bacterias amilolíticas

La mayoría de las bacterias amilolíticas son incapaces de usar celulosa. Las enzimas amilolíticas están muy distribuidas entre las bacterias y son ellas las que aseguran la conversión de materiales amiláceos, como granos de cereales, en ácidos grasos volátiles.

Con amoníaco, el proceso es más eficiente. Así, *Streptococcus bovis* produce acetato y etanol cuando se multiplica lentamente, pero forma lactato si crece rápidamente. Esta especie es más tolerante a la acidez que la mayoría de las bacterias del rumen. No son muy abundantes, pero se hacen dominantes si la acumulación de ácido láctico sobrepasa la capacidad tampón del rumen. Severa acidosis (pH 5,0) puede ocurrir cuando la dieta se cambia abruptamente de celulosa a almidón o sacarosa.

La microflora que convierte lactato en acetato y propionato no está presente en número suficiente o se multiplica más lentamente que el *S. bovis* y es inhibida cuando el pH cae.

Hidratos de carbono solubles

Oligosacáridos y azúcares solubles, productos finales de la degradación de la celulosa, son empleados por numerosos microorganismos que los degradan obteniendo energía, de modo que la biomasa crece rápidamente. Se forma ATP, poder reductor (NADH) y ferredoxina reducida, que se reciclan por oxidación con liberación de H₂, que puede inhibir a las enzimas responsables. Otros mecanismos biosintéticos ocurren, con producción de propionato y butirato, pero esta diversificación puede limitarse en el rumen por las bacterias metanogénicas (**CO₂ + H₂ = CH₄**).

Este grupo puede producir más de 200 litros de CH₄ por día en una vaca de 500 kg. Este gas es expelido, en parte con el CO₂ por el animal. Condiciones que restringen la metanogénesis favorecen la producción de propionato e incrementan la **relación propionato/acetato** en los productos finales de la fermentación.

La metanogénesis promueve la síntesis de ATP, el crecimiento microbiano y la producción de acetato, con la pérdida de más de 15% de la energía del alimento, como metano.

Otras fuentes de energía

Lípidos

Sólo bajos niveles de lípidos (7%) son adecuados en la dieta del rumiante. A niveles más altos, la liberación de ácidos grasos por su hidrólisis inhibe la digestión de las fibras, posiblemente por recubrimiento superficial de las partículas que limita la adhesión bacteriana. Algunas bacterias convierten el glicerol liberado en AGV, otras hidrogenan ácidos no saturados convirtiéndolos en saturados

Proteínas

El catabolismo de proteínas y aminoácidos que libera amonio en el rumen es de gran interés en la nutrición del animal, aunque su exceso puede ocasionar problemas. El amonio es también requerido por microorganismos fermentadores, algunos de los cuales pueden también usar aminoácidos o péptidos.

Las proteínas de la microflora constituyen la fuente primaria de N para el animal.

La mayoría de las proteínas contenidas en la dieta son rápidamente hidrolizadas en el rumen. Parte de los aminoácidos son inmovilizados por bacterias y protozoos, los restantes son fuente de energía y son degradadas a AGV y amonio. El exceso de amonio es absorbido por el animal y convertido en urea en el hígado.

Ácidos grasos volátiles

En el rumen existen bacterias que usan AGV, pero como ellos son rápidamente asimilados por el animal, su número permanece bajo. Entonces, de los productos finales de la fermentación del rumen:

- a) los **AGV** son metabolizados sólo por microorganismos que no prosperan en el ambiente del rumen,
- b) el **CO₂** se produce más rápido que lo que se usa y constituye (dependiendo del tipo de fermentación) cerca de 65% de los gases expelidos por el animal y
- c) el **metano**, que constituye el resto del 35%, no puede aportar energía a los microorganismos en las condiciones anaerobias del rumen.

Hongos del rumen

El aporte de hongos *Phycomycetes* en las fermentaciones del rumen ha sido reconocido recientemente y pueden constituir hasta el 8% de la biomasa intra-ruminal. Los flagelados, con sus zoosporas móviles, se confundieron mucho tiempo con protozoos y colonizan regiones dañadas de los tejidos vegetales en las 2 horas de la ingestión en respuesta a materiales solubles. En las 22 horas más del 30% de las partículas mayores se aprecian invadidas por rizoides.

En cultivo puro algunos de estos hongos fermentan celulosa, liberando acetato, lactato, CO₂ e H₂. La celulosa liberada al medio incrementa la degradación. Hemicelulosas, xilanos, almidón y azúcares son también fermentados. La lignina no parece ser degradada por los hongos anaerobios del rumen.

Su principal rol parece relacionado a facilitar la desaparición de la pared celular.

Han sido identificadas especies de 4 géneros: *Neocallimastix*, *Caecomyces* (formalmente *Sphaeromona*), *Pyromyces* (formalmente *Phyromonas*) y *Orpinomyces* (Theodorou *et al*, 1992). Resultan más fáciles de cultivar que los protozoos y su ciclo de vida involucra un cuerpo de fructificación (esporangio), originado a partir de una zoospora móvil que se adhiere a las fibras y desarrolla esporangios y filamentos rizoidales, que penetran la matriz lignocelulósica, donde actúan las enzimas.

Los hongos liberan un complejo celulósico más soluble que el de las bacterias y atacan partículas rugosas a las que fermentan más rápidamente que las bacterias. Alimentos finamente molidos o altamente concentrados presentan menos hongos. Existe evidencia de que su inoculación puede incrementar la digestión de las fibras así como el desarrollo de jóvenes rumiantes.

Los hongos producen **AGV, gases y trazas de etanol y lactato**. Su contribución a la biomasa microbiana puede ser baja, como la de los protozoos, ya que se ubican en la ingesta de lento movimiento, evitando su rápido lavado. No son esenciales para la sobrevivencia de los rumiantes,

están presentes en bajo número o aún ausentes en animales con dieta baja en fibras, pero se piensa que contribuyen a la digestión de forrajes de baja calidad.

Se necesitan mayores estudios para evaluar las funciones de los hongos en el rumen, sus interacciones con los protozoos, bacterias celulolíticas, metanogénicas y otras especies que emplean H₂.

Protozoos del rumen

Constituyen los organismos más conspicuos en el rumen y en el tracto digestivo de algunos monogástricos herbívoros y su rol ha sido debatido por décadas. Forman gran proporción de la biomasa (20-40% del N microbiano), pero su contribución es menor por la gran retención y menor actividad metabólica. Su tiempo de generación es grande y la sobrevivencia en el rumen depende de las estrategias que reducen el lavado.

Un problema en la determinación del rol que cumplen en el rumen es la dificultad de crecimiento fuera de las bacterias que predan. Esta constituye su principal función: ingieren partículas del tamaño de las bacterias, como almidón, fibras, cloroplastos. Se piensa que la actividad celulolítica se realice por la flora bacteriana asociada. Algunos autores los consideran **minirumiantes** que albergan bacterias celulolíticas y otras que metabolizan lo que ellos ingieren.

La mayoría de los componentes son *Ciliata*, los organismos unicelulares más complejos. Su biomasa es en general similar a la de las bacterias, pero pueden sobrepasarla más de 3 veces según la dieta, o incluso desaparecer. Su densidad es del orden de 10^5 - 10^6 /ml. Las distintas especies varían en tamaño entre 25 a 250 micras, agrupados en 17 géneros de la sub-clase *Entodiniomorphes* y 2 géneros de la sub-clase *Holotriches*, que difieren en su morfología y metabolismo. Las especies presentes varían con la especie animal, la localidad, la dieta.

Los tiempos de generación varían entre 0,5 a 2 días. Los más lentos pueden desaparecer con los fluidos del rumen, pero varios permanecen adheridos a fragmentos de alimento, por lo que son más retenidos que las bacterias y una gran proporción (más de 2/3) pueden ser lisados en el rumen.

Los ciliados difieren de las bacterias en varios aspectos:

- a) son muy móviles e invaden a los alimentos recién ingeridos tan rápidamente como las bacterias, a pesar de su menor número.
- b) son capaces de almacenar hidratos de carbono adicionales en forma de un polímero insoluble, la **amilopectina**
- c) son más fácilmente destruidos por la acidez, los *Holotriches* son los más sensibles y los *Entodiniomorphes*, menos.
- d) no pueden sintetizar aminoácidos a partir de compuestos simples de nitrógeno y dependen de las bacterias, cuyos aminoácidos emplean luego de fagocitarlas (1% de las bacterias del rumen pueden ser fagocitadas por ciliados en cada minuto). Son responsables de la producción de gran parte del amonio en el rumen
- e) a diferencia de las bacterias, los ciliados del rumen no son esenciales para los procesos de fermentación, pero contribuyen a su eficiencia.

Ciliados celulolíticos

Pocos géneros de *Epidinium* están involucrados en la fragmentación de los restos vegetales. Secretan enzimas que promueven la separación de las células y la fragmentación del material. En condiciones adecuadas más de la mitad de la actividad celulolítica del rumen se asocia con los ciliados. La mayor actividad se da cuando la enzima es liberada luego de la lisis celular que ocurre por exposición al O₂ en la rumiación o por hipotonía causada luego de la ingestión de agua.

Ciliados amilolíticos

Todos los *Entodiniomorphes* emplean almidón, cuyo exceso almacenan como **amilopectina**. Sin embargo, uno de los dos géneros de *Holotriches* no puede usar almidón. La mayoría prefiere azúcares solubles y se mueven rápidamente hacia ellos. Se estima que más de 1/3 de los azúcares ingeridos por el animal puede convertirse en amilopectina.

Otras fuentes de energía: Los ciliados son responsables de del 30-40% de la lipólisis. Incrementan el contenido de ácidos grasos saturados. Un 75% de los lípidos microbianos están

normalmente asociados con los ciliados, por lo que su contribución al huésped puede ser significativa. No son muy importantes en la degradación de proteínas de la dieta, usan las de las bacterias fagocitadas.

El nivel proteico del rumen se incrementa cuando se eliminan los protozoos.

Eliminación de los protozoos: se logra por varios procedimientos: cambios en la dieta, agregando varios agentes químicos o aislando jóvenes animales. No se afecta mucho el metabolismo del rumen, pero puede alterar el balance de los productos: una dieta de granos con protozoos presentes produce alto nivel de butirato, mientras que sin ellos, domina el propionato.

Las funciones de los protozoos en el rumen son complejas. Su eliminación parece aumentar el rendimiento microbiano y la absorción de aminoácidos por el animal, que en dietas con pajas pobres, resultaría benéfico. Mientras que en dietas ricas en almidón, los protozoos tendrían otro rol **benéfico controlando la acidosis:** al **englobar partículas** indiscriminadamente, inducen una latencia en la fermentación del almidón, limitando la acidificación.

Obtención de energía por microorganismos del rumen

El rumen es un ambiente estrictamente anaerobio, los AGV son sus productos de excreción y son absorbidos directamente desde el rumen hacia el huésped constituyendo la principal fuente de energía. La fermentación de hidratos de carbono es la principal fuente de energía para los microorganismos anaerobios del rumen. Las proteínas contribuyen con menos del 1% del total de energía y el aporte por el glicerol es menor.

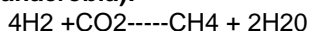
La fermentación de glucosa en los 3 principales AGV conduce a:

ácido acético: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3COOH + CO_2$

ácido propiónico: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3-CH_2-COOH + 2H_2O$

ácido butírico: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2$

Etapas finales: metano (respiración anaerobia):



El animal obtiene más energía cuando se produce **ácido propiónico** en relación al ácido acético. La liberación de H_2 y CH_4 (producto de desecho) es mayor cuando se forma ácido acético.

La principal pérdida de energía se da por la liberación de H_2 y CH_4 . Vemos que la producción de 2 moles de ácido propiónico a partir de un mol de hexosa, requiere H_2 adicional. El ácido propiónico actúa como ligando del H_2 y reduce la pérdida de energía por formación de metano.

Se aprecia la complejidad de este sistema biológico, muchos de cuyos aspectos han sido estudiados extensivamente, otros restan por investigarse.

Interacciones microbianas en el rumen

Las interacciones entre los numerosos microorganismos se comprenden mejor al comparar al rumen con un sistema dinámico y cambiante. Es precisamente la flexibilidad de este complejo sistema que hace posible la conversión de un amplio rango de sustratos en AGV de los cuales depende el rumiante para obtener energía.

Las interacciones metabólicas entre las distintas poblaciones del rumen resultan esenciales para sostener a la comunidad microbiana y sus actividades. Productos del metabolismo de algunos microorganismos son fuente de energía para otros. La liberación de vitaminas y productos del metabolismo del nitrógeno constituyen fuentes para otros microorganismos. El tipo y grado de estas interacciones regulan las concentraciones y actividades de especies individuales y la naturaleza cuali y cuantitativa de los productos de la fermentación de los sustratos ingeridos.

Interacciones nutritivas

Los rumiantes no requieren **vitaminas** del complejo B en su dieta. Sus requerimientos son satisfechos por la microflora del rumen. Es alto el número de especies que requieren biotina y ácido para-amino benzóico (PABA) o biotina y ácido fólico. La biotina se requiere para la descarboxilación del succinato a propionato, principal reacción en la fermentación del rumen.

Interacciones entre compuestos nitrogenados

Las proteínas de la dieta se convierten en proteínas microbianas. Numerosas especies presentan actividad proteolítica, liberando péptidos, aminoácidos y amonio. La principal fuente de N para la mayoría de las especies, es el amonio, aunque algunas especies no proteolíticas emplean aminoácidos.

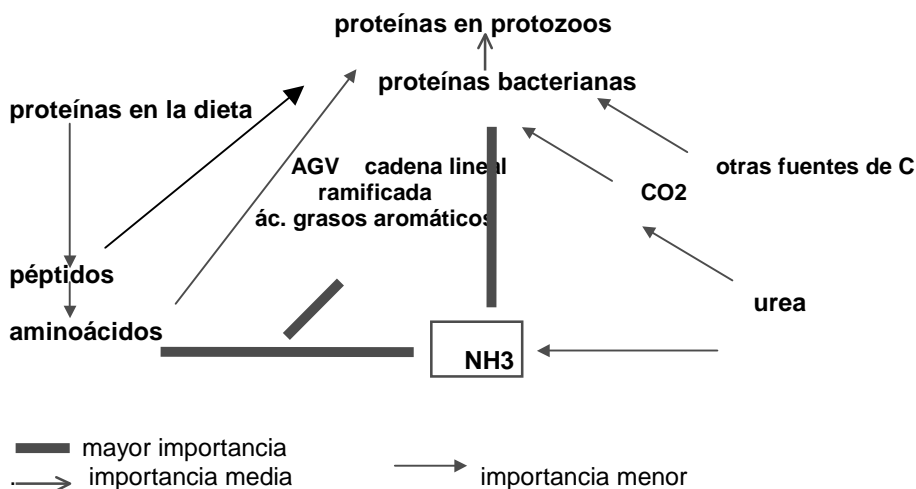
La figura 1 (Wolin, 1979) resume el metabolismo de las proteínas en el rumen. Las proteínas de la dieta se convierten principalmente en nitrógeno microbiano. Algunas bacterias, como *Bacteroides ruminicola* pueden degradar aminoácidos de cadena ramificada en los respectivos ácidos grasos, con un carbono menos.

Interacciones microbianas están involucradas también en la degradación de proteínas de la dieta, como por ejemplo entre *Ruminococcus albus* y *B. ruminicola* en co-cultivo en medio con celulosa y caseína, como únicas fuentes de energía y N, respectivamente. El celulolítico *R. albus* provee a la pareja con productos de la hidrólisis del polisacárido. *B. ruminicola* degrada la caseína y libera amonio e isobutirato requerido por el primero.

Fermentación de hidratos de carbono

Los polisacáridos de la dieta son la fuente principal de C y energía para los microorganismos del rumen. las interacciones son numerosas y los productos de hidrólisis son asimilados por la población asociada. A pesar de que la celulosa está presente en pocas especies de bacterias, protozoos y ficomicetos anaerobios, los productos de la hidrólisis son sustrato para organismos no celulíticos.

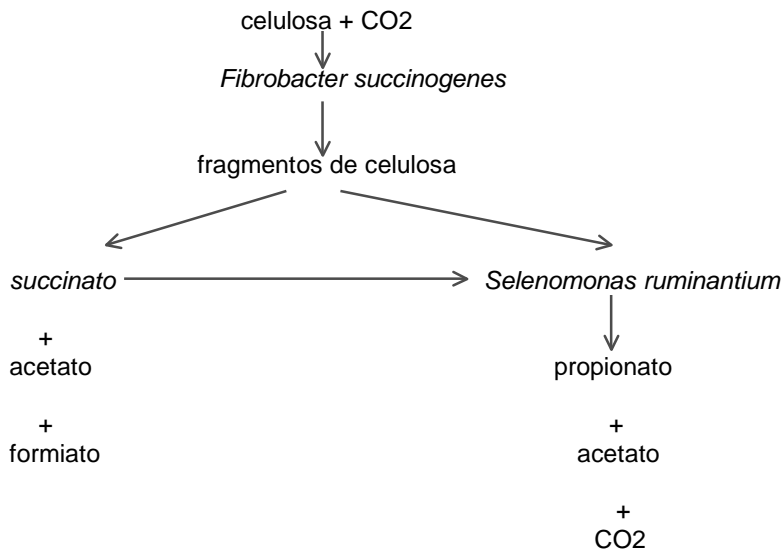
Figura 1 Metabolismo de proteínas en el rumen



Estas **asociaciones nutricionales** han sido verificadas en co-cultivos *in-vitro*. El éxito en la competencia por los productos solubles obtenidos de la hidrólisis de polímeros por especies no-hidrolíticas, depende de las velocidades de transporte en las células y de su metabolismo posterior.

Los productos de bajo peso molecular de la hidrólisis de polisacáridos son fermentados a acetato, butirato, H₂ y CO₂ por especies individuales de bacterias y protozoos. La producción de propionato y CH₄ requiere de la interacción de especies: las que producen succinato con otras que lo decarboxilan a propionato y CO₂. Esta interacción es muy importante en el rumen, ya que el **propionato** es el principal sustrato gluconeogénico para los rumiantes. La figura 2 muestra la interacción entre *Fibrobacter succinogenes* y *Selenomonas ruminantium*. El organismo celulolítico produce succinato, acetato y formiato. Cuando ambas especies crecen juntas, sin embargo, los productos finales incluyen propionato y CO₂: el succinato es intermedio en la formación de propionato y *S. ruminantium* aporta el CO₂ requerido por *Fibrobacter*.

Figura 2- Interacción metabólica entre dos bacterias del rumen



Otro ejemplo de estas cadenas alimenticias se da con las bacterias metanogénicas, que emplean CO₂ e H₂, para obtener energía, con acetato o CO₂ como fuentes de C, que son liberados por microorganismos que hidrolizan y fermentan los sustratos.

Interacciones entre bacterias y protozoos

La interacción más sorprendente es la dependencia entre los ciliados y las bacterias por los aminoácidos. La eliminación de los ciliados incrementa hasta 3 veces el número de bacterias. Las bacterias emplean tanto las proteínas como la amilopeptina de los ciliados lisados.

Algunas bacterias pueden funcionar simbióticamente, dentro de protozoos, otras permanecen independientes o pueden interactuar con los ciliados. por ejemplo, las bacterias metanogénicas se adhieren a varios *Entodiniomorphes* cuando el H₂ es limitante. El H₂ generado por los ciliados puede ser la principal fuente de metano en el rumen. Muchos ciliados absorben trazas de O₂ del líquido ruminal, manteniendo el ambiente anaerobio.

La celulolisis se ve incrementada cuando se asocian bacterias y ciliados; este sinergismo fue verificado *in-vitro*. Otro de los roles importantes de los protozoos es estabilizar el ambiente: secuestran rápidamente al almidón y azúcares solubles, restringen la formación de ácido láctico y limitan las fluctuaciones del pH. La liberación de AGV a partir de las reservas de amilopeptina de los ciliados, contribuye a la nutrición del huésped entre ingestas.

Otro mecanismo que facilita la sobrevivencia de especies no-hidrolíticas en este ecosistema son las interacciones entre **presa y predator**: una población, como los protozoos obtiene energía y/o carbono a partir de su presa (las bacterias). Los protozoos pueden obtener estos requerimientos para su desarrollo por fermentación de sustratos; las bacterias parecen ser más bien precursores para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y como fuente de lípidos. La fermentación de las reservas carbonadas de las bacterias puede contribuir también al metabolismo del protozoo.

Producción de CH₄

Ninguna de las bacterias o protozoos fermentadores producen metano, pero algunas producen formiato, H₂ y CO₂. Las bacterias metanogénicas pueden luego transformar el H₂ y el CO₂ en CH₄. En el rumen la principal vía de formación de metano es a partir de H₂ y CO₂. Su formación a partir de acetato (formado por conversión de propionato, butirato y otros AGV), no ocurre en el rumen y la producción a partir de AGV es un proceso muy lento. *Methanobacterium ruminantium* se encuentra presente en alta concentración en el rumen. *Methanosarcina barkeri* ha sido aislada de rumen de vacas y ovejas, crece lentamente con H₂ y CO₂, forma CH₄ a partir de grupos metilos (metanol y metilaminas) y no compite por el H₂ con otros metanogénicos.

Methanobrevibacter spp. es probablemente el metanogénico más significativo en el rumen bovino, pero se requieren mayores estudios para caracterizar a las especies actuantes. Casi todo el H₂ producido es empleado por las bacterias metanogénicas (transferencia de H₂ interespecie). Aproximadamente 800 litros de H₂ se producen y se usan diariamente para formar 200 litros de CH₄ en una vaca de 500 kg y sólo trazas de H₂ se acumulan en la fase gaseosa del rumen (Hungate, 1966).

Interacciones y proporciones de AGV

Existe considerable interés en alterar las fermentaciones en el rumen para incrementar la eficiencia de productos ruminales. Los aditivos alimenticios, como los ionóforos **Monensina o Rumensina y Lasolacida**, inhiben a los productores de H₂, **favorecen la producción de propionato y** reducen la producción de metano, aumentando por lo tanto, la eficiencia de conversión de los sustratos en alimento para el ganado. Estas sustancias actúan como quelantes del sodio, potasio y otros cationes, alterando el transporte a través de la membrana.

Ingeniería genética de microorganismos del rumen

La manipulación genética de organismos del rumen para producir especies más eficientes en la digestión de los alimentos está siendo practicada. Como los microorganismos del rumen operan como un **consorcio**, es decir un sistema mixto y su ecología es opuesta a la de un cultivo puro a partir de una sola célula, la **competencia y el sintrofismo** deben ser considerados en los intentos de manipulación genética.

La transferencia genética natural en este ambiente debe ocurrir y van Soest (1994) señala que considerando que los microorganismos del rumen, incluidos las bacterias metanogénicas, son los más antiguos en la escala biológica (más de 3.000 millones de años), deben haber tenido suficientes oportunidades para evolucionar y cambiar hacia mayor eficiencia.

Parecería más oportuno, para este autor modificar los materiales vegetales, haciéndolos más degradables por la microflora. Cita, sin embargo, casos de éxitos en la inoculación de microorganismos que degradan **mimosina**, amonoácido tóxico contenido en *Leucaena*, ausentes en la mayoría de los rumiantes.

Conclusiones

Esta breve descripción del ecosistema del rumen trató de evidenciar su complejidad y dinamismo. Las interacciones microbianas son allí numerosas y es precisamente la flexibilidad de este complejo sistema que hace posible la conversión de un amplio espectro de sustratos en ácidos grasos volátiles de los cuales depende el rumiante para obtener energía.

Las predicciones sobre la marcha de las fermentaciones resulta difícil dada la suma de factores que inciden: ambiente, especie animal, dieta. En general, la activa fermentación de sustratos celulósicos resulta en mayores proporciones de ácido acético. La fermentación de almidón resulta en mayor proporción de ácido propiónico.

Los tipos de fermentación con dietas ricas en azúcares, incluyendo melazas, es difícil de predecir. Efectos asociativos positivos o negativos pueden resultar cuando se combinan alimentos. Muchos de los últimos efectos pueden minimizarse regulando el régimen alimenticio, el grado de procesamiento de los granos y el tipo de concentrado adecuado a cada combinación nutritiva.

Numerosos intentos de mejoramiento de la actividad de los microorganismos del rumen se llevan adelante e incluyen manejo de la dieta, de aditivos (antibióticos, sustancias tampones, antiprotozoarias), que tienden a incrementar el nivel nutritivo del animal.

Bibliografía

- HUNGATE, R.E. 1966, **The Rumen and Its Microbes**, Academic Press, N.Y. , London
ORSKOV, E.R. y M. RYLE 1990 **Energy Nutrition in Ruminants** Elsevier Applied Science, London, N.Y.
STEWART, C.S. y M.P. BRYANT, 1988 The Rumen Bacteria. En: **The Microbial Ecosystem**, Hobson, P.N. (ed), Elsevier, Applied Science, London, N.Y.
STEWART, C.S. 1991 The Rumen bacteria. En: **Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion**, Jouany, J.P. (de), INRA Editions, París.

- THEODOROU, M.K.; S.E. LOWE y A.P.J. TRINCI 1992 Anaerobic fungi and the rumen ecosystem. Micology Series, vol 9, Marcel Dekker, N.Y.:43-72
- VAN SOEST, P.J. 1994 **Nutritional Ecology of the Ruminant** Cornell University Press, Ithaca, London
- WOLIN, M.J. 1979 The rumen fermentation: a model for microbial interaction in anaerobic systems. Adv. Microb. Ecol. 3: 49-77

Capítulo 12

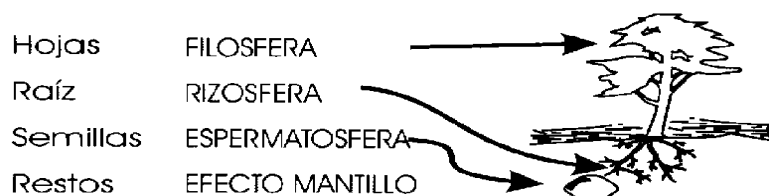
La rizosfera

Los microorganismos interactúan con las plantas a nivel del follaje y las hojas, en la superficie del suelo, alrededor de las raíces y semillas. Los microorganismos encuentran allí abundantes materiales carbonados y un ambiente particular con condiciones físico-químicas diferentes que las del suelo sin cultivar. Las plantas, por su parte, reciben numerosos metabolitos, muchos de ellos promotores de crecimiento, de la micropoblación edáfica.

La figura 1 muestra las principales zonas de interacción biológica, conocidas como:

- **filosfera** (ambiente sobre las hojas)
- **rizosfera** (zona del suelo afectada por las raíces)
- **restos vegetales o mantillo** (ramas, hojas, etc. sobre el suelo)
- **espermatosfera** (zona del suelo afectada por los exudados y descamaciones de las semillas).

Figura 1- Interacciones entre microorganismos y vegetales



El sistema radical de las plantas ejerce varios efectos sobre la micropoblación edáfica:

- **directos**, por la exudación de numerosas sustancias, la descamación de células y tejidos que actúan como fuentes de carbono, energía, nitrógeno, fósforo, etc., o por la liberación de sustancias tóxicas.
- **indirectos**, al modificar el medio **químico** por los procesos de mineralización-inmovilización, precipitación-solubilización, oxido-reducción de materiales orgánicos o minerales o el ambiente **físico** alterando la estructura, el régimen hídrico, el pH, la composición de la atmósfera del suelo. Finalmente modifican el ambiente **biológico**, estimulando las interacciones microbianas a ese nivel.

Conceptos generales

Desde comienzos de este siglo se reconoció que la zona del suelo vecina a las raíces inducía, en general, una mayor actividad de los microorganismos y se introdujo el término **rizosfera**, para definir a esta región. Desde entonces, son numerosos los estudios sobre las actividades microbianas en esta zona, que se define como el **volumen de interacción entre el sistema radical de los vegetales y su inmediato medio suelo**. Su validez en términos de gradientes microbiológico y químico ha sido demostrada por varios autores, con un máximo de efecto en la zona de contacto con las raíces, hasta distancias variables que podrían llegar a algunos milímetros. Luego el efecto es despreciable.

La **microflora** es afectada por los exudados radicales y por los aportes de restos de tejidos y células.

Los **microorganismos** estimulados actúan sobre la planta, poniendo a su disposición moléculas orgánicas que son absorbidas por las raíces, como aminoácidos, vitaminas, antibióticos, fitohormonas y contribuyen a su nutrición mineral por los procesos de mineralización y solubilización, de ciertos elementos.

Las interacciones biológicas son muy intensas en esta región y los fenómenos de sinergismo o de antagonismo son exaltados.

La **rizosfera**, en sentido amplio, se define como la fina capa de suelo que se adhiere firmemente a las raíces, pero que se puede separar por lavado y agitación moderada en agua. Se puede dividir aun en rizosfera **próxima y alejada**, según el tiempo y la intensidad de agitación.

El **rizoplaneo** lo constituye el suelo en contacto íntimo con la superficie de las raíces y se extrae por agitación vigorosa de las mismas luego del tratamiento anterior. Si no se indica expresamente, al hablar de rizosfera, se incluye en general a la rizosfera y al rizoplaneo.

Muchos microorganismos colonizan la raíz por heridas o acción enzimática. Se habló un tiempo de **endorrizosfera**, pero se comprende que esta definición no es correcta ya no está involucrado el suelo. Se habla de microorganismos **endofíticos**: saprofitas o parásitos.

Métodos de estudio

Las investigaciones en esta región no son sencillas, es necesario trabajar con plantas vivas, en medios artificiales: soluciones hidropónicas, cultivos sobre agar, vermiculita u otros soportes, o en el suelo mismo, en macetas o en el campo. Los datos obtenidos son puntuales y brindan información sobre las relaciones microflora-vegetal en un momento dado. Las condiciones en este hábitat son muy dinámicas y los productos liberados por los vegetales son simultáneamente biodegradados o adsorbidos fuertemente a los coloides del suelo.

Por este motivo, los estudios sobre exudación se realizan en medios estériles y el nivel de producción no puede extrapolarse a condiciones naturales.

- **seguimiento de microorganismos en este habitat:** se emplean mutantes marcadas por resistencia a antibióticos o con características fisiológicas obtenidas con transposones (Tn5) que permiten su reconocimiento en estudios de **recuentos (NMP)**, hibridación de ADN, empleo de sondas, etc.
- **recuentos de grupos fisiológicos y cálculo de la relación**

$$R/S = \frac{\text{densidad de algún grupo por gramo de suelo rizosférico}}{\text{densidad por gramo de suelo sin cultivo}}$$

Permiten determinar efectos estimulantes o inhibidores de ciertos cultivos sobre procesos microbianos de interés, como celulolisis, fijación del N₂, nitrificación, etc. Resulta difícil comparar resultados de distintos autores si no se han empleado técnicas y sistemas radicales semejantes.

- **colonización de la raíz (microscopía de luz, fluorescente, electrónica)** muy útil para conocer la distribución de los microorganismos y su grado de colonización. El **microscopio óptico** permitió mostrar que sólo entre un 5 a 10% de la superficie de la raíz está cubierta de microorganismos, hecho que desmiente la creencia muy extendida de que las raíces estaban cubiertas espeso manto microbiano. Esta idea se sustentó en los altos recuentos, al expresarlos por gramo de raíz.

La **microscopía fluorescente**, con anticuerpos marcados con sustancias que fluorescen en luz ultravioleta, permite determinar la colonización de distintas porciones de la raíz por cepas de interés agrícola, como los rizobios, y brindan invalorable información sobre la distribución de bacterias en el sistema radical.

El **microscopio electrónico** de transmisión y de barrido permitió grandes avances en el conocimiento de la distribución espacial de los componentes de la interfase suelo-raíz, la forma de agrupación de las poblaciones, la presencia y colonización del mucigel, sus relaciones con las arcillas, la lisis de ciertas bacterias.

- **determinaciones de biomasa microbiana:** por recuentos o por la técnica de fumigación son muy empleadas para determinaciones de efectos estimulantes o inhibidores de las distintas rizosferas (**Anexo Práctico**).

El cuadro 1 publicado por Frioni (1990) muestra la fracción de C orgánico presente en la biomasa del suelo rizosférico de cuatro gramíneas cultivadas en la zona de Río Cuarto (Argentina), evaluada en el estado de grano lechoso, en relación a la del suelo sin cultivar.

Cuadro 1 - Carbono orgánico en la biomasa (%), en la rizosfera de gramíneas (*)

	maíz	sorgo	mijo perla	mijo común	suelo solo
C-biomasa como % del C- total del suelo	6,19a	5,99 ^a	5,35ab	5,64a	4,52b

(*) Dos o más tratamientos señalados por la misma letra no difieren significativamente por Tuckey al 1 %.

- **empleo de elementos radioactivos**, C,N,S, etc. permiten un más detallado estudio de procesos microbianos en este ambiente.
- **modelización**, diseños experimentales y matemáticos son muy empleados y permiten predecir los efectos de variaciones en: el contenido de agua del suelo, la densidad de las raíces, los niveles de exudación (Martens, 1982), el agregado de distintos sustratos, el efecto rizosférico a distancias variables de las superficies radicales. Estos modelos señalaron marcada reducción del efecto a medida que la distancia de la superficie de la raíz aumenta, como se observa en microscopía electrónica y constituyen una herramienta invaluable en la predicción de cambios en las poblaciones microbianas en respuesta a modificaciones de la interfase suelo-raíz.

Origen y naturaleza de los materiales orgánicos

Se reconocen varias categorías de compuestos orgánicos en la vecindad de las raíces (Rovira *et al*, 1979) (figura 2):

1. Exudados: compuestos de bajo peso molecular en general solubles en agua que liberan las células hacia espacios intercelulares y luego al suelo.

Su liberación no está mediatizada metabólicamente. Son azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, hormonas, vitaminas. La exudación radical se puso de manifiesto luego de aplicaciones foliares de sustancias con elementos radioactivos o marcados con isótopos (P^{32} , CO_2^{14} , N^{15} , etc.).

2. Secreciones, compuestos de bajo o alto peso molecular liberados como resultado de procesos metabólicos (hidratos de carbono polimerizados, enzimas).

3. Mucílagos vegetales, son originados en el ápice de la raíz y segregados por el Golgi, o hidrolizados de polisacáridos de la pared primaria y de células del extremo de la raíz, segregados por pelos capilares o producidos por degradación bacteriana de células epidérmicas muertas.

4. Mucigel, se restringe este término al material gelatinoso de la superficie de las raíces creciendo en suelos normales, no estériles. Incluye mucílagos vegetales, células bacterianas y sus productos metabólicos (cápsulas, capas mucosas, gliocalix) así como coloides minerales y materia orgánica del suelo.

La contribución de la planta o de los microorganismos a estos materiales sólo puede estudiarse en cultivos axénicos.

El **mucigel** es una zona muy importante que mantiene a las raíces y al suelo en contacto y es un reservorio de nutrientes y agua de importancia para el vegetal en épocas de sequía. Se encuentra presente siempre en las células de ápice de la raíz, pero su extensión a lo largo del sistema radical es variable.

Rizodeposición: en estudios en hidroponia en cultivos axénicos se ha calculado la cantidad de materiales liberados por las raíces que extrapolados a campo dan valores de unos 700 m³/ha/año en trigo de invierno; 300 m³ en cebada; 1250 m³ en maíz. Estas cifras pueden representar 7,3 y 12,5 toneladas métricas en peso, excediendo a los mejores rendimientos en grano y para algunos autores pueden alcanzar un **27% de la masa total de la planta**. En el suelo, su biodegradación y la adsorción a los coloides, disminuyen la producción neta.

5. Lisados son los compuestos liberados por autólisis de las células epidérmicas. Las paredes de estas células son digeridas por los microorganismos que liberan a la rizosfera los productos de su actividad microbiana.

La figura 3 resume los conceptos sobre las transferencias del carbono y su utilización en la rizosfera (Warembourg y Billes, 1979). El CO₂ asimilado es llevado de la parte aérea a las raíces para la síntesis de nuevas estructuras y puede también ser liberado como exudados: solubles, que difunden, o bien no difusibles, que permanecen en el mucigel. La degradación de estos compuestos más resistentes explicaría un segundo pico en la liberación del CO₂. Un posible tercer pico en el flujo de CO₂ sería resultante de la degradación de restos de células y tejidos y de la penetración de microorganismos en células corticales.

Figura 2 - Materiales orgánicos en la rizosfera

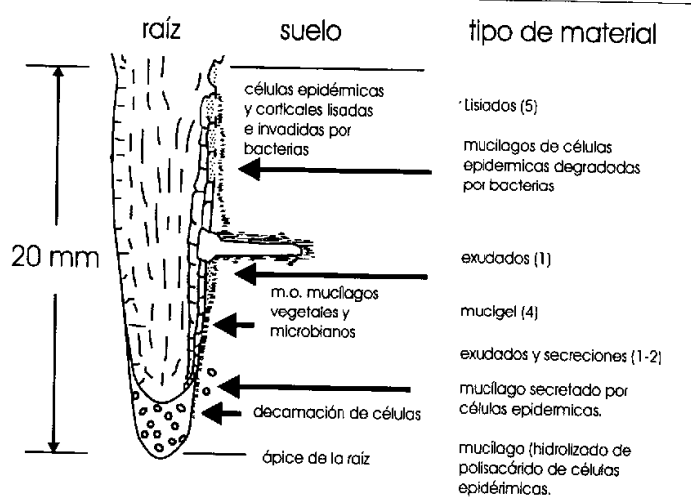
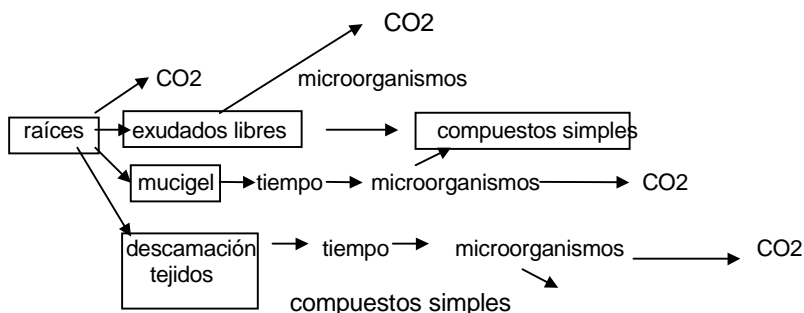


Figura 3 - Flujos de carbono en la rizosfera



Metabolitos microbianos en la rizosfera

Los microorganismos liberan gran número de sustancias que se forman y difunden en la rizosfera; reguladores del crecimiento vegetal, fitotoxinas, estabilizantes del suelo.

Es necesario verificar si la sustancia:

es producida por el microorganismo en cultivo puro y

se encuentra a concentración fisiológicamente activa en la rizosfera

- **Reguladores de crecimiento vegetal:** se señala producción por rizomicroorganismos de: etileno, ácido giberélico (AG), ácido fusárico, ácido indol acético (AIA), ácido abscísico, citoquininas, que se suman a las producidas por las plantas.
- **Fitotoxinas:** como ácido para-amino-benzoico, ácido cumárico, acético, butírico, HCN, H₂S, ácido benzoico, etc. Los ácidos alifáticos se acumulan en ambientes anaerobios (fermentación de pajas) y difunden a la rizosfera. Sus efectos dependen de la longitud de la raíz expuesta al tóxico. Por otro lado la acidez protegería a la planta de microorganismos perjudiciales. Los ácidos aromáticos son más tóxicos.
- **Antibióticos:** numerosas moléculas con carácter biostático y biocida son liberados por bacterias,

actinomicetes, hongos (patulina, gliovirina, etc). Algunos microorganismos como *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma viride* se emplean a nivel experimental como promotores del crecimiento vegetal y en el control biológico de fitopatógenos (capítulo 18).

- **Aglutininas y agentes de agregación del suelo:** las lectinas son glicoproteínas que actúan como receptores reconociendo sitios de adhesión en la superficie de la pared de raíces y de bacterias (rhizobios, azospirilos). Los microorganismos liberan sustancias como gomas, exopolisacáridos, capas mucosas, polímeros que contribuyen a formar agregados entre partículas minerales y el humus.

- **Enzimas:** más de 50 enzimas han sido detectadas en la rizosfera:

hidrolasas, pectinasas, ADNasas, oxidoreductasas, que regulan los procesos biológicos en este habitat.

Efecto rizosférico sobre grupos microbianos

Bacterias

Numerosas revisiones ilustran sobre efectos rizosféricos positivos. En general se admite, que son las bacterias no esporuladas, Gram negativas, las más favorecidas. La predominancia de especies de *Pseudomonas* en la rizosfera se explica por su alta tasa de crecimiento, latencia reducida, por la aptitud a producir sustancias inhibitoras en el curso del metabolismo glucídico y por la síntesis de pigmentos fluorescentes, frecuentemente inhibidores de otras especies.

Las formas filamentosas ramificadas son muy abundantes en la superficie de las raíces, como *Corynebacterium*, *Mycobacterium*.

Los requerimientos nutricionales de las bacterias del rizoplaneo y de la rizosfera difieren de las que habitan suelos sin vegetación.

Menos estudios se han realizado sobre los **actinomicetes**, a pesar de que son muy abundantes y activos en la superficie de las raíces. La mayoría de los trabajos están vinculados a la detección de antagonistas que producen antibióticos contra patógenos vegetales. En la rizosfera predominan especies de *Streptomyces* y *Nocardia*.

Hongos

Las técnicas de recuento muestran en general un efecto rizosférico positivo sobre este grupo, aunque menos marcado que para las bacterias. Muchos autores sostienen que si el efecto se expresa en función de la biomasa de ambos grupos y no en función del número de individuos, los resultados se invertirían. En los últimos años se ha brindado gran atención a los hongos que colonizan la superficie de las raíces.

La colonización inicial sería realizada por una variedad de especies fúngicas, habitantes del suelo, que a los pocos días sería desplazada por una micoflora más específica, formas típicas de la superficie de las raíces, que persisten hasta la senescencia. Para la detección de estos hongos es necesario lavar las raíces vigorosamente, para eliminar las formas esporógenas, dominantes.

Algas

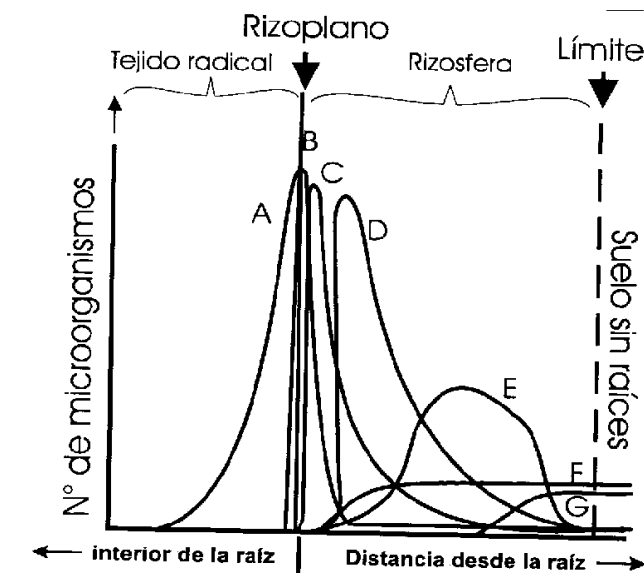
Este grupo ha sido poco estudiado, ya que por su carácter autótrofo no es afectado directamente por los exudados radicales. Sin embargo, numerosos trabajos señalan estimulación de algunas rizosferas sobre las algas; fenómeno que se ha tratado de explicar por la liberación de factores de crecimiento, el contenido de antibióticos en la rizosfera o por cambios en las propiedades físicas del medio.

Las **interacciones entre microorganismos** tanto sinérgicas como antagónicas (capítulo 13) son muy afectadas a nivel de este ambiente particular, ya que las poblaciones en altas densidades se afectan intensamente compitiendo por los nutrientes, el espacio (Dien y Mangenot, 1975). La figura 4 (Bazin *et al*, 1990) muestra la posible distribución de diferentes tipos de microorganismos rizosféricos.

Se aprecia que el:

- **tipo A** : crece en espacios intercelulares dentro de la raíz y su concentración cae abruptamente a niveles del suelo sin cultivo, inmediatamente fuera de la raíz
- **tipo B**: crece en el rizoplasma y su densidad cae a niveles basales a muy corta distancia de la superficie radical y a cero a muy corta distancia dentro de la raíz (no es endofito).
- **tipo C**: organismo físicamente excluido del rizoplasma por el tipo B), pero que emplea materiales orgánicos originados en la raíz o producidos por el organismo B), o ambos.
- **tipo D**: organismo física o químicamente excluido por los tipos B) y C), pero que emplea productos del C) o materiales complejos de la raíz pero no usados por B) o C) por su incapacidad de metabolizarlos o por represión catabólica en esos organismos por moléculas orgánicas más simples, de las plantas.

Figura 4 - Distribución de diferentes tipos de microorganismos alrededor de las raíces de las plantas



- **tipo E**: utiliza productos secundarios de organismos rizosféricos, pero en desventaja competitiva con respecto a los tipos B, C y D y por lo tanto es incapaz de competir por moléculas originadas en las raíces.
- **tipo F**: microorganismos típicos del suelo, excluidos físicamente de los ambientes sobre o cerca de las raíces, pero resistentes a productos o actividades de los organismos rizosféricos (antibióticos, quelantes del hierro, etc.)
- **tipo G**: microorganismos generales del suelo excluidos de la rizosfera por actividades o productos de los otros tipos.

Este esquema trata de representar el comportamiento de los microorganismos en los alrededores de las raíces, pero es evidente que alguna especie puede mostrar combinaciones de dos o más tipos de modelos de distribución.

Factores que afectan el efecto rizosférico

Los efectos sobre la población del suelo varían con la especie o la variedad del vegetal. Si las líneas de una especie varían en un solo gen, sus características rizosféricas pueden cambiar. La edad de la planta, su estado sanitario y vigor, el tipo y posición de la raíz, y por supuesto, el tipo de suelo y el ambiente afectan al efecto rizosférico.

Especie vegetal: algunas especies pueden estimular o suprimir determinado grupo microbiano, aunque los casos de inhibición son menos frecuentes. Las leguminosas presentan, en general, mayor efecto rizosférico que los cereales, pero pocos estudios han relacionado este efecto con la naturaleza de los exudados radicales. Las diferencias pueden ser muy marcadas según la zona de la raíz que se estudie. Los organismos que requieren aminoácidos son más numerosos en la zona apical, por tratarse de una región que los libera.

Estado fenológico: el efecto rizosférico comienza a manifestarse desde la germinación de las semillas, por aporte de los microorganismos de la espermatósfera, los componentes de las envolturas del grano y por sus exudados. Para algunos autores la colonización se realizará principalmente a partir de los microorganismos del suelo, más que por los de la semilla.

Los máximos de estimulación se encontraron en la **floración y/o fructificación**, para luego declinar abruptamente cuando comienza la senescencia de las raíces. La composición de la microflora varía, proliferando los microorganismos que participan en la descomposición de los tejidos muertos. La población no se distingue ya de la natural del suelo y poco efecto residual se mantiene para el año próximo: el nuevo cultivo determinará la composición de su población rizosférica.

El efecto de edad de la planta puede enmascarse por interacciones con el ambiente. Así, variaciones en la intensidad luminosa afectan la exudación y por lo tanto la proliferación de hongos, por inhibición del grupo más sensible, las bacterias.

El cuadro 2 muestra el efecto de tres cultivos, en distintos estados fenológicos, sobre el conjunto de bacterias y actinomicetes. Se observa efecto estimulante en los últimos estados del desarrollo vegetal.

En el caso del trébol, el efecto rizosférico fue marcado en la floración, en el trigo menos significativo y similar en los estados vegetativo y de formación del grano, mientras que en la colza fue muy pronunciado desde la floración.

Suelo y ambiente: el efecto rizosférico es más pronunciado en suelos livianos, arenosos. En suelos desérticos, la rizosfera de la escasa vegetación colonizadora constituye el único ambiente en donde los microorganismos pueden desarrollarse y las relaciones R/S son allí muy importantes (Frioni, 1990).

Cuadro 2 - Efecto rizosférico sobre bacterias y actinomicetes ($\times 10^6$)

Cultivo	estado fenológico	S	R	R/S
Trébol	vegetativo (4 hojas)	5,2	5,3	1,0
	vegetativo (6-8 hojas)	6,1	8,1	1,3
	floración	5,6	318,0	56,8
Trigo	Germinación	5,2	6,8	1,3
	Vegetativo	6,1	50,3	8,2
	grano en formación	5,6	52,0	9,3
Colza	vegetativo (6 hojas)	5,2	14,5	2,8
	floración	6,1	310,5	50,9
	fructificación	5,6	491,0	87,7

La incorporación de restos vegetales o animales, la fertilización, causan menos efectos en la rizosfera, la que manifiesta capacidad para mantener su equilibrio biológico.

Los **efectos de los microorganismos rizosféricos** sobre a las plantas pueden resumirse (Shippers *et al*, 1987):

Neutros: no afectan el crecimiento

Benéficos: existe creciente evidencia de que la microflora saprofita de la rizosfera incluye componentes benéficos que pueden incrementar el crecimiento vegetal y los rendimientos significativamente por:

- aumento de la disponibilidad y toma de nutrientes minerales
- provisión de sustancias promotoras del crecimiento
- supresión de microorganismos deletéreos y patógenos en la rizosfera.

Deletéreos: que pueden afectar negativamente el crecimiento vegetal, sin necesariamente parasitar al tejido (alteraciones en el aporte de agua, iones y sustancias promotoras del crecimiento vegetal, cambiando las funciones y/o limitando el crecimiento de raíces).

Patógenos: disminuyen el rendimiento por producción de enfermedades: numerosas bacterias, actinomicetes, hongos, producen enfermedades que provocan importantes pérdidas en los cultivos (capítulo 18).

La espermatósfera

Las semillas en germinación no realizan fotosíntesis pero ejercen efecto en el suelo vecino al movilizar sus reservas. Se considera que la espermatósfera es el origen de iniciación del efecto rizosférico de las raíces en desarrollo. A su nivel ocurren múltiples interacciones entre la planta, las poblaciones microbianas y el ambiente. Los productos liberados por los granos son de naturaleza variable, según la edad, la especie y las características del medio (fuentes de C, N, sustancias biológicamente activas, como vitaminas, aminoácidos, otras inhibidoras). La liberación de exudados por las semillas es responsable de la alta mortalidad de las mismas a causa de la sulfatorreducción, cuando cultivos, como el de maíz, germinan en suelos ricos en sulfatos, compactados y saturados en agua. Otras actividades biológicas son estimuladas, como la solubilización de fosfatos, amonificación, celulolisis, y ciertas actividades enzimáticas.

La filosfera

Así como las raíces están rodeadas de una verdadera vaina de microorganismos rizosféricos, las hojas de las plantas presentan en su superficie poblaciones muchas veces importantes, de bacterias, levaduras, hongos filamentosos, y, en regiones tropicales húmedas, algas, líquenes y hepáticas. Este hábitat está sometido a humedades fluctuantes, ligadas a las precipitaciones. La transpiración de las hojas puede mantener un microclima algo más húmedo que el del aire. En las zonas tropicales húmedas, el desarrollo de organismos en esta región es muy abundante, donde forman una película mucilaginoso de varias micras de espesor. La intensidad luminosa, la temperatura y la naturaleza de los exudados varían con el clima y la naturaleza de la planta.

Las poblaciones bacterianas de la filosfera son ricas en especies pigmentadas: *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*.

Levaduras, como la *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, poseen pigmentos rosados y son muy numerosas las especies de hongos. Entre las funciones microbianas más estimuladas en este hábitat se citan la amonificación, la fijación del N₂ y la lipólisis. La producción de antibióticos es frecuente en las poblaciones epifitas.

Los fenómenos que se desarrollan a nivel de la filosfera interesan mucho al fitopatólogo y al agrónomo, quienes tienen una puerta abierta a experiencias de inoculación con fijadores de N₂ o con microorganismos antagonistas de patógenos que protegen a la planta de las infecciones.

Efecto mantillo

Contrariamente a las formaciones vegetales anuales que ejercen sobre la microflora del suelo una influencia limitada en el espacio y el tiempo, las formaciones vegetales perennes (bosques, praderas permanentes) afectan marcadamente a la microflora del suelo donde se desarrollan. Esta acción se ejerce a nivel de los exudados, como ya hemos analizado, por el aporte al suelo de residuos vegetales subterráneos (raíces) o aéreos (hojas, ramas) o de productos diversos arrastrados por el agua a través del follaje. Estos últimos aportes contienen elementos minerales (K, Na, etc.) y orgánicos: hidratos de carbono, aminoácidos.

Resulta difícil separar el efecto rizosférico del efecto de los restos sobre el suelo, puede observarse que, en el caso de bosques, los mantillos juegan un rol preponderante. Esta capa constituye para la microflora del suelo la principal fuente de:

- **energía y de elementos nutritivos** que en kg C/ha/año varían de 0,5 a 2 toneladas en bosques de zonas templadas y frías, para alcanzar 2 a 8 toneladas en bosques tropicales húmedos. Los mantillos en zona tropical son más ricos, además, en elementos minerales y en nitrógeno que los de las regiones templadas.
- **de sustancias estimulantes o inhibidoras:** como vitaminas y sustancias diversas aún no bien determinadas, que llegan al suelo. Inversamente, ciertos mantillos liberan productos tóxicos frente

a especies bacterianas muy sensibles: bacterias nitrificantes autótrofas, fijadores del N₂, y otros organismos, como los celulolíticos. La toxicidad frente a los nitrificantes se manifiesta en formaciones forestales de la zona tropical húmeda o regiones templadas (bosques de pino silvestre, cedro, coníferas). Lo mismo puede ocurrir en ciertas praderas y bosques de coníferas, de la zona templada. Las sustancias responsables serían esencialmente **fenoles o compuestos con radicales fenólicos**: ácido gálico, floroglucinol.

- **otros efectos: modificación del pH del suelo:** la vegetación puede elevar el pH de los horizontes superficiales, por concentración de sustancias básicas. Pero más frecuentemente, la vegetación acidifica el suelo, caso de bosques de coníferas. Si ésta no es excesiva, la microflora fúngica, que en conjunto es indiferente al pH, puede indirectamente ser estimulada, por reducción de la competencia de otros organismos. Si se bajan una o dos unidades de pH, se puede observar efecto depresivo en la actividad biológica, más marcado si se acompaña de sustancias tóxicas hidrosolubles.

Bibliografía

BAZIN, M. J., P. MARKHAM y E. M. SCOTT 1990 Population dynamics and rhizosphere interactions, en **The Rhizosphere** J. M. Lynch (ed), Wiley Interscience, New York: 99-127

DIEM, H. G. y F. MANGENOT, 1975: Influence de la rizosphère sur les interactions microbiennes dans le sol, Soc. Bot. Fr. Coll. Rhizosphère: 203-212.

DOMMERGUES, Y. y F. MANGENOT, 1970 La Rhizosphère, en: **Ecologie Microbienne du Sol**, Dommergues, Mangenot (eds.), Masson et Cie., París: 549-594.

FRIONI, L. 1990 **Ecología Microbiana del Suelo**, Depto. de Publicaciones de la Universidad de la República, Montevideo, 517 pp.

MARTENS, R., 1982: Apparatus to study the quantitative relationships between root exudates and microbial populations in the rhizosphere, Soil Biol. Biochem., 14: 315-317.

ROVIRA, A. D.; R. C. FOSTER y J. K. MARTIN, 1979 Origin, nature and nomenclature of organic materials in the rhizosphere, en: **The Soil-Root Interface**, Harley, J. L. y R. Scott Russell (eds.), Academic Press, Londres: 1-4.

SHIPPER, B.; A. W. BAKKER y P. A. H. BAKKER, 1987: Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices, Ann. Rev. Phytopathol, 25: 339-358.

WAREMBOURG, F. R. y G. BILLES, 1979 Estimating carbon transfers in the plant rhizosphere organisms, en: **The Soil-Root Interface**, Harley, J. L. y R. Scott Russell (eds.), Academic Press, Londres: 184-196.

Capítulo 13

Interacciones entre microorganismos

En la naturaleza, las poblaciones microbianas raramente se presentan aisladas. En ciertos hábitats, como por ejemplo en la vecindad de las raíces, en restos de materia orgánica, en aguas o cuando se incorporan al suelo restos de cosechas, fertilizantes, etc., los componentes de la comunidad son afectados significativamente por sus vecinos. Dada la proximidad estrecha de los organismos cuando sus densidades son altas, las interacciones entre organismos son muy pronunciadas en esos ambientes.

Son precisamente estas interacciones entre habitantes de una comunidad y las interrelaciones entre los organismos y su ambiente abiótico químico y físico, las que regulan la composición de la microflora y la microfauna de un ecosistema. Se establece un equilibrio dinámico, resultante de las interacciones biológicas y no biológicas. Este equilibrio se mantiene en un ecosistema dado, y la capacidad para mantener la estabilidad de una comunidad en un medio ambiente variable es denominada homeostasis. Al cambiar las condiciones del medio, entran en juego mecanismos autorreguladores o reacciones homeostáticas para reestablecer las relaciones existentes previamente.

Dos o más poblaciones pueden interactuar con tres consecuencias:

poblaciones	efecto	interacción
A\leftrightarrowB	0	neutralismo
	+	sinergismo
	-	antagonismo

A pesar de la estrecha proximidad en que puedan encontrarse dos o más especies que coexisten en el espacio o en el tiempo, pueden no afectarse mutuamente.

El neutralismo es evidente *in vitro* cuando las velocidades de crecimiento y las densidades finales de dos poblaciones son semejantes. La demostración del neutralismo *in vivo* es más difícil. Es probable que ocurra cuando las densidades de las poblaciones son bajas, el aporte de nutrientes abundante y son satisfechos los requerimientos para el desarrollo de las poblaciones, de modo que no interactúen para los nutrientes, el espacio, etcétera, pero cuando el ambiente comienza a modificarse por la actividad biológica o cuando el aporte de nutrientes comienza a disminuir, las especies comienzan a interactuar.

Se distinguen tres tipos de **asociaciones sinérgicas**, a pesar de que las líneas de demarcación no son siempre nítidas y están muy afectadas por el ambiente:

comensalismo : un organismo se beneficia mientras que el otro no es afectado

protocooperación o simbiosis nutricional, en donde el beneficio es mutuo, sin llegar a presentar carácter obligatorio

simbiosis verdaderas, en las cuales los integrantes se benefician en situaciones en que ninguno de ellos podría realizar una función vital o sobrevivir.

Las interacciones antagónicas presentan un carácter perjudicial para una parte de la población e incluyen la:

competencia por los nutrientes (C, N, S, P, etc.), el espacio, luz, O₂, CO₂.

el amensalismo: una especie es perjudicada por otra que libera sustancias químicas como ácidos orgánicos o minerales, toxinas, bacteriocinas, antibióticos, enzimas.

predación, que implica el ataque directo de una especie sobre otra, con la muerte de la presa

parasitismo, por el cual un organismo se alimenta de células, tejidos o fluidos de otro organismo, usualmente mayor, llamado hospedante, el que es injuriado, pudiendo incluso morir.

Interacciones sinérgicas Comensalismo

Constituye una interacción muy común en la naturaleza, en donde los procesos de degradación de moléculas complejas son realizados por lo general por poblaciones mixtas (cadenas alimenticias), cada una de las cuales ofrece a las otras un sustrato más simple. El organismo que recibe el beneficio se denomina comensal y la relación es con frecuencia, pero no necesariamente, casual, ya que gran número de especies puede colaborar, existiendo poca especialización entre los asociados.

Algunos ejemplos implican una estrecha unión física entre ellos, en otros casos no se requiere proximidad entre los individuos. **Ejemplos de esta asociación:**

Modificación de un sustrato: una población convierte un sustrato no disponible para otra población en un producto que puede ser asimilado y usado como nutriente:

bacterias celulolíticas y *Azotobacter spp.* en suelos que han recibido aportes de restos vegetales

Nitrosomonas y Nitrobacter, en medio rico en amonio

degradación de polímeros como celulosa, almidón, quitina, sustancias pécticas, lignina,

pesticidas: intervienen primero poblaciones especializadas que permiten el desarrollo posterior de otras que emplean moléculas más simples (cadena alimenticia)

sustrato A —→ sustrato B —→ productos finales

organismo a organismo b

Liberación de sustancias bióticas: los factores de crecimiento son sintetizados por algunos microorganismos y su excreción permite la proliferación de auxótrofos (que los requieren pero no los pueden sintetizar). Así, muchos aislamientos a partir del suelo o aguas no crecen en los medios corrientes de laboratorio si no se los provee de ciertos aminoácidos, vitaminas, o bases púricas o pirimídicas.

En el laboratorio se puede observar fácilmente este tipo de interacción: en medio nutricionalmente inadecuado, las colonias de un organismo de interés se desarrollan en la vecindad de colonias de especies que excretan los nutrientes requeridos por la primera especie (colonias satélites).

org a —→ vitam B —→ org b (comensal)

algas auxótrofas para numerosas vitaminas en aguas con bacterias heterotróficas

productoras de vitaminas

en rumen, coexistencia de organismos exigentes y otros que producen y liberan factores de crecimiento

Remoción de factores inhibidores: una especie metaboliza toxinas u otros factores inhibidores, permitiendo, entonces, la multiplicación de su asociado. Las variaciones del pH o del Eh, la remoción del O₂, la reducción de la presión osmótica, los cambios en los niveles de nutrientes por la actividad biológica, son causas de beneficio para el comensal

Ejemplos:

organismo sensible a un biocida y otro que lo degrada

organismo b

organismo a —→ enzimas → sustrato —→ productos finales

antibiótico

inactivado

* aerobio y anaerobio dentro de un agregado en suelo aireado

* mesófilo y alcalinizante en ambiente ácido

* superficies adecuadas para la proliferación: un macro o microorganismo puede brindar una superficie adecuada para la colonización por el comensal, brindándole ventaja ecológica. Es frecuente observar bacterias que se desarrollan sobre algas, adhiriéndose a los organismos fotótrofos (ectocomensalismo).

Un organismo puede proveer hábitat favorable para su desarrollo a otro, el comensal, quien no perjudica ni beneficia al organismo que lo alberga (endocomensalismo). Estas relaciones derivan ocasionalmente hacia el parasitismo.

Como se observa, estas asociaciones son muy frecuentes en la naturaleza y explican la existencia de organismos exigentes en el plano nutricional en ambientes pobres, como en suelos o aguas.

En medios acuáticos, son muy importantes las asociaciones entre algas y otros microorganismos, como bacterias, actinomicetes y hongos, quienes estimulan el desarrollo de los fotótrofos por la excreción de factores de crecimiento, liberando CO₂, o aportando productos de la mineralización del nitrógeno, etc.

Muchas veces se observan al microscopio células bacterianas completamente rodeadas de un ectocomensal, que se adhiere, específicamente, en general en forma perpendicular a la célula por liberación de sustancias que les permiten fijarse a organismos muy variados, como algas verdes y cianobacterias, diatomeas y bacterias no relacionadas, de cuyas excreciones se nutren.

Protocooperación

Estas relaciones involucran beneficio mutuo para dos o más especies y presentan carácter bastante laxo, es decir que la existencia de cada integrante de la asociación en un ambiente no requiere una especie particular, sino que muchos integrantes de la población pueden brindarle los requisitos para su crecimiento. Los organismos que interactúan bajo ciertas condiciones ambientales, pueden proliferar independientemente, en otras condiciones. Se las denomina también mutualismo no obligatorio o simbiosis nutricional.

Ejemplos de protocooperación son muy evidentes en los procesos de síntesis y degradación de macromoléculas: polisacáridos como la celulosa, lignina, etc. son degradados por cultivos mixtos.

* un organismo provee una fuente de energía a su pareja y ésta le aporta algún nutriente esencial

* cada integrante de la pareja excreta un factor de crecimiento sin el cual el asociado no puede desarrollarse.

A tiamina⁻ B tiamina⁺
riboflavina⁺ riboflavina⁻

Los organismos A y B pueden crecer juntos en ambientes pobres ya que cada organismo excreta el factor de crecimiento requerido por el otro. La figura 1 muestra el desarrollo de organismos aislados de la leche: en medio deficiente en fenil-alanina (aminoácido) y ácido fólico (vitamina), ni *Streptococcus faecalis* ni *Lactobacillus arabinosus* se desarrollan, ya que el primero requiere ácido fólico y el segundo fenilalanina.

El cultivo mixto permite el desarrollo de ambos.

* cada integrante puede aportar fragmentos de la molécula de un factor de crecimiento, como la vitamina B1 o tiamina:

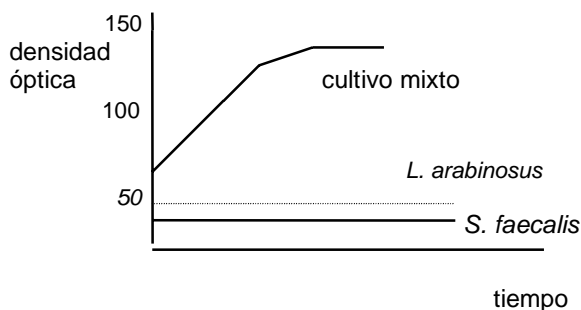
A (tiazol⁺ y pirimidina⁻) y B (tiazol⁻ y pirimidina⁺), la pareja sintetiza la tiamina formada por tiazol y pirimidina, requerida por ambos.

un heterótrofo produce CO₂ para un alga, quien a su turno libera el O₂ necesario para el primero

* una población destruye una toxina que perjudica a su asociado y éste, libre del inhibidor, aporta un compuesto necesario para la especie.

* *Azotobacter* y celulolíticos en ambientes pobres en nitrógeno y ricos en pajas. El primer organismo le brinda el nitrógeno fijado vía excreción y el segundo hidratos de carbono simples.

Figura 1 - Asociación sinérgica entre *Lactobacillus arabinosus* y *Streptococcus faecalis*



Simbiosis

Involucran relaciones bastante duraderas en las cuales dos o más especies viven en inmediata proximidad y obtienen beneficios mutuos de su interacción. En un hábitat dado, la simbiosis resulta casi siempre de carácter obligatorio, para que los simbioses realicen sus funciones vitales. Algunos biólogos emplean el término mutualismo para referirse a estas asociaciones y reconocen las simbiosis mutualísticas, en donde ambos integrantes se benefician, y las simbiosis parásitas, en las cuales un integrante se beneficia pero el otro no se afecta, o a veces sufre perjuicio más o menos severo. Los límites de separación de ambas resultan a veces difíciles de determinar. Además, el ambiente puede ejercer profundos cambios en las relaciones, de modo que una asociación que comenzó siendo mutualística puede volverse parásita, o viceversa.

Consideraremos a las simbiosis cuando al menos un integrante de la asociación obtuvo algún beneficio.

Algunas simbiosis involucran microorganismos entre sí, otras incluyen microorganismos con insectos, plantas y animales superiores. Analizaremos solamente aquellas entre microorganismos, muchas veces no distinguibles fácilmente por el tamaño submicroscópico de la mayoría de los integrantes.

Líquenes, la simbiosis más conocida entre un alga o una cianobacteria y un hongo, conocidos como ficobionte y micobionte. Los líquenes son considerados nuevos organismos con estructura externa diferente a la de los simbioses, con existencia independiente y funciones fisiológicas propias. La simbiosis ocurre bajo condiciones adversas para cada uno de los integrantes: bajo contenido en materia orgánica, temperaturas desfavorables, sequedad, etc.: el hongo obtiene materia carbonada de la fotosíntesis del alga, y ésta se beneficia con el aumento de la superficie de absorción y del agua retenida en la hifas.

Muchos líquenes poseen una cianobacteria fijadora de N₂, constituyéndose en importantes colonizadores de suelos pobres, desérticos, o muy fríos (capítulo 3).

Levaduras como *Lypomyces starkey* estimulan el crecimiento y fijación del N₂ de *Beijerinckia indica*. Se describe esta asociación como una simbiosis.

Algas y protozoarios: algunos fotoautótrofos viven y se mantienen como simbioses en los protozoos, de los cuales obtienen nutrientes y un ambiente protector, incluso algunos no pueden desarrollarse fuera del hospedante. Una pequeña bacteria denominada Kappa ha sido descrita como endosimbionte de un protozoo *Paramecium aurelia*, es requerida para su multiplicación y ha sido liberada del hospedante por métodos físicos o químicos.

protozoarios flagelados (*Cyanophora* y *Peliana*) y el ameboide *Paulinella* han sido descriptos en asociación con una cianobacteria denominada *Cyanellae*, la cual se mantiene perfectamente regulada en el protozoo, con divisiones celulares balanceadas: el hospedante alberga dos células de la cianobacteria (sin pared) que en la división se reparten en cada célula hija.

El **simbionte** favorece a su pareja por varios mecanismos:

- * aumento de la velocidad de crecimiento: el protozoo con el alga específica crece más rápidamente que sólo
- * estimulación de la actividad metabólica (respiración, etc.).
- * fuentes de C por la fotosíntesis: las algas en simbiosis en líquenes, o en protozoos o invertebrados acuáticos o con plantas, fotosintetizan en exceso para sus necesidades y satisfacen así los requerimientos de sus asociados. La capacidad de muchos paramecios para desarrollarse en medio inorgánico en la luz cuando están asociados a una clorofícea, explica esto.
- * conversión de nutrientes no disponibles para el simbionte en disponibles, por ejemplo los celulolíticos en el rumen, protozoos en el tracto digestivo de termitas, que se alimentan de los productos de las fermentaciones microbianas.
- * generación de CO₂ para la fotosíntesis, o la producción de O₂ para el simbionte por acción de la actividad fotosintética.
- * provisión de factores de crecimiento, utilización de metabolitos tóxicos, protección contra altas intensidades luminosas, desecación, parásitos, son otros de los mecanismos involucrados, en las asociaciones simbióticas.

Como vimos, **las simbiosis** varían según los autores por el grado de unión entre los participantes (ecto o endosimbiosis), el beneficio logrado (mutualismo-parasitismo), el grado de dependencia (simbiosis facultativa-obligada) y la duración de las mismas: en general involucran la mayor parte de la vida de los participantes.

La elección de la pareja no es en general un hecho casual, se reconoce cierta especificidad, distinguiéndola de la proto cooperación. La asociación es eminentemente exitosa y esto explica su amplia distribución en ecosistemas marinos, en el cuerpo de animales, en hojas, raíces, suelos.

Interacciones antagónicas

Al introducir un inoculante biológico, con rhizobios, *Frankia*, bacterias solubilizadoras de fosfatos, en ambientes densamente colonizados como el suelo, es frecuente observar que la población no logra sobrevivir y desaparece. Como vimos, cada microorganismo requiere de un conjunto de condiciones nutricionales y ambientales que le permiten desarrollarse.

Las interacciones antagónicas pueden explicar la desaparición o disminución significativa de algún organismo de interés si las condiciones físico-químicas son las adecuadas.

Competencia

En ambientes naturales, suelo, aguas, los sustratos energéticos y los nutrientes son por lo general limitantes como para mantener altas poblaciones microbianas. Estas interactúan compitiendo por los sustratos: se habla de competencia nutricional. Si excepcionalmente, el ambiente es rico de nutrientes, la competencia puede ejercerse por el espacio, la luz, etcétera.

Este tipo de interacción ejerce un profundo impacto en la sucesión de microorganismos, en la selección natural y en la composición de las comunidades microbianas. Podemos hablar de competencia interespecífica o intraespecífica, según se realice entre organismos de la misma o diferente especie.

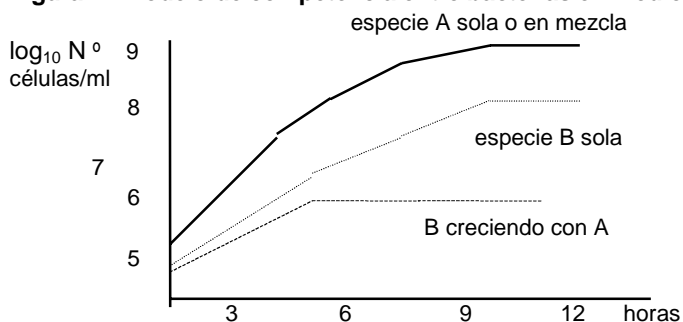
La figura 2 (Alexander, 1977) esquematiza la competencia en medio líquido entre dos bacterias. El mejor competidor, en general el que presenta menor tiempo de generación, se multiplica a la misma velocidad en cultivo puro y en mixto, aunque su densidad final es frecuentemente menor en cultivo mixto. El otro organismo crece a igual velocidad en cultivo puro o mixto, pero su velocidad de crecimiento disminuye cuando la primera especie metaboliza el nutriente limitante.

En el suelo, uno de los principales factores limitantes es el carbono, y la competencia por este elemento se hace evidente cuando la densidad de la población es alta. Al agregar sustancias carbonadas fácilmente metabolizables, se observa el levantamiento de la inhibición de la población de débil poder competitivo.

El cuadro 1 publicado por Alexander (1977) muestra el efecto del agregado de glucosa y nitrato de potasio en la competencia entre un hongo y una bacteria, en suelo neutro. Se aprecia que la competencia fue al inicio por el carbono, pero cuando éste es aportado se manifiesta la limitante del otro nutriente esencial, el nitrógeno.

En la figura 3 se esquematiza el desarrollo del hongo en el caso en que el carbono asimilable sea suficiente. Como se observa, en general aparece la deficiencia por el nitrógeno. El modelo experimental es suelo estéril inoculado simultáneamente con el hongo y la bacteria.

Figura 2 - Modelo de competencia entre bacterias en medio líquido

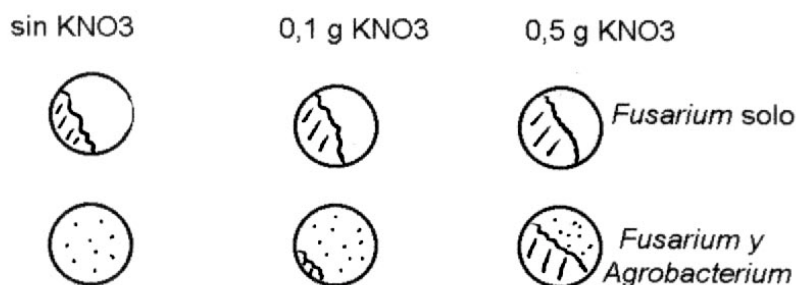


Cuadro 1 - Efecto de aportes de glucosa y nitrato en la asociación *Agrobacterium radiobacter* y *Fusarium oxysporum*

glucosa %	KNO ₃ %	C/N de la mezcla	radio del micelio (cm)	
			<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> y <i>A. radiobacter</i>
0	0	-	2.8	1.2

1,0	0,25	-	2,9	1,0
	0,50	-	3,1	0,8
	2,50	-	2,8	2,9
	0	-	5,5	2,1
	0,25	10	5,2	1,9
3,0	0,50	5	5,4	1,9
	2,50	1	5,4	5,0
	0	-	5,3	1,8
	0,25	30	5,2	1,8
	0,50	15	5,4	2,0
	2,50	3	5,2	5,2

Figura 3- Competencia por el N entre un hongo y una bacteria



Los competidores más efectivos de este hongo fitopatógeno son organismos con requerimientos nutritivos simples.

La capacidad de un organismo para competir está gobernada por una serie de factores:

- * alta velocidad de crecimiento: las especies que usan los nutrientes limitantes rápidamente poseen sin duda ventajas sobre las de crecimiento lento

- * tolerancia a factores abióticos: la facilidad de crecer en condiciones extremas, en bajas o altas temperaturas, altas intensidades luminosas, bajos niveles de humedad, brindan al organismo ventaja ecológica indudable

- * tolerancia a fluctuaciones del ambiente: de temperatura, niveles hídricos, intensidad luminosa, etc.

- * capacidad de multiplicarse a bajas concentraciones de nutrientes limitantes, propiedad de pocas especies, como algunas algas que crecen bien a concentraciones muy bajas de nitratos o fosfatos, y hongos que aparecen como contaminantes en medios sin N combinado y que pueden usar trazas de nitrógeno orgánico contenidas en los productos químicos.

- * eficiencia en el uso de nutrientes limitantes: son favorecidos aquellos organismos que pueden

- * sintetizar citoplasma con niveles bajos de nutrientes asimilables

- * requerimientos de factores de crecimiento: en ambientes pobres, organismos prototrofos poseerán ventaja frente a un auxótrofo para estas sustancias

- * capacidad para sintetizar y almacenar sustancias de reserva y emplearlas cuando el aporte de nutrientes disminuye

- * capacidad de desplazarse hacia áreas en donde el nivel de nutrientes limitantes es mayor (quimiostasis)

Cuando materiales orgánicos se incorporan al suelo o aguas, los primeros colonizadores son en general las bacterias con alta actividad metabólica y los hongos, con esporas que germinan fácilmente.

En ambientes acuáticos, es posible observar competencia por la luz; la masa de fitoplancton limita la difusión de las radiaciones. El CO_2 y el O_2 , poco soluble en el agua, provocan también fenómenos competitivos entre heterótrofos aerobios, sobre todo en aguas contaminadas con residuos orgánicos.

En regiones áridas, la competencia por el agua ejerce importante rol en la sucesión de especies. La competencia por el espacio resulta más difícil de demostrar. Además, las observaciones en microscopía electrónica de barrido en finos cortes de suelo, muestran la existencia de amplias zonas sin colonizar (Gray y Williams, 1971), indicando que aparentemente habrían escasas limitaciones espaciales para el desarrollo de microorganismos. Aunque esta limitación podría ocurrir a nivel de microporos, donde una pequeña partícula de materia orgánica estimula la proliferación de células y micelio fúngico que puede obstruir rápidamente el microhabitat.

Este tipo de interacción antagonica es una de las más difíciles de demostrar en comunidades naturales y se recurre a modelos con suelo estéril y la inoculación simultánea de los organismos sospechosos de interactuar.

Amensalismo

Resulta de la producción por una especie microbiana, **el antagonista**, de sustancias:

- * inhibidoras (microbiostáticas)

- * tóxicas (microbicidas) con o sin lisis (microlíticas) de células o filamentos de especies muy próximas.

Las sustancias pueden ser de:

- * **baja especificidad:** actúan sobre gran número de microorganismos, como por ejemplo, los ácidos minerales u orgánicos, alcoholes, detergentes. Son efectivas a altas concentraciones. Inhibidores inorgánicos como el H_2O_2 , NH_4^+ , NO_2^- , CO_2 , H_2S , NO_3^- son producidos por procesos biológicos y pueden alcanzar concentraciones que llegan a ser inhibidoras o tóxicas para especies sensibles. Compuestos orgánicos como los ácidos grasos, alcoholes, son sintetizados por una multiplicidad de especies y pueden ser inhibidores, en ambientes donde su degradación es lenta (ácido láctico en alimentos).

- * **altamente específicas**, como en el caso de antibióticos, sulfas, toxinas, enzimas, las que actúan a muy bajas concentraciones.

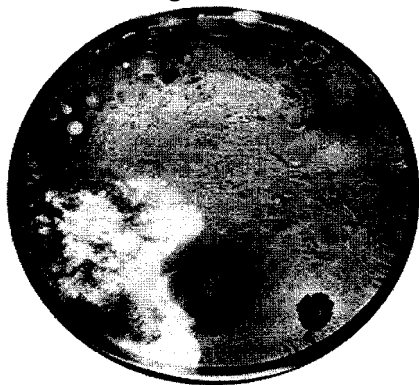
Antibióticos

Son metabolitos secundarios, productos de desecho liberados por bacterias, actinomicetes, hongos, que juegan importante rol en la lucha biológica en ambientes naturales. Brindan supremacía a la especie productora y contribuyen a determinar el tamaño de una comunidad, gobernando además la sucesión de especies. Estas interacciones explican la eliminación de ciertos patógenos para el hombre y vegetales, el control de hongos fitopatógenos cuando se incorpora al suelo restos orgánicos, o la desaparición de bacterias extrañas que llegan al rumen.

Detección: cuando una suspensión diluida de suelo o muestras de agua se siembran en la superficie de medio rico, muchas de las colonias aparecen rodeadas de un halo de inhibición, donde no crece otro organismo (figura 4). La colonia produce una sustancia difusible en el agar, presumiblemente un antibiótico, que inhibe o mata a especies sensibles a concentraciones muy bajas.

Se confirma esta presunción aislando el microorganismo y sembrándolo en otra caja en forma de línea recta. Luego de 2-3 días se siembran perpendicularmente a estas líneas, varios organismos para probar su especificidad. La supresión del crecimiento a distancias variables de la cepa productora refleja la sensibilidad frente a la sustancia inhibidora.

Figura 4 - Microorganismos del suelo en medio de cultivo



Rol en la naturaleza: durante mucho tiempo se sostuvo que los antibióticos eran un fenómeno de laboratorio ya que las concentraciones requeridas para dañar a otro organismo se alcanzaban raramente en la naturaleza, donde deben desplazarse desde el organismo productor hacia la especie sensible, pudiendo ser degradada o adsorbida. Estas controversias han sido superadas y se piensa que los antibióticos juegan un rol muy importante en el equilibrio biológico del suelo, siendo sobre todo activos a nivel de microagregados, donde la densidad microbiana puede ser muy alta y las células están en estrecha proximidad.

Modo de acción: su composición química y modo de acción son muy variados: actúan a nivel de membranas, pared, ribosomas, interfiriendo metabolismos bioenergéticos o sintéticos (actividad respiratoria, síntesis proteica, etc.). Es frecuente la aparición de resistencias entre las especies sensibles, quienes mutan o cambian la estructura sensible de modo que el antibiótico no la reconoce, o sintetizan enzimas que rompen o desnaturalizan al antibiótico, como la penicilinas. En general, la resistencia está codificada en plásmidos y puede perderse con éstos, que a su vez pueden transferirla a organismos sensibles.

Enzimas extracelulares producidas por muchos microorganismos que ocasionan la lisis de organismos sensibles. La quitinasa, producida por bacterias y actinomicetes lisa las paredes de hongos al actuar sobre la quitina. La glucanasa actúa sobre la microflora y microfauna (nemátodos).

La competencia y la antibiosis explican el fenómeno de micostasis o inhibición de la germinación de esporas fúngicas. La fungistasis es la inhibición, sin llegar a la muerte, de hongos (hifas, conidios, esclerocios, ascosporas). Se han reconocido algunas toxinas, antibióticos y compuestos volátiles como responsables de la inhibición de la proliferación de estas estructuras, aun en condiciones de abundancia de nutrientes. En ciertas situaciones este fenómeno puede resultar beneficioso para muchos patógenos vegetales, ya que si germinaran cuando su hospedante no está próximo, serían eliminados por competencia o amensalismo, por la población nativa.

Parasitismo

Un parásito es un organismo que se nutre a partir de células, tejidos o fluidos de otro organismo, usualmente mayor, llamado hospedante, el que generalmente es injuriado en el proceso. El parásito es dependiente en alto grado del hospedante, a expensas del cual se nutre y con el que se mantiene en contacto físico y metabólico íntimo durante considerable fracción de su vida. Muy pocos organismos están libres del ataque de parásitos microbianos. Resulta muchas veces difícil determinar las líneas de demarcación entre parasitismo e interacciones relacionadas, sobretudo la predación y el parasitismo, ya que ambos implican beneficio para unos y perjuicio para otros organismos.

Numerosos parásitos mantienen contacto prolongado y se alimentan por largo período de su hospedante y pueden atacar un rango estrecho de organismos. Hay especies que viven independientemente, como saprofitas y en ciertas oportunidades como parásitas, son los parásitos facultativos.

Los obligados, por el contrario, deben vivir en las células, tejidos o fluidos de un organismo durante gran parte de su ciclo de vida.

Se distinguen los:

endoparásitos, que habitan dentro de un organismo, como los bacteriófagos, los actinófagos, etc., y otros microorganismos que viven dentro de hongos, algas, etc. y

ectoparásitos que se localizan externamente en sus hospedantes, menos frecuentes entre microorganismos

Una pequeña bacteria, de forma de vibrio, llamada *Bdellovibrio*, es parásita obligada de bacterias Gram negativas, entre ellas rizobios, llegando incluso a su lisis. Su ciclo de vida es muy particular: se desplazan a gran velocidad, colisionan con las células que van a atacar por su extremo no flagelado y un orificio en la pared producido por enzimas permite al parásito penetrar, el que se ubica en el espacio entre pared y membrana. La rotación permanente ayuda a debilitar la pared. La membrana no es atravesada por el parásito pero se vuelve porosa y la célula se lisa. En la superficie de cajas de Petri con la especie hospedante, *Bdellovibrio* forma placas líticas, similares a las producidas por infección por fagos.

No han sido descriptos muchos parasitismos entre bacterias.

Los hongos sufren el ataque de numerosos parásitos, sobre todo de otros hongos en estructuras como clamidosporas, esclerocios, oosporas de especies de *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Thrichoderma*, *Gliocladium* (Alexander, 1977). Muchas especies sobreviven por su alta velocidad de reproducción, aunque las esporas pueden sufrir graves daños cuando son atacadas durante largos períodos por los parásitos.

Muchos hongos pueden penetrar en líquenes, afectando a los componentes de la asociación.

Los protozoos son parasitados también por varios tipos de bacterias y algunos hongos, llegando a veces a su lisis, por digestión de las paredes celulares.

En el parasitismo actúan enzimas extracelulares o antibióticos provocando heterólisis, o bien puede ocurrir una autólisis, por enzimas producidas por la propia célula o hifa parasitada.

El agregado de materia orgánica promueve la germinación de esporas y cuerpos en reposo, se favorece el desarrollo de las hifas, las que son atacadas más fácilmente por los antagonistas en el suelo, contribuyendo a la declinación de la infección por el fitopatógeno (lucha biológica) (capítulo 18). Así, clamidosporas de *Fusarium solani* se lisan en suelos enriquecidos con quitina y laminarina, al estimularse el desarrollo de bacterias y actinomicetes quitinolíticos.

Fagos: son los más conocidos parásitos de las bacterias, actinomicetes, cianobacterias, que pueden causar su lisis o lisogenizarlas al incorporarse a su ADN. Algunos virus son muy específicos, otros presentan un carácter más polivalente. A pesar de ser aislados de la mayoría de los suelos agrícolas, es improbable que sean los responsables de la desaparición de inóculos importantes de bacterias como rizobios, cianobacterias, etc. Los virus que atacan hongos han sido estudiados, aunque se conoce menos su distribución en la naturaleza.

Predación

En este antagonismo el período de contacto es generalmente corto y la presa es muerta y digerida rápidamente. El predator vive, por lo general, libre, es mayor en tamaño que su presa y presenta menor especificidad en sus hábitos alimenticios.

Constituye una de las más dramáticas interacciones entre microorganismos en la naturaleza. Las bacterias son los organismos más expuestas al ataque de predadores, sobre todo protozoos, algas, hongos. El predator exhibe, por lo general, hábitos alimenticios fagotróficos, ingiriendo organismos vivos, a pesar de que algunos predadores lisan la presa y asimilan sólo los constituyentes solubles. Muchos protozoos viven toda su vida como fagotrofos, alimentándose de millones de bacterias por cada ciclo celular. La presa, sin embargo, no desaparece completamente, existe un equilibrio dinámico: el cambio en un grupo conduce a cambios cuali y cuantitativos en el otro y la población bacteriana atacada estimula su metabolismo y se divide más rápidamente, evitando en muchos casos su total extinción.

Muchas bacterias son resistentes a la predación, excretando toxinas inhibitoras de los protozoos, pigmentos o formando estructuras más resistentes a condiciones adversas y a la predación, como los **cistos**. Habte y Alexander (1978) analizaron las causas por las cuales las poblaciones de ciertas bacterias no se reducen por los protozoos debajo de cierta densidad crítica, en el suelo y en medio líquido: la habilidad de la bacteria para mantener sustanciales poblaciones depende de su constante multiplicación en presencia del protozoo.

Existe evidencia de que los protozoos predadores aceleran procesos bioquímicos, incluyendo la descomposición de la materia orgánica, como consecuencia del hecho de que los protozoos evitan que las bacterias alcancen un número muy grande que resultaría autoinhibitorio. Se las mantiene, además, en estado prolongado de alta actividad metabólica.

Los protozoos pueden predar también a pequeñas algas, hongos, a pesar de que en este caso la presa es de mayor tamaño. Danso *et al* (1975) sostienen que los protozoos consumen bacterias si éstas están suficientemente próximas, de modo que la energía ganada en la predación es mayor que la requerida para predarlas. Cuando el número de bacterias cae a valores en los que la energía requerida por el protozoo para encontrar a su presa es igual o mayor que la que obtienen como alimento, entonces el protozoo cesa de predar, y se reproduce.

Como vimos, las interacciones **antagónicas** pueden conducir a una disminución importante e incluso al fracaso de prácticas agrícolas, como la inoculación de semillas con organismos de interés en la fijación del N₂, solubilización de fosfatos, etc. La predación se encuentra entre las causas más importantes.

Bibliografía

ALEXANDER, M., 1977 Interactions among especies, en: **Introduction to Soil Microbiology**, J. Wiley & Sons, Nueva York: 405-422.

DANSO, S. K. A.; S. O. KEYA y M. ALEXANDER, 1975 Protozoa and the decline of *Rhizobium* populations added to soil, *Can J. Microbiol.*, 21: 884-895.

FRIONI, L. 1990 **Ecología microbiana del suelo**, Depto. Publicaciones de la Universidad de la república, Montevideo, 517 pp.

GRAY, T. R. G. y S. T. WILLIAMS (eds) 1971 **The soil population, en Soil Micro-Organisms**, Longman, Londres, Nueva York, pp. 1-29.

HABTE, M. y M. ALEXANDER, 1975 Protozoa as agents responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* in soil, *Appl. Microbiol.*, 29: 159-164.

HABTE, M. y M. ALEXANDER, 1978 Mechanisms of persistence of low numbers of bacteria preyed upon by protozoa, *Soil Biol. Biochem.*, 10: 1-6.

Capítulo 14

Fijación biológica del nitrógeno (FBN) por diazotrofos en vida libre y en la rizosfera

El nitrógeno es un elemento fundamental para los seres vivos y el desarrollo vegetal muchas veces se ve limitado porque los suelos contienen poco nitrógeno. La fertilización con compuestos nitrogenados orgánicos o inorgánicos es una práctica frecuente.

El nitrógeno del suelo se origina a partir de la reserva inagotable que constituye la atmósfera, en donde se lo encuentra como gas diatómico (N_2) muy inerte debido a la alta energía de enlace, superior a la que se presenta entre los compuestos del carbono (cuadro 1).

Cuadro 1 - Energía de enlace en compuestos con carbono y nitrógeno (kcal/mol)

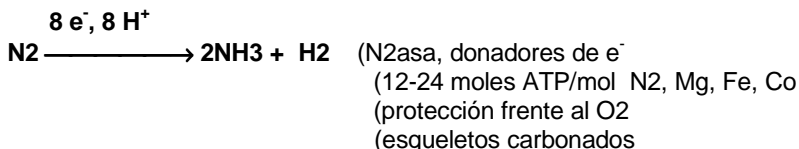
C-C	92	N-N	38
C=C	146	N=N	98
CtripleC	192	NtripleN	25
enlace		enlace	

En la naturaleza el nitrógeno se presenta en numerosos compuestos con estados de oxidación que van desde (+5) a (-3):

(+ 5) ácido nítrico (HNO_3)	(0) dinitrógeno (N_2)
(+ 4) dióxido de N (NO_2)	(- 1) diimida (N_2H_2)
(+ 3) ácido nitroso (HNO_2)	(- 2) hidrazina (N_2H_4)
(+ 2) óxido nítrico (NO)	(- 3) amoníaco (NH_3)
(+ 1) óxido nitroso (N_2O)	

Este proceso microbiano es realizado por un grupo limitado de protistas inferiores llamados también **diazotrofos** (diazó= N_2 , trofo=nutrición) a temperaturas y presiones normales, gracias a la acción de una enzima muy compleja, **la nitrogenasa**. El N_2 se reduce también reducirse por vías no biológicas.

a. Esquema del proceso biológico de fijación biológica del nitrógeno (FBN)

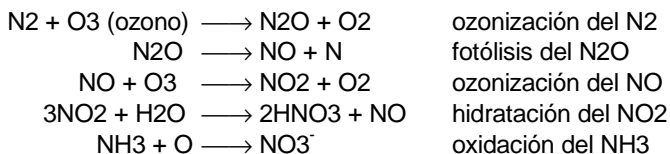


Se estima que por esta vía se fijan al año cerca de 170 millones de toneladas de nitrógeno por organismos en vida libre, asociados a vegetales no simbióticamente y en formaciones nodulares simbióticas (cuadro 2, Craswell, 1990).

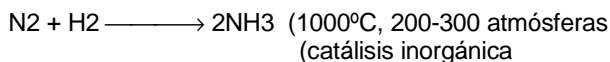
b. Procesos abiológicos en la atmósfera

De importancia cuantitativa menor, se estiman unos $10-20 \times 10^6$ toneladas de N/año, o sea un 10% del total fijado.

Algunos de los procesos



c. Procesos industriales, como el de Haber-Bosch (1914)



Este proceso representa menos del 30% de la fijación total mundial. Vimos que otro 10% provendría de los procesos no biológicos realizados en la atmósfera, es de suponer entonces que más de un 60% del total de nitrógeno que se incorpora cada año en el suelo y aguas provendría de la **FBN**.

Cuadro 2-Fijación biológica del nitrógeno atmosférico y flujo anual de N en términos globales

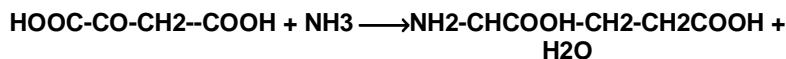
fuelle de fijación	x 10 ⁶ toneladas/año
industrial (fertilizantes)	49
atmosférica (electroquímica)	10
otros procesos químicos	35
FBN total	170
sistemas simbióticos	50
total en sistemas terrestres	139
Leguminosas	35
arbóreas (100-300 kg/ha/año)	
granos (40-240 kg/ha/año)	
abonos verdes (100-360 kg/Ha/año)	
cultivo de arroz (10-80 kg/ha/año)	4
pasturas (15kg/ha/año)	45
otros cultivos (5kg/ha/año)	5
ecosistemas forestales (10kg/ha/año)	5
otros ecosistemas (2kg/ha/año)	10
cantidad N en suelos	105.000
absorción total de N	1.400
N mineralizado	3.500
N denitrificado	135
N perdido por erosión/lavado	85

La producción de fertilizantes químicos requiere una energía muy considerable para separar el H₂ del gas natural o del petróleo, menos cantidad para comprimir los reactivos y calentarlos y otra importante cantidad para el traslado y distribución desde las plantas industriales al campo.

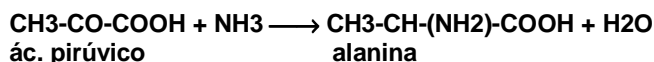
La necesidad de conservar los combustibles fósiles, el carbón, el metano y el petróleo incentiva las investigaciones sobre la **FBN**.

Proceso bioquímico de la fijación del N₂

La fijación biológica del N₂ consiste en la reducción del gas dinitrógeno hasta **amonio**; los intermediarios postulados son **diimida e hidrazina**, aunque aún no han sido aislados. El amonio es rápidamente convertido en aminoácidos, proteínas y luego en todas las moléculas nitrogenadas requeridas por la célula. El amonio formado se combina con moléculas carbonadas provistas por la célula fijadora en caso de fijación por organismos en vida libre, o por la actividad fotosintética del huésped, en caso de asociaciones con vegetales. Ocurren reacciones del tipo de las siguientes:



ác. alfa-ceto ác. glutámico ác. glutámico
glutámico deshidrogenasa



Requisitos

Poder reductor: la fijación biológica del N₂ es un proceso reductivo y numerosos compuestos orgánicos pueden ser empleados por los microorganismos fijadores heterótrofos como fuente de

carbono, energía y poder reductor. La **ferredoxina y la flavodoxina** pueden actuar de donadores de electrones *in vivo* y el metil viológeno y ditionito de sodio se emplean como donadores no fisiológicos en sistemas *in vivo*.

Las **ferredoxinas** son proteínas-SFe, capaces de reducir la nitrogenasa cuyo potencial redox de -0,43 voltios puede variar en un determinado rango según los componentes de la proteína. Las **flavodoxinas** son proteínas sin hierro que poseen un flavin-mononucleótido (FMN) como grupo prostético. Están codificadas por el gen **nifF** y son capaces de transportar dos electrones. En *Klebsiella pneumoniae*, el donador de electrones a la enzima es una flavodoxina que es reducida directamente por la piruvato-reductasa, codificada por el gen **nifJ**.

El formiato es un importante donador de electrones en organismos fijadores aerobios y anaerobios facultativos. El H₂ ha sido descrito como efectivo donador de electrones en extractos acelulares de *C.pasteurianum*.

En los organismos fotosintéticos la fuente de poder reductor proviene del flujo electrónico derivado de la clorofila.

Energía (ATP): en términos fisiológicos la fijación del N₂ es un proceso muy costoso para la célula. Se calculan entre 12 y 24 los ATP requeridos para reducir un mol de N₂. Esta molécula se genera en la célula por los procedimientos habituales:

- **fosforilaciones oxidativas** en organismos aerobios,
- **fosforilaciones a nivel del sustrato** en anaerobios o por
- **fotooxidaciones** en organismos fotosintéticos.

En estudios *in vitro* se han utilizado sistemas artificiales de generación de ATP, no empleando ATP puro, pues se comprobó que la acumulación de ADP inhibía a la nitrogenasa.

Resumiendo

- en los organismos **heterótrofos** los compuestos orgánicos son empleados como fuente de carbono, de poder reductor y de energía
- en los **fotosintéticos**, es el flujo electrónico derivado de los sistemas pigmentarios, el que llega a reducir simultáneamente al N₂ y al CO₂.

Metales: constituyen otro requerimiento imprescindible para la nitrogenasa. El magnesio reacciona con el ATP para dar la sal monomagnésica, que reacciona con la nitrogenasa, según los últimos modelos que explican el funcionamiento de esta enzima. Otros minerales presentes en la nitrogenasa son el hierro y el molibdeno. Suelos carentes en estos elementos limitan la fijación.

La nitrogenasa es la enzima responsable de la reducción y dada su complejidad resulta muy difícil de purificar. Además, por su extremada sensibilidad frente al O₂ los trabajos *in-vitro* se han limitado en el tiempo. Recién en 1960, se logró purificar la enzima a partir de un organismo anaerobio, el *Clostridium pasteurianum*. Hacia 1974 se lograron aislamientos a partir de unos 25 microorganismos, incluidos los aerobios, pero trabajando siempre en ausencia de O₂.

La enzima está integrada por dos componentes, dos metaloproteínas fácilmente separables que recibieron distintos nombres según los laboratorios que las purificaron.

- **El componente I, también denominado Mo-Fe proteína, Azofermo, dinitrogenasa** y está formada por 4 subunidades de cadenas polipeptídicas. En *Azotobacter* su PM es de 220.000 y posee 24 átomos de Fe y 2 de Mo.
- **El componente II, o Fe proteína o Azofer, ferroproteína, dinitrogenasa reductasa**, posee 2 subunidades proteicas con 4 átomos de Fe y uniones sulfuro lábil. El complejo estaría en equilibrio dinámico con sus dos componentes:

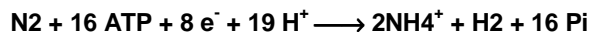


Extractos con actividad nitrogenasa se han preparado a partir de organismos diferentes: aerobios, anaerobios, microaerófilos y algunas cianobacterias y sistemas simbióticos con leguminosas y no leguminosas. Se han aislado nitrogenasas que no dependen del Mo, sino del vanadio (V) (nitrogenasa 2) y otra que no depende ni del Mo ni del V, la nitrogenasa 3, que es una FeFe-proteína, con propiedades y afinidades por los sustratos diferentes a la clásica nitrogenasa. Son las llamadas **nitrogenasas alternativas**.

La figura 1 (Pau, 1989) presenta modelo de flujo electrónico en esta enzima y sustratos alternativos también reducidos por el complejo enzimático.

Sustratos de la enzima

El dinitrógeno es el sustrato natural de la enzima, es reducido a amonio en una reacción irreversible que va acompañada de la liberación de H₂. La relación entre H₂ producido/N₂ reducido puede variar según las nitrogenasas de los microorganismos, pero nunca es inferior a 1.



Hasta la década de 1960 se pensaba que el dinitrógeno era el único sustrato de la enzima, pero se evidenció que la reacción era inhibida por determinados "análogos" del N₂, pequeñas moléculas con triple enlace, como el acetileno, cianuro, azidas, etc. Se demostró que estas moléculas eran sustratos que podían ser reducidas por la enzima. El cuadro 3 se muestran algunos de estos sustratos. El acetileno es un inhibidor no competitivo de la reducción del N₂ (figura 1), mientras que el N₂ inhibe competitivamente la reducción del acetileno.

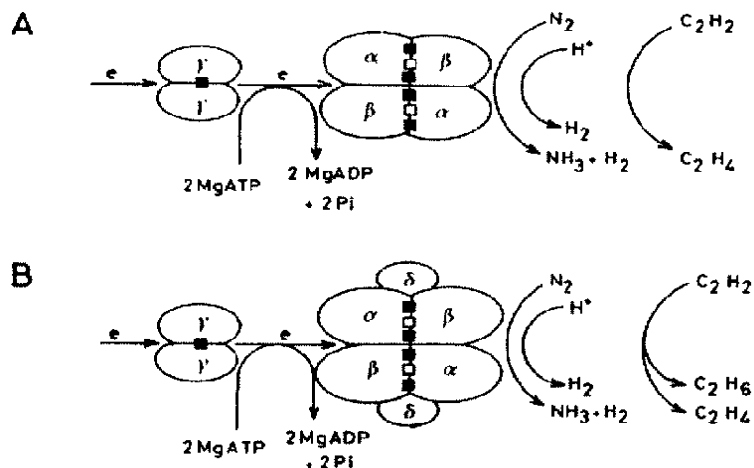
Inhibidores

El H₂ es un inhibidor competitivo de la reducción del N₂, pero no de la de protones, ni de otra reducción catalizada por la enzima. El O₂ inactiva ambos componentes de la N₂asa, actúa como inhibidor no competitivo. El mecanismo no está totalmente dilucidado, puede relacionarse con la expresión de los genes **nif** o con la formación de **radicales libres** (superóxidos) generados en el ambiente altamente reductor donde funciona la enzima.

Figura 1 - Representación de la estructura de las nitrogenasas

a) *nitrogenasa dependiente del Mo*. b) *nitrogenasas alternativas*

Las subunidades γ forman parte de la Fe-proteína, la δ es específica de las nitrogenasas alternativas, los centros 4Fe-4S y cofactores \blacksquare se localizan en cada proteína



Cuadro 3 - Sustratos reducibles por la nitrogenasa

sustrato	Km(mM)	Productos
dinitrógeno	0,1	NH ₃ , H ₂
azida (N=N-N) ⁻	1,0	N ₂ , NH ₃ , N ₂ H ₄
cianuro (C=N) ⁻	0,4	CH ₃ NH ₂ , NH ₃ , CH ₄
óxido nitroso (N ₂ O)	1,0	N ₂ , H ₂ O
acetileno CH=CH	0,1	C ₂ H ₄
protones H ⁺	-	H ₂
alquilcianuro (R-C=N)	10	RCH ₃ , NH ₃

Protección de la nitrogenasa frente al oxígeno

La fijación de N_2 requiere un acoplamiento eficiente entre los sistemas generadores de ATP, que en muchos diazotrofos es la fosforilación oxidativa y la protección de la nitrogenasa frente al oxígeno. Teóricamente todos los diazotrofos protegen a la enzima según distintas estrategias resumidas en la figura 2 (Lluch Pla y Ligeró Ligeró, 1992).

Polímeros extracelulares: cápsulas y capas mucosas limitan el flujo de oxígeno a la célula.

Microaerofilia: diazotrofos aerobios migran hacia regiones de baja tensión de O_2 donde pueden expresar la nitrogenasa.

Protección respiratoria: una intensificación del proceso respiratorio permite la reducción del O_2 a concentraciones inocuas para la enzima. Proceso descrito en *Azotobacter*: se induce un cambio en la actividad de los citocromos de la CTE y un desvío del flujo de electrones que estimulan el consumo de O_2 hacia oxidasas terminales alternativas. La respiración es más ineficiente y produce menos ATP/mol de sustrato.

Protección conformacional: cultivos de *Azotobacter* poseen este mecanismo relacionado a modificaciones bioquímicas de la enzima (se combina equimolecularmente con una tercera **SFe-proteína llamada SFell** en presencia de iones Mg).

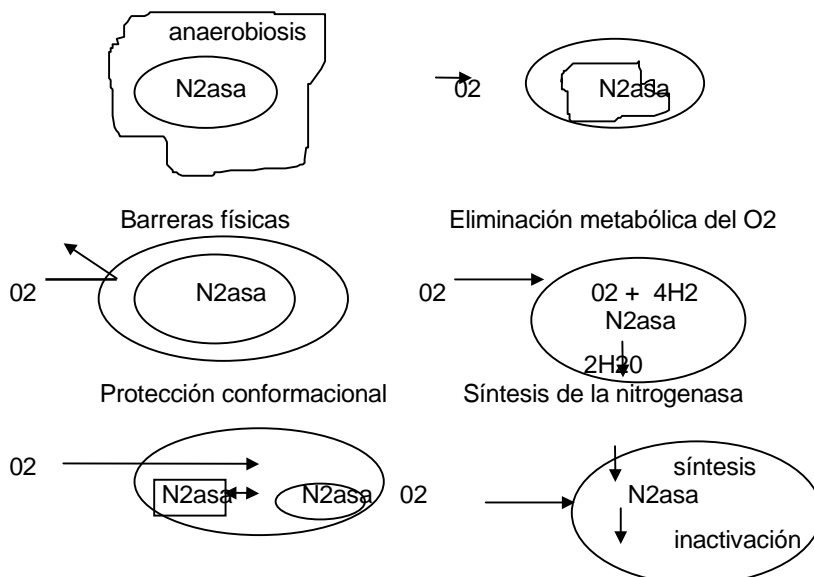
Inhibición reversible: un mecanismo alternativo propuesto para *Klebsiella* y *Rhodospseudomonas* está relacionado en la competencia entre dos sistemas enzimáticos, nitrogenasa y cadena respiratoria por un "pool" común de poder reductor.

Las proteínas como ferredoxina o flavodoxina, donadores de electrones a la N_2 asa, son también fácilmente oxidables, generando radicales libres. Este oxidación podría relacionarse con la inhibición reversible.

Separación espacial de la nitrogenasa: en células especializadas como los **heterocistos** en cianobacterias o las **vesículas** en *Frankia*, la separación de la actividad nitrogenasa puede ser temporal o espacial. En cianobacterias sin heterocistos los procesos son secuenciales: durante el día se produce la fotólisis del agua y se genera ATP y en períodos oscuros se activa la nitrogenasa y la respiración mantiene el nivel de O_2 adecuado. La fijación en especies heterocísticas se puede realizar en el aire.

Barreras a la difusión: los nódulos de leguminosas y actinorrizas ofrecen varios mecanismos de protección que analizaremos en otro capítulo, pero la barrera mecánica de las células de la **corteza del nódulo** limita la entrada de O_2 a la zona bacteriana. **Sistemas membranosos** internos de muchos diazotrofos, del tipo de los mesosomas, limitan la llegada del oxígeno a la enzima.

Figura 2 - Mecanismos de protección de la nitrogenasa frente al O_2
Polímeros extracelulares Sistemas membranosos internos



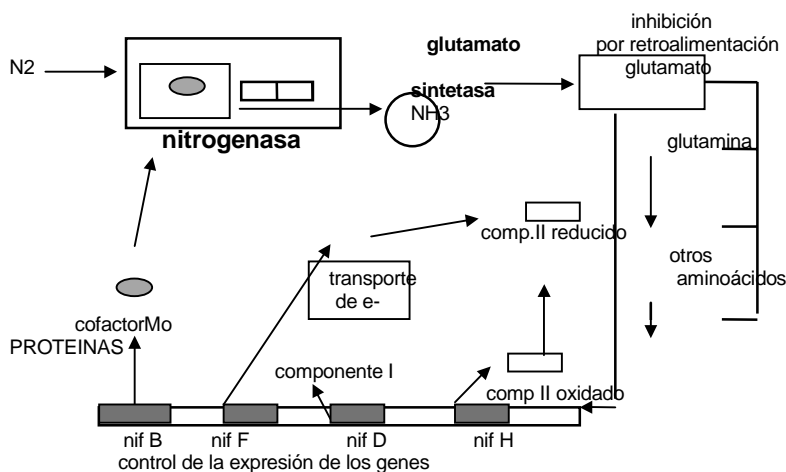
Regulación de la nitrogenasa

La figura 3 (Brill, 1977) esquematiza los mecanismos de regulación de la FBN. El nitrógeno combinado suprime la fijación por inhibición de la síntesis de la nitrogenasa, mediante mecanismos de represión de la expresión de los genes responsables de la síntesis de los componentes de la enzima (genes *nif*). En *Klebsiella pneumoniae* la represión ha sido estudiada en detalle y la molécula crucial es una enzima, la **glutamino sintetasa**, que cataliza el primer paso en la síntesis de aminoácidos: el amonio reacciona con el glutamato formando otro aminoácido: **la glutamina**.

La mayoría de los otros aminoácidos se forman por transferencia del nitrógeno desde la glutamina a otros compuestos.

La **glutamino sintetasa** es regulada por inhibición *feed back* o retroalimentación, por distintos productos finales de la síntesis de aminoácidos. Alta concentración de glutamina o de algún otro aminoácido disminuye la actividad de la enzima y suprime también la producción de aminoácidos adicionales.

Figura 3- Esquema del control de la nitrogenasa



Métodos para evaluar la FBN (Anexo Práctico)

Crecimiento y morfología

Si se logra incremento en la biomasa o en el número de organismos inoculados en un medio de cultivo sin nitrógeno combinado, puede afirmarse que el organismo es un diazotrofo. Es necesario confirmar la capacidad fijadora, pues muchos organismos crecen a expensas de pequeñas impurezas de los medios de cultivo, o se desarrollan como contaminantes luego de un pequeño desarrollo de los diazotrofos.

La presencia de células especializadas en la fijación del N_2 , como los **heterocistos** en cianobacterias filamentosas y las **vesículas**, en *Frankia*, es indicio de que el organismo puede fijar N_2 .

Contenido de nitrógeno

Se permite desarrollar al microorganismo o sistema simbiótico en un medio sin nitrógeno o con muy poca cantidad. Las medidas de este elemento por técnicas convencionales como la de Kjeldahl (digestión ácida en caliente de la materia orgánica, destilación y titulación del NH_3), permiten detectar fijación si ésta es de cierta magnitud (más del 1% del N inicial). Los errores son altos y la muestra se destruye en el análisis.

Empleo de isótopos del N

La aplicación del isótopo radioactivo N^{13} es muy limitada por la corta vida media (11 minutos) y su elevado costo. El uso del isótopo estable N^{15} constituye una de las mejores pruebas de la fijación del N_2 . Es más sensible que el Kjeldahl (1000X).

Las metodologías empleadas se basan en:

- **uso de $^{15}\text{N}_2$ gas:** la muestra se incuba en sistema cerrado con N_2 enriquecido con N^{15} y luego de período apropiado se convierte todo el N de la muestra en NH_3 por digestión ácida, se destila y se recoge el amonio formado, por ejemplo en ácido bórico. En el momento del análisis se oxida este amonio a N_2 el que se analiza en espectrómetro de masa, que separa en un campo magnético los distintos isótopos según su masa. El método posee escasa utilidad en condiciones naturales y limitaciones en condiciones controladas.
- **uso de fertilizantes o sustratos enriquecidos con N^{15} :**

I. técnica de la dilución isotópica, se acepta como el más útil para medir la **FBN**

II. técnica que usa el "valor A" (proporción del N^{15} que la planta toma del fertilizante)

- **evaluación de la diferencia** que existe en la abundancia natural en N^{15} entre la atmósfera y el suelo. Esta técnica exige gran precisión y brinda datos de gran confiabilidad (Barea, 1991).

Se evalúan los incrementos en la abundancia en N^{15} sobre un valor promedio de **0,364%** que representa la abundancia natural de este isótopo en la atmósfera. Valores superiores en **0,015%** a ese promedio se aceptan como evidencia positiva de fijación. Las técnicas isotópicas constituyen sin duda la herramienta más importante en la evaluación de la fijación en todos los sistemas biológicos, en el laboratorio o en el campo.

Determinación de la actividad nitrogenásica

El descubrimiento de que la nitrogenasa puede reducir otros sustratos además del N_2 permitió desarrollar desde 1966 un método analítico rápido y eficaz que emplea **acetileno** que inhibe la reducción del N_2 por la nitrogenasa y es reducido a etileno. Ambos se evalúan en cromatografía en fase gaseosa con columna de resinas como el Porapak, con N_2 como gas transportador y detector de ionización de llama.

Esta técnica es muy usada por su rapidez, sensibilidad y por la estabilidad del producto formado, el C_2H_4 , que permite trasladarlo en frascos cerrados tipo antibiótico hacia el laboratorio. La conversión teórica entre moles de acetileno y de N_2 reducidos por el intercambio de electrones es entre 4 y 3/1: $\text{N}_2/(\text{C}_2\text{H}_2)$ no es correcto, ya que la solubilidad en agua es superior para el acetileno, y éste no constituye un sustrato fisiológico.



Los resultados se expresan en etileno formado o acetileno reducido sin efectuar extrapolaciones a nitrógeno fijado. El método se usa para comparar gran cantidad de muestras, pero no hay que olvidar que la prueba más concluyente de capacidad fijadora la constituye la incorporación de átomos de N^{15} .

Los microorganismos fijadores de nitrógeno

Los diazotrofos: el grupo está integrado como vimos por **protistas inferiores:** bacterias heterótrofas aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas, un representante de bacterias quimioautótrofas y microorganismos fotosintéticos: bacterias y cianobacterias.

El cuadro 4 presenta a los microorganismos fijadores y sus asociaciones con vegetales y animales, en combinaciones simbióticas, nodulares y no nodulares y en asociaciones más laxas y menos obligatorias, como son las asociaciones rizosféricas, espermatosféricas y filosféricas, en donde los organismos sobre todo heterótrofos se ven estimulados por la provisión de compuestos carbonados por parte del vegetal.

Iremos analizando los más importantes grupos de diazotrofos, comenzando por aquellos reconocidos como fijadores en vida libre, es decir los que expresan su nitrogenasa sin requerir la protección o la colaboración de otro organismo, aunque pueden ser favorecidos por los nutrientes y el ambiente con baja pO_2 que le ofrece la rizosfera.

Ningún **eucariota** posee esta importante capacidad y los intentos de la ingeniería genética tratando de transferir esta propiedad cuando los genes **nif** se encuentran en plasmidios o están integrados al cromosoma bacteriano, son numerosos y se han logrado algunos **diazotrofos sintéticos**. Numerosos experimentos intentan transferir esta propiedad a vegetales, sobre todo a gramíneas, pero el funcionamiento de estas **plantas transgénicas** en la naturaleza, es motivo de controversia.

Cuadro 4 - Diazotrofos y sus asociaciones

Heterotrofos			
vida libre		asociaciones	
		s/nodulos	con nodulos
↓ aerobios	<i>Azotobacter</i> <i>Azotococcus</i> <i>Azomonas</i> <i>Beijerinckia</i> <i>Derxia</i>	↓ rizosfera	↓ leguminosas <i>Rhizobium loti</i> <i>R. leguminosarum</i> <i>bv viciae, trifolii</i> <i>R. meliloti</i> <i>R. galegae</i> <i>R. tropici</i> <i>R. huakuii</i> <i>R. fredii</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>B. japonicum</i> <i>Azorhizobium</i> <i>Sinorhizobium</i>
↓ anaerobios facultativos (aerobios cuando no fijan N ₂)	<i>Klebsiella</i> <i>Bacillus</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Propionibacterm</i>	↓ filosfera	↓ no leguminosas <i>Frankia</i> , con: <i>Alnus</i> , <i>Casuarina</i> <i>Eleagnus</i> , <i>Myrica</i> <i>Dryas</i> , <i>Ceanothus</i>
↓ microaerófilos (aerobios cuando no fijan N ₂)	<i>Mycobacterium</i> <i>Azospirillum</i> <i>Aquaspirillum</i> <i>Rhizobium</i> <i>Frankia</i>	↓ con animales	
↓ anaerobios estricto	<i>Clostridium</i> <i>Desulfovibrio</i>		

Autotrofos			
vida libre		asociaciones	
		s/nodulos	con nodulos
↓ cianobacterias aerobias	<i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i> <i>Calothrix</i>	↓ líquenes	↓ <i>Cycadacea</i>
↓ microaerofílicas	<i>Plectonema</i> <i>Lyngbya</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Spirulina</i>	↓ <i>Azolla</i>	
↓ bacterias fotoautótrofas	<i>Rhodospirillum</i> <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Chromatium</i> <i>Chlorobium</i>	↓ <i>Gunnera</i>	
		↓ <i>Briofitas</i> <i>hepáticas</i>	
quimioautótrofas		<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	

Diazotrofos en vida libre y en asociaciones rizosféricas

Por sus relaciones con el O₂ los diazotrofos son (cuadro 4):

- **aerobias estrictas**, como la familia *Azotobacteriaceae*
- **anaerobios facultativos**, como los géneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*
- **microaerofílicos** como *Azospirillum*, *Thiobacillus*, *Nycobacterium*, *Acetobacter*. Estos dos últimos grupos se comportan como aerobios cuando crecen con N combinado
- **anaerobios estrictos**, que no crecen ni fijan en aerobiosis, con representantes de los géneros *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* y productores de metano.

La mayoría de las bacterias son heterótrofas, sólo ha sido descrito *Thiobacillus ferrooxidans*, como fijador de N₂, quimioautótrofo que crece en condiciones muy ácidas. El resto de los diazotrofos son bacterias fotosintéticas, con representantes de las cianobacterias.

Diazotrofos fotosintéticos

Bacterias fotosintéticas anaerobias

Se ha determinado capacidad de reducción del CO₂ y del N₂ en muchos representantes de este grupo de procariotas anaerobios, la mayoría en ambientes acuáticos o barros y sedimentos ricos en sulfuros. Pertenecen al orden *Rhodospirillales* y pueden realizar metabolismo fotalito o fotoorganotrofo. Las bacterias purpúreas no sulfurosas (*Rhodospirillaceae*) fotoasimilan sustancias orgánicas simples, muchas son incapaces de crecer con sulfuros como único donador de electrones, y si lo emplean no se acumula S⁰ en la célula. *Rhodospirillum rubrum* es una especie en la que se efectuaron numerosos estudios sobre su nitrogenasa.

Las bacterias sulfurosas purpúreas (*Chromatiaceae*) y las sulfurosas verdes (*Chlorobiaceae*) crecen con S⁼ o S⁰ como únicos donadores externos de electrones. El S⁰ en la célula puede ser luego oxidado a sulfatos. La fotosíntesis de estos organismos es anoxigénica (no liberan O₂) y la fijación del N₂ se realiza en anaerobiosis a la luz (capítulo 2, tomo I).

Pueden desarrollarse en la oscuridad heterotróficamente, pero entonces son incapaces de fijar N₂. Aunque no han sido estudiadas todas las especies de bacterias fotosintéticas por su capacidad de fijar nitrógeno, existe consenso de que la mayoría de ellas están dotadas de esta capacidad.

Pocas referencias se encuentran sobre su rol en ecosistemas agrícolas, en parte porque muchos trabajos evalúan la fijación en suelos y aguas sin detallar las especies responsables. Es reconocido que las bacterias fotosintéticas contribuyen a la depuración de suelos y aguas al consumir los sulfuros y aminas que perjudican a los cultivos, liberando además uracilo y prolina, empleados por muchos cultivos, entre ellos el arroz.

Cianobacterias

Este grupo posee todas las características subcelulares de los procariotas, excepto el tipo de fotosíntesis, que es la de las algas y vegetales. Son capaces de desarrollarse en medio mineral y obtienen su C y N de la fijación fotosintética del CO₂ y N₂. Con la obtención de cultivos libres de contaminantes bacterianos (muchas veces los responsables de la fijación) por radiación U.V. o agregado de antibióticos o colorantes en los medios de cultivo, el número de especies fijadoras se incrementó rápidamente: de aproximadamente 165 géneros, en 8 familias y 3 órdenes, se encontró fijación en 23 géneros, de 6 familias y 2 órdenes (cuadro 5).

Las cianobacterias presentan tres tipos de células: **vegetativas, esporas o acinetos y heterocistos**. Una célula vegetativa puede diferenciarse en esporas y heterocistos y todas poseen la información genética para la síntesis de la nitrogenasa, que como vimos es muy sensible al O₂.

Los **heterocistos** son células rodeadas de gruesas paredes y parecen vacías al microscopio de luz. Son en general de mayor tamaño que las células vegetativas y están ubicadas a intervalos a lo largo del filamento o pueden presentarse terminalmente (figura 4 de Stewart, 1974). Presentan sistemas membranosos muy desarrollados con invaginaciones. Poseen abundantes ribosomas y han perdido los gránulos estructurales de glicógeno y polifosfato. Están conectados a células adyacentes por un poro en la pared celular.

Según algunos autores se originan en células preexistentes llamadas preheterocistos ubicadas a intervalos regulares del filamento, de tamaño algo mayor que el resto de la célula y según las condiciones ambientales pueden formarse los heterocistos. Otros autores opinan que la posición de ellos está determinada por los ya preexistentes, originándose nuevos cuando algunas sustancias, como el amonio fijado en los heterocistos, alcanzan niveles muy bajos. Su desarrollo es inhibido por niveles elevados de nitrógeno combinado.

Fijación en relación al O₂

Aerobiosis: las cianobacterias filamentosas heterocísticas (*Anabaena*, *Nostoc*) pueden fijar N₂ en estas condiciones ya que los heterocistos poseen activo fotosistema I, pueden fotofosforilar, pero no liberan O₂ ni reducen el CO₂. Poseen alta actividad reductora, recibiendo los compuestos carbonados, el ATP y el poder reductor de células adyacentes a las cuales les brindan el nitrógeno combinado resultante de la fijación. El sistema membranoso ofrece una protección estructural subcelular y la fotorrespiración activa remueve excesos de O₂ (protección fisiológica).

Cuadro 5 - Fijación de nitrógeno en cianobacterias

Orden suborden	familia	Género (Nº spp fijadoras)	características
Chroococcales (35 géneros)	Chroococcaceae	Gleocapsa (1)	unicelulares
Oscillatoriales (unos 100 géneros)			
Nostocales	Nostocaceae Oscillatoriaceae	Trichodesmium (1) Oscillatoria (1) Plectonema (1) Lyngbya (1) Phormidium (1)	filamentosas con heterocistos
	Nostocaceae	Anabaena (12) Anabaenopsis (1) Aulosira (1) Cylindrospermum (4) Nostoc (8) Nodularia (1)	Filamentosas Con heterocistos
	Rivulariaceae Scytonemataceae	Calothrix (5) Scytonema (2) Tolypothrix	
Stigonematales	Stigonemataceae	Fischerella (2) Hapalosiphon (1) Stigonema (1) Westielopsis (1)	
	Mastigociadaceae	Mastigociadus (1)	

Microaerofilia, las cianobacterias filamentosas sin heterocistos como *Plectonema* pueden fijar N₂, pero no en condiciones de intensa oxigenación. Lo mismo ocurre en las unicelulares, como *Gleocapsa*, aunque éstas pueden fijar N₂ en el aire, existiendo una separación temporal entre la liberación fotosintética del O₂ y la actividad nitrogenásica.

Anaerobiosis es posible que tanto los heterocistos como las células vegetativas fijen N₂. Las cianobacterias fijadoras liberan al medio una fracción del nitrógeno fijado, como amonio, amidas, péptidos, polipéptidos, que pueden representar un 20-30% del nitrógeno fijado. El cuadro 6 (resumido a partir de Mague, 1977) presenta algunos datos sobre aportes de nitrógeno por estos organismos en distintos lugares del mundo.

Las cianobacterias son responsables del nitrógeno fijado en **áreas marinas**, en mayor medida por las heterocísticas. Las que no poseen estas células especializadas fijan N₂ en zonas de bajo nivel de O₂, aguas estancadas y eutrofizadas, de importancia en algunos ecosistemas.

Asociaciones con cianobacterias

Estos diazotrofos fotosintéticos se asocian con hongos, hepáticas, helechos, gimnospermas y angiospermas. Lo hacen con los representantes más primitivos entre los vegetales, mientras que *Rhizobium* y *Frankia* lo hacen con vegetales superiores: angiospermas dicotiledóneas.

Azolla-Anabaena

Muy estudiada es la simbiosis *Azolla-Anabaena*. La *Azolla* es un diminuto helecho de agua que se desarrolla en zonas tropicales en donde llega a cubrir enormes extensiones de arrozales inundados. Mide sólo 2-3 mm de ancho y alberga a una cianobacteria del género *Anabaena* en poros ventrales de los lóbulos de las hojas (figura 4), muy rica en heterocistos. La planta le ofrece una protección adicional frente al O₂ liberado en la fotosíntesis propia y la de la planta. *Azolla filiculoides* está profusamente colonizada por *Anabaena azollae* en Río Cuarto, Argentina (Frioni, 1983). La cianobacteria no crece bien fuera del huésped.

Las características de esta asociación y su empleo desde la antigüedad como biofertilizante (**azollización**) han sido reseñados por Lumpkin, 1987 y Silver y Schröder, (1984) : en épocas secas el helecho es mineralizado y el nitrógeno fijado se incorpora al suelo.

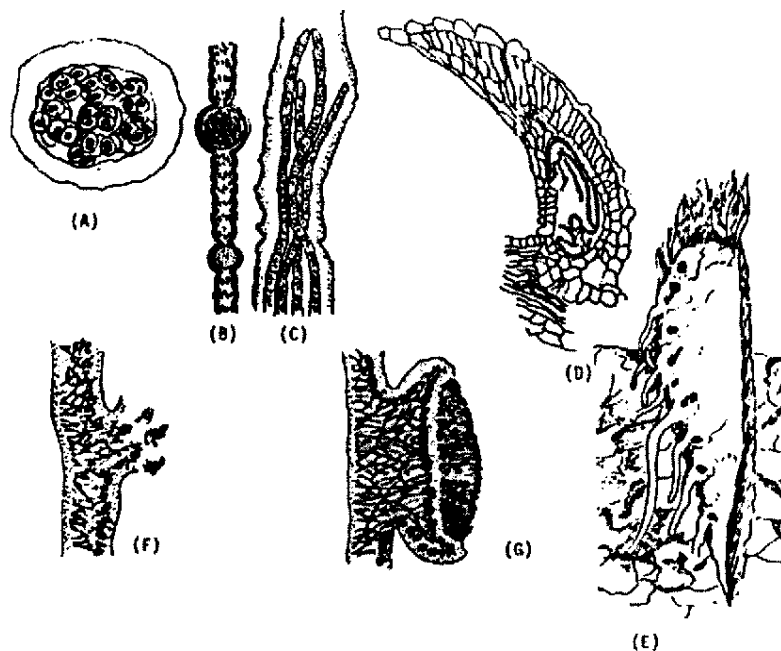
Líquenes

De las 17.000 especies conocidas, aproximadamente un 8% posee una cianobacteria fijadora: (*Peltigera canina*, *Peltigera aphthosa*). Son muy estudiados por su contribución en nitrógeno en suelos muy fríos y en bosques tropicales, donde especies de *Stricta*, *Leptogium* y *Collema* pueden contribuir con 1 a 8 kg N/ha/año.

Las cianobacterias filamentosas asociadas cambian su forma filamentosa simple por la de filamentos altamente contorneados, las células vegetativas se redondean y se dividen escasamente. Los heterocistos aumentan de un 3-5% al 20-60% en asociaciones con prototrofos, mientras que en asociaciones con heterótrofos, la frecuencia permanece baja.

Figura 4 - Cianobacterias y sus asociaciones con vegetales

A) *Gloecapsa alpina*, B) *Anabaena acheremetievi*, con heterocistos
C) *Microcoleus chthonoplastes* , filamentosa, D) Corte de *Azolla* con filamentos de *Anabaena*, E) Corte de rizoma de *Gunnera*, con *Nostoc*, F) Reproducción en líquen por liberación de hifas, G) Idem por liberación de ascosporas fúngicas



Las células en simbiosis presentan también más bajo contenido de gránulos de **cianoficina** que representan reservas de nitrógeno con ácido aspártico y arginina en relación 1/1 molar. Los gránulos de **polifosfatos** son abundantes en simbiosis. Las **ficobiliproteínas** constituyen reservas de nitrógeno, además de actuar como pigmentos accesorios en el fotosistema II.

La luz es necesaria para la fijación. Los líquenes toleran condiciones extremas: en regiones de Suecia y Noruega, la fijación ocurre a 0°C y los organismos sobreviven a heladas prolongadas y a la sequedad, aunque no fijan N₂ hasta que se rehumedecen. Constituyen la vegetación principal de ambientes extremos como piedras, zonas arenosas, facilitando luego la colonización por otros microorganismos. La cianobacteria posee escasa actividad de **glutamino sintetasa**, bloqueando parcialmente la ruta primaria de asimilación de NH₃, que es liberado y transferido al hongo.

Otras asociaciones

En zona tropical se describe una asociación con una gimnosperma, la *Cycadaceae*, donde especies de *Nostoc* forman estructuras parecidas a nódulos en las raíces (figura 4). Aproximadamente un tercio de las 90 especies poseen estos nódulos, con aportes de unos 19 kg N/ha/año en *Macrozamia riedlei* (Stewart *et al.*, 1979). Entre las angiospermas sólo se conoce un representante subtropical, *Gunnera*, que se asocia a *Nostoc* heterocística fijadora en glándulas de la base de las hojas. El nitrógeno fijado es rápidamente transferido al eucariote, sobre todo como amonio.

Cuadro 6- Rangos de fijación de nitrógeno por cianobacterias

habitat	género dominante en la FBN	N fijado
aguas termales	Mastigocladus, Calothrix	22 ugN/mgalgal/día
costas marinas (Escocia)	Calothrix	30 mgN/m2/día
zona litoral (Noruega)	Calothrix	11 " "
dunas arenosas	Nostoc	140 mgN/m2/hora
Golfo de Méjico	Calothrix	13 mgN/m2/hora
océano abierto		
Mar del Sargaso	Trichodesmiun	4,7 ugN/mg algal/día
Pacífico Norte	Richelia en líquenes	13 mgN/m2/hora
arrozales		
Japón	Tolypothrix	2,2gN/m2/año
India	no detalladas	5,0gN/m2/6 semanas
Filipinas	no detalladas	5,5mgN/m2/día
suelos		
pastura (Escocia)	no detalladas	1,5mgN/m2/día
prados (Suecia)	Nostoc, Anabaena	22 mgN/m2/día
pasturas (Canadá)	Nostoc	50µgN/gpeso fresco/día
zona árida (Australia)	Nostoc, Anabaena	134µgN/m2/hora
tundras (Alaska)	Nostoc, Anabaena y líquenes	15mgN/m2/año

Empleo de las cianobacterias como biofertilizantes

Desde la década de los sesenta se informan en Japón resultados de inoculación en suelos inundados de arroz (cuadro 6). La contribución a la economía del nitrógeno en suelos de la zona templada no sería muy importante, pues son muy afectadas por la desecación.

Nostoc, *Anabaena*, mantienen su efecto estimulante luego de la esterilización, y se piensa que su acción se debe a sustancias del tipo de las **citoquininas**, más que a auxinas y/o giberelinas, más termolábiles.

La práctica de la inoculación se va popularizando, los cultivos son fáciles de propagar en agua con sales minerales a la luz y su transporte se facilita si se mezclan con arena y se secan. Los productores comienzan a propagar sus inóculos en piletas vecinas a los cultivos de arroz. El cuadro 7 muestra a) el efecto de la inclusión de *Azolla* en el crecimiento y contenido de N en plantas de arroz, con y sin período seco en el cual el helecho se seca y muere y en b) la inoculación con *Tolypothrix* en el agua de riego en el mismo cultivo.

En la mayoría de los suelos agrícolas de zonas templadas, el aporte en N por cianobacterias no es muy alto, en parte por los requerimientos de luz y humedad. Además muchas veces la superficie de los suelos se deseca por largos períodos de tiempo. Una irrigación oportuna favorece la práctica de inoculación. **Son muy empleadas en cultivos inundables, como es el caso del arroz.**

Cuadro 7 - Manejo del cultivo de arroz con *Azolla* (a) y *Tolypothrix* (b)

a)		Arroz por maceta	
tratamiento	agua	peso seco (g)	N total(mg)
testigo	continuo	37	221
	c/sequía	40	240
c/ <i>Azolla</i>	continuo	43	316
	c/sequía	49	465
b)			
condición	rendimiento	% de incremento	
suelo mal drenado	testigo	45	33
	inoculado	60	

suelo drenado	testigo	30	
	inoculado	38	26

Bacterias heterótrofas no asociadas simbióticamente a vegetales

El cuadro 4 presenta los más importantes géneros de bacterias heterótrofas fijadoras de nitrógeno. El grupo contiene organismos acuáticos o terrestres de organismos aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos. Las especies facultativas sólo fijan N₂ anaeróbicamente y los aerobios presentan varios grados de sensibilidad frente al oxígeno.

Su distribución es muy variada, aunque sólo alcanzan altas densidades cuando se reúnen ciertas condiciones, sobre todo sustratos carbonados, temperatura, pH, humedad.

Los géneros más conocidos desde hace más de 50 años son *Azotobacter* y *Clostridium*, aerobio el primero y anaerobio el último. Actualmente son muchos los géneros reconocidos como activos en el suelo y la rizosfera.

Aerobios

Azotobacteriaceae

Es una familia curiosamente integrada exclusivamente con diazotrofos. Ya en 1901, el microbiólogo holandés Beijerinck describió al *Azotobacter chroococcum*, luego que Winogradsky, de la escuela rusa, describió al anaerobio *Clostridium pasteurianum*. Los integrantes de esta familia se presentan con células grandes, predominantemente bacilos romos u ovals, pero cambian su morfología con el tiempo o las condiciones de desarrollo. En la figura 5 se aprecian las formas bacilares y la formación de estructuras de resistencia, más lábiles que las endosporas bacterianas, llamadas *cistos*.

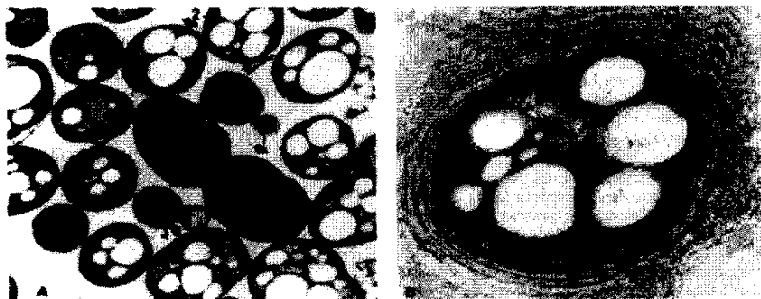
Las células se presentan frecuentemente de a pares, son Gram negativas, aunque pueden aparecer como Gram variables, aerobios estrictos, pero pueden crecer y fijar N₂ bajo presión reducida de O₂. Son móviles por flagelos peritricos o polares, o inmóviles. Los géneros son:

- I. Células grandes, ovoides, la mayoría de las especies producen sustancia viscosa extracelular, desarrollo rápido, catalasa positiva:
 - a. forman cistos, (G + C)% 63-66: *Azotobacter*
 - b. no forman cistos, (G + C)% 53-59: *Azomonas*.
- II. Pequeños bacilos, producen mucha viscosidad extracelular y cuerpos lipídicos globulares internos. Desarrollo lento, pueden o no producir catalasa:
 - a. cuerpos lipídicos bipolares, (G + C)% 5-59, catalasa positiva: *Beijerinckia*
 - b. numerosos cuerpos lipídicos, (G + C)% 70, catalasa negativa: *Derxia*

El cuadro 8 (Mulder y Brotonegoro, 1974) presenta algunas de las características de las especies. Como vimos, los **cistos** son estructuras características de algunas especies y constituyen formas de resistencia a desecación, radiaciones gamma, U.V., pero en menor grado que las endosporas. Responden rápidamente al agregado de sustancias energéticas, sustratos de las células vegetativas, reflejando mayor permeabilidad de las paredes de los cistos. La célula vegetativa se rodea de un saco en donde el microscopio electrónica reconoce dos capas: la **exina y la intina**. La **exina** contiene un complejo lipídico con lipoproteínas y lipopolisacáridos, con calcio como principal componente mineral.

Figura 5- Características morfológicas de *Azotobacter vinelandii*

A) estados morfológicos típicos: células vegetativas (1), células prequísticas ricas en poli- β - OH butírate (2) y células filtrables (3). B) quiste maduro, con las cubiertas **intina y exina** (A x 12.500, B x50.000)



La **intina** posee más carbohidratos y lípidos, pero menos proteínas, con alto nivel en calcio. Además de los cambios morfológicos, en los cistos se acumula ácido poli-beta OH-butírico (**PHB**). Parte de esta sustancia se emplea en la síntesis de los componentes del saco del cisto.

Estas estructuras, de muy baja actividad metabólica, permiten ventaja ecológica a los azotobacter en el suelo. En medio favorable, la germinación y crecimiento activo ocurren rápidamente.

Otros cambios morfológicos son la aparición de células grandes, que recuerdan a levaduras, o de grandes bacilos en *A. paspali* a las pocas horas de cultivo. La formación de conglomerados de células cocoides, rodeadas de espeso mucílago, que recuerdan a tétradas, son comunes en *A. macrocytogenes*.

Otras características

La formación de depósitos intracelulares de lípidos (**PHB**) es característica del grupo, sobre todo en cultivos viejos. En *Beijerinckia indica* se presentan dos glóbulos por célula, polares, pudiendo alcanzar en cultivos viejos más del 50% del volumen celular.

Materiales mucosos extracelulares son también característicos de ciertas especies, incluyen azúcares y ácidos urónicos. Muchas veces su excesiva acumulación en *Beijerinckia* y *Dexia*, limita seriamente la movilidad de los cultivos y vuelve a los medios líquidos muy viscosos.

Entre los azotobacter, es el grupo de los chroococcum-beijerincki y vinelandii, el que produce abundante mucílago, mientras que el grupo de los agilis e insignis, habitantes sobre todo de aguas, no los forman. Representarían productos celulares de desecho, o bien materiales de reserva en C y energía, y les permitiría protegerse frente a la fagocitosis por protozoos. La nitrogenasa es además protegida del efecto inhibitor del O₂.

Los pigmentos son otra característica de esta familia y su producción, color y solubilidad tienen carácter taxonómico. En *A. chroococcum* es característico el pigmento marrón oscuro (**melaninas**) producido en cultivos viejos por oxidación de la tirosina.

Cuadro 8 -Características de especies de la familia *Azotobacteriaceae*

especie	flagelos	exopolisacáridos	pigmentos	fuentes de C	habitat
<i>Azotobacter chroococcum</i>	peritricos	moderado	marrón-negro	benzoato almidón, manitol	suelo
A. vinelandii	peritricos	moderado	fluorescente verde	benzoato mantol, ramnosa	suelo y agua
A. beijerinckii	inmóviles	moderado	amarillo, marrón	benzoato	suelo
A. paspali	peritricos	moderado	fluoresc. verde		
Azomonas macrocytogenes	polar	abundante	rosado	manitol	suelo
A. insignis	polar	ausente	azul-gris	"	aguas
A. agilis	peritrico	escaso	fluoresc. verde	"	aguas
Beijerinckia indica	peritrico	abundante	marrón claro	lactosa propanol	suelo
Derxia gummosa	polar	abundante	amarillo-marrón	ác.orgánicos	suelo

Compuestos empleados en el metabolismo

Muchos compuestos carbonados se emplean por este grupo: azúcares, polisacáridos, alcoholes primarios y secundarios, polialcoholes, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos (ácido benzoico y fenoles), como fuente de carbono, donadores de electrones y de energía para el crecimiento y la fijación del N₂. La vía principal de degradación de los azúcares es la de Enter-Doudoroff y los principales productos formados son piruvato y gliceraldehído- 3- fosfato. Las reservas intracelulares de lípidos (PHB) ejercen también efecto en la fijación, demostrado por la movilización de esta reserva en cultivos en fase estacionaria, con escasa cantidad de glucosa.

Los materiales carbonados serían uno de los principales factores limitantes del desarrollo de estos diazotrofos en suelos agrícolas.

Mecanismos de protección de la nitrogenasa

Los integrantes de esta familia presentan numerosos mecanismos de protección de la nitrogenasa que le permiten fijar N₂ en aerobiosis

- **Activa respiración:** remueve el oxígeno de las vecindades de la nitrogenasa. La tasa de respiración puede incrementarse de 10 a 50 veces y *A. chroococcum* consume muchos hidratos de carbono en la fijación del N₂ (eficiencia baja, de 10-15 mg N₂ fijado/g azúcar). Para obtener activa respiración, los organismos deben producir grandes cantidades de poder reductor, particularmente NADH, que debe ser oxidado vía sistema citocromo. Se evita la producción de gran cantidad de ATP, en exceso frente a los requerimientos celulares, porque utiliza una **respiración de baja eficiencia**, produciendo aproximadamente 1/3 del ATP por unidad de sustrato.

- **Protección conformacional :** la nitrogenasa se asocia en las células a otras proteínas en caso de intensa oxigenación, protegiendo sus sitios activos. En este estado la enzima no funciona (estado inactivo), pero una vez que se restablecen las condiciones de oxigenación apropiadas, la fijación se renueva rápidamente.

- **Otros mecanismos:**

* la producción de polisacáridos extracelulares ofrecería una barrera física a la difusión del O₂,

* el gran tamaño de las células puede contribuir a que la relación entre superficie y contenido celular sea baja, impidiendo activa difusión del O₂.

* la presencia de membranas intracelulares ha sido descripta como otra eficiente forma de protección de la nitrogenasa. Los azotobacter presentan sistemas membranosos altamente contorneados.

Otros organismos fijadores de N₂ aerobios incluyen algunas especies sin gran significancia en los suelos, las que por no poseer mecanismo de protección de la nitrogenasa eficientes, sólo fijan en

microaerofilia. *Mycobacterium flavum* y otras micobacterias han sido descritas como fijadoras de nitrógeno. Como ya citamos, pertenece a esta categoría el quimioautótrofo *Thiobacillus ferrooxidans* y algunas bacterias oxidantes del metano.

Microaerófilicos

Azospirillaceae

Constituye un importante grupo de organismos aerobios que se comportan como microaerófilicos cuando fijan N₂. Fueron descritos por Beijerinck desde 1922, pero recibieron poca atención hasta 1976 cuando Döbereiner y Day los aislaron de raíces de pasturas tropicales. *Azospirillum* (Krieg y Döbereiner, 1984) son Gram negativas, con forma de vibrio o espirilo, de 1 µm de diámetro, con flagelos peritricos de corta longitud de onda empleados para desplazarse en superficies sólidas o un flagelo polar, para nadar.

Depósitos de **PHB** pueden deformar las células. Se desarrollan tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (con aporte de nitratos y una fuente de C orgánico). Son preferencialmente **microaerófilicos** en presencia o ausencia de N-combinado en el medio.

No poseen ningún mecanismo de protección de la nitrogenasa

El crecimiento es rápido con amonio y O₂ y más lento con N₂ (5-7 horas de tiempo de generación). Sin N combinado el desarrollo es rápido en **medio semisólido**, formando una densa película debajo de la superficie, donde encuentran la tensión de O₂ apropiada. A medida que la demanda de O₂ se incrementa la película se desplaza hacia la superficie. Esta sensibilidad al O₂ hizo que por mucho tiempo no fueran descritos como activos fijadores.

En medio con malato y extracto de levadura o cloruro de amonio, desarrollan colonias blancas o rosadas, pequeñas y secas, elevadas, circulares o irregulares (**Anexo Práctico**).

Se han descrito 5 especies: ***A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amanzonense*, *A. halopreferans* y *A. irakense*.**

Por detalles sobre la taxonomía, fisiología y genética de este grupo consultar a Döbereiner y Pedrosa (1987), Elmerich *et al*, (1992), Michiels *et al*, (1994), Okon (1994).

Algunos azospirilos son **denitrificantes**, reduciendo los nitratos a nitritos (**nr⁺**) y hasta productos gaseosos, N₂ y N₂ (**nir⁺** y **nir⁻**). En cereales de clima templado parecen predominar cepas **nir⁻**, indicando ventajas evolutivas que favorecen a la planta, eliminando una causa de pérdida del nitrógeno fijado.

Estos organismos son considerados responsables de la estimulación del crecimiento en importantes cultivos y pasturas naturales. La figura 6 muestra la morfología típica de estos organismos (González-López, 1992).

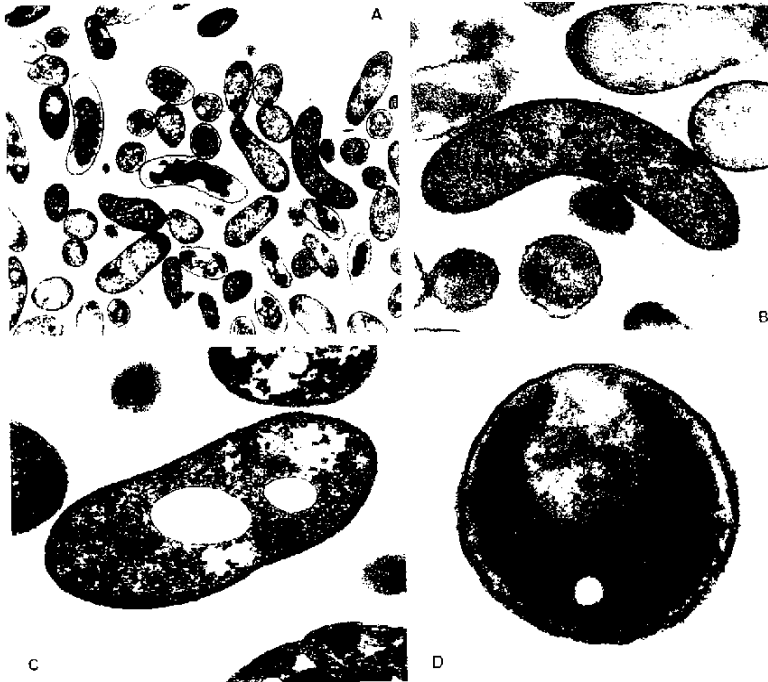
Acetobacter

Acetobacter diazotrophicus una nueva bacteria Gram negativa fijadora de N₂ fue aislada en caña de azúcar (Cavalcante y Döbereiner, 1988) en medio semisólido, sin N combiando, empleado para detectar *Azospirillum*. Las bacterias se ubican en el gradiente de oxígeno creado entre la superficie y el fondo del tubo en el nivel adecuado para su metabolismo aerobio y para la protección de la nitrogenasa. Esta bacteria es capaz de crecer y fijar N₂ en pH ácido y en presencia de altas concentraciones de azúcar: glucosa y sacarosa pero no de gluconato (Alvarez, 1993). No posee nitrato reductasa y puede fijar N₂ incluso con niveles de 10mM de nitrato.

Aislada de caña de azúcar, en Brasil, fue luego encontrada en otros países a partir de tallos, hojas, raíces y en la savia del xilema de diferentes cultivos (Döbereiner *et al*, 1992). Su crecimiento óptimo a pH 5,5 y 10% de azúcar, condiciones prevalentes en el caldo de caña, evidencia su adaptación a la planta. Recuentos de 10³-10⁵ bacterias.g⁻¹ han sido informados en la rizosfera de caña de azúcar. Como no ha sido aislada del suelo, se piensa en una bacteria endofítica, de gran interés ya que el nitrógeno sería fijado dentro de la planta.

Figura 6- Morfología de *Azospirillum brasilense*

A) en medio con malato a las 48h, clara morfología encurvada y ausencia de corpúsculos de inclusión (x 8.000). B) microfotografía de la anterior (x 25.000). C) 48h en medio con fructosa, con mayor pleomorfismo y gránulos de PHB (x 45.000) y D) a los 7 días en el mismo medio, típica forma C, con cubiertas multilaminares (x 50.000)



Se ha determinado de que *A. diazotrophicus* produce ácido indol-acético, promotor del crecimiento vegetal y puede excretar amonio, hasta un 40% del fijado, lo que explicaría los altos niveles de fijación en caña de azúcar.

Bacterias anaerobias facultativas

Con nitrógeno combinado, este grupo puede crecer con o sin O₂, pero sólo pueden fijar N₂ anaeróbicamente, por lo que resultó difícil establecer su contribución en suelos y aguas. El grupo comprende bacterias pertenecientes a las *Enterobacteriaceae* y al género *Bacillus*. Entre las primeras ha sido muy estudiada *Klebsiella pneumoniae*, conocida antes como *Aerobacter aerogenes*, en la cual se han realizado experiencias de transferencia de genes fijadores. Pertenece a las bacterias "coliformes" por su parecido a *Escherichia coli*, habitante del intestino del hombre y animales.

Bacillus polymyxa, *Bacillus macerans* y *Bacillus pasteurianum* son especies muy conocidas entre los diazotrofos. Son bacilos Gram positivos, esporulados, aerobios, que fijan en microaerofilia, de la familia *Bacillaceae*, cuyos representantes anaerobios fijadores pertenecen al género *Clostridium*. Las bacterias propiónicas citadas en el cuadro 6, se encuentran en leches fermentadas y han sido descritas como fijadores de N₂ en anaerobiosis (Postgate, 1980).

Bacterias anaerobias

Clostridium pasteurianum fue el primer diazotrofo descrito por Winogradsky en 1893. Otras especies de este género pueden también fijar nitrógeno y son habitantes de suelos, abonos en fermentación, rumen, compost. Una pasteurización previa de la muestra de suelo y otros materiales (10' a 80°C) facilita el aislamiento al eliminar las formas no esporuladas. No pueden emplear el O₂ bajo ninguna circunstancia.

Otros diazotrofos anaerobios son **bacterias sulfatorreductoras**, que usan sulfatos como aceptores de electrones finales en la respiración anaerobia. Frecuentemente se libera ácido sulfhídrico (H₂S), volátil, de olor desagradable. Los géneros conocidos son *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*. Entre los

primeros, varias especies pueden fijar N₂; algunas tienen importancia en el mar, fijando N₂ en sedimentos. El segundo género posee menos representantes diazotrofos.

Las **bacterias productoras de metano** son anaerobias estrictas y son abundantes en ambientes en fermentación y en el fondo de estanques. La cepa en la que se detectó fijación, resultó ser una población mixta.

Fijación en la rizosfera

La **rizosfera**, región del suelo donde la actividad microbiana es modificada por la presencia de las raíces que aportan constantemente gran número de sustancias orgánicas, la **filosfera** (hojas) y la **espermatosfera**, zona del suelo afectada por la presencia de semillas y granos (capítulo 1), favorecen a la FBN.

La **eficiencia de la fijación** de organismos heterótrofos evaluada en medios de cultivo estáticos, es baja: **10 a 50 mg N fijado/g sustrato carbonado consumido**. Así, para fijar 100 kg N/ha/año se requeriría el metabolismo de aproximadamente 10 toneladas de materia orgánica, muy difícil de reunir en suelos sometidos a agricultura tradicional.

En la rizosfera, el funcionamiento de los diazotrofos es más eficiente por:

- **los productos de la fotosíntesis** (esqueletos carbonados y fuentes de energía)
- **el microambiente con baja pO₂**
- **la transferencia de los productos de la fijación a la planta** (aminoácidos, proteínas, que inhiben la fijación), que evita la represión de la fijación del N₂.

Desde el primer informe sobre la estrecha asociación entre *Azotobacter paspali* y ecotipos tetraploides de *Paspalum notatum* de la variedad batatais (Döbereiner *et al.*, 1972), numerosos trabajos señalan estimulación en la rizosfera de cultivos de interés económico, como cereales, gramíneas forrajeras de especies de *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Clostridium*, etc.

Se reconocen varios mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por estos organismos:

- **fijación biológica del N₂**
- **liberación de fitohormonas y estimulación de la excreción de las mismas por la raíz colonizada**
- **protección frente a microorganismos fitopatógenos**

La cuantificación de la contribución de cada uno de estos mecanismos es tema de trabajo en la mayoría de los centros que afirmaban en las décadas del 70 y 80 que la FBN era la principal causa. Las determinaciones de actividad de la nitrogenasa no evidenciaron niveles muy altos en muchas rizosferas y los ensayos con N¹⁵ señalaron incrementos entre 10- 50 kgN.Ha⁻¹.año⁻¹ (Döbereiner, 1978).

Otras bacterias han sido descritas en la bibliografía como estimuladas en la rizosfera: *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.* en suelos de arroz y trigo; bacterias sulfatorreductoras, en suelos inundados de arroz; *Bacillus* y *Enterobacter cloacae* en pasturas de *Agrostis tenuis*, trigo y festuca. Especies de *Azotobacter* fueron estimuladas en cultivos de maíz y trigo y *Azospirillum* en pasturas naturales de la Patagonia, Argentina (Pozzo-Ardizzi, 1982).

En el cuadro 8 (Fulchieri, Frioni, 1986) se muestra el efecto estimulante de rizosfera de sorgo, maíz, mijo perla y mijo común sobre *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Clostridium* en el campo, sobre todo en los dos períodos más críticos en N para los cultivos: floración y grano al estado lechoso.

Se postula la existencia de **lectinas** que unirían específicamente los espirilos a los pelos capilares de ciertas gramíneas. En presencia de nitrógeno combinado, la bacteria sólo se asocia al mucigel del ápice y a células epidérmicas no diferenciadas.

Ecología de las asociaciones rizosféricas

A diferencia de las asociaciones nodulares, las simbiosis asociativas llamadas también **rizocenosis**, se encuentran muy afectadas por las fluctuaciones del ambiente, que impide muchas veces una fijación acorde a las necesidades del vegetal. La figura 7 (Balandreau y Knowles, 1978) presenta la compleja serie de requerimientos que deben reunirse para favorecer la fijación del N₂ en la rizosfera de arroz.

Algunos de los factores que afectan la fijación del nitrógeno a nivel rizosférico son:

- **Fotosíntesis:** la provisión de hidratos de carbono y otras sustancias a nivel radical está gobernada por el tipo y la intensidad de la fotosíntesis. Experiencias con cultivos evidencian abrupta caída de la actividad nitrogenasa cuando las plantas se somborean, o se produce un corte de la parte aérea; aunque se ha observado en algunas experiencias otro pico en horas de la noche, a expensas de las reservas carbonadas.
- **Factores físicos:** como es de suponer, una excesiva humedad o extrema desecación afectarán de gran manera a este proceso. La temperatura es otro de los factores que inciden limitando el proceso cuando los umbrales térmicos son muy bajos o muy altos. Rangos entre 18 y 30°C se citan como óptimos para cultivos en zona templada.
- **Nutrientes:** el nivel de N combinado fácilmente asimilable en el suelo (amonio y/o nitrato) afecta a este proceso. Se tiende a la selección de mutantes de diazotrofos resistentes a altos niveles de N mineral y que además excreten rápidamente el amonio fijado. Una ligera fertilización en la siembra (**10-30 kg N/ha**) se emplea en gramíneas, en suelos pobres. El establecimiento del cultivo estimula la FBN rizosférica que contribuye con parte de la demanda en nitrógeno. Fósforo, molibdeno, hierro, inciden en el funcionamiento de la nitrogenasa. El fósforo actuaría más bien a nivel del vegetal.

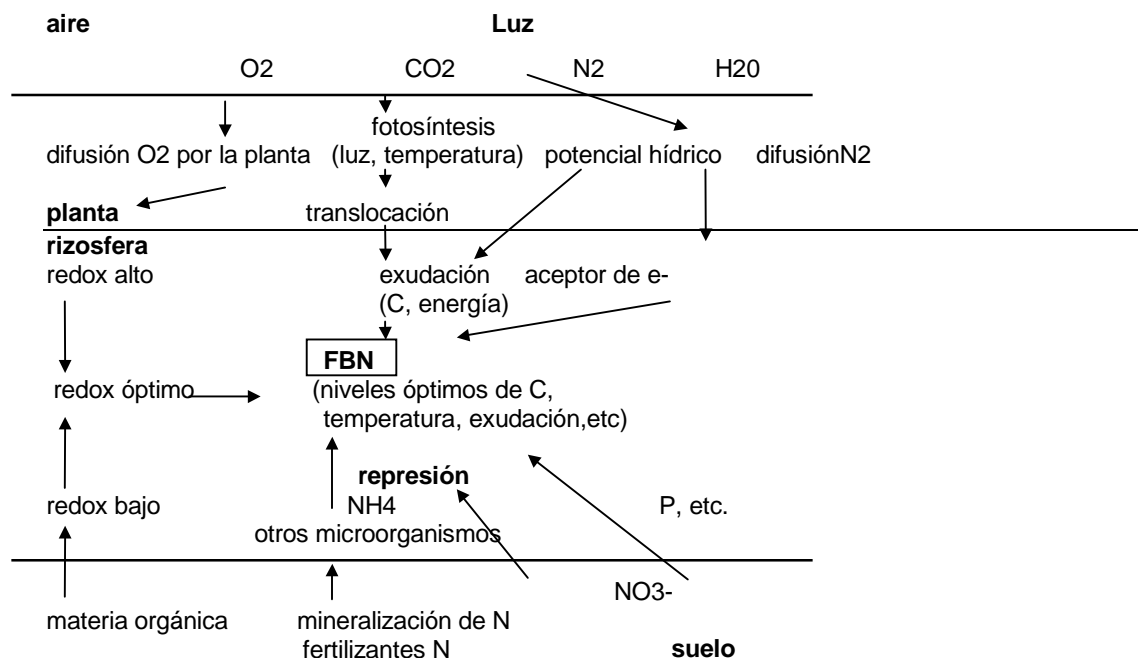
Cuadro 8 - Efecto rizosférico (R/S) de gramíneas sobre diazotrofos, en Río Cuarto, Argentina

Estado fenológico	diazotrofo/gramínea	sorgo	maíz	mijo perla	mijo común	"F"
vegetativo	<i>Clostridium</i>	31	46	35	29	ns
	<i>Azotobacter</i>	490ab	996a	185b	41b	++
	<i>Azospirillum</i>	135	93	57	111	ns
floración	<i>Clostridium</i>	501	158	511	166	ns
	<i>Azotobacter</i>	389ab	1013a	201ab	49b	++
	<i>Azospirillum</i>	769	962	279	152	ns
grano	<i>Clostridium</i>	1094	1804	211	261	ns
lechoso	<i>Azotobacter</i>	501 ^a	463a	46b	90b	+
	<i>Azospirillum</i>	674	2161	395	57	ns
grano	<i>Clostridium</i>	309	1121	105	72	ns
pastoso	<i>Azotobacter</i>	306	354	126	74	ns
	<i>Azospirillum</i>	188	296	56	76	ns

R/S densidad microbiana en suelo rizosférico/densidad en suelo control, ns= no significativo. + diferencias significativas al 5%, ++ al 1%, dos o más tratamientos con la misma letra no difieren por Tukey al 5%

- **Gases:** es bien conocido el efecto del O₂ en la enzima. En general, la rizosfera de la mayoría de los cultivos presenta baja pO₂, alto nivel de CO₂ y suficiente N₂, que nunca es limitante, como para favorecer la fijación.
- **pH:** ciertas rizosferas presentan pH demasiado bajo para el desarrollo de diazotrofos neutrófilos, como el *Azotobacter*.
- **pesticidas,** la aplicación de altas dosis de herbicidas y fungicidas pueden afectar las densidades de estas bacterias. Alta inhibición de la actividad nitrogenasa se encontró en rizosfera de sorgo tratado en el campo con altas dosis de herbicida (atrazina 4,5 kg/ha), mientras que en los controles se apreció marcada estimulación de la enzima en épocas fundamentales para el cultivo: inicio de floración y llenado de los granos (Frioni, 1983)

Figura 7- Interacciones entre la FBN en la rizosfera de arroz y factores edáficos, climáticos y del cultivo



Inoculación

Desde la década de los sesenta, en la entonces Unión Soviética, se citaron incrementos en los rendimientos de maíz y trigo de un 10 a un 20% al inocularlos con *Azotobacter spp.* El tema ha sido retomado en la década de los setenta, luego de los trabajos del grupo de Florida, Estados Unidos, de Smith *et al.* (1976), quienes citan incrementos de materia seca sobre el control de un 66% al inocular *Digitaria decumbens* y *Panicum maximum* con *Azospirillum*. En mijo perla, la inoculación con 40 kg N/ha/año produjo materia seca equivalente a una fertilización con 80 kg N/ha/año, a los 70 días de crecimiento. Una ligera fertilización en la siembra favorece el establecimiento de la pastura y por ende la fijación rizoférica.

En algunos ensayos se obtiene más respuesta en los testigos regados con el filtrado acelular de los diazotrofos, indicando que los efectos se deben a la producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal por estos organismos. Se observan cambios en la morfología radical de plantas inoculadas, aumento del número de raíces laterales profusamente cubiertas con pelos radicales.

Giberelinas del tipo A1, A3 e iso-A3 se han identificado en cultivos de *A. lipoferum* cepa Op33 (Bottini *et al.*, 1989) y la inoculación de esta cepa en maíz incrementó el peso seco, la densidad de pelos radicales y la longitud total de la raíz. Efecto similar al producido con 40 pg/ml de GA3 y 2000 pg/ml de AIA (Fulchieri, 1992).

Se trabaja con mutantes de espirilos sin nitrogenasa funcional, pero capaces de elaborar sustancias del tipo de las fitohormonas, para incluirlas en las parcelas control.

Azotobacter spp. es empleado como inoculante en zonas agrícolas de Egipto e India. Los trabajos de Hegazi *et al.* (1979) informan de resultados positivos en la inoculación con *Azospirillum* y *Azotobacter* en maíz. Los balances de N fueron positivos, indicando respuesta favorable a la inoculación de cultivos hortícolas, trigo, yute, algodón, sola o en combinación con fertilizantes.

El cuadro 9 (Fulchieri, Frioni, 1994) muestra el efecto de inoculación (I) de maíz con tres cepas de *Azospirillum* en suelo Haplustol, de Argentina. Además de un incremento en los rendimientos similar a la fertilización (N) con 60 kg N-urea/ha en los tratamientos inoculados, se apreció importante desarrollo de raíces y persistencia de altos niveles de inóculo (10^8 células. g^{-1} raíz en la cosecha) (T = testigo).

Rodríguez-Cáceres *et al*, (1994) informan de incrementos en cultivares de trigo inoculados con cepas "homólogas" de *Azospirillum*, es decir aisladas del mismo hospedante. Sin embargo, cepas "heterólogas" aisladas de otras gramíneas, han promovido el crecimiento en *S.italica*. Existe controversia sobre la posible especificidad de estas asociaciones.

El cuadro 10 (Urquiaga y Döbereiner, 1991) muestran cierta especificidad a tener en cuenta en la inoculación de cereales.

La evaluación de la FBN por *Azospirillum* en la rizosfera de numerosos cultivos de interés agronómico se ha incrementado en los últimos años, pero su **importancia agronómica es actualmente menor que lo que se preveía**. Okon y Labandera (1994) publican una revisión de ensayos de inoculación que resumiremos a continuación:

Cuadro 9 -Inoculación de maíz con *Azospirillum* (datos en cosecha)

	N-urea	Inoculada	Testigo
Peso seco parte aérea (g/planta)	90,84a	79,16a	46,19b
Peso seco raíz (g/planta)	34,00	65,50	26,93
log ₁₀ N° <i>Azospirillum</i> /g raíz	5,82b	8,03a	4,55b
N° granos por espiga	333	359	109
Peso seco granos(kg/ha)	4122a	4447a	2792b
Dos o más tratamientos señalados con la misma letra no difieren por Tuckey 5%.			

Cuadro 10 -Efecto de la inoculación con *A. brasilense* en trigo a campo

	% colonización		N total en planta(kg/ha)	
	rizosfera	dentro raíz	15 kg N	60Kg N
testigo	1	5	57	69
Cd (aislada de otra rizosfera)	61	11	56	66
Sp 245 (aislada de raíces de trigo)	44	76	69	68

- La producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal parece ser el principal mecanismo. La colonización bacteriana ocurre principalmente en la mayoría de las especies vegetales estudiadas en la zona de elongación de las raíces.

- *Azospirillum* estimula la densidad y longitud de pelos capilares, la velocidad de aparición de raíces laterales y la superficie radical. La intensidad de estos efectos en la morfología radical depende de la especie vegetal y el cultivar y de la concentración del inóculo de *Azospirillum*. En muchos ensayos el óptimo fue de alrededor de 1.10^7 unidades formadoras de colonias (ufc)/semilla⁻¹ o plántula⁻¹

- inoculación con *Azospirillum* afecta la concentración de ácido 3-indol acético y 3-indol butírico libres, así como las velocidades específicas de respiración y actividades de enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la glicolisis en raíces de maíz y otras plantas. Esto contribuye a que las raíces tomen más agua y nutrientes minerales que favorecen un mayor crecimiento de las plantas inoculadas.

- el efecto de la inoculación parece evidenciarse principalmente en los estados tempranos del desarrollo vegetal, durante las primeras semanas luego de una correcta colonización de las raíces.

Los autores concluyen de la evaluación de datos acumulados en los últimos 20 años en la inoculación a campo con *Azospirillum*, que la bacteria es capaz de promoción del crecimiento de importantes cultivos. Estiman un **60-70% de éxito** con incrementos significativos en los rendimientos entre el 5-30%. El suceso en los ensayos de inoculación se debe a un cuidadoso control :

- óptimo de células viables de *Azospirillum* en el inóculo y en la superficie de las semillas
- empleo de métodos apropiados de inoculación
- conocimiento de condiciones del suelo, microclima, manejo de residuos
- tratamientos químicos al suelo en la temporada anterior y la usada antes de la siembra
- análisis del suelo: textura, salinidad, nitrificación, humedad, intensidades lumínicas.
- características del cultivar usado, ciclo de crecimiento, resistencias a la desecación y enfermedades.
- formulación del inoculante, la técnica de inoculación y la cepa de *Azospirillum* empleada (colección original, como ATCC, etc). La caracterización de las cepas por técnicas genéticas permite analizar resultados más acertadamente (Gilles y Reinhold-Hurek, 1994)

Bibliografía

- ALVAREZ, B. 1993 Caracterización de *Acetobacter diazotrophicus*, Tesis Magister en Química, PEDECIBA, Facultad de Química, Montevideo, 148 pp.
- BALANDREAU, J. y R. KNOWLES, 1978: The rhizosphere, en: **Interactions between non pathogenic soil microorganisms and plants**, Dommergues, Y. y S. V. Krupa (eds.), Elsevier, Amsterdam, Oxford, Nueva York, pp 254.
- BAREA, J. M. 1991 Cuantificación de la fijación biológica de N mediante el uso de N¹⁵, en: **Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes, vol II**, Olivares, J. y J. M. Barea (coord), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Colección Nuevas tendencias, Madrid: 105-127
- BOTTINI, R., M. FULCHIERI, D. PEARCE y R.P. PHARIS, 1989 Identification of gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*, Plant Physiol. 90: 45-47
- BRILL, W. J., 1977: Biological nitrogen fixation, Scient. Amer., 236 (3): 68-81.
- CRASWELL, E. T. 1990 Biological nitrogen fixation: Investments and expectations. en: **International Congress of Soil Science, 14**, Kyoto, Proceedings Kyoto, ISSS: 176-181
- CAVALCANTE, V. A. y J. DÖBEREINER 1988 A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. Plant and Soil 108: 23-31
- DÖBEREINER, J., 1978: Nitrogen fixation in grass-bacteria associations. A summarized review of recent progress, Non-symbiotic nitrogen Fixation Newsletter, 6 (1): 12-19.
- DÖBEREINER, J. y J. M. DAY 1976 Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites, en: **Symposium on Nitrogen Fixation**, Newton, W. E. y C. J. Nymans (eds), Washington Univ. Press, Pullman, WA: 528-538
- DÖBEREINER, J., y F.P. PEDROSA; 1987 **Nitrogen-fixing Bacteria in Non-Leguminous Crop Plants**. Springer-Verlag, Berlín
- DÖBEREINER, J., V.M. REIS, M. A. PAULA y F. OLIVARES 1992 Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants, en: **New Horizons in Nitrogen Fixation**, R. Palacios, J. Mora y W. E. Newton, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 671-676
- ELMERICH, C., W. ZIMMER y C. VIELLE 1992 Associative nitrogen-fixing bacteria, en: **Biological Nitrogen Fixation**, G. Stacey, R.H. Burris y H.J. Evans (eds) Chapman & Hall, New York
- FRIONI, L., 1983: Fijación del nitrógeno en ecosistemas agrícolas por algas azul-verdes y bacterias en la rizosfera, Rev. Univ. Nac. Río Cuarto, 3 (2): 197-210.
- FULCHIERI, M. 1992 Producción de giberelinas por *Azospirillum spp.* y efecto de la inoculación sobre el contenido de giberelinas en la raíz y la promoción del crecimiento en maíz (*Zea mays*, L). Tesis Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Río Cuarto, 170 pp
- FULCHIERI, M. y L. FRIONI, 1986: Efecto rizosférico de gramíneas sobre *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Clostridium*, en ensayo de campo, Rev. Latinoam. Microbiol., 28: 293-301.
- FULCHIERI, M. y L. FRIONI, 1994: *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*). Effect on yield in a field experiment in Central Argentina, Soil Biol. Biochem 26(7): 921-923

- GILLIS, M, y B. REINHOLD-HUREK 1994 Taxonomy of *Azospirillum*, en: *Azospirillum-Plant Associations*, Y.Okon (ed): 1-14, CRC Press, Boca Raton, Florida
- GONZALEZ-LOPEZ, J. 1992 Microorganismos diazotrofos asociados a raíces de plantas no-leguminosas, en : **Interacción Planta-Microorganismo, BIOLOGIA DEL NITROGENO**, González López, J. y Lluch Plá, C. (coord), Editorial Rueda, Madrid: 71-96
- HEGAZI, N. A.; A. MONIB y K. VLASSAK, 1979: Effect of inoculation with nitrogen fixing *Spirilla* and *Azotobacter* on nitrogenase activity on roots of maize grown under subtropical conditions, App. Env. Microb., 38 (4): 621-625.
- KRIEG, N. R. y J. DÖBEREINER, 1984: Genus *Azospirillum*, en: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 1, Krieg, N. R. y J. Holt (eds.), Williams & Wilkinson, Baltimore, Londres: 94-104.
- LUCH PLA, C. y F. LIGERO LIGERO 1992 Bioquímica de la nitrogenasa, en : **Interacción Planta-Microorganismo: Biología del Nitrogeno**, González López, J. y C. Lluch Plá (coord) Editorial Rueda, Madrid: 145-162
- LUMPKIN, T.A. 1987 Collection, Maintenance and Cultivation of *Azolla*, en: **Symbiotic Nitrogen Fixation Technology**, G.H.Elkan (ed), Marcel Dekker, New York: 55-94
- MICHIELS, K., J. VANDERLEYDEN y C. ELMERICH 1994 Genetics and molecular biology of *Azospirillum*, en : *Azospirillum-Plan Associatins*, Y.Okon (ed): 41-56
- MULDER, E. G. y BROTONEGORO, 1974: Free living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria, en: **The biology of Nitrogen Fixation**. Quispel, A. (ed., North Holland, Amsterdam, American Elsevier, Nueva York: 37-85.
- OKON, Y (ed) 1994 ***Azospirillum-Plant Associations***. CRC Press, Boca Raton, Fla
- OKON, Y. y C.A. LABANDERA-GONZALEZ, 1994 Agronomic applications of *Azospirillum* of 20 years worldwide field inoculation, Soil Biol. Biochem.26(12): 1591-1601
- PAU, R. N. 1990 Nitrogenase without molybdenum. TIBS, 14: 183-187
- POSTGATE, J., 1980: **Fijación del nitrógeno**, Cuadernos de Biología, Ed. Omega, Barcelona, España.
- POZZO-ARDIZZI, M. G., 1982 Non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria from Patagonia, en: **Technology for Tropical Agriculture**, P.Graham y S.Harris (eds): 599-612
- RODRIGUEZ-CACERES; E.A., G. GONZALEZ-ANTA, J.R. LOPEZ,, C. DI CIOCCO, J.C. PACHECO-BASURCO y J.L.PARADA 1994 *Azospirillum brasilense* and *Bacillus polymyxa* inoculation in yield response of field grown wheat in an Argentine semiarid regios. Arid Soil Research and Rehabilitation
- SILVER, W. S. y E. C. SCHRÖDER, 1984: **Practical application of Azolla for rice production**, Martinus Nijhoff, Dr. W. Junk Publish., Boston.
- SMITH, R. L.; J. H. BOUTON; S. C. SCHANK; R. H. QUESENBERRY, 1976: Nitrogen fixation in grasses inoculated with *Spirillum lipoferum*, Science, 193 (4257): 1003-1005.
- STEWART, W. D. P., 1974: Blue-green algae, en: **The biology of nitrogen fixation**, A. Quispel (ed.), North Holland, Amsterdam, American Elsevier, Nueva York: 202-237.
- STEWART, W. D. P.; P. ROWELL y C. M. LOCKHART, 1979: Associations of nitrogen-fixing Prokaryotes with higher and lower plants, en: **Nitrogen assimilation of plants**, Hewitt y Cutting (eds.), Academic Press: 67-72.
- URQUIAGA, S. y J. DöBEREINER 1991 Fijación biológica de nitrógeno asociada con gramíneas forrajeras, cereales y caña de azúcar, en : **Fijación y Movilización de Nutrientes, vol II**, Olivares, J. y J. M. Barea (coord), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, colección Nuevas Tendencias, vol 18, Madrid: 71-89

Capítulo 15

Fijación de nitrógeno por la simbiosis rhizobio-leguminosa

Introducción

Bacterias heterótrofas del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* se asocian en estructuras nodulares fijadoras de N₂ en leguminosas contribuyendo de manera fundamental a la fertilidad del suelo, a la producción de alimentos para el hombre y animales y a la economía de fertilizantes nitrogenados, ya que muchas de las leguminosas son autosuficientes en sus requerimientos en nitrógeno.

La bibliografía sobre este tema es enorme y los estudios se amplían fuera de las leguminosas cultivadas: alfalfa, maní, soja, poroto, vicia, tréboles, etc., hacia leguminosas indígenas y hacia las arbóreas, cuyo empleo en forestación en suelos degradados ofrece una enorme perspectiva.

Luego del aislamiento del rhizobio por Beijerinck, en 1888, los trabajos sobre esta bacteria y sus asociaciones con leguminosas se han incrementado rápidamente. Boussingault puso en evidencia en 1838 la capacidad de las leguminosas en emplear el N₂ atmosférico, pero, solamente 50 años más tarde, Hellriegel y Wilfarth demostraron de manera indiscutible que sólo las leguminosas noduladas pueden hacerlo y que el lugar de fijación eran los nódulos. Luego de estas clásicas experiencias se pudo comprobar fehacientemente que el lugar de fijación son los nódulos y que los microorganismos se encuentran en el suelo o deben inocularse.

Para **determinar la fijación de N₂** en un sistema simbiótico de manera rápida y sencilla:

- se compara el **tenor de nitrógeno** en leguminosas noduladas con el de las no noduladas cultivadas en ausencia de nitrógeno combinado
- el empleo de **N¹⁵** confirma los resultados y con el uso de variedades no nodulantes de la leguminosa en estudio se puede conocer la fracción de nitrógeno del cultivo que proviene del aire, del suelo y de otras fuentes. En el campo, se incorpora un fertilizante marcado (ejemplo sulfato de amonio enriquecido con N¹⁵ y en lugar de isótopos no fijadoras se puede emplear controles no fijadores (soja no inoculada en suelos sin rhizobio específico, o sorgo). El N fijado se calcula por la ecuación:

$$\text{N fijado} = 1 - \frac{\% \text{ átomos N}^{15} \text{ en exceso en plantas fijadoras}}{\% \text{ átomos N}^{15} \text{ en exceso en plantas no fijadoras}}$$

- la **reducción del acetileno** a etileno por la nitrogenasa, a pesar de las limitaciones señaladas en el capítulo anterior, se emplea para comparar sistemas simbióticos (**Anexo Práctico**, Elkan, 1987, Frioni, 1990).

Las leguminosas

Constituye una familia de origen tropical arborescente cuyos más recientes derivados son pequeñas matas o hierbas de las regiones templadas. Representan la tercera familia de plantas de flor, superadas por las *Compositae* y las *Orchidaceae*. Desde su origen en el Cretáceo superior, en condiciones tropicales húmedas, fueron extendiéndose a otras condiciones climáticas. El cuadro 1 (Allen y Allen, 1981) muestra la característica de nodulación en las subfamilias. Se observa que el 48% de los géneros han sido examinados por la nodulación, y el 86% se encontraron nodulados. En las *Mimosoideae* y *Papilionoideae*, el 83 y 95%, respectivamente, poseen especies noduladas, mientras que en *Caesalpinioideae* sólo el 40% de los géneros examinados evidenciaron habilidad para nodular.

A nivel de especies, los autores señalan que del 15% de la familia que ha sido examinado, el 91% presentó nódulos (90 y 98% entre *Mimosoideae* y *Papilionoideae* y sólo 30% entre las *Caesalpinioideae*). Los siguientes son los géneros que poseen el mayor número de especies noduladas: en *Mimosoideae*, *Acacia* (217); en *Papilionoideae* *Indigofera* (194), *Crotalaria*

(145), *Trifolium* (141), *Astragalus* (102), *Tephrosia* (95), *Desmodium* (76), *Vicia* (65) y *Aspalathus* (60); en *Caesalpinioideae*, *Cassia* (99).

Una de las principales características que evidencian el carácter evolutivo de la leguminosas se relaciona con las modificaciones en su forma y tamaño: desde árboles tropicales muy altos, pasando por arbustos, a trepadoras leñosas, hierbas perennes o hierbas anuales.

Cuadro 1 - Nodulación en las leguminosas

subfamilia	Nº géneros	Nº géneros analizados				Nº especies analizadas	Nº especies analizadas			
		+	+/-	-	total		+	+/-	-	total
<i>Mimosoideae</i>	66	18	8	5	31	2900	351	37	388	
<i>Caesalpinioideae</i>	177	13	13	39	65	2800	72	6	180	258
<i>Papilionoideae</i>	505	241	14	14	169	14000	2316	46	2462	
Total	748	272	35	58	365	19700	2839	6	263	3108

Las especies adaptadas a zonas templadas están aclimatadas a desarrollarse en suelos de alta fertilidad con elevados tenores en calcio y poseen baja eficiencia en la extracción del mismo y probablemente de otros nutrientes cuando crecen en suelos de baja fertilidad. Presentan problemas de desarrollo y nodulación en suelo ácido, a diferencia de las especies tropicales que presentan alta capacidad de extracción de nutrientes en suelos ácidos, aunque algunas como *Desmodium* e *Indigofera* responden positivamente al encalado.

La bacteria

Son bacilos Gram negativos, de 0,5 a 0,9 micras por 1,2 a 3,0 micras, aislados o de a pares, generalmente móviles cuando jóvenes por flagelos peritricos, polares o subpolares. No forman endosporas, pero sus células contienen gránulos de ácido poli-beta-hidroxibutírico (**PHB**) que se tiñen de negro con negro Sudán y aparecen refráctiles al microscopio de fase. Algunas cepas poseen gránulos metacromáticos de polifosfatos. La mayoría de las cepas producen abundantes polisacáridos extracelulares mucilaginosos, de composición variable según la cepa y el medio de cultivo. Algunas cepas desarrollan estructuras similares a cápsulas al envejecer, que representarían acumulación extracelular de antígeno de pared.

Los rizobios sufren cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en las células del nódulo dando lugar a células pleomórficas, de formas muy irregulares, en X, Y, o de clave, denominadas **bacteroides**, que carecen de flagelos y no se dividen. Se presentan en grupos aislados, encerrados en envolturas membranosas originadas por la planta. Para algunos autores estos cambios constituyen otro ejemplo de **ciclo celular**, que como el que incluye la formación de endosporas bacterianas, originan dentro de un mismo organismo estructuras con propiedades diferentes a las de las células que las originaron. Un conjunto de cambios conducen en medios de cultivo a las formas vegetativas clásicas.

Los rizobios son organismos aeróbicos, los cuales, sin embargo, son capaces de crecer a una tensión de oxígeno menor de 0,001 atmósfera. No presentan ningún mecanismo de protección de la nitrogenasa frente al O₂. En base a sus propiedades culturales los rizobios se diferencian en dos grupos, que dieron lugar a dos géneros:

- **de crecimiento rápido (CR)**, con tiempo de generación entre 3 y 4,5 horas, acidifican el medio y liberan abundante cantidad de polisacáridos, género *Rhizobium* (*R. meliloti*, *R. loti*, *R. leguminosarum* y *R. phaseoli*)
- **de crecimiento lento (CL)**, con tiempos de generación que oscilan entre 6 y 8 horas, producen menos polisacáridos y alcalinizan el medio: género *Bradyrhizobium*: *B. japonicum*, *B. spp.*

El concepto de "**productores de ácidos**" o "**productores de álcalis**" depende de la composición del medio, de la presencia de distintos hidratos de carbono y compuestos nitrogenados orgánicos y no se toma como carácter taxonómico exclusivo.

El aspecto de las colonias depende del medio de cultivo y de la especie. En medio de extracto de levadura-manitol-agar (**EMA**), las cepas de crecimiento rápido originan colonias de 1 a 5 mm luego de 3 a 5 días de incubación, mientras que las de crecimiento lento no exceden, dentro de un período de 10 días, un diámetro de 1 mm. Su forma varía desde plana a convexa, su color puede ser blanco opaco, poco gomosa, a blanco lechosa, translúcidas, con abundante cantidad de polisacáridos.

Medios de cultivo

Los rhizobios son organismos heterótrofos exigentes que se desarrollan en medios ricos, con vitaminas y aminoácidos, aunque existen gran variedad de cepas que difieren en sus requerimientos nutricionales.

- **Fuentes de carbono:** los rhizobios de crecimiento rápido utilizan una mayor variedad de fuentes carbonadas, siendo la sacarosa y el manitol los sustratos de preferencia. El glicerol y las pentosas (L-arabinosa, xilosa, ribosa) son preferidas por los rhizobios de crecimiento lento (Graham, 1975). El catabolismo de la glucosa, fructosa, sacarosa, manosa, gluconato y arabinosa fue estudiado en diferentes especies (Arias *et al.*, 1982) demostrándose en extractos acelulares la presencia de enzimas de las vías de Entner-Doudoroff (ED), de pentosa-fosfato (PF) y del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT) en especies **CR** y de enzimas de la vía ED y (CAT) en especies **CL**.
- **Fuentes de nitrógeno:** no son específicas; el nitrato y el amonio pueden ser empleados por la mayoría de las cepas, pero a menudo se obtienen mejores crecimientos con aminoácidos como glutamato y asparato.
- **Fuentes de factores de crecimiento:** muchas especies de rhizobio son estimuladas por factores de crecimiento como biotina, tiamina, riboflavina o pantotenato de calcio. El requerimiento es variable y algunas especies y cepas se desarrollan mejor sin su agregado. El **extracto de levadura** provee de fuentes de N-combinado y factores de crecimiento.
- **Minerales:** algunos aniones y cationes son también requeridos para el desarrollo bacteriano, como K^+ , Mg^{++} , PO_4^{3-} , $SO_4^{=}$, Cl^- , además de trazas de Co^{++} , Ca^{++} (relacionado con la estructura de la pared).

Medios de cultivo: según la finalidad que se persiga, se emplean los:

- **complejos**, son los más comúnmente usados, sobre todo en la preparación de inoculantes: medio-79 o EMA (extracto de levadura-manitol-agar) (Vincent, 1975).
- **definidos**, en los cuales el extracto de levadura es reemplazado por compuestos nitrogenados inorgánicos, aminoácidos y cofactores, se emplean para determinar los requerimientos nutritivos, los productos del catabolismo, las vías metabólicas y la identificación de mutantes.

Identificación de rhizobios y taxonomía

En general, la forma más directa para identificar una cepa de rhizobio es inducir la formación de nódulos, reaislándolo a partir de los mismos. Actualmente se consideran varios criterios taxonómicos:

- **inefectividad:** especies de leguminosas mutuamente susceptibles de nodular con un tipo particular de rhizobio, constituyeron un grupo de "**inoculación cruzada**". Las cepas capaces de nodular las plantas de uno de esos grupos se consideraron hasta la última taxonomía de 1984, como especies, independientemente de la ocurrencia de fijación. Pero numerosos nódulos son inefectivos, no benefician el crecimiento de la leguminosa y se consideran incluso como **parásitos**, ya que la planta provee energía para su desarrollo, sin recibir nitrógeno en cambio. La biodiversidad de cepas de rhizobios es considerable, como lo demuestran los estudios en árboles (*Prosopis sp.*, *Faidherlia albida*, etc.). Resulta apresurado proponer una clasificación definitiva, pero se han logrado muchos avances con el empleo de las siguientes características:
- **comportamiento simbiótico con huéspedes seleccionados : especificidad** (capacidad de nodulación) , **efectividad**, (capacidad para fijar N_2)
- **características morfológicas y culturales** (cuadro 3)
- **análisis del genoma** bacteriano han demostrado ser importantes herramientas en los estudios de evolución y han renovado el interés en estudios taxonómicos. La composición de bases del ADN (citosina+guanina)%, plasmidios, el análisis de las proteínas totales por electroforesis (Irisarri *et al.*, 1996), hibridación de ADN y ARN o ARN-ARN, el polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN (*RFLP*), la secuenciación del ADN y otras aproximaciones como el análisis electrofóretico de enzimas (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996) y la taxonomía numérica han demostrado su utilidad en estudios de estas bacterias (Martínez-Romero, 1994)
- **análisis de ARN 16s ribosomal**, tanto la conservación del ARN ribosomal como la existencia de

variabilidad en ciertos segmentos, hace que el estudio de la secuencia de los genes del rARN, constituyen importantes herramientas en la comparación de organismos y en el establecimiento de relaciones filogenéticas (Martínez-Romero, 1996)

- **análisis serológico**, estos estudios han sido relativamente poco utilizados para clasificar a los rhizobios debido a la variedad de antígenos que poseen estos organismos.
- **análisis de la homología de fragmentos de restricción amplificados por la reacción de la polimerasa (RFLP/PCR)**. Estas técnicas son muy empleadas y sus resultados acuerdan con la filogenia derivada de estudios de enzimas multilocus (De Bruijn, 1992).

La taxonomía numérica ha permitido agrupar enorme cantidad de caracteres bacterianos (morfológicos, metabólicos, ecológicos, genéticos) determinando grados de similitud entre aislamientos.

Algunas de estas técnicas se analizan en el **Anexo Práctico**.

En el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Krieg y Holt, 1984)(última edición en 2001), se encuentra la descripción de los géneros de la familia *Rhizobiaceae* y el cuadro 2 incluye las modificaciones recientes. El cuadro 3 señala las principales características fisiológicas y bioquímicas que diferencian a los principales géneros: *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Elkan, 1992).

Análisis del perfil de los ésteres metilados de los ácidos grasos de cepas de *Bradyrhizobium*, la mayoría aislados de soja, permitió a Graham *et al*, (1995) distinguir 5 grupos en este género, algunos aislamientos se mostraron muy alejados de las especies descritas de *B.japonicum* y *B. elkanii* y podrían agruparse en una nueva especie

Cuadro 2 - Clasificación de los rhizobios (a)

género	Especies	hospedantes
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	<i>Vigna</i> , etc
<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Vicia</i>
	biovar <i>viciae</i> , <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
	<i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
	<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i>
		<i>Trigonella</i>
	<i>R. loti</i> b	<i>Lupinus</i> , <i>Lotus</i>
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i>
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>S. tropici</i>	<i>Phaseolus</i> , <i>Leucaena</i>
	<i>R. huakuii</i> b	<i>Astragalus</i>
	<i>R. fredii</i>	??
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. saheli</i> c	<i>Acacia</i> , <i>Sesbania</i>
	<i>S. teranga</i> c	<i>Acacia</i> , <i>Sesbania</i>
	<i>S. xinjianensis</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Photorhizobium</i>		<i>Aeschynomene</i>

a- otras especies son *R. ciceri* para *Cicer arietinum* y *R. tianshanense* para *Glycine max*.. **b-** se ha propuesto que *R. loti* y *R. huakuii* se asignen a otro género. **c-** un nuevo género ha sido propuesto: *Sinorhizobium*, para agrupar a *R. meliloti* y *R. fredii* y las nuevas especies son *S. teranga* y *S. saheli*.

Especificidad en la infectividad y en la efectividad

Algunas cepas de *Rhizobium* o *Frankia* poseen un amplio espectro de huéspedes. Otras cepas poseen un pequeño espectro y se les dice específicas. Este tema de la especificidad debe verse desde el punto de vista del micro y del macrosimbionte. Basados en sus características de especificidad para la nodulación y la fijación, las leguminosas se pueden agrupar en 3 grupos (Singleton *et al*, 1992).

Cuadro 3 - Características fisiológicas y bioquímicas de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*

característica	<i>Rhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
crecimiento en EMA (tiempo de generación)	rápido (2-4h)	lento (5-10h)
crec. con sacarosa	+	-
crec.con ramnosa	+	-
crec.ác.orgánicos	+	+
aumen.pH medio con azúcares(pentosas)	-	+
acidificación del medio con HdeC	+	-
colonias con Rojo Congo	-	-
metabolismo Entner-Doudoroff	+	+
crecim.con 2% CINA (0,0025%)	algunas cepas de <i>R.meliloti</i>	-
H ₂ S producción - estim.crec.con biotina	idem	-
resp.con nitratos	+	+
	muchas cepas	
alta afinidad por fosfato	+	+
alto requim.Ca, Fe, Co	+	+
degrad.comp.fenólicos		
vía beta-cetoadipato	+	+
+ más del 90% de las cepas analizadas dieron positivo - negativo (con excepciones)		

El primer grupo está integrado por especies que son noduladas por amplio rango de cepas genéticamente diversas y fijan N₂ efectivamente en asociación con estas cepas. Estas especies son:

- **promiscuas en la nodulación y en la efectividad**, por ej. *Vigna unguiculata*, *Macroptilium atropurpureum* (siratro), *Acacia crassiparpa* (CL), *A. auriculiformis* (CL), *Albizia lebbek* (CL), *Paraserianthes falcata* (CL).

El segundo grupo esta formado por especies que son noduladas por un amplio rango de cepas genéticamente diversas pero sólo fijan N₂ con un limitado grupo de cepas específicas. Estas plantas son promiscuas para la nodulación y específicas para la efectividad, ej. *Acacia mangium* (CL), *Robinia pseudoacacia* (CR), *Acacia mearnsii* (CL).

El tercer grupo está integrado por especies que son específicas en sus requerimientos, por lo que nodulan efectivamente con un pequeño rango de cepas: son específicas para la nodulación y también para la efectividad. Ejemplos: *Leucaena leucocephala* (CR), *Gliricidia sepium* (CR), *Calliandra calothyrsus* (CR) (Galiana, 1991, Turk y Keyser, 1993).

Esta clasificación difiere de la propuesta por Date (1977) que sostenía:

- **especies promiscuas**, las que nodulan con amplio rango de cepas:
 - A. promiscua efectiva (PE), nodula con cepas de CL
 - B. promiscua inefectiva (PI) nodula con cepas de CL y de CR
- **especies específicas**, que sólo nodulan con pocas especies de rhizobio. Una limitación de esta

clasificación es que el carácter de promiscuo o específico depende del rango de cepas testadas por lo que deben realizarse gran número de test de inoculación.

Nodulación

La fijación biológica del N₂ en los nódulos de leguminosas es el resultado de complejas interacciones entre el huésped y el endofito. La eficiencia es máxima en estos sistemas ya que existe:

1. **protección de variables ambientales** y la FBN puede funcionar bajo amplio rango de condiciones. Así, nódulos de soja, son relativamente insensibles a la temperatura sobre un rango

de 15°C, y pueden fijar N₂ a concentraciones externas de O₂ entre 0,05 y 0,8 atm, mientras que los bacteroides fijan N₂ en rango más estrecho (10⁻⁶, 10⁻⁴ atm). La protección frente al O₂ es una de las principales ventajas de los sistemas simbióticos.

2. **aporte de esqueletos carbonados** por los vasos de la planta quien le asegura la generación de energía y poder reductor para el endosimbionte y la actividad nitrogenasa.
3. **transferencia del N fijado a la planta**, disminuyendo el nivel de N combinado en la vecindad de la nitrogenasa, principal causa de inhibición del proceso. Las leguminosas se clasifican según la forma de exportar el N combinado:
 - **productoras de amidas** (asparagina, glutamina), sobretodo las leguminosas de zona templada
 - **productoras de ureídos** (alantoína, ácido alantoico), sobretodo en las leguminosas de zona tropical.

En la **nodulación** se distinguen varias etapas:

- **Multiplicación rizosférica de los rhizobios**, a partir de materiales excretados por las raíces. Este proceso no es específico y se citan estimulaciones de rhizobios por rizosferas de gramíneas y otras plantas.
- **Adhesión** entre la bacteria y células superficiales de los pelos radicales. La marcada especificidad en esta simbiosis se ha explicado en parte, por la teoría de las **lectinas**, glucoproteínas específicas que se unen por un lado, a hidratos de carbono producidos por el hospedante, y por el otro a receptores moleculares de la bacteria. Leguminosas de diferentes grupos de inoculación cruzada sintetizan lectinas con diferente afinidad por azúcares. Estas sustancias se encuentran en semillas, raíces, hojas o tallos y se piensa que cumplen varias funciones.

Algunos autores comparan a estas moléculas con los anticuerpos: los sitios a unir, en la bacteria y la planta, poseen afinidad por la misma molécula, llamada **trifolina**, en tréboles.

Funciones de las lectinas en la FBN:

I. adsorción no específica entre rhizobio y raíces

II. rol específico en la nodulación: se unen a receptores bacterianos través de los exopolisacáridos (EPS) o derivados de EPS. Mutantes EPS⁻ no nodulan a su hospedante.

- **Encurvamiento de los pelos y marcada deformación de los mismos**, constituyen los primeros pasos de la infección. El pelo se encurva y encierra al rhizobio adherido. El fenotipo se designa como **Hac⁺**. Rhizobios heterólogos son incapaces de inducir encurvamiento de los pelos. La producción de sustancias con carácter de **fitohormonas** como el AIA, debilitaría las paredes de los pelos, facilitando la deformación que precede a la infección. Las giberelinas inhibirían el desarrollo de futuros nódulos.
- **Penetración de la bacteria a través de la pared de los pelos radicales y formación de un cordón de infección tubular**, intracelular que confina a las bacterias a medida que ellas penetran en las células del hospedante. En trébol blanco, se observó cordón de infección 2 días luego de la inoculación con rhizobio infectivo. Exámenes en cultivos en hidroponia sugirieron que se requiere estrecha proximidad del núcleo de las células de los pelos radicales y el ápice del cordón, mientras éste avanza hacia la base del pelo. Allí, se ramifica en la pared celular y penetra en la corteza. Dos hipótesis explican la invasión:
 - **invaginación de la pared vegetal** ante la presión de las bacterias **participación de enzimas**, las bacterias dentro del pelo capilar pueden degradar la pared por enzimas líticas: carboxicelulasa y poliugalatouronasa.
 - **diferenciación nodular**, cuando el cordón llega a una célula particular (poliploide en relación al hospedante) cesa la síntesis de pared o ésta es degradada por enzimas líticas y la bacteria es liberada en la células que formarán la zona infectada del futuro nódulo. En respuesta a esta invasión, ciertas células corticales son estimuladas a proliferar, se alargan y emergen como tejido nodular diferenciado, infectado con los rhizobios, que se transforman en **bacteroides**.

La membrana de la célula vegetal forma otro envoltorio para separar los rhizobios de la planta: es la **membrana peribacterial**.

Otro mecanismo de infección es por **heridas**, que se presenta en algunas simbiosis, como en rhizobio-mani y en el caso de *Frankia-no leguminosas*.

- **fijación de N₂**, varios días después la bacteria dentro de las células hospedantes en nódulos efectivos comienzan a fijar nitrógeno y excretan amonio en el citosol de las células de la planta donde puede ser asimilado por acción de la **glutamato deshidrogenasa (GDH)** y por acción de la **glutamato sintetasa (GS)** o de la **glutamato-2-oxoglutarato-amino-transferasa (GOGAT)**. Esta segunda ruta es empleada más frecuentemente.

La falla en alguno de estas delicadas etapas conduce a simbiosis deficientes o abortivas. El cuadro 4 modificado a partir de Sprent y Sprent (1990), resume los distintos eventos entre rhizobios y leguminosas en la formación de nódulos.

La figura 1 presenta un esquema que resume los pasos en la invasión de una leguminosa por rhizobio. El proceso comienza con la exudación de inductores flavonoides por la raíz que activan la expresión de los genes **nod** que intervienen en la modificación de la pared celular (primer componente en la especificidad del hospedante). La bacteria produce una sustancia señal que estimula la curvatura del pelo y la división de las células corticales. El cordón de infección se produce luego de invaginación de la pared del pelo y crece a lo largo del mismo. Las bacterias diferenciadas en **bacteroides** se rodean de una **membrana peribacterial** que deriva de la membrana de la célula vegetal (Palomares y Coronado, 1992)

Cuadro 4 - Interacción entre rhizobio y leguminosa en la formación de nódulos

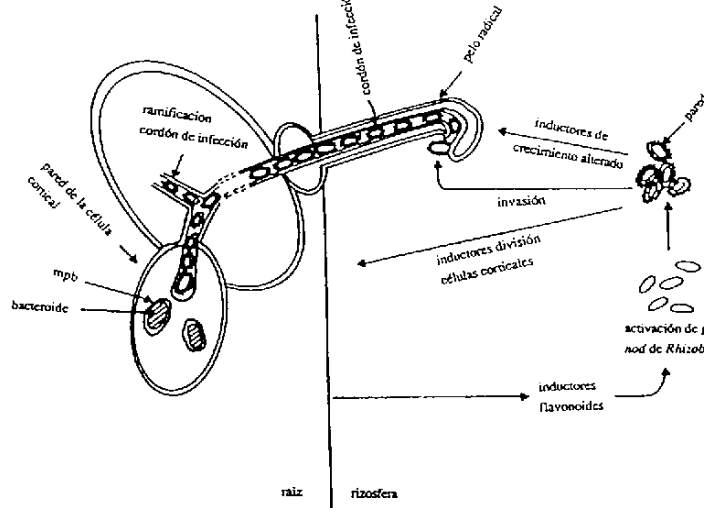
fases	Requerimientos	observaciones
multiplicación en suelo y raíz	secreciones radicales pueden estimular o inhibir	especificidad variable
encurvamiento pelos radicales	compatibilidad entre planta y rhizobio	especificidad variable
entrada de la bacteria	Invaginación y/o disolución o debilitamiento de la pared celular de la planta (enzimas)	la planta puede tener factor genético no-nodul. Muy afectada ambiente(temp,pH)
cordón de infección	Sincronismo entre crecimiento de la bacteria y pared celular de la planta	en nód. perennes, los cordones son también perennes
formación de nódulos	balance entre factores de crecimiento del rhizobio y la planta	rh-bacteria específico inhibido alta temperatura y nitratos
formación células infectadas	Liberación rh del cordón. Sincronismo entre crecim. de la membrana de la célula vegetal y multiplicación del rhizobio	inhibida por factores ambientales y nutricionales que afectan crecimiento vegetal
formación de los bacteroides, síntesis N ₂ asa y leghemoglobina	Intercambio de señales y complementación genética	combinación planta y rhizobios específicos
mantención tejido nodular con bacteroides	intercambio de metabolitos (H ₂ deC, N ₂ -org)	afectada por altas temperatura, nitratos, baja H ₂ %

Estructura nodular

Se cree que la formación de los nódulos está controlada por **fitohormonas: citoquininas, auxinas, giberelinas**, producidas no sólo por los rhizobios, sino también por el huésped frente al estímulo de la

bacteria. Estas sustancias inducen repetidas divisiones celulares de células poliploides. El ácido absísico exógeno ejerce una inhibición específica y detiene la iniciación nodular (Vincent, 1982).

Figura 1- Esquema de la colonización de una leguminosa por rhizobio



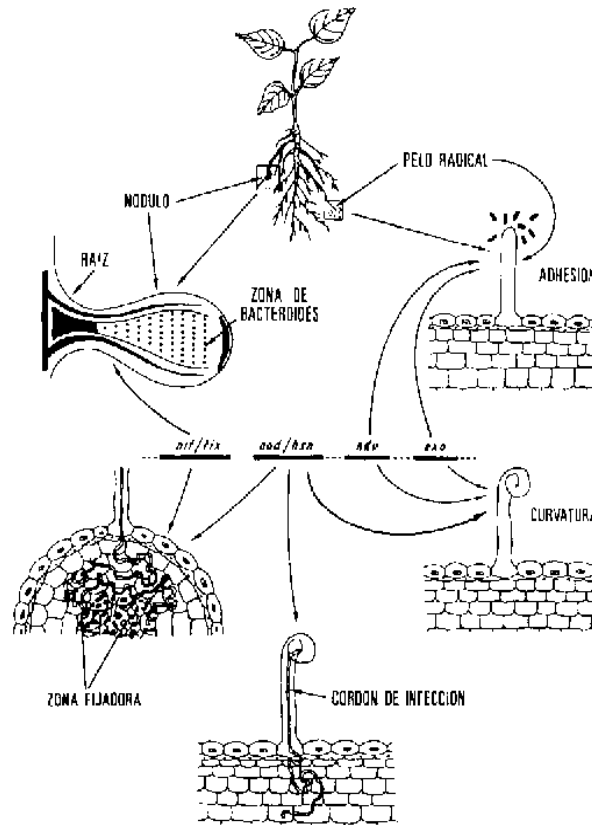
En el futuro desarrollo del nódulo ocurren drásticos cambios anatómicos y citológicos en células de la corteza. Pequeñas células meristemáticas se convierten en grandes células con bacteroides. Su rápida senescencia una vez cumplida la función de fijación del N_2 está también relacionada con cambios en el balance hormonal. Los nódulos de leguminosas y los tumores de agallas de corona están inducidos por bacterias estrechamente relacionadas: *Rhizobium* o *Bradhyrhizobium* y *Agrobacterium*, y en ambos casos se reconoce la inducción hormonal: en nódulos posiblemente por auxinas y citoquininas, liberadas por los rhizobios, en las agallas, por hormonas que producen heridas.

La figura 2 presenta un esquema general del proceso de nodulación.

Dos tipos de estructura primaria se pueden describir (figura 3):

- **determinados:** todas las partes se diferencian a la vez y la senescencia ocurre simultáneamente, por lo que estos nódulos tienen una existencia limitada.
- **indeterminados:** con meristema apical que continúa activo a través de la vida del nódulo, dando nuevos lóbulos activos.

Figura 2 - Eventos en el proceso de nodulación

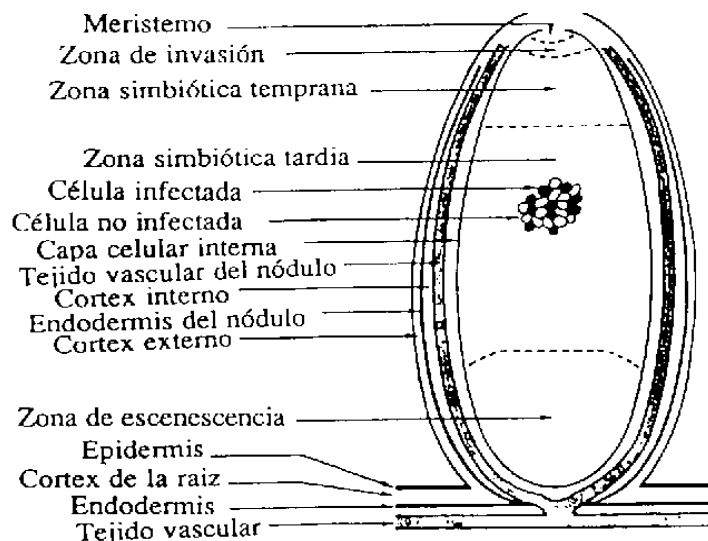


Los nódulos perennes son del tipo indeterminado, el meristema persistente es capaz de reiniciar la actividad en cada estación de crecimiento. Corby (1988) reconoció subgrupos en cada categoría:

- **indeterminados:** caesalpinoide (*Mimosa*, *Albizia*), crotalarioide (*Vicia faba*), lupinoide (*Lupinus*)
- **determinados:** aeschynomenoide (*Aeschynomene*, *Arachis*), desmodoide (*Arachis*, *Vigna unguiculata*)

Todos los tipos, excepto caesalpinoide, se presentan en las *Papilionoideae*. El descubrimiento de nódulos en tallos de *Sesbania rostrata* permitió la inclusión de un tercer tipo de nódulos determinados; sesbanoide.

Figura 3 - Organización de un nódulo indeterminado



Zonas del nódulo

En el nódulo maduro se diferencian las zonas:

- cortical**, formada por células no diferenciadas ni infectadas. En especies perennes estas células pueden aparecer suberificadas
- zona meristemática**, con activas divisiones celulares, con células no infectadas que darán origen a las otras zonas. En los nódulos efectivos la actividad meristemática es más prolongada
- zona vascular**, constituye un sistema de vasos ligados a los de la raíz y por ellos la planta aporta los materiales energéticos y retira los productos nitrogenados resultantes de la fijación
- zona bacteriana**, o de infección, con células colonizadas y otras no. Las primeras contienen a los bacteroides y aparecen hipertrofiadas, alcanzando dimensiones 4 a 8 veces superiores a las células sin bacterias. El volumen de tejido infectado nos da un índice de la capacidad de fijación. Los **bacteroides** aparecen al microscopio electrónico individualmente o en grupo dentro de envolturas membranosas de origen vegetal.

En las células colonizadas aparece una hemoproteína, la **leghemoglobina**, que se une específicamente al O_2 y lo libera a bajas concentraciones de O_2 . La concentración de esta sustancia sólo encontrada en los nódulos de leguminosas y no-leguminosas, se incrementa a medida que la fijación progresa y su determinación colorimétrica se emplea como medida de la potencialidad de fijación. Su principal función está relacionada con la provisión de adecuadas cantidades de O_2 para el metabolismo respiratorio de los **bacteroides**, manteniendo el nivel suficientemente bajo, como para no dañar el funcionamiento de la nitrogenasa (figura 1 del Anexo Práctico).

La constante de equilibrio para la oxigenación de la leghemoglobina ($0,04 \cdot 10^{-6}M$) asegura que los bacteroides suspendidos en solución parcialmente oxigenada de este pigmento, se encuentren en concentración de O_2 libre en el rango para una óptima producción de ATP y para la fijación del N_2 . En los nódulos, la concentración de leghemoglobina es del orden de 1 mM, o sea 10^5 veces superior a la concentración para su máxima actividad. El efecto tampón es muy grande, minimizando el efecto de concentraciones fluctuantes de O_2 .

La cantidad de nitrógeno fijado en los nódulos es función de:

- **el volumen del tejido con bacteroides**
- **su actividad específica**, es decir, la eficiencia en la fijación del N_2
- **el tiempo en que permanece activo.**

Las relaciones entre la bacteria, el huésped y su ambiente pueden afectar a la fijación del N_2 . Usualmente, la restricción en el número de nódulos es compensada por un mayor tamaño de los

mismos. Para evaluar tempranamente la fijación se tiene más en cuenta la masa de tejido nodular, que su número.

El cuadro 5 presenta algunas de las características de los nódulos efectivos y de los inefectivos (que no fijan cantidades detectables de N₂). Entre ambos grupos existen varios grados de efectividad.

Costo energético de la FBN

Un importante hecho agronómico de la FBN es que ella es una reacción energéticamente desfavorable. El costo exacto en la simbiosis con leguminosas en términos de ATP empleado es motivo de polémica. Desde que la transferencia de cada electrón de los 8 involucrados en la reacción requiere la hidrólisis de 2 ATP, significa que un mínimo de 16 ATP se requieren por molécula de N₂ reducida.

En la práctica el costo es más alto, debido a la ineficiencia de la actividad de la N₂asa y a costos asociados al desarrollo y mantención del nódulo a la asimilación y el transporte del amonio. Las estimaciones en la literatura varían ampliamente, un dato generalmente reconocido se sitúa en **28 mol ATP por mol de N₂**, excluyendo los costos adicionales

Cuadro 5 - Diferencias entre nodulación efectiva e inefectiva

nódulos efectivos	nódulos inefectivos
poco y situados sobretodo en la raíz primaria	numerosos y repartidos en todo el sistema radical
voluminosos de superficie lisa o rugosa	pequeños, de superficie lisa
actividad meristemática y nodular prolongada	actividad meristemática y nodular corta
infección generalizada, zona bacteriana grande, con bacteroides	pocas células infectadas, pocos o sin bacteroides
	presencia de gránulos de almidón
interior rojo por la leghemoglobina	no pigmentados de rojo

.Las características de la reacción de fijación del N₂ se resumen en:

1. sensibilidad de la nitrogenasa al O₂
2. costo energético elevado : 28 moles de ATP/mol N₂ y hasta el 33% de la energía fijada fotosintéticamente
3. represión por el N combinado

Hidrogenasa

La nitrogenasa libera H₂, que puede perderse o ser recapturado por una hidrogenasa: la reacción simplificada es



El gran interés de la hidrogenasa se ha centrado en su posible rol en incrementar la eficiencia de la FBN. El término Eficiencia relativa (**ER**) ha sido definido por Schubert and Evans (1976) como:

ER= electrones usados en la reducción del N₂

flujo total de electrones a la nitrogenasa

Experimentalmente se determina: $ER = 1 - \frac{H_2 \text{ liberado en aire}}{H_2 \text{ liberado en atm.sin N}_2}$

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ liberado en aire}}{C_2H_2 \text{ reducción}}$$

Dado que un 25% de los electrones destinados a la N2asa se pierden en la evolución del H2, el máximo valor para la ER será 0,75. En realidad se encontraron valores entre 0,40 a 0,99. Valores superiores a 0,75 son sólo posibles si algo del H2 liberado por la N2asa no se detecta en la evolución neta del H2. Se postula que la presencia de una hidrogenasa puede contribuir a incrementar la eficiencia de la FBN en varias vías:

- provee una fuente de **poder reductor** que puede resultar metabólicamente útil, por ejemplo en la regeneración de ATP.
- la oxidación del H2 está acoplada a la **consumición del O2**, por lo tanto se protege a la N2asa.
- el **H2 es un inhibidor** de la reducción del N2 por la N2asa y la actividad H2asa puede remover un potencial inhibidor de la reducción del N2.

Existe mucho debate sobre el hecho de que la presencia de una activa H2asa (fenotipo **Hup⁺**) confiere un beneficio significativo a las leguminosas en el campo. Comparación entre simbiosis con **Hup⁻** y **Hup⁺** han dado resultados variables. La planta puede afectar la expresión de la actividad de la hidrogenasa, unas 128 cepas de *B.japonicum* expresan actividad H2asa en simbiosis con *cowpea*, pero no con soja.

Protección de la nitrogenasa frente al oxígeno

En los sistemas simbióticos diferentes mecanismos de protección están involucrados:

- **la corteza** de los nódulos constituye una importante **barrera física** a la difusión del O2.
- **la leghemoglobina** en leguminosas o **hemoglobina** en plantas actinorríticas. Este pigmento rojo se presenta en el tejido central de nódulos fijadores, rodeando a los bacteroides. Esta molécula es una **nodulina**, hemoproteína temprana sintetizada en los nódulos. La fracción proteica parece ser codificada por el vegetal, mientras que los bacteroides serían los responsables de la síntesis de la fracción hemo.
- **la respiración de los bacteroides** contribuye a la remoción del O2 (6 veces más alta que en nódulos inefectivos).
- **la hidrogenasa** contribuye a la protección de la nitrogenasa al eliminar el H2.

Interacciones entre genes de la bacteria y de la planta

La iniciación y formación de los nódulos son el resultado de interacciones simultáneas de los genes de la planta y de las bacterias (Kondorosi, 1991)

- **genes de la nodulación, genotipo específicos**, juegan un importante rol. Por ejemplo el genotipo arveja, *Pisium sativum* *bv* *Afghanistan* es nodulada por cepas de *Rhizobium* **TOM** pero no lo es por cepas europeas de rhizobio. Los genes que permiten a las cepas **TOM** a nodular arveja *Afghanistan* se han localizado en el plasmidio simbiótico.
- **inducción de genes de la nodulación** por flavonoides e isoflavonoides, señales de la planta que inducen los genes **nod** han sido mostradas como necesarias para la inducción de los genes de la nodulación. La figura 6 muestra la señal específica aislada de alfalfa (lipo-oligosacárido sulfatado), de PM 1.102, inducido por flavonoides. Se indican también las proteínas que intervienen en su síntesis.

Un hecho interesante es que los rhizobios de amplio rango de huéspedes, responden a un amplia gama de compuestos y aquellos con estrecho rango aceptan solamente un limitado número de flavonoides. Pico moles (pmol = 10⁻¹² moles) de estos compuestos pueden inducir la expresión de los genes **nod** de rhizobio.

- **rhizobio produce gran variedad de moléculas biológicamente activas que afectan la infección y desarrollo del nódulo**

Genes de la nodulación

Las secuencias de ADN bacteriano que se requieren para la formación de nódulos fijadores de N2 en raíces o tallos se refieren como genes **nod**. Más de 30 genes **nod** han sido identificados y secuenciados, más que las letras del alfabeto (nod A, nod Z) los futuros *loci* de nodulación son referidos como genes **noi** (nodulación loci).

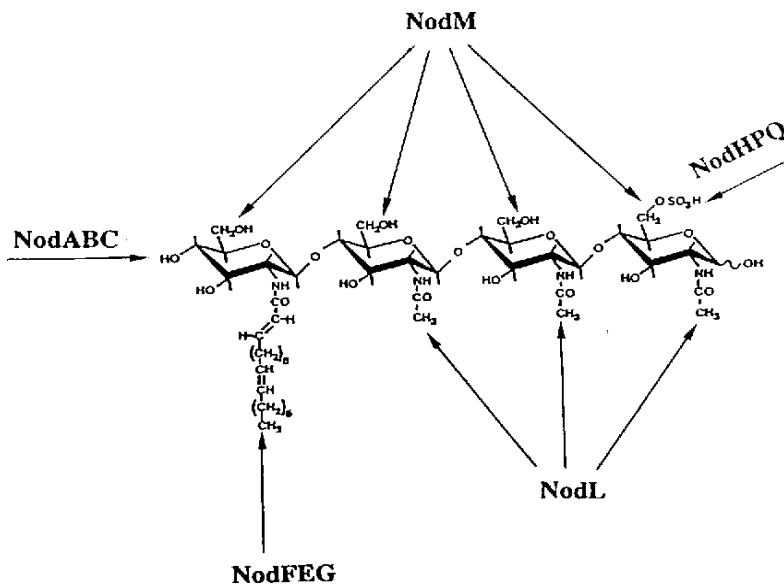
En la mayoría de los miembros de los géneros:

- *Rhizobium*, los genes **nod** están localizados en **plasmidios** (también llamados plasmidios simbióticos o plasmidios **sym**) a veces como racimos en la proximidad de los genes de la fijación

- Tres tipos de *loci* de nodulación han sido identificados en varios rhizobios:

- genes nod comunes
- genes nod específicos para el huésped (hsn)
- genes nod genotipo específicos (GSN)

Figura 4- Estructura de la señal simbiótica (NodRm1: tetraoligosacárido de glucosamina sulfatado) en *R. meliloti*



A pesar de que muchos de los mismos genes de nodulación han sido encontrados en especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium japonicum*, 3 diferencias separan a esas bacterias:

- En *B. japonicum* los genes de nodulación no se localizan en plasmidios sino se distribuyen en el cromosoma.
- Los genes estructurales **nif DK y H** están físicamente separados por una distancia relativamente grande de los genes **nod**
- En el caso de rizobios CR las sustancias que inducen los genes **nod** (moléculas señal derivadas de las plantas) pertenecen a la clase conocida como **flavonoles, flavonas y flavanonas**. En *B. japonicum* las principales sustancias inductoras son **isoflavonas** (figura 5)

Genes de la fijación del nitrógeno

Dos grupos principales de genes han sido descriptos:

- **Los genes nif** refieren a la secuencia genética que están específicamente involucrados en el proceso de FBN y que se correlacionan estructural y funcionalmente con diazotrofos de vida libre, sobretodo *Klebsiella pneumoniae*.
- **Los genes fix** (para la fijación) están también específicamente involucrados en la FBN, pero no se correlacionan con los de *K.pneumoniae*. Esta fue la primera bacteria fijadora de N₂ estudiada en detalle, por la adaptación de técnicas empleadas primeramente en *E.coli*.

Los productos de los genes **nif A y nif L** controlan el operón de todos los otros genes **nif**.

Genes fix junto a otros genes involucrados en la FBN son referidos colectivamente como **genes sym**, que incluyen a los necesarios para las interacciones iniciales con la planta (reconocimiento, encurvamiento, formación cordón de infección) y la formación y mantenimiento de los nódulos radicales o de tallos (**nod, nol, GSN y hsn**). Además otro conjunto de genes bacterianos están involucrados en la biosíntesis de la parte Hemo necesaria para la protección del O₂.

Cuadro 6 - Genes simbióticos en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*

gen	concepto	Función
hac	encurvamiento	Encurvamiento de pelos capilares
nod	nodulación	Eventos en desarrollo de nódulos
hsn	específicos del hospedante	Determinación de especificidad del hospedante dentro del grupo de infección
efn	eficiencia de la nodulación	Genes adicionales para eficiencia de la nodulación
ndv	desarrollo nódulo	Regulación del desarrollo del nódulo, ej: glucanos cíclicos
exop	polisacáridos extracelulares	Regulación de infección y liberación de bacteroides
nif	fijación de N ₂	Involucrados en FBN homólogos a los de <i>Klebsiella</i>
fix	fijación	Genes adicionales involucrados en la FBN en estado simbiótico (sin homología con los nif de <i>Klebsiella</i>)
dct	transporte ácidos di carboxílicos	Transporte de ác.di COOH- como sustratos para la FBN en bacteroides

Genética del hospedante

Las leguminosas muestran gran variabilidad genética en respuesta a la invasión por rhizobios. Varios autores, consideran que el hospedante es el que corrientemente desempeña el rol principal en el control de la simbiosis, afectando el tamaño, la forma y el número de nódulos, así como la efectividad de los mismos. Se reconocen:

- **genes de "no nodulación"** : ausencia de nódulos en plantas inoculadas con especie compatible de rhizobio, en distintas leguminosas: *r r* en *Trifolium pratense*, la bacteria no penetra en los pelos radicales; *rj1 rj1* en *Glycine max*: la nodulación es controlada en las raíces, *Sym-1* en *Pisum sativum*, el hospedante no nodula a temperaturas menores a 26°C y *Sym-2*, la inoculación con ciertas cepas de *R. leguminosarum* en el mismo hospedante produce fallas en la nodulación por aborto de los canales de infección.
- **morfología de los nódulos es controlada por el hospedante**. Se ha demostrado también que el

genotipo del hospedante influye sobre la distribución de los nódulos en el sistema radical, así como en el número de nódulos formados.

- **nodulación "efectivas" o "inefectivas"**: el término "inefectiva" se aplica cuando la secuencia se interrumpe en algún momento. Varios genes del hospedante controlan la nodulación inefectiva.
- **eficiencia de la FBN**. Así, en soja variedad "Peking" inoculada con cepas de *R. japonicum* (serogrupo 123) se forman nódulos grandes de aspecto normal, aunque las plantas permanecen pequeñas y cloróticas, síntomas de deficiencia en N. Sin embargo, la misma variedad establece simbiosis eficientes con otras cepas de *R. japonicum* y lo mismo ocurre con las cepas del serogrupo-123 con otras variedades de soja.
- **nodulinas**, proteínas específicas sintetizadas como respuesta a la invasión por rhizobios, como por ejemplo la (**leghemoglobina**) con secuencias de mRNA cuyo origen está en el hospedante.

Autoregulación en la formación de nódulos

Con mucho N cambiando en el suelo, la planta regula la nodulación. La planta puede también controlar la formación de nódulos en ausencia de nitrógeno combinado: se habla de **autoregulación**. La zona susceptible de las raíces no puede soportar futuras nodulaciones luego del establecimiento de la primera infección. Existe evidencia de que la emergencia de nódulos en leguminosas está controlada por mecanismo de señal y respuesta. Las siguientes hipótesis para explicar la autoregulación:

- los rhizobios inducen divisiones celulares en la corteza
- estas divisiones producen una señal que actúa directamente o por la parte aérea para suprimir la actividad de división celular en la corteza.

Los problemas de la **competencia** de la cepa del inoculante con rhizobios nativos es motivo de estudios a nivel genético y caracteres que favorecen la colonización como: movilidad, producción de antibióticos, características de superficie para la adhesión, velocidad de nodulación, se están identificando e introduciendo en cepas altamente fijadoras. El empleo de un par rhizobio-leguminosa con infectividad suficientemente restringida para prevenir la nodulación por la población indígena será una muy buena solución (Triplett y Sadowsky, 1992), independizando al inoculante del nivel de rhizobios del suelo.

Métodos de estudio de rhizobio

Rhizobio es un habitante normal del suelo, aunque puede presentarse muchas veces en baja densidad. Es capaz de sobrevivir, compitiendo efectivamente con el resto de la población y haciendo uso eficiente de los nutrientes disponibles. La vida saprofítica de esta bacteria es tema de interés, incluso en cultivos que son año a año inoculados con altas dosis de rhizobios específicos, como ocurre en casi 100% del área sembrada de soja en Argentina, Uruguay y Brasil.

La carencia de **técnicas específicas** y confiables limitó bastante este estudio: en el suelo el rhizobio no se distingue del resto de la población bacteriana, no fija N₂ o lo hace a niveles muy bajos, no posee requerimientos nutritivos específicos, ni morfología característica.

En el **Anexo Práctico** se explicitan las técnicas más empleadas en el reconocimiento y seguimiento de esta bacteria en ambientes naturales: recuentos, serología, mutantes resistentes a antibióticos y aquellas que analizan la composición del ADN o ARN.

Factores limitantes de la FBN en la simbiosis rhizobio-leguminosa

Los factores que afectan la sobrevivencia de la bacteria en el suelo y aquellos que afectan la iniciación de los nódulos, son sin duda decisivos en el éxito de la simbiosis. Por ser un proceso resultante de complejas reacciones fisiológicas y bioquímicas, que involucra especies distintas, la FBN depende de la expresión del potencial genético del microorganismo diazotrofo, del hospedante, o de ambos (en caso de las simbiosis) y del ambiente.

Físico-químicos

pH

Este factor afecta distintas etapas de la simbiosis:

La bacteria es muy sensible a la acidez, aunque diferentes cepas de una misma especie difieren marcadamente por su sensibilidad al pH. El encalado permite incrementos en la nodulación. Se seleccionan rhizobios por su resistencia a pH ácidos (pH 4,5).

Las leguminosas se afectan directamente por acción de altas concentraciones de H^+ , o bien indirectamente por deficiencias (Ca, Mg) o toxicidad (Al, Mn). La FBN puede ocurrir a pH menores que los necesarios para la persistencia de la bacteria y la infección.

El encurvamiento de pelos capilares de *Medicago sativa* por *R. meliloti* se detuvo a pH 4,5 pero ocurrió cuando éste se elevó a 5,5. La iniciación de los nódulos es sensible a la acidez algunas horas luego de que el encurvamiento se ha completado, así como la iniciación del cordón de infección. Los niveles críticos de pH para la nodulación varían con las especies y aun dentro de éstas, situándose entre pH 3,5 y 5,5, con mayor tolerancia en especies tropicales, como el caupi, productora de granos y estilosa, forrajera.

La leguminosa puede aumentar el pH de su rizosfera, favoreciendo al rhizobio y la nodulación. La inoculación con altas dosis de rhizobios facilita la infección y la nodulación.

El **encalado** es el método más empleado para mejorar estos suelos. Los resultados logrados en Brasil merecen señalarse, con grandes aumentos en los rendimientos por el encalado y la inoculación de leguminosas (Jardim Freire, 1982). El cuadro 7 (Danso, 1977) muestra este efecto y la inoculación con *R. leguminosarum* bv *phaseoli* en poroto en suelos altamente ácidos de Colombia.

Cuadro 7 - Efecto de la inoculación en *Phaseolus vulgaris* con rhizobios en suelos ácidos y encalados

cal ton/ha	rhizobio/g suelo inoculados	nódulos/planta	N%
0	-	20,2	1,4
0,5	-	19,0	1,3
2	-	22,7	2,0
6	-	67,8	3,5
0	3,5. 10^4	23,1	2,5
0,5	"	23,4	2,4
2	"	30,0	3,2
6	"	56,8	3,0

Temperatura y humedad

Los rhizobios son organismos mesófilos pero están sin embargo, distribuidos en todas las regiones del mundo. Difieren marcadamente en su tolerancia a elevadas temperaturas. En general, *R. meliloti* es la especie más tolerante a temperaturas elevadas, *R. leguminosarum* lo es menos y los rhizobios de leguminosas tropicales soportan amplio rango de temperatura.

La selección de rhizobios tolerantes a altas temperaturas y a la desecación es muy importante en la introducción de leguminosas forrajeras en regiones áridas y semiáridas, o de cultivos como soja o maní, en zonas áridas con irrigación. La unión con arcillas, como por ejemplo de montmorillonita, protege a las células y les confiere resistencia a altas temperaturas y desecación. Sagardoy (1979) estudió la sobrevivencia de *R. meliloti* nativos en la zona semiárida de la Argentina y encontró luego de 2 años respuesta positiva en la mayoría de los suelos mantenidos en condiciones de laboratorio en estado seco al aire.

La simbiosis es más sensible a extremos de temperatura. Bajas temperaturas retardan la infección y formación de nódulos, en tanto que las altas temperaturas provocan nódulos poco eficientes.

Siqueira y Franco (1988) señalan que para las leguminosas tropicales, temperaturas diurnas de 25 a 32°C son óptimas para la nodulación, el funcionamiento de la simbiosis y el crecimiento de las plantas, con gran variación entre especies. Los algarrobos presentan óptimo de 35°C para la FBN.

El **nivel de agua** debe ser tal que no origine problemas de presión osmótica en la célula. En regiones tropicales con estaciones muy secas, el número de rizobios en las cepas superficiales del suelo disminuye rápidamente. Con las lluvias, la recolonización puede ocurrir desde las capas más profundas.

La disminución del potencial hídrico del suelo limita también el transporte de los productos de la fijación a la planta y el flujo de fotosintetizados. Altas humedades limitan la aireación y la FBN. Algunos rizobios con **nitrato reductasa desasimilativa (nir⁻)** pueden sobrevivir en anaerobiosis. Los nódulos soportan poco tiempo el anegamiento (aumentan las lenticelas: expansiones de células epidérmicas que facilitan los intercambios gaseosos, o los espacios vacíos, con gases).

Los **nódulos en tallos** presentes en ciertas leguminosas, como *Sesbania rostrata*, se independizan del problema del exceso de agua.

Salinidad

Los suelos se clasifican en salinos si su conductividad eléctrica es mayor que 4dS/m. Contienen además de sodio, un pH desfavorable, un desbalance de iones esenciales (P, Fe, Zn, Mn, Bo), una estructura y textura alterada que reduce la aireación y la retención de agua.

La tolerancia de los rizobios a las sales varía mucho y de hecho las leguminosas y las plantas actinorríticas son más sensibles a la salinidad que la mayoría de las bacterias. Los hongos ectomicorríticos pueden incrementar la resistencia a la salinidad de leguminosas noduladas.

Fuentes de carbono y energía

Los rizobios introducidos en el suelo deben competir por los nutrientes del suelo. El uso eficiente de las fuentes naturales de carbono, energía y demás nutrientes, es de suma importancia para su persistencia. La **competencia saprofítica** es una de las cualidades que se les exige a las cepas para ser seleccionadas en la producción de inoculantes. Las leguminosas ejercen efectos estimulantes sobre la población de rizobios, a través de sus exudados y descamaciones de tejidos.

El agregado al suelo de sustratos orgánicos, como abonos de granja estimulan a los rizobios debido, tal vez, al efecto combinado de los nutrientes orgánicos e inorgánicos, modificaciones del pH, o aumentos en el nivel de CO₂ del suelo. Como regla general, en suelos fértiles los rizobios sobreviven por períodos considerables. Vincent (1977) informa de una disminución de 10 veces en número de *R. meliloti* luego de 14 años y un número variable de células se encontraron en suelo estéril, luego de más de 30 años.

Crozat *et al.* (1982) encontraron buena sobrevivencia de *R. japonicum*, una especie naturalmente ausente en suelos de Francia, con más de 10⁴ bacterias por gramo de suelo seco luego de 5 años, aun en ausencia de soja.

La sobrevivencia de la bacteria depende del nivel introducido y del nivel de la población nativa: si ésta es alta, el inóculo puede fallar debido a la mortandad natural y a la competencia con la población nativa por el alimento y el espacio.

Fertilidad del suelo

Las leguminosas noduladas presentan requerimientos mayores de nutrientes en relación a las fertilizadas con nitrógeno combinado. Esto ocurre con los elementos que se encuentran en la nitrogenasa y otros sistemas enzimáticos, como el **Mo, Fe, S, Cu, Mg, Co**. La fertilización con fósforo, potasio, azufre, microelementos, afectan la sobrevivencia del rizobio y la nodulación y FBN.

El **calcio** es un elemento que se requiere en alto nivel en leguminosas noduladas, sobre todo en las primeras etapas de la nodulación. Si el nivel es bajo, se inhibe el encurvamiento de los pelos y la nodulación. Al encalar suelos ácidos, el calcio agregado aumenta el pH, disminuyendo la solubilización de elementos tóxicos a altas concentraciones, como el Mn y el Al y se aumenta la solubilidad del Mo. Se incrementan también los bicarbonatos del suelo que favorecen el crecimiento del rizobio en vida libre.

El **fósforo** constituye un elemento necesario para la leguminosa y la FBN y como su disponibilidad es baja en muchos suelos agrícolas; la incorporación en la siembra es práctica corriente. Las micorrizas contribuyen a su absorción y las raíces de las leguminosas se encuentran muy micorizadas.

El **molibdeno** (Mo) es un elemento clave en la nitrogenasa, responsable de la transferencia de electrones de la reductasa de la nitrogenasa (Fe-proteína) hacia el N_2 . Su nivel puede ser limitante en suelos tropicales y es aconsejable incluirlo en una fertilización basal.

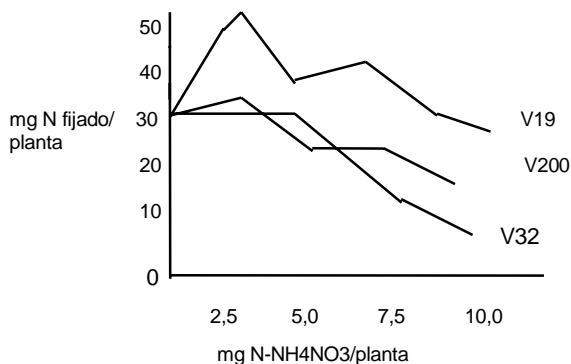
El **cobalto** (Co), **hierro** (Fe) y **magnesio** (Mg) son importantes en el funcionamiento de la nitrogenasa y para la planta, por lo que los requerimientos en leguminosas noduladas se incrementan.

El **nitrógeno combinado** afecta el desarrollo de los nódulos y la fijación del N_2 . Es bien conocida la inhibición de la nodulación por los iones nitrato o amonio, aunque las leguminosas difieren en la susceptibilidad a estos compuestos. Se citan numerosas experiencias en la bibliografía sobre los niveles mínimos de iones amonio que no inhiben a la nitrogenasa; en general, **40 mg/kg de $N-NH_4^+$** son tolerados, pero cantidades superiores a 100 mg/kg inhiben la fijación en la rizosfera, efecto que ha sido relacionado con inhibición en la producción de fitohormonas cerca del sitio de infección.

El crecimiento de los nódulos es más sensible al exceso de N que la nitrogenasa y ambos son más sensibles que la infección y los eventos iniciales de la nodulación. La figura 5 muestra la sensibilidad al amonio de algunas cepas de *R. leguminosarum* y la importancia de la selección de cepas que mantengan la fijación del N_2 en presencia de N-combinado.

Un exceso de nitratos disminuye la deformación de pelos capilares, la adhesión a sus paredes, el número de cordones de infección y aumenta el número de abortos de eventos iniciales de la infección. Uno de los mecanismos de inhibición podría ser por inactivación del ácido indol-acético (AIA), fitohormona involucrada en la colonización, por los nitritos producidos por reducción biológica de los nitratos. Los nitritos también inactivan a la leghemoglobina.

Figura 5- Efecto del nitrato de amonio en la fijación de N_2 de *Vicia atropurpurea* inoculada con varias cepas de rhizobio



El amonio es asimilado inmediatamente, pero el nitrato requiere un período de tiempo antes de ser asimilado, coincidente con su reducción por nitrato reductasas. El exceso de amonio, o de glutamina, reprime la producción y actividad de la nitrogenasa. Con alta disponibilidad de N en la parte aérea se disminuye el nivel de fotosintetizados que llegan al nódulo. Dreyfus y Dommergues (1981) encontraron *Sesbania rostrata*, leguminosa que produce **nódulos en raíces y tallos**, marcada inhibición de los nódulos radicales por la presencia de nitrato de amonio, pero los nódulos del tallo no fueron afectados y redujeron activamente el acetileno.

Esta planta posee una alternativa para evitar la inhibición de la nodulación radical y se amplía el conocimiento sobre especies de leguminosas y de plantas actinorríticas (simbiosis con *Frankia*) que pueden formar nódulos en tallos.

Interesa en muchos casos complementar el aporte de N por FBN con una fertilización con N combinado. Es necesario analizar el período de mayor fijación a los efectos de incorporarlo antes o después (evaluación actividades de nitrogenasa y nitrato reductasa). La inhibición por nitratos es afectada por la combinación rhizobio-leguminosa y la inoculación con distintas cepas afectó la actividad nitrato reductasa de hojas y tallos en *Lotus corniculatus* (Díaz *et al*, 1995). El empleo de

mutantes **nitrato-reductasa negativas**, incapaces de reducir nitratos, ofrecen la alternativa de seguir fijando N₂ en presencia de N-NO₃⁻

Polución

El uso indiscriminado de herbicidas, fungicidas, la acumulación de sales de metales pesados en suelos y aguas resulta perjudicial para el rhizobio. Se han descrito diversas técnicas de incorporación de biocidas a las semillas evitando su íntimo contacto con la bacteria. A pesar de la multiplicidad de resultados obtenidos, se piensa que los pesticidas aplicados en dosis aconsejadas no ejercen un efecto muy detrimento en el rhizobio.

De manera general, los fungicidas son más perjudiciales, seguido de los herbicidas y los insecticidas. Se seleccionan mutantes de rhizobio altamente efectivas en la fijación del N₂, resistentes a altos niveles de pesticidas, sobre todo a los fungicidas que son aplicados directamente sobre las semillas (capítulo 20).

Productos de la fotosíntesis

La fotosíntesis provee energía y poder reductor para la fijación del N₂ y los esqueletos carbonados para la formación de aminoácidos, amidas, etc., fuentes de nitrógeno para la leguminosa. Las leguminosas noduladas requieren iluminación adecuada para mantener una activa fijación. Son muy conocidos los experimentos que muestran las fluctuaciones de la actividad nitrogenasa de nódulos por cambios en la iluminación, o cuando se corta la parte aérea o se sombrean los cultivos.

Hardy y Havelka (1976) mostraron en original experimento que si se incrementa el nivel de CO₂ de la parte aérea de plantas de soja (requirieron envoltorios transparentes) la fijación del N₂ a los 40 días de la siembra se estimulaba más de 4 veces (evaluada por reducción del acetileno a etileno). Pero en la práctica resulta muy difícil regular el nivel de CO₂ sobre un cultivo, salvo manejando las densidades de siembra, la competencia entre plantas.

Con elementos marcados se ha mostrado la translocación de productos de la fotosíntesis hacia los nódulos: sacarosa, glucosa, ácidos orgánicos. Ryle *et al.* (1979) estudiando el costo respiratorio de la fijación del N₂ en soja, caupí y trébol blanco, encontraron mucha similitud en las tres leguminosas estudiadas: entre 6,3 y 6,8 mg C/mg N fijado. Consideraciones bioquímicas y teóricas indican que la reducción del N₂ a NH₃ resultaría de un costo mínimo respiratorio de unos 2 C / 1 N, excluyendo los gastos por la conversión del amonio en otros compuestos y aquellos involucrados en el desarrollo y mantención de los nódulos.

Si se consideran los costos de la FBN y el transporte, la cifra puede superar el **33% de los fotosintetizados** (Minchin *et al.*, 1981) que son translocados hacia los nódulos: un 5% se emplea en el desarrollo de los nódulos, un 12% se respira como CO₂ y un 15% se reexporta hacia el huésped con el N fijado.

Factores biológicos

Se han aislado de la rizosfera o del rizoplaneo cierto número de bacterias, hongos y sobre todo actinomicetes, que se muestran antagonicos frente al rhizobio *in vitro*. Este antagonismo puede deberse a competencia por los nutrientes, acidificación, producción de antibióticos u otras sustancias, y aun a la predación por protozoos o a la infección por fagos líticos (capítulo 13).

Muchas veces un inoculante desaparece en el suelo. La causa precisa, de origen biológico, es difícil de determinar. Una bacteria depredadora que lisa ciertas cepas de rhizobio ha sido identificada (*Bdellovibrio bacteriovorus*). Este parásito afecta a los rhizobios en el suelo cuando la densidad de la presa es alta. La población afectada puede aun mantenerse a niveles aceptables para nodular leguminosas (10⁴-10⁵ células/ml), de modo que las frecuentes desapariciones de rhizobios introducidos en el suelo, no pueden explicarse exclusivamente por las actividades de este microparásito.

Los **fagos líticos** fueron motivo de numerosos estudios, sobre todo en suelos donde las pasturas fracasaban en la nodulación luego del segundo año de instaladas. El problema de la decadencia de los alfalfares fue atribuido, en parte a la acción de estos parásitos intracelulares.

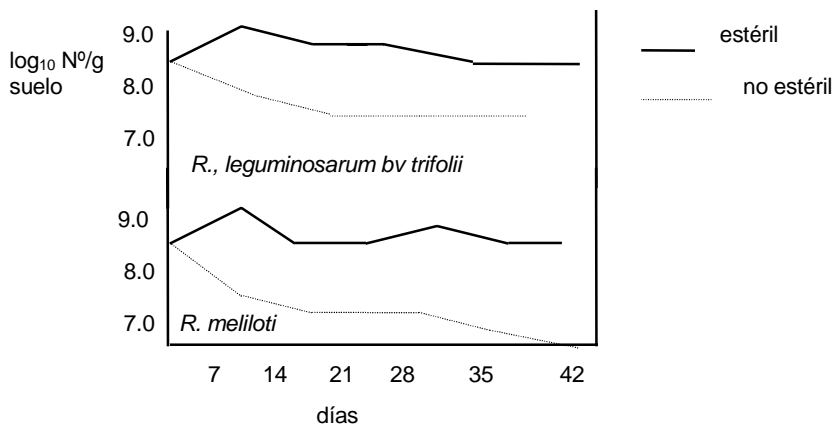
Las **bacteriocinas** constituyen un grupo de sustancias, sobre todo proteínas, péptidos, producidas por muchas bacterias que afectan a organismos muy relacionados, incluso de la misma especie, a

diferencia de los antibióticos, que poseen un espectro de acción más amplio. Las **rhizobiocinas** han sido descritas como elemento de lucha biológica que permite la supremacía de la célula productora frente a la población de rhizobios nativos del suelo. Para algunos autores serían partículas defectuosas de fagos, pues se parecen a las colas de ciertos virus de *E. coli*, y su síntesis está muchas veces mediatizada por plásmidos.

Distintos patógenos pueden afectar directamente a la FBN atacando nódulos (insectos) o indirectamente afectando el crecimiento de las plantas, como los nemátodos. La figura 6 muestra la sobrevivencia de *R. leguminosarum* bv *trifolii* y *R. meliloti* en suelo estéril y no estéril.

Se observa que estas bacterias mantienen alta densidad en suelo estéril y declinan lentamente en suelo no estéril, debido a interacciones biológicas. La selección de cepas buenas competidoras en los suelos donde va a ser empleada, es un requisito importante cuando se desea éxito en la colonización temprana de raíces de plántulas inoculadas.

Figura 6- Sobrevivencia de *R. leguminosarum* bv *trifolii* y *R. meliloti* en suelo estéril y no estéril



Inoculación de las leguminosas

La fijación biológica del nitrógeno por la simbiosis rhizobio-leguminosa compite económicamente con la fertilización nitrogenada. Si bien las gramíneas fertilizadas con nitrógeno producen más materia seca por su mayor eficiencia fotosintética, la siembra de leguminosas se incrementa en el mundo, ya sea por la calidad nutritiva de sus granos (soja, maní, leguminosas tropicales), por su aporte en forrajes y sobre todo cuando se desea recuperar suelos muy degradados.

En muchos suelos el nivel y la eficiencia de las cepas nativas pueden no ser los adecuados y la nodulación y la fijación del N₂ resultar insuficientes para satisfacer las demandas del cultivo.

Desde muy antiguamente se practica la **inoculación artificial** de las semillas o del suelo en donde se van a introducir las leguminosas. Esta técnica resulta imprescindible cuando se introducen nuevas leguminosas, sobre todo si son huéspedes de alta especificidad (*Trifolium*, *Medicago*, *Glycine*), cuando la población nativa es ineficiente o cuando la deficiencia en nitrógeno limita el desarrollo vegetal.

Requisitos para el éxito de la inoculación:

- que la semilla inoculada posea la bacteria adecuada en número suficiente
- que el método y las condiciones de inoculación permitan la sobrevivencia de las bacterias
- que las condiciones del suelo próximo a la semilla permitan la colonización de los rhizobios en la rizosfera, la formación de los nódulos y su funcionamiento efectivo.

Técnicas de inoculación

- **natural:** en la antigüedad, los agricultores mezclaban las semillas con tierra de plantíos de leguminosas, asegurándose la nodulación
- **inoculantes comerciales** productos con alta densidad de cultivos específicos de rhizobios en

diversos soportes, en general turba estéril. La dificultad en algunos países para obtener turbas de buena calidad, obliga a la búsqueda de sustitutos, como tierra de diatomeas, bagazo de caña, grava, etc.

Establecimiento de la necesidad de inoculación

La colección y selección de cepas de rhizobio puede resultar inútil si las leguminosas nodulan eficientemente con poblaciones nativas, situación frecuentemente encontrada en leguminosas tropicales, que nodulan con el mismo tipo de rhizobio o si el suelo contiene alto nivel de nitrógeno combinado. Date (1977) sugiere un ensayo simple de campo en parcelas con 3 tratamientos, para determinar la necesidad de inoculación:

1. **testigo sin inocular** para evidenciar la presencia y eficiencia de cepas nativas, **(T)**
2. **inoculada** con una cepa potencialmente eficiente y seleccionada en ensayos de invernáculo o que es empleada con éxito en otra región **(I)**
3. **fertilizada** con dosis óptimas de N inorgánico **(N)**, puede ser incluso inoculada, donde se logra el máximo desarrollo.

Ejemplos de resultados

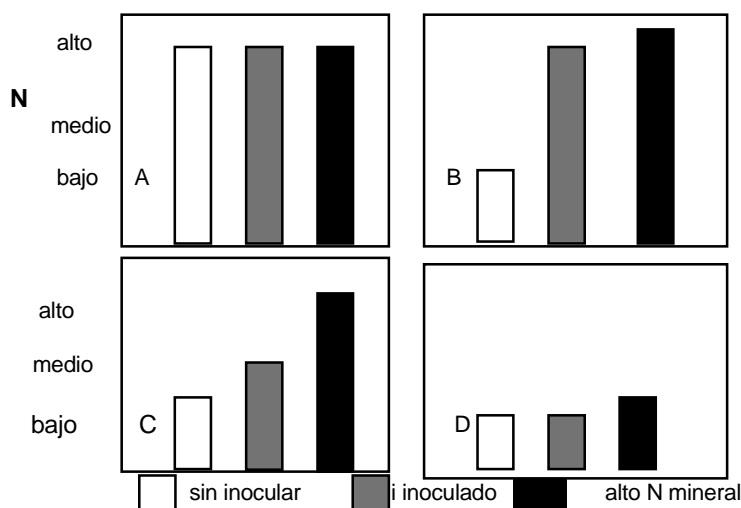
La figura 7 presenta algunas de las respuestas posibles.

- Rendimiento similar en los tres tratamientos y buena nodulación en los testigos, indica abundante y eficiente población nativa de rhizobios específicos para la leguminosa, no se aconseja la inoculación **(caso A)**
- Los testigos crecen pobremente y con nódulos inefectivos, mientras que los inoculados lo hacen bien y con abundante nodulación, indican buena respuesta a la inoculación **(caso B)**
- Poco desarrollo en el inoculado, pero buena respuesta a la fertilización, se supone que la cepa no es la adecuada o que la calidad del inoculante no es buena. En este caso es necesario plantearse una selección de cepas ya sea a partir de nódulos de buenas plantas de otras regiones y de cepas seleccionadas por centros de colección del país o del exterior **(caso C)**
- Falta de nodulación y pobre desarrollo vegetal en el testigo, indican carencia de rhizobios nativos y si no hay respuesta a los otros dos tratamientos se debe suponer que otros factores, excluyendo el N, como el P, S, Fe, etc. limitan el crecimiento vegetal **(caso D)**

Este mismo ensayo se emplea para evaluar el efecto de otros nutrientes, como por ejemplo, el fósforo o microelementos, mediante el diseño de parcelas divididas. El ensayo se instala en condiciones óptimas para el desarrollo vegetal, en general con una fertilización mínima basal.

Una vez establecida la necesidad de inoculación, se determina los **criterios para la selección de cepas** apropiadas para el huésped en cuestión. Las cepas usadas en los inoculantes deben ser cuidadosamente seleccionadas y mantenidas, deben probarse anualmente para minimizar las posibilidades de cambios en las propiedades simbióticas (Labandera, Vincent, 1975).

Figura 7- Ensayo de campo para determinar la necesidad de inoculación de leguminosas



Cualidades de una cepa de rhizobio para su recomendación en la fabricación de inoculantes:

- **efectividad en la fijación del N₂**, la más importante de las propiedades, las cepas deben superar significativamente al testigo (**T**) en ensayos de laboratorio, invernáculo y campo.
- **competencia en la rizosfera o** competencia saprofítica, le permite a la bacteria soportar las condiciones físico-químicas del medio, emplear eficientemente los nutrientes disponibles y lograr imponerse a la población nativa.
- **otros requisitos: infectividad** o sea buena capacidad para formar nódulos rápidamente, **adaptación a circunstancias especiales**, como bajos pH, tratamientos pesticidas, salinidad, capacidad para nodular a bajas temperaturas, con altos niveles de nitrógeno combinado, etc.
- **hidrogenasa**: le permite reciclar el H₂ liberado en la FBN, derivando los electrones liberados hacia la nitrogenasa.
- **rápido crecimiento en medios de cultivo simples** y la sobrevivencia en los soportes más empleados, son importantes ventajas que facilitarán la preparación de inoculantes.
- **estabilidad genética**, que no sufra frecuentes mutaciones en la conservación en el laboratorio.

En la recomendación de inoculantes se pueden dar alternativas:

- aconsejar el uso de **varios inoculantes**, cada uno con una cepa altamente efectiva para especies individuales
- empleo de cepas de "amplio espectro" que fijan N₂ con amplio rango de leguminosas
- aconsejar el uso de inoculantes con varias cepas, o **polivalentes**, que incluyan a las mejores cepas para cada especie del huésped.

La tendencia en general es a la producción de inoculantes con cepas de **amplio espectro**, de utilidad en vastas regiones del país e incluso a nivel regional. Esta práctica evita también la introducción de muchas cepas que con el tiempo se pueden volver ineficientes, pero manteniendo su infectividad, se comportan casi como **parásitas**. Pueden presentarse situaciones en las que se justifica la producción de inoculantes a nivel local, cuando las características de la zona y la importancia de las variedades empleadas así lo justifiquen.

La inoculación puede resultar imprescindible cuando se desea introducir una variedad o un cultivo nuevo en una región. Resulta de importancia seleccionar cepas eficientes a partir de los **rhizobios nativos**, bien adaptados a las condiciones ecológicas de la región.

La tarea de **extensión** es muy importante y el productor debe conocer los beneficios que redundan de una buena inoculación.

Respuesta a la inoculación

- **población nativa de rhizobios es escasa o nula** o ineficiente, se obtienen en esta situación muy buenos resultados. Esto ocurre con el cultivo de soja en suelos sin historia previa y donde se inocula en un casi 100% pues *B. japonicum* no se encuentra o está presente en niveles bajos.
- **población nativa de cepas específicas de eficiencia moderada**, resulta muchas veces difícil incrementar los rendimientos por inoculación.
- **alta población nativa con baja especificidad**, como ocurre con cultivos de leguminosas tropicales arbóreas que nodulan con el mismo tipo de rhizobio, de baja especificidad (Turk *et al*, 1993). Este es el caso del maní, que presenta abundante nodulación nativa en amplias regiones del centro de Argentina. La selección de cepas más eficientes entre las nativas, bien adaptadas a la zona y una inoculación masiva puede redundar en incrementos en este importante cultivo oleaginoso.

El cuadro 8 (Frioni, 1985) presenta los resultados de un ensayo de campo donde se observa abundante nodulación de las parcelas testigo, reflejo de la alta densidad de cepas nativas. En la cosecha, se apreció efecto positivo de la inoculación en el peso de cajas y en la producción de N.

Uso de los inoculantes

Los aspectos relacionados a la selección de cepas para recomendar en un inoculante para leguminosa, el cultivo del inóculo y la formulación de distintos tipos de inoculantes es tratado en el **Anexo Práctico**, así como prácticas referentes al control de calidad de estos productos biológicos. Los principales puntos a tener en cuenta al inocular una leguminosa son:

Cuadro 8- Inoculación en maní (*Arachis hypogaea*, L) en Río Cuarto, Argentina (cosecha: 150días)

tratamiento peso cajas grano N% kgN/ha
 kg/ha

testigo	2.115b	1.379b	4,77	65.76b
urea 70kgN/ha	3.590a	2.342a	4.34	101,64a
M-4	2.853a	1.822a	4,74	86,36a
M-13	2.679a	1.500ab	4,61	69,56a
M-10	2.673a	1.560ab	4.62	72,07a

Dos o más tratamientos señalados por la misma letra no difieren por Tuckey al 5%.
M-4, M-10 y M-13 son aislamientos de la zona

- **empleo de inoculantes a base de turba** que aseguran buena sobrevivencia en la semilla hasta la germinación. La esterilidad de la turba permite extender los plazos de vencimiento (cuadro 9, Vincent, 1974). Las formas pildorizadas que emplean adhesivos como goma arábica o derivados celulósicos, para lograr mayor contacto con la semilla, que se recubre con carbonato de calcio y fosfato de roca, mejoran la inoculación.
- **biocidas y fertilizantes:** asegurarse que las semillas no hayan sido tratadas con sustancias tóxicas y fertilizantes y que los recipientes empleados en la inoculación están libres de aceites, petróleo, metales pesados, etc.
- **conservación:** mantener el inoculante en ambiente fresco, en lo posible en el refrigerador hasta su uso. No emplear inoculantes vencidos
- **inoculación y siembra simultáneas:** sembrar lo más pronto posible luego de la inoculación, y si se pildorizó, no más de unos días después
- **condiciones de siembra :** sembrar en suelo húmedo y si la temperatura es muy alta, hacerlo al final de la tarde

Fijación de nitrógeno por leguminosas

La cantidad de nitrógeno tomada por una leguminosa varía considerablemente con la especie, la efectividad de la simbiosis, las condiciones del ambiente, del manejo, etc.

El cuadro 10 presenta valores sobre la fijación en diferentes especies. La cantidad derivada del aire varía y representa en general un 50% del total en suelos fértiles, es mayor en suelos deficientes y menor con fertilización nitrogenada. En asociaciones con gramíneas la proporción derivada de la fijación puede llegar al 80 o 90% pues el cultivo asociado toma la mayoría del nitrógeno disponible en el suelo.

Cuadro 9 - Efecto de la esterilización de la turba en la sobrevivencia de rhizobio (x 10⁶/g), luego de 4 y 26 semanas

Cultivo	4 semanas			26 semanas		
	A	B	C	A	B	C
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv trifolii</i> TA1	660	990	110	6	79	2,8
<i>R. meliloti</i> SU47	1500	1800	697	180	170	5,3
<i>Bradyrhizobium</i> CB 756	1100	1200	16	25	190	1,0
A= esterilización en autoclave B= esterilización por rayos gama C= turba no estéril						

El N de las leguminosas puede transferirse a otros cultivos en mayor o menor grado por las siguientes vías:

- **excreción de compuestos nitrogenados** por los nódulos y raíces

- **pastoreo animal**
- **descomposición de parte aérea de la planta.**

Se citan valores de N% en distintas partes de una leguminosa, evaluado en floración o hacia el final de ésta: hojas (2,6-5,0); tallos (1,2-1,8), raíces (1,6-2,4), nódulos (3,9-6,5), vainas (3,1-4,2) y en la planta entera en leguminosas tropicales (2,0-3,0), de acuerdo a Henzell y Vallis (1977).

Perspectivas

Algunos de las prioridades en la investigación en el tema se pueden resumir:

- conocer las potencialidades de las **poblaciones nativas de rhizobio** y seleccionar entre ellas las más aptas para ser empleadas en los inoculantes (Baraibar y col, 1999)
- incorporar **leguminosas no tradicionales** en ensayos de adaptación como forrajeras perennes: *Desmodium intortum*, *D. incanum* (Crosa y col, 1999), *Leucaena leucocephala*, *Loteniz bainesii*, *Noenotonia wightii*, *Macroptilium atropurpureum*
- extender las investigaciones sobre la fijación del N₂ en **leguminosas arbóreas**, importantes en la fijación de suelos arenosos, erosionados, con incremento del nivel de materia orgánica (Dommergues, 1994a, Frioni *et al*, a y b, 1998, Frioni *et al*, 2001, Subba Rao y Rodríguez-Barrueco, 1993).
- estudiar **leguminosas indígenas**, bien adaptadas a determinadas zonas ecológicas, pero no explotadas a nivel agrícola (Izaguirre-Mayoral *et al*, 1992)
- evaluar la simbiosis triple: leguminosa-rhizobio-hongo micorrítico
- **mejorar genéticamente** a los diazotrofos: el aumento de la efectividad de los sistemas existentes se puede alcanzar manipulando los genes **nif** responsables de la fijación del N₂, construyendo nuevos organismos fijadores por transferencia de los genes (Martínez *et al*, 1990).
- seleccionar **mutantes de rhizobios** que pueden fijar N₂ en presencia de **altos niveles de N-combinado** y con una **hidrogenasa funcional** que le permita reciclar los ATP, permiten mayores rendimientos en la fijación.
- aumentar la eficiencia en la **toma de metales** como el Mo y el Fe, constituye un carácter que puede mejorarse
- seleccionar **genotipos del huésped** por su mayor actividad reductora del acetileno en presencia de una mezcla comercial de cepas de rhizobio que transmiten este carácter a su progenie.
- transferir **genes nif** a mitocondrias o cloroplastos vegetales es otra de las aspiraciones de los genetistas. Se piensa que los **nif** penetran en los vegetales frecuentemente por heridas o llevados por parásitos. El problema radica en el mantenimiento de estos genes y su funcionamiento dentro del organismo superior. Se piensa también en su introducción en microorganismos del **rumen**.
- obtener **híbridos por fusión somática**: células de una hoja pueden ser inducidas a fusionarse y regenerar plantas completas. Está en la especulación de muchos científicos producir un cereal que forme nódulos fijadores de N₂.

Pero, muy acertadamente, Postgate (1981) señala las consecuencias de una alteración tan brusca de los sistemas simbióticos naturales. Los especialistas del ambiente temen que malas hierbas exuberantes, fijadoras del N₂, alteren el equilibrio biológico. Otros elementos, además, pasarían a ser limitantes: P, K, S, e incluso el CO₂.

Sería también peligrosa la propagación de microorganismos patógenos con genes **nif**.

Sin embargo, todos estos llamados de atención no pueden detener las investigaciones sobre aspectos vinculados a la **FBN**, ante la necesidad de alimentar a la creciente población mundial. El cuadro 11 (Dommergues, 1994b) resume algunas de estas ideas.

**Cuadro 10 - Nitrógeno fijado por leguminosas (kg/ha/año)
Forrajes**

templadas	
<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	177
<i>Trifolium platense</i> (trébol rojo)	115
<i>Trifolium repens</i> (trébol blanco)	149
legum.consociadas (pradera mixta)	125
<i>Melilotus alba</i> (trébol de olor, blanco)	104
<i>Medicago polymorpha</i> (trébol carretilla)	63
<i>Trifolium subterraneum</i> (trébol subterráneo)	24
<i>Lotus corniculatus</i> (cuernecillo)	27
tropicales	
<i>Centrosema pubesens</i> (centro)	112
<i>Stylosanthes guianensis</i>	115
<i>Neonotonia wightii</i>	160-450
Leguminosas de grano	
templadas	
<i>Vicia</i>	57-190
<i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto)	46
<i>Lupinus</i> sp.. (lupino)	128
tropicales	
<i>Vigna unguiculata</i>	35-77
<i>Glycine max</i> (soja)	17-124
<i>Arachis hypogea</i> (mani)	33-117

Cuadro 11 - Estrategias para optimizar la fijación del N2

1. Selección de la planta huésped

criterios de selección

- alto potencial de fijación de N2 en simbiosis
- crecimiento rápido
- raíces profundas
- competencia interespecífica reducida
- tolerancia limitaciones del ambiente: salinidad, sequedad
- nodulación aérea (en casos específicos)

métodos de selección

- manejo para incrementar la FBN
- ensayos de orígenes o individuos y su propagación vegetativa,
- elección de las mejores combinaciones:
rhizobio-leguminosa, *Francia* - no-leguminosa
- transferencia de genes

2. Selección de cepas compatibles de *Rhizobium* o *Frankia*

criterios de selección

- alta efectividad
- habilidad competitiva
- tolerancia a limitantes del medio
- capacidad de afectar la fisiología de la planta

métodos de selección

- estudios en cepas salvajes
- construcción de nuevas cepas

inoculación

- cultivo de rhizobio o frankia
- procesamiento de inoculantes

3. Levantamiento de limitantes

sequía

- irrigación

deficiencia de nutrientes

- fertilización y micorrización

factores biológicos desfavorables

- control químico (pesticidas) o control biológico
- esterilización (solarización)

Bibliografía

- ALLEN, O. N. y E. K. ALLEN, 1981, **The Leguminosae, A source book of characteristics, uses and nodulation**, The Univ. of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin.
- ARIAS, A; A. GARDIOL y G. MARTINEZ-DRETS, 1982, Transport and catabolism of D-mannose in *Rhizobium meliloti*, J. of Bact., 151 (3): 1069-1072.
- BARAIBAR, A., L.FRIONI, M.E. GUEDES and H. LJUNGREN. 1999 Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* population in Uruguay **Pesq. Agrop. Bras. Brasilia** 34(6): 1011-1017
- CORBY, H.D.L. 1988 Types of rhizobial nodules and their distribution among the *Leguminosae*, Kirkia 13: 53-123
- CROSA, M.; OLIVEIRA C. GOYENOLA, R. y L. FRIONI, 1999 Comportamiento simbiótico en *Desmodium incanum* en Uruguay. **Agrociencia**, vol III, N° 1: 38-43
- CROZAT, Y.; J. C. CLEYET-MAREL; J.J. GIRAUD y M. OBATON, 1982: Survival rates of *Rhizobium japonicum* populations introduced into different soils, Soil Biol. Biochem., 14 (4): 401-405.
- DANSO, K. A., 1977: The ecology of *Rhizobium* and recent advances in the study of the ecology of *Rhizobium*, en **Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics**, Ayanaba y Dart (eds.), Wiley & Sons, Nueva York: 115-125.
- DATE, R. A., 1977: The development and use of legume inoculants, en **Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics**, Ayanaba y Dart (eds.), Wiley & Sons, Nueva York: 169-180.
- DE BRUIJN, F. J. 1996 Monitoring of indigenous *Rhizobium* strains via ERIC PCR and DNA fingerprinting, en World J. of Microb. & Biotech 11: 163-174
- DIAZ, P., O. BORSANI y J. MONZA 1995 Effect of inoculation and nitrate reductase activity and acetylene reduction activity in *Lotus sp.-Rhizobium loti* symbiosis. Symbiosis, 19: 53-63
- DOMMERGUES, Y. 1994a The benefits and limitations of the use of N₂-fixing trees in African forestry and agroforestry. Proc. 6th. Conference African Association for Biological Nitrogen Fixation, Harare, Zimbabwe, set
- DOMMERGUES, Y. 1994 b Interacciones entre microorganismos y plantas. Curso Facultad de Agronomía-PEDECIBA, Montevideo
- DREYFUS, B.Y. y Y. DOMMERGUES 1981 Non-inhibition de la fixation d'azote atmosphérique par l'azote combiné chez une légumineuse à nodules caulinaires, *Sesbania rostrata*, C.R. Acad. Sc. Paris, 291, serie D: 767-770
- ELKAN, G. H. (ed.), 1987: **Symbiotic Nitrogen Fixation Technology**, Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- ELKAN, G.H. 1992 Taxonomy of the rhizobia. Can. J. Microbiol. 38: : 446-450
- FRIONI, L. 1985 Simbiosis rizobio-maní. Ciencia del Suelo (1-2): 61-67
- FRIONI, L. 1990 **Ecología Microbiana del Suelo**, Ed. Univ. de la República, Montevideo, 517 pp.
- FRIONI, L., R. DODERA, D. MALATES and I. IRIGOYEN 1998 An assessment of nitrogen fixation capability of leguminous trees in Uruguay Applied Soil Ecology 7: 271-279
- FRIONI, L., D. MALATES, I. IRIGOYEN and R. DODERA 1998 Promiscuity for nodulation and effectivity in the N₂-fixing legume tree *Acacia caven* in Uruguay, Applied Soil Ecology 7: 239-244
- FRIONI L.; A.. RODRÍGUEZ and M. MEERHOFF. 2001 Differentiation of rhizobia isolated from native legume trees in Uruguay. Applied Soil Ecology 16: 275-282
- GRAHAM, P. H. J., 1975: **Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants**, Nutman (ed.), Cambridge Univ. Press.

- GRAHAM, P.H., M.J. SADOWSKY, S.W. TIGHE, J.A. THOMPSON, R.A. DATE, J.G. HOWIESON Y R. THOMAS, 1995 Differences among strains of *Bradyrhizobium* in fatty acid-methyl ester analysis. Can J. of Microbiol. 41(11):1038-1042
- HARDY, R. W. F. y V. D. HAVELKA, 1976: Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes, with emphasis on soybeans, en: **Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants**, Nutman (ed.), Cambridge Univ. Press: 421-439.
- HENZELL, E. F. y I. VALLIS, 1977: Transfer of nitrogen between legumes and other crops, en **Biological Fixation in Farming Systems of the Tropics**, Ayanaba y Dart (eds.), Wiley & Sons, Nueva York: 73-88.
- IRISARRI, P. , F. MILNITSKY, J. MONZA y E. J. BEDMAR 1996 Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from uruguayan soils, Plant and Soil 180: 39-47
- IZAGUIRRE-MAYORAL, M.L., O. CARBALLO, S. FLORES, M.S. de MALLORCA y T. OROPEZA 1992 Quantitative analysis of the symbiotic N₂-fixation, non-structural carbohydrates and chlorophyll content in sixteen native legume species collected in different savanna sites. Symbiosis 12: 293-312
- JARDIM FREIRE, J. R., 1982: Research into the *Rhizobium*-Leguminosae symbiosis in Latin America, Plant and Soil, 67: 227-239.
- KONDOROSI, A. 1991 Overview on genetic of nodule induction: Factors controlling nodule induction by *Rhizobium meliloti*, en: **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions**. H.Nennecke y D.P.S. Verma (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda: 111-118
- KRIEG, N. R. y J. C. HOLT, 1984: Family III *Rhizobiaceae*, en **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 1, Williams & Wilkinson, Baltimore-Londres: 234-245.
- LABANDERA, C. y J. M. VINCENT, 1975: Loss of symbiotic capacity in commercially useful strains of *Rhizobium trifolii*, J. App. Bact., 39: 209-211.
- MARTINEZ, E., D. ROMERO y R. PALACIOS 1990 The *Rhizobium* genome. Plant Sciences, vol 9: 59-93
- MARTINEZ, E., D. ROMERO y J. CABALLERO-MELLADO, 1996 *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. Crit. Rev. Plant Sci. 15(2):113-140
- MINCHIN, F. R. , R. J. SUMMERFIELD, P. HARDYLEY, E. H. ROBERTS y S. RAWSTHORNE , 1981 Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. Plant, Cell & Environmental 4: 25-26
- PALOMARES, A. J. y C. CORONADO 1992 Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa: El proceso de nodulación, en: **Interacción Planta-Microorganismo, Biología del Nitrógeno**, González López, J y C. Lluch Pla (eds) Editorial Rueda, Madrid
- POSTGATE, J. R., 1981, **Fijación de Nitrógeno**, Cuadernos de Biología, Omega, Barcelona.
- RYLE, G.J.A., C.E. POWELL y A.J. GORDON 1979 The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea and white clover J. Exp.Bot. 30:135-144
- SAGARDOY, M. 1979: Supervivencia de *Rhizobium meliloti* nativo en suelos franco arenosos, en Agrochimica, XXIII (1): 59-65.
- SIQUEIRA, J. O. y A. A. FRANCO 1988 **Biotecnología do Solo, Fundamentos e Perspectivas**, MEC_ESAL-FAEPE-ABEAS, Brasília
- SINGLETON, P.W., B.B. BOHLOOL y P.I. NAKAO 1992 Legume response to rhizobial inoculation in the tropics: Myths and Realities, en: **Myths and Science of Soils in the Tropics**, SSSA Special Publication nº 29, 135-155
- SCHUBERT K.R. y EVANS, H.J. 1976 Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulating symbionts, Proc. Nat. Academy Sci. 73: 1207- 1211
- SPRENT, J.I. y P. SPRENT 1990 **Nitrogen Fixing Organisms-Pure and Applied Aspects**, Chapman y Hall, London 256 pp

- SUBBA RAO, N. S. y C. RODRIGUEZ-BARRUECO 1993 **Symbioses in Nitrogen-Fixing Trees**, Subba Rao y R.Barrueco (eds) Oxford & IBH Publishing Co. New Delhi
- TRIPLETT, E. W. y M. J. SADOWSKY 1992 Genetic of competition for nodulation of legumes, *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 399-428
- TURK, D., H.H. KEYSER y P.W. SINGLETON 1993 Response of tree legumes to rhizobial inoculation in relation to the population density of indigenous rhizobia. *Soil Biol Biochem* 25, pp:75-81
- VINCENT, J. M., 1975: **Manual de Rhizobiología**, Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- VINCENT, J. M. 1977: *Rhizobium*: general microbiology, en **A Treatise on Dinitrogen Fixation**, vol III (Biology), Hardy y Silver (eds.), Wiley & Sons, Nueva York: 227-354.
- VINCENT, J. M. 1982 **Nitrogen Fixation in Legumes**, Academic Press, Londres en *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol 1: 65-84.

Capítulo 16

Simbiosis fijadoras de nitrógeno en no leguminosas Asociaciones con *Frankia* spp

Las raíces que presentan nódulos fijadores del N₂ en sus raíces, pertenecen a unas 10 familias de las Espermatófitas. La mayoría de ellas, unas 1.100 especies, pertenecen a la gran familia de las *Leguminosae*, de amplia distribución mundial. La mayoría, como vimos en el capítulo anterior, son árboles o matas, originadas en el trópico y distribuidas luego a otras zonas. De sus casi 1.280 especies, sólo un 10% ha sido examinado por la presencia de nódulos con rhizobios sobre todo aquellas de interés agrícola, como alfalfa, soja, tréboles, maní.

Pero existe otro grupo muy abundante de plantas no pertenecientes a las leguminosas, que presentan nódulos radicales fijadores de N₂ y que contribuyen a la economía de este elemento en zonas erosionales, en suelos pobres, en donde se desarrollan como vegetación pionera. De acuerdo a la naturaleza del microsimbionte, o endofito, estas plantas se pueden agrupar en 3 categorías (Akkermans y Van Dijk, 1981):

- con nódulos tipo *Alnus*, con actinomicete del género *Frankia*
- con nódulos tipo *Parasponia*, con rhizobio como simbiote
- con nódulos tipo *Cycas*, con *Nostoc* y *Anabaena* (cianobacterias).

Describiremos brevemente los últimos dos grupos, para desarrollar más extensamente las asociaciones con *Frankia*.

Nódulos tipo *Cycas*

Las *Cycadales* son consideradas gimnospermas primitivas, reliquias de una flora tropical muy antigua: su origen se ubica en los períodos Triásico, Jurásico y Cretáceo. Se piensa que jugaron importante rol en el ciclo del nitrógeno de esas épocas. De las 90 especies actuales (9 géneros), sólo algunas, como *Macrozamia*, se desarrollan en Australia a un nivel suficiente como para intervenir activamente en el ciclo del nitrógeno. No han sido muy estudiadas y muchos aspectos relativos al proceso de infección y a la naturaleza de la especificidad hospedante-endofito, no han sido aclarados.

Desarrollo y estructura de los nódulos: se parecen superficialmente a los de no-leguminosas angiospermas, pero su formación y estructura varían. Se originan a partir de raíces especializadas, llamadas **coraloides**, que presentan estructuras del tipo nodular aún antes de ser colonizadas por la cianobacteria, inducidas posiblemente por bacterias. Los nódulos se inician en la raíz embrional y el hipocótilo y recién luego de su emergencia son infectados por cianobacterias heterocísticas de los géneros *Nostoc* y *Anabaena*, por rupturas de los estratos superficiales.

Las raíces coraloides se desarrollan en forma de grandes racimos y pierden su característico geotropismo negativo. Las raíces no infectadas permanecen pequeñas y mueren en el correr del año. Todos los aislamientos mostraron capacidad para fijar N₂.

En Argentina, Tortosa y Medán (1983) observaron nodulación en ejemplares de *Cyca revoluta* cultivada en parques y jardines. La fijación en cultivos de *Cycas* spp. y *Macrozamia* spp se realiza tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Los productos de la fijación son transportados al hospedante y se piensa que gran parte es exudado por el endosimbionte, a diferencia de lo que ocurre con las cianobacterias en vida libre. Las causas de mayor exudación podrían deberse a:

- mayor actividad nitrogenásica del endosimbionte
- una capacidad limitada para almacenar nitrógeno como ficocianina

Nódulos tipo *Parasponia*

Hasta no hace mucho tiempo se pensaba que los rhizobios formaban nódulos solamente con leguminosas. En 1973, Trinick describió nodulación en ciertas *Ulmaceae*, por rhizobios. Son árboles muy altos, ampliamente distribuidos en el trópico, identificados primeramente como del género *Trema*, como *T. cannabina*, cuyo endofito bacteriano logró infectar varias leguminosas.

Estudios posteriores mostraron que estos especímenes estaban incorrectamente identificados y que pertenecen en realidad al género *Parasponia*, sobre todo *P. rugosa*. *Parasponia* es nativa del sudeste asiático, son árboles más chicos, de hasta unos 15 m, pioneros en suelos de montaña de Malasia, Indonesia y Nueva Guinea. Tres especies presentan nódulos: *P. rugosa*, *P. parviflora* y *P. andersonii*, empleadas desde muy antiguo como abono verde en Java. El endosimbionte se identificó como *Bradyrhizobium spp.* de crecimiento lento, el más promiscuo y tal vez el más antiguo de los rhizobios, que inocula cruzado como *Vigna unguiculata*. Los nódulos de *Parasponia* fijan nitrógeno en rangos comparables a los nódulos perennes de otras no leguminosas (Akkermans y Van Dijk, 1981).

Diferencias con nódulos de las leguminosas:

- el rhizobio se encuentra preferencialmente dentro de un cordón de infección altamente ramificado y **pocas bacterias se liberan de él y se diferencian en bacteroides**. En las leguminosas, la mayoría de los rhizobios se transforman en bacteroides.
- los nódulos de *Parasponia* **no poseen leghemoglobina**, lo que muestra claramente que tanto la formación de bacteroides como la síntesis de leghemoglobina, están determinados por el hospedante. La masa coraloide puede alcanzar tamaños de hasta 6 cm de diámetro y se parecen más a los nódulos actinorríticos de *Coriaria* o *Datisca* que a los de las leguminosas.
- la zona infectada suele presentar forma de herradura, donde coexisten células hipertrofiadas, con la bacteria y células menores, libres de endofito. Pueden presentarse capas con células oscuras, posiblemente con compuestos polifenoles y taninos.

Parasponia, como *Casuarina* y árboles leguminosos crecen rápidamente en suelos vírgenes del sudeste de Asia y juegan importante papel en la reforestación de suelos erosionados, donde son empleados desde muy antiguamente.

Aunque es improbable que la nodulación ocurra en *Trema*, se requieren otros estudios sobre la fijación del N₂ en otros miembros de las *Ulmaceae*.

No leguminosas noduladas con *Frankia*

Las simbiosis noduladas por un actinomicete del género *Frankia* se presentan en unas 170 especies distribuidas en 8 familias poco relacionadas entre sí. Estas asociaciones recibieron diferentes nombres: simbiosis tipo *Alnus*, simbiosis con actinomicetes y más recientemente **actinorrizas**, por analogía con las micorrizas (simbiosis con hongos).

El cuadro 1 (Akkermans y Van Dijk, 1981) presenta los géneros de plantas actinorríticas descritos hasta el presente. Son frecuentemente árboles o arbustos que juegan importante rol en la economía del nitrógeno en bosques de zona templada. Su distribución es menor en la región tropical. Estas plantas son raramente mencionadas en los textos básicos de biología o ecología, a pesar de que son importantes componentes de ecosistemas de vastas regiones y muchas de ellas muy empleadas en forestación. Esta vegetación es tolerante a suelos de baja fertilidad, como dunas arenosas, zonas quemadas, suelos erosionados y muchas resisten la salinidad.

Cuadro 1 - Ocurrencia de nódulos tipo *Alnus*

orden	familia	Nºtotal gén/flia	género fijador	Nºtotal spp c/nódulo	Nºspecies s/nódulos	
Casuarinales	Casauriaceae	1	Casuarina	45	18	0
Coriales	Coariariaceae	1	Coriaria	15	13	0
Fagales	Betulaceae	2	Alnus	35	33	0
	Fagaceaea	8	-	+/-400	0	0
Cucurbitales	Cucurbitaceae	126	-	>1280	0	0
	Begoniaceae	5	-	> 500	0	0
	Datisceaeae	3	Datisca	2	2	0
	Caricaceae	5	-	65	0	0
Myricales	Myricaceae	2	Myrica	35	20	0
			Componia	1	1	0
Rosales	Rosaceae	124	-	+/-3375		
			Rubus	>200	1	3
			Dryas	4	3	0
			Cercocarpus	20	3	0
Rhamnales	Eleagnaceae	3	Eleagnus	45	14	0
			Hippphae	3	1	0
			Sphepherdia	3	2	0
	Rhamnaceae	58	Ceanothus	55	31	0
			Trevoa		1	0
			Discaria	10	5	2
			Colletia	17	3	0

La figura 4 del Anexo Práctico, muestra un nódulo coraloide de *Casuarina*. Todas las actinorrizas albergan bacterias pertenecientes a un mismo género, un actinomicete simbiótico del género *Frankia* (figura 2), fijador de N₂ que fue confundido primeramente con un hongo, por su carácter filamentosos. Quizá la primera descripción de nódulos radicales en estas plantas se remonta a 1895 en *Alnus glutinosa*, cuyo desarrollo y N en el follaje se correlacionaron con el número de nódulos.

El empleo del N¹⁵, demostró la importancia ecológica de estas asociaciones, acelerando sucesiones vegetales en suelos pobres. Estos árboles son empleados en silvicultura, en planes de forestación, en sistemas agroforestales, contribuyendo a incrementar el nivel de nitrógeno de los mismos.

Las plantas del cuadro 1 se incrementarán seguramente en los próximos años, con la contribución de botánicos, fisiólogos vegetales, ingenieros forestales. Se observa un rápido desarrollo en los estudios sobre estas asociaciones, y es necesario un trabajo cooperativo de distintos países para lograr un panorama global sobre la distribución y contribución de estas plantas.

De los datos recogidos en el cuadro 1 se puede observar que la nodulación está aparentemente relacionada a la posición taxonómica del hospedante, y a veces es una característica de todas las especies de un mismo género, aunque las excepciones son frecuentes, sobre todo en las *Rosaceae*, con pocas especies noduladas. Se podría pensar también que la nodulación puede ocurrir en aquellos géneros aún no estudiados. Un ejemplo de esto es el descubrimiento de actinorrizas en *Trevoa*, miembro de *Colletieae* (Rundel y Neel, 1978) y en *Datisca glomerata* (Chaudhary, 1979) relacionada a *D. cannabina*, aunque de distribución geográfica muy diferente.

Silvester (1977) realiza una minuciosa descripción sobre el origen en el tiempo geológico de estos vegetales nodulados, ubicándolos en el período cuaternario. Actualmente ocurren en áreas templadas y algunas en la zona circumpolar. Las que se encuentran en zonas tropicales, lo hacen sólo a altas latitudes, como *Coriaria*, en N. Guinea y Perú, *Cercocarpus*, en Méjico y *Alnus*, en Perú. La excepción la constituye *Casuarina*, que se extiende en zonas costeras tropicales del Océano Pacífico y del Indico. Esta distribución contrasta con la de las leguminosas (tropical y templada cálida).

Usos, el empleo que se les da a estas plantas es variable:

- muchas especies de *Alnus* pueden alcanzar 30-35 m en 50 años con diámetros de 0,6 m y se emplean en **muebles, postes, enchapados**, y en la preparación de pulpas para la elaboración de tejidos
- *Casuarina* se emplea también para **postes** y es rica en energía y se usa como **leña**. Pueden alcanzar 4 a 5 m en 2 años
- como **alimento** se usan poco: *Hippophae* da frutas ricas en vitamina C y en aceite y suele complementar la dieta humana
- *Ceanothus* y *Purshia*, como **forraje** en la alimentación de ciervos

- otras especies poseen **uso medicinal**, como astringentes, febrífugos, estimulantes o hipnóticos: *Myrica*, *Colletia*.
 - pero el empleo más promisorio es sin duda el de la **recuperación de suelos erosionados, la fijación de dunas y su inclusión en sistemas silvopastoriles** ya que brindan abrigo y sombra a los animales, además de brindar N fijado a la pastura asociada
- Tortosa y Medán (1983) identificaron nódulos actinorríticos en 10 especies de la flora autóctona argentina (Cuadro 2). Aislamientos de *Frankia* a partir de *C. spinosissima* de la zona del embalse del Río Tercero (Córdoba) se mostraron activos fijadores de N₂ (Guathier *et al.*, 1984).

Cuadro 2 - Especies actinorríticas argentinas

<i>Betulaceas</i>	<i>Alnus acuminata</i> H.B.K.	Castellanos, 1944		
<i>Ramnaceas</i>	<i>Colletia paradoxa</i> (Spreng)	Medán, Tortosa 1976		
	<i>Colletia spinosissima</i> Gmel	"	"	"
	<i>Discaria americana</i> Gill et	"	"	"
	Hook	"	"	"
	<i>Discaria chacaye</i> (G.Don) Tort.	"	"	"
	<i>Discaria nana</i> (Clos) Weberb	"	"	"
	<i>Discaria trinervis</i> Hook et Am.	"	"	"
	<i>Kentrothamnus</i>	"	"	1981
	<i>weddellianus</i> (Miers)	"	"	"
	<i>Trevoa patagonica</i> Speg	"	"	"
<i>Coriariaceas</i>	<i>Coriaria ruscifolia</i> L.	"	"	"

El cuadro 3 (Silvester, 1977) muestra el contenido de nitrógeno en hojas de algunas de estas plantas. El mismo autor señala valores de producción de mantillo entre 5 y 9 toneladas de materia seca por hectárea. Los datos de N en los rastrojos no deben tomarse como todo el nitrógeno fijado, ya que, dependiendo del nivel de N del suelo, una parte es reciclada a partir del mismo.

Numerosos son los trabajos realizados en los últimos años sobre esta simbiosis e importantes revisiones publicadas sobre su ecología y usos potenciales (Benoit y Berry, 1990, Dawson, 1990), sobre la fisiología de los nódulos (Silvester *et al.*, 1990), la genética de *Frankia* (Mullin *et al.*, 1990, Simonet *et al.*, 1990), su biología y taxonomía (Lechevalier, 1994, Valdés *et al.*, 1996).

Cuadro 3 - N% en hojas y en mantillo de plantas actinorríticas noduladas

especies	N% en hojas caídas	mantillo ton/ha/año	N%	edad años	Ntotal kgN/ha/año
<i>Alnus incana</i>	2,82				
<i>A. crispa</i>		1,5	3,0	5	157
<i>A. rubra</i>		1,3	2,0	0-40	30
	2,17	9,3	1,82	12	169
<i>A. glutinosa</i>	2,57				
<i>Casuarina</i>		2,9	1,0	-	290
<i>littoralis</i>					
<i>C. equisetifolia</i>	1,30				
<i>Ceanothus</i>		6,2	1,46	9	91
<i>velutinus</i>					
<i>Eleagnus</i>		13,5	1,35		183
<i>orientalis</i>					

Caracteres del endofito

El endofito de nódulos tipo *Alnus* ha sido frecuentemente descrito como simbiote obligado y pocas referencias a ellos se encuentran en los textos clásicos de microbiología. Han sido introducidos en la

8ª edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, pero no figuran muchos textos sobre actinomicetes. La causa principal de esta omisión ha sido la incapacidad de cultivarlos *in-vitro*. Este inconveniente ha sido superado y se han aislado con éxito endofitos de *Comptonia peregrina* (Callaham *et al.*, 1978), de *Alnus glutinosa* (Quispel y Tak, 1978), *Colletia spinosissima* (Guathier *et al.*, 1984).

Algunos autores presentaron evidencias para la subdivisión de los endofitos tipo *Alnus* basadas en las barreras de inoculación cruzada entre especies vegetales. Las experiencias se realizaron desde 1978 inoculando con cultivos puros de *Frankia* y se comprobó que un mismo aislamiento podía nodular distintas especies, resultando difícil la subdivisión en especies basada en la especificidad endofito-hospedante, como en el caso de los rizobios.

Otros caracteres que se toman en cuenta para establecer claves taxonómicas en *Frankia* incluyen:

- **la composición química de las paredes celulares**
- **la capacidad para formar esporas en los nódulos**
- **isoenzimas**
- **taxonomía genética**

Frankia posee ciertos rasgos taxonómicos característicos: su pared posee ácido diaminopimélico, ácido glutámico, alanina, peptidoglicano. Sus ácidos grasos son de cadena normal. Ramificados y monoinsaturados. Ciertos lípidos no saponificables llamados **hopanoides** les confieren resistencia en condiciones desfavorables, son usados en la taxonomía. Las **manequinonas**, como la MK9(H4), con 9 unidades de isopreno, son también usadas como marcadores taxoquímicos (Valdés *et al.*, 1996). También se han encontrado cepas genéticamente diferentes en endofitos de *Alnus*: una produce esporas y la otra no, aunque en cultivo puro esta última es capaz de esporular, indicando que la supresión de la esporulación en simbiosis está controlada por el hospedante.

Así, los intentos de clasificación de *Frankia* incluyen estudios sobre:

- i) infectividad y efectividad en distintos hospedantes
- ii) crecimiento y características fisiológicas
- iii) estudios genéticos: nº y tipo de plásmidos, isoenzimas, perfil de ácidos grasos, polimorfismo de segmentos de restricción del ADN (RFLP), secuencias del rARN 16S (Guillén *et al.*, 1993). Las regiones conservadas de este fragmento permiten ubicar al género *Frankia* dentro de los Actinomicetales, mientras que las regiones hipervariables son útiles para la clasificación filogenética a nivel de género y especie.

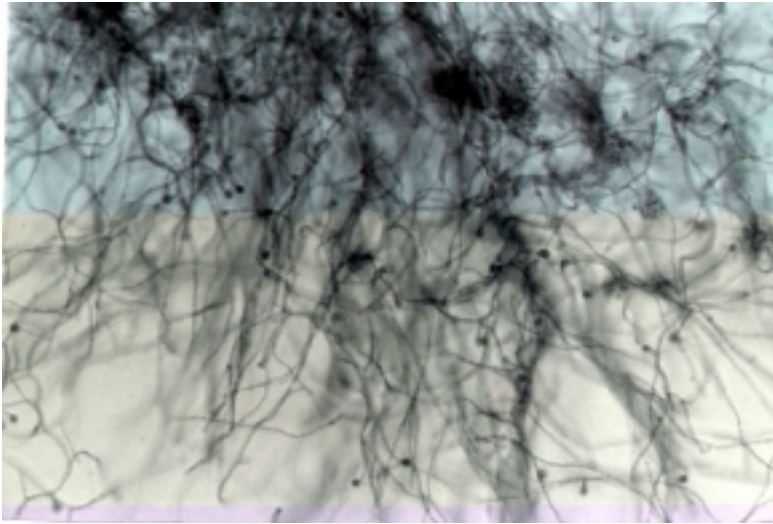
Aislamiento

Se han empleado distintas técnicas para lograr el aislamiento de *Frankia*: digestión enzimática de macerados de nódulos, microdissección, fraccionamiento en gradiente de sacarosa, diluciones seriadas o aislamiento directo a partir de trozos de nódulos desinfectados superficialmente. Se han desarrollado numerosos medios de cultivos (**Anexo Práctico**). Diem *et al.* (1982) detallan los procedimientos para el aislamiento a partir de nódulos de *Casuarina equisetifolia*: las plántulas se desarrollan en medio sin nitrógeno en tubos. Al mes se inoculan con macerado nodular y los nódulos se hacen visibles entre 1 y 2 meses. A partir de éstos se aísla *Frankia*.

Morfología Esta bacteria presenta distintas estructuras en medios de cultivo (figura 1) y en los nódulos

- **hifas**: en las colonias las hifas aparecen ramificadas, septadas, de unos 0,4 a 0,9 micras
- **los esporangios**, pueden presentarse intercaladamente (foto 2), con **esporas** de forma irregular: globosas, o de masa, alargados o irregulares, con paredes gruesas, tamaño variable (0,5 a 1 micra), muy abundantemente empaquetadas en la zona infectada. Su formación puede originarse en las células de la corteza a partir de cuerpos esporógenos de las hifas, o en espacios intercelulares. La formación de esporas puede estar ausente, los nódulos sin ellas se denominan Sp⁻ y los que las presentan como nódulos Sp⁺.
- **vesículas**, la presencia de estas estructuras esféricas (2,6 micras) de paredes gruesas, en extremos de hifas cortas y ramificadas se visualizan en el microscopio óptico y son el asiento de la fijación de nitrógeno (protección de la N2asa) en aerobiosis

Figura 1 - Morfología de *Frankia* con hifas, esporangios y vesículas
en cepa aislada de *Allocauarina stricta* (Frioni *et al*, 1991)



El polimorfismo de *Frankia* dificulta los estudios fisiológicos y la evaluación del crecimiento, ya que no produce turbidez uniforme como los microorganismos unicelulares. La curva de crecimiento se analiza por determinaciones de **biomasa** por medio de diferentes técnicas, como análisis del contenido de proteínas, determinación de actividad deshidrogenasas (TTC, INT), turbidimetría luego de sonicación de las hifas, actividad N₂asa (Anexo Práctico, Frioni *et al*, 1991). Para la preparación de inoculantes y en estudios fisiológicos se trabaja con cultivos frescos, repicados varias veces en medios nuevos (Schwncke, 1991).

Fuentes de carbono y nitrógeno

Frankia emplea ácidos grasos de cadena corta (propiónico, acético) y sus derivados, intermediarios del ciclo de Krebs (ácidos succínico, málico) y el ácido pirúvico. Puede crecer con N₂ en vida libre y emplear otras fuentes de N: aminoácidos, urea, nitrato, adenina, uracilo y amonio. Como en otros diazotrofos la glutamino sintetasa es la enzima responsable de la asimilación del amonio.

Protección frente al oxígeno

Las cepas son aerobias o microaerófilas y a diferencia de los rizobios, *Frankia* puede fijar N₂ a diferentes concentraciones de O₂. Su nitrogenasa está protegida en las **vesículas**, rodeadas de gruesas capas lipídicas, integrados por hopanoides y triterpenos pentaciclados, reconocidos en la alteración de la permeabilidad de membranas en procariotes. Estas estructuras se han comparado con los heterocistos de las cianobacterias. La presencia de **superóxido dismutasa** en el nódulo contribuiría también a la protección. Los **gruesos tejidos** del nódulo y la **hemoglobina** contribuyen a la protección en simbiosis. La presencia de una **hidrogenasa funcional** ha sido citada como un mecanismo adicional y permitiría en muchos casos un crecimiento autotrófico.

Genética de *Frankia*

Los estudios han avanzado lentamente por la baja velocidad de crecimiento, la escasa germinación de las esporas. Mucha de la información obtenida se ha logrado con las técnicas usadas para los rizobios y actinomicetes. Se ha avanzado en la determinación de los plasmidios y los genes *nod*, *nif* y genes que codifican la asimilación del amonio. Una herramienta muy útil en el establecimiento de relaciones filogenéticas es el estudio de las secuencias conservadas en los segmentos 16S de los rARN (Niner *et al*, 1996).

Formación de los nódulos

El proceso ha sido más estudiado con *Alnus glutinosa* y pueden distinguirse 4 fases:

- a. desarrollo del endofito en la rizosfera
- b. invasión de pelos capilares
- c. formación de nódulos primarios

d. formación de nódulos verdaderos, por ramificaciones dicotómicas de meristemas apicales, dando el aspecto racimoso característico de estos nódulos.

El proceso es muy parecido al que ocurre en leguminosas: los pelos radicales en contacto con el endofito se encurvan y las hifas penetran avanzando hacia células corticales que son estimuladas a dividirse. Las hifas penetran en las células en división, se ramifican y forman las clásicas vesículas en la periferia de estos conglomerados. La infección progresa y se forma el llamado **nódulo primario**, que se reconoce como una deformación de una raíz lateral cuyo crecimiento se detiene. El nódulo verdadero se completa por surgimiento de raíces laterales inducidas cerca de los nódulos primarios, que se transforman en **lóbulos nodulares** por infección persistente de su región cortical. En los **nódulos verdaderos**, la penetración de las células jóvenes de la corteza y la diferenciación del endofito es esencialmente la misma que en los nódulos primarios.

En *Casuarina* y *Myrica*, el ápice de cada lóbulo nodular da lugar a una raíz pero con geotropismo negativo, debido a bajos niveles de ácido indolacético, lo que le da a los nódulos una apariencia muy particular. En el campo, los nódulos pueden alcanzar diámetros de más de 8 cm y muchas veces resulta difícil obtenerlos, pues se distribuyen a lo largo de un sistema radical muy extenso, que en suelos pedregosos y compactados puede llegar a varios metros.

El cuadro 4 y la figura 2 resume las similitudes y diferencias entre las dos principales simbiosis: con leguminosas y en plantas actinorríticas. La figura 3 muestra los eventos en la nodulación en actinorrizas

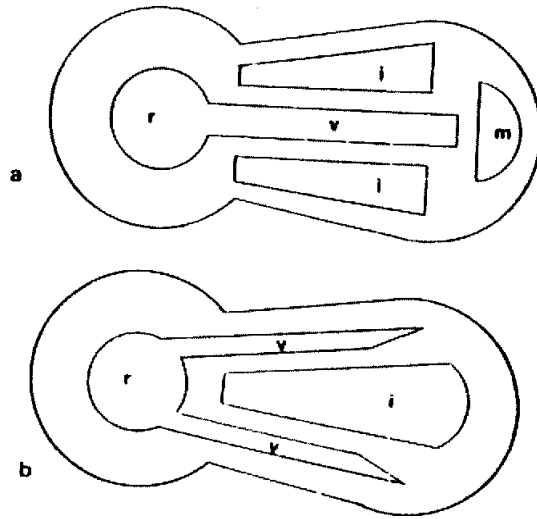
Propagación del endofito

La existencia de poblaciones extranodulares del endofito es esencial para lograr colonizar plántulas y la diseminación en el campo. La presencia de cepas de *Frankia* en el suelo está asegurada, como en el caso de las leguminosas, por el decaimiento y desintegración de los nódulos al finalizar la actividad simbiótica.

Cuadro 4 - Comparación de las simbiosis con leguminosas y las actinorríticas

	leguminosas	actinorrizas
morfología nódulo	simple	complejo
veloc.crecim.bacteria	CS, más 6h(tg) CR, menos 6h	más 15 horas (tg)
sistema vascular en nódulos	periférico	central
hidrogenasa (Hup ⁺)	no general	general
N ₂ fijación <i>in vitro</i>	excepcional	general
protección O ₂	constante siempre	variable algunas
hemoglobina		excepciones
nodulación aérea	varias especies	excepcional
transporte N fijado como ureídos	puede emplearse en un número de plantas	no pueden usarlo
nodulación perenne	excepcional	es la regla

Figura 2 - Esquema de nódulos en: a) actinorrizas b) leguminosas
r) raíz v) vasos i) zona infectada m) meristema



El actinomicete se propaga en el suelo. La sobrevivencia e infectividad ha sido demostrada cuando se emplean homogeneizados nodulares como material infectivo. La infectividad, que disminuye con la dilución, puede mantenerse a bajas temperaturas -en heladera- por varios meses. Se pueden conservar nódulos secos al aire sobre sílico-gel a 6°C. El congelamiento permite también mantener los inóculos viables.

Se observó que la presencia de nódulos con esporas permite mayor sobrevivencia, siendo las esporas más resistentes a condiciones adversas del suelo. Las partículas del endofito responsables de la propagación y de la colonización posterior parecen ser hifas finas, más que esporas.

Muchas experiencias se realizaron para determinar la distribución de los endofitos y de sus respectivas plantas hospedantes. Se encontraron:

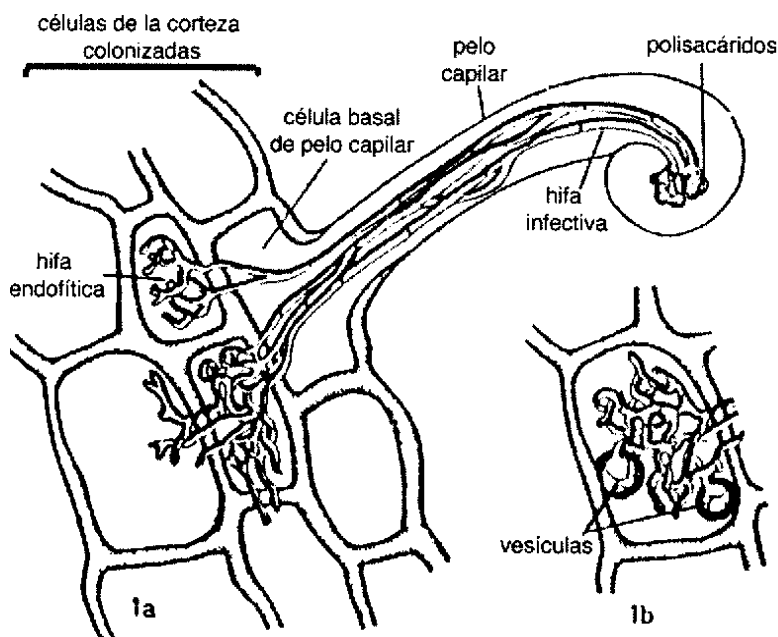
- poblaciones locales de *Frankia* en ambientes sin los hospedantes, que pueden haber migrado por agua, viento, lluvia
- las poblaciones del endofito siguen, en general, a las poblaciones de la planta hospedante. En *Alnus*, cuya nodulación es muy extendida, el endofito se encuentra en un 100% de las zonas de distribución de la planta.

Fijación del nitrógeno

Los nódulos de estas plantas fijan nitrógeno, como lo hacen otros sistemas fijadores, dependiendo su actividad de la biomasa del tejido nodular, de la actividad de la nitrogenasa y del período en que permanecen activos. La respiración y la actividad nitrogenasa de los nódulos declina con los incrementos de la edad de los nódulos, como ocurre en general en nódulos perennes. De modo que, en promedio, estos nódulos fijan menos que nódulos jóvenes de leguminosas anuales.

Figura 3 - Nodulación en actinorrizas

1a) células de la corteza radical 1b) células con *Frankia*



El cuadro 5 (Gauthier *et al.*, 1984) muestra la actividad nitrogenasa de *Colletia spinosissima*, su contenido de N%, el N total por planta y su peso seco en ensayo control e inoculado en cultivo hidropónico.

Cuadro 5 - Efecto de la inoculación con *Frankia* en *Colletia spinosissima*

Tratamiento	peso seco mg/planta	N%	Ntotal	ARA mMC2H4/h/planta
Control	56	0,8	0,45	0
Inoculado	113	1,5	1,69	0,68

La región apical (2-3 mm) de los lóbulos del nódulo parecen constituir las partes más activas en la fijación del nitrógeno. Allí precisamente, los racimos de vesículas presentan la mayor actividad y reducen activamente las sales de tetrazolium. El aislamiento de las vesículas y la incorporación de ATP y ditionito permitió comprobar que son el sitio de la fijación. Incluso los resultados de fijación se expresan por número de vesículas.

Se han señalado valores de fijación de 200-250 kgN/ha/año en *Alnus*, entre 60 y 230 en *Casuarina*, 20-180 en *Hippophæe*, de 150 en *Coriaria*. En general, Rodríguez Barrueco *et al.* (1991) destacan, en la mayor parte de los ecosistemas con especies leñosas fijadoras de N₂, ganancias de N a nivel del suelo iguales o superiores a 100 kgN/ha/año, del mismo orden de magnitud que las aportadas como fertilizantes en coníferas.

La selección de especies eficientes es una alternativa a la fertilización, logrando ganancias sensibles de la productividad, sin aumento de los costos.

Factores que afectan a la fijación del nitrógeno

Tanto la nodulación como la fijación del nitrógeno están afectadas por los mismos factores que en otras simbiosis fijadoras de N₂: fotosíntesis, factores ambientales, como la temperatura, el aporte de nutrientes, incluido el nitrógeno combinado, la aireación. La cantidad fijada varía mucho entre especies e incluso por la posición de los nódulos en la raíz.

- **El número de partículas** infectivas en la rizosfera afecta directamente a la nodulación y por lo tanto a la fijación del N₂. La inoculación tendrá efectos positivos cuando ese número es bajo.

- **El nitrógeno combinado** afecta negativamente a la fijación por estos organismos, al igual que el proceso en leguminosas. Se observaron, sin embargo, diferencias entre la sensibilidad de especies vegetales frente al nitrógeno combinado; *Alnus* es bastante insensible y se los puede encontrar nodulados en suelos relativamente ricos en nitrógeno.
- **La temperatura del suelo:** afecta marcadamente a la fijación, aunque la tolerancia a temperaturas extremas varía con las especies. El óptimo para muchas plantas se ubica entre 20-25 °C, sin embargo especies de *Casuarina* y *H. rhamnoides* toleran altas temperaturas, lo que les brinda gran ventaja ecológica. Las bajas temperaturas afectan también negativamente al proceso.
- **La acidez:** se piensa en general que las no-leguminosas son más tolerantes a los bajos pH que las leguminosas. *Alnus glutinosa* y *Myrica gale* se mostraron muy resistentes a las bajas concentraciones de iones hidrógeno.
- **La humedad,** muchas especies actinorríticas que crecen en áreas secas son afectadas por una sequía transitoria y la actividad nitrogenasa cesa en plantas sometidas a una succión de -25 barías en el xilema. En general ocurre un decaimiento masivo de nódulos en el verano. La inundación, al limitar la difusión de los gases, limita la actividad de los nódulos. Algunas especies poseen estructuras en las extremidades de los nódulos llamadas **lenticelas**, que facilitan la difusión del O₂ a través del tejido nodular.
- **Los cambios diurnos y estacionales:** en árboles perennes, la actividad nitrogenasa se induce temprano en la primavera, cuando comienza la emergencia de las hojas. Luego se incrementa a medida que lo hace la temperatura. Las determinaciones de la fijación del N₂ se han realizado sobre todo a nivel de laboratorio, con nódulos aislados y son pocos los datos de campo que permiten conocer el aporte de nitrógeno al suelo.

Transporte de los productos de la fijación hacia la planta

Como en otras simbiosis, un 90-95% de los compuestos nitrogenados de la fijación son transferidos al hospedante. Luego de unos minutos de exposición a una mezcla de gases con N¹⁵, un 25% del nitrógeno fijado se detecta en las partes basales de los nódulos de *Alnus*, el resto se encuentra en las partes superiores de los lóbulos nodulares y luego de una hora de inoculación, en las raíces vecinas al nódulo.

Los compuestos transferidos son sobre todo **aminoácidos:** arginina, glutamina; la citrulina es más común en nódulos de *Alnus glutinosa*. No se sabe si su síntesis es realizada por la planta, el endofito o por ambos. Entre las enzimas para la asimilación del amonio, se encontró la glutamato deshidrogenasa (**GDH**) y la glutamino sintetasa (**GS**), presentes en nódulos de *A. glutinosa*, sobre todo en el citoplasma del hospedante y no tanto en los residuos de 20 micras con vesículas. Akkermans y Roelofsen (1980) postulan que la asimilación la efectúa el hospedante, mientras que el endofito excretaría el amonio producido en la reducción del N₂, al igual que en las otras simbiosis fijadoras de nitrógeno.

El H₂ es liberado escasamente por la presencia de una **hidrogenasa** muy eficiente contenida en las vesículas que asegura el reciclamiento de los electrones hacia la nitrogenasa. Como se observa, los sistemas simbióticos fijadores de N₂ presentan gran similitud en cuanto a los sistemas enzimáticos: nitrogenasas e hidrogenasa, en las enzimas para la asimilación del amonio y en los efectos del medio sobre la magnitud del proceso.

Perspectivas

El empleo de las plantas actinorríticas como pioneras en suelos pobres o degradados es ya práctica común en muchos países. Algunas especies se pastorean, como jóvenes ejemplares de *Alnus spp.* Representan una buena alternativa frente a las leguminosas en ciertas zonas. Progresan los estudios sobre las relaciones de especificidad endofito-hospedante, los mecanismos de reconocimiento y los procesos de colonización. Constituye un área cuyos estudios se incrementan rápidamente por la importancia del nitrógeno como elemento limitante del desarrollo vegetal y la capacidad de estas plantas de colonizar áreas muy erosionadas, suelos muy pobres en todas las regiones climáticas.

Bibliografía

- AKKERMANS, A. D. y W. ROELOFSEN 1980 Symbiotic nitrogen fixation by *Actinomycetes* in *Alnus*-type root nodules, en **Nitrogen Fixation**, W. D. P. Stewart y J. R. Gallon (eds) Academic Press, Londres: 279-299
- AKKERMANS, A. D. L. y C. VAN DIJK, 1981: Non-leguminous Root-nodule Symbioses with *Actinomycetes* and *Rhizobium*, en **Nitrogen Fixation**, vol. 1 **Ecology**, W. J. Broughton (ed), Oxford Univ. Press: 57-103.
- BENOIT, L.F. y A. M. BERRY, 1990 Methods for production and use of actinorhizal plants in forestry, low maintenance landscapes and revegetation. En: **The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants**. C.R. Schwintzer y J.D. Tjepkema (eds), Academic Press, New York: 299-316
- CALLAHAM, D., P. DEL TREDICI y J. G. TORREY, 1978 Isolation and cultivation in-vitro of the *Actinomycete* causing root nodulation in *Comptonia*, en Science 199: 899-902
- CHAUDHARY, A. H. 1979 Nitrogen-fixing root nodules in *Datisca cannabina*, en: Plant and Soil 51: 163-165
- DIEM, H. G.; D. GAUTHIER y R. DOMMERGUES, 1982, Isolation of *Frankia* from Nodules of *Casuarina equisetifolia*, Can. J. Microb., 28 (5): 526-530.
- FRIONI, L., SPINELLI, A. y MAGGI, A. 1991 Nodulación y fijación de nitrógeno en especies de *Casuarina* y *Allocasuarina* cultivadas en el país. Bol. Inv. Fac. Agr, Uruguay 30: 1-20
- GAUTHIER, D.; FRIONI, L.; DIEM, H. G. y Y. DOMMERGUES, 1984: The *Colletia spinosissima*-*Frankia* Symbiosis, Oecol. Plantarum, 5 (19); n 3: 231-239.
- GUILLEN, G., M. VALDES, J. LIAO y A.M. HIRSCH, 1993 Identificación de actinobacterias aisladas de nódulos de *Casuarina* por técnicas tradicionales y moleculares. Rev. Latinoam. Microbiol. 34: 195-200
- LECHEVALIER, M.P. 1994 Taxonomy of the genus *Frankia*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 1-8
- MULLIN, B.C. y C.S. AN 1990 The molecular genetic of Frankia. En: The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants. C.R. Schwintzer y J. D. Tjepkema (eds) , Academic Press, New York: 195-214
- NINER, B.M. , J.P. BRAND, M. VILLEGAS, CH.R. MARSHALL, A.M. HIRSCH y M. VALDES. 1996 Analysis of partial sequences of genes coding for 16SrRNA of actinomycetes isolates from *Casuarina equisetifolia* nodules in Mexico. Appl. Env. Microbiol. 62(8): 3034-3036
- QUISPEL, A. y T. TAK 1978 Studies on the growth of the endophyte of *Alnus glutinosa* (L) Vill. in nutrient solutions. en: New Phytol: 127-132
- RUNDEL, W. R. y J. W. NEEL 1978 Nitrogen fixation by *Trevoa trinervis* (Rhamnaceae) in the Chilean matorra, en Flora 167: 127-132
- RODRIGUEZ BARRUECO, C., A. MOIROUD y E. CERVANTES 1991 Actualidad de la fijación simbiótica de nitrógeno en plantas actinorrícicas, en : **Fijación y Movilización de Nutrientes, vol II**, Colección Nuevas Tendencias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid: 91-103
- SCHWENKE, J. 1991 Rapid, exponential growth and increase biomass yield of some *Frankia* strains in buffered and stirred mineral medium (BAP) with phosphatidyl choline. Plant & Soil 137: 37-41
- SILVESTER, W. B., 1977: Dinitrogen fixation by plant association excluding legumes, en **A Treatise on Dinitrogen Fixation**, R. W. F. Hardy y A. H. Gibson (eds), Wiley & Sons, Nueva York: 141-172.

- SIMONET, P. , P. NORMAND, A. M. HIRSCH y A. D. L. AKKERMANS 1990 The genetic of the frankia-actinorhizal symbiosis. En: **Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation**, P.M. Gresshoff (de) CRC Press, Florida: 70-109
- TORTOSA, R. D. y D. MEDAN, 1983: Nódulos radicales simbióticos en espermatofitas argentinas, Kurtziana, 16: 101-122.
- TRINICK, M. J. 1983: Symbiosis between *Rhizobium* and the non-legume *Trema aspera*, en Nature (Londres), 244: 459-460.
- VALDES, M., L. VAZQUES MENDES Y A. MUÑOS GARCÍA 1996 La biología de *Frankia*, endosimbioente de árboles fijadores de nitrógeno. Ciencia 47:51-67

Capítulo 17

Las micorrizas

Existen numerosas relaciones mutualísticas entre hongos y raíces de plantas vasculares y no vasculares. Una de las más extendidas la constituyen las asociaciones micorríticas, que involucran varios tipos de hongos del suelo y raíces. El término **micorriza** fue propuesto por Frank, en 1885 para describir estas estructuras, que en contraste con la infección de raíces con hongos patógenos, no provocan síntomas de enfermedad y se las considera como verdaderas simbiosis.

Están muy distribuidas en el reino vegetal y sólo algunas especies acuáticas, las crucíferas y pocas especies más, no forman normalmente micorrizas. Se reconocen en los fósiles vegetales más antiguos y se postula que la evolución de plantas terrestres desde hábitats semiacuáticos fue posible gracias a relaciones mutualísticas con algas y hongos.

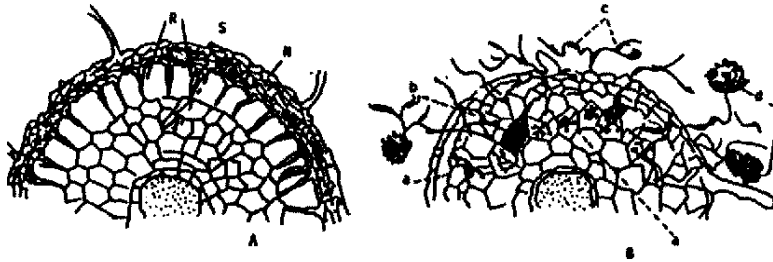
Aproximadamente 95% de especies de plantas vasculares pertenecen a familias característicamente micorrizadas. La micorrización ha evolucionado como la norma en la nutrición terrestre y no como la excepción.

La importancia de estas asociaciones se demostró por los fracasos en la implantación de especies exóticas, al cambiarlos de hábitat o por la dificultad en la forestación en zonas erosionadas. Cuando se agregan cultivos adecuados de hongos micorríticos, o mantillo de la zona de origen, la sobrevivencia y desarrollo aumentan en forma sorprendente. En base a los caracteres morfológicos se reconocen varios tipos de micorrizas, presentados en el cuadro 1 (Harley, 1994) y esquematizadas en la figura 1.

Cuadro 1 - Características de los tipos más importantes de micorrizas

Tipos de micorrizas							
	V-A	ECM	ETM	arbu toide	monotro poide	Ericoi de	Orquide acea
hongo septado	-	+	+	+	+	+	+
aseptado	+	(+)	-	-	-	-	-
hifas en las células	+	-	+	+	+	+	+
manto fúngico	-	+	-/+	+	+	-	-
red Hartig hifas ovilladas en célul.	-	+	+	+	+	-	-
haustorios	+	-	+	+	-	+	+
dicotómicas	+	-	-	-	-	-	-
no-dicotómicas	-	-	-	-	+	-	+/-
vesículas	+/-	-	-	-	-	-	-
aclorofilia	-/+	-	-	-/+	+	-	+
taxonomía del hongo	F	B,A,F	B,A?	B	B	A(B)	B
taxonomía	B,T	G,A	G,A	E	M	E	O
hospedante	G,A						
F= Phycomycetes, B= Basidiomycetes, A= Ascomycetes B= Bryophyta, P= Pteridophyta, G= Gymnosperma, A= Angiosperma E= Ericales, M= Monotropaceae, O= Orchidaceae V-A micorrizas vesículo-arbusculares, ECM ectomicorrizas,							

Figura 1- A- Corte esquemático de una ectomicorriza
N=manto fúngico T= red de Hartig S= hifas
B- Endomicorrizas V-A a = arbusculos b=vesículas
 c=hifas d =fructificaciones externas



En las **ectomicorrizas**, la raíz está completamente rodeada por un manto fúngico, bien desarrollado, cuyas hifas se expanden entre las células corticales de la raíz (red de Hartig). Son comunes entre Gimnospermas (especialmente *Pinaceas*) y Angiospermas (especialmente *Salicaceae*, *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Ulmaceae*, *Rosaceae*, *Leguminosae*, *Myrtaceae*, *Tiliaceae*, *Ericaceae*). La mayoría son árboles.

Algunas especies hospedantes pueden formar también los otros dos tipos de micorrizas: **ectendomicorrizas y endomicorrizas**, en donde la característica es la penetración de las células de la raíz por estructuras fúngicas: **hifas, vesículas, arbusculos o haustorios y esporas**, en las cuales muchas veces no se aprecian modificaciones externas que evidencien la infección. Las endomicorrizas pueden clasificarse en: micorrizas vesículo-arbusculares (V-A), arbusculares (A), micorrizas tipo *Orquidiaceae* y tipo *Ericaceae*.

Las **ectendomicorrizas**, con características de ecto y endomicorrizas: poseen manto fúngico externo, aunque no siempre bien desarrollado, las hifas se presentan entre las células y pueden también observarse dentro de ellas. Existen numerosas graduaciones entre las ecto y ectendomicorrizas.

Los estudios relacionados con la naturaleza del hongo, la fisiología de la micorriza, el aislamiento y propagación del endosimbionte y las prácticas de inoculación, se han incrementado en los últimos años (Barea *et al*, 1991, Allen, 1992, Moser y Haselwandter (1983), Norris *et al*, 1994, Alvarez, 1991).

Ectomicorrizas

Se ha calculado que ocurren en aproximadamente un 3% del total de especies vegetales. La gran mayoría se encuentran en árboles forestales: angiospermas y coníferas. Los estudios se han realizado sobre todo en *Pinus* (figura 5 del **Anexo Práctico**), *Fagus*, *Quercus*.

El manto fúngico puede representar en 40% del peso total del órgano (figura 6 del **Anexo Práctico**). Las hifas se pueden extender al suelo vecino y también penetrar espacios intercelulares de la corteza. Las células corticales se alargan transversalmente y los pelos capilares están ausentes. Los tejidos meristemáticos y los del ápice están reducidos en relación a raíces no micorizadas. Las raíces colonizadas son por lo general laterales, al emerger de la corteza de raíces micorizadas. Estas raíces son de corta longitud, muy ramificadas y son reemplazadas periódicamente.

La morfología y anatomía de las ectomicorrizas son variadas según el estado de desarrollo, el hongo asociado, la presencia de más de una especie fúngica. Caracteres anatómicos, fisiológicos, ecológicos y taxonómicos se tienen en cuenta en la descripción de las ectomicorrizas, como la morfología de las hifas, estructura y aspecto del manto fúngico, presencia de rizomorfos, color, fluorescencia, olor, hábitat (Agerer, 1994).

Las ectomicorrizas de árboles forestales pueden ser pardas, negras, rojas, amarillas, blancas. Muchos hongos inducen ramificaciones dicotómicas en las raíces, las que le dan forma coraloides característica; otras pueden tener formas ramificadas, pinadas, globulosas, etc. El hongo se mantiene en la corteza pudiendo llegar a la endodermis, vía lámina media, por acción de enzimas pectinolíticas, dependiendo de la agresividad del hongo y la respuesta del hospedante.

Taxonomía y fisiología de hongos ectomicorrícicos

La mayoría son: *Basidiomycetes*: *Hymenomycetes*, como *Boletus*, *Cortinarius*, *Suillus*, *Amanita*, *Tricholoma*, *Laccaria* y entre los *Gasteromycetes* se encuentran especies de *Rhizopogon*, *Pisolithus* y *Scleroderma* (Singer, 1975). Algunos de estos géneros poseen especies saprofitas o parásitas que no forman simbiosis con raíces y es posible que los ectomicorrícicos hayan evolucionado a partir de éstos.

De acuerdo a su capacidad para vivir libremente y su grado de especificidad con el hospedante, los hongos ectomicorrícicos se dividen en:

- **saprofitas**, que pueden formar micorrizas con hospedantes adecuados
- **normalmente micorrícicos**, con amplio rango de hospedantes, y con capacidad saprofítica. La mayoría de los hongos que forman ECM poseen escasa o nula habilidad para vivir libremente, pero poseen amplio rango de hospedantes.
- **con escasa capacidad saprofita**, con estrecho rango de hospedantes: *Suillus plorans* o *Boletinus asiaticus*, que pueden encontrarse en una sola o dos especies.

La mayoría de los conocimientos sobre la fisiología de las ectomicorrizas se obtuvo con los dos últimos grupos. Las diferencias en los grados de colonización dependen, entre otras causas, de la actividad de enzimas como **celulasa** y **polifenol oxidasa**.

Fuentes de carbono: muchas especies ectomicorrícicas obligadas han podido desarrollarse en cultivo puro, con nutrientes relativamente simples, como glucosa y otros azúcares. Muchas no pueden emplear disacáridos y otras especies pueden degradar polisacáridos siempre que se agregue algo de glucosa (inducción enzimática). Se han detectado actividades de celulasas, hemicelulasas y amilasas pero, como grupo, estos hongos son en general incapaces de descomponer mantillos u otras formas de materia orgánica del suelo, y dependen del hospedante para la provisión de compuestos carbonados simples.

Fuentes de nitrógeno: son variadas, en general sales de amonio, aminoácidos y otras formas de N-orgánico son rápidamente utilizadas (experiencias con N^{15}), los nitratos son menos empleados. Altos niveles de N en el suelo inhiben la síntesis de ectomicorrizas: una C/N alta parece ser prerequisite para su formación.

Factores de crecimiento: muchos de estos hongos requieren ciertas vitaminas del complejo B, como tiamina y biotina; otras especies prefieren inositol, ácido nicotínico y ácido pantoténico.

Los hongos ectomicorrícicos producen **auxinas**, **giberelinas**, **citoquininas** y una variedad de vitaminas, antibióticos, ácidos grasos. Las sustancias de naturaleza auxínica reproducen caracteres de la micorrización al incorporarlas a raíces creciendo asépticamente: raíces cortas y gruesas, ausencia de pelos y elongación radial de células corticales. La microflora rizosférica puede brindar el triptófano para la síntesis del **AIA** (ácido indol acético), que induce estos cambios.

Si las raíces micorrizadas pierden al hongo asociado, las características estructurales desaparecen y se transforman en raíces normales. El exceso de nitrógeno afecta a la micorrización: puede provocar que las auxinas se conviertan en compuestos relacionados, pero sin actividad promotora del crecimiento, e incluso inhibir su síntesis por el hongo.

Los factores físicos también afectan el desarrollo de estos hongos. El óptimo del crecimiento se sitúa entre 18 y 27°C, para muchos cesa sobre 35°C y debajo de 5°C. Se consideran acidófilos, con pH óptimo entre 4 y 6, algunos crecen bien a pH 3.0. Son aerobios y por esto los cultivos para preparar inoculantes se agitan y sensibles a la falta de agua.

Interacciones entre el hongo y el hospedante

Si bien el desarrollo de plántulas de árboles no depende siempre de la simbiosis, tanto el crecimiento como el nivel de minerales son incrementados.

- **La planta** logra mayor absorción de nutrientes al aumentar la superficie radical, incrementan la resistencia a patógenos, a toxinas, pH, temperatura y humedades adversas. La suberización de las raíces está limitada y se alarga su vida útil.

- **El hongo**, por su parte, obtiene los nutrientes carbonados simples que requiere en las etapas iniciales y un ambiente que lo protege de la intensa competencia microbiana.

Fisiológicamente, las asociaciones micorrícicas constituyen uno de los mejores ejemplos de parasitismo controlado.

Los intercambios entre ambos componentes de esta asociación se estudian con elementos marcados:

- **CO₂¹⁴** en las plantas para seguir los compuestos orgánicos radioactivos en el manto fúngico y en las hifas

- **P³²** en compuestos orgánicos o minerales insolubles en el suelo, que es transferido hacia la planta, por las hifas del hongo. Las plantas micorrizadas se desarrollan mejor en suelos deficientes en nutrientes como N, P, K.

Las raíces micorrizadas carecen de **pelos capilares**, la mayoría de los nutrientes deben ser absorbidos por las capas externas de la vaina fúngica y son trasladados a la corteza radical, por las hifas. La gran superficie de contacto entre el hongo y la planta permite un rápido intercambio de nutrientes.

La absorción de fosfatos es entre 2 y 5 veces superior en raíces micorrizadas, en relación a controles no infectados. Los sitios más activos de absorción corresponderían a lugares de emergencia de raíces cortas e infectadas. Los fosfatos se desplazarían por los espacios entre las hifas del manto fúngico, o internamente, por mecanismos de difusión.

Dados los niveles de fosfato en el suelo, es probable que todo el fósforo se desplace a expensas del metabolismo fúngico, en condiciones de baja disponibilidad de fosfatos alrededor de las raíces.

Se han detectado reservas de P, como **gránulos de polifosfato** en vaina e hifas de micorrizas de *Pinus*. Algunos hongos ectomicorríticos son capaces de emplear **fitato** (hexafosfato de inositol), que constituye importante fuente de fósforo insoluble en suelos forestales. Otras fuentes de P orgánico empleados son: p-nitro fenil fosfato, beta-glicerol fosfato, por actividad de fosfatasa.

Es evidente que esta asociación permite explorar el suelo más eficientemente en hábitats en donde ninguno de los integrantes de la pareja podría desarrollarse satisfactoriamente. La asociación debe mantenerse por un prolongado espacio de tiempo, para obtener beneficios sustanciales.

Protección contra fitopatógenos

Se ha puesto en evidencia que las raíces ectomicorrizadas son más resistentes a la invasión por microorganismos fitopatógenos, en relación a las plantas no infectadas. Varias hipótesis tienden a explicar estos hechos (Alvarez, 1991):

- el patógeno contaría con **menor disponibilidad de materiales carbonados** en la zona de la raíz, como consecuencia de la absorción de los mismos por el hongo micorrícico
- el manto fúngico ejercería una eficiente **barrera física** a la penetración por el patógeno: en cortes de raíces micorrizadas y controles inoculadas por esporas de hongo patógeno, se aprecia la invasión sólo en el caso de raíces no micorrizadas
- **la secreción de antibióticos** frente a los patógenos, el desarrollo de una microflora rizosférica antagonista
- **la exudación de otros metabolitos** que inhiben a los patógenos, como terpenos, en concentraciones muy superiores a las producidas en raíces no micorrizadas, se han postulado también como causas de este fenómeno
- **incremento de antagonistas del patógeno** entre la población rizosférica de la planta micorrizada

Colonización y factores que afectan el desarrollo de ectomicorrizas

Se produce a partir de alguna estructura del hongo: micelio, hifas, rizomorfos, esporas, a partir del suelo. El reconocimiento del hongo y el hospedante apropiado es seguido por la colonización y la formación del manto fúngico. El desarrollo del hongo en la rizosfera del hospedante es estimulado por los exudados radicales.

La **fertilidad del suelo** y la **actividad fotosintética** del vegetal afectan marcadamente a la micorrización.

- **Favorecen el proceso:** alta actividad fotosintética y baja o moderada fertilidad
- **Reducen el proceso:** bajas intensidades luminosas o deficiente fotosíntesis que afectan el nivel de azúcares y la formación de nuevas raíces, altos niveles de N y P en el suelo provocaron disminuciones en el contenido de sacarosa en raicillas de pino y en la susceptibilidad a la infección por el hongo ectomicorrítico *Pisolithus tinctorius*.

Otros factores que inciden en la micorrización incluyen la temperatura, aereación, humedad, el nivel de otros nutrientes, que afectan el desarrollo de las raíces y la propagación del hongo, la microflora rizosférica (sinergismos y antagonismos).

Prácticas de inoculación

En general, los hongos micorrícicos se incorporan a los **cultivos de árboles**, en particular de pinos, abetos y otras coníferas, así como a plantas ornamentales, cuando éstas se desarrollan en medios artificiales como vermiculita, arena, etc. en el **vivero**.

La falta de micorrización puede acarrear problemas en el transplante de estos cultivos, salvo que el suelo contenga especies ectomicorrícicas.

Técnicas de inoculación (Honrubia *et al*, 1994, Norris *et al*, 1994, Brundrett *et al*, 1996, Malvárez *et al*, 1997, **Anexo Práctico**):

- **con suelo o mantillo o trozos de raíces** colonizadas que se trasladan desde la zona de origen del cultivo, a los viveros. Esta técnica es poco específica y se corre el riesgo de llevar también microorganismos patógenos

- **con esporocarpos, esporas, esclerocios**, frescos o secos se emplean desde hace muchos años

en la inoculación de plántulas. Las esporas son fáciles de coleccionar a partir de esporocarpos maduros de muchos *Gasteromycetes* que se colectan en el terreno en la vecindad de árboles bien micorrizados y se agregan a las macetas regando con un licuado en agua.

- **con cultivos puros**, desde la década del 50 se comenzó con éxito a inocular con cultivos puros. Los suelos o los soportes de plántulas se fumigan frecuentemente para eliminar patógenos y la población nativa, que puede competir con el inóculo.

Las esporas asexuadas desarrolladas en medios de cultivo son también un buen inóculo, pero los cultivos con micelio se emplean mucho últimamente ya que ofrecen mayores garantías.

Programas de inoculación: comienzan con la selección del hongo ectomicorrícico, la que puede realizarse simultáneamente con un diazotrofo, en leguminosa o en no-leguminosa fijadora de N₂. Los ensayos para evaluar la especificidad y eficiencia de la simbiosis se realizan en plántulas creciendo en tubos con vermiculita/turba, arena, con solución nutritiva. La inoculación se puede realizar a partir de discos de agar con micelio activo (Marx *et al*, 1991). Los ensayos continúan en invernáculo, incluyendo suelo, niveles de fertilización, tipos de inóculos, etc.

La introducción de especies de *Pisolithus* en viveros ha incrementado significativamente la calidad de plántulas de pino. El cuadro 2 muestra un ejemplo de inoculación en suelos muy erosionados, cerca de minas de cobre, en el sur de Estados Unidos, pobres en materia orgánica y nutrientes minerales. Como se observa se presentan marcadas diferencias entre los hongos. Las ectomicorizas con *Pisolithus* incrementaron el crecimiento cerca del 100%, en ambas especies, en relación a las formadas por *Thelephora*, menos adaptado a las condiciones adversas del suelo. No se desarrollaron los cultivos testigo, sin inocular.

En otras partes del mundo *Pisolithus tinctorius* responde muy bien en la simbiosis, persiste en el suelo a pesar de la competencia de los hongos ectomicorrícicos nativos. Considerando la enorme extensión sembrada con especies forestales, se comprende la importancia de lograr incrementar los rendimientos mediante una correcta selección de estos hongos.

Cuadro 2 - Supervivencia y desarrollo de plántulas de pino luego de dos años

Tratamiento	altura (cm)	diámetro tallo (cm)	vol.plántula (cm ³)
pino Virginia con <i>Pisolithus</i>	52.3*	1.46*	111.5*
<i>Thelephora</i>	44.8	1.15	59.3
pino lobulado con <i>Pisolithus</i>	48.7*	1.29*	81.0*
<i>Thelephora</i>	41.3	1.01	42.1
* = Diferencia significativa al 5%. Volumen plántula = (diámetro tallo) ² x altura.			

Efectos de la inoculación: incrementos en tamaño (altura, peso seco de las plantas), diferencias en la anatomía y morfología de los cultivos, han sido atribuidas a esta simbiosis (cambios en la relación raíz/parte aérea, estructura de tejidos radicales, longitud de acículas, longevidad de raíces cortas, incremento en el número de cloroplastos).

Algunas de estas variaciones se atribuyen al incremento del aporte de nutrientes, pero otras son consecuencia de la actividad del hongo o de fitohormonas que libera (Moser y Haselwandter, 1983).

El cuadro 3 de estos autores muestra ligeros aumentos en la lignificación de plantas de pino inoculadas (en experimentos con CO₂¹⁴) y del tamaño y peso del orden del 44%.

Cuadro 3 - Peso seco (mg) y contenido de lignina en *Pinus sylvestris* micorrizado y no micorrizado

	peso		lignina (% peso seco)	
	inoculado	no inoculado	inoculado	no inoculado
peso seco total	770	534	-	-
raíz	265	125	30	28
tallos viejos	91	56	35	30
tallos nuevos	108	44	29,5	24,5
acículas	305	282	-	-

Resumiendo: se reconoce la importancia de estas asociaciones en el desarrollo de especies arbóreas, sobre todo en suelos de baja fertilidad. La colonización puede efectuarse con hongos que forman ecto y endomicorrizas en la misma especie vegetal y la sucesión de las mismas es conocida en eucaliptos y especies de leguminosas arbóreas (Frioni *et al*, 1998). El endosimbionte moviliza nutrientes desde el suelo hacia el hospedante. La inoculación con especies fúngicas correctamente seleccionadas ofrece una interesante perspectiva (Siqueira *et al*, 1994) en el manejo de los cultivos forestales en:

- cultivos exóticos
- suelos degradados por la erosión, mineralización o por construcciones civiles
- áreas despobladas o desprovistas del hospedero
- suelos y sustratos inertes desinfectados
- en áreas donde ocurren los hongos pero se pretende aumentar la densidad de inóculo o introducir organismos más efectivos que los nativos

Endomicorrizas

Se piensa, dada la abundancia de estas asociaciones, que la presencia de hongos endomicorríticos en raíces es una constante, más que una excepción, en condiciones naturales. Han sido reconocidas desde hace más de 100 años y se destaca su presencia en fósiles de más de 300 millones de años (Harley, 1994).

La mayoría de las endomicorrizas poseen características comunes: el hongo invade las raíces desde el suelo, lo que implica que debe poseer mecanismos para sobrevivir en él o poseer una existencia saprofítica; dentro de la raíz, el hongo coloniza las células de la corteza, pero las de la endodermis y los vasos de las raíces infectadas no presentan cambios morfológicos.

Se distinguen dos tipos de endomicorrizas:

- **aquellas con hongos tabicados** pueden subdividirse en las de las *Ericaceae* y familias relacionadas y las presentes en las *Orchidaceae*
- **las que albergan hongos no tabicados: Zygomycotina.**

Constituyen un grupo heterogéneo, incluyen plantas de muy variada taxonomía y se conocían como micorrizas **vesículo-arbusculares (V-A)**, hoy mejor definidas como **arbusculares (A)**, ya que las vesículas pueden o no estar presentes y son las que han recibido mayor atención en los últimos tiempos.

Es realmente importante el volumen de publicaciones sobre este tema desde la década del 70 y distintas ramas del conocimiento se sienten atraídos por estas asociaciones en las cuales el hongo y la planta obtienen mutuos beneficios.

Las demarcaciones entre los distintos tipos de endomicorrizas no son claras y existen muchas superposiciones. En algunas del tipo erical-arbustóide puede presentarse una vaina fúngica alrededor de las raíces, como en las ectomicorrizas. Especies de *Endogonio*, caracterizado como hongo que forma micorrizas A, pueden formar ectomicorrizas con especies de *Pinus*. Incluso más de una especie vegetal puede presentar ecto y endomicorrizas.

Micorrizas arbusculares (A)

Estas asociaciones son las más numerosas, las presentan la mayoría de las fanerógamas, de lo que se deduce el enorme potencial económico que puede derivarse de un correcto manejo de ellas en suelos de baja fertilidad (figura 8 del **Anexo Práctico**)

Los estudios se han incrementado mucho en los últimos años y se trata de seleccionar las mejores combinaciones planta-hongo con el objeto de inocular cultivos de interés. En las leguminosas se tienden a usar inoculantes dobles, con rhizobio y esporas del hongo.

Los hospedantes se encuentran distribuidos en las principales familias cultivadas, las gramíneas y leguminosas. Muy pocas de las familias examinadas carecen de endomicorrizas A. Se piensa que *Ericales*, *Orquidaceae* y ciertas familias típicamente ectomicorríticas como *Pinaceae* y *Betulaceae*, carecen de micorrizas arbusculares.

Han sido descritas en cultivos muy variados, como maíz, maní, trigo, citrus, manzanos, papas, porotos, soja, café, caña de azúcar, hasta plantas silvestres, árboles como roble, fresno y plantas herbáceas, en variadas zonas ecológicas.

Generalmente sólo están ausentes en suelos muy húmedos, en plantas sumergidas. Son más abundantes en suelos de baja fertilidad, como todos los tipos de micorrizas, y algunas prácticas agrícolas, como la fertilización, pueden disminuir su incidencia.

Como la morfología de las raíces cambia muy poco, pasaron mucho tiempo inadvertidas. Además, la **dificultad del endofito para desarrollarse como en medio de cultivo**, limitó los estudios. Las publicaciones son muy numerosas en los últimos años.

El endofito

Los hongos son no-tabicados y se los ubica entre los **Zygomycotina**, del orden *Glomales* (familias *Glomaceae*, *Acaulosporaceae* y *Gigasporaceae* y *Endogonales* (familias *Gigasporaceae* y *Endogonaceae* (cuadro 4)

Cuadro 4 - Sistemática de *Zygomycotina* micorrízicos y tipo de micorrizas formadas

Orden	Suborden	Familia	Género	Micorriza
<i>Glomales</i>	<i>Glominae</i>	<i>Glomaceae</i>	<i>Glomus</i>	V-A
			<i>Sclerocystis</i>	V-A
		<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>	V-A
			<i>Entrophospora</i>	V-A
	<i>Gigasporinae</i>	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i>	A
			<i>Scutellospora</i>	A
<i>Endogonales</i>	<i>Endogonaceae</i>	<i>Endogone</i>		A, EC

Como estos hongos no han logrado crecer en medios de cultivo la taxonomía se basa en características de las esporas (Schenck y Pérez, 1988), que se colectan de suelo rizosférico por técnicas de **tamizado húmedo y decantación** (figura 9 del **Anexo Práctico**). El empleo de gradientes de sacarosa ayuda a separar las esporas de partículas inertes, huevos de insectos, etc. Se emplean combinaciones de técnicas (**Anexo Práctico**, Honrubia *et al*, 1992, Frioni, 1990).

Glomus puede presentar esporocarpos o no con clamidosporas generalmente terminales en una hifa indiferenciada, las de *Sclerocystis* se ubican dentro de esporocarpos, en capa simple. *Gigaspora* posee azigosporas en extremo de célula alargada en una hifa que se proyecta hacia la espóra y *Acaulospora* no forma esporocarpo y las esporas están ubicadas en hifas próximas a una vesícula de gran tamaño.

Con estas esporas es posible realizar ensayos de síntesis de endomicorrizas y probar la eficiencia de distintas combinaciones planta-endofito. El empleo de macerados de raíces micorrizadas no ofrece las mismas garantías. La inoculación con esporas desinfectadas mostró que el rango de hospedantes para la mayoría de los endofitos estudiados es amplio, hecho que contradice la incapacidad del hongo para desarrollarse fuera del hospedante.

Colonización

Es necesario efectuar observaciones al microscopio de cortes coloreados, previamente tratados con KOH a los efectos de clarificar las células, eliminando polímeros de la pared con técnica (**Anexo Práctico**, Sieverding y Barea, 1991), ya que naturalmente las raíces no permiten visualizar estructuras internas. Las hifas del hongo penetran desde el suelo y se presentan tanto inter como intracelularmente, en la corteza. La endodermis, meristema y vasos no son invadidos.

Se reconocen **estructuras fúngicas** características

- **los arbúsculos** que se forman por repetidas divisiones dicotómicas de una hifa, presentando el aspecto arborescente característico, llamados también **haustorios o apresorios**, presentan gran superficie de intercambio con el hospedante. Membrana del hospedante acompaña a la hifa (**plasmalema**) y es a este nivel que se realizan la transferencia de nutrientes. Presentan viabilidad sólo por algunos días, son digeridos por la planta y su formación recomienza. En ciertos estados de digestión, los arbúsculos forman masas granulares y son lentamente absorbidos por el hospedante
- **las vesículas** son estructuras de gruesas paredes, que se desarrollan en extremos de hifas inter o intracelularmente, a medida que la infección progresa, aunque se las ha descrito en etapas tempranas de la colonización. Funcionan como órganos de almacenamiento de grasas, aceites (figura 8 del **Anexo Práctico**).
- **las hifas** que se desarrollan dentro de la raíz están conectadas a un fino micelio que se extiende en el suelo vecino. Los ápices radicales no se presentan frecuentemente colonizados, como tampoco las raíces gruesas.
- **las esporas** presentes en las células colonizadas y en el suelo vecino. Su morfología permite la caracterización de especies.

Se suele determinar la longitud de la raíz con alguna de las estructuras de los hongos A, observando segmentos de 1 cm a intervalos regulares. Esta longitud puede superar a un tercio del total en muchas plantas cultivadas y superar 70-80%.

Ecología

Muchos son los factores que afectan la formación y desarrollo de las micorrizas A. La fotosíntesis es uno de los más importantes, pero el manejo de los cultivos (fertilización, biocidas, rotaciones), la abundancia de inóculo en los suelos, la susceptibilidad de la planta, las condiciones de temperatura, humedad, pH, estación del año, afectarán el grado y la eficiencia de la asociación.

- **Fotosíntesis:** con CO₂ marcado se demostró la transferencia de compuestos carbonados hacia el hongo. Sombreado o corte de la parte aérea afectan la micorrización. El efecto estacional incide en la colonización, ésta aumenta en la estación de activo crecimiento vegetal.

La incidencia de la micorrización es mayor cuando la actividad biológica del cultivo es más intensa, con preponderancia de arbúsculos, responsables de los intercambios nutritivos con el hospedante. Las hifas y esporas contribuyen a la propagación del endofito y las vesículas almacenan nutrientes que el hongo moviliza en condiciones adversas.

Se reconocen tres fases en el desarrollo de las endomicorrizas

- **una latencia inicial** atribuida al desarrollo de las plántulas y germinación de esporas, el crecimiento del tubo de germinación y la colonización (20-25 días)
- **intenso desarrollo** de la micorriza, de unos 30 días, coincide con crecimiento de la parte aérea y del micelio externo, facilitando las colonizaciones
- **fase de equilibrio**, donde la proporción de raíces micorrizadas y no micorrizadas permanece constante, coincide con la etapa de fructificación del hospedante y continúa hasta la senectud.

Las endomicorrizas colaboran con la nutrición del vegetal durante el período de máximo desarrollo. Otros factores del ambiente, como **la luz y la temperatura**, afectan el desarrollo del hospedante y por ende la disponibilidad de nutrientes para el hongo. Existe correlación entre grado de infección y nivel de hidratos de carbono en jóvenes plántulas.

- **La temperatura** del suelo parece afectar más la actividad fisiológica de la micorriza que su desarrollo
- **La aireación:** la escasa infección en suelos inundados está relacionada a la falta de oxígeno
- **La fertilización** afecta el establecimiento del hongo. La inhibición por fosfatos solubles ha sido bien documentada: cuando la concentración de P en los tejidos vegetales se vuelve muy alta, la morfología del hongo cambia drásticamente y eventualmente muere. Los fertilizantes nitrogenados también afectan a esa simbiosis, pero no existe acuerdo sobre los mecanismos involucrados. Se especula sobre la teoría de los hidratos de carbono de Björkman: el nitrógeno, al incrementar la síntesis de proteínas, disminuiría el aporte de azúcares que estimulan la colonización endomicorrícica. En condiciones naturales, se observa variación en la sensibilidad de los distintos endofitos frente al nitrógeno.
- **Los pesticidas** también afectan al proceso: muchos fungicidas e insecticidas han sido referidos como inhibidores. Es necesario tener en cuenta estos efectos en las prácticas de inoculación.
- **Las interacciones con otros microorganismos** del suelo afectan la germinación y crecimiento de esporas de hongos VAM. Azcón-Aguilar y Barea (1992) resumen estos efectos:

detoxificación del medio: remoción de inhibidores, presentes en el suelo o producidos por los métodos de esterilización, ejemplo, metales pesados

producción de sustancias bióticas, solubles en agua o volátiles, como aminoácidos, vitaminas, fitohormonas

otros efectos incluyen cambios en el pH, como en el caso de los solubilizadores de fosfatos.

La inoculación con esporas de hongos endomicorrícicos y rizobios ha tenido éxito en la implantación y rendimientos de leguminosas: los rizobios favorecerían la micorrización por la producción de polisacáridos y de poligalactourosa en el sitio de infección. Otras enzimas, como las pectinolíticas, producidas por bacterias del suelo, favorecen también la micorrización (proceso relacionado en gran parte a la producción de enzimas, ya que los hongos no parecen entrar por heridas).

El cuadro 5 publicado por Frioni, (1990) muestra los resultados de inoculación de plántulas de soja con *R. japonicum* y una mezcla de esporas, hifas, micelio de hongos endomicorrícicos -probablemente *Glomus fasciculatus* (E3) y *Glomus mosseae* (YV)- y de trozos de raíces colonizadas, con distintas dosis de fosfato de roca.

Cuadro 5 - Efecto de los tratamientos sobre plantas de soja (media de 5 repeticiones), nivel de fosfato de roca 0,12%

Tratamiento	p. seco parte aérea (mg)	p. seco raíz (mg)	Nº nódulos Por planta	% colonizac por micorr
Testigo	155	60	0	0
rizobio (Rh)	161	64	6	0
ME3	162	63	0	62
MYV	161	68	0	67
ME3 + Rh	320	117	16	88
MYV + Rh	357	136	16	90

Se aprecia que el cultivo respondió positivamente a la acción conjunta de rizobio y endomicorizas V-A, en presencia de fosfato de roca, incrementando su peso seco y nodulación. La inoculación conjunta permitió un aprovechamiento más eficiente y rápido del fertilizante fosfatado.

Beneficios para la planta

En general cultivos creciendo en suelos deficientes en P responden rápidamente a la inoculación y en las primeras semanas ya se aprecian diferencias en el desarrollo de plántulas inoculadas y a los pocos días se visualizan los arbúsculos intracelulares. En general, se encuentra que la respuesta a la micorrización está inversamente correlacionada con el contenido de P lábil del suelo.

Incrementos en la absorción de fosfatos

Se han postulado varios mecanismos para explicar la mayor absorción de fósforo por plantas micorrizadas (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991) (figura 2).

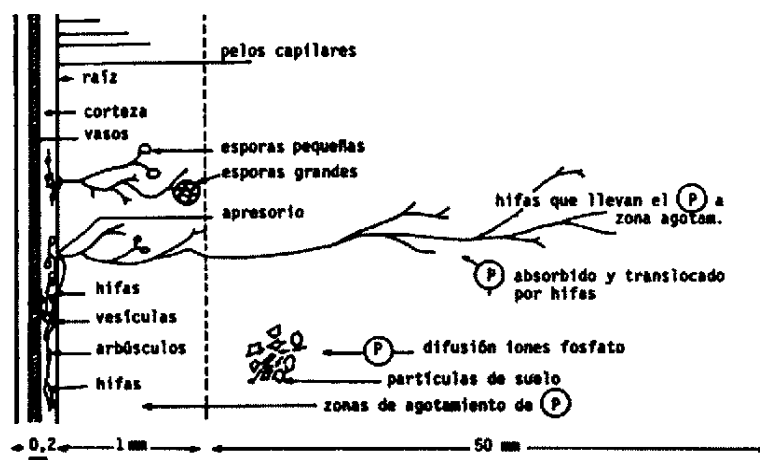
Absorción de P por las hifas El P^{32} se acumula en estructuras fúngicas, a partir de la fracción soluble, en ensayos de corta duración. Pero este no puede ser el único mecanismo en suelos pobres en nutrientes, ya que el nivel de iones fosfatos que puede llegar a la superficie de la raíz, es muy bajo. La fracción asimilable o intercambiable de fosfato representa sólo entre el 1 y el 5% del contenido total de P en los suelos. Los hongos A, al mismo tiempo que incrementan la capacidad de absorción de fosfato asimilable, podrían también solubilizar fuentes no disponibles o escasamente disponibles. La respuesta de plantas micorrizadas al agregado de fuentes insolubles de P como fosfato de roca, hidroxiapatita, parecerían apoyar esta posibilidad. Pero la hipótesis más aceptada sostiene que los efectos se deben a una absorción más eficiente de los iones fosfato de la solución del suelo, por parte del hongo.

Translocación de P a lo largo de las hifas. Las hifas acumulan grandes cantidades de P que podría interferir en el metabolismo celular, lo que no ocurre por su rápida conversión en **polifosfato**, osmóticamente inactivo. Los gránulos, contenidos en vacuolas que pueden representar entre un 16 y 40% del total de P en estos hongos, se evidencian en el microscopio electrónico. La translocación tiene lugar por corrientes citoplasmáticas rápidas. Los hongos poseen las enzimas necesarias para la síntesis y degradación de los polifosfatos, así como fosfatasa alcalina, que disminuye con la fertilización fosfatada.

Los hongos micorrícicos pueden contribuir entonces a:

- **la mineralización de P orgánico** por actividad de fosfatasas localizadas en arbúsculos maduros e hifas intercelulares y
- **la solubilización de P insoluble** (fosfato tricálcico, hidroxiapatita, polvo de roca) mediante la producción de ácidos. La selección de inoculantes se realiza incluyendo estas propiedades

Figura 2 - Esquema de raíz con micorrizas arbusculares y toma de fosfatos



Transferencia de P a la planta. Las causas y los mecanismos que controlan la liberación de fosfatos por el hongo A a células radicales, es motivo de especulación. La interfase entre ambos facilita los intercambios, se ha referido un incremento en la permeabilidad de la membrana de la hifa inducida por el hospedador, la transferencia de fosfatos estaría acoplada de alguna manera a la transferencia de carbohidratos desde el hospedador.

Otros beneficios: numerosos minerales son absorbidos en mayor grado por plantas micorrizadas con hongos V-A, pero no existen referencias sobre absorción incrementada de iones móviles en el suelo, como los nitratos. La toma de **agua** parecería estar incrementada en micorrizas V-A y la resistencia a condiciones de sequedad se atribuye a la capacidad de la planta micorrizada para mantener un adecuado nivel de fósforo ya que la baja humedad disminuye la movilidad de los iones fosfato, más que a un efecto directo sobre la absorción del agua.

Se cita también la producción de **fitohormonas**, como lo hacen bacterias y otros organismos del suelo.

Su balance resulta de fundamental importancia en la regulación del crecimiento vegetal.

Las células de la corteza colonizadas con hongos que forman micorrizas arbusculares incrementan las mitocondrias, retículo endoplasmático, clorofila, respiración, tamaño del núcleo y disminuyen su contenido en almidón y la invasión por hongos patógenos.

Beneficios para el hongo

Ya señalados en el caso de los hongos ectomicorrícicos: reciben de la planta nutrientes, sobre todo **hidratos de carbono** en las primeras etapas de la colonización. La estimulación en la producción de clorofila y una alteración en la permeabilidad de las membranas evitan pérdidas de energía en la fotofosforilación y explican el hecho de que una incrementada actividad fotosintética compensa el flujo de carbono hacia el hongo, evitando disminuir la materia seca de la planta.

Inoculación

Existen numerosas publicaciones sobre efectos en los rendimientos de varios cultivos luego de la inoculación con *Endogonaceae*, sobre todo a nivel experimental. La inoculación es promisorio en el caso de plantas de valor económico: ornamentales y micropropagadas (citrus, café, etc). No se puede pensar por el momento su uso en cultivos extensivos. Para que la inoculación sea exitosa se deben reunir una serie de condiciones:

- **ausencia o bajo potencial de inóculo de hongos endomicorrícicos nativos**
- **alta competencia** del inóculo en caso de que la población nativa sea alta y gran capacidad para estimular la toma de nutrientes y el crecimiento vegetal.

Las características requeridas para emplear un hongo A como inoculante son similares a las exigidas a cepas de rhizobios: **infectividad, efectividad, colonización y sobrevivencia en la rizosfera y en el suelo.**

Existe poca especificidad entre las asociaciones arbusculares y las plantas. En cultivos anuales, la sobrevivencia debe ser considerada para eliminar los costos de reinoculación.

La selección inicial debe incluir hongos que produzcan esporas que germinen rápidamente, hifas que crezcan bien en el suelo y que colonicen extensivamente al sistema radical. Las condiciones experimentales para la selección de cepas son las mismas que para rhizobios.

El nivel de fósforo de los suelos empleados debe ser similar al de los suelos que van a ser inoculados. Generalmente se esterilizan los suelos en los ensayos maceteros, pero se aconseja incluir un control no esterilizado para comparar el comportamiento del inóculo con la población nativa de hongos que forman micorrizas arbusculares.

El inóculo:

- **esporas** colectadas mediante técnicas trabajosas de tamizado a partir de suelo rizosférico
- **raíces colonizadas** picadas
- **mezcla de suelo con raíces de plantas trampa** (sorgo, cebolla, etc) inoculadas con esporas, crecidas y luego sometidas a estrés (sequedad) a los efectos de que el hongo esporule.

En la inoculación de viveros se pueden incorporar las esporas con las semillas o incluirlas en el transplante. En suelos de muy bajo nivel de nutrientes se suele incorporar un fertilizante fosfatado de baja solubilidad.

A modo de repaso el cuadro 6 compara características de las ectomicorrizas y las endo del tipo arbusculares (A).

Perspectivas

El efecto de las endomicorrizas arbusculares en el establecimiento y mantención del nivel de nutrientes no ha sido aún establecido en la agricultura a gran escala. Se requieren mayores estudios sobre la respuesta a la inoculación, pero se estima, que su introducción puede disminuir los niveles de fertilizantes requeridos sobre todo en la fase de establecimiento de los cultivos.

La incapacidad de los hongos A de desarrollarse en cultivo puro constituye la principal limitación en estudios fisiológicos, genéticos, taxonómicos y por supuesto en la preparación de inoculantes.

Cuadro 6 - Características de ecto y endomicorrizas

Endomicorrizas	Ectomicorrizas
presentes en un 97% fanerógamas y algunos árboles	Presentes en aprox.3% de fanerógamas, sobretodo forestales
no visibles a simple vista	Visibles macroscópicamente
estructuras dentro células corticales de la raíz: arbusculos, vesículas, y esporas	Manto fúngico, a veces coloreado, red de Hartig; hifas intercelulares, rara vez penetran en las células
forman carpóforos, esporas y/o elementos de resistencia en el suelo, no visibles	en general forman carpóforos visibles (aéreos o hipogeos)
hongos no tabicados Zygomycotina (Endogonales)	Basidiomycotina, Ascomycotina micelio tabicado
aislados de suelo y raíz no crecen en medios usuales de cultivo	Idem, cultivados en medios de laboratorio a partir de esporas o hifas
fructifican en presencia del hospedante	no fructifican en medios de laboratorio, salvo excepciones

inoculación en pequeña y mediana escala con esporas o suelo y raíces de plantas trampa	Inoculación con mantillo, esporas o cultivos de micelio y/o esporas. Inoculantes comerciales
pueden conservarse a baja temperatura por 1-2 años	Pueden conservarse mucho tiempo en medios artificiales
no se conocen especies venenosas ni comestibles	Algunas especies comestibles y otras altamente venenosas
requieren al hospedante para crecer	no lo requieren

Bibliografía

- AGERER, R. 1994 Characterization of Ectomycorrhiza, en : **Techniques for Mycorrhizal Research**, J. R. Norris, D. Read y A. K. Varma (eds), Academic Press: 25-73, London
- ALLEN, M.F. 1991 (ed) **Mycorrhizal Functioning, An integrative Plant-Fungal Process**, Chapman & Hall, New York, 534 pp.
- ALVAREZ, I. F. 1991 Ecología, fisiología e implicancias prácticas de las ectomicorrizas, en **Fijación y Movilización de Nutrientes**, vol II, Colección Nuevas tendencias, Consejo Superior de Investigaciones científicas, Madrid: 247-259
- AZCON-AGUILAR, C. y J. M. BAREA, 1992 Interactions between Mycorrhizal Fungi and other Rhizosphere Microorganisms, en: **Mycorrhizal Functioning, an Integrative Plant Fungal Process**, M.F. Allen (ed), Chapman & Hall, New York: 163-198
- BAREA, J. M., C. AZCON-AGUILAR, J. A. OCAMPO y R. AZCON 1991 Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares, en : **Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes, Vol II**, Colección Nuevas Tendencias, vol 18, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid: 149-173
- FRIONI, L. 1990 **Ecología Microbiana del Suelo**, Depto. Publicaciones de la Universidad de la república, Montevideo, 517 pp.
- FRIONI, L., VOLFOVICZ, R. AND H. MINASIAN. 1998 Ectomycorrhizae and endomycorrhizae in native legume trees in Uruguay. **Forest Ecology and Management** 115: 41-47
- HARLEY, J. L. 1994 Introduction: The State of Art, en : **Techniques for Mycorrhizal Research**, J. R. Norris, D. Read y A. K. Varma, Academic Press, pp: 1-23
- HONRUBIA, M., P. TORRES, G. DIAZ y A. MORTE, 1994 **Biotecnología Forestal: Técnicas de Micorrización y Micropropagación de Plantas**, Universidad de Murcia, 167 pp.
- MALVAREZ, G., G. MAJOR, V. CURBELO y L. FRIONI, 1997 Hongos ectomicorrícicos en *Eucalyptus grandis*. Agorciencia, vol 1: 38-43, Facultad de Agronomía, Montevideo.
- MARX, D. H., J. L. RUEHLE y C. E. CORDELL, 1991 Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza, en **Methods in Microbiology, vol 23, Techniques for the Study of Mycorrhiza**, J. R. Norris, D. J. Read y A. K. Varma (eds), Academic Press, London: 383-412.
- MOSER, M. y K. HASELWANDTER, 1983: Ecophysiology of mycorrhizal symbiosis, en **Physiological Plant Ecology III**, Lange, O. L.; P. S. Nobel; C. B. Osmond y H. Zeigler (eds.), Encycl. Plant Physiol. N. Series, vol. 12, Springer-Verlag, Berlín: 391-421.
- NORRIS, J.R., D. READ y A.K. VARMA (eds) 1994 **Techniques for Mycorrhizal Research**, Academic Press, London, New York
- SCHENCK, N.C. y Y.PEREZ 1988 **Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi**, Univ.Florida, Gainesville, 241 pp

- SIEVERDING, E. 1991 **Vesicular-arbuscular mycorrhizal management in tropical agrosystems.** GTZ GmbH, Eschborn, 371 pp.
- SIQUEIRA, J. O. y A. A. FRANCO 1988 Micorrizas, en : **Biotechnologia do Solo**, MEC-ESAL-FAEPE-ABEAS, Brasília, DF: : 125-177
- SIQUEIRA, J. O., F. M. de S. MOREIRA, B. M. GRISI, M. HUNGRIA y R. S. ARAUJO 1994 Micorrizas, en : **Microorganismos e Processos Biológicos do Solo: Perspectiva Ambiental**, EMBRAPA-SPI, Brasília, DF: 95-117
- SIEVERDING, E. y J. M. BAREA 1991 Perspectivas de la inoculación de sistemas de producción vegetal con hongos formadores de micorrizas VA, en : **Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes, vol II**, Colección Nuevas tendencias, CSIC, Madrid: 221-245
- SINGER, R. 1975 **The Agaricales in Modern Taxonomy**, Cramer (ED), Vaduz
- WALKER, G. D. y C. LI. POWELL 1979 Vesicular-arbuscular mycorrhiza in white clover: a scanning electron microscope an X-ray microanalytical study, New Z. J. Bot. 17: : 55-59.

Capítulo 18

Promoción directa del crecimiento vegetal

Promoción indirecta: Control biológico

Los efectos de los microorganismos rizosféricos sobre a las plantas pueden resumirse en:

Neutros: no afectan el crecimiento

Benéficos: existe creciente evidencia de que la microflora saprofita de la rizosfera incluye componentes benéficos que pueden incrementar el crecimiento vegetal y los rendimientos significativamente,

Deletéreos: que pueden afectar negativamente el crecimiento vegetal, sin necesariamente parasitar al tejido (alteraciones en el aporte de agua, iones y sustancias promotoras del crecimiento vegetal, cambiando las funciones y/o limitando el crecimiento de raíces).

Patógenos: disminuyen el rendimiento por producción de enfermedades: numerosas bacterias, actinomicetes, hongos producen enfermedades que provocan importantes pérdidas en los cultivos.

En el cuadro 1 se muestran estos efectos.

Cuadro 1 - Efecto de los microorganismos sobre las plantas

Benéficos	FBN, antibiosis, sustancias promotoras, biocontrol, estabilización del suelo, liberación de nutrientes (mineralización, solubilización), degradación de fitotóxicos
Neutros o variables	adhesión, liberación de enzimas, competencia, alelopatías, flujo de nutrientes
Perjudiciales	fitotoxicidad, infección

Ejemplos de ellos:

1. Microorganismos benéficos

Bacterias fijadoras de N₂:

- no simbióticos: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Acetobacter*
- simbióticos: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Azorhizobium*

Rizobacterias estimulantes del crecimiento vegetal (PGPR en inglés)

- solubilización de Pi
- liberación sustancias estimulantes crecimiento
- mayor absorción de agua y de nutrientes
- antagonistas de patógenos
- degradación de sustancias fitotóxicas

Hongos micorríticos

- ectomicorríticos: *Pisolithus*, *Suillus*, *Laccaria*
- endomicorríticos: *Glomus*, *Acaulospora*

Microorganismos empleados en control biológico

- antagonistas de bacterias (*Agrobacterium tumefaciens*)
- antagonistas de hongos (bacterias, otros hongos)

Microorganismos en la rehabilitación de suelos

- revegetación
- manejo de residuos tóxicos
- solubilización de fosfatos

Técnicas de estimulación de este grupo

- manejo de residuos (abonos, pajas)
- inoculación

2. Microorganismos desfavorables

Asociados al mantillo

- inmovilizantes del N
- síntesis de sustancias tóxicas (ácidos orgánicos, toxinas)

Rizobacterias

- reductoras de S, Fe, Mn
- antagonistas de microorganismos promotores

3. Microorganismos patógenos

- bacterias
- hongos
- los virus (entidades biológicas)

Promoción directa del crecimiento vegetal

Las rizobacterias benéficas que promueven el desarrollo vegetal se designaron como **rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, plant growing promoting rhizobacteria)** y son extensamente estudiadas por sus efectos benéficos en rendimientos de importantes cultivos (Schippers *et al.*, 1987). Hablaremos de **microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV)**, para incluir a otros grupos, como los hongos.

Los microorganismos benéficos afectan el desarrollo vegetal por:

Acción directa

aumento de la disponibilidad y toma de nutrientes minerales
provisión de sustancias promotoras del crecimiento

Acción indirecta

supresión de microorganismos deletéreos o patógenos en la rizosfera

Características de un microorganismo promotor del crecimiento vegetal (MPCV)

- desarrollo en la rizosfera, deben tener la capacidad de colonizar activamente la rizosfera y el rizoplano
 - sobrevivir a la inoculación sobre las semillas, en el suelo, en la esfermatosfera en respuesta a exudados radicales.
 - activos competidores, para persistir deben encontrarse en valores altos (10^3 - 10^6 UFC/g raíz fresca). Son sobretodo bacterias y hongos.
 - Gram negativas, como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* no fluorescentes, *Azospirillum*, miembros de las *Enterobacteriaceae*: *Enterobacter agglomerans*, *E. cloacae*, *Erwinia herbicola*, *Serratia marcescens*.
 - Gram positivas, como *Arthrobacter* y *Bacillus*: *B. cereus*, *B. subtilis*, etc.
- Otros microorganismos: *Streptomyces*, hongos: *Alternaria*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, etc).

La colonización se ve favorecida por cualidades como:

- alta velocidad de crecimiento
- movilidad que le permita acceder a nutrientes
- quimiostasis: desplazamiento hacia exudados radicales

Los mecanismos de acción se pueden agrupar en:

1. Producción de sustancias estimulantes del crecimiento vegetal. En medios de cultivo se ha verificado la producción de sustancias del tipo de las **fitohormonas**; auxinas, giberelinas, citoquininas. El ácido indol acético a bajas concentraciones promueve la elongación radical e incrementa las ramificaciones laterales (**incrementa el área radical**), mientras que mayores concentraciones pueden resultar inhibitorias. Algunos autores relacionan la producción de AIA con aumentos en la permeabilidad celular con consiguiente incremento en la exudación radical. Se han logrado los mismos efectos con la adición de giberelinas o AIA que con la inoculación con diazotrofos, como por ejemplo, *Azospirillum*, evidenciando que el efecto en los incrementos de los rendimientos se deben principalmente a estas sustancias (Fulchieri, 1992).

2. Incrementos en la capacidad de absorción de agua y minerales

Los MPCV aumentan la disponibilidad de nutrientes poco móviles (fosfatos) y su absorción por la planta. Los microorganismos solubilizadores de fósforo como *Bacillus megaterium*, *B. fluorescens* son capaces de mineralizar P orgánico (fosfatasas) o solubilizar el P inorgánico por producción de ácidos. Los incrementos en el área radical y de los pelos absorbentes favorecen la asimilación de iones como nitratos, sulfatos, sodio, potasio. La inoculación con diazotrofos como *Azospirillum* y la simbiosis con hongos ecto y endomicorríticos producen estos efectos.

3. Estimulación de la germinación y emergencia

Se verificó la producción de sustancias de tipo fenoles como las **quinonas** por *Pseudomonas* estimulan la germinación de semillas y la emergencia de plántulas.

Mecanismos de acción indirecta

Control biológico

Los microorganismos fitopatógenos causan serios deterioros en frutas, hortalizas, plantas ornamentales y pérdidas económicas. Ocurren severas enfermedades a nivel de hojas, frutos, tallos, raíces. Los tratamientos empleados en el control de estas plagas incluyen:

Control químico: innumerables sustancias de gran toxicidad se emplean en el tratamiento de enfermedades vegetales. Se calculan 500.000 toneladas de agrotóxicos usadas en el mundo al año, lo que ha despertado gran inquietud por los efectos laterales contra los animales y el hombre, la lenta biodegradación de muchos y su acumulación en aguas y suelos (capítulo 20).

Control biológico: se aprovechan efectos antagonistas de un microorganismo sobre otro para disminuir o eliminar enfermedades, sobretudo a nivel de raíces, y la inoculación de organismos seleccionados resulta una práctica cada vez más extendida a nivel de vivero. Resulta más difícil el tratamiento biológico a nivel de hojas, tallos, etc. Cada día se incrementan las investigaciones en este aspecto, ya que los microorganismos no presentan, en general, el riesgo de toxicidad de los agroquímicos y los costos de aplicación son bajos. Son muy empleados hongos y bacterias contra **insectos** plaga de vegetales.

Control integrado: práctica que resulta de la interacción de los anteriores, con el empleo de bajas dosis de sustancias químicas combinado con inoculantes biológicos.

Las ventajas y desventajas del **control biológico** de enfermedades en vegetales han sido resumidas por Gould (1990):

- **los microorganismos ofrecen mayor seguridad** en el uso en relación a muchos agentes químicos
- **no se acumulan en las cadenas alimenticias**
- **su persistencia y multiplicación evita repetidas aplicaciones**
- **raramente desarrollan resistencias** como ocurre con agentes químicos
- cuando se muestran menos efectivos que una sustancia química, ambos **se pueden combinar** en las aplicaciones
- los agentes biológicos correctamente preparados y aplicados **no son considerados peligrosos para la ecología**

Las principales **desventajas** señaladas son:

- la variabilidad genética de muchos microorganismos seleccionados, que obligaría a una selección continua
- la experimentación requerida, que incluye ensayos de laboratorio, invernáculo y campo
- las variaciones en los resultados de aplicaciones de campo (efecto de suelos, clima, etc.)
- la necesidad de asegurar su sobrevivencia en los soportes más empleados en los inoculantes comerciales.

La evidencia de control biológico se obtuvo en la década del 80 cuando monocultivos de trigo o cebada infectados con un hongo *Gaeumannomyces graminis* se trataron con un suelo **supresivo** para la enfermedad (*take-all*), es decir un suelo que no permite el desarrollo de este patógeno. Los suelos **conductivos** (que manifiestan la enfermedad) se convirtieron en supresivos, sugiriendo la participación de un factor biológico. En efecto, se encontró mayor número de pseudomonas fluorescentes antagonistas del hongo en la rizosfera de trigo en relación al resto del suelo. Actualmente, numerosas pseudomonas se reconocen efectivas en el control de esta enfermedad.

El **control biológico de enfermedades de raíces** se puede lograr de varias maneras:

- inoculación directa de las bacterias u hongos seleccionados en semillas o trozos de tallos (propagación vegetativa)
- incorporación en el suelo
- control indirecto por cambios culturales que estimulan a la microflora antagonista nativa
- control integrado, como inoculación de semillas con el agente de control biológico y dosis menores del agente químico

Un microorganismo efectivo en el control biológico deber realizar alguna de las siguientes funciones:

- colonizar rápidamente la zona radical
- producir antibióticos que antagonicen a los microorganismos patógenos
- producir compuestos que quelatan al hierro, llamados "sideróforos", que hacen menos disponible este elemento para los patógenos
- competir por sustratos esenciales para el patógeno
- competir con el patógeno por los sitios de infección
- liberar nutrientes asimilables por las plantas (N, P, etc.) y producir compuestos promotores del crecimiento de las plantas, como AIA, giberelinas, etc., que favorecen el desarrollo de las plantas.

La habilidad de un organismo para colonizar la rizosfera del hospedante es uno de los principales requerimientos para el éxito del control biológico de enfermedades de raíz.

Para que la **colonización** sea exitosa el microorganismo debe:

- moverse hacia zonas adecuadas de la raíz
- adherirse a ella
- emplear los sustratos disponibles
- competir con la microflora autóctona y
- multiplicarse sobre la raíz.

Si se inoculan las semillas, el microorganismo debe multiplicarse en la espermatósfera antes de establecerse en la radícula emergente. La **quimiostasis** ayuda a desplazarse hacia exudados. La adhesión a la raíz mediante unión a glicoproteínas, como las **lectinas**, ha sido reconocida como un paso crítico en la colonización. Los exudados radicales seleccionan poblaciones rizosféricas y varían con el ambiente, la genética y estado de desarrollo de la planta y afectan la susceptibilidad de los cultivos frente a enfermedades (capítulo 12).

Mecanismos en el control biológico

Los antagonismos biológicos se dan por: competencia, amensalismo, predación, parasitismo (Kapulnik, 1991) (capítulo 13).

Competencia

Se da por nutrientes (C, N, S, P, Fe, micronutrientes, etc.), espacio, agua, O₂, CO₂, luz, etc. Una colonización agresiva por estos antagonistas desplaza especies rizosféricas deletéreas disminuyendo el riesgo de reducción del crecimiento vegetal. Se reduce también el inóculo de patógenos del suelo.

Sideróforos

A pesar de que el hierro es abundante en los suelos, está muchas veces no disponible para plantas y microorganismos ya que su solubilidad es muy baja a pH neutro y alcalino. Muchos microorganismos, sobre todo especies de *Pseudomonas* producen sustancias orgánicas quelantes, de bajo PM (figura 1), con elevada afinidad por el ion férrico, denominados **sideróforos**, que son inducidos por bajas concentraciones de hierro y reprimidos por altas.

Estas sustancias favorecen las posibilidades de asimilación de este ión por la bacteria productora en ambientes de baja disponibilidad, **compitiendo** con el microorganismo deletéreo o patógeno (figura 2).

Los pigmentos fluorescentes que permiten identificar a estas pseudomonas constituyen muchas veces sideróforos, como la **pioverdina**, **seudobactina**. Una proteína de membrana específica (**permeasa**) transporta el complejo organo-metálico al citoplasma, donde sistemas ferrisideróforo-

reductasa reducen el hierro y el resultante hierro ferroso es liberado y asimilado por la planta. El sideróforo queda disponible para reiniciar el ciclo.

Figura 1- Esquema del sideróforo pseudobactina

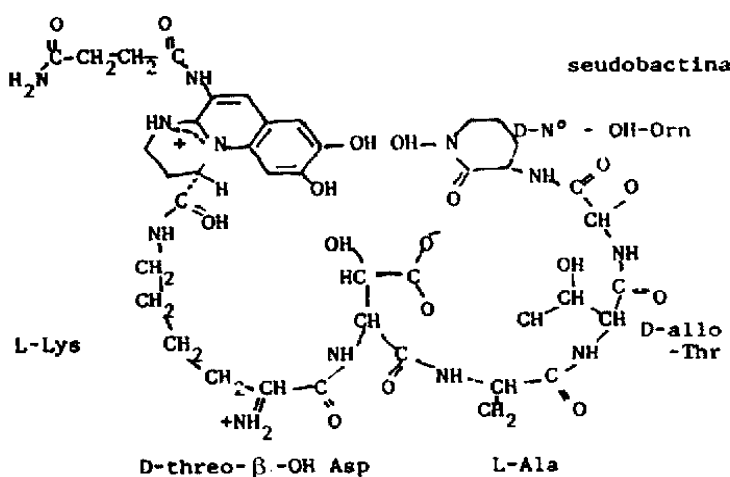
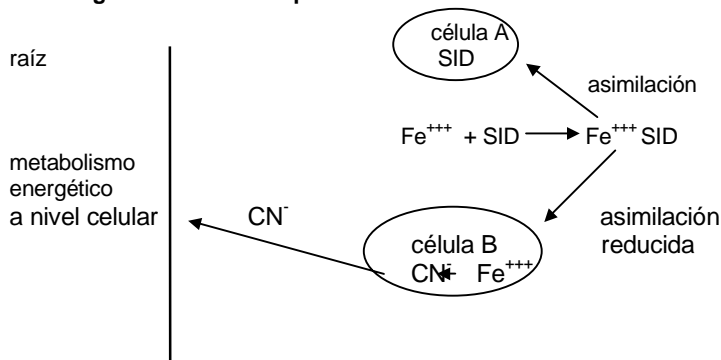


Figura 2- Mecanismo de acción de sideróforos. A-célula productora de sideróforos, B- célula de microorganismo deletéreo productor de cianuro. SID- sideróforo



Muchos microorganismos deletéreos producen **HCN** (ácido cianhídrico) que inhibe el metabolismo energético a nivel de la **CTE** (figura 2). Los microorganismos productores de sideróforos compiten con estos organismos por el hierro, inhibiendo el efecto deletéreo en el cultivo. A pH inferiores a 6,0 el hierro disponible (ferroso) aumenta y los sideróforos son menos efectivos.

Para determinar si la producción de estas sustancias es la causa de la supresión de una enfermedad, se agrega Fe soluble al sistema suelo-plantas: si reaparece la enfermedad la competencia por el hierro puede haber sido la causa de la supresión.

Otra forma de demostrar esto es mediante el empleo de mutantes sideróforo negativas (**sid⁻**) obtenidas con ayuda de transposones (**Tn5**), su inoculación no limita la enfermedad, pero si lo hace la recombinante con el segmento de ADN productor del sideróforo aislado de la cepa salvaje.

Numerosas bacterias y hongos producen sideróforos, como *Azospirillum*, *Rhizobium*, etc. y en la selección de cepas para la preparación de inoculantes se incluye la producción de sideróforos para favorecer su supremacía en ambientes con hierro no disponible. Muchos pigmentos fluorescentes aislados de *Pseudomonas* poseen la propiedad de complejar el hierro e inhibir a hongos fitopatógenos. La inhibición es revertida por el agregado de hierro. La inoculación de estas bacterias y su sideróforo, **pseudobactina**, a suelos conductivos los convierten en supresivos.

Este suelo revierte a su estado original conductivo por:

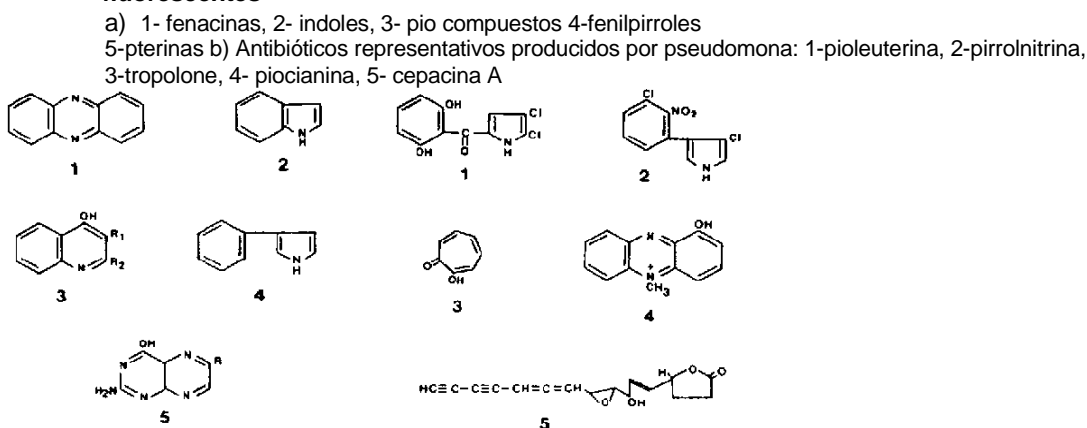
- la adición de hierro
- al bajar el pH, debido probablemente a una incrementada disponibilidad del hierro a bajos pH

Antibiosis

Uno de los principales mecanismos de control biológico es la producción de metabolitos secundarios tóxicos, como los **antibióticos**, o toxinas específicas como las **bacteriocinas** que actúan sobre hongos patógenos induciendo fungistasis, inhibiendo la germinación, lisando el micelio o ejerciendo efectos fungicidas. Son moléculas orgánicas liberadas por los microorganismos al ambiente donde pueden perder efectividad a distancia de las células productoras porque son adsorbidas a los coloides orgánicos o minerales o son degradadas química o biológicamente. La aparición de resistencias en los patógenos, codificada en general en **plásmidos**, limita muchas veces su efectividad.

Las pseudomonas fluorescentes han sido consideradas para el control biológico ya que producen gran número de metabolitos secundarios, (figura 3, a y b), muchos con acción antimicrobiana (1 a 5 figura 3a). Otras pseudomonas producen potentes antibióticos (1 a 5, fig 3b) como **tropolone**, bacteriostático y bactericida de amplio rango de bacterias y también fungicida. Producen también HCN.

Figura 3- Metabolitos secundarios producidos por pseudomonas fluorescentes



Algunas pseudomonas han sido patentadas y se emplean en inoculantes comerciales:

***Pseudomonas putida* WCS358**, seleccionada para papa que incrementó rendimientos en 13% en el campo. Su efecto es mayor en rotaciones cortas (unos 3 años). Su efecto es la producción de sideróforos limitando el hierro a la microflora deletérea que produce HCN.

***Pseudomonas fluorescens* 2-79**, efectiva en maíz con enfermedades producidas por *Gaeumannomyces graminis var tritici*, por sideróforos y antibióticos.

***Pseudomonas fluorescens* CHAO** que produce el sideróforo **pioverdina**, ácido salicílico y tres antibióticos, entre ellos **pioluteorina**

Las condiciones químicas y nutricionales del suelo afectan la producción de los antibióticos: el pH, nutrientes inorgánicos, edad del cultivo. En medios de cultivo se observó que estas sustancias se producen en la segunda mitad de la fase estacionaria, cuando las fuentes minerales se agotan.

La evidencia del rol de estas sustancias en el control biológico se obtuvo a partir de los trabajos de Howell y Stipanovic (1980) quienes aislaron de rizosfera de algodón una cepa de *P. fluorescens* antagonista de *Rhizoctonia solani* y *Phythium ultimum*, que produce dos antibióticos: **pioleutorina**, activa contra *P. ultimum* y **pirrolnitrina**, activa contra *R. solani*. Esta bacteria inoculada en semillas de algodón lo protegió de la enfermedad conocida como **damping-off** producida por ambos hongos. La aplicación de los antibióticos a las semillas protegió a la planta de esta enfermedad.

Pero la confirmación de este rol se realiza con el empleo de mutantes antibiótico negativas, que no protegen a la planta, mientras que la cepa parental si la protege así como la mutante complementada con el ADN responsable de la síntesis del antibiótico.

Otra clase de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias son las **bacteriocinas**, efectivas contra microorganismos estrechamente relacionados (muchas veces de la misma especie). Uno de las primeras aplicaciones comerciales para el control biológico de enfermedades de raíces ha sido el uso de *Agrobacterium radiobacter* K84 para el control de *Agrobacterium tumefaciens* causante de la

enfermedad conocida como "agallas de corona", mediante la producción de "**Agrocina 84**", codificada por un plásmido, cuya transferencia a cepas de *A. tumefaciens* las convierte en resistentes.

Micoparasitismo

El empleo de hongos como agentes de biocontrol se ha extendido mucho en los últimos años y la literatura es muy amplia sobre resultados de antagonismo de patógenos, sobretudo de otros hongos (Howell, 1990). El grupo de *Hyphomycetes* más empleado en el control biológico lo integran los géneros: *Verticillium*, *Trichoderma* y *Gliocladium*, los 3 son micoparásitos necrotróficos (matan inmediatamente del contacto con el hospedante) y buenos saprofitas que crecen en medios corrientes de laboratorio. *V. biguttatum* se encuentra en asociación con esclerocios de *Rhizoctonia solani* y se usa en el tratamiento de semillas de papa, donde reduce significativamente el número de esclerocios patógenos en los nuevos tubérculos.

El género *Trichoderma* contiene numerosas especies usadas en el control biológico seleccionadas por su capacidad de micoparasitar a otros hongos. *T. harzianum* es la especie más empleada y el rango de especies sensibles incluye: *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Phytium aphanidermatum*, *Alternaria raphani*, *Fusarium roseum*, patógenos de muchos cultivos, como trigo, algodón. El ataque se realiza envolviendo y penetrando a las hifas y estructuras de resistencia. La entrada se logra por orificios en la pared mediante la producción de enzimas como **beta 1-3 glucanasa y quitinasa**. El reconocimiento de las hifas está mediado por lectinas.

Especies de *Trichoderma* producen además **antibióticos y fitoxinas**, por lo que es son considerados importantes agentes de biocontrol. Se han señalado estimulaciones del crecimiento en cultivos inoculados en suelos estériles, lo que evidencia la producción de sustancias del tipo de las fitohormonas. Otras especies incluyen *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viridi*, que producen las típicas esporas verdes en medios de cultivo.

Un representante del género *Penicillium*, *P. vermiculatum* se emplea en biocontrol por combinación de micoparasitismo y producción de antibióticos. *P. frequentans* parasita esclerocios de numerosos hongos.

Las investigaciones sobre las posibilidades de emplear hongos como agentes de biocontrol avanzan rápidamente, aunque las técnicas de manipulación genética en hongos han prosperado menos que en bacterias. La mutagénesis en hongos es un proceso bastante inespecífico y se han realizado avances con la fusión de protoplastos a los efectos de lograr la transferencia de caracteres de interés asociados al biocontrol de una cepa de hongo a otra.

Otros mecanismos

Se han propuesto otras explicaciones de los incrementos en el crecimiento vegetal y la resistencia a enfermedades en plantas inoculadas con microorganismos de biocontrol:

- **enzimas líticas extracelulares** que destruyen la integridad de las paredes de hongos, como **quitinasas**. Se ha demostrado que las hifas de *Sclerotium rolfsii* pueden ser degradadas tanto por aislamientos de *Serratia marcescens* como por extractos acelulares de la misma cepa con actividad quitinolítica. La adición de quitina al suelo incrementa el número de bacterias y actinomicetes, muchos de ellos inducen quitinasa afectando a la población fúngica.
- **eliminación de microorganismos deletéreos de la rizosfera**: estos organismos inhiben el crecimiento vegetal por producción de metabolitos tóxicos, pero sin llegar a parasitar. Shippers *et al*, (1987) sugieren que uno de los principales grupos de bacterias deletéreas son las pseudomonas productoras de HCN. Como el hierro es necesario para la producción de HCN por estos microorganismos, también sugieren que los microorganismos del inóculo ejercen su efecto benéfico compitiendo con ellos por el hierro (figura 1b).
- **generar resistencia inducida en plantas sensibles**: se ha observado que cepas no patógenas de un hongo patógeno prevén la infección por la cepa patógena. Se explica este fenómeno por competencia entre ambas cepas por nichos ecológicos similares en el suelo.
- **inhibición de la germinación y crecimiento de hongos** por compuestos volátiles de la atmósfera del suelo, como el etileno, amonio, ha sido ocasionalmente observado.

- **aumento de la disponibilidad de nutrientes y producción de sustancias del tipo de las fitohormonas**, como el AIA, giberelinas, citoquininas, que ha sido verificada en cultivos microbianos, se postula como causa de control de enfermedades. El cultivo se desarrolla más tempranamente y su población rizosférica puede competir con el patógeno.

Desarrollo de agentes para el control biológico

A pesar de los múltiples ejemplos publicados en los últimos años sobre el éxito en la aplicación de organismos para el control biológico de enfermedades de raíces, ha habido escaso desarrollo de formulaciones comerciales. Powell (1993) señala que el mercado de agroquímicos en el mundo es de cerca de 12 mil millones de dólares, de los cuales los agentes de control biológico representan sólo un 1% (120 millones). Pero de éstos, un 92% corresponde a preparaciones secas de *Bacillus thuringensis* (Bt) que sintetizan cristales de proteínas tóxicas en cultivos esporulados y son empleados como poderosos **insecticidas**. El resto está integrado por una mezcla de productos menores.

Para este autor es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones para lograr competir con los agentes químicos de control:

- los agentes de control biológico presentan un espectro estrecho, no sólo en términos de hospedante, sino del ambiente, incluido el pH, tipo de suelo, humedad, temperatura.
- considerar los costos de selección, producción y formulación de los inoculantes
- considerar que efectos de laboratorio muchas veces no se reproducen en el campo y se necesitan numerosas experiencias antes de poder recomendar un agente biológico
- emplear el producto en el sitio de acción (semilla, suelo) resulta crítico, sobretudo en ausencia de movimientos de agua
- los más efectivos agentes de control biológico son aquellos que poseen un nicho que pueden colonizar rápidamente y sin competencia de la población indígena
- lograr buen desarrollo en medios simples de laboratorio, de bajo costo, así como formulaciones sencillas que aseguren viabilidad por períodos de tiempo que permitan su distribución.

La producción de inóculos en fermentadores y su adición a turba (como en el caso de rizobios) parece ser una alternativa para estos inoculantes.

Finalmente: se piensa que a pesar del trabajo de selección, propagación y evaluación de efectos de los inoculantes biológicos, su menor impacto en el ambiente, los convierte en alternativas promisorias en la lucha contra plagas. Goult (1990) y Campbell (1990) señalan algunas de las líneas futuras de investigación en el tema:

- dilucidación de los mecanismos involucrados en diferentes tipos de suelos
- identificación de parámetros ambientales que afectan la colonización radical
- desarrollo de procedimientos más eficientes de selección de cepas y de formulación de productos comerciales
- identificación de los genes que codifican producción de sideróforos, de antibióticos y los que permiten la colonización de las raíces
- lograr avances en la modificación genética de cepas para producir agentes superiores de biocontrol, con mayor rango de hospedantes y suelos a ser aplicados.

Alternativas a la inoculación

Muchas **prácticas de manejo** conducen al control de microorganismos fitopatógenos por estimulación de la microflora antagonista naturalmente presente, a veces en bajo nivel, en los suelos. Algunos ejemplos de estas prácticas incluyen:

- **rotaciones de cultivos:** el patógeno al no encontrar la rizosfera de la planta sensible (determinada por la naturaleza de exudados) germina y muere al no poder competir con la población nativa por los nutrientes, espacio, etc.
- **incorporación de enmiendas orgánicas,** como pajas, abonos verdes, que provocan una eclosión microbiana en respuesta a los nutrientes aportados por el residuo orgánico. En esta población estimulada se encuentran **antagonistas** que por los mecanismos señalados en este capítulo (antibiosis, competencia, predación, parasitismo), logran disminuir o eliminar a la población deletérea o patógena.

Bibliografía

CAMPBELL, R. 1990 Biological Control of Soil-Borne Diseases en: **Brighton Crop Protection Conference- Pests and Diseases**, Brighton, Section 7A-2

FULCHIERI, M. 1992 Producción de giberelinas por *Azospirillum spp.* y efecto de la inoculación sobre el contenido de giberelinas en la raíz y la promoción del crecimiento en maíz (*Zea mays, L.*). Tesis Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Río Cuarto, 170 pp

GOULD, W.D. 1990 Biological Control of Plant Root Diseases by Bacteria, en **Biotechnology of Plant-Microbe Interactions**, J.P. Naskas y Ch. Hagedorn (eds) Mac Graw-Hill, New York, pp 287-317

HOWELL, Ch.R. 1990 Fungi as Biological Biocontrol Agents, en: **Biotechnology of Plant-Microbe Interactions**, J.P. Naskas y Ch- Hagedorn (eds) Mac Graw-Hill, New York: .257-286

HOWELL, C.R. y R. D. STIPANOVIC, 1980 Suppresion of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoleutorin, *Phytopalogy* 70: 712-715

KAPULNIK, Y. 1991 Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria, en: **Plant Roots, the Hidden Half**, Waisel, Y., A. Eshel y V. Kafkafi (eds), Marcel Dekker, New York: 717-729

SHIPPERS, B., BAKKER, A.W. y P.A.H.M. BAKKER 1987 Interactions of deleteterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopatology* 25:339-358

POWELL, K.A. The commercial exploitation of microorganisms in agriculture, 1993 en: **Exploitation of Microorganisms** D.G. Jones(ed), Chapman & Hall,London:441-459

Capítulo 19

Biotransformación de residuos orgánicos

La crisis en la disponibilidad de alimentos, la escasez de combustibles y la agudización de la contaminación ambiental han conducido a que numerosos residuos de la agricultura, agroindustrias, actividad forestal, industrias, animales o el hombre sean tratados para reciclarlos y obtener alimentos, forraje, energía, fertilizantes, sustancias químicas.

Complejos sistemas microbiológicos que transforman estos residuos, resultantes de la actividad humana y que pueden llegar a provocar graves problemas de contaminación, se desarrollaron a lo largo de millones de años, sobretodo en el suelo. Como en general, la tasa de degradación de residuos orgánicos es extremadamente inferior a su tasa de generación, y además, muchos de los residuos no son productos naturales, el hombre se ve obligado a su tratamiento en el campo, donde se producen, o en plantas, especialmente diseñadas.

Los tratamientos a que son sometidos los residuos se pueden agrupar en:

- **físicos:** transformaciones termoquímicas, pirólisis (altas temperaturas)
- **químicos:** hidrólisis ácida o alcalina
- **biológicos y enzimáticos:** fermentaciones, enriquecimiento proteico para forrajes, hidrólisis enzimática.

El cuadro 1 resume estos procesos

Los **objetivos** en el tratamiento de los residuos son varios:

- **disminuir la carga contaminante** (ejemplo tratamientos de grandes volúmenes de estiércol en la industria lechera)
- **aprovechar los restos como fuente de energía** (producción de etanol, H₂, metano)
- **obtener moléculas de interés** (producción de proteínas celulares)
- **producir alimentos** (cultivo de hongos, proteínas microbianas, lombrices)

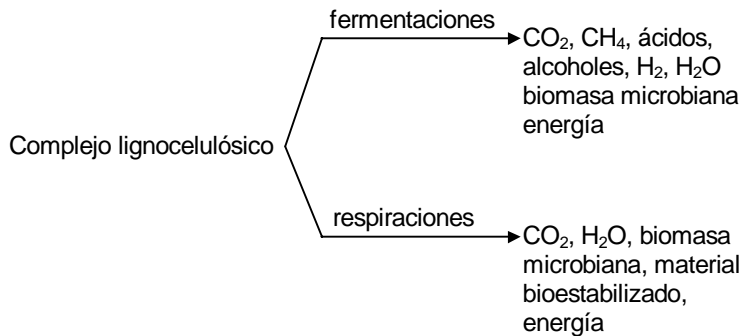
Cuadro 1- Procesos empleados en la biodegradación de residuos

biológicos	no biológicos
Orgánicos biogás, proteínas unicelulares, etanol	Orgánicos Incineración, fabricación de ladrillos
Inorgánicos lixiviación bacteriana, nitrificación-denitrificación	Inorgánicos Reciclaje de minerales

El tratamiento de un residuo puede conducir a más de un objetivo, por ejemplo, el compostaje de restos del tambo disminuye la carga contaminante y se logra un sólido estabilizado empleado como fertilizante (Frioni, de los Santos, 1998). La biodegradación anaerobia además de disminuir la contaminación ambiental, produce energía (CH₄) y un residuo empleado como fertilizante.

Procesos biológicos

En los residuos orgánicos derivados de vegetales, el complejo lignocelulósico es el más lentamente degradable en procesos aerobios o anaerobios.

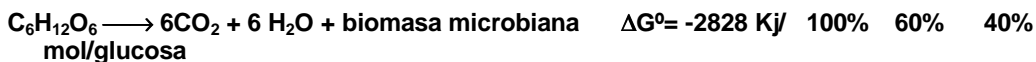


Comparación de procesos de biodegradación aerobia y anaerobia de residuos

A. Orgánicos

- de residuos de cosechas, como cáscara y pajas de cereales, aserrín, de alto contenido en lignocelulosa.

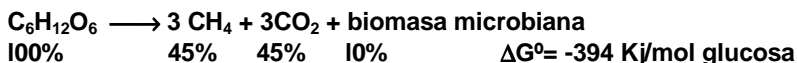
En **aerobiosis** ocurren procesos de respiración:



Como se aprecia, la alta eficiencia en la asimilación del C conduce a la producción de **gran volumen de biomasa microbiana**.

Los residuos son removidos completamente, pero el tratamiento de efluentes contaminados con materia orgánica requiere grandes superficies (lagunas) y queda un gran volumen de barros (**biomasa microbiana**), que requieren nuevos tratamientos, en general, uno anaerobio.

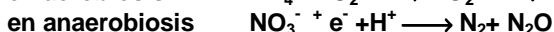
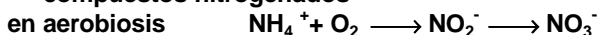
En **anaerobiosis** se dan fermentaciones y respiraciones anaerobias:



Los residuos son removidos en forma incompleta, queda amonio, SH₂, ácidos grasos, que hacen necesario un tratamiento aerobio posterior. Son, por el contrario, procesos de bajo costo que emplean pequeños reactores y originan pocos barros (residuos de biomasa y materiales lignocelulósicos no atacados).

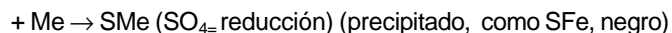
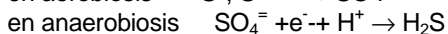
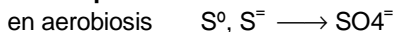
B. Inorgánicos

- compuestos nitrogenados**

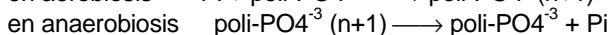
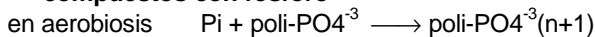


El ciclo de nitrificación y desnitrificación asegura la eliminación del N de los ecosistemas hacia la atmósfera, en forma de gases.

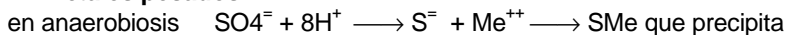
- compuestos con azufre**



- compuestos con fósforo**



- metales pesados**



Biodegradación aerobia de residuos orgánicos

Restos con alto contenido de agua

Los residuos pueden contener alto nivel de agua, como por ejemplo los efluentes de la industria láctea, aguas servidas, etc. Su tratamiento se realiza en forma continua, en dispositivos tipo piletas, que dependen de la difusión natural del aire que se mezcla con las aguas a tratar por corrientes térmicas o producidas por el viento. En algunos casos se utilizan **aireadores** mecánicos, que incrementan la difusión del aire atmosférico en el agua y aseguran vigoroso crecimiento de las bacterias aerobias.

Restos sólidos

Compostaje

Compostaje es el término que se usa para designar la **degradación aeróbica y termófila** de materiales orgánicos de diferente origen, en estado sólido realizado por comunidades microbianas quimioheterotróficas existentes en los propios residuos, bajo condiciones controladas del que se obtiene un producto estable que puede ser utilizado como fertilizante.

Las **ventajas** de emplear este proceso son:

- **no hay formación de gases de mal olor**
- **se disminuye el volumen, peso o tenor de humedad, en relación al material original**, lo que facilita el almacenamiento, transporte y empleo del residuo
- **inactivación de patógenos**
- **posibilidad de empleo del producto final (compost) en la agricultura**, contribuyendo al reciclaje de los nutrientes del residuo (Lambais, 1992)

Constituye una técnica para obtener la estabilización de la materia orgánica en forma rápida y en condiciones que no provocan inmovilización del nitrógeno en el suelo al ser aplicado. Al mineralizarse provee en forma lenta, los nutrientes que las plantas necesitan.

En la naturaleza esta estabilización se da en tiempo indeterminado, de acuerdo a las condiciones que encuentra el sustrato. El compostaje puede realizarse en:

- **pilas**, al aire libre, con o sin aereación forzada, o en
- **reactores** cerrados con control de aereación, humedad, temperatura y tiempo de retención. En estos últimos, el proceso puede completarse entre 5-7 días, mientras que en las pilas, puede llevar 3 a 8 semanas, o más para lograr un compost adecuado (Mustin, 1987).

Microflora

Es un proceso microbiológico realizado en la naturaleza por organismos nativos: bacterias, hongos y actinomicetes, principalmente, actuando en sucesión de predominancia, según la influencia de factores, como la composición química de la materia original, su relación C/N, humedad, aereación, temperatura, pH.

Los primeros sustratos atacados son hidratos de carbono simples, proteínas, compuestos solubles en alcohol y otros solventes orgánicos (ceras, grasas, cutinas). La fracción ligno-celulósica no es degradada en su totalidad y se mezcla con la biomasa microbiana en el producto final. El proceso se puede separar en dos etapas: estabilización y maduración.

Fase de estabilización: al inicio de la descomposición se da una:

- **fase mesófila**, en la que predominan bacterias y hongos productores de ácidos que atacan a la materia orgánica fácilmente degradable, generando calor que favorece el desarrollo de organismos termófilos
- **fase termófila:** a partir del 10º día, con la elevación de la temperatura, comienza esta etapa y la población dominante se compone de actinomicetes, bacterias y hongos termófilos o termotolerantes. Esta elevación de la temperatura y la consecuente alteración de la flora microbiana es influenciada, en gran parte por la disponibilidad de oxígeno.

Se produce además, la inactivación de **microorganismos patógenos** como coliformes, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Aspergillus*. Las pilas de compost más intensamente removidas al comienzo alcanzan temperaturas más elevadas, hasta **75°C**, mientras que las menos aereadas sólo llegan hasta los **60°C**. Bacterias formadoras de esporas sobrevivirán a estas temperaturas.

Esta etapa culmina al agotarse los nutrientes fácilmente empleados por los microorganismos, y el compost va perdiendo calor. La materia orgánica se ha estabilizado, acumulándose aquella de lenta degradación (fracción lignocelulósica).

Etapas de maduración: ocurre una lenta degradación de la materia orgánica hasta que el volumen se reduce aproximadamente 50%.

El material va retornando a una nueva **fase mesófila**, pero ahora con otra composición química, puesto que los nutrientes fácilmente atacables ya han sido consumidos por los microorganismos. Reaparecen, hongos y bacterias mesófilas provenientes del medio. A medida que el compost va tomando la temperatura ambiente pueden ser encontrados protozoarios, nemátodos, hormigas, miriápodos, lombrices e insectos diversos.

La **biomasa microbiana** puede representar hasta el 25% del peso total del compost.

Microorganismos presentes

El cuadro 2 presenta algunas de las especies identificadas.

Los hongos y actinomicetes son activos degradadores de la celulosa y otros materiales más resistentes. Muchas bacterias atacan la celulosa, pero hacia el final del compostaje, cuando la temperatura disminuye, son hongos y actinomicetes los que predominan. Para asegurar una buena actividad de estos organismos, es necesario mezclar la masa en forma frecuente.

Cuadro 2 - Principales microorganismos aislados de un compost

bacterias	Actinomicetes
Mesófilas <i>Cellulomonas folia</i> <i>Chondrococcus exigus</i> <i>Myxococcus fulvus</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Thiobacillus denitrificans</i> <i>Aerobacter sp.</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	Termotolerantes <i>Micromonospora vulgaris</i> <i>Nocardia brasiliensis</i> <i>Streptomyces rectus</i> <i>S. thermofuscus</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. thermoviolaceus</i> <i>Thermonospora fusca</i> <i>T. glaucus</i> <i>Thermoactinomyces sp.</i> <i>Thermopolyspora sp.</i>
Termófilas <i>Bacillus stearothermophilis</i>	
Hongos	
Mesófilos <i>Fusarium culmorum</i> <i>F. roseum</i> <i>Stysanus stemonitis</i> <i>Coprinus cinereus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Geothricum candidum</i> <i>Mucor jansseni</i>	Termófilos <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Humicola insolens</i> <i>Mucor pusillus</i> <i>Dactylomyces crustaceus</i> <i>Torula thermophila</i>

Inoculación

Se ha intentado seleccionar microorganismos para usarlos como inoculante en cultivos puros o mezclas. Existen a nivel comercial productos recomendados para la inoculación de diferentes tipos de residuos. Sin embargo, los datos encontrados en la bibliografía señalan escasas diferencias en el producto final entre restos inoculados y sin inocular.

Los microorganismos autóctonos, existentes en esos materiales se encuentran en general en cantidad y calidad suficiente para producir la descomposición. La aereación de las pilas asegura la multiplicación de los microorganismos en toda la masa.

Para que los sustratos puedan ser **inoculados** con éxito, sería necesario en primer lugar esterilizarlos o pasteurizarlos para luego inocularlos. La cantidad de inóculo puede representar una limitante, teniendo en cuenta los grandes volúmenes que normalmente se procesan.

Residuos vegetales secos, como restos de cosechas (pajas de alta relación C/N) pobres en microorganismos pueden ser compostado mezclándolos con estiércol de animales, lodos o cualquier material que posea alta carga microbiana.

Tecnología

Para estabilizar materiales de muy diferente origen se requiere tener en cuenta diversos factores.

Dispositivo: el compostaje puede ser hecho en

- **silos, en digestores o usinas altamente tecnificadas**, para el tratamiento de grandes volúmenes de sólidos, como por ejemplo los residuos domiciliarios.
- **en el campo, en pilas:** sobre piso de tierra o pavimentado, disponer el material en pilas es lo más común y económico.

La experiencia ha demostrado que las dimensiones ideales para las pilas de desechos son las siguientes:

largo: 2,5 a 3,5 m

altura: 1,5 a 1,8 m, que baja al final de 1/3 a 1/6

ancho: variable, nunca menor de 2 m

El peso disminuye de 50 a 80%, y el volumen total se reduce entre un 20 y un 60%. La pila nunca puede ser muy alta, porque se corre el riesgo de que las capas superiores ejerzan presión sobre las inferiores, compactándolas, provocando anaerobiosis y los consiguientes procesos de fermentación y putrefacción.

En cuanto a la forma, las pilas pueden tener sección triangular o trapezoidal: la triangular es recomendada para estaciones lluviosas, pues favorece el escurrimiento del agua, la trapezoidal, por el contrario, facilita la infiltración del agua.

Materiales a compostar

En el cuadro 3 se observa la composición de distintos materiales a compostar y su contenido en nitrógeno.

Cuadro 3 - Composición de residuos a compostar

Materiales	%N sobre peso seco	Relación C/N
Orinas de animales	15-18	0.8
Sangre seca	10-14	3
Harina de cuernos	12	ND
Harina de pescado	4-10	4-5
Torta de oleaginosa	3-9	3-15
Lodos cloacales	5.5-6.5	6-10
Fangos activados	5-6	6
Harina de huesos	2-4	8
Cama de aves	4	ND
Pasturas jóvenes	2-4	12

Desechos de cervecería	3-5	15
Estiércol de cerdo	1.9	ND
Estiércol vacuno	1.0-1.8	ND
Paja de trigo	0.6	80
Hojas recién caídas	0.4-0.1	40-80
Restos de remolacha	0.3	150
Aserrín fresco	0.1	500
Papel	0	infinito

ND: No determinado.

Principales factores que afectan el compostaje

Relación C/N: cuando la materia prima presenta alta relación C/N, se corrige agregando materiales ricos en N (estiércol, camas de animales, tortas vegetales, residuos de matadero, fertilizantes orgánicos nitrogenados, etc). Una relación ideal para un compostaje rápido se sitúa entre **25 y 35/1**.

Un compost con materiales de C/N inferior a 30/1 conducen a pérdidas de N como amonio, agravadas si el pH es alcalino. En este caso, se agregan materiales ricos en C, como pajas, para elevar la relación C/N o tierra, arcillas o fertilizantes minerales que pueden retener el amonio.

Al final del compostaje la mayor parte del N está en forma de NO_3^- en solución que puede ser removido por el agua y aprovechado por las plantas. También puede ocurrir fijación de N_2 atmosférico por microorganismos especializados, en composts estabilizados, sin presencia de N amoniacal.

Granulometría: ésta se adecúa moliendo los materiales gruesos o agregando restos como pajas en residuos de granulometría fina como los lodos residuales u otros sustratos con tendencia a compactarse. También se pueden agregar materiales no degradables, como esferas porosas de arcillas, plástico, goma.

pH : el óptimo se sitúa entre 6,0 y 7,5, los vegetales presentan en general reacción ácida que se puede corregir agregando cal, ceniza vegetal u otro producto alcalino, evitando que el pH pase de 8,0.

Humedad: la humedad óptima para máxima eficiencia del proceso está comprendida entre 60 a 65% en peso para granulometrías groseras (pajas de cereales) y de 55 a 60% para granulometrías finas (aserrín, contenido ruminal). La humedad mínima debe ser de 40%; con humedad inferior al 12% la actividad biológica cesa y muy altas inducen anaerobiosis y pérdidas de nutrientes.

Se controla dentro de los límites recomendados por:

- **irrigación** al montar la pila, si la humedad de los residuos es baja
- **remover la pila** para provocar evaporación si la humedad es alta

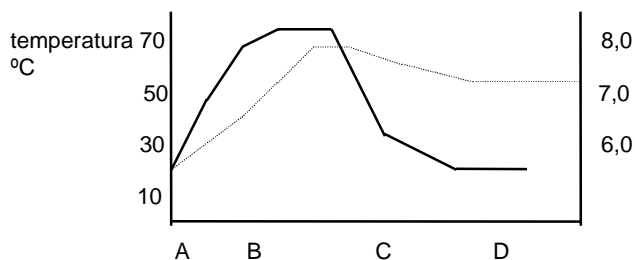
La humedad se debe mantener en el entorno del 50% durante la fase inicial y del 30% en la fase final de estabilización.

Aireación: es importante para que la descomposición sea aerobia, más rápida y eficiente que la anaerobia. Su control es una de las tareas más difíciles y costosas. La concentración de O_2 no debe ser inferior al 5 y 10% del volumen de los macroporos. En los digestores cerrados la aereación se hace mecánicamente. En las pilas se produce en el mezclado o por sistemas de aereación forzada.

Temperatura: el calor es la primera información de que el proceso de descomposición se inició. La ausencia de calor en los primeros días indica un problema en: baja actividad microbiana, falta de O_2 por exceso de agua o material de granulometría muy fina. Las altas temperaturas son consideradas deseables por el hecho de destruir semillas de malezas y organismos patógenos, la mayoría sensibles al calor. Se produce una **pasteurización** del material. Las altas temperaturas no deben extenderse mucho porque limitan a la microflora mesófila, coagulan proteínas y provocan pérdidas de N como amonio. La figura 1 presenta la variación más frecuente de temperatura durante las distintas fases del compostaje.

Figura 1- Cambios en la temperatura durante el compostaje

A-fase mesófila, B-fase termófila, C-fase mesófila
D- estabilización



fases:

A mesófila B termófila C mesófila D estabilización

El cuadro 4 presenta los resultados del agregado de 20 toneladas de compost por hectárea sobre el rendimiento de maíz, en un suelo arcilloso calcáreo, con cultivo anterior de trigo y con riego.

Cuadro 4 - Efecto del agregado de compost en cultivo de maíz

	Con compost	Sin compost
Rendimiento k/há	9.970a	9.070b

Interacción del compost x dosis de N (k/há).

Dosis de N	0	50	100	150	200
Con Compost	7750	9940	10470	10830	10880
Sin compost	5850	8750	9640	10740	10470

Como se aprecia globalmente sobre todas las parcelas, el efecto de la enmienda fue favorable (a 10% de confianza), sobretudo sin fertilización o con bajas dosis de nitrógeno.

Vermicompostaje

Constituye una variación en la tecnología del compostaje en la cual se utilizan **lombrices** para acelerar la degradación de la materia orgánica. La lombriz trabaja cavando galerías en el suelo o en el compost, moliendo y humedeciendo partículas en el tubo digestivo (acción más mecánica que biológica).

Sus excrementos están formados por agregados de tierra, materia orgánica digerida y secreciones intestinales y urinarias, de más fácil asimilación por las raíces que reciben el nombre de **coprolitos**. Estos son más neutros que los suelos, pobres en arcillas y ricos en materia orgánica, nitratos, P, K, Ca y Mg, presentando alta **CIC** (capacidad de intercambio catiónico), saturación en bases y alto porcentaje de humedad.

Para la elaboración del vermicompostaje pueden utilizarse una gran variedad de sustratos, las lombrices prefieren los estiércoles pero atacan cualquier tipo de materia orgánica, siempre que no sea muy ácida o muy olorosa. El vermicompostaje es una técnica competitiva frente a compostaje tradicional aunque presenta algunas **desventajas**:

- necesita más mano de obra
- el material debe estar triturado para una mayor eficiencia en la degradación
- necesita de una mayor área: 1000 m² para producir 100 ton de compost por día (Kiehl, 1985)
- no presenta fase termófila, que mataría a la fauna.

La descomposición de la materia orgánica es realizada por los **microorganismos** del tracto digestivo de las lombrices.

Para determinaciones del grado de maduración de estos materiales se remite al **Anexo Práctico**.

En resumen: el empleo de compost en la agricultura es muy ventajoso, funciona como un fertilizante nitrogenado de liberación lenta con acción residual prolongada, de modo que se

incrementa la eficiencia de absorción por las plantas, con mayores productividades al compararla con el empleo de fertilizantes nitrogenados solubles (Tester y Parr, 1983). Su aplicación puede incrementar la retención de agua en el suelo. Prácticamente todos los restos orgánicos generados y acumulados en establecimientos agropecuarios son capaces de estabilizarse mediante este proceso microbiano.

Biodegradación anaerobia de residuos

La digestión anaerobia consiste en una serie de procesos de degradación microbiana de la materia orgánica en ausencia de agentes oxidantes (O_2 , NO_3^- , S_0^{4-}). Como productos de esta degradación se produce una mezcla de gases (**biogás**) y queda como remanente una forma de materia orgánica estabilizada, el **biofertilizante**.

Interviene en este proceso una población microbiana muy heterogénea que actúa en una cadena alimentaria. Uno de los grupos terminales de esta cadena son las **metanobacterias**, responsables de la producción de gas **metano**, usado como combustible. El sustrato que entra a los biodigestores rurales está compuesto principalmente por estiércol u otras materias orgánicas diluídas: una mezcla compleja de celulosa, hemicelulosa, lignina, proteína, lípidos, minerales, etc.

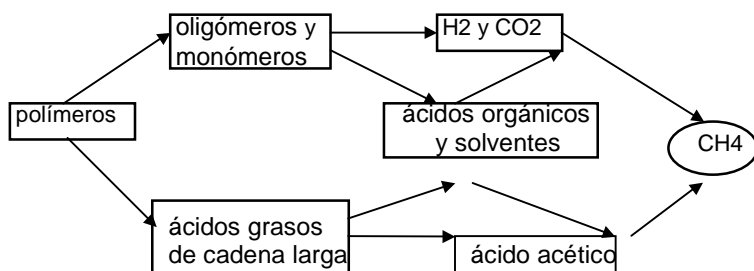
Los microorganismos utilizan estos compuestos para obtener energía y como fuente de carbono, mineralizando cada vez más los restos orgánicos hasta alcanzar un equilibrio. En la digestión anaerobia se distinguen cuatro etapas (cuadro 5).

- Hidrólisis de biopolímeros
- Fermentación
- Acetogénesis y deshidrogenación
- Metanogénesis

La primera etapa de la degradación de la materia orgánica es llevada a cabo por enzimas hidrolíticas de múltiples microorganismos que utilizan los compuestos de la hidrólisis. Posteriormente actúa otro grupo que ataca los productos resultantes de la acción del primer grupo y así sucesivamente conformando una cadena trófica con una población microbiana en equilibrio.

La fermentación es la fuente de energía en las condiciones de anaerobiosis y de falta de luz de este sistema. Los principales productos finales de la hidrólisis y la fermentación son CO_2 , H_2 , propionato, acetato y butirato.

Cuadro 5- Esquema de las etapas de la digestión anaerobia

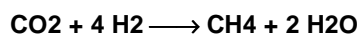


hidrólisis y fermentación

acetogénesis

metanogénesis

Existen bacterias que degradan el propionato y el butirato llevándolo a acetato, H_2 y CO_2 . Estas bacterias actúan sinérgicamente (**sintrofia**) con otros microorganismos que consumen el H_2 producido y de esta forma permiten que se establezca el primer grupo (que es inhibido por el hidrógeno). La metanogénesis es la última etapa de la cadena trófica y las bacterias metanogénicas producen CH_4 por la siguiente reacción:



Como se observa consumen hidrógeno, por lo que poseen un papel regulador en el biodigestor.

También se puede producir metano a partir de acetato (metanogénesis acetoclástica).



Población microbiana

Dentro del biodigestor coexisten distintos grupos de microorganismos: bacterias, hongos y protozoarios. Cada biodigestor es diferente ya que debido a que las interacciones entre los microorganismos son múltiples y complejas, en cada uno se alcanzarán poblaciones distintas.

No se puede hacer consideraciones taxonómicas generales pero es importante conocer los grandes grupos fisiológicos de microorganismos presentes. Los microorganismos se agrupan de acuerdo a las reacciones que emplean en la generación de energía y se relacionan a su vez con el consumo y producción de hidrógeno.

La clasificación se esquematiza en el cuadro 6.

Cuadro 6 - Microorganismos en biodigestores anaerobios

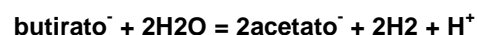
grupo	Características
productores de hidrógeno	
Hidrólisis de biopolímeros, fermentación de azúcares, aminoácidos, ácidos grasos (bacterias, hongos, protozoos)	
• anaerobias facultativas	consumen el O ₂ presente
• anaerobias estrictas	actúan a bajo nivel de O ₂ , fermentativos
• aerotolerantes	actúan en presencia de O ₂ , bacterias lácticas
Bacterias sintróficas: acetogénesis y deshidrogenación	
• anaerobias obligadas: requieren siempre de otro microorganismo para crecer	
• anaerobias facultativas: pueden crecer en cultivo puro	
consumidores de hidrógeno	
Bacterias metanogénicas , anaerobias estrictas, productoras de CH ₄ , crecen sólo con menos de 5 ppm de O ₂	

Bacterias hidrolíticas y fermentadoras

Se encuentran bacterias anaerobias facultativas como las enterobacterias, las aerotolerantes como las del ácido láctico y bacterias anaerobias estrictas como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Propionibacterium*. Las enterobacterias como *E. coli* poseen la enzima **formiato liasa** responsable de la generación de H₂ a partir de formiato, pero tal vez su rol fundamental es la remoción del O₂. Las bacterias lácticas producen ácido láctico y a veces etanol y CO₂, a partir de azúcares. *Propionibacterium* fermenta ácido láctico con liberación de H₂ y acetato, o acetato y propionato.

Bacterias acetogénicas reductoras obligadas de protones

Son las conocidas bacterias sintróficas obligadas que se caracterizan por su imposibilidad de crecer en cultivo puro. Necesitan asociarse estrechamente a microorganismos consumidores de H₂. En el laboratorio se las mantiene junto a una bacteria metanogénica hidrogenofílica, o a una sulfatoreductora en presencia de sulfato, que en estas condiciones funciona como consumidor de H₂. Los sustratos naturales que oxidan son ácidos grasos saturados, etanol y benzoato. Algunas de las reacciones de las que generan energía:



No pueden transferir los equivalentes de reducción del NADH a ningún aceptor externo que no sean los protones. Algunas especies conocidas: *Syntrophobacter wolinii* que usa propionato y

crece en cocultivo con *Desulfovibrio*, *Syntrophomonas sapovorans*, crece con ácidos grasos de C4 a C18 asociada con *Methanospirillum*.

Bacterias sulfatoreductoras

Emplean los productos de las fermentaciones como sustratos en la reducción de sulfatos a sulfuros, de la cual obtienen energía. Se dividen en dos grupos:

- **oxidantes completos** que liberan CO₂, H₂O y S⁼, pueden degradar ácidos orgánicos de hasta 18 carbonos
- **oxidantes incompletos**: liberan acetato, CO₂, S⁼, algunas propionato y butirato, que en general no pueden seguir degradando.

La reducción del sulfato a sulfuro es más favorable termodinámicamente que la producción de metano. Si existe alta disponibilidad de sulfatos proliferarán estas bacterias con consecuencias negativas: van a emplear el H₂ (sustrato de las metanogénicas) y producen sulfuros, tóxicos a concentraciones elevadas e indeseables en el gas de salida.

En virtud del elevado número de bacterias sulfatoreductoras que existen en los reactores anaerobios y en los biodigestores rurales, aun en ausencia de sulfato (pueden metabolizar lactato dando acetato, CO₂ y H₂), se postula que ejercen importante rol como acetogénicas deshidrogenantes.

Bacterias acetogénicas

Son las que crecen a expensas de la reacción:



Pertenecen a géneros diversos como *Acetobacterium*, *Acetogenium* y *Clostridium*. También pueden realzar otros metabolismos y sólo un 10% del carbono en los reactores sufrirá esta transformación.

Bacterias denitrificantes

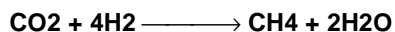
Estas bacterias que obtienen energía de la oxidación de compuestos orgánicos y compuestos de azufre reducido e H₂, con nitratos como aceptores de electrones, están presentes en los reactores anaerobios y se les atribuye junto a las Enterobacterias el rol de remoción del oxígeno del sistema. Especies del género *Pseudomonas* son las más distribuidas en la naturaleza.

Bacterias metanogénicas

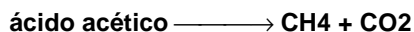
Estos microorganismos tienen características especiales

- son **Arqueobacterias**, hoy denominadas **archae**, organismos muy primitivos que se distinguen de las bacterias típicas por poseer un pseudopeptidoglicano en su pared, algunos géneros poseen recubrimientos exteriores solamente proteicos (capa S en *Methanococcus*), o una capa polisacárida junto a la capa S (*Methanosarcina*), una capa S y seudomureína (*Methanothermus*) y diferente composición lipídica en la membrana lo que las hace muy resistentes a pH bajos, altas temperaturas.
- **son anaerobias estrictas** y requieren concentraciones de oxígeno menores de 5 ppm en cultivo puro.
- **el pH óptimo** de la mayoría de las cepas aisladas es de 7. Existen cepas mesófilas y termófilas
- **son los únicos microorganismos capaces de generar metano** y poseen enzimas exclusivas como **hidrogenasas** con cofactores como el F₄₂₀ y F₄₃₀, que fluoresce con luz ultravioleta de 420 nanómetros y permite así visualizar células y colonias de estos organismos. Estas metaloproteínas determinan necesidades especiales de Ni, Fe, Co y Se. No presentan metabolismos alternativos.
- **Por los sustratos que pueden degradar se dividen** (Soube, 1994) en:

1. **hidrogenotróficas**, capaces de producir metano a partir de H₂ y CO₂:



2. **acetilclásticos**, que producen metano y anhídrido carbónico a partir de acetato:



3. **metilótrofos**, que metabolizan compuestos como metilaminas y metilsulfuros

metilamina \longrightarrow **0,5 H₂O + 0,75 CH₄ + 0,25 CO₂**

dimetilamina + H₂O \longrightarrow **1,5 CH₄ + 0,5 CO₂ + NH₃**

trimetilamina + 1,5 H₂O \longrightarrow **2,25 CH₄ + 0,75 CO₂ + NH₃**

El mayor número de especies de bacterias metanogénicas pertenecen al primer grupo, y los más frecuente son *Methanobacterium*, *Methanospirillum* y *Methanobrevibacter*. Muchas de ellas a su vez pueden emplear también formiato, algunas pocas isopropanol e isobutirato.

ácido fórmico \longrightarrow **0,25 CH₄ + 0,75 CO₂ + 0,5 H₂O**

metanol \longrightarrow **0,75 CH₄ + 0,25 CO₂ + 0,5 H₂O**

El género *Methanosarcina* es el más versátil entre los metanógenos, ya que posee especies capaces de emplear H₂, metilaminas y acetato. Los microorganismos metanogénicos son sensibles a **sustancias tóxicas** como sales de metales pesados, detergentes, desinfectantes y antibióticos, por lo que se debe prestar atención especial a este aspecto en el momento de cargar el biodigestor. Asimismo el amoníaco y el sulfuro resultan tóxicos a niveles superiores de 100 y 150 mg por litro, respectivamente.

La bioquímica y microbiología dentro del biodigestor deben ser tenidas en cuenta para el manejo del mismo.

Por ejemplo, si aumenta la concentración de hidrógeno en el sistema, se detiene el metabolismo de las bacterias productoras de hidrógeno que también metabolizan butirato, propionato y ácidos grasos de cadena larga. En estas condiciones el biodigestor se acidifica y disminuye la producción de biogás, por lo que se debe interrumpir el ingreso de nuevo sustrato orgánico para restablecer el equilibrio original.

Biofertilizante

El efluente de la digestión anaerobia en los biodigestores se denomina biofertilizante. Es un producto muy apto para ser usado como fertilizante orgánico e inclusive muchos establecimientos agropecuarios instalan biodigestores con el fin primario de obtener un fertilizante orgánico complejo, cuya composición variará de acuerdo al material orgánico.

En los casos comunes de biodigestores rurales se utiliza **estiércol diluido**, el biofertilizante resultante es una suspensión homogénea cuyo valor no está dado en la cantidad de nutrientes químicos para las plantas (por ejemplo nitrógeno o fósforo), sino como **activador de la población microbiana** del suelo con la resultante dinamización de toda la actividad biológica.

En el proceso de digestión anaerobia la relación carbono/ nitrógeno (C/N) baja (cuadro 7), señalando una estabilización del producto, que se asemeja al humus, con la fracción lignocelulósica no degradada y abundante biomasa microbiana.

Muchas veces se aprecia un incremento en el porcentaje de nutrientes presentes en el biofertilizante respecto al material original. Sin embargo, el efecto principal sobre los cultivos no es a partir de los nutrientes químicos sino al **proceso activador** sobre la población microbiana del suelo. Asimismo, se mejoran las **propiedades físicas** del suelo (que son las que regulan la aereación y la dinámica del agua).

Biodigestores rurales

La figura 2 (FAO, 1986) muestra los dos tipos más frecuentes de biodigestores empleados en establecimientos agropecuarios, el hindú y el chino. En el **modelo hindú**, el biogás formado se va acumulando bajo la campana que se eleva (flota) a medida que avanza el proceso. El biodigestor se carga por una caja de entrada y se descarga por una caja de salida. Todo el sistema se maneja con el principio de vasos comunicantes o sea que el volumen que entra por la caja de carga sale por la caja de descarga y el biodigestor mantiene siempre el mismo nivel. La presencia de una pared divisoria central hace un efecto de reciclaje dentro del biodigestor.

Cuadro 7 - Composición química media del sustrato y del bio-fertilizante producido por biodigestores hindú y chino *

análisis	biofertilizantes en biodigestores:		
	sustrato	hindú	Chino
pH	7,89	7,40	7,44
N%	1,97	1,97	1,97
P%	1,01	1,18	1,10
K%	2,21	2,67	2,71
Ca	2,40	2,59	2,47
Mg%	0,67	0,78	0,76
S%	0,43	0,51	0,52
Fe ppm	3684	3903	3908
Zn "	375	536	548
Cu "	129	127	122
Mn "	321	395	374
B "	45	481	46
MO%	72	69	69
C%	41	40	40
C/N	21	20	21

En base en materia seca

El biogás es transportado por cañerías hasta el lugar donde se emplea (calefacción del tambo, luz) e incluso se envasa en cilindros para usos familiares o como combustible para vehículos.

El **modelo chino** requiere un diseño más preciso y posee gran resistencia estructural y su vida útil puede sobrepasar los 20 años. Consta de caja de carga del material (estiércol y agua), una estructura principal cerrada y una cámara compensatoria de presión que es a la vez la caja de salida del material degradado. El gas se acumula en la bóveda con lo que aumenta la presión interna que hace que el contenido se desplace a la cámara compensatoria de presión con lo cual sube el nivel de la misma. Al usarse el biogás la presión de la cámara baja y el líquido entra nuevamente al cuerpo principal.

Según las condiciones climáticas se calculan unos 20 días para que ocurran las diferentes etapas del proceso.

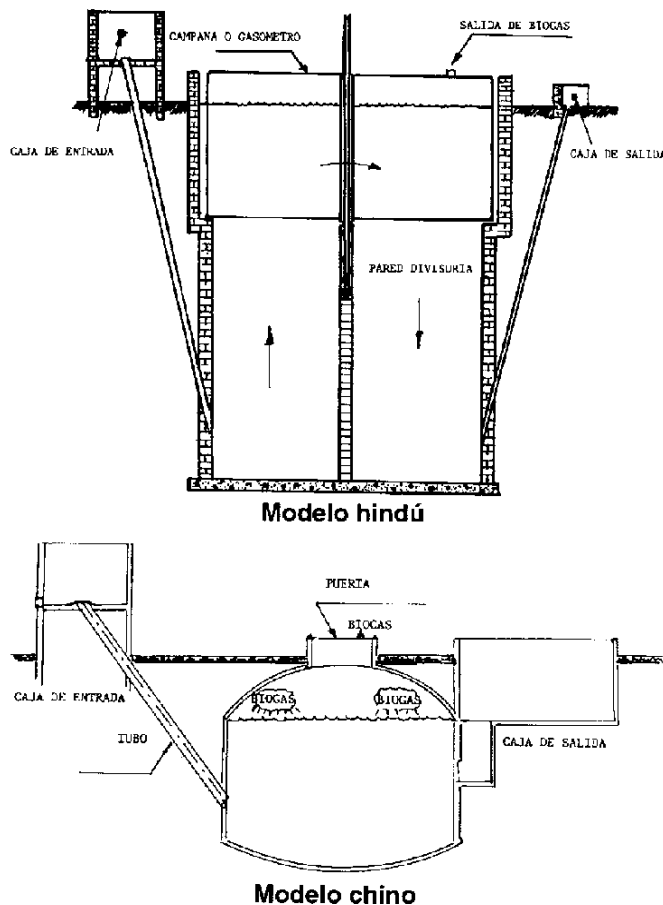
Figura 2 - Modelos de biodigestores

a) hindú, b) chino

Procesos Microbianos en la Protección Ambiental

Figura 2 - Modelos de biodigestores

a) hindú, b) chino



En el manejo de grandes volúmenes de **residuos domiciliarios e industriales** se emplean reactores anaerobios de distinto diseño que permiten que las 4 etapas del proceso se realicen rápidamente durante el flujo de líquido con restos orgánicos (3-5 días). También ocurre el proceso en lagunas donde los efluentes permanecen en períodos entre 5 a 30 días.

En resumen: los factores que más influyen en la elección de un sistema anaerobio son:

- la baja producción de lodo biológico (**biomasa**) con menores costos de deposición
- altas eficiencias de tratamiento (comparable a otras alternativas)
- bajos costos de inversión inicial y menores costos de operación (no requieren O₂)
- producción de metano (uso potencial como combustible)
- bajos requerimientos de nutrientes (menor que en el sistema aerobio)

Bibliografía

FRIONI, L. Y C. DE LOS SANTOS 1998 Biodegradación aerobia de residuos orgánicos sólidos. **Agrociencia**, vol II N°1 :1-11

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION 1986 **Reciclaje de Materia Orgánica y Biogás**, **FAO**, Santiago de Chile

KIEHL, E. J. 1985 **Fertilizantes Orgánicos** Editora Agronómica, Ceres, San Pablo

LAMBAIS; M. R. 1992 Poluição Organica e seu Controle, en : **Microbiologia do Solo**, Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo, Campinas (SP): 91-104

MUSTIN, M. 1987 Le compost: Gestion de la matière organique, París, François Dubusc: 954 pp.

SOUBES, M. 1994 Microbiología de la digestión anaerobia, en: **Tratamiento Anaerobio**, III Taller y Seminario Latinamericano: "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales", Universidad de la República, Montevideo: 15-28

TESTER, C. F. y J. F. PARR 1983 Intensive vegetable production using compost. *Byocicle*, Emmaus, 24(1): 34-36

Capítulo 20

Degradación de xenobióticos Pesticidas

Las sustancias **xenobióticas** (*xeno*= extraño, *biótico*= vida) se definen como compuestos orgánicos o minerales que son introducidos en el ambiente por actividades del hombre a concentraciones que provocan efectos indeseables.

Algunos de estos compuestos son liberados al ambiente por el hombre con el objeto de controlar plagas, caso de los **pesticidas, o agrotóxicos**, cuya persistencia y transformaciones reflejan su eficacia como producto y su peligro potencial para la microflora y la calidad del ambiente. Más de 1.000 de estos compuestos están registrados, desde moléculas simples como el bromuro de metilo (CH₃Br) hasta moléculas muy complejas como el aldrín. Cerca del 97% son herbicidas, insecticidas y fungicidas que representan 65, 25 y 7% respectivamente. Los restantes 3% corresponden nematocidas, acaricidas, etc.

Otros xenobióticos provienen de la industria manufacturera, efluentes de industrias, aguas residuales, actividad de minas, de las industrias petrolera, del papel, agrícola.

Muchos de estos compuestos introducidos continuamente o formados en la biosfera son resistentes a la biodegradación: se conocen como **recalcitrantes o refráctiles** y pueden clasificarse en 4 categorías (Balba, 1993):

- 1- compuestos muy recalcitrantes
- 2- los que son sólo lentamente biodegradables
- 3- compuestos que pueden ser utilizados rápidamente cultivos microbianos, pero que no se sabe si lo pueden hacer en la naturaleza
- 4- compuestos aptos para microorganismos en cultivos axénicos y en uno o más habitat microbiano, pero que son ocasionalmente persistentes.

Muchos **polímeros sintéticos** caen en la categoría 1).

La **lignina** es un ejemplo de la segunda categoría ya que es sustrato para algunos hongos aunque no es desasimilada rápidamente. Ciertos **hidrocarburos clorados** con carácter insecticida son ejemplos de la tercera categoría, ya que muchos son metabolizados en medios de cultivo, pero su mineralización a CO₂, H₂O y Cl₂ no ha sido demostrado *in situ*. En la última categoría se pueden ubicar algunos **hidrocarburos derivados del petróleo y constituyentes vegetales**.

En términos de cantidad, los **xenobióticos orgánicos** son los más numerosos: 114 compuestos han sido designados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos como polucionantes, en 1982. Los más peligrosos son los **halogenados**, especialmente los aromáticos por sus efectos sobre la biocenosis y su carácter recalcitrante en el ambiente. Consecuentemente persisten en el suelo porque no son susceptibles de transformaciones biológicas a rangos normales.

El cuadro 1 muestra algunos ejemplos de compuestos orgánicos detectados en suelos y que representan potencial peligro para el ecosistema suelo-planta-hombre, muchos se reconocen o sospechan como cancerogénicos o mutagénicos. Los halogenados aromáticos ejercen efectos negativos en la microflora y son reconocidos recalcitrantes. Fueron introducidos por el hombre, de modo que se consideran verdaderos **xenobióticos** (Hicks *et al*, 1990).

Como el suelo es el reservorio último de la mayoría de ellos, sus efectos sobre poblaciones microbianas y la acción de éstas sobre estas moléculas resulta de gran importancia en la determinación de sus consecuencias. Una vez liberadas al ambiente la distribución de estas sustancias depende de:

- propiedades quimiodinámicas del producto
- propiedades físico-químicas del suelo
- su transferencia en las interfases suelo-agua y suelo-aire y a través de membranas biológicas

Procesos bióticos y abióticos pueden transformar a los productos alterando su estado químico y consecuentemente su toxicidad y reactividad. Idealmente se espera su conversión a:

- **CO₂, H₂O, minerales**
- **sustancias menos tóxicas**

Pero se pueden formar productos **intermediarios** que se convierten en polucionantes tóxicos.

Cuadro 1 - Ejemplo de importantes xenobióticos orgánicos

tipo	Ejemplos
Alifáticos (halogenados)	tricloroetano, tricloro metano, cloruro de metilo tetracloetano
Alifáticos(no halogenados)	acilonitrilo, tolueno, benceno, nitrobenceno, fenol cresol
Aromáticos (halogenados)	Pentaclorofenol, clorobenceno hexaclorofenol, diclorobenceno
Policíclicos (no halogenados)	naftaleno, benzopireno, antraceno, bifenil, fenantraceno
Policíclicos (halogenados) Pesticidas	bifenilos policlorados (PCBs) lindano, toxafeno, DDT, 2,3-D dieldrin, heptacloroborano

Efecto sobre la microflora del suelo

El grado de afectación de estas sustancias en segmentos de la población dependerá de:

- su composición química, dosis, métodos de aplicación
- parámetros físico-químicos del ambiente, como pH, temperatura, agua

No existen muchos datos cuantitativos sobre las transformaciones de muchos de estos productos tóxicos, salvo, quizá, lo referente a los **pesticidas**, sobre los cuales las investigaciones son más abundantes. Los xenobióticos interfieren con procesos importantes como:

- fotosíntesis
- metabolismos oxidativos
- síntesis celulares
- algunos, como los clorados alteran la composición de la membrana celular, alterando su permeabilidad y la fisiología celular.

Los **métodos** empleados para estudiar sus efectos son los clásicos en estudios de ecología microbiana, pero se destaca en las últimas revisiones sobre el tema (Hicks *et al*, 1990), la necesidad de estandarizar procedimientos que reflejen los efectos de estas sustancias sobre grupos y procesos microbianos de importancia para la continuidad de los ciclos de los elementos en la naturaleza.

Pesticidas

Su empleo se ha incrementado en los últimos años y tanto la agricultura moderna, como la conservación de frutas y verduras para la exportación, la lucha contra insectos, etc. liberan en los ecosistemas naturales grandes cantidades de sustancias de lenta biodegradación.

Las investigaciones sobre el efecto de muchos de estas sustancias en las comunidades microbianas naturales y sobre los mecanismos de degradación se han estimulado por los riesgos reales o potenciales asociados con el empleo indiscriminado de los xenobióticos.

Los pesticidas son sustancias químicas destinadas al control de poblaciones no deseadas (pestes), de muy distintos grupos taxonómicos y se caracterizan por los organismos que atacan: **insecticidas**, **nematicidas**, **herbicidas**, **fungicidas**. Otros, destinados a la supresión de roedores y moluscos, han recibido menos atención.

En muchos países no se llevan estadísticas sobre el uso de estas sustancias y debemos remitirnos a las cifras sobre sus importaciones. El empleo masivo de herbicidas selectivos comenzó hacia la mitad de la década del 40, luego del descubrimiento del 2,4-D, pero el control químico de malezas está aún poco desarrollado, si se lo compara a los logros en el mejoramiento vegetal y con otros aspectos de las ciencias del suelo.

Se pretende lograr que un agente químico específico actúe selectivamente sobre una determinada planta. Los métodos de control de malezas son numerosos e incluyen: mecánicos, la competencia por el cultivo, la rotación; biológicos, químicos, el fuego, etcétera.

Muchas de estas sustancias, sobre todo los **herbicidas**, se aplican directamente en la superficie o llegan a las capas superficiales del suelo, otros se pulverizan sobre el follaje, pero se ponen en contacto con los microorganismos al caer las hojas o cuando las plantas mueren. Estas aplicaciones pueden alcanzar zonas vecinas cuando las moléculas son volátiles. El agua de riego puede contaminarse, constituyendo ésta otra vía de entrada al suelo.

Las **interacciones** entre los pesticidas y los microorganismos serán analizadas desde dos puntos de vista:

- **sobre los microorganismos** estas sustancias pueden afectar habitantes no patógenos de los ecosistemas naturales, o sus interacciones con el consiguiente efecto sobre procesos benéficos (degradación de materia orgánica, nitrificación, fijación del N₂, solubilización de fosfatos)
- **los microorganismos** de estos ambientes metabolizarán a estas sustancias (la mayoría son orgánicas) por distintos mecanismos, los que sumados a las otras causas abiológicas de alteración, contribuyen a disminuir sus efectos tóxicos.

Como **generalización**, se piensa que:

- los compuestos de amplio rango, como los fumigantes, fungicidas, parecen afectar negativamente todos los procesos biológicos, al menos temporariamente. El mismo efecto se encontró con la mayoría de los metales pesados
- herbicidas, insecticidas, son menos perjudiciales para la microflora y en algunos casos, pueden estimularla

Entre los procesos: la nitrificación es altamente sensible, mientras que la mineralización del nitrógeno es bastante resistente.

La eficacia de un pesticida se determina por la **dosis letal**, que asegura la muerte de la población entera y la **dosis letal 50 (DL 50)**, que elimina al 50% de los componentes de la población (Dommergues y Mangenot, 1970). En respuesta al efecto causado por los pesticidas, los microorganismos muestran gran adaptabilidad, evidenciada por el rápido restablecimiento de la actividad metabólica.

Los **mecanismos** pueden ser:

- reemplazo de especies sensibles por otras tolerantes, muy frecuente en el caso de especies de rhizobios
- por una rápida recolonización del ambiente luego de los tratamientos biocidas

Evaluación de efectos inhibidores o tóxicos

Numerosos estudios se han realizado en torno a los efectos laterales de los pesticidas sobre los microorganismos y sobre sus interacciones. La aplicabilidad de estos resultados obtenidos a nivel de laboratorio a las condiciones naturales de campo, resulta muchas veces difícil porque:

- los estudios fueron realizados bajo condiciones muy diversas, muchas veces no correctamente explicitadas en los trabajos
- en ambientes y tipos de suelos muy diferentes
- falta de información sobre la formulación de productos comerciales y sus aditivos, que pueden afectar a la población en mayor grado que el producto mismo.

El efecto de un pesticida sobre la microflora se evalúa frecuentemente en el laboratorio, bajo condiciones controladas. En estos casos la determinación de la dosis que actúa sobre los organismos resulta difícil de precisar, sobre todo con pesticidas volátiles.

Cuando las sustancias son fuertemente adsorbidas en los coloides del suelo, se pueden acumular altas concentraciones en las capas superficiales. La concentración puede ser más alta en la zona de la corona, por movilización del producto por los tallos. En esa zona la actividad biológica es grande y actúan gran número de patógenos.

Con sustancias muy adsorbidas, se emplean dosis altas en los modelos experimentales, como reflejo de la práctica de campo.

Técnicas de estudio: (Anexo Práctico)

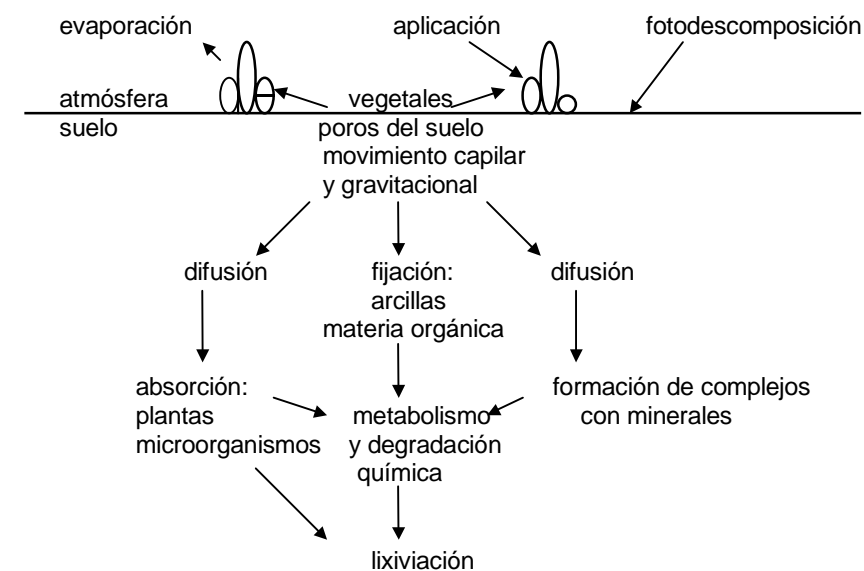
El estudio de la **biodegradación** de sustancias con carácter biocida no es sencillo en aguas, suelos, alimentos, ya que muchas veces las concentraciones son muy bajas, del orden de las partes por millón (mg/kg). Se deben emplear técnicas muy sensibles: cromatografía en fase gaseosa o líquida, espectrofotometría con luz ultravioleta, para detectar trazas de pesticidas o de sus intermediarios en la degradación.

- **actividad respiratoria**, el desprendimiento de CO₂ o el consumo de O₂ de muestras de suelo o aguas tratadas con el producto en estudio y algún sustrato cuya transformación se desea seguir, glucosa, celulosa, se emplea para evaluar efectos sobre la micropoblación global
- **biomasa microbiana**, por recuentos o por la técnica de fumigación
- **recuentos de grupos microbianos** que realizan procesos de interés para el ambiente (FBN, solubilizadores, mineralizantes, etc)
- **actividad enzimática**: deshidrogenasas, amilasas, fosfatasas, ATPasas, etc.
- **procesos microbianos**, como la FBN, mineralización, oxido-reducción, son evaluados a los efectos de conocer el efecto de estas sustancias

Pesticidas en el suelo

La figura 1 (Correa, 1980) presenta un esquema de las posibles vías a seguir por un pesticida cuando llega al suelo. Pongamos como ejemplo el caso de la incorporación de un herbicida. Este se puede perder por lavado, por degradación en el suelo, o ser absorbido por los cultivos. El período en que un pesticida persiste en el suelo es de gran importancia práctica, ya que refleja el tiempo en que la plaga o peste estará sometida a control, afectando también la polución del ambiente: acumulación en porciones comestibles de las plantas, en corrientes de agua, transporte a pájaros vía lombrices, etcétera.

Figura 1- Esquema del comportamiento de un pesticida en el suelo



La **persistencia** en el suelo, es decir la duración de la efectividad de un pesticida, depende de

- **su composición química**
- **de las condiciones del medio:** materia orgánica, arcillas, pH, humedad, tipo de suelo, etcétera. El efecto biológico de un pesticida (B) depende de su concentración y la duración de su acción.

$$B = \{K \int c dt$$

Donde c es la concentración en un momento dado (dt); K es un factor que depende del suelo (humedad, coloides, etc.).

La **persistencia** en ambientes naturales depende de varios factores: la descomposición química y biológica, la adsorción a coloides, el lavado, la volatilización, la fotodescomposición, la remoción por vegetales que se cosechan. El cuadro 2 muestra los procesos que en el suelo afectan a sustancias xenobióticas

Cuadro 2 - Procesos que afectan a xenobióticos en el suelo

proceso	factores que inciden
hidrólisis	PH
transformación microbiana	enzimas degradativas, condiciones ambientales apropiadas
volatilización	presión de vapor
óxido-reducción	Eh
lavado	Solubilidad
adsorción	coeficiente de partición pK_a , solubilidad, tipos de adsorbentes
bioconcentración	coeficiente de partición pK_a
fijación/adsorción	CIC

La estructura de la molécula, la posición y naturaleza de los grupos funcionales afectan también la persistencia, como se aprecia en cuadro 3.

Descomposición microbiana

Durante mucho tiempo se pensó que los mecanismos de degradación de los pesticidas por los microorganismos eran similares a los de los animales. Pero a medida que las investigaciones fueron progresando, se apreciaron las diferencias:

- en los animales las reacciones conducen sobre todo a convertir estas moléculas en formas polares y por lo tanto excretables y los procesos ocurren en órganos especializados, como el hígado
- en los microorganismos, el objeto principal es la obtención de energía y muy pocas moléculas (algunos halogenados aromáticos usados como insecticidas) no son atacadas por algún grupo de microorganismo, en el suelo. Matsumura, (1982) propuso un esquema general sobre la acción de los microorganismos y de procesos abiológicos, sobre los pesticidas (cuadro 4)

Una microflora especializada es responsable de la degradación de los pesticidas mediante dos mecanismos diferentes:

I. la sustancia favorece el crecimiento y es empleada como fuente de carbono, energía y ocasionalmente de nitrógeno, azufre, etc. El número de especies activas aumenta y el aislamiento se puede efectuar en medios de cultivo en donde el pesticida actúa como única fuente de nutrientes. Una vez que el producto es degradado, la población declina

II. cometabolismo: el compuesto no actúa directamente como fuente de nutrientes, sino que debe emplear otras, como glucosa, por ejemplo, que al disminuir en el medio inducen las enzimas necesarias para la degradación del pesticida.

Cuando el nivel de pesticida es bajo en relación a otras fuentes de carbono, el metabolismo incidental, dentro del cual se ubica el cometabolismo, es la forma principal de actividad microbiana.

Las reacciones catabólicas ocurren sobre todo cuando las dosis de pesticidas son altas y la estructura química permite su biodegradación y su uso como fuente de carbono.

Cuadro 3 - Influencia de la estructura en la biodegradación de xenobióticos

tipo de compuesto o sustituyentes	más degradable	menos degradable
hidrocarburos	alcanos superiores (12 C) alcanos alifáticos de cadenas lineales aromáticos mono y bi cíclicos	Alcanos inferiores Alcanos de alto PM Alifáticos ramificados Aromáticos Policíclicos Aromáticos
aromáticos sustituidos	-OH -COOH -NH ₂ -OCH ₃	-F -Cl -Br -NO ₂
alifáticos clorados	-Cl más 6 C desde el C terminal	-Cl menos 6 C

Cuadro 4 - Metabolismos microbianos sobre pesticidas

I. Enzimático
A. Metabolismo incidental: los pesticidas no se usan directamente como fuente de energía. 1. metabolismo por enzimas generalmente disponibles a. enzimas de amplio espectro (hidrolasas, oxidasas, etc.) b. enzimas específicas presentes en muchas especies 2. metabolismo inducido por productos análogos (cometabolismo) c. enzimas que emplean sustratos estructuralmente similares a los de los pesticidas.
B. Catabolismo: los pesticidas se emplean como fuente de energía. d. pesticidas o parte de su molécula son rápidamente usados e. deben inducirse enzimas específicas para su degradación
C. Detoxificación. f. metabolismo por microorganismos resistentes
II. No enzimático
A. Participación en reacciones fotoquímicas.
B. Contribución por cambios de pH.
C. Por la producción de reactantes orgánicos o inorgánicos.
D. Por la producción de cofactores.

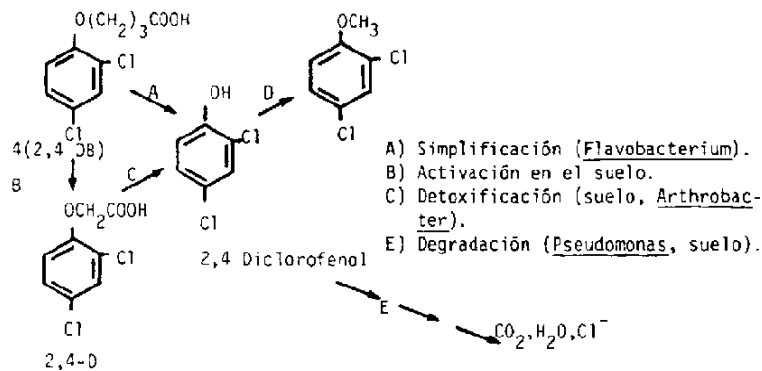
Procesos microbianos sobre pesticidas

- **detoxificación**, conversión de moléculas tóxicas en no tóxicas
- **degradación**, o transformación de sustancias complejas en productos simples (puede ser sinónimo de mineralización, con aparición de CO₂, H₂O, NH₃, etc.
- **conjugación** o formación de complejos, por reacciones de adición; el microorganismo combina el pesticida con metabolitos celulares (adición de aminoácido, ácidos orgánicos, metilos, etc.); pueden conducir a bajar la toxicidad

- **activación:** conversión de un producto no tóxico en moléculas tóxicas: preparaciones comerciales, como el herbicida 4 (2,4-DB) que en el suelo se transforma en metabolito tóxico para malezas (2,4-D)
- **cambio en espectro de toxicidad:** sustancias específicas para un grupo de organismos, se metabolizan y dan productos que inhiben a otros organismos, como la conversión en el suelo del fungicida pentacloro benzol en ácido pentacloro benzoico, que actúa como herbicida
- **simplificación:** conversión de molécula no tóxica, que puede convertirse en pesticida cuando es activada enzimáticamente, en producto no tóxico, fácilmente degradado.

La figura 2 (Alexander, 1977) reagrupa estos conceptos en el ejemplo del metabolismo de herbicidas fenoxialcanos.

Figura 2- Pasos iniciales en el metabolismo de herbicidas fenoxialcanos



Descomposición química

Mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis se pueden degradar pesticidas, mientras que otros pueden ser activados. Así, el cianato de potasio y el dalapón se hidrolizan lentamente en agua, resultando entonces inefectivos como herbicidas. En suelos en ambiente anaerobio, la degradación puede ser química y microbiológica.

Adsorción a coloides

Son retenidos a la materia orgánica y a la fracción arcilla, y los óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio juegan importante rol en suelos pobres en materia orgánica. En escala descendente de capacidad de adsorción tendríamos: humus > montmorillonita > illita > caolinita, pero intervienen también la temperatura, el pH, la capacidad de intercambio catiónico. Los enlaces pueden ser de naturaleza física (fuerzas de Van der Waals) o electrostáticos, por puentes de hidrógeno, sobre todo en moléculas con grupos -NH, como los fenilcarbamatos y las ureas sustituidas. Intervienen también enlaces en complejos con iones metálicos, inactivándose muchas moléculas fijadas.

Así, suelos con alto nivel de materia orgánica requieren dosis relativamente mayores de la mayoría de los herbicidas y suelos arcillosos niveles superiores a los arenosos. Para predecir las dosis de herbicidas que es necesario aplicar en varios tipos de suelos, se han desarrollado modelos matemáticos. El nivel de materia orgánica es uno de los parámetros del suelo que ofrece las mejores correlaciones entre la adsorción de herbicidas y propiedades edáficas. El carbón activado, uno de los materiales absorbentes más potentes, se emplea para proteger a las semillas de la acción de los herbicidas.

Lavado

Los herbicidas de pre-emergencia que se aplican generalmente en la superficie del suelo pueden ser llevados por el agua a capas sub-superficiales donde germinan la mayoría de las semillas de malezas, que son así eliminadas por estas sustancias. Las semillas grandes deben sembrarse debajo del área de alta concentración del herbicida, o bien ser resistentes a ellos. El grado de lixiviación

dependerá de las relaciones de adsorción entre los herbicidas y el suelo, su solubilidad en agua y la cantidad de agua que atraviesa el suelo. En base a estos parámetros se puede calcular la dosis requerida en una situación dada.

Volatilización

Los ésteres del 2,4-D son volátiles y sus vapores pueden perjudicar a otros cultivos. Estas sustancias se movilizan en los poros del suelo como los gases, y su concentración se puede medir por destilación del agua que se evapora en la superficie del suelo. Constituye una pérdida importante, si se consideran los volúmenes de agua que se pierden.

Los principales factores que afectan la volatilidad son: el grado de adsorción al suelo, la temperatura, el viento, la tensión de vapor (Correa, 1980).

Fotodescomposición

Muchos herbicidas absorben en el rango del ultravioleta, pero la radiación solar con longitudes de onda menores de 295 nm que llega al suelo es despreciable. El efecto sobre los biocidas está limitado a la superficie de suelos y aguas; sólo serán atacados (liberación de electrones, formación de puentes) los pesticidas no incorporados o los que ascienden por capilaridad en épocas secas. Puede ocurrir también cierta "sensibilización": la energía es absorbida por un intermediario y transferida a la molécula herbicida por colisión, la que es así dañada. Los productos de la foto-descomposición pueden ser similares a los obtenidos por degradación.

Remoción por los cultivos

Ciertos cultivos se siembran con el objeto de absorber herbicidas persistentes en suelos donde se aplicaron en altas concentraciones para eliminar toda la vegetación, para sembrar luego plantas ornamentales. El maíz se usa para eliminar simazina a atrazina.

Persistencia en el ambiente

Depende, como hemos visto, del tipo del suelo, de la calidad de las aguas, la temperatura, la humedad, materia orgánica, coloides minerales, actividad biológica. Se puede evaluar en ensayos controlados o de campo. Se citan datos de que sólo un 27 % de la variabilidad encontrada en las pérdidas de Picloram en 11 suelos, en condiciones controladas, pudo relacionarse a las propiedades de los mismos.

Los datos de temperatura y humedad son más útiles para predecir la desaparición de un pesticida que el tipo de suelo. La velocidad de degradación aumenta con la temperatura y la humedad.

La evaluación en el campo exige numerosos ensayos, con aplicaciones en distintas épocas y durante varios años.

Contando con amplia información sobre datos de lluvias, evaporación, temperatura, residuos de pesticidas, durante varios años, se obtienen mediante los modelos de predicción curvas de desaparición simuladas de estas sustancias.

En general, la concordancia entre valores observados y simulados es buena y su empleo resulta muy útil, sobre todo si se consideran las dificultades en la toma de muestras representativas en el campo, la variabilidad asociada en la determinación de cantidades pequeñas, etcétera. Soulas (1982) desarrolló un interesante modelo matemático para predecir la degradación microbiana de pesticidas en el suelo.

Acción de los pesticidas sobre la microflora

La bibliografía señala innumerables citas relativas a casos de supresión o inhibición de algún grupo importante de microorganismos por efecto de pesticidas.

Efectos

- **modificación del espectro de especies dominantes**, pueden ser suprimidos géneros comunes y aparecer otros resistentes. Estos cambios pueden ser de corta duración, aunque la población puede ser afectada en algunos casos por largos períodos.
- **grados de susceptibilidad**: una especie puede disminuir apreciablemente, una segunda puede

alterarse sólo ligeramente y otras pueden resistir el efecto del pesticida. Las hifas de los hongos y las células vegetativas de las bacterias son aún más afectadas que los conidios o esclerocios de los hongos o que las endosporas bacterianas.

- **efecto en interacciones biológicas** algunos fungicidas pueden provocar estimulación en la incidencia de enfermedades, hecho que se atribuye a inhibición de poblaciones que compiten con la especie perjudicial y a la proliferación de poblaciones antagónicas.

- **efectos sobre procesos microbianos:** en las transformaciones de compuestos nitrogenados, se puede generalizar que, salvo en el caso de fungicidas presentes en el suelo en alta concentración, la **mineralización y la denitrificación** no son muy afectadas, mientras que la **nitrificación** es uno de los procesos más sensibles, acumulándose amonio. Esta sensibilidad de los nitrificantes autótrofos se usa para evaluar los efectos tóxicos de diferentes dosis de pesticidas, mediante la evaluación de los nitratos.

La **nodulación y la fijación del nitrógeno** en leguminosas pueden ser afectadas por pesticidas, sobre todo por aquellos aplicados a las semillas que además se inoculan con rhizobios específicos. Se propone separar en el tiempo las aplicaciones de inoculante y fungicida o trabajar con mutantes de rizobios resistentes a los pesticidas más empleados. El cuadro 5, publicado por Alexander (1977), evidencia la importancia de esta línea de trabajo.

Marcada inhibición de la actividad nitrogenásica en la rizosfera de 25 variedades de sorgo se evidenciaron cuando se emplearon dosis tres veces superiores a las normales de atrazina (4,5 kg/ha); efecto que desapareció en otro ensayo de campo, sin herbicida (Frioni, 1990).

Cuadro 5 - Rendimiento y contenido de nitrógeno en leguminosas inoculadas y tratadas con pesticidas en el invernáculo (mg)

inoculante	semillas tratadas		semillas no tratadas	
	rendimiento	N	rendimiento	N
alfalfa con thiram				
ninguno	270	5,9	290	6,8
rhizobio sensible	280	6,6	440	12,2
rhizobio resistente	490	13,2	500	14,6
caupi con phygon				
ninguno	1150	21,7	1100	23,2
rhizobio sensible	1820	36,4	3820	97,0
rhizobio resistente	3930	105	3790	106

En el mismo cultivo, se comprobó en otro ensayo con aplicaciones de distintas dosis de tres herbicidas: atrazina, linurón y 2,4-D amina, que la celulólisis fue inhibida por todos los tratamientos pesticidas. Este efecto fue observado por otros autores y se atribuye a la falta de sustratos carbonados (las malezas son suprimidas) y a una inhibición selectiva de la celulasa.

Numerosas revisiones (Hicks et al, 1990, Greaves *et al.*, 1980; Malkolmes y Wöhler, 1983) incluyen determinaciones de efectos sobre procesos biológicos como respiración, mineralización del nitrógeno, nitrificación, datos sobre recuentos de ciertos grupos de microorganismos, evaluación del ATP de origen microbiano, enzimas específicas (deshidrogenasas, celulasa, amilasa, etc.), fijación del nitrógeno.

Johnen y Drew (1977) propusieron un programa de análisis a los que deben ser sometidos los pesticidas antes de que su distribución sea autorizada por autoridades competentes, donde se incluyen estudios sobre la población normal del suelo, además de los clásicos controles sobre sanidad humana y vegetal:

1. **Actividad respiratoria** (CO₂, O₂) evaluada en el laboratorio en muestras de suelo: sin aditivos (respiración endógena), con glucosa (proceso activado por el desarrollo microbiano) y con restos vegetales (degradación de materia orgánica compleja por sucesiones microbianas).
2. **Transformaciones del nitrógeno:** amonificación, nitrificación
3. **Fijación simbiótica del N₂**, en macetas: nodulación: número, peso, tamaño, actividad nodular, rendimiento vegetal
4. **Microorganismos particulares y antagonismos:** micorrizas, patógenos vegetales, antagonistas

5. Estabilidad de agregados y mejoramiento de la estructura.

Los estudios incluyen distintas dosis de los productos, formas de aplicación: incorporación, pulverización, etcétera. Es muy importante realizar experiencias a nivel de campo; ya que resulta casi imposible correlacionar resultados obtenidos bajo condiciones controladas con los logrados cuando estas sustancias llegan al suelo, en condiciones naturales. Malkomes y Wöhler (1983) señalan estas diferencias y sugieren que cuando se observan efectos laterales en ensayos de laboratorio, los pesticidas deben llevarse a la naturaleza y realizar allí las observaciones, aunque estos trabajos son largos y se debe considerar el efecto del ambiente (temperatura, humedad, nutrientes) sobre las propiedades biológicas que evaluamos, afectadas además por los pesticidas.

En resumen Se puede señalar que raramente la agricultura moderna dejará de emplear estos productos para lograr incrementar los rendimientos. Reconocida la toxicidad de la mayoría de ellas para el hombre, animales y microorganismos, es de esperar que se empleen conscientemente por los técnicos y productores y en las dosis recomendadas, evitando contaminar recursos tan importantes como suelos y aguas, con productos altamente tóxicos y escasamente biodegradables.

Los agroquímicos parecen no ejercer efectos de larga duración en actividades microbianas del suelo cuando se aplican a dosis recomendadas. Sin embargo, al emplearlas a dosis superiores, provocan efectos negativos, de corta duración, particularmente sobre transformaciones del carbono y del nitrógeno (Barkay *et al*, 1986).

Las prácticas de control de plagas incluyen cada vez más las técnicas de **Control Biológico**, empleando microorganismos antagonistas de fitopatógenos (capítulo 18).

Xenobióticos inorgánicos

Muchos compuestos inorgánicos se forman como desechos en las industrias modernas, como anhídridos de S y N y las sales de metales pesados, que se consideran xenobióticos por la elevada concentración liberada en ambientes naturales, sobre todo aguas y suelo y los efectos deletéreos que ejercen en la biosfera. A pesar de que muchos metales son abundantes en la corteza de la tierra, las actividades del hombre, como la combustión de petróleo y derivados, minas y prácticas agrícolas, frecuentemente incrementan su concentración a niveles tóxicos. Entre los metales tóxicos a alta concentración se incluye el arsénico, boro, cadmio, cromo, cobre, plomo, mercurio, molibdeno, níquel, selenio, zinc, vanadio. Los microorganismos poseen la capacidad de transformar elementos minerales, por ejemplo, al usarlos como fuente de energía (Fe^{++} a Fe^{+++} por *Thiobacillus*), aceptor de electrones (Mn^{+4} a Mn^{+2} por *Bacillus*), oxidación (As), alquilación ($\text{CH}_3^- + \text{Hg}^{+2} \rightarrow \text{CH}_3\text{Hg}^-$, por *Clostridium*).

Biorremediación

La biorremediación constituye un conjunto de técnicas que permiten aumentar la biomasa microbiana del suelo, estimulando la biodegradación de xenobióticos (Bouwer, 1993). Bajo esta denominación se agrupan una variedad de procesos de biotratamiento que varían en sus mecanismos de acción, sobretudo los de mineralización, transformación parcial, humificación y alteración del potencial redox (Shannon y Unterman, 1993). Algunos de los problemas de contaminación ambiental pueden resolverse por estos mecanismos: cerca de 300 compuestos contaminantes del suelo se consideran factibles de biodegradación microbiana, por lo que la biorremediación se aplica en ambientes contaminados por:

- derramamiento de petróleo crudo e hidrocarburos derivados (benceno, xileno, tolueno, etc.)
- solventes diversos (acetona, butanol, etilenglicol, cloruro de metilo)
- otros: pentaclorofenol, TNT, halógenos, pesticidas

Para lograr una efectiva biodegradación es necesaria la presencia de microorganismos o de asociaciones apropiadas y de condiciones ambientales adecuadas para la actividad biológica. Se requieren además, conocimientos de ecología microbiana y de bioingeniería a los efectos de diseñar condiciones favorables para el desarrollo y actividad microbiana para descontaminar ambientes naturales (Siquiera *et al*, 1994).

Los **procesos** se realizan:

- **in situ**, el suelo se emplea como un gran reactor, los residuos se incorporan en capas de aproximadamente 50 cm, en el suelo o en pilas en el compostaje, donde sufrirán el ataque microbiano, se agregan los nutrientes necesarios y humedad para estimular a la biomasa microbiana
- **en reactores** especialmente diseñados, que pueden tratar gran volumen de sustancias en períodos más cortos de tiempo.

Muchas veces resulta necesario incrementar la población de microorganismos responsables de las transformaciones. Así, la **inoculación** del ambiente contaminado con organismos seleccionados aumenta con el tiempo. El incremento se puede lograr de varias maneras:

- estimulación de la población existente por alteraciones del ambiente o agregado de nutrientes
- aislamiento y selección de organismos competentes y posterior inoculación
- uso de microorganismos contruidos por ingeniería genética, denominados (**MEG**), con propiedades deseables que pueden albergarse en plásmidos o en el cromosoma microbiano.

El cuadro 6 resume las condiciones para favorecer el proceso de depuración de suelos o aguas contaminadas.

Cuadro 6- Requisitos para lograr éxito en la biorremediación

- Los contaminantes deben estar biodisponibles, es decir no adsorbido en un residuo inaccesible (arcillas, humus)
- Los microorganismos degradadores apropiados deben estar presentes en el suelo, agua, o disponibles para la inoculación
- Los compuestos recalcitrantes: no son degradados a velocidad razonable: ejemplo de compuestos naturales recalcitrantes: humus, artificiales (pesticidas, plásticos)
- Los organismos deben degradar el contaminante a velocidad tal que permita llevar su concentración a estándares regulares
- Deben reunirse condiciones ambientales favorables para el desarrollo microbiano: temperatura del suelo, pH, aireación, humedad
- Puede requerirse fertilización (N, P, K, etc.) para estimular procesos degradativos
- El costo del tratamiento debe ser menor que el de las otras tecnologías disponibles

La falla en alguna de estas condiciones puede conducir al fracaso de un proceso de biorremediación, como ocurre en caso de suelos muy secos, o de pH inadecuado para la actividad biológica.

El cuadro 7 resume las estrategias en la bioremediación.

Cuadro 7- Estrategias para la biorremediación

- **Pasiva o intrínseca**: "natural", de un lugar contaminado por organismos indígenas.
- **Bioestimulación**: adición de nutrientes, N, P, S, etc. para incrementar a los microorganismos del suelo
- **Bioventilación**: donde se agregan estimulantes gaseosos al suelo, como O₂, CH₄, pasivamente o en forma forzada, para estimular la actividad microbiana
- **Bioaumentación**: inoculación de microorganismos a un sitio contaminado. El inoculante puede tener un microorganismo natural o modificado genéticamente (solos o en consorcio), seleccionados por su capacidad degradativa
- **Rellenos sanitarios**: "landfarming" enterrar contaminantes en suelos no contaminados, con capa impermeable inferior para evitar pérdidas. Se combina con los anteriores.
- **Compostaje**: microorganismos aerobios, termófilos, en pilas o reactores, humedecidos luego de atacar materiales rápidamente degradables, atacan a las sustancias xenobióticas
- **Fitorremediación**: empleo de plantas para sacar o transformar contaminantes (plantas hiperacumuladoras o que estimulan microorganismos rizosféricos degradadores)

La biorremediación **pasiva o intrínseca** es la que ocurre naturalmente por acción de los microorganismos nativos. Esta es la más frecuente estrategia de degradación de contaminantes, a pesar de que el proceso puede ser muy lento si las condiciones no son las adecuadas.

La **bioestimulación**, que incorpora nutrientes, como fuentes de nitrógeno y fósforo, con el objeto de estimular a la microflora nativa, es corrientemente empleada. Los nutrientes pueden incorporarse con agua de riego, en caso de suelos contaminados, o en preparados solubles en hidrocarburos, en el caso de derrames de petróleo en el mar.

La **bioventilación**, que emplea gases estimulantes, como O₂, CH₄, en forma pasiva o forzada en los suelos a los efectos de incrementar la actividad degradadora de la población nativa, requiere dispositivos especiales, de tipo industrial, por lo cual los suelos contaminados se transportan y depositan en estructuras del tipo de los biodigestores, con las instalaciones adecuadas para la entrada pasiva o forzada de gases.

La **bioaumentación**, es la inoculación del sitio contaminado con microorganismos seleccionados para estimular la degradación. Los inoculantes pueden estar formados por microorganismos nativos seleccionados para el proceso en cuestión o bien se pueden usar aquellos genéticamente modificados, a los cuales por ingeniería genética se les incorporaron genes activos en la biodegradación. Puede tratarse de una sola especie o de varias especies (consorcio microbiano). Los mismos se seleccionan en el laboratorio, inoculando con suelo o aguas, medios de cultivo con dosis crecientes de la sustancia tóxica en estudio, por ejemplo, hidrocarburos, como única fuente de C y energía. Las colonias que se desarrollan en estos medios, se van seleccionando por su capacidad degradadora sobre el xenobiótico. Otros microorganismos se construyen por ingeniería genética, incorporando genes específicos en sus plásmidos.

Rellenos sanitarios, consisten en la aplicación e incorporación de suelos contaminados en la superficie de suelos no contaminados. Son en general excavaciones de suelos muy pobres, con un fondo de arcillas o algún material impermeable, para evitar la contaminación de las napas freáticas. El suelo contaminado es arado y se mezcla bien, pudiéndose incorporar nutrientes, inóculo microbiano y gases, para acelerar el proceso.

Compostaje, es el uso de procesos microbianos aerobios y termófilos en pilas o reactores, para degradar el polucionante. Los dispositivos se mezclan periódicamente y se humedecen a los efectos de lograr la máxima actividad biológica. Los microorganismos activos se encuentran en el suelo y son incrementados por el proceso de compostaje.

Fitorremediación, es el empleo de vegetales para absorber, remover o transformar contaminantes. Son muy empleadas en el caso de remoción de metales pesados, que se acumulan en la madera en el caso de árboles o en la fitomasa en herbácea, que debe tratarse luego en incineradores.

La acción se da directamente, en plantas hiperacumulantes, o indirectamente, por estimulación de microorganismos activos en su rizosfera.

Bibliografía

ALEXANDER, M., 1977: Pesticides, en **Introduction to Soil Microbiology**, Wiley & Sons, Nueva York: 438-456.

BALBA, M. T. 1993 Microorganisms and detoxification of industrial waste, en : **Exploitation of Microorganisms**, D. G. Jones (ed), Chapman & Hall, London: 371-410

BOUWER, E. J. 1993 Bioremediation of organic contaminants in the subsurface, en: **Environmental Microbiology**, Wiley-Liss, New York: 287-318

BARKAY, T., D. F. SCHEARER y B. H. OLSON 1986 **Toxicity Testing Using Microorganisms** B. J. Dutka y G. Bitton (eds) vol 2, CRC Press, Boca Raton, Florida: 133-135

CORREA, A., 1980: Consideraciones ecológicas sobre aplicaciones de plaguicidas en la agricultura, en Nueva Agr. Trop., XXXII (3): 5-19.

DOMMERGUES, Y. y MANGENOT, F., 1970: Les traitements pesticides, en **Ecologie Microbienne du Sol**, Dommergues, Mangenot (eds.), Masson, París.: 498-527.

FRIONI, L., 1990: **Ecología microbiana del suelo**, Depto. Publicaciones de la Universidad de la República, Montevideo: 357-374

GREAVES, M. P.; N. J. POOLE; K. H. DOMSCH; G. JAGNOW y W. VERSTRAETE, 1980: Recommended tests for assessing the side effects of pesticides on the soil microflora, en Tech. Rep. Agric. Counc. Weed Res. Organ., 59 pp.

HICKS, R. J., G. STOTZKY y P. VAN VORIS 1990 Review and Evaluation of the Effects of Xenobiotic Chemicals on Microorganisms in Soil, en **Advances in Applied Microbiology**, vol 35: 195-253

JOHNEN, B. G. y E. A. DREW, 1977: Ecological effects of pesticides on soil microorganisms, en Soil Sci., 123: 319-324.

MALKOMES, H. P. y B. WÖHLER, 1983: Testing and evaluating some methods to investigate side-effects of environmental chemicals on soil microorganisms, en *Ecotox. and Environ Safety*, 7: 284-294.

MATSUMURA, F., 1982: Degradation of pesticides in the environment by microorganisms and sunlight, en **Biodegradation of Pesticides**, F. Matsumura y C. R. Krishnamurti (eds.), Plenum Publish. Corp., Nueva York: 67-87.

SHANNON, M. J. R. y R. UNTERMAN 1993 Evaluating bioremediation: Distinguishing fact from fiction. *Ann. Rev. Microbiology*, Palo Alto, 47: 715-738

SIQUEIRA, J. O., F. M. de S. MOREIRA, B. M. GRISI, M. HUNGRIA y R. S. ARAUJO 1994 **Microorganisms e Processos Biológicos do Solo: Perspectiva Ambiental**, EMBRAPA-SPI, Brasília, DF

SOULAS, G., 1982 Mathematical model for microbial degradation of pesticides in the soil, en *Soil Biol. Biochem.*, 14: 107-115.

Capítulo 21

Anexo Práctico

Contenido

Indicadores biológicos

Muestreo de suelos, aguas, alimentos

Determinaciones de: H%,

Biomasa microbiana: técnica de fumigación-inoculación y fumigación-extracción

Actividad respiratoria: desprendimiento de CO₂

Indices: qC-CO₂/C-biomasa

Recuentos microbianos: heterótrofos totales, hongos, algas, protozoos, grupos fisiológicos

Actividades enzimáticas: deshidrogenasas, fosfatasas ácida y alcalina, hidólisis de la fluoresceína di acetato (*FDA*)

Ciclos biogeoquímicos

Carbono: actividad mineralizante, amilolíticos, celulolíticos

Nitrógeno: Fijación biológica del N₂ (FBN), mineralización: amonificación, nitrificación. Pérdidas: denitrificación

Azufre: sulfooxidación, sulfatorreducción

Fósforo: solubilización de P insoluble. Mineralización de P-orgánico

Micorrizas: ecto y endomicorrizas del tipo arbuscular. Inoculación

Biodegradación de residuos: Evaluación del grado de madurez de compost

Bibliografía

Actividad biológica del suelo

Muestreo y preparación de las muestras

- a) un número adecuado de submuestras (10-20) compone la muestra de suelo, por ejemplo, 1 Kg, recogidas en el predio al azar
- b) secar las muestras al aire, sobre papel absorbente en bandejas dentro del laboratorio o usarlas inmediatamente (estado fresco)
- c) tamizar el suelo a 2mm y guardarlo en bolsas rotuladas en heladera hasta su empleo (lo más rápido posible)

Determinación del porcentaje de humedad

Se realiza en cápsulas metálicas con tapa, numeradas y taradas previamente = Peso Tara (PT). En caso de no disponer de las mismas, usar cajas de Petri

Procedimiento

- a) Colocar suelo fresco en las cajas, pesar las mismas (una cifra después de la coma) = Peso Fresco (PF)
- b) Colocar las muestras en estufa a 105°C durante 48 horas, destapadas (no perder los rótulos)
- c) Poner las cajas tapadas en desecador con silica-gel deshidratado o CaCl₂ anhidro hasta pesar
- d) Pesar nuevamente = Peso Seco (PS)

Cálculo del H% (agua como % del peso seco del suelo)

$$H\% = \frac{PF - PS}{PS - PT} \times 100$$

Cálculo del factor de corrección a suelo seco: $h = \frac{100 + H\%}{100}$

NOTA: Las muestras se guardan en bolsas de plástico bien cerradas y rotuladas en heladera (3-5°C) hasta efectuar los análisis (no más de 15 días-1 mes)

Según las determinaciones a efectuar, muchas muestras pueden guardarse congeladas a -20°C

Actividad respiratoria

Se evalúa el CO₂ liberado por el suelo solo y con el agregado de sustancias cuya degradación y efecto sobre la microflora se desea estudiar (abonos verdes, pajas, fertilizantes, pesticidas) por técnicas de absorción en el infrarrojo, cromatografía gaseosa, conductividad eléctrica, gravimetría o volumetría (luego de absorberlo en solución alcalina).

Analizaremos la técnica volumétrica

Técnica

- 100 g de suelo fresco o seco al aire y tamizado (2 mm), de humedad conocida, solo y con los aditivos que se desean estudiar, se colocan en recipientes de vidrio que se puedan cerrar herméticamente de un volumen de aproximadamente 1 litro (3 repeticiones). Se puede reducir proporcionalmente las muestras: por ej. 30 g. en recipientes de 250mL.
- se lleva a humedad fija (75% de la capacidad de campo o la deseada) y se mezcla
- colocar un vasito en el fondo del frasco (o en sistema suspendido sobre el suelo) con 15 mL de solución NaOH 0,5 N y cerrar herméticamente
- incubar a 28°C 7 días
- preparar blancos de reactivos (sin suelo)
- determinar el CO₂: transvasar el contenido del vaso interno a un erlenmeyer de 125 mL con ayuda de agua
- agregar 5 ml solución de Cl₂Ba 2% y 2-3 gotas de fenolftaleína

- valorar con CIH 0,5 N (valorado con carbonato de calcio anhidro) hasta desaparición color rosa: gasto = GM
- igual procedimiento para los blancos, gasto = GB

Cálculos

$$a) \text{ mg C-CO}_2/100 \text{ g suelo seco} = \frac{(\text{GB-GM}) \text{ N(HCL)} 6 \times h \times 100}{7 \text{ días a } 28^\circ\text{C} \times \text{peso de la muestra}}$$

6mg= equivalente en C del HCl 1N porque: CO₂ (44g)---C (12g) PE=PM/2

$$h = \frac{100 + H\%}{100} \quad \text{factor de corrección de humedad para llevar los cálculos a suelo seco a } 105^\circ\text{C}$$

H% = humedad referida a peso seco a 105°C

b) coeficiente de mineralización del carbono en 7 días:

$$C_m = \frac{(\text{mg C-CO}_2/100 \text{ g})}{\text{C org.}\% (\text{g}/100 \text{ g})} \times 100$$

Expresar el numerador y denominador en las mismas unidades (mg/100g/mg/100g), por ejemplo multiplicar el numerador por 10⁻³

Biomasa microbiana

Esta importante y dinámica fracción de los ecosistemas (carbono, N, P, orgánico que se encuentra en células microbianas vivas) se evalúa por:

Recuentos microbianos y cálculo de la biomasa (kg/ha) conociendo el peso promedio de los organismos en estudio: se expresa en kg biomasa/ha

Técnica de fumigación/inoculación (FI) de Jenkinson y Powlson (1976), por análisis del C-CO₂ liberado en muestras de suelo previamente fumigadas con cloroformo, desfumigadas y posteriormente inoculadas con suelo fresco, y otras muestras con suelo sin fumigar y de fumigación-extracción (FE).

Técnica:

- las muestras de suelo, frescas o secadas al aire y tamizadas a 2 mm se dividen en dos partes de 50 g cada una, una de ellas se expone a los vapores de cloroformo puro, obtenidos al efectuar vacío en desecador de vidrio cerrado herméticamente, con las muestras de suelo en tapas de cajas de Petri y el cloroformo en vasito central
- dejar en contacto con los vapores por 24 h a 28°C
- desfumigar por repetidas aspiraciones con bomba de vacío hasta desaparición del olor típico del cloroformo
- llevar a capacidad de campo o a la humedad deseada con agua e inocular con 0,4% de suelo fresco, mezclado cuidadosamente con el resto del suelo
- el suelo no fumigado se mantuvo el mismo período a 28°C y luego se llevó a la misma humedad
- las muestras se incuban en frascos herméticamente cerrados para la evaluación del CO₂, con 20 mL NaOH 0,5 N, efectuar blancos, sin suelo
- evaluar a los diez días de incubación a 28°C (procedimiento ya analizado)
- las muestras no fumigadas se incuban por otros 10 días con soda fresca

Resultados: Biomasa (mg C-CO₂/100 g suelo seco) = X-Y/k

donde: X = mg C-CO₂/100 g suelo fumigado, reinoculado e incubado durante 0-10 días

Y = mg C-CO₂/100 g suelo no fumigado e incubado entre 10 y 20 días (dato más representativo para muchos autores de la actividad de la microflora del suelo, al eliminarse el efecto del pre-tratamiento de la muestra: secado al aire, tamizado, rehumedecimiento)

k = constante determinada por varios autores, se usa en general 0,45 para muchos autores, que representa la fracción de la biomasa total del suelo que puede ser mineralizada en estas condiciones (10 días, 28°C)

Biomasa como fracción del C%:

Se expresa la proporción del carbono orgánico total que está como biomasa

$$\text{Corg.-biomasa\%} = \frac{\text{mg C-CO}_2/100 \text{ g suelo} \times 100}{\text{C\% (g/100)}}$$

Nota: igualar las unidades en numerador y denominador.

Se pueden expresar los resultados como **N-biomasa** procediendo a extraer el N-NH₄⁺ de las muestras incubadas con KCl 2N y valorando con electrodos específicos o destilación por arrastre de vapor (ver ciclo del nitrógeno). **P-biomasa:** extrayendo el P soluble luego de las incubaciones.

C-biomasa por el método de fumigación-extracción

(Vance y col., 1987, Soil Biol Biochem. 19(6):703-707)

El cloroformo es un biocida efectivo que actúa sobre los lípidos de las membranas, lisando a las células pero no solubiliza a la materia orgánica del suelo ni la hace más biodegradable. Los contenidos de las células lisadas se extraen con solución salina de sulfato de potasio.

Materiales

dsecador con conexión a vacío, bomba de vacío

cloroformo puro, libre de etanol

K₂SO₄ 0,5 M

Agitador

filtros

ácido sulfúrico concentrado

K₂CrO₆ 0,0667M

estufa a 150°C

espectrofotómetro

curva patrón (ftalato de K)

Técnica

- 50 g de suelo se colocan en tapas de cajas de Petri en desecador, con toallas de papel humedecidas en las paredes (evitar desecación), con vasito con cloroformo y perlas de vidrio, en el fondo del mismo. Cerrar herméticamente con vaselina y conectarlo a bomba de vacío. Hacer hervir el cloroformo, 2-3 veces (cambiar el cloroformo de ser necesario).
- Cerrar el vacío y dejar las muestras 24 horas con los vapores de cloroformo en el desecador, cubierto con bolsa negra (oscuridad)
- Desfumigar: sacar el vasito con cloroformo, cerrar el desecador y hacer vacío y restituir la presión dejando entrar aire, por unas 5 veces (no debe quedar olor a cloroformo en las muestras)
- Extracción del C-biomasa en muestras fumigadas (F) y no fumigadas (no F) con K₂SO₄ 0,5M en relación 1:5 (suelo, solución). Ej: 10g suelo con 50 mL K₂SO₄ 0,5M (en frascos con tapa rosca)
- Agitar 30 minutos en agitador
- Filtrar con papel filtro N° 42 plegado y recoger en recipientes con tapa
- Guardar en congelador si no se analizan el mismo día
- Técnica: 4 mL de extracto en tubo de digestión con tapa rosca, añadir 1 mL K₂Cr₂O₆ (0,0667M) y 5 mL ácido sulfúrico concentrado. Tapar no herméticamente
- Colocar en estufa a 150° C por 30 minutos. Incluir un blanco con agua en lugar del extracto
- Dejar enfriar a temperatura ambiente por 30' y luego en agua 15'

- Medir en espectrofotómetro a 600 nm y comparar con curva patrón (ajuste a una recta), realizada con glucosa o ftalato de potasio (ej: solución madre de ftalato de K: 6,382 g/L posee 3,0 g/L de C), a partir de ella se efectúan diluciones
- Se puede leer hasta 24 h más tarde

$$\text{C-biomasa}/100\text{g suelo seco} = (\text{C Fum} - \text{C noFum}) \frac{50}{4} \times 10 \times 2,64 \times h$$

C Fum = valor C-suelo Fumigado

C no Fum = valor C- suelo no Fumigado

2.64 es el factor de corrección propuesto por los autores, (aproximadamente un 38% del C-biomasa total es evaluado en estas condiciones)

50 = vol. de extracción de 10g de suelo, 4mL, alícuota analizada

h= factor de corrección de humedad = $\frac{100 + H}{100}$

100

N-biomasa por la técnica de fumigación-extracción

(Schinner y col, 1996)

- Luego de la fumigación con cloroformo, las muestras se extraen con solución de sulfato de potasio. El Se determina el Ntotal del filtrado y se convierte en N-biomasa (Brookes y col. 1985) Fumigar el suelo como para la determinación del C-biomasa, pero el cloroformo no se elimina. Se mezcla el suelo fumigado con solución de sulfato de potasio 0,5M (1/4 partes), agitar por 30 minutos y filtrar (triplicado)
- Repetir el procedimiento en suelo sin fumigar
- Analizar los filtrados por N% por el método de Kjeldahl (o guardar a 4°C hasta análisis)

Cálculos: $\frac{S-C}{0,54} = \mu\text{gN-biomasa.g}^{-1}$

0,54

S= valores medios de las muestras, C= valores medios de los controles

0,54 = fracción del N-biomasa mineralizado en las condiciones de la experiencia

Variante: con reactivo ninhidrina

Las muestras fumigadas se extraen con solución de cloruro de potasio (2M) y se filtran. El N-aminoácidos de los filtrados se evalúan en la reacción con la ninhidrina (Amato y Ladd, 1988)

Fumigar el suelo húmedo con cloroformo, 10 días a 25°C, extraer el suelo con KCl (1/5 partes) y filtrar (3 repeticiones)

Repetir el procedimiento para el suelo no fumigado (3 repeticiones), controles

En tubo test mezclar: 0,1 mL de los filtrados con 0,5 mL de sol. citrato de Na (0,4M) y agitar bien.

Agregar 0,5 mL de la mezcla de reactivos:

ninhidrina en etilenglicol monometiléter, 4% p/v, cloruro estañoso: 80mg $\text{Cl}_2\text{St.2H}_2\text{O}$ en mezcla de 25 mL de buffer de acetato de sodio, 50 mL del reactivo de ninhidrina y 25 mL de agua destilada.

Los tubos se colocan en baño María por 30 minutos. Enfriar los tubos en agua de la canilla y agregar 5mL de etanol. Agitar los tubos y medir a 570nm frente a blancos de reactivos, antes de 1 hora.

Cálculos: $\frac{S.V.h}{\text{Peso suelo(g) (alícuota del filtrado)}} = \mu\text{g ninhidrina-N.g}^{-1}$

S= valores medios de las muestras, V= volumen de extracción. H= factor de corrección de la H%

Solución estandar stock (28 µg N-leucina.mL⁻¹)

Disolver 0,262g de leucina en 100mL de HCl 0,1M, llevar el volumen a 1000mL con agua destilada en balón aforado.

Solución de trabajo (2,8 µg N-leucina.mL⁻¹): en frasco aforado de 100 mL, diluir 10 mL de la solución estandar y llevar a volumen con agua destilada. Preparar diluciones para construir la curva de calibración y proceder igual que para las muestras.

P-biomasa por la misma técnica

Se determina por la diferencia en P extraíble entre muestras fumigadas y no fumigadas

Fumigar las muestras (3 repeticiones) con cloroformo por 24h a 25°C

Agitar las muestras y los controles (no fumigados) por 30 minutos con 200 mL de solución de bicarbonato de sodio (0,5M, pH 8,5) y filtrar

Analizar los filtrados de las muestras y los controles para P-soluble

Actividades enzimáticas

Deshidrogenasas

Schinner y col, 1995: 243

Fundamento: las muestras de suelo se mezclan con cloruro de p-iodo nitrotetrazolium (INT) y se incuban 2 horas a 40° C, el p-iodo formazán formado (rojo) se extrae con acetona, metanol y/o etanol y N-dimetilformamida (1/1), se mide en espectrofotómetro a 464 nm con curva patrón de INTF.

Soluciones

- HCL 3M : 100 mL concentrado (37%) con 300 mL de agua destilada
- Buffer Tris 1M, pH 7,0: 30,28g Tris (hidroximetil-aminometano) en 200 mL de agua destilada, ajustar pH 7,0 con HCL y llevar a 250 mL en matraz aforado.
- Sustrato: 500 mg INT + 2mL N-dimetilformamida, agitar vigorosamente y llevar a 100 mL con agua destilada (aforado). Prepararlo cada vez y guardarlo en oscuridad.
- Solución stock: 100 µg de INTF/mL (10 mg en matraz aforado de 100mL, diluir con 80 mL de acetona y llevar a 100 con la misma).
- Curva de calibración: añadir 0,1, 2 y 5 mL de INTF estándar en 4 tubos y llevar a 13,5 mL con solución de extracción (acetona), Corresponde a 0, 100, 200 y 500 µg INTF en el volumen de reacción (13,5mL) (PM = 471,3 g)

Procedimiento

- 1 g suelo húmedo en tubos con tapa rosca, añadir 1,5 mL buffer Tris y 2 mL solución de sustrato. Envolver cada tubo con papel de aluminio para evitar la luz.
- Tapar los tubos, agitar brevemente en vortex, incubar por 2 h a 40°C en oscuridad en estufa o baño de agua. Control: suelo autoclavado por 20' e igual procedimiento anterior
- Extracción: 10 mL de acetona a cada tubo, agitar y dejar 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad, agitar fuerte en el vortex cada 20'
- Dejar decantar, si es necesario filtrar y/o centrifugar y medir a 464 nm, acetona como blanco, junto a la curva patrón (no usar celdas de plástico)

Cálculos: Leer en la curva patrón (ajuste a una recta) y calcular

$$\frac{(S-C) \times h}{2h} = \mu\text{g INTF g}^{-1} \text{ suelo seco/h}$$

S = valor en la muestra
C = control estéril

Se puede expresar la actividad como µLH transferidos/g⁻¹ suelo seco

multiplicando los μg INTF por 150,35

Hidrólisis del acetato de fluoresceína (FDA)

Según trabajo de: Schnürer and Roswall, 1982

K. Alef, 1998 En: Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Eds: K Alef and P. Nannipieri. Academic Press, N.York: 232-233

Burket, J. Z y R.P. Dick. Biol Fertil Soils (1998) 27:430-438: Microbial and soil parameters in relation to N mineralization in soils of diverse genesis under differing management systems.

El método se basa en la estimación de la fluoresceína liberada en suelo tratado con solución de FDA e incubado a 24°C

Soluciones

Fosfato de sodio buffer (60mM, pH 7,6), ajustar a pH 7,6 con HCl 0,1N

Acetona

Solución de FDA 2mg/mL acetona, guardar a -20°C

Solución estándar de fluoresceína: 5mg/mL acetona, guardar a -20°C

Procedimiento

Suelo húmedo se tamiza a 2 mm se guarda a 5°C antes del análisis.

TOMAR: 1g suelo y 20mL fosfato buffer 60mM, en frascos de 125mL y la mezcla se incuba en agitador a 24°C por 15 minutos, luego 100 μL de sol. stock de 2mg/mL de FDA (sustrato) a las muestras, no a los controles. Incubar agitando 2 horas a 24°C

Parar la reacción agregando 20mL acetona (concentración final 50% v/v). Agregar 100 μL sustrato a los controles.

Centrifugar a 6000rpm por 5 minutos, filtrar con Whatman N°4 y leer D-óptica del sobrenadante claro a 499nm (si da más de 0,8 diluir las muestras en acetona)

Curva de calibración

Preparar como se señala arriba, de modo que la relación concentración de fluoresceína y la densidad óptica sea lineal.

Resultados: **en microgramos de fluoresceína/g suelo seco/hora= mg/kg suelo seco/h**

Fosfatasa ácida y alcalina

Schinner y col, 1995, pp 213

Fundamento: el sustrato empleado es el fosfato de p-nitrofenil. Las muestras se incuban una hora a 37°C en estufa o baño de agua. El p-nitrofenol liberado por la enzima se evalúa luego de la extracción, se genera color con NaOH y se mide a 400 nm, con curva patrón.

Soluciones:

- f) **Sustrato para la fosfatasa ácida:** disolver 4,268 g de fosfato de p-nitrofenil. 6 H₂O disódico en buffer para fosfatasa ácida y llevar el volumen a 1000 mL con el mismo buffer en matraz aforado (hacerla **cada día**)
- g) **Sustrato para OH⁻:** ídem, pero en buffer para fosfatasa alcalina
- h) **Buffer:** 12,1 g tris (hidroximetil) aminometano, 11,6 g de ácido málico, 14 g de ácido cítrico monohidratado y 6,3 g de ácido bórico en 500 mL de NaOH 1 M y diluir a 1000 mL con agua destilada (aforado). Guardar a 4°C
- i) **Ácida:** pH 6,5: mezclar 200 mL de stock buffer y 500 mL de agua destilada Ajustar a pH 6,5 con HCl, llevar a 1000 mL con agua destilada
- j) **Alcalina:** pH 11: mezclar 200 mL de buffer y 500 mL de agua destilada. Ajustar a pH 11 con NaOH y llevar a 1000 mL con agua destilada
- k) **Solución CaCl₂ 0,5 M:** disolver 36,74 g de CaCl₂.2H₂O en agua destilada, llevar a 500 mL en matraz aforado
- l) **Solución NaOH 0,5 M:** disolver 20 g en agua destilada y llevar a 1000 mL con agua destilada
- m) **Solución estándar stock:** 1 mg de p-nitrofenol/mL: disolver 1 g en agua destilada y llevar a 1000 mL. Guardar a 4°C

- n) **Solución estándar de trabajo:** 20 μ g de p-nitrofenol/mL: diluir 2 mL de solución estándar en 100 mL de agua destilada
- o) **Curva:** pipetear 0 (reactivo blanco), 1, 2, 3, 4 y 5 mL de solución estándar de trabajo en 6 tubos, ajustar los volúmenes a 5 mL con agua destilada y agregar 1 mL de CaCl_2 y 4 mL de NaOH 0,5 M, mezclar bien, filtrar por dos papeles

Se obtiene: 0, 20, 40, 60, 80 y 100 μ g de p-nitrofenol

Procedimiento:

- 1 g de suelo en tubo con tapa rosca de unos 150mL. (5 muestras = 3 para análisis y 2 para control) agregar 1 mL de sustrato (ácido o alcalino) y 4 mL de buffer de distinto pH a 3 de los tubos. A los dos controles agregar sólo 4 mL de buffer
- Agitar, tapar e incubar una hora a 37°C
- Agregar 1 mL de CaCl_2 y 4 mL de NaOH al control y a las muestras
1 mL de solución sustrato (ácido o alcalino) luego de la incubación a los controles
- Para diluir (de ser necesario, si la concentración es muy elevada) agregar 90 mL de agua destilada a las muestras y los controles, agitar brevemente, filtrar
- Medir la densidad óptica a 400 nm y calcular los $\mu\text{g NP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ con ayuda de la ecuación de ajuste a una recta (datos de la curva patrón)

Expresión resultados: h = factor suelo seco 10 = factor dilución extracto
 $(S - C) \times 10 \times h = \mu\text{g NP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ S =media de muestras C =media de controles

Recuentos microbianos

Suspensiones-diluciones del suelo

- pesar 10 g suelo fresco, de contenido de humedad conocido, introducirlo asépticamente en un frasco con 90 mL agua destilada estéril, solución fisiológica (CINa al 0,85%) u otro medio mineral
- agitar en agitador magnético un tiempo establecido (2 minutos), se obtiene así la dilución 1/10 = 10^{-1} (se puede partir de 30 g en 270 mL, etc.)
- tomar 1 mL de la primera suspensión-dilución y pasarlo a otro tubo con 9 ml de agua estéril (dilución 10^{-2})
- proceder como anteriormente hasta la suspensión-dilución adecuada según la densidad microbiana de las muestras (10^{-7} , 10^{-8} , etc.). Cambiar los punteros de la pipeta automática en cada paso o usar una pipeta estéril y enjuagarla 5 o más veces en una dilución antes de pasar a la siguiente

Microflora heterótrofa total

Medio

Glucosa	10g
K_2HPO_4	0,2 g
agar	15g
extracto de suelo	20 mL
agua	1.000 mL

Extracto de suelo

- autoclavar durante 1 hora a 120°C 1 kg de suelo fértil y neutro en 1,5 litro de agua corriente
- decanar y filtrar por batería de filtros de papel hasta clarificar
- completar a 1 litro con agua destilada
- repartir en pequeños volúmenes y esterilizar 20 minutos a 120°C y guardar hasta su uso
- Repartir el medio de cultivo fundido en cajas de Petri estériles de 15-20 ml cada una y dejar solidificar

- sembrar en superficie 0,1 ml de suspensiones-diluciones altas: 10^{-5} en adelante, 3 cajas/dilución
- incubar las cajas invertidas a 28-30°C y leer entre el 5º y 8º día
- contar las cajas que contengan entre 30 y 300 colonias, efectuar promedio de las tres cajas y multiplicar por la inversa de la dilución y por el factor de corrección de la humedad. Ejemplo:
promedio colonias en 3 cajas de dilución $10^{-7} = 58$ $H\% = 20$, $h = 1,20$

$$\text{Nº microorg./g suelo seco} = 58 \times 10^7 \times 1,20 = 69,6 \times 10^7 = 7,0 \times 10^8$$

Actinomicetes

Medio

glicerol	10g
asparaginato de Na	1g
K ₂ HPO ₄	1g
agar	15g
agua destilada	1000 mL

Proceder como anteriormente para el recuento; colonias típicas, secas, adheridas firmemente al medio.

Hongos

Medio

peptona	5g
glucosa	10g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄	0,5g
agar	2g
sol. acuosa de Rosa de Bengala al 1/300	100 mL
agua destilada	900 mL

Agregar en cada caja estéril 1 mL de solución de sulfato de estreptomicina (75 mg/100 mL) esterilizada por filtración con filtros millipore de 45 micras y luego el medio en sobrefusión

Se emplea también: extracto de malta 20g
 Agar 20g
 agua 1L

- luego de esterilizado y en sobrefusión bajar el pH a 4,5-5,0 con ácido láctico y cítrico

Algas

Medio

KH ₂ PO ₄	0,5g
NaNO ₃	0,5g
MgSO ₄	0,15g
CaCl ₂	0,05g
NaCl	0,05g
FeCl ₃	0,01g
agua corriente	1000mL

- Incubar a la luz con burbujeo de aire, seguir el enriquecimiento por el incremento de los pigmentos y efectuar aislamientos en el mismo medio sólido.

Protozoos

Medio

NaCl	5g
------	----

agar 10g
 agua destilada 1000mL
 pH neutro

- Repartir en cajas de Petri y antes de solidificar colocar anillos de vidrio estériles, o perforar el agar con sacabocado y sembrar toda la caja con cultivo denso de una bacteria, como *Aerobacter* sp.
- inocular con 0,05 ml de las suspensiones-diluciones de suelo en cada orificio, incubar a 28°C
- examinar luego de 15 días el desarrollo colocando la caja sobre la platina del microscopio
- se observan los protozoos por su movilidad, a bajo aumento

Grupos fisiológicos

Su estudio se realiza empleando **medio y/o condiciones de cultivo selectivos**, que permiten poner en evidencia organismos que realizan determinado proceso metabólico: celulolíticos (aerobios o anaerobios), fijadores de nitrógeno, etc. Los recuentos se efectúan en

- medio sólido**, sembrando un volumen conocido de las suspensiones-diluciones en **superficie o en inclusión** (antes de agregar el medio sobrefundido y a menos de 40°C el que se mezcla íntimamente con el inóculo antes de solidificar)
- medios líquidos** que se siembran con una alícuota de las suspensiones-diluciones a razón de 3 o 5 tubos por cada una. Luego de la incubación se consideran positivos aquellos tubos:
 - que presentan desarrollo** (turbidez)
 - o por la desaparición del sustrato o aparición de productos del metabolismo:** formación de nitratos a partir de amonio, en los nitrificantes.

Cálculo del número más probable de microorganismos por el método de Mc Crady

- sembrar 3 o 5 tubos por cada suspensión-dilución con 1 mL cada uno
- incubar a la temperatura apropiada y el tiempo requerido en cada caso
- anotar el número de tubos positivos en cada suspensión-dilución
- determinar el número característico (3 cifras): la última dilución (de izquierda a derecha) donde todos los tubos son positivos, es la primera cifra y las dos restantes se forman con el número de tubos positivos en las siguientes diluciones.

Ejemplo

1) 3 tubos/dilución	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Nº tubos positivos:	3	3	3	2	1	0
Número característico:	321 (dilución 10^{-4})					

2) 5 tubos/dilución	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Nº tubos positivos:	5	5	5	3	2	0
Nº característico:	532 (dilución 10^{-4})					

- determinar el número más probable (**NMP**) de microorganismos, con ayuda de tablas construidas a partir de algunos datos de recuentos de viables en medio sólido (cajas) y luego por cálculos estadísticos se infieren todas las combinaciones posibles. Se entra en la tabla correspondiente con el número característico y se lee en **NMP** en la alícuota sembrada en la dilución correspondiente al primero de los números del N° característico.

ejemplo 1

Nº característico: 321 (10^{-4}) NMP 15,0 microorganismos en 1 mL dilución 10^{-4}

Nº microorganismos/g suelo seco = $15,0 \times 10^{-4} \times h = 1,5 \times 10^{-5} \times h$

ejemplo 2

Nº caract. 532 (10^{-4}) NMP 14,0 microorganismos en 1 mL de la dilución 10^{-4}

Nº microorganismos/g suelo seco = $14,0 \times 10^4 \times h = 1,4 \times 10^5 \times h$

Nota: si se siembra con una alícuota menor de 1 mL es necesario tenerlo en cuenta en los cálculos. Promediar los resultados de las repeticiones efectuadas.

Tablas de Mc Crady

3 tubos/dilución

1	2	1	2	1	2
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.4	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	0.7	221	3.0	321	15.0
102	1.1	222	3.5	322	20.0
110	0.7	223	4.0	323	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	110.0
200	0.9	301	4.0		140.0

1 = Nº característico; 2 = NMP

Ciclo biológico del carbono

Celulolíticos aerobios

Medio

K ₂ HPO ₄	1 g
NaNO ₃	0,5 g
MgSO ₄	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
agua	1 litro

- Repartir en tubos de ensayo a razón de 8 mL cada uno y agregar una banda de papel de filtro como única fuente de carbono y energía
- Esterilizar 20 minutos a 3/4 atmósfera
- Sembrar con 1 mL de las suspensiones-diluciones de suelo (10^{-2} - 10^{-7}) 3 o 5 tubos/dilución
- Incubar por 15 días a 28°C: tomar como positivos los tubos en donde se visualice el ataque al papel, pigmentación, desarrollo microbiano. A veces es necesario evaluar la integridad del papel con ayuda de un ansa: positivo, si éste se disgrega con facilidad
- Expresar los resultados: Nº celulolíticos / g suelo seco con ayuda de la tabla de Mc Crady.

Aislamiento en medio sólido

- Sembrar con una alícuota de las diluciones más concentradas (10^{-1}) la superficie de caja de Petri con el medio anterior solidificado con 15 g/L de agar. Colocar encima un disco de papel de filtro estéril del diámetro de la caja. Incubar
- Observar colonias típicas en zonas atacadas del papel
- Efectuar una coloración Gram de un trocito del mismo, describir los organismos dominantes y su relación con las fibras de celulosa.

Amilolíticos

Medio

solución salina estándar		50 mL
extracto de suelo		10 mL
almidón	1,5 g	
NH ₄ NO ₃		1,0 g
agua		940 mL
agar		20 g

Solución salina estándar

K ₂ HPO ₄	5 g
MgSO ₄	2,5 g
NaCl	2,5 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,05 g
MnSO ₄	0,05 g
agua	1 litro

- Recuento en medio sólido: como para microflora heterótrofa total
- Recuento en el mismo medio líquido: inocular 3 o 5 tubos/dilución (1 ml). Incubar 15 días
- **Lectura:** pasar 1 mL de cada tubo a un tubo vacío de hemólisis; agregar 1 gota de reactivo iodo-iodurado (Lugol): iodo= 10 g; IK= 25 g; agua= 1 litro. Agregar 2-3 ml de agua. Tubos (+) ligeramente coloreados de amarillo; tubos (-) color azul a violeta y marrón.

Nota: Se emplea también caldo simple o agar simple con 0,2% de almidón u otro azúcar cuya utilización se desee estudiar.

Caldo simple: peptona, 10 g; NaCl= 5 g; extracto de carne= 10 g; agua= 1 litro.

Ciclo biológico del nitrógeno

Fijación por organismos en vida libre y en la rizosfera

Aislamientos y recuentos

Azotobacter y *Derxia* medio LG (Döbereiner, 1980)

sacarosa	20 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g
CaCl ₂	0,01 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,20 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,002 g
FeCl ₃	0,01 g
azul bromotimol (0,5% en etanol)	2,0 mL
CaCO ₃	1,00 g
agar	15 g
agua	1 litro
pH	6,8 (color verde)

Para **Derxia**: reemplazar sacarosa por almidón o glucosa, omitir el carbonato de calcio y agregar 0,01g NaHCO₃

Azospirillum (NFb) (Döbereiner, 1980)

ácido málico	5,0 g
K ⁺ HPO ₄ ⁻	0,5 g

MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,002 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,01 g
Fe EDTA 91,64% peso/vol, agua)	4,0 mL
azul bromotimol (0,5 % p/vol. en etanol)	3,0 mL
KOH	4,5 g
biotina	0,1 mg
agua	1 litro
pH 6,8 (color verde) antes de agregar el agar (semi-sólido)	1,75 g agar

- Distribuir en frascos chicos de antibióticos (7-10 mL) a razón de la mitad de su volumen, esterilizar como de costumbre.

Nota: Para realizar cajas agregar 20 mg extracto de levadura y 15 g de agar

Determinación del efecto rizosférico (R/S) de vegetales sobre estos diazotrofos

- plantas de gramíneas se llevan al laboratorio con el pan de suelo, se corta la parte aérea y se sacude la raíz con suaves movimientos: el suelo que queda adherido se considera rizosférico (**R**)
- colocar la raíz en erlenmeyer de 250 mL y peso seco conocido con 100 mL de agua destilada estéril o solución NFb salina (sin azúcares)
- agitar 10 minutos a 70 rpm en agitador eléctrico
- decantar y realizar suspensiones-diluciones (10^{-1} - 10^{-6})
- retirar la raíz con pinza, enjuagarla con agua que se recoge en el erlenmeyer. Este se lleva a estufa a 105°C para evaporar toda el agua y determinar peso seco del suelo rizosférico (peso erlenmeyer con suelo seco-peso erlenmeyer vacío). Colocarlo en desecador con Cl₂Ca o sílico gel para enfriarlo antes de pesar.
- con suelo no rizosférico (**S**) realizar suspensiones-diluciones (10^{-1} - 10^{-6})

Azotobacter

- inocular 3 cajas/dilución con 0,2 ml de suspensiones-diluciones
- 10^{-1} - 10^{-6} del suelo (**S**) y del (**R**) del erlenmeyer inicial y 10^{-1} - 10^{-3}
- extender el inóculo en toda la superficie con varilla de vidrio doblado 90°, secar a estufa a 37°C e incubar invertidas a 28°C
- leer entre 5-7 y hasta 14 días: colonias típicas transparentes, brillantes, distinguir de contaminantes.

Cálculo de R/S, como se explicó anteriormente

Azospirillum

- inocular 3 frascos/dilución con 0,1 ml cada uno en el medio semi-sólido, con las mismas suspensiones-diluciones que para ***Azotobacter***, incubar a 28°C
- leer entre los 3- 5 días por la aparición de una película sub-superficial, determinar el número característico y calcular la densidad con ayuda de la tabla de Mc Crady
- verificar capacidad de fijación del N² de las películas, sustituyendo el algodón de los frascos por tapón de goma y precinto de aluminio, medir reducción del acetileno a etileno (actividad nitrogenásica)
- efectuar observaciones morfológicas de los cultivos y aislamientos en cajas de medio NFb con extracto de levadura (N combinado); las colonias aparecen en 1 o 2 días, pero se dejan incubar por 1 semana; son blancas, secas y pequeñas y frecuentemente se introducen en el agar. Verificar su capacidad de reducir el N² en medio semi-sólido, sin N

$$(R/S) = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ m.o./g suelo rizosférico}}{\text{N}^{\circ} \text{ m.o./g suelo no rizosférico}}$$

Actividad nitrogenásica (Döbereiner, 1980)

Reducción del acetileno a etileno en raíces cortadas

- recoger las plantas temprano en la tarde para permitir máxima acumulación de fotosintetizados, separar la parte aérea y exceso de suelo y colocar las raíces en recipientes con agua destilada, llevar inmediatamente al laboratorio
- colocar las raíces en frasco que pueda cerrarse herméticamente: de suero, tipo antibiótico o los empleados como biberones, tapar con tapón de goma y precinto de aluminio. Reemplazar el aire por N₂ y 5% de aire, dejar a temperatura ambiente toda la noche para superar la fase de latencia en la reducción observada en gramíneas
- reemplazar un 10% de la atmósfera por acetileno y 1% O₂
- incubar a 32°C y efectuar mediciones en las 2 o 3 horas a partir de 0,5-1 ml de muestra tomada con jeringa de plástico, en cromatógrafo de gases con columna de Porapax Q, N o T a 80°C temperatura y 100°C en el inyector, gas portador: N₂
- los picos de etileno se comparan con los producidos en las mismas condiciones y sensibilidad por muestras de etileno puro diluido en frasco de antibiótico cerrados. El etileno se consigue en pequeños balones o se prepara por reducción del etanol con ácido sulfúrico
- los resultados se expresan en micro o nano moles de etileno (nM C₂H₄/g raíz seca/hora)
- efectuar dos controles: raíz sin acetileno (producción endógena del mismo) y otro con acetileno, sin raíz (impurezas de etileno)

En cilindros de suelo con planta entera

- introducir un cilindro de acero abierto en ambos extremos, alrededor de las plantas y retirar el sistema radical lo más intacto posible. Sellar sobre un plato de plástico en la base
- colocar en bolsa de polietileno, tipo Saran dejando la parte aérea libre, sellar alrededor del tallo con banda de goma y solución de agar (7 g/L) luego de unas 24 horas en invernáculo para equilibrar el sistema
- una tubuladura lateral de goma permite efectuar los intercambios gaseosos. Si no se cuenta con medidor de flujo para volúmenes grandes, se puede generar el acetileno en la bolsa a partir de carburo de calcio y agua. A los efectos de calcular el volumen de la bolsa y posibles pérdidas se introduce volumen conocido de **propano**, como estándar interno
- leer luego de 1-2 horas de introducción del acetileno
- efectuar blanco de suelo sin plantas

Asociación *Rhizobium*-leguminosa

Aislamiento de rizobios a partir de nódulos

- lavar cuidadosamente las raíces noduladas bajo el agua de la canilla
- elegir nódulos grandes y vigorosos, separarlos de la raíz dejando pequeña porción de ésta a cada lado del nódulo
- **Desinfección:** colocar los nódulos en tubo de ensayo con tapa rosca o en sistema preparado cortando jeringas de plástico y adhiriendo con banda elástica en un extremo del cilindro una gasa para sumergirlo en las distintas soluciones : alcohol 70% durante 1 minuto, cambiar a NaClO al 2% por 3-5 minutos, agitando, lavar 5-6 veces con agua destilada estéril

- **Maceración** del nódulo con auxilio de varilla de vidrio, bisturí o ansa estéril, puede efectuarse entre dos portaobjetos o en un borde de la tapa de la caja donde se efectuará el aislamiento, con unas gotas de agua

Aislamiento

1. *en superficie*: sembrar por agotamiento con ansa en superficie de medio **EMA (extracto de levadura manitol agar)**, llamado también M-79, con rojo Congo
 2. *en inclusión*: colocar 1 mL de agua estéril en 3 cajas de Petri vacías. Con el ansa flambeada tomar contenido nodular y diluirlo sucesivamente en las 3 cajas. Agregar el medio en sobrefusión (menos de 45°C) y por repetidos movimientos mezclar con el inóculo
- incubar las cajas en posición invertida a 28°C: las colonias de rizobios de crecimiento rápido aparecen a los 2-3 días y las de crecimiento lento, al cabo de 1 semana. Son grandes, incoloras, mucosas, de superficie lisa y brillante. Los contaminantes generalmente se colorean con el rojo Congo, aunque hay excepciones como *Agrobacterium radiobacter* y cultivos viejos de rizobio
 - repicar las colonias representativas en tubos de agar inclinado con medio EMA con azul de bromotimol

Medio EMA con rojo Congo

manitol	10 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
extracto de levadura	1 g
agar	15 g
rojo Congo (sol. acuosa 1/400)	10 mL
agua destilada	1 litro

Medio EMA con azul de bromotimol

- el mismo medio anterior: se sustituye el rojo Congo por 1 mL por litro de solución alcohólica al 1,6% de azul de bromotimol. Ajustar el pH 6,8-7,0, repartir en frascos (para preparar cajas) o en tubos de ensayo, esterilizar e inclinar antes de solidificar

Selección de cepas de rizobio

Se realiza a tres niveles: **laboratorio, invernáculo o cámara controlada y campo**. Se parte de una colección de cepas autóctonas y otras cedidas por centros de colección.

- **Desinfección de las semillas**: colocar la cantidad de semillas de leguminosas necesarias, de buen poder germinativo, en un frasco y sumergirlas en alcohol a 70%, agitando por 3-5 minutos. Volcar y agregar hipoclorito de sodio al 2%, por 3-5 minutos. Lavar varias veces con agua destilada estéril.
- **Germinación**: en los mismos recipientes se pueden distribuir las semillas sobre las paredes con una pequeña cantidad de agua del último lavado, o bien colocarlas sobre la superficie de agar-agua o medio EMA sin colorante, o sobre algodón y papel de filtro en cajas estériles, para su germinación a la oscuridad y temperatura adecuada a cada leguminosa.

• Siembra e inoculación

Para leguminosas de semilla pequeña (*Medicago*, *Trifolium*, etc.)

tubos grandes (19 x 2 cm) con 25 mL de medio salino para plántulas, como el de Jensen :

CaHPO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g

Cl ₃ Fe	0,1 g
agua	1 litro
agar	8 g
pH	6,8-7,2

- sembrar dos plántulas por tubo con ayuda de ansa
- llevar a solarío y a la semana inocular con 0,2 mL de una suspensión densa de células (10^9 /mL) de las cepas a estudiar (el contenido de un tubo de agar inclinado crecido 2-3 días se suspende con 5 mL de agua estéril). Efectuar 8 o más repeticiones de cada tratamiento
- se incluyen dos testigos:
 - T = sin inocular y sin nitrógeno**
 - N = 0,2 mL solución KNO₃ al 0,05%**
- llevar a cámara de cultivo con temperatura, fotoperíodo e intensidad luminosa controlados de acuerdo a la leguminosa con que se trabaje. Las raíces no deben quedar expuestas a la luz. Los nódulos comienzan a aparecer en las primeras semanas. Anotar fecha de inicio de nodulación y aspecto de ésta
- **Evaluación:** la experiencia concluye cuando se observa la máxima diferenciación entre los tratamientos (**T**) y (**N**), pero antes que los primeros comiencen a secarse (6-8 semanas). Con ayuda de ansa o varilla se sacan las plantas con el medio, se corta la parte aérea, se coloca en sobre de papel con su correspondiente numeración y se determina su peso fresco y luego su peso seco a 65°C, hasta peso constante.
- El N% de la parte aérea y la producción de N por tubo se realiza por la técnica de semi-micro Kjeldahl, aunque en este primer ensayo suele efectuarse determinaciones de peso seco de la parte aérea y nodulación: número, peso de los mismos a 65°C, ubicación velocidad de aparición.

Para para leguminosas de semilla grande (soja, maní, poroto)

- se emplean unidades de siembra mayores, como las clásicas **botellas de Leonard**: botellas comunes de unos 700 mL a las que se les quitó el fondo y que van invertidas sobre un frasco de boca ancha (1 litro) con solución nutritiva para plántulas que asciende por capilaridad a través de una mecha de gasa enrollada, a la botella invertida llena de arena fina lavada y neutra o vermiculita donde se desarrollará el sistema radical. Todo el dispositivo sin la solución se envuelve en bolsa de papel y se esteriliza en autoclave; antes de su uso se le coloca solución nutritiva (Jensen, Norris, etc.) Pueden hacerse más chicos, o **con dos vasos de plástico** uno con arena/vermiculita y con una mecha no degradable sumergida en la solución del vaso externo.
- **Siembra:** con semillas desinfectadas o con plántulas creciendo asépticamente, o micropropagadas, 5-6 semillas para luego ralear a 2 por dispositivo
- **Inoculación:** puede incluirse con la semilla (peleteada) o agregarse una vez emergidas las plántulas a razón de 1 mL de suspensión con 10^9 células/mL por cada planta. Cuando las plantas están establecidas, se cubre la superficie de arena con 2-3 cm de arena parafinada o trozos de espuma plástica para evitar desarrollo de algas y excesiva evaporación
- **Incubación:** el ensayo (cepas y testigos) se lleva a cámara de cultivo controlado o invernáculo. Se repone la solución a medida que se requiera, alternándola con agua estéril
- **La evaluación** es la misma que efectuamos en el ensayo de laboratorio

Ensayos de invernáculo o cámara con suelo

- se emplea suelo seco al aire y tamizado o bien cilindros intactos de suelo que se obtienen en el campo con ayuda de un cilindro metálico que se entierra para extraer un pan que se coloca luego en bolsas duras de plástico o en macetas. En este caso no hay alteración del mismo.

Pero son sin duda los ensayos de campo los que permitirán emitir opinión más acertada sobre el comportamiento simbiótico de combinaciones rhizobio-leguminosa.

Ensayos de campo

- **Elección del lugar:** los suelos con bajo número de rhizobios y nitrógeno disponible son probablemente los más útiles para el ensayo de cepas, pero para probar otras cualidades además

de la eficiencia, como la capacidad competitiva, se requiere una alta población de rhizobios nativos. El lugar debe estar lo suficientemente nivelado para evitar el lavado luego de una lluvia y la contaminación de las parcelas. Elegir el diseño experimental más conveniente

- **Tratamientos al suelo:** si el propósito es comparar la eficiencia de un grupo de cepas, las demás condiciones no deben ser limitantes: nivel mínimo de fertilidad, pH, dosis de inoculante, riego para evitar pérdidas por sequía, etc. Por el contrario, si se desea comparar la capacidad de las cepas para sobrevivir y nodular en el campo, las condiciones deben ser las naturales
- **Inoculación:** a menos que el ensayo se establezca para comparar distintos métodos de inoculación, ésta debe efectuarse según las normas de práctica común en la zona. Se desea establecer entre 1.000 a 10.000 rhizobios viables/semilla
- **Evaluación:** en el momento del raleo ya se aprecia nodulación, pero ésta se evalúa al comienzo de la floración, en unas 10 plantas por parcela: número y peso seco de los mismos. **Cosecha:** una superficie determinada (1 m^2) para cultivos forrajeros y las líneas centrales para los cultivos de grano. **Se evalúa:** peso fresco y seco de la parte aérea, N% y producción de nitrógeno por hectárea. En caso de granos: número de cajas o vainas por planta, peso seco de las mismas y de los frutos, N% de frutos y se calcula la **producción de nitrógeno** = $\text{N\%} \times \text{materia seca (kg/ha)}$
- **Interpretación de los resultados:** análisis estadístico: varianza y diferencias entre medias de tratamientos, correlaciones, etcétera.

Preparación de los inoculantes

La bacteria seleccionada se cultiva en medio líquido con agitación hasta altas densidades (10^8 células/mL).

El inoculante puede ser líquido o sólido.

Algunos inoculantes se distribuyen en pequeña escala en agar, o en bolsas de plástico con caldo de altísima concentración celular e incluso algunos se expenden como cultivos liofilizados (pastillas).

Inoculantes líquidos se usan cuando existe buena coordinación entre el laboratorio y las tareas de campo y son útiles a nivel experimental (solario, invernáculo) o cuando se observan fallas en la aplicación de otros tipos de inoculantes en el campo y se desea salvar el ensayo, se riega el surco con un cultivo denso de la bacteria. Actualmente se vuelven a emplear para inocular grandes áreas de leguminosas, como la soja en Brasil y Argentina. La botella o recipiente de plástico se adosa a la sembradora y el inoculante convenientemente diluido, gotea las semillas a medida que son sembradas.

Inoculantes sólidos, son muy usados sobretodo cuando se separa en el tiempo la producción de su empleo. En general el soporte sólido es la **turba**, tierra con alto contenido de materia orgánica (60-70%), pero si no se dispone de buenas turberas, se han ensayado otros soportes: lignita, cáscara de cereales molida, **polímeros orgánicos (poliacrilamida, alginatos)** o **minerales** como arcillas, tierra de diatomeas, etc.

Se usa: **Turba estéril** por rayos gamma o en autoclave en las bolsas de poliestireno que luego se inoculan con el caldo con ayuda de una jeringa y aguja estéril. Se deja madurar para que la bacteria se multiplique en el soporte. Actualmente casi todos los inoculantes emplean turba estéril para evitar disminuciones del inóculo por la competencia de hongos, actinomicetes y otras bacterias. (en general las turbas aceptan igual volumen de caldo sin aparentar estar mojada).

Control de calidad de los inoculantes

Como todo producto biológico pueden perder calidad por mutaciones en los cultivos o por descenso del número de células viables. Se tiende a que la producción de inoculantes sea una actividad privada y que el estado cuente con laboratorio de control responsable de:

- **seleccionar y proveer a los industriales cepas de rhizobios** debidamente seleccionada para cada leguminosa
- **controlar la calidad** de los cultivos durante su desarrollo (caldos) y en el producto final, en la fábrica y en los lugares de distribución, rechazando aquellos que no contengan el número mínimo exigido (en Uruguay 2×10^9 /gramo producto fresco) o limitando el período de uso a menos de 6 meses.

- **conducir áreas de investigación** para superar problemas asociados con la elección de las cepas y su sobrevivencia en el producto final.

Técnicas de inoculación

En semillas:

- **en seco**, consiste en mezclar el inoculante en el depósito de semillas de la sembradora; ambos productos van cayendo en el surco. A pesar de que no hay un contacto íntimo entre el inóculo y la semilla, muchos productores lo prefieren por la comodidad que significa no emplear agua.
- **húmedo**, se mezcla la turba con la semilla y la mínima cantidad de agua, en general con un adhesivo, como leche o azúcar para lograr mayor adhesividad (**inoculación simple**)
- **pildorización, o "pelleteo"**, se mezcla la semilla con el inóculo y un adhesivo como solución de goma arábica, celofax A, otros derivados celulósicos, etc. y luego se recubre ésta con un polvo fino: carbonato de calcio, para los rhizobios de crecimiento rápido que acidifican, o fosfato de roca o dolomita para los de crecimiento lento, que alcalinizan.

Esta técnica aumenta las posibilidades de nodulación exitosa en: suelos ácidos, siembra aérea, siembra demorada por causas climáticas, germinación retardada por falta de humedad, pero suele secar el preparado, por lo que su uso debe controlarse. Algunos países expenden la semilla **pre-inoculada**, con 10^5 rhizobios/semilla. En muchos casos se recomienda el pellet múltiple o "**super pellet**" para obtener semillas con elevado número de rhizobios, mejorando el establecimiento en casos en que la densidad de cepas nativas infectivas sea muy elevada.

En el suelo

Cuando se aplican pesticidas, o cuando la semilla puede dañarse fácilmente con el manipuleo como en el caso de la de maní, se pueden aplicar técnicas de inoculación al suelo con formas líquidas o granuladas de inoculantes.

- **granular**, en general son a base de turba preparados como las raciones de animales, comprimiendo pequeños cilindros. Son comunes con aplicaciones de insecticidas y herbicidas. Se aplican debajo de la semilla en el surco y resulta ser un método muy eficaz en la inoculación en maní, soja y otros cultivos. El inoculante se puede colocar a la distancia que se desee de la semilla.
- **líquidos** se emplean al igual que los anteriores cuando se desea evitar el manipuleo de la semilla, pero se requiere transporte de agua y maquinaria con pulverizador.
- **otros tipos** se extiende el uso de inoculantes donde los microorganismos se atrapan en geles de **poliacrilamida** y otros productos como **alginato**, **xantano**, que protegen a las células. Se mostraron tan eficaces como los inoculantes a base de turba, con la ventaja de que se puede inocular muchos días antes de la siembra (30 o más días).

Inoculante a base de alginato de calcio (figuras 2 y 3)

- Esterilizar alginato de sodio al 4% en agua (es muy viscoso)
- Mezclar en partes iguales con cultivo denso de rhizobio, *Frankia*, *Azospirillum*, hongos micorrícicos u otro microorganismo a ser empleado como inoculante con el alginato, que queda al 2%, mantenerlo en agitación con barra magnética
- Preparar solución del cloruro de calcio al 1% estéril y agitada con barra magnética.
- El inoculante se forma dejando caer gotas de medio-alginato sobre el cloruro de calcio, con pipeta o filtro de porcelana con pequeños orificios. Se forman pequeñas esferas de alginato de calcio (**gel**) con las células atrapadas que se lavan para eliminar exceso de Cl_2Ca con agua estéril y se dejan secar una noche bajo flujo laminar. El gel desecado ocupa pequeño volumen y se mantiene en frascos o bolsas en lugar fresco hasta su uso.
- Se puede colocar este preparado seco junto con la semilla o previamente se disuelve en buffer fosfato, pH 7,0 o buffer de citrato de sodio, igual pH.

La figura 2 muestra un sencillo dispositivo para preparar inoculantes con bacterias, *Frankia*, en este caso, incluida en la matriz de alginato de calcio. El peso seco de estas bolitas fue de 1,2 a 1,9 mg. La figura 3 presenta el aspecto de este inoculante antes del secado al aire, con distintas concentraciones de bacteria, coloreado con INT (iodo-nitrofenil tetrazolio) que se reduce a INT-formazán rojo por actividad bacteriana.

Inoculación simple

- seguir atentamente las instrucciones del inoculante comercial a emplear, preparar el agua añadiendo 100 g de azúcar por litro
- agregar el inoculante a base de turba u otro preparado siguiendo las instrucciones y mezclar bien hasta eliminación de los grumos
- agregar el agua azucarada con el inoculante a la semilla y mezclar hasta que toda la semilla quede uniformemente recubierta por una capa negra de inoculante
- extender las semillas inoculadas fuera de la luz directa del sol y dejar orear antes de su empleo

Pildorización (*pelletización*)

- preparar la solución adherente, por ejemplo: celofáx-A 50g/L de agua o solución de goma arábica al 40%, con 24 horas de antelación
- agregar el inoculante y mezclar bien para deshacer los grumos
- agregar la solución adherente con el inoculante a las semillas, mezclar bien hasta que toda la semilla quede recubierta por el inoculante
- agregar de una vez el polvo de recubrimiento mezclando suavemente hasta que toda la semilla quede recubierta y separada
- extender la semilla inoculada al abrigo de la luz solar y dejar orear antes de su empleo

Recomendaciones sobre cantidades de goma arábica e inoculante a emplear en algunas leguminosas

	semillas(g)	inoculante (g)	goma arábica(mL)
<i>Arachis hypogea</i>	100	10	4,0
<i>Glycine max</i>	100	10	3,0
<i>Medicago sativa</i>	50	0,2-5	4,0
<i>Phaseolus vulgaris</i>	100	8	2,5

Reconocimiento de rhizobios

Serología

Son muy empleadas las reacciones antígeno-anticuerpo:

- aglutinación: interviene la totalidad de la célula
- precipitación: sólo los antígenos solubles.

Obtención de antisuero con alto título por inmunización en conejos; se cultiva el rhizobio en medio EMA, sólido o líquido (este último evita la excesiva acumulación de polisacáridos extracelulares que acumulan muchas cepas), se prepara una suspensión densa (10^8 células/ml) luego de repetidos lavados de las células en solución fisiológica.

- Si se calienta previamente el antígeno 30 minutos a 100°C se destruyen los antígenos flagelares (H): proteicos y se obtienen los somáticos (O): polisacáridos, proteínas solas o con lípidos. En este caso sólo se pueden efectuar las reacciones de aglutinación, pero si se desea el conejo puede luego volver a ser inmunizado con el cultivo entero y obtener un antisuero completo para reacciones de precipitación.
- **Título:** última dilución en la que se observa aglutinación. Los sueros se conservan congelados, con el agregado de algún antiséptico, en pequeños volúmenes, que facilitan su empleo. La determinación del título puede efectuarse en tubos chicos de hemólisis o en bandejas:
- diluir el antisuero (0,08 mL, con pipeta especial) en un primer tubo con 2 mL sol. fisiológica (NaCl 0,85%), dilución 1/50; llevar 1 mL a un segundo tubo con 1 mL de sol. fisiológica y así sucesivamente (cada uno de los tubos diluye a la mitad) tirar el último mililitro
- agregar a cada tubo 1 mL de suspensión concentrada de antígeno (10^9 /mL), agitar suavemente. Tubos control: solución fisiológica (CINa 0.09%) y antígeno (sin suero) no debe presentar aglutinación

- **lectura: rápida:** poner los soportes en baño María a 52°C y leer en 1-2 horas las reacciones flagelares y en 4 h las somáticas. **Lenta:** a 37°C los tiempos se extienden 4 horas y toda la noche, respectivamente. Leer en iluminación indirecta contra fondo oscuro. Reacción flagelar: agregados grandes, floculentos, que decantan en forma lenta y que, si van acompañados de reacción somática, dejan una marcada turbidez en el líquido sobrenadante

Reacción somática: comienza con la aparición de granulaciones finas y pueden dar lugar a depósito compacto de sobrenadante transparente.

- **Aglutinación con nódulos triturados:** resulta útil cuando se desea identificar a las cepas que dieron origen a un gran número de nódulos. Se trabaja con el contenido nodular, sin efectuar el aislamiento. Los nódulos lavados se maceran uno por uno en 1-2 mL de sol. fisiológica; se calienta a 100°C unos minutos y se pipetea unas gotas dentro de pequeños tubos o en bandejas de plástico con cavidades individuales (tipo para ELISA). Se agregan unas gotas de los antiseros de las cepas que se desean identificar, se cubre con un vidrio la bandeja para evitar evaporación y se observa la aglutinación a la media hora.

- **Test de precipitación:** ha llegado a ser muy específico gracias a la técnica de inmunodifusión en gel: se efectúan varias cavidades en agar-agua muy puro solidificado en caja de Petri o sobre un portaobjeto.

ELISA, método indirecto muy sensible que emplea IgG- anticonejo conjugado con fosfatasa alcalina y el sustrato p-nitrofenil fosfato. La enzima libre se lee a 405 nm luego de 30 minutos a temperatura ambiente, con la solución del sustrato como blanco.

- **Inmunofluorescencia:** se emplean mucho en estudios ecológicos: se combina el anticuerpo con una sustancia que fluoresce en UV, como isocianato de fluoresceína o naranja de acridina que al reaccionar con el antígeno específico produce una fluorescencia que se visualiza en el microscopio equipado con luz fluorescente

Empleo de cepas marcadas por resistencia a antibióticos

Desarrollo de resistencia a antibióticos

- conocer la resistencia natural de las cepas a emplearse en la inoculación de leguminosas
- seleccionar mutantes en cajas con medio EMA con y sin antibiótico (dosis creciente), por ejemplo con estreptomycinina y espectinomycinina
- transferir colonias de cepas resistentes a medio EMA líquido y a agar inclinado
- sembrar cepas en caldo con resistencias a estreptomycinina a cajas con espectinomycinina (y viceversa)
- transferir mutantes dobles a EMA sólido, confirmar resistencia a ambos antibióticos sembrando en cajas con los dos antibióticos
- confirmar la eficiencia simbiótica de las mutantes
- las cepas seleccionadas se siembran (0,1 mL) en cajas: sin antibióticos; con estreptomycinina y con espectinomycinina para conocer la respuesta a concentraciones de antibióticos
- dividir cada caja en 4 secciones con una fibra, colocar discos con distinta concentración del antibiótico en el centro de cada sección (4 discos/placa); incubar 26-28°C y observar halos de sensibilidad; se esperan más de 30 colonias resistentes con una velocidad de mutación de 1.10^6 (en muchas cepas esta velocidad llega a 1.10^7)
- seleccionar por resistencia a ambos antibióticos

Identificación de las cepas en los nódulos

- preparar cajas de medio EMA (por triplicado) con: estreptomycinina 40 µg/mL; espectinomycinina, 250 µg/mL y sin antibiótico. Los antibióticos se agregan de solución madre: estreptomycinina = 4 mg/mL y espectinomycinina 250 mg/mL, esterilizadas por filtración con milipore de 0,20 micras y mantenidas en heladera
- dividir las cajas en unos 20 cuadrados, numerarlos y seguir el modelo
- cada nódulo se separa, se desinfecta y se siembra en un cuadrado
- **Otro método:** separar la raíz con nódulos, colocarla sobre un papel de filtro en caja de Petri estéril, darle un número a cada posición nodular, sacar los nódulos con un bisturí, siguiendo un orden, y sembrar. Se puede así describir que nódulos fueron los formados por la cepa introducida marcada, la localización y distribución de ellos en el sistema radical

- incubar a 28°C y efectuar observaciones diarias, algún contaminante puede ser resistente a los niveles de antibióticos empleados (cuidar el paso de la desinfección)
- leer por crecimiento en las 3 cajas
- **Informar:** nódulos con cepas resistentes a cada antibiótico y a ambos

Estudios genéticos

El número y PM de los **plásmidos**, el **perfil de proteínas** de las células, la presencia de **isoenzimas**, son herramientas muy útiles en la identificación de cepas de rhizobio

Proteínas totales

Por electroforesis en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE). las bacterias crecen en medio EMA líquido, colectadas por centrifugación y lavadas 2 veces con buffer 10 mM Tris-HCl, pH 7,0. Muestras con 10-20 mg de proteínas/mL corren en el gel.

Plásmidos

Modificaciones de la técnica de Eckhardt (1978) son empleadas con cepas de referencia con plásmidos de PM conocido.

Reconocimiento de fragmentos de ADN del genoma o de plasmidios luego de tratamiento con enzimas de restricción (*restriction fragment length polymorphism, RFLP*) (Schneider y De Bruijn, 1996).

Mapas detallados usando estos marcadores están disponibles para el hombre y un número de especies vegetales, animales y microorganismos de importancia agronómica. La identificación de rhizobios mediante un código de barras (*ADN fingerprinting*) ha permitido su seguimiento en ambientes contaminados, como lo es el suelo. La mayoría de las técnicas amplifica la muestra de ADN por la reacción en cadena con polimerasa (*polimerasa chain reaction, PCR*)

Recuentos de rhizobios

1. Recuento total en cámara: en cámara cuenta-glóbulos se aplica a cultivos en fase exponencial de crecimiento, contenidos nodulares, caldos, en el laboratorio o en la fábrica de inoculante, antes de impregnar la turba, donde se postula que todas las células están viables. Puede evaluarse también la turbidez (densidad óptica a 600nm) frente a escala patrón confeccionada por recuento de viables en caja.

2. Recuento de viables en medio sólido: procedimiento habitual a partir de diluciones seriadas de la muestra, por siembra en superficie (0,2 mL) o en inclusión (1 mL) en medio EMA. Lectura en cajas con entre 30 y 300 colonias. Se emplea con cultivos puros, con inoculantes a base de turba estéril y también con turba no estéril, ya que los contaminantes pueden ser del orden de 10^6 /g y el rhizobio debe superar 10^6 /g. En las últimas diluciones predominan las colonias típicas de esta bacteria y pueden contarse.

3. Recuento de viables en plantas: emplea la capacidad de cada cepa de rhizobio para nodular con una leguminosa y presume que una sola célula agregada a la planta test puede originar una población que nodule a la leguminosa específica

- sembrar semillas germinadas estérilmente en tubos con agar-Jensen para las leguminosas de grano pequeño
- a los 7 días inocular 2 tubos con 0,2 mL de cada una de las suspensión-dilución de: suelo, inoculante, etcétera
- evaluar la nodulación; las plántulas que no recibieron rhizobio se marchitan y mueren
- tomar en cuenta el número de tubos positivos (con nódulos) en 4 diluciones con tubos positivos y negativos
- leer en la tabla de Fisher y Yates el **NMP** en la alícuota (0,2ml) de la primera dilución de la izquierda; expresar los resultados por g de suelo o de turba.

Determinación del número más probable (NMP) por el método de dilución en planta

Nº unidades positivas en 4 diluciones en ensayos en:		NMP en la alícuota de la menor dilución
duplicado	cuadruplicado	
8	16	
	15	>700
7	14	690
	13	340
6	12	180
	11	100
5	10	59
	9	31
4	8	17
	7	10
3	6	5.8
	5	3.1
2	4	1.7
	3	1.0
1	2	0.58
0	1	<0.5
	0	

$NMP/g \text{ turba o suelo} = (m \times d)/(v \times g)$

m = NMP de la tabla

v = volumen de la alícuota

d = menor dilución de la serie

g = peso seco de la turba en la dilución inicial

Límite de confianza aprox. al 5%: duplicado = 6 cuadruplicado = 3.5

Efectuar varias repeticiones de cada recuento

- **Para leguminosas de semilla grande** deben emplearse los dispositivos de Leonard o modificaciones que permiten el desarrollo de las plántulas, que ocupan mucho espacio y son trabajosas de preparar, esterilizar, etcétera

- **NMP de rhizobios usando bolsas de plástico** para el desarrollo de la leguminosa: bolsas de plástico con un papel de filtro en su interior permite el desarrollo de la raíz y la impregnación con solución mineral. Las semillas pregerminadas se colocan en repliegue superior del papel de filtro (2 semillas para soja y unas 15 para alfalfa) y se inoculan con alícuota de las suspensiones-diluciones de suelo y/o inoculante, a razón de 5 bolsas/dilución. Las bolsas llevan solución mineral para plántulas

- las bolsas se colocan paradas entre soportes metálicos. Se intercalan controles (sin inocular) para observar posibles contaminaciones

- se observa nodulación, se consideran negativas si no los presentan en 2 semanas para alfalfa y 3 para soja

- **NMP** con la tabla de Cochran que reproducimos en parte

NMP para usar con diluciones decimales y 5 tubos por dilución

MNP para los valores de p3

p1	p2	0	1	2	3	4	5
5	0	0.23	0.31	0.43	0.58	0.76	0.95
5	1	0.33	0.46	0.64	0.84	1.1	1.3
5	2	0.49	0.70	0.95	1.2	1.5	1.8
5	3	0.79	1.1	1.4	1.8	2.1	2.5
5	4	1.3	1.7	2.2	2.8	3.5	4.3
5	5	2.4	3.5	5.4	9.2	16	-

Cálculos

p1 es el N° bolsas positivas en la dilución menos concentrada en donde todas las unidades son positivas, o donde se encuentra el mayor N° de tubos o bolsas positivas, p2 y p3 son los N° de unidades positivas en las 2 siguientes diluciones. Leer en la tabla el valor correspondiente a p3: **NMP** en la alícuota de la segunda dilución.

Ejemplo:

	10^{-6}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
positivos:	5	5	3	1	0

p1= 5; p2= 3 y p3 = 1

NMP = 1,1 en inóculo de 10^{-6} N° de rizobios/g = $1,1 \times 10^6$

Nota: Algunos países emplean un método sencillo de evaluar la calidad de inoculantes en turba no estéril: se inoculan unas 50 semillas con una alícuota de inoculante calculada según las indicaciones de la bolsa; se siembran éstas en jarras de Leonard (unas 3-4 por cada inoculante) colocando testigos sin inocular. A las 2-3 semanas se observa nodulación: por lo menos 2 nódulos/planta. Si no se forman estos nódulos, su calidad es inferior, o no posee el inóculo específico.

Simbiosis *Frankia*-no leguminosa

Medios de cultivo empleados

QMOD

	g/L sol.final	mLsol.madre	N° sol.madre
Extracto de levadura	0.5		
Bacto peptona	5		
Glucosa	10		
MgSO ₄ 2H ₂ O	0.2	20	2
KCl	0.2	10	4
Lecitina	5 mg	1	7
FeNa Edta 0.02 M		1	9
Sol. Oligoelementos =			
a del BAP		1	10
tampón K ₂ HPO ₄	0.3 g	10	17
NaH ₂ PO ₄	0.26 g		

BAP

	conc.final	g/L ml	sol.madre	N°sol.madre
MgSO ₄ 2H ₂ O	0.2 mM	0.05	5	2
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.07 mM	0.01	10	3
NH ₄ Cl	5.0 mM	0.267	5	5
Propionato de Na	5 mM	0.48	5	6
FeNa EDTA	0.02 mM	0.1	1	9
Sol. Oligoelementos			1	10
vit BAP			1	12
tampónKH ₂ PO ₄ /K ₂ HP	10 mM		10	15
O ₄				

Sol. Oligoelementos	(g/L)	vitaminas del BAP	mg/L
H3BO3	2.86	HCl-tiamina	10
MnCl2	1.81	ác. Nicotínico	50
ZnSO4	0.22	HCl-piridoxina	50
CuSO4	0.08	biotina	22.5
Na2MoO4 H2O	0.025	ác. Fólico	10
		pantotenato Ca	10
		riboflavina	10

agar: 12-15 g/L.sol.final**C activo:** 0.15 g/L

Soluciones madre

- 1) KH2PO4 100 g/L
- 2) MgSO4 7H2O 10 g/L
- 3) CaCl2 2H2O 1 g/l
- 4) KCl 20 g/L
- 5) NH4Cl 53,5 g/L
- 6) propionato de Na 96,1 g/L
- 7) lecitina 0,5 g/100 ml: disolver 500 mg lecitina de soja en 50 ml alcohol absoluto, agregar 50 mL agua destilada
- 8) CoCl2 0,1 g/100 mL
- 9) FeNa EDTA 0,734/100 mL
- 10) sol.oligoelementos (son los del BAP)
- 11) vitaminas base: en 100 ml: tiamina 1 mg (pesar 10 g + 10 mL agua y tomar 1 mL), ác. nicotínico 5 mg y piridoxina 5 mg
- 12) vitaminas del BAP a 100 mL de la sol. (11) agregar:
 - 1 ml sol. biotina (4,5 mg en 2 mL agua)
 - 1 ml sol. ác. fólico (5 mg en 2 mL agua)
 - 1 ml sol. pantotenato de Ca (5 mg en 5 mL agua)
 - 1 ml sol. riboflavina (5 mg en 5 mL agua)
- Filtrar por filtro bacteriológico y guardar en heladera por poco tiempo
- 13) K2HPO4 1M 136,09 g/L
- 14) K2HPO4 1M 174,18 g/L
- 15) sol. tampón BAP: KH2PO4- K2HPO4 pH 6,7: mezclar aprox. 560 mL sol. (13) y 320 mL sol. (14) Luego ajustar a pH 6,7 con ambas soluciones, con ayuda de pH-metro.
- 16) Tampón QMOD K2HPO4 30 g y NaH2PO4 20 g en 1 litro
- 17) Tampón QMOD puede hacerse con sols. (14) y (16), llegando a pH 6,7 con ayuda de ambas.

Aislamiento

Directamente de nódulos: foto 4 nódulo de *Casuarina*

Resulta bastante difícil por la presencia de numerosos contaminantes que se desarrollan en los medios de cultivo empleados. Conviene partir de nódulos frescos. Numerosos desinfectantes superficiales se han empleado: hipoclorito de Na o de Ca, Cl2Hg, H2O2 OsO4, glutaraldehído. Procedimientos empleados hasta el presente en el aislamiento de *Frankia*:

centrifugación de nódulos macerados en gradiente de sacarosa, *incubación selectiva* de trozos de nódulos desinfectados en medios ricos, como el QMOD por 6 semanas; los tubos o cajas con turbidez se descartan por los contaminantes

filtración de macerados de nódulos por 52 y 20 micras, los restos nodulares quedan arriba y vesículas u otras estructuras en el de 20 micras; *dilución seriada* y siembra en medios apropiados (pero se requiere alta relación de inóculo para iniciar el desarrollo de *Frankia*)

microdissección, uno de los procedimientos más empleados

- lavado de nódulos en agua de canilla, en tamiz
- en caja de Petri con agua, elegir con lupa los lóbulos claros, turgentes
- con ayuda de agujas pelar la corteza y separar pequeñas raíces

- pasar a erlenmeyer estéril tapado y esterilizar superficialmente con sol. al 3% de OsO_4 , 3' (bajo campana, gases tóxicos). La corteza se ennegrece. Si no se dispone del óxido de osmio, ensayar con hipoclorito de Ca (1,5% P/V); de Na (1% P/V de Cl activo = agua de lavandina al 20%), Cl_2Hg), 1% acidificado, como para nódulos de leguminosas)
- lavar varias veces con agua destilada estéril
- cada lóbulo se fragmenta asépticamente con ayuda de bisturí en fragmentos de aprox. 50-200 micras, que se lavan sobre tamiz de gasa con agua estéril (eliminar taninos y polifenoles tóxicos)
- siembra depositando los trocitos en superficie de medio sólido en medio BAP con o sin C activo o medio más rico QMOD
- puede agregarse una segunda capa en sobrefusión sobre los trozos que facilita la observación posterior al microscopio.
- cerrar las cajas con Parafilm, incubar por 4 semanas a 29°C
- observar ausencia de contaminantes y colonias típicas de *Frankia* pequeñas, de unos 0,5 mm de diámetro al mes, se aprecian a la lupa: hifas finas creciendo radialmente, algunas cepas forman esporangios y vesículas (éstas sobre todo en medio sin N), y otras pigmentos rojos. Inicialmente difusas, luego más densas. El C activo facilita el pasaje del estado endofítico al saprofítico

Nota: conviene trabajar con nódulos frescos, de otra manera regenerarlos en plántulas hospedantes creciendo en distintos dispositivos: tubos con sol. hidropónica o con medio agarizado, en arena-vermiculita, perlita (en vasos o macetas). El aislamiento es como precedentemente.

Ejemplo de solución mineral: Crone

KCl	0,75 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50 g/L
KH ₂ PO ₄	0,1 g/L
* CaSO ₄ ·2H ₂ O	10 ml/L
* Ca ₃ (PO ₄) ₂	10 ml/L
** oligoelementos	1 ml/L
*** citrato férrico	1 ml/L

- preparar solución de la sal señalada 10 g/L, agitar 10', dejar reposar 1 hora y luego tomar el volumen necesario del sobrenadante

** Oligoelementos (g/L)

H ₃ BO ₃	1,5
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,7
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,1
(NH ₄) ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0,2
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
*** citrato férrico: cloruro férrico	10
ácido cítrico	10

Inoculación de plántulas

Inóculo

- se puede partir de cultivos de *Frankia* creciendo entre 2 y 3 semanas en medio líquido, (evaluación de la biomasa por reducción de INT, turbidez luego de sonicación, proteínas totales, que se centrifugan y se lavan con agua destilada estéril (2.000 rpm, 15'). Se descarta el sobrenadante y el pellet se transfiere a frascos de suero con 15 ml de agua estéril y se disgrega en agitador magnético o bien por pasajes sucesivos por agujas hipodérmicas

- si se dispone de gran cantidad de inóculo, la inoculación puede efectuarse mezclando 5 ml de inóculo en la parte superior del suelo antes de la siembra. De otra forma, es se sumergen las raíces un tiempo en el cultivo.

Mineralización del nitrógeno

Amonificación

Recuentos en medio líquidos

Existen muchos medios y condiciones de cultivo, se usa mucha la asparagina, o la urea, como fuente de C y N:

Medio

sol.salina	50 mL
asparagina	0,2g
agua destilada	950 mL

- inocular 3 o 5 tubos con 1 mL de cada suspensión-dilución del suelo (10^{-3} en adelante)
- incubar a 28°C por 7 días
- **lectura:** colocar aproximadamente 1 mL de cada tubo a un tubo vacío de hemólisis, agregar 2 gotas de reactivo de Nessler (puede realizarse la lectura en vidrio de reloj o piedra de toque).
Positivo: enturbamiento amarillo-anaranjado. Cálculo del NMP con tabla de Mc Crady

Reactivo de Nessler

solución A:	I ₂ Hg	50 g
	IK	36,5 g

Friturar en mortero, agregando de a poco 100 mL agua

solución B:	KOH	150g
	Agua dest.	1 litro

En el momento de usar, mezclar partes iguales de A y B.

- **actividad potencial:** en el suelo mismo, pero en el laboratorio
- **actividad real** (en el campo).

El suelo se mezcla con la sustancia orgánica nitrogenada que se va a estudiar (urea, proteína, harinas de cereales, etc.) a la humedad deseada en recipiente herméticamente cerrado, como el usado para la evaluación del CO₂: en el vaso interior se recoge al amonio liberado con sol. 0,2 N de H₂SO₄ que se valora con NaOH de la misma normalidad. Se pueden construir curvas acumulativas de amonio, en el tiempo.

Mineralización del nitrógeno (amonificación) *in-situ*

Una de las técnicas consiste en incubar el suelo con agua, formando un barro que asegura la anaerobiosis, en frascos cerrados. La ventaja de este dispositivo es que no es necesario determinar ni mantener el nivel adecuado de humedad que exigen los procesos aerobios. Se evita la formación de nitritos y nitratos, pero no la pérdida de anhídridos nitrogenados volátiles.

El N-NH₄⁺ se valora luego de 10 días de incubación a 37°C por: técnica de destilación luego de desplazarlo con álcali y se recoge luego de destilación en solución de ácido bórico, que se valora con ácido clorhídrico valorado, o bien con electrodos específicos de amonio, o por técnicas de extracción y medidas colorimétricas (Nessler).

Coeficiente de mineralización N-orgánico = $\frac{N-NH_4^+ \text{ final} - N-NH_4^+ \text{ inicial}}{N\text{-orgánico}} \times 100$

N-orgánico

Nitrificación

Recuentos en medio líquido

nitritantes:	sol.salina estándar	50 mL
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
	CaCO ₃	1g
	agua destilada	950 mL
nitratantes:	sol.salina estándar	50 mL
	NaNO ₃	1 g
	CaCO ₃	1 g
	agua destilada	950 mL

- repartir en tubos de hemólisis a razón de 1 ml por tubo, se esterilizan en autoclave, 20 minutos a 110°C
- sembrar con 0,5 ml de cada suspensión-dilución de suelo (3 o 5 tubos/dilución)
- incubar 21 días a 28°C

Lectura

Nitritantes: se analizan en los tubos nitritos o nitratos con reactivo difenil-amina sulfúrica (difenilamina 10 g; ácido sulfúrico 1 litro, verter sobre 200 ml agua destilada): vaciar casi completamente los tubos de modo que sólo queden 1-2 gotas, agregar a cada uno 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado y puro y 10 gotas de reactivo. *Tubos positivos:* aparición color azul intenso a altas concentraciones y fugaz a concentraciones límites

Nitratantes: detección nitratos con difenilamina sulfúrica, luego de eliminar los nitratos restantes con urea en medio sulfúrico: proceder como anteriormente, agregar unos 50 mg urea, 10 gotas de ácido sulfúrico y 10 gotas difenilamina *Tubos positivos:* intenso color azul

Nitrificación en medio sólido

Sílico-gel: mezclar partes iguales de sol. silicato de sodio diluido a 9°Baumé y sol. de HCl a 13°Baumé (verter el silicato sobre el ácido mezclando). 30 mL de la mezcla se vierten en cajas de Petri de 10 cm de diámetro que se dejan en superficie horizontal hasta formación del gel (unas 24 h), que vibra ante ligero golpe en el borde de la caja. Lavar las cajas con agua corriente disponiéndolas apiladas convenientemente en una pileta, hasta eliminación del exceso de ácido y cloruros (verificar con reactivo de nitrato de plata o colorante de azul de bromo timol). Se guardan en agua hasta su uso. Antes de su empleo se pasan unos 30 segundos por agua hirviendo, se dejan escurrir y secar y se impregnan con el medio apropiado.

Nitritantes: a cada caja de sílico gel se le incorpora 1 mL de solución salina estándar con 5 % de sulfato de amonio estéril. Inocular con 0,5 ml de suspensión-dilución del suelo (10^{-1} - 10^{-6}) y agregar 1 ml de sol. carbonato de calcio al 40%; distribuir uniformemente y secar en estufa a 30°C; observar a los 15-20 días la aparición de playas sobre la superficie del gel, consecuencia de la producción de ácidos nitroso y/o nítrico que solubiliza al carbonato. Se cuentan las playas como si fueran colonias

Nitrificación en suelo: se evalúa la **nitrificación real**, en el suelo mismo en el campo, tomando muestras periódicamente que se llevan al laboratorio, o la actividad potencial, luego de incubaciones en el laboratorio.

Nitrificación potencial: el suelo se incuba en suspensiones de suelo y agua, con buffer de pH 7,2, con exceso de amonio. Se agrega clorato de sodio a los efectos de inhibir el segundo paso de la oxidación, de modo que el producto final es nitrito, que se analiza fácilmente colorimétricamente.

Se evalúa en ambos casos la producción de N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ y la variación de N-NH₄⁺ en el suelo mismo, solo o con distintos agregados: fertilizantes, pajas, pesticidas, etc. Las técnicas son muy variadas: colorimétricos, con electrodos específicos, por desplazamiento del amonio con una base fuerte (OMg) y titulación, reducción de nitritos y nitratos y desplazamiento del amonio, como anteriormente (semi-micro técnica de Kjeldahl para amonio, nitrito y nitrato)



- Colocar 2 g suelo en balón de destilación de 100 ml, agregar 10 mL KCl 2N y 0,1 g de OMg
- Conectar el balón al aparato de destilación con arrastre de vapor, destilar y recoger en erlenmayer de 125 mL con 5 mL sol. al 2% de ácido bórico con mezcla indicadora de verde de bromocresol y rojo de metilo, destilar hasta unos 30 mL
- Valorar el amonio con H₂ SO₄ 0,005N con microbureta o pipeta de 5 mL hasta desaparición de color verde y aparición de tono rosa, gasto= GM, igual procedimiento para blancos (gasto = GB)

N-NO₃⁻ (incluidos los nitritos)

- se procede como anteriormente, agregando al mismo balón en que se determinó el amonio y se enfrió en agua, 0,2 g de aleación Devarda (mezcla de metales reductores). Se destila el amonio formado a partir de la reducción de nitritos y nitratos

Cálculos: $\text{mgN-min/kg suelo seco} = \frac{14 (GM-GB) 0,005 \times h \times 1000}{\text{peso de la muestra}}$

Denitrificación

Recuentos en medio líquido

Medio

KNO ₃	2 g
glucosa	10 g
CaCO ₃	5 g
sol.salina estándar	1 litro

- minutos a 110°C
- Inocular con 1 mL de cada suspensión-dilución del suelo (10⁻¹-10⁻⁶) 3 o 5 tubos por dilución, incubar a 28°C, 7 días
- *Lectura:* pasar 2 gotas de cada tubo a tuba de hemólisis y evaluar los nitratos luego de eliminar nitritos como para nitrantes

Técnica ecológica

- incubar en condiciones de anaerobiosis (exceso de agua) muestras de suelo con agregados de nitratos y fuente de carbono (glucosa, etc.) en frascos herméticamente cerrados
- en distintos períodos de tiempo se toman muestras de suelo: determinar su pH en agua (1:2 suelo-agua), en 2 g determinar amonio, nitritos y nitratos por destilación con arrastre de vapor u otra técnica. Expresar el coeficiente de desnitrificación= (N-NO₃⁻ perdido/N total) x 100
- el N% de determina en los suelos por Kjeldahl (tratamiento sulfúrico en caliente)
- se puede graficar la evolución de los N-nitratos agregados, en el tiempo

Nota: Se emplea la determinación de N₂ y de N₂O en la atmósfera del suelo por cromatografía en fase gaseosa, en recipientes cerrados

Ciclo biológico del azufre

Aislamiento de microorganismos sulfatorreductores

- Puede realizarse en medio de agar simple suplementado con Na_2SO_4 0,5% y FeSO_4 0,005 %, inoculando por agotamiento con muestra de suelo suspendido en agua. Incubar en la oscuridad a 25-30°C por una o dos semanas. Se observan las colonias negras resultantes de la precipitación del SFe

Recuento en medio líquido

- **Medio** Sembrar con suspensiones-diluciones de suelo, un medio líquido con sulfatos, N mineral y un donador de H conveniente; con una porción de hierro metálico (un clavo) asegura el ambiente reductor y permite reconocer los sulfuros formados por formación de SFe negro.

NH_4Cl	1 g
K_2HPO_4	0,5 g
MgSO_4	2 g
Na_2SO_4	0,5 g
CaCl_2	0,1 g
lactato de Na (al 60 %)	6 mL
agua destilada	1 litro

- Repartir en tubos de 17 cm a razón de 5 ml c/u, tapar, esterilizar
- **Siembra:** si el medio salió del autoclave luego de varias horas, es necesario sacarle el aire (Baño María 20-30 minutos), enfriar e introducir en cada tubo un clavo previamente pasado por la llama y enfriado. Sembrar con 1 ml de suspensiones-diluciones de suelo (10^{-1} - 10^{-6})
- **Lectura:** luego de 3 semanas, positivos: en donde el clavo se rodeó de halo negro de SFe (sulfuro ferroso)

Recuento de microorganismos sulfooxidantes

Medio

K_2HPO_4	0,25 g
MgCl_2	0,10 g
NaCl	0,10 g
NH_4NO_3	2 g
CaCO_3	5 g
agua destilada	1 litro

- Repartir en tubos de ensayo a razón de 5 mL c/u, esterilizar
- Agregar a cada tubo 1 ml de sol. al 10 % de monosulfuro de sodio
- Sembrar 1 ml en cada tubo (3 o 5 tubos/dilución) de 10^{-1} a 10^{-6}
- Incubar a 28°C y a las 3 semanas observar los tubos sin agitar, transferir 1 o 2 mL a tubo vacío y agregar: 2 gotas HCl concentrado y 5 gotas sol. acuosa BaCl_2 al 5 %; la presencia de sulfatos se manifiesta por aparición de **precipitado blanco** (comparar con testigo). Determinar el **NMP** como de costumbre.

Ciclo biológico del fósforo

Microorganismos que mineralizan el P-orgánico

- Sembrar por agotamiento una suspensión de suelo en agua sobre superficie sólida de medio:

extracto de levadura	2 g
glucosa	20 g
agar	15 g
fitina al 2 %	110 mL
agua	1 litro
pH	7,0

- Observar colonias rodeadas de halo transparente. Pueden emplearse otros sustratos: glicerofosfato de calcio, lecitina, etcétera

Solubilizadores de fósforo

Medio

extracto de levadura	2 g
glucosa	20 g
agar	15 g
agua	1 litro
fuelle de fosfalo insoluble*	2 g
actidiona al 1%	6 mL
pH	7,0

- La fuente de fosfato insoluble puede ser: fosfato tricálcico, hidroxiapatita, fosfato de roca, etcétera.
- Siembra:** para recuento por siembra en inclusión se colocan 0,5 o 1 mL de las suspensiones-diluciones del suelo (10^{-1} - 10^{-4}) por caja, con 3 repeticiones, se agrega el medio en sobrefusión y se incuba a 28°C por 3 semanas
- Lectura:** se observan las colonias con playas de solubilización de fósforo insoluble

Técnica ecológica de Winogradsky

En suelos deficientes en P soluble pone en evidencia la acción de los microorganismos solubilizadores por la técnica de la tierra empastada: se mezcla suelo con una fuente de C y energía (1% de almidón) y agua hasta formar una pasta sobre la que se colocan distintas fuentes de fosfatos insolubles. La solubilización permite el desarrollo de un organismo exigente como el *Azotobacter*, cuyas colonias típicas aparecen alrededor de las partículas de fosfatos

Asociaciones micorríticas

Ectomicorizas

- Observar macroscópicamente raíces de pinos: raíces engrosadas, manto fúngico, color etc. Efectuar cortes a mano que se observan al microscopio entre porta y cubreobjeto. Describir hifas externas, intercelulares (red de Hartig).

Aislamiento de hongos ectomicorrícicos

- Existen numerosos medios, citaremos el de Melin-Norkrans, modificado

CaCl ₂	0,05 g
NaCl	0.025 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,15 g
sol (1g citrato férrico,	0,64 g

ác.cítrico, 100 ml agua)	1 mL
HCl-tiamina	100 mg
extracto de malta	3 g
sacarosa	10 g
agar	20 g
agua destilada	1 litro

- **A partir de carpóforos:** se abre cuidadosamente el sombrero y pie del hongo y se toman fragmentos de micelio con aguja o bisturí estéril (alcohol y llama), que se siembran en medio sólido. Puede partirse de esporas que se recogen en caja de Petri sobre papel de filtro estéril, colocando el sombrero adherido a la tapa de la caja (se forma imagen en el papel)

- **A partir de micorrizas:** se lavan con agua corriente una hora, se lavan varias veces con agua destilada, se desinfectan con H₂O₂ 110 vol. durante tiempo a determinar (segundos a minutos), lavar con agua estéril y depositar sobre medio sólido estéril. Incubar a 23°C

Resumen en la figura 7

Endomicorrizas

Materiales

segmentos de raíces finas de 1 cm
KOH al 10 %
H₂O₂(10 vol)
azul de tripán 0,05 % en lactofenol
lactofenol

Técnica

- Transferir segmentos de raíz a frasco con tapa rosca de unos 15 ml, cubrir con sol. KOH al 10 %, tapar y calentar a 90°C 1-2 h o a temperatura ambiente por 1 día (en raíces muy oscuras puede tratarse en autoclave 13-20 minutos)
- Eliminar la KOH y sumergir las raíces en H₂O₂ 10 vol. 15 minutos
- Lavar con agua corriente y comprobar con HCl 0,1 N si la decoloración es correcta
- Transferir la masa de segmentos de raíz con ayuda de espátula a frasco, agregar un volumen de azul de tripán al 0,05 % en lactofenol igual al volumen de raíz durante 5 minutos
- Eliminar el colorante y adicionar lactofenol, donde pueden dejarse las raíces por mucho tiempo
- Montar entre porta y cubreobjeto un trozo de raíz coloreada, aplastarlo ligeramente para separar los tejidos
- observar a la lupa o al microscopio (10x, 40x) la presencia de arbuscúlos, vesículas, esporas y sus relaciones con las células

Una de las mayores dificultades en la aplicación práctica de **inoculantes** con estos cultivos es la imposibilidad del hongo para propagarse en medio de cultivo. Luego de trabajoso aislamiento de esporas a partir del suelo por técnicas de tamizado húmedo y flotación, se caracterizan las mismas según claves apropiadas (morfología, color, tipos de paredes). Las esporas se propagan en las llamadas "**plantas trampas**", especies como sorgo, cebolla.

técnica: el inóculo se coloca 2-3 cm más abajo donde se colocarán las semillas en macetas con mezcla de suelo y arena (1:2 v/v) con pH ligeramente ácido. A los 3-4 meses en invernáculo se observa la colonización endomicorrítica y el aumento del número de esporas en el suelo.

- Se extraen las raíces colonizadas, se las secciona en segmentos de 1 cm: el **inoculante** está constituido por fragmentos de raíces colonizadas y esporas homogeneizadas con la mezcla suelo-arena. Se mantienen a un 50 % de la capacidad de campo y a bajas temperaturas hasta su empleo en inoculaciones experimentales en vivero. Aun no se logró propagar esta técnica a nivel de campo.

Extracción y cuantificación de propágulos de hongos arbusculares

Tamizado húmedo y decantación

- Una muestra de 50 g de suelo rizosférico se suspende en unos 2 litros de agua, se agita y se deja reposar durante unos segundos para que sedimenten las partículas de suelo
- Se decanta a través de una cadena de tamices de 500, 250, 125 y 53 μ m, las partículas de suelo quedan retenidas
- Se recoge el sedimento retenido en cada uno de los tamices
- Se puede añadir un agente antiespumante (Tween 80 0,1-0,5%) para evitar la formación de espuma, en suelos arcillosos se puede emplear pirofosfato de sodio 0,1 M para precipitar las partículas.

En el tamiz de 500 micras quedan los trozos de raíz, en el de 250 los esporocarpos y esporas grandes, en el de 125 μ m la mayoría de las esporas y en el de 53 μ m las esporas pequeñas.

- Se recoge el sedimento retenido en el tamiz más pequeño y se coloca en tubos de centrífuga (unos 25 mL de sedimento con 55 ml de agua), se centrifuga 3 minutos a 895g, se tira el sobrenadante y se añade una **solución de sacarosa** a 480g/l y se centrifuga 15 segundos a 895g
- Se pasa el sobrenadante por el tamiz de 53 μ m, lavando con agua para eliminar la sacarosa. Se observan a la lupa y se agrupan por morfología con ayuda de varilla de vidrio húmeda y las claves disponibles. Se conservan hasta su empleo en frascos con agua estéril en el refrigerador.

Control de maduración en los *compost*

1. Alteración de las características

- **Reducción del volumen:** la masa final de la pila debe ser por lo menos 1/3 de la del material original.
- **Coloración o aspecto:** el color inicial es ceniciento y sin brillo; con el correr del proceso la masa se va tornando más oscura y brillante cuando húmeda (como el humus). Debido a la acentuada descomposición, la mayor parte de la materia prima original no se reconoce, quedando una masa moldeable cuando se humedece.
- **El olor** característico de ciertas materias primas se va perdiendo con el compostaje que pasa a tener olor a tierra mojada, tolerable a agradable.
- **La humedad** se reduce, los que se aprecia al apretar el material con la mano: pasa de una consistencia mojada a húmeda en el inicio a casi seca cuando madura.

2. Test de maduración

Se introduce una vara de madera en la pila de compost durante todo el proceso. Al removerla se verifica:

- **fría y mojada:** no hay degradación, probablemente por exceso de agua en la masa
- **levemente tibia y seca,** con filamentos de micelio de hongos: la pila necesita más agua
- **caliente, húmeda y manchada de pardo oscuro:** las condiciones de compostaje son correctas
- **libre de "barro negro",** con olor a moho, el compost está pronto para ser usado

3. Test de temperatura

Con un termómetro se puede acompañar el proceso de compostaje, midiendo la temperatura entre 40 y 60 cm de profundidad.

4. Test de coloides

En el compostaje la materia orgánica se va fraccionando, pasando de materiales groseros al estado coloidal, con partículas que no sedimentan cuando se hace una suspensión del material con solución de sulfato de amonio.

Otra prueba muy sencilla: se toma una muestra del compost en la palma de la mano y se agrega agua suficiente para formar una pasta, que debe ser trabajada con la punta de los dedos, amasándola. Separando las manos se puede observar:

- **Compost crudo:** las palmas de las manos estarán prácticamente limpias porque el material se desprendió en partículas sueltas.
- **Compost semimaduro:** pequeña parte de la muestra permanecerá en las manos, coloreándolas de marrón.
- **Compost maduro:** las palmas de las manos se mostrarán como se estuviesen recubiertas por una grasa negra. Lavándolas, el agua tomará una coloración negra, como el **humus**, cosa que no ocurrirá con el compost semimaduro.

5. Test del pH

Midiendo el pH durante el compostaje, se puede saber como se desarrolla la descomposición, principalmente si los datos se asocian a otros tests.

- Si el material es ácido, con pH inferior a 6,0 el compost puede ser considerado crudo, en fase inicial de degradación.
- Si es neutro a levemente alcalino (6,0-7,6) el compost se encuentra en la fase de bioestabilización, o sea, semimaduro.
- Los pH superiores a 7,6, son característicos de compost bioestabilizado, en proceso de humificación.

6. Test de nitrógeno mineral

Para indicar la presencia de amonio o de nitrato en el compost, que caracterizan fases en el compostaje: una muestra de compost se humedece con agua destilada y se presiona sobre un papel de filtro. El papel de filtro con la solución del compost se divide en dos partes para analizar amonio y nitratos:

- Test para amonio:** en una de las mitades del disco de papel de filtro se colocan gotas de reactivo de Nessler: si el reactivo toma color pardo, indica presencia de amonio, lo que significa que el compost no está maduro, si no cambia de color, no hay amonio, y se procede al test siguiente:
- Test para nitrito y nitrato:** en la otra mitad del disco de papel, agregar gotas de alfa naftilamina (0,1g en 250 mL de ácido acético al 20%) y gotas de ácido sulfanílico (1,5 g en 250 ml de ácido acético al 20%) (reactivo de Gries): si aparece color **rojo** es porque hay nitrito, si no se colorea, se agrega una pequeña cantidad de polvo reductor (Zn en polvo); si hubiera nitrato, será reducido a nitrito que da color rojo, en un corto intervalo.

Un compost bien maduro presenta **nitrato** en abundancia y apenas trazas de amonio; un compost semimaduro tiene amonio y no hay nitrato.

Si la muestra presenta amonio y nitrato, es porque se trata de una mezcla de abonos con distinto tiempo de preparación, o que se han agregado fertilizantes minerales. Con trazas de nitrato o amonio, el compost se encuentra en fase intermedia de fermentación, en la cual casi todo el nitrógeno está en forma de proteína (nitrógeno orgánico).

7. Test para almidón

Tres tipos de carbohidratos son encontrados en el compost: azúcares, almidón y celulosa. Los azúcares son los primeros componentes en ser metabolizados, generalmente en una semana; el almidón en la cuarta a quinta semana ya está en la fase máxima de descomposición y el compost está bioestabilizado, con olor más tolerable y con apariencia modificada; el pH debe ser alcalino y la celulosa estará presente. Se toma 1 g de compost en un vaso de 100 ml se moja con algunas gotas de etanol si el compost estuviera seco y se agrega 20 ml de ácido perclórico al 36%. Se agita 5 minutos y se filtra. Se agrega 2 mL de **solución de iodo** al filtrado y se agita. Se colocan algunas gotas en una placa de vidrio y se examina la coloración y la cantidad de precipitado formado.

- **Coloración amarilla y poco precipitado**, significa compost maduro.
- **Coloración azul intenso y fuerte precipitado**, compost pobre y no maduro.

La secuencia de coloración para el proceso de compostaje es la siguiente: azul oscuro, azul claro, ceniza, verde y amarillo. La coloración roja se encontrará en composts parcialmente degradados.

Bibliografía

- BREMNER, J.M., 1965 Total Nitrogen e Inorganic Nitrogen, en *Methods of soil analysis*, Black (ed.), Amer. Soc. of Agronomy: 1149-1178 y 1179-1237
- BRUNDRETT, M., N. BOUGHER, B. DELL, T. GROVE y N. MALAJCZUK, 1996 Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture, Aciar Monograph 32 , 374 pp, CSIRO , Canberra
- COCHRAN, W.G., 1950 Estimation of bacterial densities by means of the most probable number, en *Biometrics*, 6: 105-116
- DÖBEREINER, J., 1980 Forage grasses and grain crops, en *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*, F.J. Bergersen-Wiley & Sons: 535-555
- ELKAN, G.H. (ed.), 1987 *Symbiotic nitrogen fixation technology*, Marcel Dekker Inc., Nueva York y Basilea
- ECKHARDT, T. 1978 A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1: 584-588
- FAO, Technical Handbook on Symbiotic Nitrogen Fixation Legume/Rhizobium, Roma, 1983
- FAO, Legume Inoculante and their Use, Roma, 1984
- FISHER y YATES, 1953 Statistical Tables, 4ª ed., Oliver & Boyd, Londres
- FRIONI, L. , A. SPINELLI y A. MAGGI 1991 Nodulación y fijación de nitrógeno en especies de *Casuarina* y *Allocasuarina* cultivadas en el país. Bol. Inv. Fac. Agr. 30: 1-20
- FRIONI, L., C. LE ROUX, Y. R. DOMMERGUES, y H. G. DIEM 1994 Inoculant made of encapsulated *Frankia*: assessment of *Frankia* growth withing alginate beads. World J. Microbiol. & Biotech 10: 118.121
- GONZALEZ, S. y S.R.A. BARRIOS, 1983 Producción de inóculo de micorrizas arbusculares, en *Rev. Latinoam. Microb.*, 25: 181-187
- HONRUBIA, M., P. TORRES, G. DIAZ y A. MORTE 1994 Biotecnología Forestal: Técnicas de Micorrización y Micropropagación de Plantas, Universidad de Murcia, CIHEAM, Instituto Agronómico mediterráneo de Zaragoza, Murcia, 168 pp.
- JENKINSON, D.S. y D.S. POWLSON, 1976 The effect of biocidal treatments on metabolism in soil V-A method for measuring soil biomass, en *Soil Biol. Biochem.*, 8: 209-213
- LALONDE, M. y H.E. CALVERT, 1979 Production of *Frankia* hyphae and spores as an infection inoculant for *Alnus* species, en *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forest*, Gordon, J.C.; C.T. Wheeler y D.A. Perry (eds.), Oregon St. Univ. Corvallis: 95-110
- LASSAGNO, M. y L. FRIONI, 1988: Obtención de mutantes de *Rhizobium meliloti* resistentes a antibióticos, en Bol. Fac. Agron., Montevideo
- MARX, D.H., 1969 The influence of ectothropic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria, *Phytopathol*, 59: 153-163
- MALVAREZ, G., G. MAJOR, V. CURBELO y L. FRIONI 1997 Hongos ectomicorríticos en *Eucalyptus grandis*. Agrociencia, Fac. de Agronomía, Mdeo: 1-9
- MILNITSKY, F. L. FRIONI y F. AGIUS , 1997 Characterization of rhizobia that nodulate native legume trees from Uruguay, *Soil Biol Biochem* 29(5-6):289-292
- MONZA, J. E. FABIANO y A. ARIAS 1992 Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biol. Biochem* 24: 241-247
- MURRY, M.; N.S. FONTAINE; J.C. TORREY, 1984 Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HIPARI3. Growth in batch culture, en *Plant & Soil*, 78: 61-78

NIFTAL, 1981 *International Network of Legume Inoculation*, Niftal Project, Univ. Hawaii, US Agency for Int. Development

NILSEN, D.R. y J.G. MAC DONALD (eds.), 1978 Methods for analysis of denitrification in soils, en *Nitrogen in the enviroment*, vol. 2, Academic Press

PHILIPS, J.M. y D.S. HAYMAN, 1970 Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizae for rapid assesment of infection, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55 : 158-161

POCHON, J. y P.TARDIEUX, 1962 *Techniques d' analyses en Microbiologie du Sol*, Ed. de la Tourelle, Paris

Schinner, F.; Ohlinger, R.; Kandeler, E. and Margering, (1996) *Methods in Soil Biology*. Springer, Germany, 426 pp.

SCHMIDT, E.L., 1973 Fluorescent antibody techniques for the study of microbial ecology, en *Modern Methods for the study of Microbial Ecology*, T. Rosswall (ed.), *Bull. Ecol. Res. Comm.*, Estocolmo, 17: 67-76

SCHNEIDER, M. y F. J. De BRUIJN, 1996 Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer assisted phylogenetic pattern analysis. *J. of Microb. & Biotech* 12: 163-174

SCHENK, N. C. y Y. PEREZ 1988 *Manual for the Identification of V-A Mycorrhizal Fungi*, Ganesville, University of Florida, 241 pp.

SIEVERDING, E. 1991 *Vesicular-arbuscular mycorrhizal management in tropic agrosystems*. Eschborn, GTZ, GmbH, 371pp.

SOMASEGARAN, P.; H. HOBEN y J. HALLIDAY, 1982 *Niftal manual for methods in legume-Rhizobium technology*, Univ. Hawaii College of Trop. Agr. and Human Resources, US Agency for Int. Development

STOWERS, M.D., 1987 Collection, Isolation, Cultivation and Maintenance of *Frankia*, en *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*, Elkan, G.H. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York: 29-53

TALLER DE TRABAJO **Ectomicorrizas y su aplicación forestal**, UNRC, Río Cuarto, dic. 1985, 11 págs. L.Frioni (ed)

WEAVER, R.J. y L.R. FREDERICK, 1972 A new technique for most-probable-number counts of Rhizobia, en *Plant & Soil*, 36: 219-222

WRIGHT, S. F. , G. J. FOSTER y O. L. BENNETT 1986 Production and use of monoclonal antibodies for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *App. Envirom. Microbiol.* 52: 119-123

Figura 1- Nódulos de soja mostrando la coloración roja de la leghemoglobina

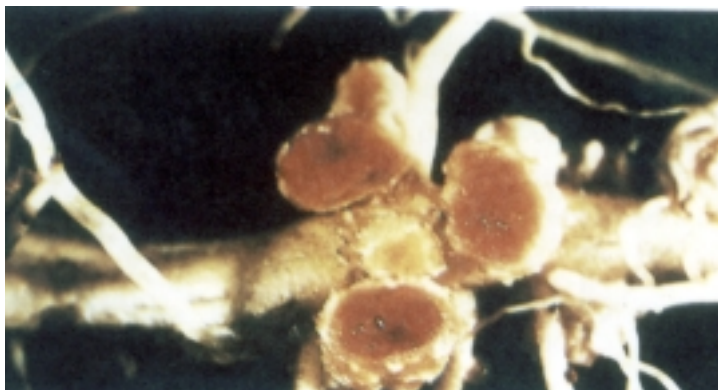


Figura 2 Inoculantes a base de alginato (Frioni et al, 1994)
medio de cultivo de *Frankia* y alginato de sodio al 2% final



Figura 3- Inoculante en alginato de calcio con *Frankia* a diferentes concentraciones. La coloración roja del INT-formazán permite evaluar la viabilidad de la bacteria. (Frioni et al, 1994)

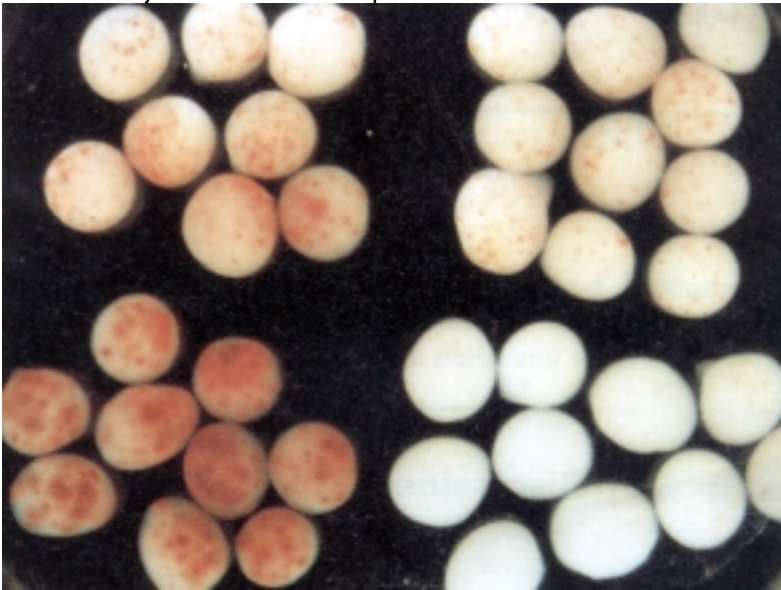
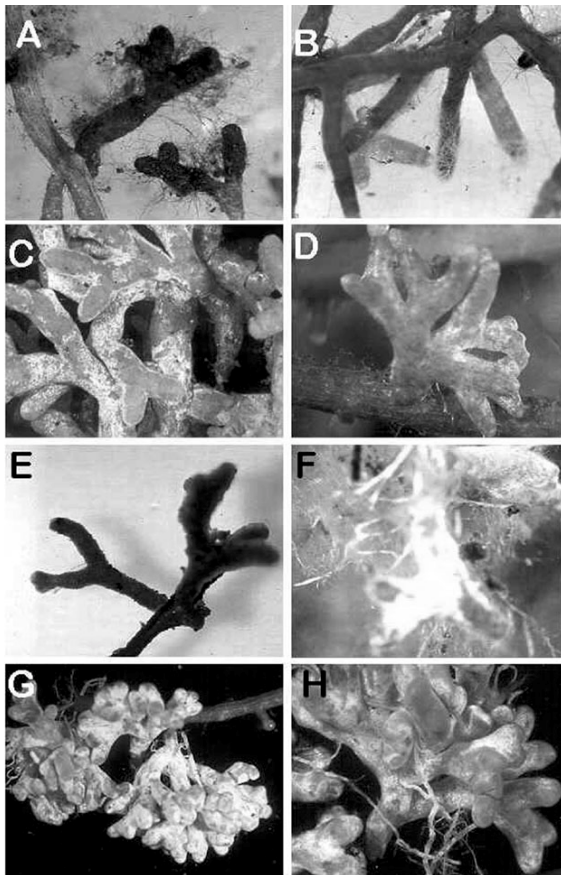


Figura 4- Nódulos de *Casaurina* spp. (gentileza de S.M. de Faría)



Figura 5- Ectomicorrizas



El diagrama ilustra el ciclo de vida de las esporas de *Trichoderma reesei*. El proceso comienza con la inoculación de un sustrato estéril con esporas. El cultivo resultante puede ser controlado o esporulado. Las esporas se almacenan a 4 °C o se secan. El ciclo también incluye un cultivo 'trampa' que produce esporas a partir de un suelo rico en nutrientes.

Figura 8- Endomicorrizas arbusculares
(hifas, vesículas, arbusculos)

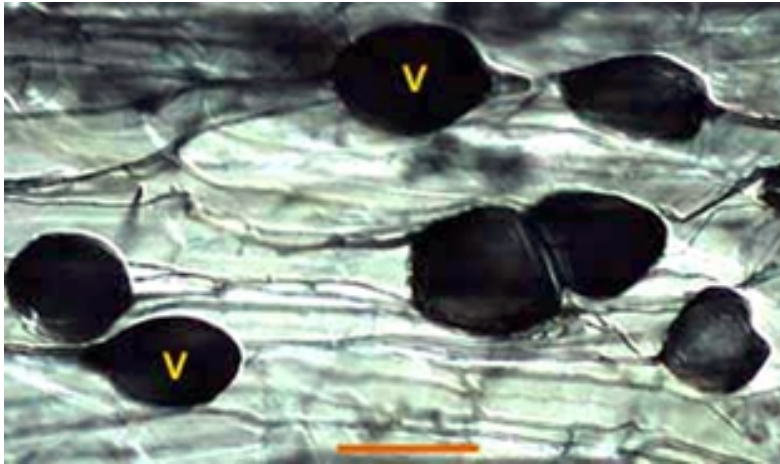


Figura 9 - Esporas de hongos Endogonaceae obtenidas por tamizado húmedo: *Gigaspora margarita* (esporas claras), *Scutellospora heterogama* (marrones) y *Gigaspora gigantea* (amarillas). Gentileza de Siqueira y Franco, 1988)

