

Los microorganismos y su rol en la producción agrícola

Pedro Alberto Balatti

Mario Carlos Nazareno Saparrat (coordinadores)

n
naturales

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES


Editorial de la UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

LOS MICROORGANISMOS Y SU ROL EN LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

Pedro Alberto Balatti
Mario Carlos Nazareno Saparrat
(coordinadores)

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales



Esta obra está dedicada a todos los investigadores que en laboratorios de diversa envergadura con mayor y/o menor disponibilidad de recursos y equipamiento han dedicado muchas horas de su vida a desentrañar la biología, interacciones y roles de los microorganismos en el mundo lo cual ha contribuido a comprender y mejorar la vida.

Los microorganismos son la vida del suelo y los responsables de su fertilidad.

Índice

Prólogo _____ 7

Capítulo 1

Conceptos generales de Microbiología _____ 8

Pedro A. Balatti

Capítulo 2

El suelo como ecosistema _____ 27

Virginia Martínez Alcántara

Capítulo 3

Metabolismo del carbono: degradación microbiana de lignocelulosa
y formación de sustancias húmicas _____ 46

Gabriela Diosma y Mario C. N. Saparrat

Capítulo 4

Ciclo del nitrógeno _____ 63

Geraldina Fermoselle y Pedro A. Balatti

Capítulo 5

Fijación de nitrógeno _____ 86

Graciela N. Pastorino y Pedro A. Balatti

Capítulo 6

Fijación simbiótica de nitrógeno: rizobios-leguminosas y Frankia-plantas no leguminosas _ 106

Pedro Alberto Balatti

Capítulo 7

Microorganismos promotores del crecimiento_____ 124

Graciela N. Pastorino

Capítulo 8

Microbiología de la leche. Bacterias Ácido lácticas. Microbiología del agua _____ 143

Gabriela Diosma, Laura Balagué y Alejandra Londero

Capítulo 9

- Hongos que impactan en la producción agro-forestal _____ 165
Mario Carlos N. Saparrat

Capítulo 10

- Ecología microbiana y biotecnología ambiental _____ 175
Sabrina Festa y Virginia Martínez Alcántara

- Los autores** _____ 195

Prólogo

Esta obra está destinada a los estudiantes de las carreras de Ingeniería Agronómica e Ingeniería Forestal y fue realizada por los docentes del curso de Microbiología Agrícola. Describe de manera sencilla y sintética el rol que cumplen los microorganismos en el suelo y en su interacción con las plantas y los animales. Los microorganismos dan vida al suelo porque dinamizan los nutrientes, entre ellos el C y el N, que contribuyen a la estabilidad de los suelos y el crecimiento y rendimiento de los cultivos. La microbiología de las bacterias de la leche se asocia a la producción, desarrollo y utilización de probióticos y conservación del forraje. El agua de ingesta debe estar libre de microorganismos y en los efluentes de agua se debe bajar la carga microbiana. Los microorganismos se utilizan como indicadores de la calidad del ambiente y cumplen un rol clave en la descontaminación de suelos perturbados y en biorremediación de matrices contaminadas. Por último, la formulación de bioinsumos es hoy un tema clave de la producción agrícola sustentable y por eso describimos las principales aplicaciones. El libro fue elaborado por un equipo de profesionales entre los que se distinguen Agrónomos, Biólogos, Ecólogos y Biotecnólogos. El trabajo fue intenso y llevó tiempo, pero fue divertido, esperamos lo disfruten y resulte de utilidad.

Pedro A. Balatti

CAPÍTULO 1

Conceptos generales de Microbiología

Pedro A. Balatti

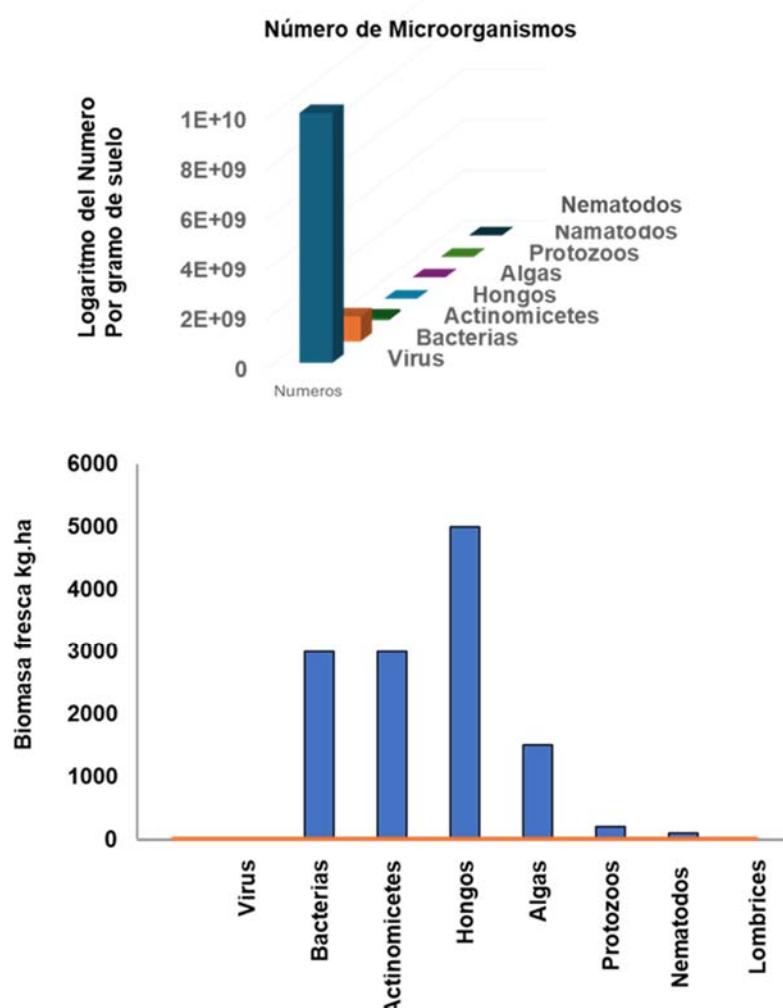
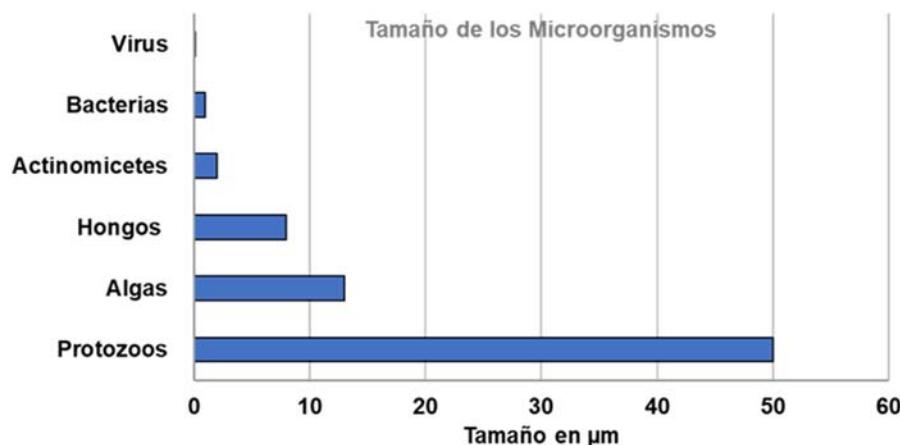
Este capítulo tiene como objetivo describir aspectos generales de la Microbiología que son necesarios para luego tratar aspectos de la Microbiología Agrícola. La Microbiología estudia a los microorganismos que no son visibles a simple vista y por ello su avance está íntimamente ligado al desarrollo de la microscopia y de metodologías específicas para aislar y cultivar a los microorganismos. Por eso la Microbiología Agrícola se inicia como ciencia cuando Anton van Leeuwenhoek con un microscopio casero, que él construyó en sus horas de ocio, describió la presencia de animáculos en muestras de suelo. A partir de este momento, se dispararon los estudios de la microscopia, cuyo desarrollo fue dependiente de la resolución de los microscopios. Esta última es una función de la apertura de la lente del objetivo del microscopio y la longitud de onda de la luz, siendo mejor si se capta más haces de luz proveniente de la muestra objeto. Por eso, cuando se hacen observaciones con rayos x o con flujos de iones, es decir se trabaja con menores longitudes de onda, se aumenta la resolución de lo observado y se puede discriminar entre estructuras más pequeñas que una célula como los virus.

Microorganismos que componen la comunidad del suelo

El suelo es uno de los ambientes más heterogéneos por características físicas y químicas, pero también porque contiene una cantidad muy grande de diversos microorganismos. El suelo contiene virus, bacterias, hongos, actinomicetos, algas, protozoarios y macroorganismos; todos los cuales le dan vida y son esencialmente responsables de la dinámica de los nutrientes en los suelos. Es por este motivo que la vida del suelo es importante para el crecimiento de las plantas y la sostenibilidad de los sistemas. En la Figura 1.1 se presentan datos comparativos del tamaño de los microorganismos, de su cantidad en el suelo en lo que hace a números de individuos y cuánto representa esto en biomasa de peso fresco del suelo.

Figura 1.1

Tamaño y Biomasa de los microrganismos del suelo



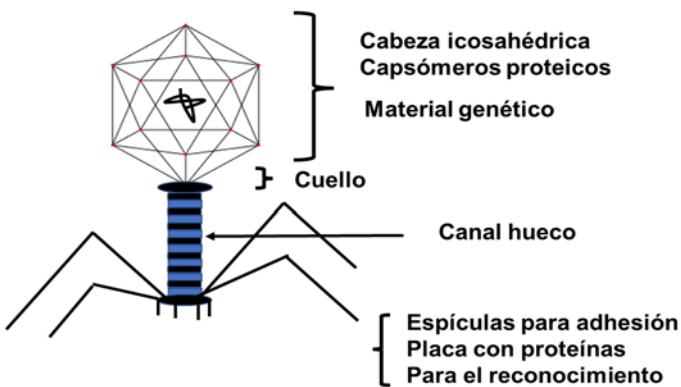
Nota. Composición de la comunidad microbiana de los suelos en tamaño y cantidad.

Los virus son entes que se describieron por primera vez en 1890, éstos se encuentran en grandes números en los suelos (Figura 1.2), cómo se reproducen solo en sus hospedantes

indican la presencia de sus huéspedes. Los virus están formados por material genético ADN o ARN que están rodeados de una cubierta proteica formada por capsómeros, son de muy pequeño tamaño 20 a 300 nm. Los más pequeños son más simples y codifican 3 genes y los más complejos hasta 120; estos últimos que son los virus que se suelen encontrar en el suelo se conocen como bacteriófagos, porque infectan a las bacterias del suelo. El resto de las comunidades de organismos presentes en los suelos son también afectadas por los virus.

Figura 1.2

Esquema de un bacteriófago



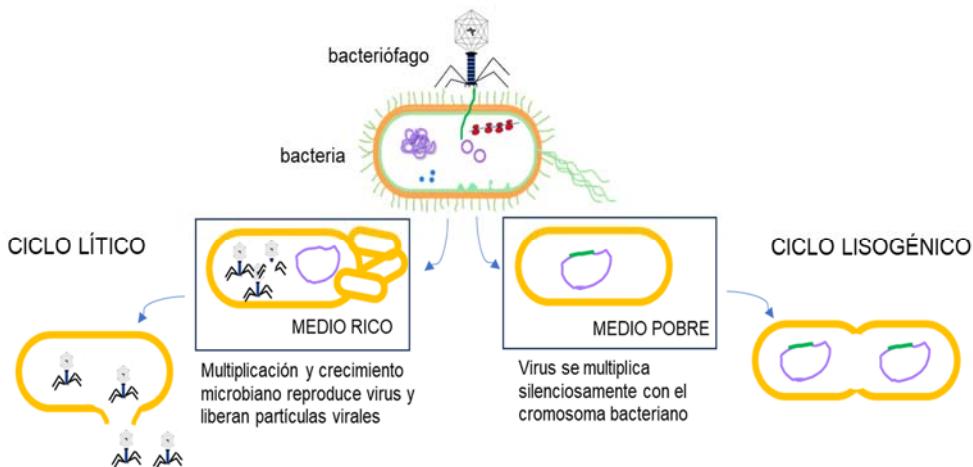
La estructura de los bacteriófagos consiste en una cabeza icosaédrica con una cobertura proteica, la cápside, que contiene ADN. A esto le sigue un collar que se ensambla a un canal proteico hueco que presenta una base, espículas que aparecen como patas y otras fibras. Esa placa base y las espículas son las que les permite reconocer a la bacteria hospedante en la que ingresa el material genético del virus en donde se multiplica. Las infecciones víricas se describen en varias etapas: la adsorción del virus a la superficie bacteriana (reconocimiento), la penetración (ingreso del material genético desnudo) y la replicación del virus, seguido del ensamblaje (en el que el material genético viral es recubierto por la cápside) y liberación de las partículas virales a los suelos.

La replicación del virus en su hospedante puede ser de dos tipos. Cuando el hospedante, es decir las bacterias, están creciendo sin restricciones el virus las infecta, se multiplica en ellas y luego de ensamblarse, se liberan muchas partículas virales; a este ciclo se lo conoce como ciclo lítico. Cuando el virus infecta bacterias que no se encuentran creciendo y por lo tanto la síntesis proteica ocurre lentamente, el material genético del virus se integra al genoma del hospedante y se multiplica junto con éste silenciosamente (ciclo lisogénico). Esto sucede hasta que determinadas condiciones ambientales hacen que la bacteria active su metabolismo, lo que conduce a la síntesis de la proteína de cobertura del virus que envuelve al material genético liberando así partículas virales (virión). Los virus son muy específicos en su interacción con los hospedantes bacterianos y esto se utiliza tecnológicamente para el reconocimiento e identificación de bacterias y de alguna manera son un factor clave para regular la población de otros organismos de los suelos. Los virus frecuentemente mutan debido a que no suelen tener sistemas de reparación de los cambios genéticos que se producen durante la replicación, esto

es a tal punto que suelen poder agruparse por los sitios geográficos de donde provienen las muestras.

Figura 1.3

Ciclo lítico y lisogénico de un bacteriófago



Las bacterias son organismos procariotas, mayoritariamente unicelulares que en grandes cantidades habitan todos los ambientes del planeta, entre ellos los suelos. Entre las características que se utilizan para clasificar a las bacterias están las morfológicas, fisiológicas, las bioquímicas, las antigenicas y las ecológicas. Los grupos taxonómicos bacterianos son numerosos y se generan en función de la comparación de la secuencia nucleotídica del ARN ribosomal. Este material genético responsable de la síntesis proteica está conservado, excepto regiones no codificantes, y ha sido utilizado para establecer las relaciones entre ellos. Se distinguen tres dominios de la biodiversidad, el dominio bacterias o eubacterias, las arqueobacterias y los organismos eucariotas. Es interesante destacar que las arqueobacterias se encuentran evolutivamente más próximas a los eucariotas que a las bacterias.

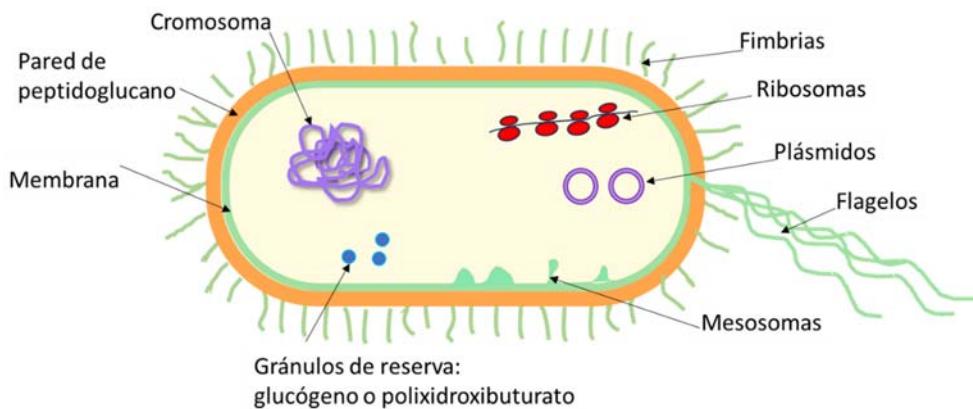
Los organismos procariotas no tienen organelas y los procesos metabólicos se encuentran compartimentalizados en pliegues membranales. Excepto las micoplasmas, que no tienen pared, las bacterias tienen una pared formada por peptidoglucano, que es un polímero de N-acetil murámico y N-acetil glucosamina que a la vez se une a un tetrapéptido. Las bacterias respiran y fotosintetizan utilizando rutas metabólicas similares a la de los eucariotas, pero no tienen ni mitocondrias ni cloroplastos. El material genético consiste en una molécula de ADN desnudo, organizada en un cromosoma superenrollado inmerso en el citoplasma. Esta estructura se denomina nucleoide, ya que carece de membrana nuclear (carioteca)."

Las bacterias suelen tener además material genético extracromosómico, que se conocen como plásmidos; éstos se replican de manera independiente al cromosoma y en general codifican genes de características accesorias como resistencia a metales pesados, antibióticos, capacidad patogénica, etc. Este material genético extracromosómico puede pasar de una especie bacteriana a otra a través de lo que se conoce como conjugación, un proceso de

transferencia horizontal. Las bacterias se dividen por fisión binaria, en la que después de la replicación una copia del cromosoma va a cada una de las células hijas.

Figura 1.4

Morfología y componentes de una bacteria



Las variaciones genéticas bacterianas suelen ocurrir también como resultado de los siguientes procesos de transferencia horizontal: transformación, proceso que consiste en el ingreso de fragmentos de ADN a células bacterianas jóvenes que tienen paredes más permeables. Una de las cosas que ocurren cuando mueren las bacterias en el suelo es que se fragmenta su ADN en pequeños trozos. El ADN bacteriano que ingresa eventualmente se recomienda e inserta en el cromosoma bacteriano, generando así una variante bacteriana. Otra forma en que las bacterias presentan cambios genéticos es por la transducción generalizada y especializada que provocan los bacteriófagos. La transducción generalizada consiste en que un bacteriófago que infecta una bacteria, se desensambla y multiplica luego de lo cual, sintetiza proteínas de cobertura para rodear las nuevas partículas virales que son liberadas cuando se produce la lisis celular. Algunas de esas partículas contienen material genético bacteriano rodeado por la cápside que de esta manera puede transferir ese material genético. La transducción especializada es similar a la anterior; la diferencia radica en que cada réplica del fago generado en la bacteria hospedante lleva un trozo de material genético bacteriano, es decir que todas las partículas ensambladas podrán generar modificaciones en la comunidad bacteriana susceptible de ser infectadas por esas partículas virales.

Por otro lado, las bacterias pueden sufrir mutaciones en secuencias claves, la frecuencia de mutaciones es mayor de lo que creemos, pero muchas no se detectan debido a que generan un fenotipo letal y otras no generan cambios ya que con frecuencia aun cuando cambia la tercera base el triplete sigue codificando el mismo aminoácido. Es interesante destacar que algunos de estos mecanismos también generan variabilidad en los hongos y demás organismos del suelo.

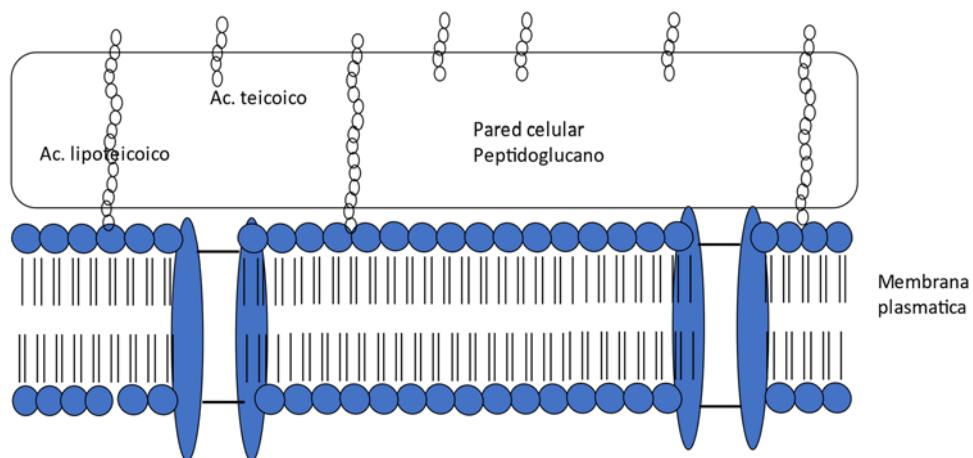
Hay dos características de las bacterias que son claves en su fisiología pero que además se utilizan con fines de identificación. Una es el grosor de la pared y la presencia de una membrana externa a la membrana plasmática y el otro es la capacidad de algunos grupos bacterianos de formar esporas de resistencia.

Pared de las bacterias

En cuanto a la pared, Gram, un científico danés, describió un procedimiento para caracterizar el grosor de la misma a través de una reacción. Así se diferencian dos grandes grupos de bacterias las Gram (+) y las Gram (-), que tienen que ver con el resultado de la reacción que se produce al final del procedimiento. Las bacterias Gram (+) retienen el colorante violeta y las Gram (-) pierden a este colorante y se tiñen con otro colorante de contraste rosa que es el color que tienen vistas al microscopio. Las Gram (+) son bacterias que tienen una pared de peptidoglucano muy gruesa y no tienen una membrana externa. Entre sus constituyentes se destacan los ácidos teicoicos, ácidos lipoteicoicos y una membrana plasmática. El espacio que se encuentra entre la membrana y la pared se conoce como espacio periplásmico y es estrecho.

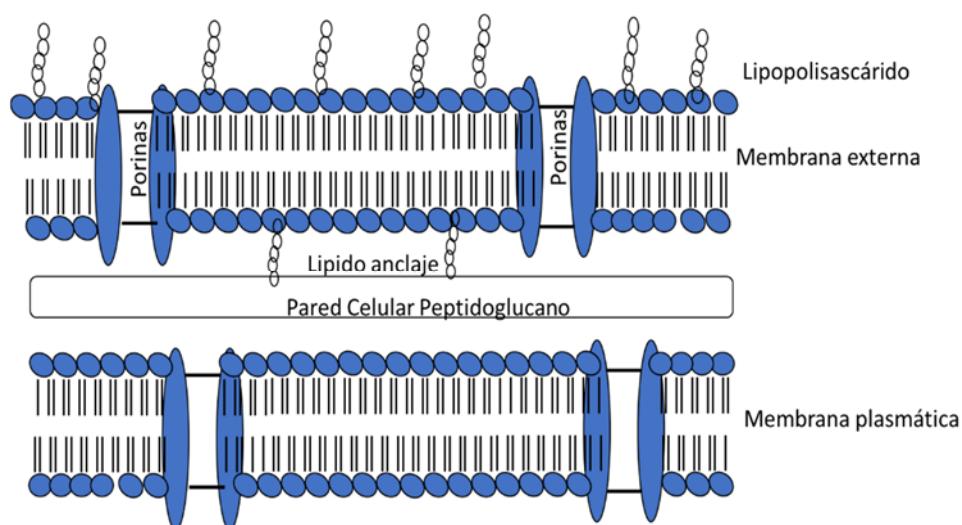
Figura 1.5

Esquema de la pared y membrana de una bacteria Gram (+)



Nota. Estructura, composición y distribución de la pared y la membrana en una Bacteria Gram (+).

Las bacterias Gram (-) se caracterizan por tener una pared muy delgada que se ubica entre la membrana plasmática y una membrana externa formada por lipopolisacáridos y fosfolípidos, entre los que se ubican además las proteínas porinas. En estas bacterias el espacio periplásmico es amplio y contiene una matriz proteica densa en donde se detectan actividades enzimáticas de importancia. Las porinas son canales que facilitan el pasaje de compuestos específicos y/o agua.

Figura 1.6*Esquema de la pared y membrana de una bacteria Gram (-)*

Nota. Estructura, composición y distribución de la pared y las membranas interna y externa en una Bacteria Gram (-)

Además de las bacterias descritas también se conocen las bacterias ácidas que presentan una pared celular delgada entre la membrana plasmática y la membrana externa que en este caso está conformada por ácidos grasos de cadena larga (ácidos micólicos), que también contiene porinas. Por último, existe un grupo de bacterias que carecen de pared como los micoplasmas que no presentan membrana externa, pero su membrana plasmática está formada por esteroles (ausente en la mayoría de los procariotas) que le confieren una mayor resistencia.

La superficie de las bacterias es clave porque es la forma en que se relacionan e interactúan con otros organismos. En este sentido algunas bacterias producen glucocálix que están formados por glicoproteínas que rodean a la bacteria y que alteran las propiedades superficiales que hacen a su reconocimiento. Por otro lado, otras bacterias producen cápsulas que consisten en una película de una sustancia mucilaginosa, constituida esencialmente por un polímero de azúcares que se adhieren fuertemente a la célula, que puede variar en grosor y constitución polisacáridica. Esta cápsula además de proveer de características de reconocimiento a la bacteria reduce la pérdida de agua por evaporación y a veces protege a la bacteria de la fagocitosis de los protozoarios.

Esporulación

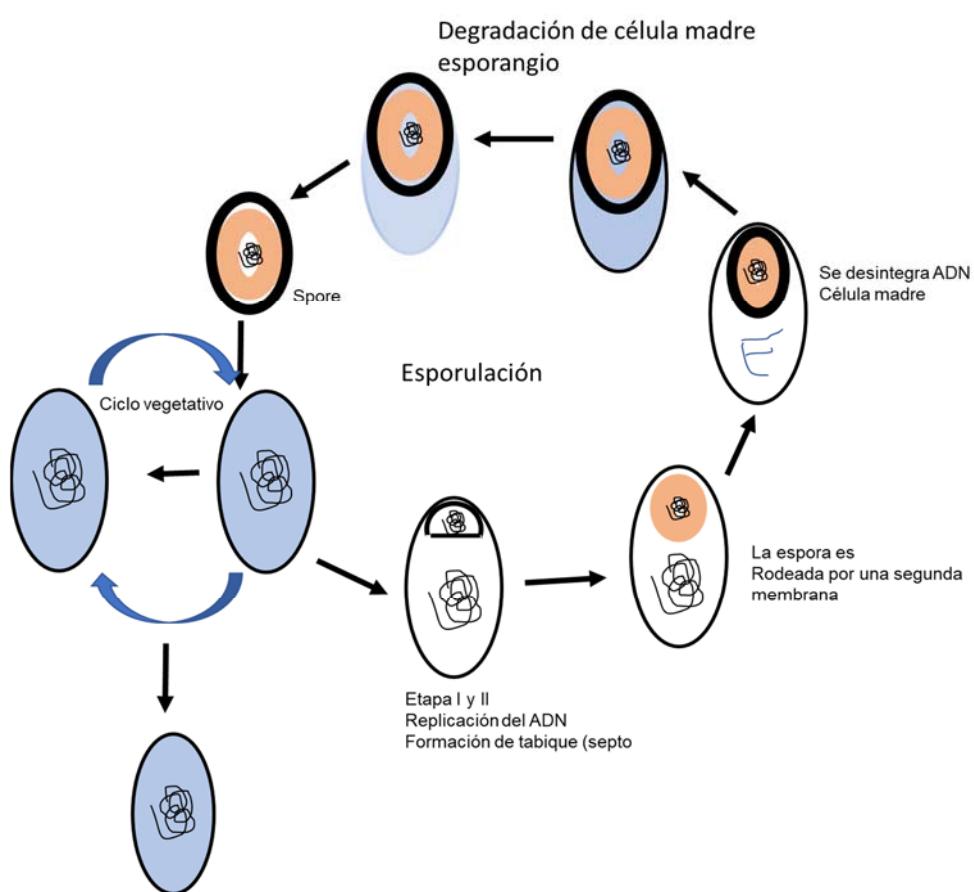
En cuanto a la formación de esporas las bacterias de los géneros Gram (+) *Clostridium* y *Bacillus* se destacan porque forman esporas cuando el cultivo bacteriano es expuesto a un estrés. Este evento consiste en que se induce un cambio regulatorio del complejo proteico que regula la expresión de genes y así, dejan de sintetizarse los componentes celulares de una célula vegetativa y comienza a formarse un conjunto de proteínas nuevas que conducen a la regulación

y formación de estructuras típicas de la esporulación. Estas esporas bacterianas son muy resistentes a condiciones ambientales adversas y es muy complejo inactivarlas, lo que se logra con procesos de esterilización.

Es importante destacar que a lo largo de este libro se habla de las cianofíceas y de los actinomicetes, estos dos grupos son bacterias que se asocian por un conjunto de capacidades como es en las primeras la capacidad de fotosintetizar y fijar nitrógeno. En el caso del segundo grupo son bacterias Gram (+) filamentosas que forman esporas y contienen varios núcleos, pero debe estar claro que son bacterias.

Figura 1.7

Esquema del proceso de esporulación en bacterias



Otros microorganismos del suelo

En los suelos también encontramos a las cianobacterias que son las bacterias más antiguas del planeta, que con su capacidad fotosintética oxigénica contribuyeron a aumentar la disponibilidad de oxígeno en la atmósfera. La mayoría de las cianofíceas son fotótrofos obligados y almacenan el C fijado por fotosíntesis como sustancias similares al almidón o como aceite y

adicionalmente fijan nitrógeno y lo almacenan como cianoficina. La mayoría de las cianofíceas liberan un mucílago que las protege de la desecación y además actúa como quelante de nutrientes en suelos arenosos. Ellas contienen pigmentos accesorios a la clorofila como la ficocianina, que es responsable de su llamativo color azulado. Las cianobacterias pueden ser unicelulares, filamentosas o formar colonias. Los filamentos se forman porque durante la multiplicación celular las células resultantes comparten sus paredes o porque las células quedan unidas a través de mucílagos. Las cianofíceas se mueven en el suelo por procesos de desplazamiento sin flagelo.

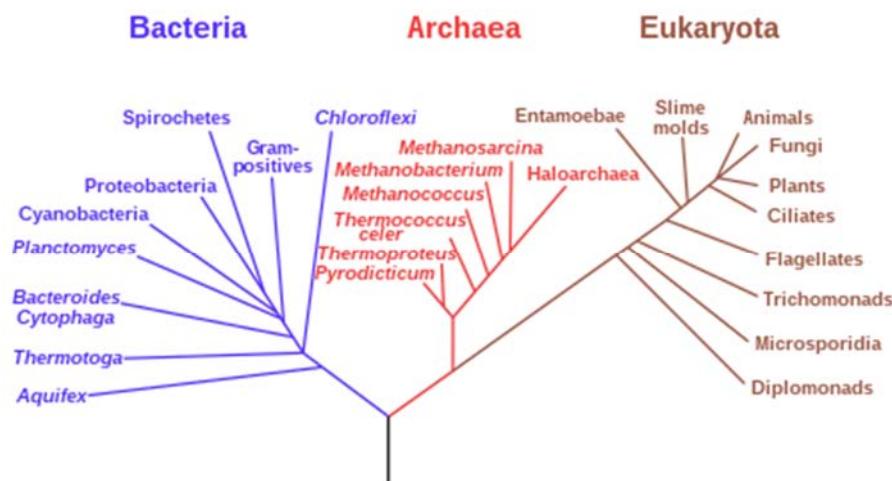
Los hongos son otros habitantes del suelo. Ellos son eucariotas quimioorganótrofos (heterótrofos) que están provistos de una pared de quitina y que filogenéticamente se agrupan en el Reino Fungi (Supergrupo Opisthokonta). Los hongos pueden colonizar distintos tipos de sustratos del suelo y habitar en cursos de agua dulce, así como con menor frecuencia también de ambientes marinos. Ellos suelen además desempeñar diferentes roles ecológicos, como saprótrofros, simbiontes mutualistas o parásitos. Los hongos saprótrofros utilizan el C y otros nutrientes de la materia orgánica presente en los suelos, siendo agentes de la degradación que contribuyen a la mineralización del carbono y en definitiva al ciclo del mismo.

Los hongos tienen formas miciliares y/o unicelulares. Cuando crecen superficialmente en los sustratos sólidos que colonizan forman colonias macroscópicas visibles a simple vista. Varios grupos de hongos sintetizan una batería de exoenzimas hidrolíticas y oxidativas que despolimerizan sustratos orgánicos complejos y generan productos solubles que los absorben para su nutrición (osmotrofía). Esta capacidad que tienen algunos hongos para descomponer compuestos poliméricos de baja degradabilidad, es decir recalcitrantes, tiene estrecha relación con los grupos taxonómicos a los cuales pertenecen. Los hongos que se consideran, desde un punto de vista filogenético, menos evolucionados suelen caracterizarse por utilizar azúcares y otros compuestos carbonados simples fácilmente asimilables (hongos sacarofílicos), en contraposición a los representantes de los phyla Ascomycota y Basidiomycota, que incluyen a hongos filogenéticamente más evolucionados que se destacan por degradar compuestos poliméricos. La mayoría de los hongos son aerobios estrictos, pero existen algunos anaerobios facultativos y estrictos, como diferentes levaduras y los hongos del Orden Neocallimastigales que viven en el rumen de los herbívoros, respectivamente.

La colonización de distintos materiales orgánicos y su degradación por los hongos depende de la temperatura, el tenor de humedad ambiental y las características del sustrato. Cuando el crecimiento de los hongos es inhibido ya sea porque el sustrato no es asimilable y/o los factores ambientales son desfavorables, se activan procesos que conducen a la diferenciación de estructuras reproductivas (esporas) u otras somáticas de resistencia, o alternativamente los hongos mueren. No obstante, algunos hongos crecen en condiciones de estrés debido a que poseen mecanismos que les permiten resistir condiciones adversas del ambiente (hongos xerotolerantes).

Figura 1.8

Árbol evolutivo de los organismos



Nota. Árbol que muestra la evolución de los organismos

Los hongos son agentes claves en el reciclado de la materia orgánica y la liberación de nutrientes al suelo. Ciertos hongos tienen efectos negativos, como los que provocan enfermedades en plantas y animales y los que actúan como agentes responsables del deterioro. Otros hongos son benéficos ya que suelen utilizarse como alimento como *Agaricus bisporus* (el champiñón) y diferentes especies de *Tuber* (trufas), que a través del uso de sus esporomas (fructificaciones) constituyen fuentes de alimento y de productos gourmet. Otros hongos tienen rutas metabólicas que sintetizan compuestos de importancia tecnológica como antibióticos, alcaloides, ácidos orgánicos y enzimas como celulasas, amilasas, proteasas, lipasas y pectinasas. Otros hongos con valor biotecnológico son las levaduras que se utilizan para la producción de alimentos fermentados como panes y bebidas, como también los representantes del género *Penicillium* que son usados en la preparación de los quesos azules, y los hongos aplicados en la formulación de inoculantes para promover el crecimiento vegetal.

Los pseudohongos son organismos heterotróficos pertenecientes al Reino Straminipila, cuya pared está formada por glucano y que filogenéticamente son diferentes a los hongos, aun cuando morfológicamente y funcionalmente presentan similitudes.

Las algas son otros organismos que se encuentran en el suelo; son muy diversas y están representadas por al menos 7000 especies. Aunque muchas de ellas son acuáticas, hay varias que pueden encontrarse en ambientes particulares como la superficie del tronco de los árboles, los suelos, la nieve o estableciendo una relación simbiótica con los hongos que se denomina liquen. Las algas de la misma manera que las plantas vasculares son fotótrofos y cumplen un rol clave por su capacidad fotosintética, es decir su capacidad de fijar carbono en el suelo utilizando la energía de la luz.

Nutrición y Metabolismo de las bacterias

El contenido de nutrientes del suelo es clave para el desarrollo de las comunidades que en él desarrollan. Los microorganismos utilizan los macronutrientes minerales como el C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Fe. Na y los micronutrientes que se utilizan en muy baja concentración. Algunos de estos elementos como por ejemplo el oxígeno, carbono e hidrógeno se encuentran disponibles en la atmósfera u otros sustratos de muy diversas maneras. Por otro lado, al momento de intentar cultivarlos hay organismos que son más exigentes en cuanto a la composición del medio de cultivo, el que debe ser suplementado con factores de crecimiento como vitaminas.

En relación al tipo de metabolismo que desarrollan los microorganismos en el variable ambiente del suelo, éstos pueden ser aerobios y microaerobios o microaerófilos, los dos utilizan al oxígeno molecular como último aceptor de electrones, sin embargo, los segundos sólo toleran concentraciones de oxígeno bajas, es decir tienen sistemas de protección débiles frente a las especies reactivas de oxígeno. Luego, se encuentran los microorganismos anaerobios facultativos que desarrollan preferentemente en presencia de oxígeno molecular, pero cuando la tensión de oxígeno en el medio es baja utilizan otro elemento como aceptor de electrones (nitrato, sulfato, dióxido de carbono). Luego están los organismos anaerobios aerotolerantes que tienen un metabolismo que funciona tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, porque no lo utilizan como aceptor de electrones, sólo se produce fosforilación a nivel de sustrato.

Por último, se encuentra el grupo de los anaerobios obligados que no toleran el oxígeno, es decir no crecen en su presencia. Esta clasificación de microorganismos en relación con cómo utilizan el oxígeno molecular se explica también por la presencia de un conjunto de mecanismos de protección frente a las especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) que se generan como resultado del metabolismo. Entre estas enzimas se pueden mencionar el superóxido dismutasa, la catalasa y la peroxidasa; todas ellas catalizan reacciones tendientes a reducir la capacidad oxidante de los radicales libres al remover el electrón despareado que suelen tener.

Figura 1.9*Clasificación de las bacterias en base a vínculo con el oxígeno disponible en el suelo*

Tipo de Respiración	Aceptores de electrones	Productos
AEROBIOS	O ₂	H ₂ O
FACULTATIVOS ANAEROBIOS RESP AER. RESP ANAER	NO ₃	N ₂ ; N ₂ O; NO
ANAEROBIOS AEROTOLERANTES FERMENTACIÓN LACTICA	Fosforilación a nivel de sustrato	Ac. Orgánicos alcohol, otros
ANAEROBIOS OBLIGADOS	SO ₄ C	SH ₂ CH ₄



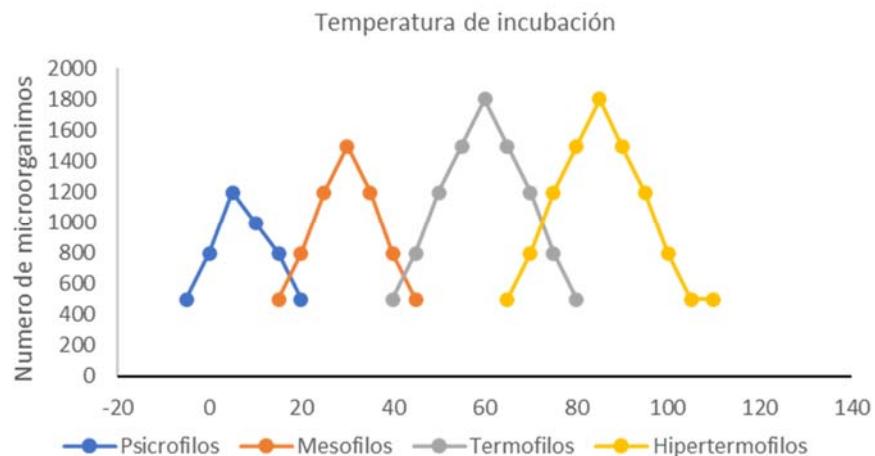
Nota. Clasificación de las bacterias en función de su relación con el oxígeno. Se consignan para cada grupo los aceptores de electrones.

Es decir que en los diversos ambientes que conviven en el suelo van a desarrollar diversos grupos de bacterias en lo que hace a cómo utilizan los mismos el oxígeno. Además del contenido de nutrientes del suelo y de la disponibilidad de oxígeno, otros factores ambientales claves para el crecimiento microbiano son la temperatura, la disponibilidad de agua y el pH de los suelos. En cuanto a la temperatura, vale la pena destacar que los microorganismos toleran amplios rangos de temperatura en la que crecen y, si bien se siguen identificando especies bacterianas adaptadas a nuevos ambientes, la clasificación general de los organismos en su relación con la temperatura incluye esencialmente a psicrófilos, mesófilos, termófilos, hipertermófilos (Figura 1.10).

En cuanto a la disponibilidad de agua en el suelo, ésta es clave para el crecimiento microbiano y un indicador es la actividad del agua, que tiene que ver con la energía que contiene este solvente. Como ejemplo, un agua con bajo contenido de sales tiene más energía que un agua con un alto contenido de sales, esto se debe a que los iones están interactuando con las moléculas del agua en lo que se invierte energía. Es decir que la actividad agua del suelo indica el agua disponible para el crecimiento bacteriano. Otra característica que impacta en el crecimiento de los microorganismos en el suelo es el pH. Las bacterias desarrollan preferentemente en pH cercanos a la neutralidad y en cierta alcalinidad, pero los hongos crecen preferentemente en suelos ácidos. Es decir que el pH del suelo altera el balance de las comunidades microbianas de los suelos.

Figura 1.10

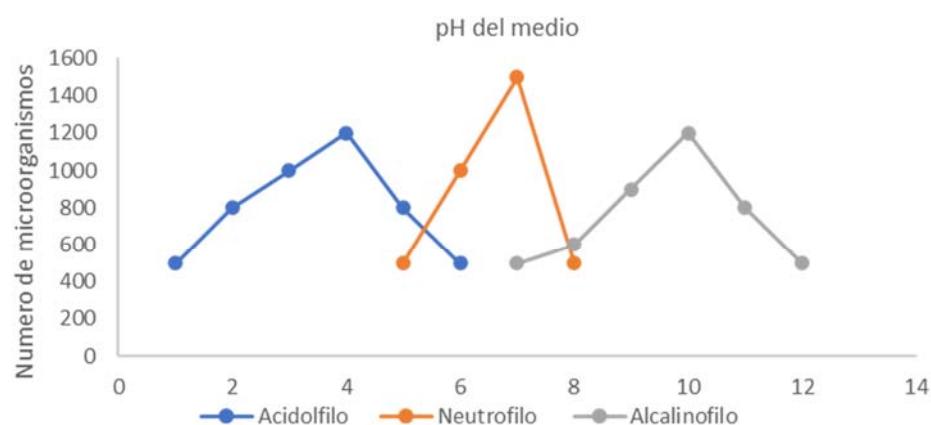
Clasificación de los microorganismos en base a la temperatura en la que desarrollan



Nota. Rango de temperaturas en las que desarrollan los organismos psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos

Figura 1.11

Clasificación de los microorganismos en base a las condiciones de pH en las que desarrollan



Nota. Rango de pH en los que desarrollan los microorganismos acidófilos, neutrófilos y alcalinófilos.

Control del crecimiento microbiano

Hemos descrito a los componentes que contribuyen al crecimiento de los microorganismos del suelo en donde conviven comunidades bacterianas que difieren en sus capacidades metabólicas, que cumplen roles claves y complementarios en el ambiente del suelo. Los primeros estudios microbianos se realizaron intentando cultivar a todos los microorganismos que desarrollaban a partir de una muestra de suelo u otro elemento, y esto se realizó sembrando

suelo en una rebanada de una fruta. Esa fruta proveía de azúcares y otros elementos al desarrollo microbiano, sin embargo, la complejidad de la comunidad no permitió profundizar estudios de los individuos. Esto último por un lado indica que los suelos contienen una gran diversidad bacteriana, cuyo estudio demanda el cultivo de sus microorganismos de manera aislada, pero además que los microorganismos degradan la materia orgánica que aporta nutrientes. De esta manera uno de los objetivos fue manejar el crecimiento microbiano y en este sentido se trabajó por un lado en la eliminación o control del crecimiento microbiano que tenía como objetivo eliminar o controlar el crecimiento de microorganismos indeseables y por otro, disponer de medios para inducir el crecimiento de determinados grupos de bacterias.

En lo que hace al control del crecimiento microbiano, Lister encontró que exponiendo a la llama elementos como un bisturí, previo al momento de realizar una cirugía, se reducía la ocurrencia de infecciones. De esta manera se concluyó que la alta temperatura eliminaba a los microorganismos y que evidentemente éstos eran los potenciales agentes causales de las infecciones. Hoy el conocimiento más detallado de la biología de los microorganismos y del efecto de la temperatura es la base para el desarrollo de las diversas estrategias que se utilizan para controlar o manejar el crecimiento microbiano.

La eliminación de los microorganismos es necesaria en diversos campos como ser en los materiales que se utilizarán en una cirugía, en alimentos que se van a almacenar, etc. Esto se realiza por diversos métodos, uno es la esterilización por calor que es un método eficiente que depende de la temperatura que se utiliza y el tiempo al que se expone la muestra a la misma. La esterilización por calor es uno de los métodos más utilizados para controlar el crecimiento microbiano y consiste en eliminar a los microorganismos de una muestra; se basa en que la alta temperatura desnaturaliza las proteínas funcionales bacterianas. La esterilización por calor también se puede realizar en un autoclave, equipo que consiste en un recipiente que se cierra herméticamente contenido agua, ésta se calienta, ebulle y genera vapor, así se eleva la presión a 1,1 atmósfera, en estas condiciones el agua ebulle a más alta temperatura, es decir a 121 °C. Cuando una muestra es expuesta a estas condiciones por espacio de 20 minutos se eliminan todas las células vegetativas, pero también las esporas que desarrollan *Bacillus* y *Clostridium*.

Las muestras de suelo se suelen esterilizar por radiación ionizante que es la más eficiente; ésta elimina a los microorganismos sin alterar la matriz del suelo, que es modificada notablemente a alta temperatura con vapor. La radiación ionizante basa su modo de acción en que destruye las uniones a nivel del material genético de los microorganismos. Otro método que suele utilizarse para trabajar con suelos estériles es la tindalización; este proceso consiste en exponer una muestra de suelo tres veces consecutivas a 80 °C durante 20 minutos, luego de lo cual la muestra se deja en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas. Este procedimiento se repite tres veces, porque el calentamiento a 80 °C elimina las células vegetativas y en el tiempo de descanso que es de 24 horas germinan las esporas de la muestra; se calcula que en la tercera repetición se han eliminado todas las esporas presentes en la muestra.

Otro método de esterilización es por filtración, se basa en excluir por tamaño y ésta es una de las razones porque un tubo de ensayo contenido bacterias se tapa con algodón, la trama del algodón presionado en un tapón genera un filtro que deja que ocurra el intercambio de aire, pero los microorganismos quedan retenidos en el algodón. La filtración es un método muy utilizado para esterilizar fluidos como el aire y líquidos como soluciones que se pasan por membranas filtrantes con tamaños de poros de 0,22 ó 0,45 µm lo que impide el paso de las bacterias que quedan retenidas en los filtros.

Otro tipo de esterilización es con compuestos químicos como por ejemplo el óxido de etileno o bromuro de metilo, gases que eliminan a los microorganismos de las muestras tratadas. El óxido de etileno bloquea puntos moleculares críticos que inhiben la interacción de las moléculas en los procesos metabólicos y reproductivos, y así se produce la muerte celular. Por otro lado, el bromuro de metilo, producto que fue prohibido por su acción sobre la capa de ozono, bloquea procesos relacionados con la producción de ATP y otras reservas energéticas. El óxido de etileno es muy utilizado para esterilizar por ejemplo jeringas plásticas, entre otras cosas.

Otro proceso que controla la cantidad de bacterias es la pasteurización; este proceso que fue desarrollado originalmente por Luis Pasteur. Es un proceso frecuentemente utilizado para eliminar a los organismos patógenos y reducir la carga microbiana de microorganismos que afectan la calidad de ciertos productos por ejemplo el vino o la leche.

La leche es un medio muy rico en el que desarrollan las bacterias y por eso se suele pasteurizar, de esta manera se reduce la carga microbiana alargando la vida del producto y al mismo tiempo se eliminan microorganismos patógenos que suelen ser sensibles a la temperatura.

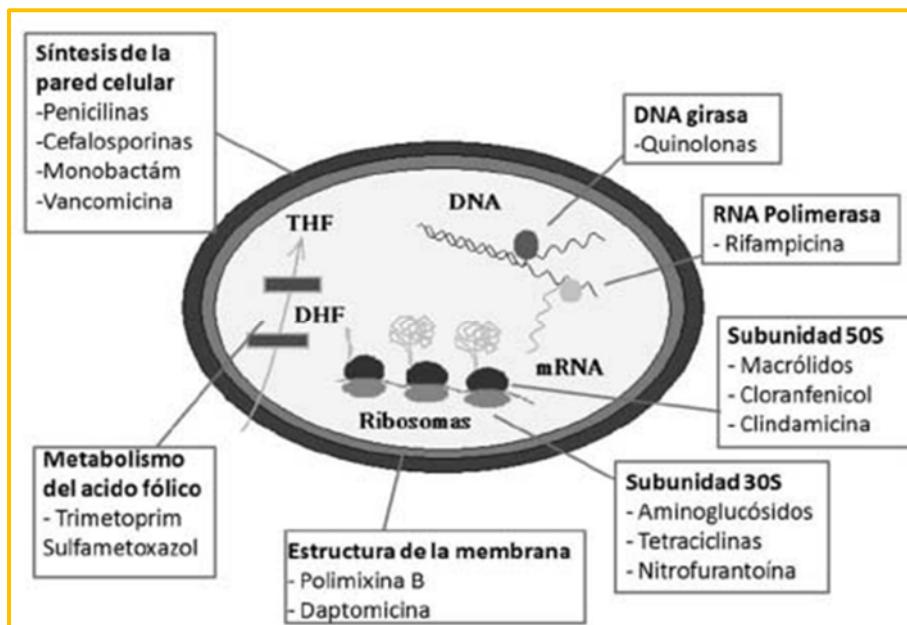
El crecimiento microbiano también se controla con productos químicos, algunos de éstos son compuestos que eliminan microorganismos y en ese caso su denominación posee el sufijo -cida como bactericida o fungicida, es decir son compuestos que eliminan bacterias y hongos, respectivamente. Otros compuestos químicos detienen el crecimiento microbiano y para su denominación se utiliza el sufijo -stático, así se dispone de bacteriostáticos y fungistáticos, que son productos que solo impiden la multiplicación de bacterias y hongos respectivamente. Estos productos químicos que controlan el crecimiento microbiano pueden actuar como antisépticos o desinfectantes. Mientras que los primeros son los que se utilizan para eliminar microorganismos en tejidos vivos, los desinfectantes se utilizan en superficies inertes. Muchas veces la concentración con que se utiliza el compuesto permite utilizarlo como antiséptico o como desinfectante.

Otra forma de controlar el crecimiento microbiano es con los antibióticos que son moléculas que sintetizan diversos organismos en la naturaleza que inhiben el crecimiento de ciertos organismos en los ambientes en los que conviven y compiten por nutrientes y espacios. Por ejemplo, los actinomicetas (organismos procariotas) y los hongos son productores de diferentes tipos de antibióticos. Estos metabolitos que previenen el crecimiento de microorganismos inhiben procesos metabólicos clave que solo se encuentran presentes en algunos grupos definidos. En este sentido, es interesante destacar que las bacterias tienen una síntesis bacteriana distinta a

las de las células eucariotas, son los únicos microorganismos que tienen peptidoglicano constituyendo la pared y tienen una RNA polimerasa distinta a los eucariotas, entre otras cosas. Por eso hay antibióticos, que no afectan el funcionamiento de las células eucariotas debido a que inhiben el crecimiento microbiano actuando sobre la síntesis de pared, o sobre la síntesis de RNA polimerasa, o la síntesis proteica o la síntesis de ácido fólico, compuesto que no es sintetizado por los organismos eucariotas.

En lo que hace al crecimiento de microorganismos para su estudio o multiplicación en el laboratorio o en emprendimientos productivos es claro que se debe generar un medio de cultivo que provea al microorganismo de todos los elementos necesarios para su crecimiento, lo que además debe ser acompañado de las condiciones ambientales. Hay dos grandes grupos de medios, los complejos e indefinidos que contienen una o más fuentes de nutrientes cuya composición exacta no se conoce, en los que la bacteria crece y se multiplica. Por otro lado, existen medios sintéticos definidos químicamente, cuya composición se conoce con precisión ya que se formula con drogas puras. Otra forma de clasificar a los medios de cultivo es en medios generales y medios selectivos; un medio general contiene una riqueza tal de nutrientes que permite el crecimiento de un amplio espectro y diversidad de microorganismos. El medio selectivo en cambio contiene algún componente que permite el crecimiento de un conjunto de organismos específicos y previene o inhibe el crecimiento de otros. Si bien es claro que cada vez que intentamos cultivar un microorganismo estamos seleccionando, porque es imposible generar un medio universal que no restrinja el crecimiento de algún microorganismo. Por otro lado, existen los medios diferenciales que como su nombre lo indica son medios que tienen una composición que si bien permite el crecimiento de varios microorganismos permite diferenciarlos por la apariencia o color que toman en el medio de cultivo.

Figura 1.12

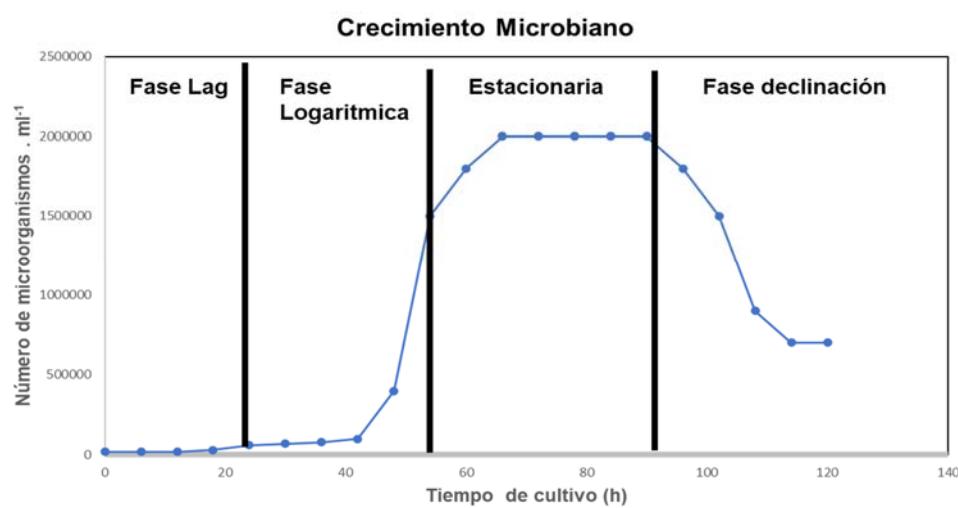


Nota. Sitios de acción de los antibióticos o antimicrobianos-.

Crecimiento microbiano en lotes

Las bacterias se pueden multiplicar por medio de diversas estrategias lo que está relacionado con la disponibilidad de equipos y con conocer las condiciones de crecimiento de los microorganismos. Una de las formas de cultivar microorganismos es en Bach (lote). En este caso se formula un medio de cultivo, que se coloca en un recipiente como un Erlenmeyer y se esteriliza, luego de lo cual se inocula con una especie bacteriana. La bacteria se nutre del medio, se replica por fisión binaria y multiplica, lo que se advierte porque el medio se vuelve turbio. En las etapas tempranas el crecimiento es logarítmico, lo que cambia a medida que evoluciona el proceso de crecimiento. La multiplicación bacteriana se determina en base al tiempo de duplicación o tiempo de generación, que se define como el tiempo que le toma al microorganismo para duplicar su número. Cuando las bacterias se cultivan en un recipiente cerrado como el mencionado, el crecimiento muestra una **fase lag**, en la que las bacterias no se multiplican activamente porque se están adaptando a las nuevas condiciones de cultivo. Ésta es seguida de una **fase logarítmica**, en la que en un espacio de tiempo cada vez menor la población se duplica y por eso crece exponencialmente, siendo su aumento logarítmico. A esto le sigue una **etapa estacionaria** que se asocia a una situación en la que debido al consumo de los nutrientes del medio por la población obtenida y/o a la acumulación de sus desechos celulares tóxicos, se limita la multiplicación bacteriana. En esta fase no se produce aumento ni disminución netos del número de células, de modo que la velocidad de crecimiento de la población es cero. Por último, se define la **fase de declinación** o de muerte de las bacterias.

Figura 1.13

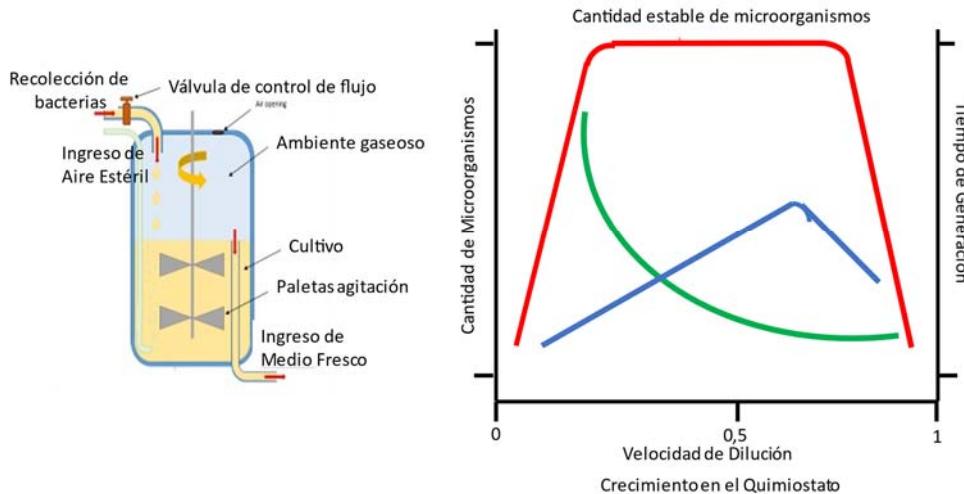


Nota. Curva de crecimiento modelo de microorganismos en las que se delimitan las fases del crecimiento

Crecimiento bacteriano continuo

Este tipo de cultivo se realiza en equipos conocidos como quimiostatos o turbidostatos que son unidades para multiplicar grandes cantidades de organismos en forma continua. En ellas, ingresa medio estéril a lo largo de todo el proceso de producción bacteriana y esto va acompañado de la colecta de células bacterianas. Es decir que el sistema dispone de un recipiente que provee de nuevo medio y otro donde se colecta la producción bacteriana, procesos que están regulados sincrónicamente para evitar que se produzca un efecto de dilución. Estos dos equipos, el quimiostato y el turbidostato se diferencian por el parámetro que se utiliza para regular el ingreso de medio y el egreso de bacterias. En el caso del quimiostato, se utiliza un medio que contiene un elemento en concentración limitante para el crecimiento, y su disponibilidad sólo se incrementa ingresando más medio de cultivo. Cuando queremos incrementar la velocidad de crecimiento del organismo en cultivo debemos aumentar el ingreso de medio y así se reduce el tiempo de generación, hasta un momento en que el exceso de ingreso de líquido tiene un efecto de dilución del cultivo (Figura 1.14.). En contraposición, el turbidostato, que es un equipo esencialmente similar, utiliza medio de cultivo completo, pero el crecimiento de las bacterias se regula en base a la densidad óptica.

Figura 1.14



Nota. Esquema de un fermentador con sus distintas partes y curvas de crecimiento, dilución y tiempo de duplicación en un quimiostato. La línea roja de la curva representa el crecimiento microbiano. La línea verde el tiempo de generación y la línea azul la velocidad de dilución.

En estos dos equipos se realiza un control permanente de la temperatura (termómetro), del pH del medio (electrodo de pH) y de la presencia de oxígeno en el medio (electrodo de oxígeno).

En base a lo expuesto es claro que resulta importante medir el crecimiento microbiano. Una forma de hacerlo es con el método de las diluciones que consiste en tomar una muestra del

cultivo, hacer una serie de diluciones de las que luego se siembra una alícuota. Multiplicando el número de bacterias obtenido por un coeficiente que proviene de las diluciones realizadas se estima al número real de bacterias presentes.

Otra manera de estimar el crecimiento microbiano es tomar una muestra del cultivo bacteriano y colocarla en una cámara de Neubauer o de Petroff Hauser. Estas contienen un volumen conocido y el campo dividido en cuadrículas. El número de células en una determinada área de la cuadrícula se corresponde con un determinado volumen, lo que multiplicado por la dilución permite conocer el número de células, si bien algunas pueden estar muertas es decir este método no excluye las células muertas. Otro procedimiento que se puede realizar es determinar la transmitancia o la absorbancia de una suspensión de bacterias; la absorción será una relación directa con la cantidad de bacterias presentes en suspensión que interceptan la luz. Junto con esta determinación se debe realizar una calibración con cada aislado bacteriano porque las bacterias difieren en tamaño y forma. La calibración consiste en sembrar las mismas diluciones que se leen en el espectrofotómetro y hacer el recuento de bacterias. Una vez que el método fue puesto a punto, es decir se construye una curva de calibración absorbancia versus números de colonias, con una sencilla determinación espectrofotométrica podemos estimar el crecimiento microbiano.

Referencias

- Cepero de García, M. C., Restrepo Restrepo, S., Franco Molano, A. E., Cárdenas Toquica, M., Vargas Estupiñán, N. (2012). *Biología de los hongos*. Medellín: Universidad de los Andes. 497 pp.
- Mardigan Michael T., John M. Matinko, Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley, David A. Stahl (2015). *Biología de los Microorganismos* 14 Edición.
- Sylvia, D. M., Hartel, P. G., Fuhrmann, J. J. y Zuberer, D. A. (2005). *Principles and applications of soil microbiology, 2nd ed.* New Jersey: Pearson Prentice Hall.

CAPÍTULO 2

El suelo como ecosistema

Virginia Martínez Alcántara

Introducción

El suelo es un cuerpo natural de la superficie terrestre compuesto por una fracción mineral (arena, limo y arcilla), materia orgánica, agua y gases (Figura 2.1); que se caracteriza por presentar capas u horizontes. Cada una de estas capas, tiene diferentes características (composición mineral, cantidad de materia orgánica, entre otras) que se distinguen del material parental (rocas y minerales originarios) debido a que son el producto final de la influencia del tiempo, el clima, la topografía y la actividad de los organismos y del ser humano. El horizonte superior del suelo, el orgánico, es el que sufre la influencia más importante de la actividad humana y es a partir del cual los nutrientes lixivan hacia las capas inferiores.

Figura 2.1



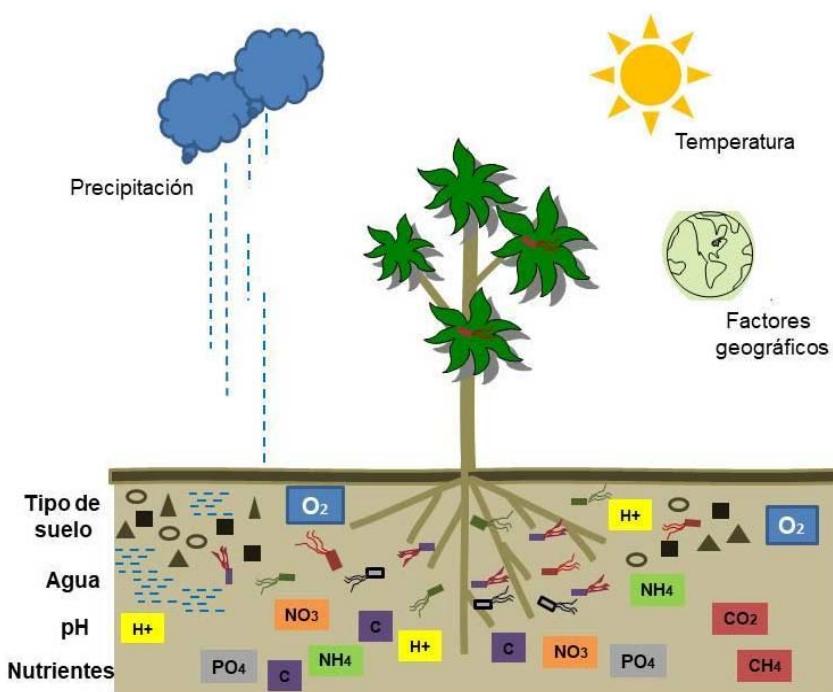
Nota. Composición aproximada del suelo y detalle de las fracciones que constituyen la materia orgánica. Adaptada de FAO, 2022.

El suelo cumple funciones esenciales para la producción agrícola como, entre otras, dar sustento a las raíces de las plantas, suministrarles nutrientes y agua y, regular el ciclo del carbono y de otros elementos. Como todo ecosistema, está formado por una comunidad de organismos, entre ellos los microorganismos, que interactúan entre sí y con las condiciones físicas y químicas del ambiente.

Los factores abióticos

Los principales factores abióticos del suelo, que afectan y regulan las poblaciones de microorganismos del suelo, incluyen: el tipo de suelo (textura y estructura), la materia orgánica y los nutrientes, el agua, la aireación, la temperatura, el pH, los factores climáticos (temperatura, precipitación) y los factores geográficos (latitud y longitud). En la Figura 2.2 se resumen los factores abióticos que influencian el crecimiento y la diversidad de los microorganismos, los que se tratarán a continuación.

Figura 2.2



Nota. Factores abióticos que influyen a las poblaciones microbianas. Adaptada de Santoyo et al., 2017

Materia orgánica y nutrientes

La materia orgánica del suelo (MOS) comprende todos los compuestos orgánicos presentes en el suelo, y está constituida por distintas fracciones: los organismos vivos, los residuos de plantas y animales frescos, y en descomposición (fracción activa) y sustancias complejas llamadas humus (FAO, 2022).

El humus está formado por compuestos orgánicos que han sido modificados por la actividad microbiana y constituye la fracción más estable, ya que es resistente a la descomposición y se mineraliza muy lentamente.

La materia orgánica muerta tiene efectos en las propiedades físicas y químicas del suelo y su cantidad regula el ciclo de los nutrientes esenciales como el nitrógeno (N), el carbono (C) y el fósforo (P) y la disponibilidad de nutrientes dependiendo de la mineralización. Estos nutrientes influyen en el crecimiento de las plantas y en la diversidad, la abundancia y el crecimiento de los microorganismos.

Tipo de suelo

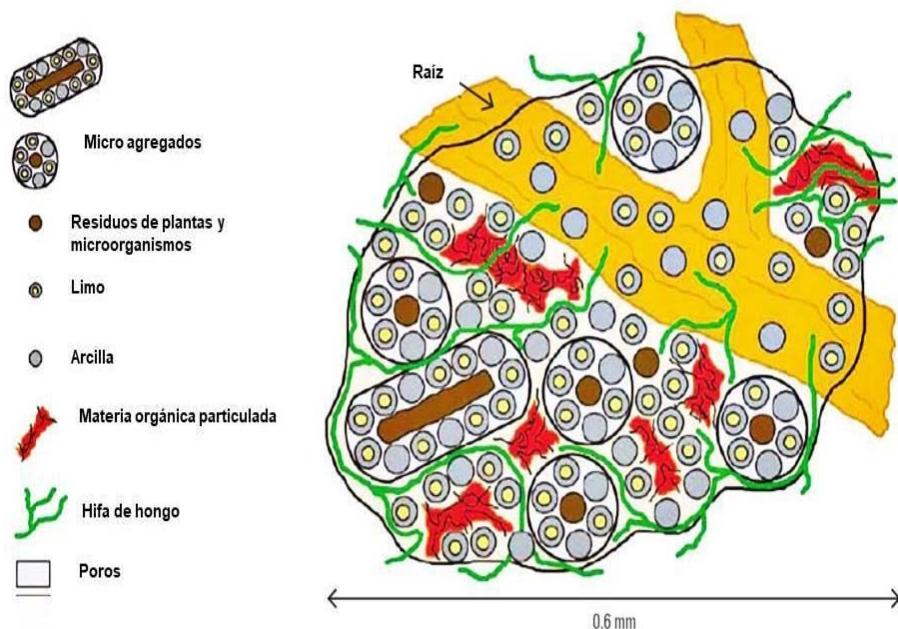
La fracción mineral está definida por la proporción de arena, limo y arcilla, que se diferencian entre sí por el tamaño de las partículas. Las proporciones en que estas se encuentran en los suelos determinan su **textura**, que influye en la porosidad o tamaño de los poros, el movimiento y la disponibilidad de agua y de aire y en la retención de nutrientes. La red de poros del suelo contribuye a su aireación o ventilación. Un aumento en el contenido de agua del suelo a menudo provoca una reducción en su aireación, ya que la difusión del oxígeno es 10.000 veces más rápida en el aire que en el agua.

Cuando los grupos de partículas minerales se adhieren fuertemente unas con otras, estos grupos forman agregados que le confieren al suelo su **estructura**. Los agregados están formados por las partículas minerales, la materia orgánica que aglutina las partículas de suelo formando complejos de materia orgánica y minerales en el suelo y poros. Los agregados pueden variar entre 0,5 a 5 mm de diámetro y se clasifican de acuerdo a su tamaño en: microagregados (< 250 mm de diámetro) y macroagregados (0,25 mm a 2 mm de diámetro). Dependiendo de su forma (redondeada, poliédrica, prisma u otras) definen la estructura del suelo, la que regula el intercambio gaseoso, la infiltración y el movimiento del agua y la penetración de las raíces, entre otros aspectos (Figura 2.3).

Los microorganismos del suelo suelen agruparse formando microcolonias en los poros del suelo o biopelículas sobre las partículas minerales, la MOS y las raíces. Ellos juegan un rol clave en la agregación del suelo uniendo las partículas, ya sea por la producción de exopolisacáridos o como en el caso de los hongos, a través de las hifas o por la producción de gomas y mucilagos como material cementante, permitiendo que el agua se infiltre y se retenga con mayor facilidad. Por otra parte, las prácticas de labranza del suelo también influyen en la agregación.

Agua

El agua, tiene efectos en las comunidades de microorganismos del suelo y en los procesos microbianos. Mientras que algunos microorganismos y procesos toleran el estrés hídrico por falta de agua, otros no. Por otro lado, una reducción en el contenido de agua del suelo limita el movimiento de los microorganismos.

Figura 2.3

Nota. Representación gráfica de un agregado. Adaptada de FAO, 2022

Oxígeno

El oxígeno, que proviene de la atmósfera desde donde ingresa al suelo principalmente por difusión, generalmente disminuye con la profundidad e incide en la distribución de los organismos del suelo. La aireación o grado de oxigenación del suelo, depende no solo de la humedad del suelo sino también de su textura y porosidad, por ejemplo, un suelo con alto contenido de arcillas tendrá un alto porcentaje de poros pequeños, lo que resultará en una difusión más lenta y el suelo estará poco aireado. En un suelo aireado, el oxígeno es utilizado por el proceso respiratorio de las raíces de las plantas y los microorganismos aerobios que oxidan los compuestos orgánicos a CO₂. Cuando en un suelo se detectan altos niveles de CO₂, que proviene de la respiración de los microorganismos, los animales del suelo y las raíces de las plantas, se desarrollarán microorganismos anaerobios facultativos, microaerófilos y anaerobios estrictos, según la tensión de oxígeno presente.

Temperatura

La temperatura influye en los procesos biológicos, físicos y en las reacciones químicas que ocurren en el suelo, las que suelen duplicarse cuando se producen aumentos de 10°C. La temperatura del suelo disminuye con la profundidad, si bien también se reducen sus grandes variaciones respecto de la superficie del suelo en la medida en que aumenta la profundidad.

Además, los cambios de temperatura en el suelo son moderados por el agua, debido a su alto calor específico. Cuando la profundidad es importante, el suelo se mantiene a una temperatura distinta a la atmosférica en la superficie y además es constante en el tiempo.

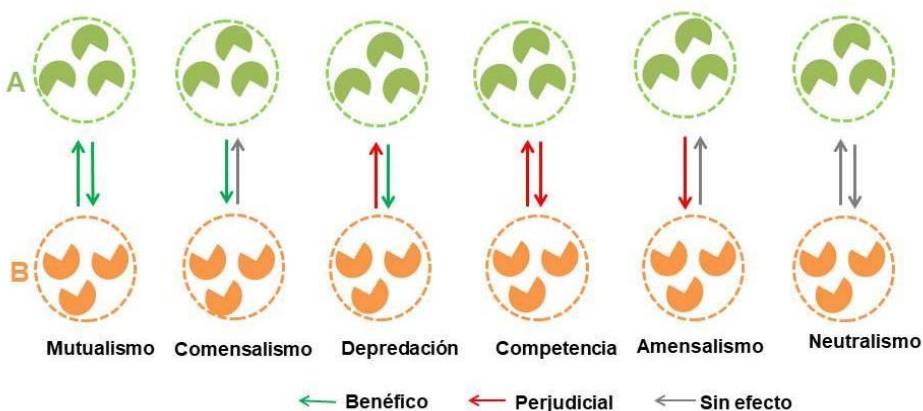
pH

Entre las características químicas del suelo el pH es muy importante, ya que afecta a las plantas y a los microorganismos del suelo que prefieren los suelos con un rango de pH cercano a la neutralidad (pH6 a pH7), en el que los nutrientes se encuentran disponibles para su crecimiento. La actividad de los microorganismos y de las plantas también pueden alterar el pH, estos últimos debido a la producción de ácidos orgánicos tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas o produciendo H⁺ por oxidación de otros compuestos como el amonio o los sulfuros.

Los factores bióticos

Los microorganismos del suelo son numerosos y diversos, se estima que las bacterias alcanzan 10⁸ (100 millones) de individuos por gramo de suelo y quizás unas 10³ a 10⁶ especies dependiendo de las estimaciones de distintos autores. El suelo puede contener más de 1.000 kg de biomasa microbiana por hectárea, de la cual la biomasa de bacterias y hongos del suelo es unas 10² a 10⁴ veces mayor a la de otros microorganismos, aunque los hongos representan una mayor biomasa total del suelo que las bacterias. Entre los factores bióticos que influencian a los microorganismos se encuentran las especies de plantas, las interacciones entre los microorganismos del suelo y las interacciones microbio-planta. En la naturaleza, los microorganismos se encuentran en comunidades complejas compuestas por múltiples poblaciones que sobreviven y prosperan debido a las interacciones metabólicas entre ellas y con las condiciones abióticas. Las interacciones biológicas dependen de las poblaciones que conforman la comunidad y pueden ser: positivas o estimuladoras (mutualismo y comensalismo), negativas o inhibitorias (competencia, amensalismo), positivas para una población, pero negativas para la otra (depredación) o neutrales, donde no hay ningún efecto en las poblaciones que interactúan.

En la Figura 2.4 se muestran los efectos de las interacciones básicas entre dos poblaciones (A y B) de microorganismos.

Figura 2.4

Nota. Tipos de interacciones entre dos poblaciones (A y B). Adaptada de Che, S., & Men, Y., 2019.

El **mutualismo** se refiere a una relación que ocurre a través del intercambio de productos metabólicos o de nutrientes, lo cual es beneficioso para ambas poblaciones y donde cada una de ellas necesita de la otra para sobrevivir. Algunos ejemplos de mutualismo son: la utilización continua de un compuesto por la población A para su crecimiento es dependiente de la población B, que vive de un intermediario metabólico de A. La población A degrada compuestos específicos para su crecimiento, cuando los metabolitos son mantenidos en bajos niveles por B al consumirlos. En la detoxificación, una población B es alimentada con los metabolitos excretados por A, mientras que A se beneficia por la eliminación de sus metabolitos tóxicos. En otro enfoque, un organismo A le provee a B sustratos esenciales, mientras que B ofrece un hábitat protegido, como ocurre en las biopelículas. Otro ejemplo son las relaciones simbióticas.

En el **comensalismo** la interacción es positiva en una dirección, un miembro se beneficia y el otro no es afectado ni positivamente ni negativamente. Se produce cuando la población no perjudicada modifica el hábitat, durante su crecimiento y metabolismo, adecuándolo a las necesidades de la otra población. Por ejemplo: un organismo remueve un compuesto perjudicial para el crecimiento de otro, como en el caso en que los organismos aerobios disminuyen la concentración del oxígeno y permiten el desarrollo de organismos anaerobios en la proximidad, en microambientes predominantemente aeróbicos. El comensalismo es la base que sustenta la mayoría de los ciclos de los nutrientes, por ejemplo, las bacterias oxidantes del amonio transforman el amonio en nitrito, que es el sustrato específico de las bacterias que lo oxidan.

Cuando el crecimiento de una población se ve afectado por el crecimiento de otra que la consume, se denomina **depredación** y la dinámica de ambas poblaciones generalmente muestra continuas oscilaciones. La depredación actúa como un regulador natural de las poblaciones microbianas. Al limitar el crecimiento descontrolado de algunas especies, evita que se agoten los recursos del ambiente. Entre los principales depredadores de las bacterias se encuentran los protozoos ciliados, los flagelados y otros, que se alimentan de ellas en el suelo y en ambientes acuáticos.

La **competencia** ocurre cuando dos poblaciones necesitan el mismo recurso limitado o escaso como los nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo y otros) o el espacio (sitios de colonización en superficies o en los tejidos de las plantas o la rizósfera, entre otros), con efecto negativo en ambas, ya que el crecimiento de ambas se verá perjudicado. Aunque una población "gane" eventualmente la competencia y la otra sea eliminada (exclusión competitiva) o finalmente coexistan, durante la competencia ambas sufren costos como su menor tasa de crecimiento.

El **amenazamiento** (antagonismo) es una interacción unidireccional, en la que el crecimiento de una población es afectado por la producción y la acumulación de compuestos tóxicos o inhibitorios de la otra. Un ejemplo, son los microorganismos biocontroladores que producen compuestos antimicrobianos.

El **neutralismo** implica la falta de interacción entre dos poblaciones microbianas. Ocurre cuando dos poblaciones consumen diferentes sustancias (divergencia nutricional) y ninguna produce compuestos inhibidores para la otra.

La diversidad de funciones y rutas metabólicas que poseen las distintas poblaciones en una comunidad en las que se dan asociaciones cooperativas, como el mutualismo y el comensalismo, permite a las poblaciones coexistentes reciclar los nutrientes de manera eficiente y reducir la formación de subproductos, incluyendo aquellos tóxicos o inhibitorios. Además, permitiría a las comunidades microbianas realizar funciones complejas más eficientemente que las poblaciones individuales y puede facilitar su supervivencia en entornos subóptimos, que carecen de sustratos fácilmente disponibles y/o hay compuestos tóxicos presentes.

Con base en las interacciones ecológicas que se dan en la naturaleza, las comunidades tienen distintas aplicaciones biotecnológicas, como la biorremediación de sitios contaminados (ver capítulo 11).

Además de las interacciones bacteria-bacteria, las interacciones beneficiosas planta-microbio son de especial interés, ya que se pueden aprovechar con el fin de mejorar y promover el crecimiento y la sanidad de las plantas.

La rizósfera

La rizósfera es la estrecha zona del suelo que se encuentra muy próxima a la raíz influenciada por los exudados de las raíces de las plantas (Figura 2.5). Es una zona rica en compuestos de origen vegetal y microbiano, en la que los microorganismos no solo se encuentran en altas concentraciones, sino que además tienen una mayor actividad e interactúan con las plantas. En la rizósfera se distingue el rizoplano, que se corresponde con la lámina de suelo en contacto íntimo con la superficie de las raíces.

Figura 2.5

Nota. Rizósfera. Adaptada de Bulgarelli et al., 2013

El suelo de la rizósfera tiene condiciones fisicoquímicas distintas a las del suelo circundante y allí los microorganismos encuentran abundantes cantidades de compuestos orgánicos excretados por las plantas que estimulan su actividad, la que disminuye, en una distancia de algunos milímetros, a medida que los microorganismos se alejan de la raíz.

Este micro ecosistema está compuesto por poblaciones microbianas que pueden interactuar de manera beneficiosa, dañina o neutral con las plantas. Es un ecosistema con una alta diversidad microbiana, lo que lo hace interesante como fuente de descubrimiento de nuevos taxa y de material genético con potencial biotecnológico.

Los microorganismos que habitan en la rizósfera son estimulados por los compuestos que excreta la raíz (metabolitos secundarios) y ellos sintetizan y liberan metabolitos que benefician a las plantas como: vitaminas, antibióticos, hormonas reguladoras del crecimiento vegetal, compuestos con capacidad antifúngica y antibacteriana. También promueven la formación de agregados del suelo porque liberan sustancias como gomas, exopolisacáridos y otros polímeros. Además, la rizósfera es una fuente de microorganismos que pueden ingresar al interior de las plantas.

Las raíces de las plantas tienen efectos directos e indirectos sobre las comunidades microbianas y su actividad. Los exudados de las plantas consisten predominantemente en ácidos orgánicos y azúcares, pero también incluyen aminoácidos, hormonas, vitaminas, flavonoides y compuestos antimicrobianos.

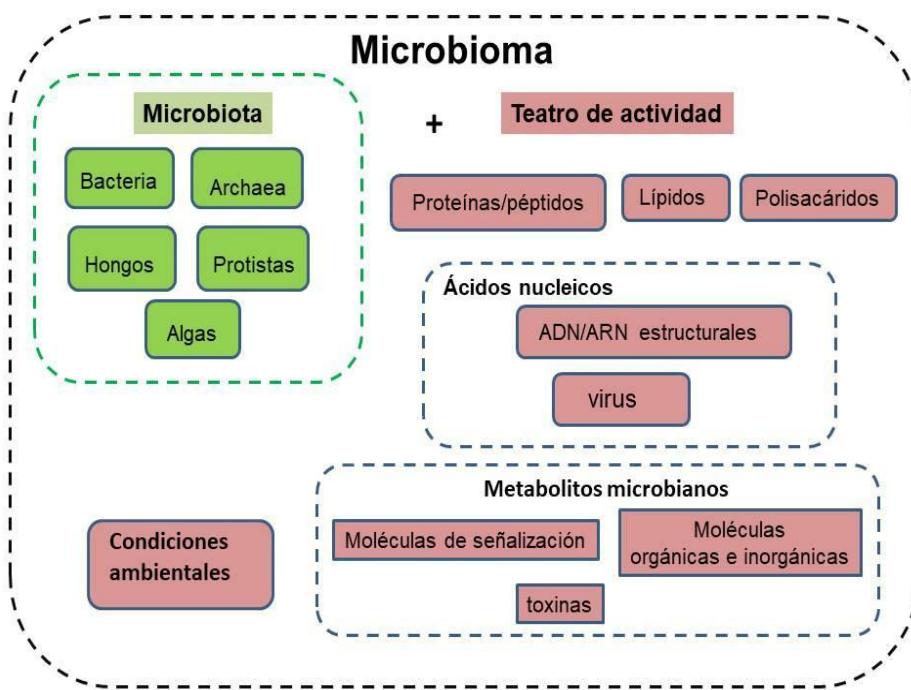
Es importante destacar que las especies y cultivares de plantas liberan distinta cantidad y tipo de compuestos orgánicos y esto, además, depende de otros factores como las condiciones ambientales, la edad y el estado fenológico de la planta, si es herbácea o leñosa, entre otros.

Entre los efectos indirectos se encuentran: las modificaciones que ejercen sobre el pH, la disponibilidad de nutrientes por su absorción y las condiciones redox. Además, la descamación de las células epidémicas de la raíz facilita el ingreso y la colonización de los microorganismos en el interior de los tejidos de las plantas, los que se conocen como microorganismos endófitos. Otros efectos indirectos son las alteraciones en las condiciones físicas de los suelos como en: la estructura, la disponibilidad de agua debido a su absorción y la composición de la atmósfera del suelo mediante la respiración que incorpora CO₂. Modifican también el componente biológico del suelo, intensificando las interacciones microbianas como el sinergismo y el antagonismo y entre las plantas y los microorganismos.

Otros ambientes particulares para las comunidades microbianas, que también son importantes para el desarrollo de las plantas son: la filósfera, es decir la superficie de las hojas, la espermatósfera o volumen de suelo que es influenciado por los exudados y descamaciones de las semillas y la endósfera: los tejidos del interior de las plantas. Los microorganismos capaces de colonizar y sobrevivir dentro de los tejidos internos de las plantas se conocen colectivamente como microorganismos endófitos.

El microbioma del suelo y de las plantas

Los microorganismos del suelo, conocidos también como la microbiota del suelo o comunidad de microorganismos, incluyen a las bacterias, los hongos, las algas y los protozoos que habitan en el suelo. El microbioma del suelo (Figura 2.6) se refiere a la comunidad microbiana y su teatro de actividad, que incluye sus genes, elementos genéticos móviles (virus, transposones), el ADN extracelular derivado de células muertas, elementos estructurales microbianos (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, polisacáridos), metabolitos y las condiciones ambientales circundantes. El microbioma forma un micro-ecosistema dinámico, propenso a cambiar con el tiempo y el espacio en apenas en centímetros, dado que varía con la heterogeneidad del suelo, es decir que no hay un microbioma típico del suelo.

Figura 2.6

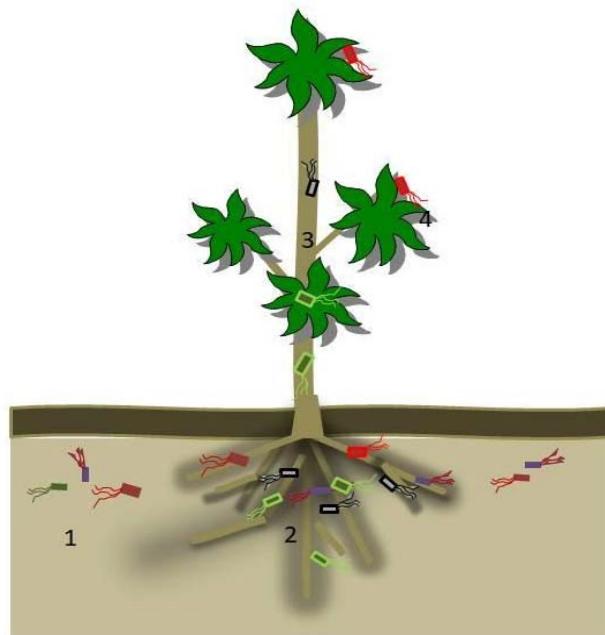
Nota. Esquema del microbioma. Adaptado de Berg et al., 2020

El microbioma, también está integrado en macro-ecosistemas ya sea en huéspedes eucariotas o considerando distintas escalas espaciales del terreno. En este sentido, la planta se considera como una entidad mayor denominada microbioma vegetal o fitobioma, que comprende la planta, los microorganismos asociados y su entorno. si bien las poblaciones microbianas que habitan en el interior de las plantas se originan mayormente en la rizósfera, difieren de estas en su composición, función y diversidad. La Figura 2.7 muestra las principales zonas involucradas en las interacciones planta-microbio.

Como los microorganismos, las plantas y el entorno del suelo están interconectados, es clave considerarlos de manera integrada para lograr un manejo del microbioma de las plantas con el fin de mantener altos niveles de productividad y agroecosistemas sostenibles.

Entre las estrategias de manejo del microbioma de la planta se destacan: a) la introducción de microorganismos en un sistema existente (la inoculación de una cepa microbiana o de consorcios y la trasferencia de microbiomas completos), b) la selección de prácticas agrícolas que mejoran las comunidades microbianas residentes en el suelo, a través de la modificación del ambiente del suelo y c) el mejoramiento de la planta.

Figura 2.7

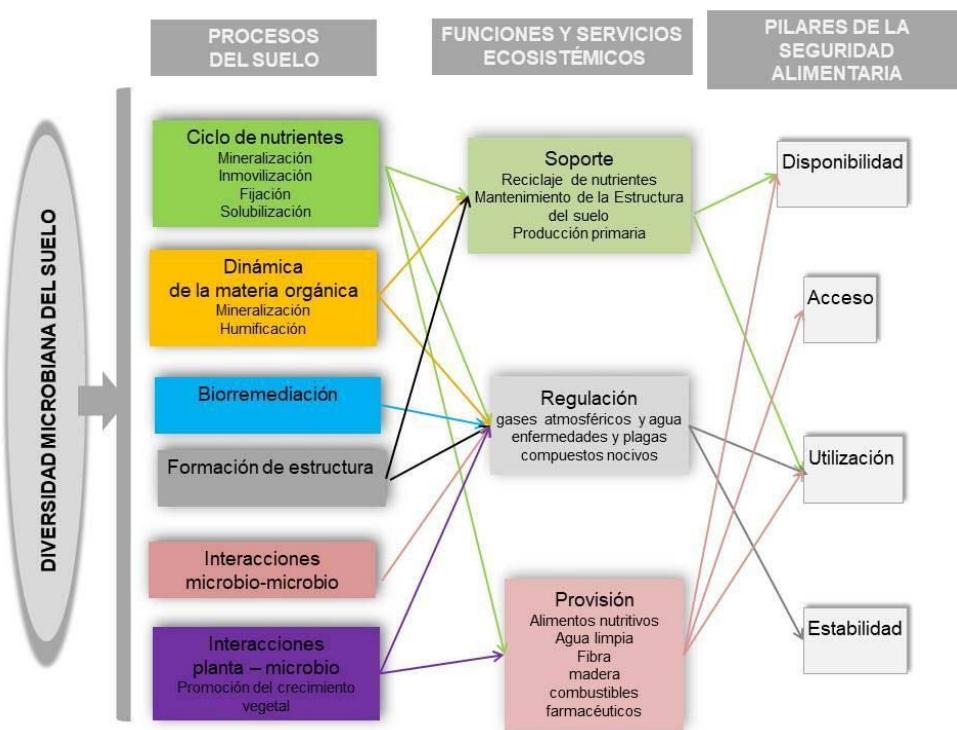


Nota. Principales zonas involucradas en las interacciones planta-microbio: (1) Suelo fuera de la rizósfera, (2) Rizósfera, (3) Endósfera, (4) Filósfera. Adaptada de Orozco-Mosqueda et al., 2018.

Diversidad microbiana del suelo y su importancia en los ecosistemas

En las últimas décadas, varios estudios comenzaron a reconocer el papel clave de los microorganismos en los ecosistemas naturales y manejados, dado que los microorganismos exhiben una gran diversidad de funciones que regulan los ecosistemas. Ellos contribuyen a la producción agrícola y además garantizan la prestación de importantes servicios ecológicos (beneficios que proporcionan los ecosistemas a los seres humanos), que satisfacen las necesidades de los productores agrícolas y de la sociedad en general (Figura 2.8).

La conservación de la biodiversidad del suelo en los sistemas agrícolas o la inducción de cambios en la misma a través de insumos como los productos biológicos basados en microorganismos y las prácticas de producción que tengan efectos positivos en la diversidad microbiana del suelo, contribuye a reducir la dependencia de los agroquímicos, su impacto ecológico y los costos de producción, conduciendo a la sostenibilidad de la producción agrícola.

Figura 2.8

Nota. Relación entre la biodiversidad microbiana del suelo y las cuatro dimensiones de la seguridad alimentaria a través de su rol en varias funciones de los ecosistemas y la provisión de servicios ecosistémicos. Adaptada de FAO, 2022

El rol de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos

Las comunidades microbianas del suelo llevan adelante procesos metabólicos claves para los ecosistemas, uno de ellos es dinamizar los minerales del suelo, gran parte de los cuales son nutrientes esenciales para los microorganismos y las plantas. En este sentido el impacto de la actividad microbiana es particularmente importante en el reciclaje del carbono (C) del nitrógeno (N), del azufre (S), del fósforo (P) y del hierro (Fe), si bien en el caso de estos dos últimos elementos no se conforma un ciclo completo. En el suelo, estos elementos nutren a las plantas que son la fuente de alimento de los animales herbívoros. De este modo, el ciclo global de nutrientes afecta la sanidad de las plantas y de los animales. En cualquier caso, la actividad microbiana en los ciclos del C, del S y del N constituye el eje de los ciclos biogeoquímicos, que se refiere a la mineralización u oxidación y a la reducción y asimilación de C, N y S. Estos ciclos están regulados por la disponibilidad o el uso de la energía en el suelo y la tensión de oxígeno, lo que en realidad determina la importancia relativa de las diversas etapas que conforman los ciclos, modificando de esta manera el estado en que encontramos al C, el N, el S, el P y el Fe en el suelo.

Ciclo del carbono

En los inicios de la vida en la tierra el ambiente era reductor y los procesos ocurrían en ausencia de oxígeno. Un proceso clave que se desarrolló en los organismos vivos es la capacidad de atrapar la energía y almacenarla, de manera de utilizarla en otro momento. Esto es representado por la fotosíntesis (proceso que generó oxígeno y cambió el estado de la atmósfera que se volvió oxidativo), o la fijación autotrófica de CO₂ (consiste en atrapar la energía de la luz o de los compuestos inorgánicos en moléculas orgánicas, los azúcares). En la medida que se necesite esa energía se utiliza degradando los azúcares, lo que resulta en la liberación de energía y CO₂. Estos y otros procesos conviven en los suelos y hacen al balance de C y en definitiva al ciclo del mismo en el ambiente.

Los suelos representan la reserva de carbono más grande y más estable en los ecosistemas terrestres y contienen más del doble de carbono que la atmósfera. Los microorganismos del suelo contribuyen directamente al intercambio neto de C entre el suelo y la atmósfera, como se describió anteriormente.

La mayor parte de la materia orgánica de un suelo es aportada por los residuos de las plantas que contienen entre un 15 a un 60% de celulosa, un 10 a un 30% de hemicelulosa, un 5 a un 30% de lignina y un 2 a un 15% de proteínas. Las sustancias solubles como los azúcares, aminoazúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos representan hasta un 10% del peso seco y son metabolizados rápidamente por los microorganismos del suelo. Dado que la materia orgánica cumple un conjunto de funciones en el suelo, es importante mantener el nivel de la misma, por un lado en base al ingreso de fuentes frescas y por otro impidiendo las pérdidas de C.

En el suelo la materia orgánica se encuentra en un equilibrio dinámico a través de tres procesos distintos:

a) **La asimilación**, consiste en el secuestro del nutriente, en el caso del C, el mismo pasa a formar parte de compuestos orgánicos que los microorganismos utilizan para su crecimiento y desarrollo. Es decir que las formas inorgánicas CO₂ son asimiladas utilizando energía y poder reductor (ATP y NADPH), los azúcares o compuestos orgánicos se integran y forman parte de los compuestos orgánicos en la célula. Este secuestro temporal del elemento genera una carencia, que tiene una corta duración ya que está nuevamente disponible cuando los organismos mueren y se degrada la biomasa.

b) **La mineralización** consiste en la degradación de la materia orgánica que es transformada en sustancias inorgánicas, es decir que la mineralización del carbono consiste en la oxidación del C orgánico que se libera como CO₂ y la liberación de energía. Entonces, la transformación microbiológica de la materia orgánica del suelo es el resultado de procesos de mineralización que consiste en la oxidación de las formas orgánicas de carbono (catabolismo) y en la reducción del carbono (anabolismo), procesos que dependen de la disponibilidad de energía y de la tensión de oxígeno. Si bien solo se presentan los ciclos del C, N y S, todos los nutrientes del suelo se reciclan en el suelo en función de la disponibilidad de oxígeno y de energía en forma de ATP o poder reductor.

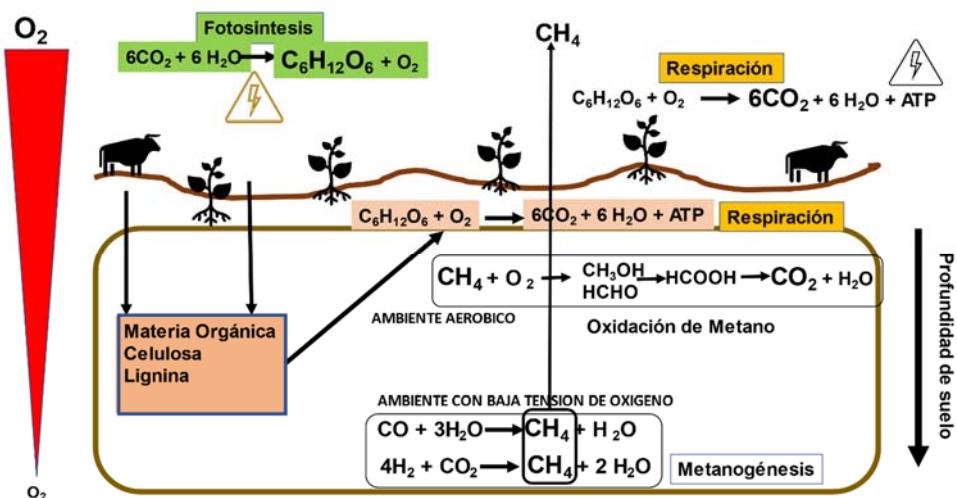
La mineralización de la materia orgánica en el suelo es el resultado de un conjunto de procesos simultáneos que ocurren en un ambiente oxidante, que consiste en la despolimerización de sustancias como la celulosa o la lignina liberando los monómeros que alimentan diversas vías metabólicas de los microorganismos como la fermentación y/o la respiración (aeróbica y/o anaeróbica). La ocurrencia de estos procesos depende de la presencia de microorganismos que intervienen específicamente en determinados procesos. Todos estos procesos demandan determinadas condiciones ambientales como es la tensión de oxígeno y el flujo de energía, todo lo cual impacta en la dinámica del C en el suelo.

c) **La humificación** consiste en la transformación de la materia orgánica en humus, principal reservorio de C en el suelo. El humus se define como una estructura, compleja, amorfa y resistente a la degradación. El proceso y los mecanismos de síntesis, así como la naturaleza de sus principales precursores se encuentran actualmente en análisis y discusión.

La **celulosa** es el principal componente de la pared de las células vegetales, es el compuesto orgánico más abundante de la biomasa vegetal que llega al suelo, junto con la hemicelulosa y la lignina. La celulosa es un polímero lineal de celobiosa (D-glucopiranósil- β -1,4-D-glucopiranosa).

En el suelo encontramos distintos grupos funcionales que mineralizan la materia orgánica. Los **celulolíticos** son microorganismos que degradan la celulosa, entre los que se encuentran bacterias aerobias y anaerobias, mesófilas, termófilas, hongos y protozoarios. Todos estos utilizan el C y la energía para su crecimiento y desarrollo. La mayor actividad celulolítica se da en ambientes aeróbicos, y solo un 5-10 % se lleva a cabo bajo condiciones anaeróbicas. Este proceso de degradación de compuestos orgánicos se conoce como **mineralización** y consiste en la conversión de la materia orgánica en dióxido de carbono (CO_2) y H_2O por los microorganismos del suelo a través de la descomposición y respiración (Figura 2.9). Los microorganismos del suelo degradan la biomasa o materia orgánica, por un proceso respiratorio que libera CO_2 cuando ocurre en alta tensión de oxígeno y CH_4 (metano) en baja tensión de oxígeno. La producción de metano ocurre en condiciones anaeróbicas, en las que el carbono es reducido a CH_4 como resultado de la respiración anaeróbica por las bacterias metanógenas que se encuentran en el suelo. Algunos grupos bacterianos como las bacterias metanotróficas utilizan el metano como fuente de C y energía (Figura 2.9)

Las comunidades microbianas del suelo median la conversión del tejido vegetal muerto y los compuestos orgánicos exudados de las raíces de las plantas en CO_2 y compuestos inorgánicos. La actividad microbiana también contribuye a la formación de complejos de materia orgánica – minerales (microagregados) que protegen físicamente al carbono orgánico de la degradación. La comprensión de las reacciones catalizadas por enzimas y las condiciones ambientales que controlan la transformación de varios compuestos de la MOS en compuestos húmicos de larga duración o microagregados altamente estables podría generar oportunidades para secuestrar grandes cantidades de carbono de manera que mejoren la calidad del suelo y beneficien al medio ambiente.

Figura 2.9

Nota. Ciclo Biogeoquímico del C. Transformaciones del C en el suelo como resultado de la disponibilidad de energía y de la tensión de oxígeno.

Es importante destacar que, la mineralización de la MO en el suelo no solo contribuye al flujo de energía en los suelos y al reciclaje de C, sino que además afecta la movilización de otros nutrientes como el N, el P y el S.

Factores que afectan la dinámica de la materia orgánica en el suelo

- Nitrógeno:** el N-inorgánico en forma de nitrato es clave para la degradación de la celulosa, ya que los microorganismos lo requieren para satisfacer sus necesidades (1 parte de nitrato por cada 35 partes de celulosa), por ello el crecimiento y la multiplicación de bacterias que degradan la celulosa asimilan (inmovilizan) el N del suelo, por lo que depende de la disponibilidad del mismo.
- Temperatura:** la asimilación y la mineralización del C depende de la temperatura debido a que son procesos catalizados por enzimas, si bien las mismas pueden pertenecer a diversas poblaciones microbianas, por eso el rango es muy amplio.
- Humedad y aireación:** el nivel hídrico del suelo condiciona la actividad de las comunidades microbianas porque influyen en la vida de los microorganismos y en la aireación del suelo.
- pH:** en condiciones de pH neutro conviven la mayoría de las poblaciones microbianas y en extremos de pH solo proliferan algunas.
- Relación carbono/nitrógeno:** esta relación permite estimar la velocidad en que se producirá el proceso de degradación. Las plantas contienen generalmente la misma cantidad de carbono (40% del peso seco), sin embargo, el contenido de N varía según la especie. Cuando la cantidad de N del sustrato adicionado es alta, los microorganismos encuentran satisfechas sus exigencias, se multiplican y degradan el sustrato rápidamente. Por el contrario, si el sustrato es deficiente en nitrógeno, su relación C/N es alta y el proceso de degradación se

cumplirá lentamente, en este caso los microorganismos encargados de la descomposición asimilan el N disponible, inmovilizándolo.

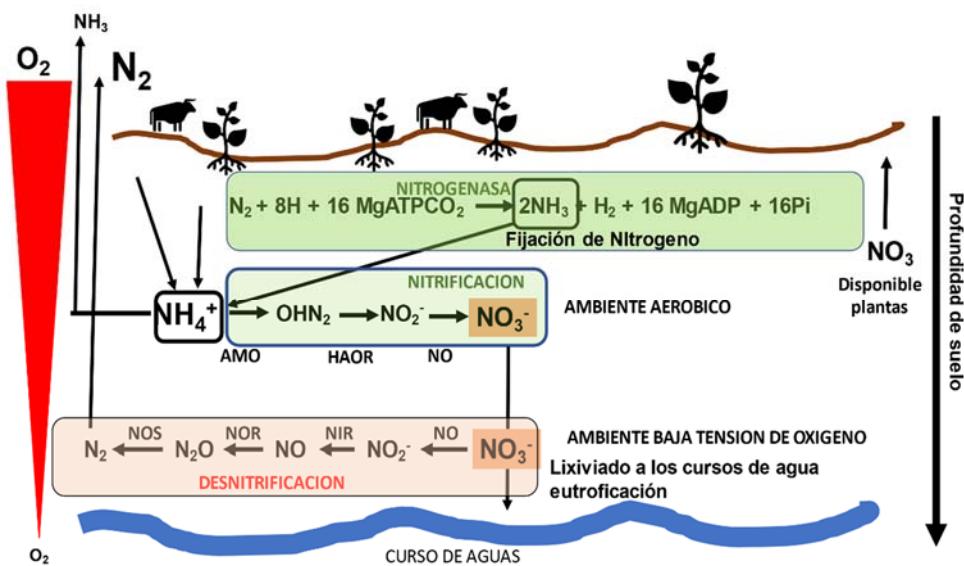
Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno forma parte de las proteínas y de los ácidos nucleicos por lo que es un nutriente esencial para la vida y del más abundante en las células y tejidos de los organismos. Por ello, habitualmente el N limita el rendimiento de los cultivos en cantidad y calidad, variando el contenido proteico de los alimentos.

La atmósfera es una reserva de nitrógeno, en la que se encuentra en estado gaseoso constituyendo el 80% de la misma. En el suelo, el N se encuentra principalmente en forma orgánica (proteínas, peptidoglicano, quitina, ácidos nucleicos), pero para ser aprovechado por las plantas, debe mineralizarse, este proceso lo realizan los microorganismos que actúan mediante sus sistemas enzimáticos.

En el suelo conviven los procesos de asimilación, como la incorporación de compuestos nitrogenados a la célula bacteriana, y de mineralización, en la que el N es liberado en forma de ion en el suelo.

La secuencia de transformaciones que sufre el nitrógeno en el suelo constituye un ciclo y este es el resultado de la actividad microbiana, siendo los hongos y las bacterias los microorganismos del suelo que tienen mayor participación. En el caso del N, un grupo de organismos autótrofos y heterótrofos aeróbicos mineralizan el N que queda en el suelo en forma de NO_3^- . Este puede ser lavado por el agua, absorbido por las plantas o en condiciones de falta de oxígeno es reducido por organismos anaerobios facultativos heterótrofos formando formas intermedias gaseosas que terminan en la pérdida de N. Otra vía de ingreso de N al suelo es por la fijación biológica de N, que realizan algunas bacterias en forma aislada o en simbiosis, ellas fijan el N_2 liberando NH_4^+ que es asimilado por las plantas.

Figura 2.10

Nota. Ciclo biogeoquímico del N. Se describen los procesos reductivos y oxidativos del N que ocurren en el suelo fundamentalmente debido a la actividad de los microorganismos del suelo.

Ciclo del azufre

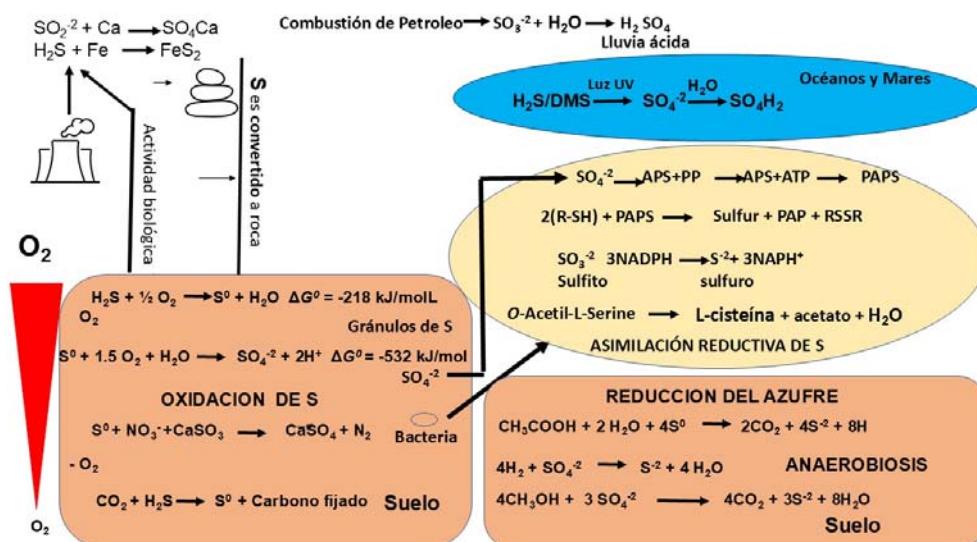
El azufre (S) es el décimo elemento en abundancia en la tierra, es esencial para los organismos en los que representa aproximadamente el 10% de la materia seca. El S forma parte de aminoácidos esenciales como la cisteína y la metionina que forman las proteínas, pero además es requerido por algunas vitaminas, hormonas y coenzimas. El S es clave en la conformación de las proteínas ya que los puentes disulfuro juegan un rol clave en las mismas. El S es un elemento que de la misma manera que el N y el C es muy dinámico, puede estar en el suelo formando parte de distintos compuestos o en estado mineral con distinto grado de oxidación, que también depende de la disponibilidad de energía química o de la luz y del ambiente aeróbico o anaeróbico que determina ambientes reductores u oxidativos.

Vale la pena destacar que el reservorio de S más importante son las rocas es decir la litósfera, si bien los gases de S se liberan a la atmósfera por la actividad volcánica, en realidad se combinan con el Fe y genera pirita, por otro lado con el calcio (Ca) forma sulfato, ambos se almacenan como roca en el suelo, mientras que la atmósfera solo mantiene una baja concentración de S. En cualquier caso, en la tierra el ciclo del S incluye interacciones de la pedosfera, la hidrosfera, la biosfera y la atmósfera. El ciclo del S incluye transformaciones mediadas por reacciones químicas y microorganismos que conducen a su volatilización. El S es incorporado a la materia orgánica por una reducción asimilativa y hay también una mineralización que ocurre formando ácido sulfúrico y ácido sulfuroso. En ausencia de oxígeno el S es reducido por bacterias quimioautótrofas, anaerobias estrictas y por bacterias fotoautótrofas. Pero, además, organismos heterotróficos aeróbicos oxidan el azufre a tiosulfato o sulfato. Por otro lado,

en el suelo ocurre también una reducción aerobia y anaerobia del S que es llevada a cabo por otros grupos de microorganismos.

La mineralización del S ocurre por varias rutas metabólicas: la mineralización aeróbica directa en la que se oxida C para obtener energía; la mineralización anaeróbica de la materia orgánica (desulfurización); la oxidación incompleta de S orgánico en compuestos azufrados inorgánicos; la oxidación biológica de H₂S a sulfato vía S elemental y sulfito; la oxidación biológica de tetratiónato a sulfato; la hidrólisis de cisteína por la cisteína desulfidrolasa, y por último la mineralización indirecta cuando ésteres de sulfato son hidrolizados por sulfatasas.

Figura 2.11



Nota. Ciclo del Azufre. Se describe la reducción asimilativa, desasimilativa y la oxidación que ocurre en el suelo como resultado de la actividad microbiana y en función de la disponibilidad de energía en el suelo.

La inmovilización consiste en que usualmente el S sufre una reducción luego de lo cual es asimilado en los compuestos orgánicos como SO₂ por las plantas y los microorganismos. Existe de manera similar a lo que ocurre en el ciclo del N una reducción desasimilativa del S que ocurre en anaerobiosis.

Referencias

- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., Schloter, M. (2020). Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>.

- Bulgarelli Davide, Schlaepi Klaus, Spaepen Stijn, van Themaat Emiel Ver Loren, Schulze-Lefert Paul (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 64:1, 807-838.
- Che, S., & Men, Y. (2019). Synthetic microbial consortia for biosynthesis and biodegradation: promises and challenges. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 46(9-10), 1343–1358. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02211-4>.
- FAO (2022). A review of the impacts of crop production on the soil microbiome: Innovations and policy recommendations to address environmental degradation, climate change and human health. Rome, FAO.
- Orozco-Mosqueda Ma del Carmen, Rocha-Granados Ma del Carmen, Glick Bernard R., Santoyo Gustavo (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological Research*, 208:25-31
- Santoyo, Gustavo & Hernández-Pacheco, Claudia & Hernandez-Salmeron, Julie & Hernández-León, Rocio. (2017). The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: Toward sustainable agriculture. A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 15. e03R01. 10.5424/sjar/2017151-9990.
- Tosi, M., Mitter, E. K., Gaiero, J., & Dunfield, K. (2020). It takes three to tango: the importance of microbes, host plant, and soil management to elucidate manipulation strategies for the plant microbiome. *Canadian journal of microbiology*, 66(7), 413–433.

CAPÍTULO 3

Metabolismo del carbono: degradación microbiana de lignocelulosa y formación de sustancias húmicas

Gabriela Diosma y Mario C. N. Saparrat

Introducción

El carbono (C) y el oxígeno (O) son los componentes mayoritarios de la biomasa del suelo, la que se genera por procesos anabólicos que inmovilizan nutrientes en la estructura celular. Entre éstos, se pueden mencionar a los procesos de síntesis de compuestos orgánicos como la fotosíntesis y/o la asimilación de carbono que utiliza la energía de los compuestos inorgánicos del suelo para reducir y fijar el CO₂ y formar así compuestos orgánicos. También la materia orgánica contenida en el suelo es transformada por la actividad de los microorganismos, que llevan adelante procesos de mineralización que conducen a la liberación de C en forma de CO₂ y también procesos de humificación, que conducen a la formación de compuestos carbonados que son estables y que les transmiten esta propiedad a los suelos.

Existen diferentes procesos claves que están asociados con el ciclo de la materia orgánica en los suelos, distinguiendo los siguientes: transformación, descomposición, mineralización, partición (distribución), asimilación y estabilización. Mientras que la mineralización es definida como la conversión microbiana de la materia orgánica en constituyentes inorgánicos, la humificación es el proceso en el que el carbono de los residuos orgánicos es transformado y convertido en sustancias húmicas a través de reacciones bioquímicas y abioticas. La mineralización de la materia orgánica en el suelo es el resultado de diversos procesos que ocurren simultáneamente y que provocan la degradación entre otros de sustancias poliméricas, y la posterior fermentación (etanólica o alcohólica, ácido-mixta, butanodiólica, entre otras) y/o respiración (aeróbica y/o anaeróbica) de los monómeros liberados. Esto se lleva a cabo en función de la presencia de microorganismos específicos que son responsables de cada proceso, lo que debe ser acompañado de condiciones predisponentes, como por ejemplo la disponibilidad de oxígeno, es decir que tanto los microorganismos como las condiciones están directamente relacionados con los ciclos de C y O. La humificación es el proceso de formación del humus, principal reservorio de C orgánico en el suelo. El humus se define como una estructura polifenólica, compleja, amorfa y recalcitrante que caracteriza el estatus nutricional de los suelos.

El proceso y los mecanismos de síntesis, así como la naturaleza de sus principales precursores se encuentra actualmente en análisis y discusión.

Materia orgánica del suelo: componentes

La materia orgánica del suelo representa un *continuum* de materiales que abarca desde residuos orgánicos alterados amorfos de la biota, en proceso de descomposición, exudados radiculares, biomasa microbiana, biomoléculas como sustancias no húmicas y sustancias húmicas. Convencionalmente, acorde al concepto clásico de la teoría del polímero, se acepta que la materia orgánica del suelo consiste predominantemente de sustancias húmicas (humus, 60-70 % de la materia orgánica del suelo), las que son sintetizadas en un proceso llamado “humificación” del material orgánico.

Las sustancias no húmicas son compuestos orgánicos de estructura definida como proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, y pequeñas moléculas tales como azúcares y aminoácidos, siendo la mayoría de ellos degradables y por eso pueden ser utilizados como sustrato por microorganismos del suelo, de tal forma que su existencia es transitoria.

En el suelo, la materia orgánica se encuentra en un equilibrio dinámico a través de tres procesos diferentes:

- Inmovilización microbiana: es el secuestro del nutriente que es incorporado a la estructura celular.
- Mineralización: es la degradación de la materia orgánica que es transformada en sustancias inorgánicas, donde la materia orgánica es convertida a CO₂ (forma oxidada del C) y H₂O por los microorganismos del suelo.
- Humificación: es la formación del humus o sustancias húmicas (que incluyen a los ácidos fúlvicos y húmicos) a partir de la materia orgánica que llega al suelo; se basa en un proceso de degradación y síntesis.

La dinámica de la materia orgánica en el suelo es impactada por diversos factores:

1. Nitrógeno: el N-inorgánico en forma de nitrato, es un componente clave para la degradación de la materia orgánica, ya que la microbiota lo requiere para sintetizar diferentes enzimas involucradas en los procesos de degradación. Por esta causa, mientras se esté llevando a cabo la degradación de materia orgánica en el suelo los niveles de nitratos disponibles en la solución edáfica, que son también la principal fuente de nitrógeno para las plantas, serán bajos. El nitrógeno se encontrará inmovilizado en la biomasa de los microorganismos, cuyo crecimiento y actividad depende de su disponibilidad.

2. Temperatura: la mineralización de la materia orgánica es más lenta a temperaturas bajas, pero en función de la diversidad de microorganismos implicados en el proceso, el rango puede ampliarse.

3. Humedad y aireación: como la microbiota heterótrofa del suelo puede ser aerobia o anaerobia, el nivel hídrico del suelo condiciona la actividad de cada uno de estos grupos.

4. pH: en general los procesos de degradación de la materia orgánica, como la celulólisis, son más activos en suelos con valores de pH neutro o levemente ácido.

5. Relación carbono/nitrógeno de la materia orgánica a incorporar al suelo: esta relación puede ser utilizada para estimar la velocidad con que se llevará a cabo el proceso de degradación. Las plantas herbáceas contienen generalmente una cantidad relativa de carbono del 40% de su peso seco, sin embargo, el contenido de N varía según la especie y es un factor limitante del proceso de degradación. Si la cantidad de N del sustrato adicionado es alta, la microbiota involucrada en el proceso de degradación encontrará satisfecha la demanda del elemento, lo que conducirá a la rápida mineralización de la materia orgánica. En cambio, si el sustrato a incorporar al suelo es deficiente en nitrógeno, su relación C/N será alta y el proceso de degradación estará limitado y por lo tanto se llevará a cabo más lentamente, ya que el N del sistema estará inmovilizado. Cuando los sustratos son leñosos, el grado de lignificación, es decir la calidad del C y/o la relación entre lignina y N son mejores parámetros indicadores de la degradabilidad de este tipo de sustrato.

Componentes poliméricos de la materia orgánica del suelo

A nivel cuantitativo la fracción más importante de carbono orgánico que ingresa al suelo son los residuos vegetales, ya sean en forma de rastrojos desde los cultivos u hojarasca de sistemas forestales, material constituido principalmente por celulosa y lignina. Este es el material estructural de las paredes celulares de las plantas; esta matriz compleja corresponde a los siguientes polímeros: celulosa que forma parte de la estructura de la pared celular vegetal, hemicelulosa y un polímero de naturaleza aromática, la lignina. Esta última macromolécula cumple un rol clave en la rigidez de las paredes de las células vegetales xilemáticas y es lo que da sostén y contribuye a la defensa frente a los ataques microbianos. La transformación de estos polímeros en el suelo es un proceso clave del ciclo biogeoquímico de carbono, lo que tiene impacto en las características estructurales y químicas del suelo. Los microorganismos heterótrofos del microbiota del suelo utilizan la lignocelulosa como sustrato de crecimiento y/o simplemente la degradan en reacciones cometabólicas, y de esta manera actúan sobre el flujo de energía en el sistema, lo que afecta a otros niveles tróficos y conduce además a la liberación de CO₂ a la atmósfera. A causa del significado funcional y cuantitativo que tiene la celulosa como material de partida en los procesos de degradación de residuos vegetales en el suelo, en los siguientes apartados se analizará el proceso de celulólisis, incluyendo los microorganismos que llevan a cabo este proceso y qué mecanismos involucran. Además, se incluye información sobre la degradación de lignina de los materiales vegetales, y las características de las sustancias húmicas, sus precursores y su relación con la lignocelulosa en el contexto actualizado de los modelos de las sustancias húmicas y los procesos de transformación de la materia orgánica.

Lignocelulosa, características y su degradación en el suelo

La lignocelulosa, que incluye a tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, es uno de los componentes mayoritarios del carbono en el suelo y es una fuente de energía para un amplio espectro de microorganismos que la degradan.

La celulosa representa entre el 35 y el 50 % de la biomasa vegetal seca, y además es también sintetizada, aunque en menor proporción, por otros organismos. Es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas entre sí mediante enlaces β -1,4-glucosídicos. Estas cadenas de glucosa (cadenas poliglucosídicas) se agregan en paquetes que se conocen como microfibrillas, las que tienen unos pocos nanómetros de diámetro. La celulosa en los restos vegetales expuestos a la degradación en el suelo presenta un estado semicristalino en el que se identifican sectores ordenados y amorfos, estos últimos son más susceptibles a la hidrólisis enzimática.

La hemicelulosa es otro polímero que forma parte de la materia orgánica que llega al suelo. Está formado principalmente por xilanos y mananos, aunque también pueden contener otros constituyentes.

La lignina es otro de los componentes de la materia orgánica del suelo, que, considerando la cantidad con que se la encuentra en el material vegetal, es un constituyente limitante de la velocidad de degradación. Es un polímero tridimensional de hasta 3 unidades fenilpropanoides, derivadas de alcoholes p-hidroxicinámicos, que dan origen a una variedad de subunidades, incluyendo diferentes enlaces C-C y éter que no son hidrolizables. La estructura de la lignina no se conoce con exactitud y hasta el momento sólo se han descriptos modelos estructurales. La lignina es resistente a la degradación microbiana. Este compuesto y otros de bajo peso molecular de la fracción extraíble de la materia orgánica son los responsables del color pardo amarillento de los restos lignocelulósicos.

Son también componentes de la materia orgánica del suelo, las pectinas y otros polímeros menores que son degradados por un amplio espectro de microorganismos no específicos que los utilizan como fuente de C y de energía.

Celulosa, microorganismos que la degradan y sus mecanismos

La celulosa y el almidón son probablemente los dos polisacáridos naturales más abundantes de la materia orgánica del suelo. Aunque ambos son polímeros de la glucosa, las unidades están enlazadas de manera diferente. Esto hace que la celulosa y el almidón difieran en su solubilidad en agua y en la velocidad con que son degradados.

Almidón y su degradación microbiana

El almidón es una sustancia de reserva de C y energía que se encuentra en el suelo. Es una mezcla de dos polímeros de D-glucosa, la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal con enlaces glucosídicos α -(1,4). Aunque la amilosa y la celulosa son polímeros lineales de la glucosa, las unidades están enlazadas de manera diferente, generando una conformación tridimensional del polímero distinta. Esto hace que la celulosa sea insoluble en solución acuosa comparado con el almidón y que se digiera más lentamente.

El otro polímero del almidón es la amilopectina, que además de enlazar sus glucosas a través de enlaces glucosídicos α -(1,4), tiene ramificaciones de cadenas generadas vía enlaces glucosídicos α -(1,6).

Muchos hongos y bacterias del suelo hidrolizan el almidón a través de la síntesis de diferentes enzimas extracelulares llamadas amilasas (α -(1,4) exo- y endoglucanasas), lo que conduce a la generación mayoritaria de oligosacáridos y maltosa, un disacárido. La hidrólisis de este último azúcar, como resultado de la actividad de una α -(1,4) glucosidasa, genera glucosa. Por otro lado, también existen microorganismos en el rumen que tienen actividad amilolítica como *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amyloytica* y los protozoarios y hongos del rumen (*Neocallimastix frontalis*).

Entre las enzimas involucradas en la degradación de almidón, están las α - y β -amilasas y las enzimas desramificadoras. La α -amilasa es una endohidrolasa que rompe los enlaces glucosídicos α -(1,4) de los polisacáridos y libera oligosacáridos de bajo peso molecular. Mientras que esta enzima hidroliza los enlaces del polímero en forma aleatoria, la β -amilasa lo hace en forma escalonada en enlaces alternos, con lo que conduce a que se libere maltosa de las cadenas del almidón.

La β -amilasa es una exohidrolasa que actúa en el grupo final no reductor de la molécula y que no hidroliza los enlaces α -(1,6), en donde se originan las ramificaciones de las cadenas del almidón, razón por la cual la presencia de ramificaciones limita la acción de la β -amilasa y así la degradación del almidón.

Por lo tanto, las enzimas α -amilasa y β -amilasa hidrolizan los enlaces α -1,4, pero no los α -1,6; esto significa que existen otras enzimas para romper los enlaces que dan lugar a las ramificaciones, las que se han nombrado como enzimas desramificadoras, que pueden dividirse en isoamilasas o dextrinasas límite, dependiendo de su especificidad por el sustrato.

La descomposición microbiológica de celulosa en el suelo no solo contribuye al flujo de energía en los suelos y al reciclado de C, sino que además afecta la movilización de otros nutrientes como N, P y S.

Existe una diversidad de microorganismos del suelo que se encuentran asociados al material vegetal como rastrojos y hojarasca del mantillo del suelo de bosques, que incluyen bacterias aeróbicas y anaeróbicas y hongos, que participan en la degradación de la celulosa. La mayor actividad celulolítica se da en ambientes aeróbicos, y solo un 5-10 % de la degradación se lleva a cabo bajo condiciones anaeróbicas.

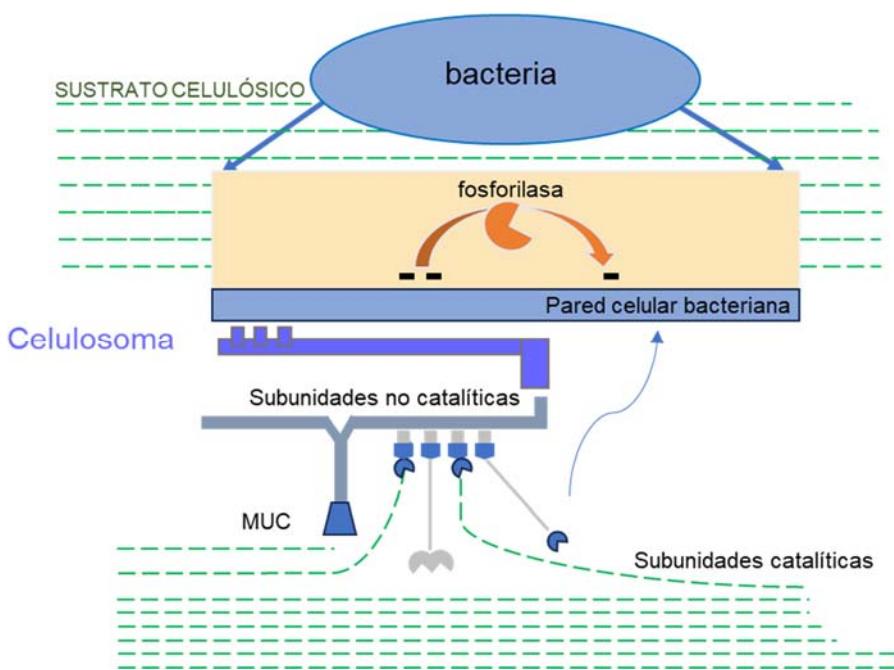
Entre los microorganismos celulolíticos, podemos mencionar a:

1. Los clostridios, que incluyen a organismos celulolíticos anaerobios modelos como las especies *Clostridium thermocellum*, *C. cellulolyticum*, y *C. cellulovorans* que fermentan la celulosa con formación de ácidos y alcoholes. Estas especies son probablemente los principales organismos descomponedores de celulosa en ambientes anóxicos, como el rumen o sedimentos.
2. Diferentes bacterias del orden Cytophagales (phylum Bacteroidetes), que son Gram (-), no formadoras de endosporas, aerobias estrictas y que son las que se consideran las principales responsables de la degradación bacteriana de la celulosa.
3. Otras bacterias que degradan celulosa son diferentes bacilos Gram positivos del género *Cellulomonas* que pertenecen al Orden Micrococcales (phylum Actinobacteria) como *C. flavigena* y *C. persica*. Estas bacterias son quimio-organótrofas, no formadoras de endosporas, anaerobios facultativos y se caracterizan por su capacidad para degradar celulosa y hemicelulosas y sintetizar diferentes enzimas lignocelulolíticas.
4. Algunas bacterias filamentosas del grupo de las Actinobacteria como *Streptomyces*, que sintetizan enzimas extracelulares hidrolíticas que degradan polisacáridos como almidón, celulosa y hemicelulosa, siendo los productos de reacción utilizados por estas bacterias como fuente de carbono y energía;
5. Bacterias del rumen como aquellas pertenecientes al género *Fibrobacter* (phylum Fibrobacteres) como *F. succinogenes* y *F. intestinalis*, que son Gram (-) y anaerobias estrictas.
6. Diferentes grupos de hongos que incluyen representantes de los phyla Ascomycota (*Chaetomium* y *Trichoderma*, de los que se han caracterizado sus enzimas celulolíticas a nivel transcripcional y proteómico), Basidiomycota, Chytridiomycota y Mucoromycota (con sólo unos pocos miembros del género *Mucor* que presentan significativa actividad celulolítica). Se han descripto también hongos anaeróbicos celulolíticos, incluidos en el phylum Neocallimastigomycota, que están asociados a la microbiota del sistema digestivo de animales rumiantes.
7. Microorganismos eucariotas pertenecientes al phylum Oomycota (Reino Straminipila) como *Pythium graminicola*,
8. Entre las bacterias extremófilas como las Archaea, se identificaron representantes que degradan la celulosa cristalina, destacándose unas hipertermófilas afines a *Ignisphaera aggregans*, *Pyrobaculum islandicum* y *Thermofilum pendens*.

Celulosomas de los clostridios

Los clostridios celulolíticos poseen celulosomas, una compleja estructura multienzimática que se encuentra en la superficie externa de la pared celular (Figura 3.1). El celulosoma está unido a la envoltura celular del microorganismo celulolítico a través de una subunidad de anclaje y consiste de un módulo proteico de unión a la celulosa (MUC) y de varias subunidades catalíticas que están unidas a la subunidad de anclaje común en la que se despolimeriza la celulosa próxima al microorganismo. El celulosoma facilita la unión del organismo a la celulosa, y la degrada hasta productos solubles que se incorporan al protoplasto del clostridio, donde son metabolizados, mecanismo que es común en las bacterias que degradan la celulosa anaeróbicamente.

Figura 3.1



Nota. Celulosoma en clostridios. El acrónimo MUC indica el módulo de unión a celulosa

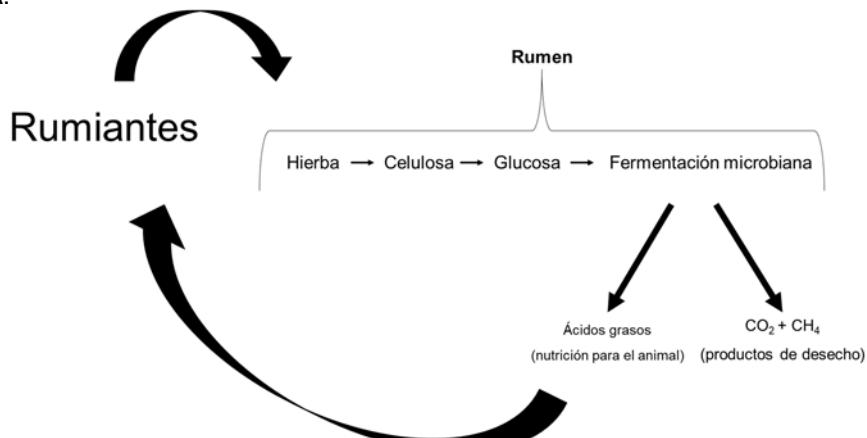
Microorganismos del rumen (Figura 3.2 A-C)

Las asociaciones simbióticas que se establecen entre los microorganismos y varias especies de mamíferos resultan en un uso de la energía y los nutrientes de compuestos que catabolizan los microorganismos con los que interactúan. Mientras que los mamíferos carecen de las enzimas necesarias para digerir la celulosa y otros polisacáridos de las plantas, los microorganismos que habitan en uno de los compartimentos del estómago policavitorio de los rumiantes (como las vacas y las ovejas), que es llamado rumen, sintetizan las enzimas que catalizan la despolimerización de los polisacáridos. El rumen es un ecosistema microbiano, estrictamente anóxico y de ubicación estratégica en el sistema gastrointestinal del animal, ya que se encuentra localizado antes del estómago ácido. El rumen

tiene una temperatura cálida y constante (39°C) y un estrecho rango de pH (5,5-7, dependiendo de cuándo el animal fue alimentado por última vez) que es también clave para su actividad. El alberga diferentes poblaciones de microorganismos anaeróbicos incluyendo diferentes especies de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, así como también los metanógenos que son prácticamente el principal grupo funcional de arqueas. También hay bacterias celulolíticas del género *Fibrobacter*, diferentes protistas y hongos unicelulares anaerobios estrictos (una propiedad que es poco común entre los eucariotas, como *Neocallimastix* que fermenta azúcares produciendo ácidos, alcohol y H_2) que digieren y fermentan la celulosa y sus productos de degradación. Es de destacar que, sin estos microorganismos simbóticos, los rumiantes no podrían alimentarse adecuadamente solo a expensas de alimentos ricos en celulosa como la hierba y el heno.

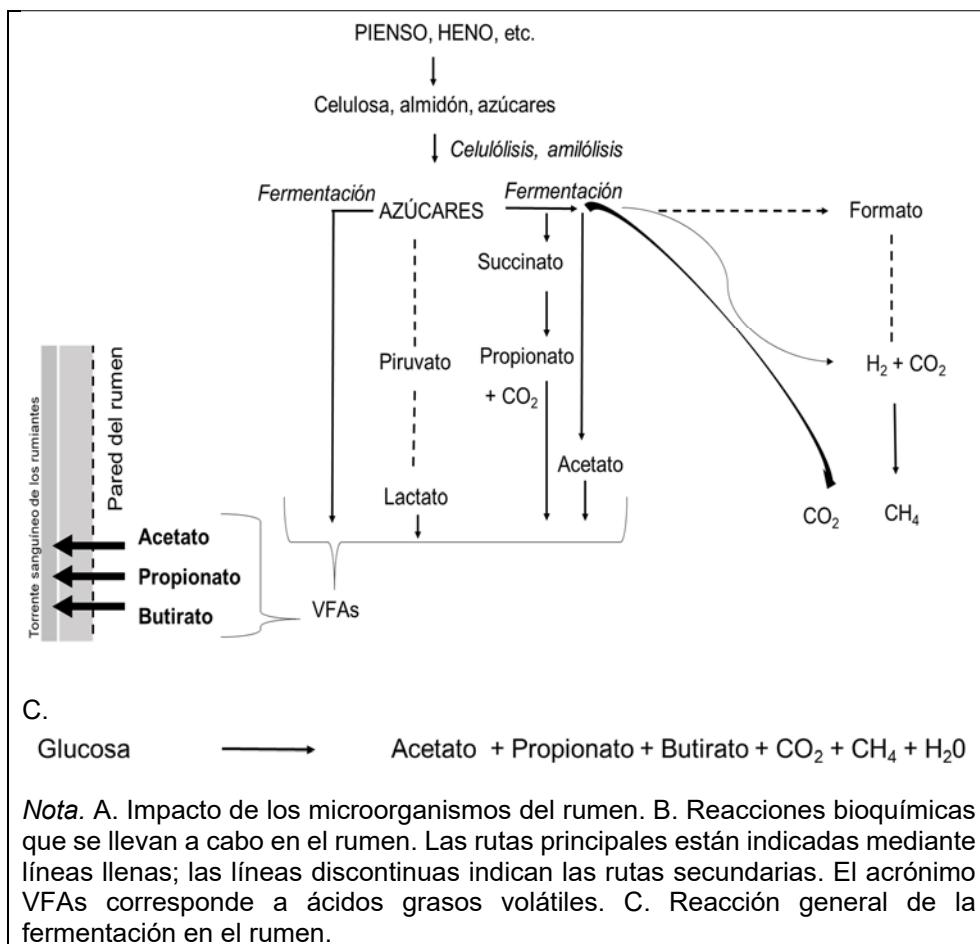
Figura 3.2

A.



Nota: Impacto de los microorganismos del rumen.

B.



En términos generales, la celulólisis consiste en la degradación de la celulosa por enzimas que son sintetizadas por grupos de microorganismos que utilizan la celulosa como fuente de carbono y energía. Los pasos de este proceso son:

1. la amorfogénesis, que es un evento inicial de acondicionamiento que consiste en la desorganización de sectores cristalinos;
2. la despolimerización extracelular que genera pooles de oligosacáridos hasta celobiosa o incluso glucosa, los que pueden ingresar a las vías metabólicas de los microorganismos asociados al proceso de degradación; y
3. el último paso que corresponde a la oxidación propiamente dicha de la glucosa.

La desorganización de la estructura lignocelulósica es clave para que la celulosa quede expuesta al ataque enzimático, aumentando su susceptibilidad a la despolimerización. No obstante, algunos microorganismos, como los hongos causantes de la pudrición parda de la madera, degradan en células vegetales intactas la celulosa de la pared celular a través de un sistema no enzimático involucrando especies reactivas de oxígeno.

Colonización y ataque de la madera por diferentes grupos de hongos

Existen diferentes grupos funcionales de hongos que colonizan madera, que son llamados xilófagos. Entre ellos, se encuentran los denominados “mohos”, los hongos manchadores de la madera y los hongos causantes de pudrición. El ataque de los mismos se inicia cuando encuentran condiciones favorables para la germinación de sus propágulos y la posterior colonización de la madera, generalmente cuando el contenido de humedad es superior al 20 %, siendo los factores que tienen mayor influencia en el crecimiento fúngico la humedad, la temperatura y la presencia de aire (oxígeno).

Los “mohos”, representados principalmente por hongos pertenecientes al Orden Mucorales (phylum Mucromycota) y al phylum Ascomycota, se nutren de material orgánico simple asociado al lumen de la madera. Ellos colonizan la superficie expuesta de la madera diferenciando colonias, estromas y/u otras estructuras portadoras de esporangios/esporas, las cuales son evidenciables a simple vista por una coloración diferencial respecto a la madera no deteriorada.

Los hongos manchadores de madera o cromógenos, al igual que los “mohos”, sólo se alimentan de compuestos simples de la madera, ya que no pueden utilizar a los polímeros de la pared de las células como fuente de C y energía y por lo tanto no afectan las propiedades mecánicas de la madera. Adicionalmente, se caracterizan porque su colonización está asociada a alteraciones en el color de la madera.

Los hongos que pudren la madera difieren en la forma en que degradan los polímeros estructurales de la madera. Existen diferentes tipos de pudriciones de la madera, como resultado de la colonización asintomática de la madera, siendo solo evidente el tipo de pudrición en etapas avanzadas, cuando los cambios de color y apariencia de la madera se ven a simple vista o también debido a la diferenciación de estructuras macroscópicas como los esporomas de los hongos causantes de las pudriciones. No obstante, la remoción de las estructuras fúngicas visibles no detiene la degradación de la madera que es provocada por la actividad de las hifas en contacto con la madera. En el área de la pudrición en la medida que avanza la degradación se acentúa el cambio de color (sea blanco/parduzco) y la madera pierde masa e incrementa su contenido de humedad. En la fase final del proceso se llega a pérdida de las características físico - mecánicas por la disagregación total de la estructura de la madera.

Tipos de pudrición de la madera causada por hongos

Existen tres tipos básicos de pudrición: blanca, parda y blanda, que son el producto de diferentes formas de ataque de la madera que generalmente tienen también un patrón morfológico distintivo. Algunos hongos xilófagos pueden generar más de un tipo de pudrición en un mismo huésped.

Pudrición blanca

Este tipo de pudrición consiste en términos generales, en que el sustrato leñoso se vuelve fibroso de color blancuzco, y se desmenuza fácilmente. El polímero clave que se degrada es la lignina, a través de un proceso de despolimerización oxidativa.

Se distinguen dos patrones de pudriciones blancas:

- Pudrición blanca simultánea, donde la lignina, las hemicelulosas y la celulosa son atacadas a la misma velocidad dejando las paredes de las células más delgadas, incluso a veces perforadas.

- Pudrición blanca selectiva, que consiste en un ataque selectivo de la lignina y las hemicelulosas; en este caso los materiales afectados toman aspecto de desfibrado por la desaparición de la laminilla media cementante.

Las especies fúngicas más importantes causantes de pudriciones blancas, representadas por taxones del phylum Basidiomycota, son: *Coriolus versicolor*, *Fomes* sp., *Ganoderma applanatum*, *Pholiota* sp., *Pleurotus* sp. *Polystictus versicolor*, *Schizophyllum commune* y *Trametes* spp.

Pudrición parda

Este tipo de pudrición es el resultado de un proceso complejo en el cual se remueve selectivamente de la madera la celulosa y las hemicelulosas, quedando la lignina oxidada. A partir del lumen los hongos causantes de la pudrición parda degradan la celulosa en las capas S1 y S2 de la pared celular vegetal. Aunque la capa S3 queda intacta o poco modificada, la madera se torna quebradiza en sentido transversal y perpendicular al eje mayor de la estructura de los elementos celulares axiales de la madera y se torna de color pardo-café. Los hongos, que provocan esta degradación pertenecen al phylum Basidiomycota y solo atacan los polisacáridos. En estadios tempranos se detecta una reducción de la fuerza mecánica de la madera, que no es acompañada de una pérdida de biomasa. El proceso involucra un mecanismo en el que participan especies reactivas de oxígeno y se produce una modificación oxidativa de la lignina, principalmente a través de reacciones de demetoxilación y la consecuente aparición de grupos cromóforos.

Ejemplos de taxones fúngicos que producen este tipo de pudrición son: *Coniophora puteana*, *Laetiporus sulphureus* y *Phaeolus schweinitzii*, *Poria* spp. y *Serpula lacrimans*.

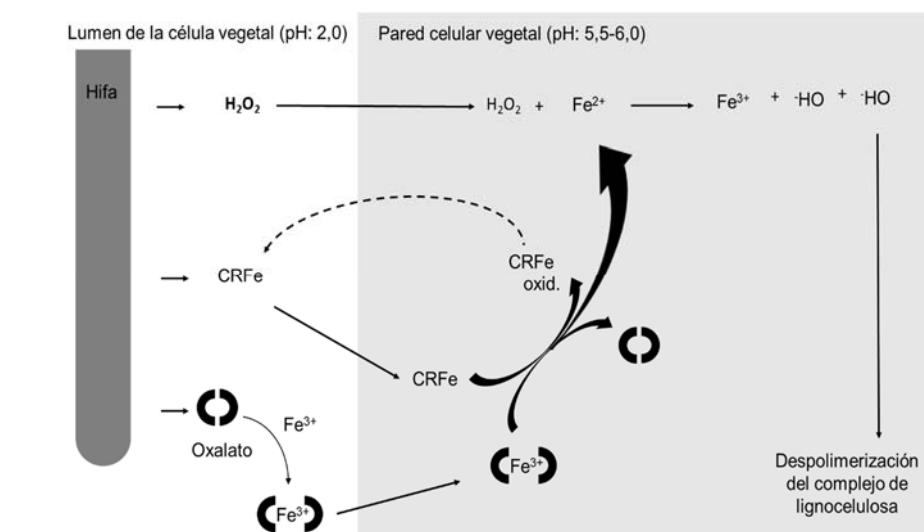
Pudrición blanda

Esta pudrición es provocada por hongos del phylum Ascomycota, que colonizan la madera expuesta y generan un material leñoso blando y amarronado. Según el tipo de alteraciones morfológicas que muestran las paredes celulares de la madera atacada, se distinguen dos tipos de pudrición blanda, siendo causados por un amplio rango de hongos, incluyendo representantes de los géneros *Alternaria*, *Coniothyrium*, *Chaetomium*, *Humicola*, *Stemphylium* y *Ustulina* entre otros.

¿Cómo degradan la celulosa los hongos causantes de la pudrición parda de la madera? (Figura 3.3).

Estos hongos sintetizan compuestos reductores de hierro (CRFe), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido oxálico. Este ácido se une a Fe^{3+} formando un complejo que difunde a la pared celular junto con el H_2O_2 y el CRFe. Al valor de pH presente en la madera, CRFe secuestra Fe^{3+} del complejo Fe-oxalato y lo reduce a Fe^{2+} . Este ion luego reacciona con el H_2O_2 (reacción de Fenton) y produce radicales hidroxilos ($\cdot OH$) que despolimerizan la lignocelulosa. Aunque a través de este sistema estos hongos pueden degradar principalmente polisacáridos de la madera, solo modifican parcialmente la lignina, la cual torna a un color pardo (lignina oxidada), que es una fuente potencial de compuestos aromáticos para la fracción estable de la materia orgánica de los suelos forestales (sustancias húmicas).

Figura 3.3



Nota. Degradación del complejo de lignocelulosa por hongos causantes de la pudrición parda de la madera utilizando el sistema Fenton. El acrónimo CRFe corresponde a compuestos reductores de Fe^{3+} .

La degradación de polisacáridos como la celulosa es provocada por hongos y bacterias que sintetizan un conjunto de enzimas que difieren en sus propiedades fisicoquímicas y/o catalíticas; muchas son isoenzimas, cuya actividad es dependiente de los valores de pH, fuerza iónica y el tipo de sustrato lignocelulósico que degradan, que pueden presentar diferente relación C/N y tenor de lignina.

La despolimerización de la celulosa es llevada a cabo por enzimas que difieren en su actividad; unas son hidrolíticas y otras oxidativas (Figura 3.4). Se han reportado tres grupos de enzimas hidrolíticas:

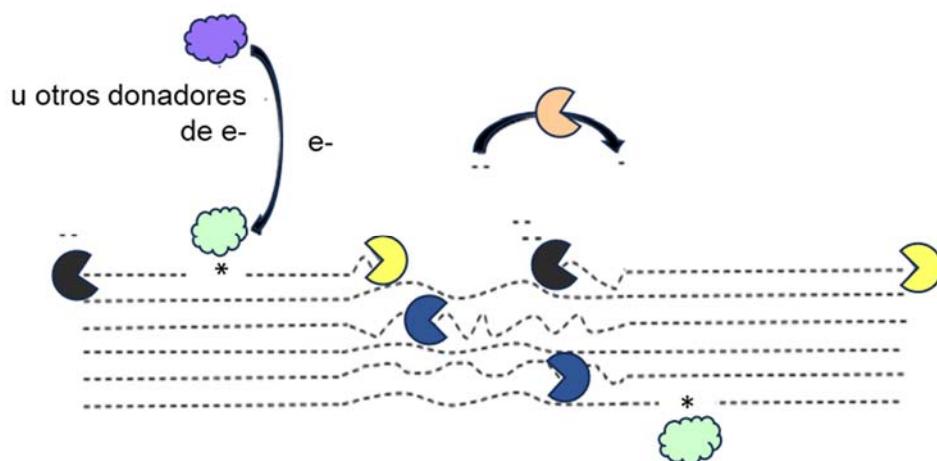
1. endoglucanasas (endo 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasas), que catalizan en forma aleatoria la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de la cadena de celulosa.

2. exoglucanasas (cellobiohidrolasas; exo 1,4- β -D-glucano-4-cellobiohidrolasas), que liberan celobiosa o glucosa desde el extremo reductor o no-reductor de la celulosa.
3. β -glucosidasas, también conocidas como celobiasas, que hidrolizan celobiosa y otras celodextrinas solubles a glucosa.

Con respecto a las enzimas oxidativas involucradas en la celulólisis, se encuentran las monooxigenasas líticas de polisacáridos y la celobiosa-deshidrogenasas que oxidan la celulosa o sus productos de degradación a través de reacciones redox.

Todas estas enzimas que despolimerizan la celulosa actúan fuera de las células, es decir que son enzimas sintetizadas por los microorganismos y secretadas, con lo cual el proceso degradativo es regulado exclusivamente por la actividad de las enzimas y su vida media. La mayor actividad celulolítica ocurre cuando actúan mezclas de enzimas que trabajan sinérgicamente en el suelo.

Figura 3.4



Nota. Un modelo de la degradación enzimática de celulosa por microorganismos celulolíticos aeróbicos que liberan sus enzimas al ambiente donde están creciendo. El asterisco indica la unidad de glucosa oxidada por la enzima. Se indican a través de formas tipo-Pacman de diferente color las enzimas con actividad hidrolítica: endoglucanasas (gris oscuro), exoglucanasas (blanco y negro) y β -glucosidasas (gris claro). Las formas tipo-nube de diferente color corresponden a las enzimas con mecanismos de catálisis de tipo oxidativo: monooxigenasas líticas de polisacáridos (gris oscuro) y celobiosa-deshidrogenasas (blanco).

Residuos celulosicos como materia prima para la generación de bioetanol

La bioconversión de lignocelulosa a combustibles líquidos y otros químicos tiene varias ventajas en términos de mitigar el efecto invernadero y reducir la dependencia a los combustibles fósiles. Muchos residuos ricos en celulosa derivados del uso de la biomasa vegetal pueden ser revalorizados como fuente para la síntesis de bioetanol de segunda generación. La conversión de biomasa

lignocelulósica a etanol requiere de tres pasos básicos: 1. el pretratamiento del residuo, para aumentar la accesibilidad a las fibras, a fin de exponer la celulosa; 2. la etapa de sacarificación, que consiste en la despolimerización de la celulosa a través de la acción de cócteles enzimáticos de celulasas para generar una mezcla de azúcares simples fermentables (especialmente glucosa, aunque también en el proceso se generan xilosa y otros azúcares derivados de las hemicelulosas), y que es uno de los factores limitantes del proceso, ya que demanda una gran cantidad de enzimas para obtener una conversión eficiente de los residuos de partida; y 3. la fermentación para convertir estos azúcares en etanol a través de la actividad de la levadura de cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*. Este tipo de combustible es un ejemplo de energía de impacto neutro respecto a los combustibles fósiles, que tienen un gran impacto ambiental en lo que se refiere a la cantidad de emisión de gases de efecto Invernadero, ya que la generación de bioetanol celulósico implica el aprovechamiento de la energía desde un residuo orgánico en el marco de una economía circular del carbono. También el etanol celulósico, que es denominado de segunda generación, es considerado ecológicamente una fuente de producción de energía más sustentable respecto al bioetanol de primera generación que se obtiene a partir del almidón y la sacarosa, contenidos principalmente en el maíz y la caña de azúcar, en respuesta a que posibilita el uso de diferentes subproductos celulósicos, reduciendo su volumen y evitando el uso de materias primas comestibles y por lo tanto los suelos destinados para su producción.

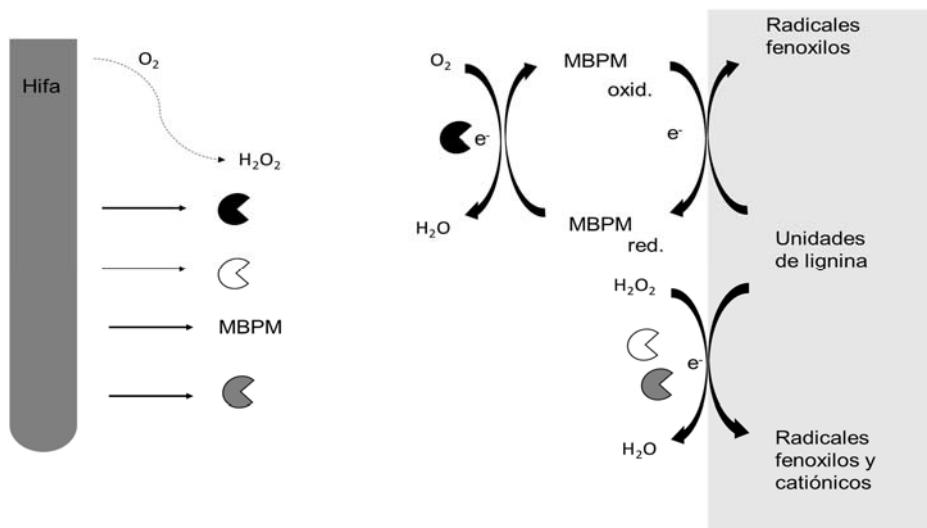
El mercado mundial de enzimas involucradas en la generación del bioetanol celulósico y la disponibilidad de cócteles comerciales con estas enzimas demanda el desarrollo de complejos enzimáticos, optimizados para las biommasas específicas usadas como materias primas, que a su vez deben ser compatibles con los costos de logística de grandes volúmenes de enzimas para la obtención del etanol a granel. Como consecuencia, grandes esfuerzos en investigación se realizan en todo el mundo para optimizar el paso de sacarificación mediante la bioprospección de enzimas de microorganismos que sean más eficientes a las disponibles en el mercado y con menor costo de producción.

Lignina y su degradación

La degradación de la lignina ha sido estudiada con mayor énfasis en representantes del phylum Basidiomycota que son los agentes causantes de las pudriciones blancas de la madera. Se han descrito un número de enzimas ligninolíticas como las lacasas, lignina peroxidases, manganeso peroxidases, peroxidases versátiles y variados mecanismos de ataque a la lignina (Figura 3.5). Estos hongos son agresivos y degradan todos los polímeros existentes en el sustrato, generando con frecuencia un material blanco enriquecido en celulosa.

Existen además otros hongos y bacterias de suelo que viven en la hojarasca o mantillo del bosque, que metabolizan parcialmente la lignina. En los suelos forestales la hojarasca se encuentra asociada a hongos saprótroficos del phylum Basidiomycota que también sintetizan enzimas oxidativas, aunque la actividad ligninolítica de estos hongos es moderada. Sin embargo, también hay hongos del phylum Ascomycota que degradan lignina, con menor eficiencia, aun cuando la utilizan como única fuente de C (asimilación) o degradándola bajo condiciones de cometabolismo. Éste último proceso corresponde a la transformación de la lignina u otro tipo de compuesto que solo se lleva a cabo cuando el microorganismo se nutre y obtiene energía de otro sustrato disponible. Se ha descrito la existencia de bacterias del suelo que metabolizan lignina; la mayoría corresponden a los grupos Actinobacteria, α -Proteobacteria y γ -Proteobacteria que suelen estar presentes en los sistemas digestivos de termitas e insectos que habitan madera. Estas bacterias despolimerizan lignina de alto y bajo peso molecular y como resultado de este proceso liberan compuestos aromáticos como el ácido protocatéquico entre otros. Esta actividad ligninolítica se ha asociado a peroxidases extracelulares y en algunos casos a lacasas.

Figura 3.5



Nota. Degradación de lignina por hongos causantes de pudrición blanca que secretan enzimas extracelulares (formas tipo-Pacman de diferente color) como peroxidases (manganese peroxidase y lignina peroxidase, gris claro y oscuro respectivamente) y lacasas (negro) y metabolitos de bajo peso molecular (MBPM) para generar especies radicales oxidativas que catalizan la oxidación de la lignocelulosa.

Sustancias húmicas

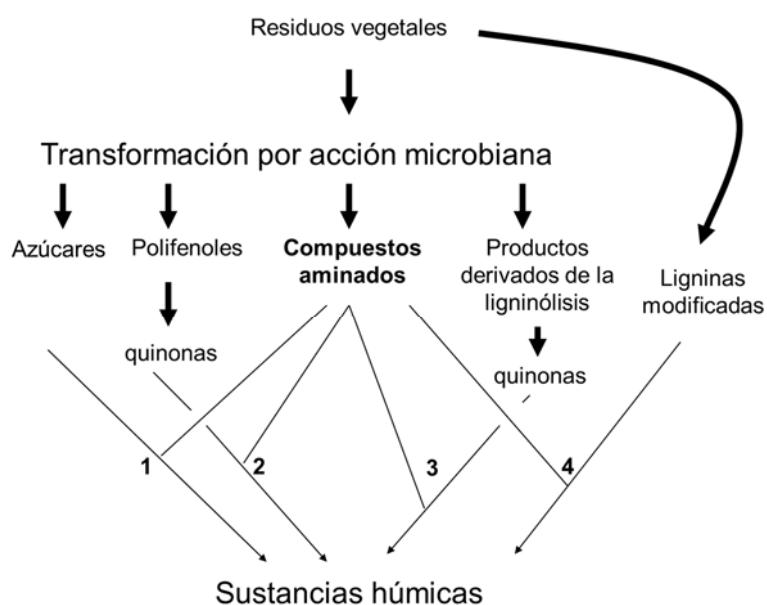
Las sustancias húmicas son una serie de polímeros complejos del suelo que tienen un origen complejo y una estructura macromolecular heterogénea, que es función de los materiales de origen y de las condiciones ambientales de los suelos en que se encuentran. Ellas cumplen roles

importantes desde un punto de vista ambiental y agroecológico, ya que le confieren al suelo propiedades físicas y químicas que resultan en un aumento de la fertilidad, complejando cationes y por lo tanto aumentando su disponibilidad para las plantas. Las sustancias húmicas son definidas convencionalmente en tres categorías: ácidos húmicos (AH, fracción soluble en medio alcalino e insoluble en medio ácido), ácidos fúlvicos (AF, fracción soluble tanto en medio alcalino como en medio ácido), y humina (material orgánico insoluble en los residuos alcalinos).

Las sustancias húmicas representan una clase de polímeros de alta masa molecular de color amarillo a pardo oscuro o negro. Los componentes del humus son químicamente indefinidos, refractarios, complejos, heterogéneos, amorfos y polidispersos. Se caracterizan por tener una multitud de grupos químicos que, a la vez, les otorgan propiedades reguladoras del pH. Las sustancias húmicas tienen un mayor contenido de C y menor de O que la mayoría de sus precursores y están estrechamente asociadas con los constituyentes inorgánicos de los suelos, a menudo formando agregados, lo cual explica su lenta modificación y/o mineralización. Todas estas características explican su resistencia a la degradación y al ataque químico.

La humificación consiste en la transformación del carbono en sustancias húmicas como resultado de procesos bioquímicos y abióticos (Figura 3.6). La lignina y sus productos de transformación, así como también polisacáridos, melaninas, cutinas, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, partículas finas de carbón, entre otros, son componentes importantes que participan en el proceso.

Figura 3.6



Nota. Potenciales precursores de las sustancias húmicas y posibles mecanismos de síntesis. Obsérvese que compuestos aminados de origen microbiano son considerados reaccionar con ligninas modificadas (vía 4), quinonas (vías 2 y 3) y azúcares reductores (vía 1) para formar polímeros complejos tipo-humus, adaptado de Sylvia et al. (2005).

Se han propuesto dos mecanismos de humificación que están interrelacionados o incluso son convergentes. Uno consiste en la alteración macromolecular, sin degradación previa, y el otro es un proceso de condensación de precursores de bajo peso molecular, provenientes de la degradación de biomacromoléculas o de la síntesis biológica.

Referencias

- Cragg, S. M., Beckham, G. T., Bruce, N. C., Bugg, T. D., Distel, D. L., Dupree, P., Etxabe, A. G., Goodell, B. S., Jellison, J., McGeehan, J. E., McQueen-Mason, S. J., Schnorr, K., Walton, P. H., Watts, J. E., y Zimmer, M. (2015). Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Current Opinion in Chemical Biology*, 29, 108-119.
- Guggenberger, G. (2005). Humification and Mineralization in Soils. En: Buscot F, A Varma (Eds.), *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Soil Biology (ISBN 3-540-2220-0). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. Volume 3: 85-106 (ver http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3-540-26609-7_4#page-1).
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Bucklen, D. H., y Stahl, D. A. (2015). *Brock, Biología de los microorganismos*. 14^a edición. Madrid: Pearson Educación S. A.
- Saparrat, M. C. N., Bárcena, A., y Balatti, P. A. (2013). Microorganismos del suelo y su participación en la formación de la materia orgánica: lignocelulólisis y mecanismos involucrados. En: *Microbiología Agrícola. Un Aporte de la Investigación en Argentina, Segunda Edición*. Ed.: Albanesi, A. S. Magna Publicaciones, Tucumán. ISBN: 978-987-1726-17-2. Capítulo del Eje Temático: Materia Orgánica del Suelo, pp. 65-92.
- Sylvia, D. M., Hartel, P. G., Fuhrmann, J. J., y Zuberer, D. A. (2005). *Principles and applications of soil microbiology, 2nd ed.* New Jersey: Pearson Prentice Hall.

CAPÍTULO 4

Ciclo del nitrógeno

Geraldina Fermoselle y Pedro A. Balatti

Introducción

El nitrógeno (N) es uno de los macronutrientes de las plantas que junto con el fósforo (P) habitualmente limitan el crecimiento y el desarrollo de los cultivos. El N es uno de los principales constituyentes de los aminoácidos, proteínas, enzimas, nucleoproteínas, ácidos nucleicos, forma parte de compuestos que conforman las paredes celulares y también de un pigmento clave de las plantas como es la clorofila. Es decir que el N, de la misma manera que el P, es demandado en grandes cantidades por las plantas y cuando sus niveles son bajos, estas no pueden desarrollar todo su potencial de rendimiento.

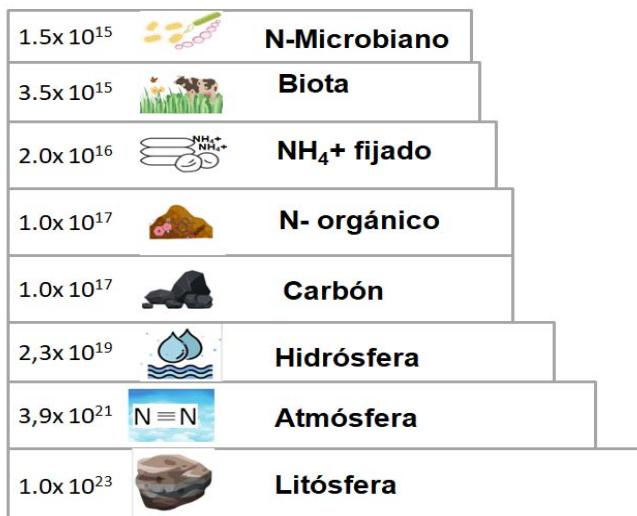
La reserva más grande de N es la litósfera, es decir las rocas, pero de esta forma no está disponible para los organismos vivos. Otra fuente que alberga una gran cantidad de N es la atmósfera, el aire tiene un 78% de nitrógeno en forma de N₂ gaseoso, sin embargo, metabólicamente no está disponible para su asimilación por las plantas superiores, que no poseen mecanismos para romper el triple enlace covalente, que convierte al N₂ en una molécula muy estable. Algunas bacterias contienen una enzima que permite romper ese triple enlace pudiendo así utilizar el N₂. En la Figura 4.1 se muestran las reservas en gramos de N a nivel global.

El N atmosférico es utilizado en el suelo por medio de la fijación espontánea del nitrógeno, este es un proceso natural en el cual el nitrógeno es reducido utilizando la energía liberada durante las descargas eléctricas producidas en las tormentas, uniéndose con el oxígeno del aire formando óxido nítrico y dióxido de nitrógeno que al unirse con el agua forman ácido nítrico, y el agua de lluvia arrastra los compuestos formados hasta el suelo. Una vía de ingreso muy importante es por medio del proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN), que será visto más adelante. El N también se incorpora al suelo con los fertilizantes nitrogenados que se generan por un proceso industrial llamado Haber-Bosch.

Otra fuente importante de N es la materia orgánica del suelo (MOS), que está constituida aproximadamente por un 98% de compuestos orgánicos de los restos vegetales y animales y menos del 2% son formas minerales, (óxido nitroso, óxido nítrico, amonio, nitritos y nitratos), por lo tanto, la fracción orgánica debe transformarse por medio de la acción de los microorganismos del suelo, por el proceso de mineralización, a la forma inorgánica para que las plantas puedan

aprovecharlo. La forma en que las plantas absorben el nitrógeno es principalmente como nitrato (NO_3^-) y en menor medida como amonio (NH_4^+).

Figura 4.1



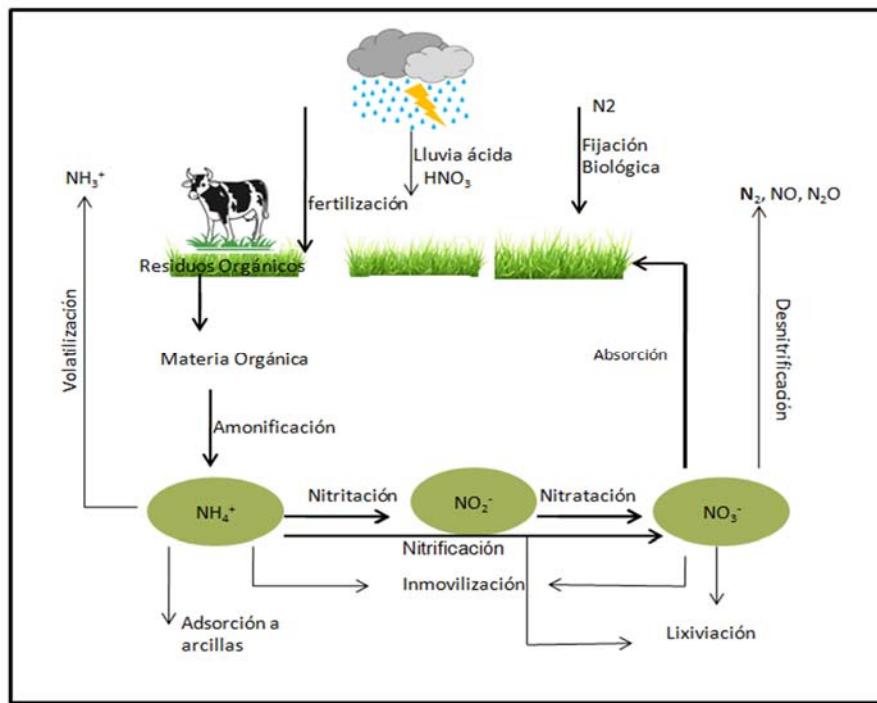
Nota. Reserva de nitrógeno en el ecosistema terrestre.

La fracción orgánica nitrogenada del suelo está compuesta por: 20-40% de aminoácidos, un 5 -10% de aminoazúcares y un 1% bases púricas y pirimídicas. El resto del nitrógeno integra las moléculas húmicas, que le dan estabilidad a los suelos porque se degradan lentamente.

Los microorganismos del suelo son de gran importancia para la vida del suelo porque transforman los compuestos orgánicos en inorgánicos que son los que utilizan las plantas. La actividad de descomposición y mineralización, que realizan los microorganismos, se consideran herramientas para el manejo del suelo y la nutrición de las plantas. Este conocimiento es de particular importancia en la agricultura para desarrollar manejos productivos considerando el cuidado de los recursos ambientales.

Las transformaciones que sufre el N en la naturaleza constituyen lo que se da en llamar el ciclo del nitrógeno (Figura 4.2), el cual se lleva a cabo por diversos procesos biogeoquímicos. Diferentes formas de vida participan en los procesos que se llevan a cabo en el suelo, pero las comunidades microbianas son las que poseen un papel principal. En la Figura 4.3 se muestran los estados de oxidación que puede tener el N como resultado de los diferentes procesos que regula la actividad microbiana. Debido a los diversos estados de oxidación que puede tener el N en el suelo (actúa con valencias desde -3 a +5) se evidencia que hay una diversidad de procesos biológicos que actúan en la oxidación y reducción de diversos compuestos nitrogenados.

Figura 4.2



Nota. Ciclo del Nitrógeno. Se muestran las entradas de N al suelo: la fijación biológica de nitrógeno, la fertilización, el ingreso por lluvia y la incorporación de materia orgánica, y las salidas de mayor magnitud: la absorción por parte de las plantas, la volatilización, la desnitrificación y la lixiviación.

Figura 4.3



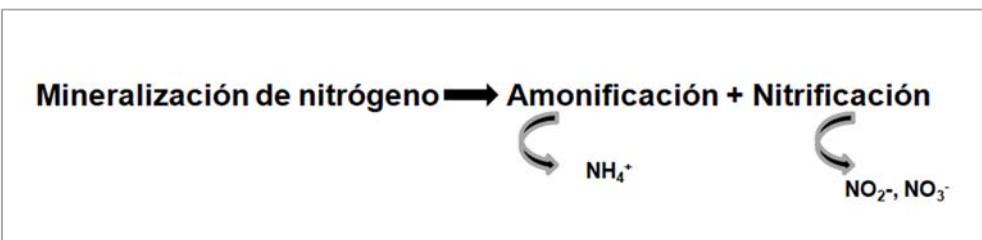
Nota. Diferentes estados de oxidación por los que pasa el nitrógeno, por acción de los microorganismos.

Mineralización del nitrógeno

La mineralización, es el proceso bioquímico mediante el cual los componentes orgánicos del suelo (restos animales y vegetales, células microbianas, exudados de las raíces, etc.) son degradados hasta formas minerales simples por la actividad de diversos microorganismos. En el caso del nitrógeno, este pasa de N orgánico a N mineral, fundamentalmente a amonio, nitritos y nitratos.

Otro proceso que ocurre en el suelo es la inmovilización, esto consiste en el secuestro de los nutrientes que son liberados durante la mineralización de la materia orgánica, que son incorporados por los microorganismos para su crecimiento y desarrollo. En el caso del N lo utilizarán para formar sus enzimas, proteínas, ácidos nucleicos etc. Se conoce que la asimilación microbiana (inmovilización) es un proceso crítico que controla la disponibilidad de N para las plantas.

La mineralización de la materia orgánica, que llevan a cabo los microorganismos del suelo, se realiza en dos etapas que son la amonificación y la nitrificación.



Amonificación

Es el proceso por el cual los compuestos nitrogenados orgánicos que se encuentran en el suelo, como las proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, urea, quitina, mureína, etc. son transformados por los microorganismos del suelo liberando amonio. La degradación microbiana de estos compuestos nitrogenados es realizada en muchos casos para satisfacer los requerimientos de energía y carbono de los microorganismos heterotróficos, gran parte del amonio producido es utilizado por los microorganismos para sintetizar sus proteínas estructurales y funcionales y el amonio liberado como resultado de la amonificación puede considerarse como producto del catabolismo



Los microorganismos que metabolizan los compuestos orgánicos son: bacterias, hongos, protozoos, algas, estos poseen enzimas extracelulares (proteasas, peptidasas, quitinasas, lisozima, ARNasa) que degradan los polímeros orgánicos nitrogenados y luego los monómeros resultantes atraviesan la membrana celular y son metabolizados por las enzimas intracelulares

(asparaginasa, glutaminasa, deshidrogenasa) El grupo amino de las moléculas orgánicas es liberado por deshidrogenasas y oxidases en un proceso llamado desaminación.

Al ser tan amplio el grupo de microorganismos amonificadores y los sustratos tan variados, el proceso de amonificación puede realizarse en diferentes condiciones ambientales, como aerobiosis o anaerobiosis, temperaturas frías o cálidas y amplio rango de pH. Aunque la actividad sería máxima en condiciones de suelos aireados, temperaturas entre 25 - 37 grados, el pH cercano a la neutralidad y humedad del suelo media.

El amonio que se libera como resultado de la degradación de compuestos orgánicos nitrogenados puede seguir diferentes caminos:

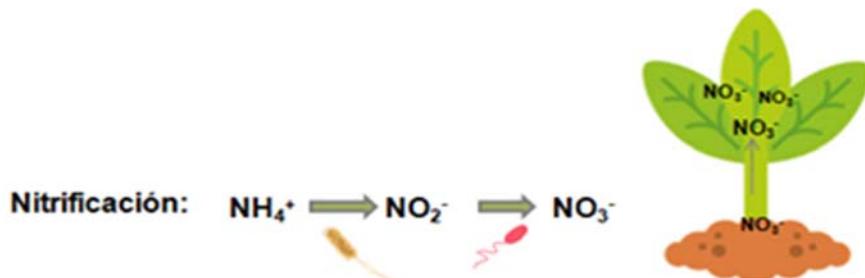
- Puede ser utilizado por los microorganismos como fuente de nitrógeno.
- Puede ser asimilado en pequeñas cantidades por los vegetales.
- Puede unirse fuertemente a las arcillas en base a dos procesos; por un lado, por atracción de cargas, como el amonio está cargado positivamente, se une a las arcillas que tienen cargas (-) de esta manera pasan a formar parte del complejo de intercambio de iones del suelo. El amonio unido de esta manera a las arcillas no es lixiviado o lavado del suelo por el agua. Además, el NH_4^+ es adsorbido por las arcillas y solo estará disponible para las plantas cuando se produzca la ruptura de las uniones responsables de adsorción.
- Puede ser utilizado por bacterias quimiolitótrofas que oxidan el amonio a nitrito y luego a nitrato en el proceso que se conoce como nitrificación.
- Se puede volatilizar en condiciones de altas temperaturas y suelos secos, perdiéndose en la atmósfera como amoniaco; este gas, aunque no tiene efecto invernadero, puede adoptar diversas formas, actuando como un precursor del óxido nitroso (N_2O) y del óxido nítrico (NO), para caer finalmente al suelo en forma de ácido nítrico (HNO_3) (componente de la lluvia ácida).

Algunos de los microorganismos involucrados en el proceso de amonificación son: bacterias como *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella*, etc. y hongos como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Rhizopus*. etc.

Nitrificación

La nitrificación es el proceso en el que el NH_4^+ es convertido en NO_3^- ; esta reducción del N es catalizada por bacterias del suelo que respiran aeróbicamente y son autótrofas, es decir que fijan el CO_2 , carbonatos o bicarbonatos del suelo y lo utilizan para sintetizar sus compuestos celulares. Estas fueron identificadas en 1890 por Sergei Winogradsky, son bacterias Gram (-), quimiolitótrofas, aerobias, no esporuladas, con forma de bacilos, cocos o espirilos, generalmente móviles debido a la presencia de flagelos polares, estas pertenecen a la familia Nitrobacteriaceae.

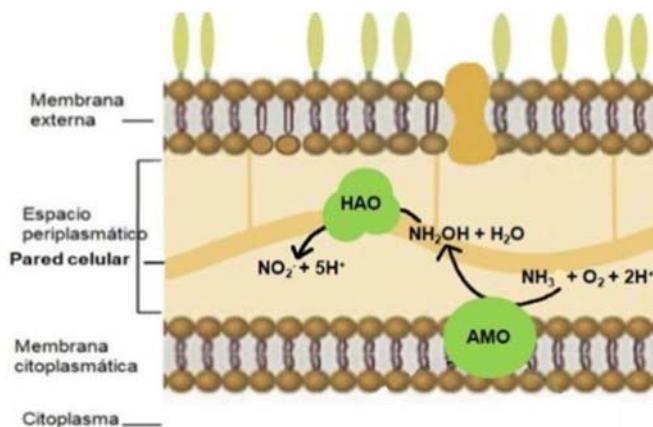
El proceso clásico de nitrificación es el resultado de la acción secuencial de dos grupos de bacterias que son: las oxidantes de amonio y las oxidantes de nitrito, que en conjunto se conocen como bacterias nitrificantes. Ellas utilizan nitrógeno en forma de amonio y nitrito como fuente de energía, y oxígeno molecular como aceptor de electrones, liberando nitritos y nitratos al suelo. El nitrato es la forma más común en que es aprovechado el nitrógeno por las plantas.



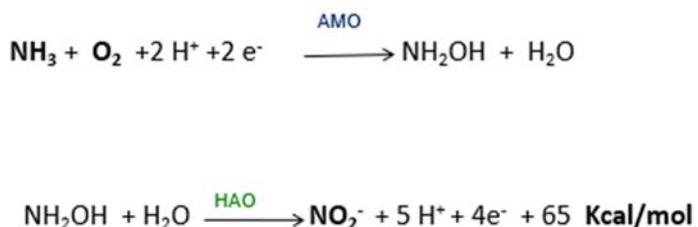
La nitrificación es un proceso que ocurre en dos etapas: **nitritación y nitratación**.

La **nitritación** consiste en la oxidación del amonio a nitrito. El amonio ingresa al citoplasma por difusión a través de la pared y la membrana bacteriana y es convertido en hidroxilamina (NH_2OH) por la actividad de la enzima amonio-monooxigenasa (AMO), que está presente en la membrana celular de los microorganismos nitritadores, esta reacción es endergónica, es decir demanda un gasto de energía para la bacteria. El proceso continúa y la hidroxilamina es oxidada a NO_2^- , por la actividad de la enzima hidroxilamina-oxidoreductasa (HAO) que se ubica en el periplasma de las bacterias nitritadoras. En este caso la energía contenida en los electrones del N es acumulada en ATP cuando los mismos son transportados a través de la cadena de transporte de electrones hacia el oxígeno, reacción que genera energía (Figura 4.4 y 4.5)

Figura 4.4



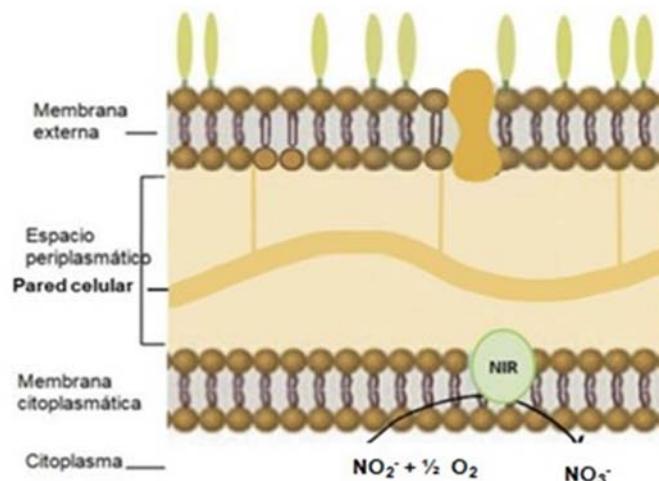
Nota. Ubicación de la enzima amonio-monooxigenasa y de la hidroxilamina-oxidoreductasa.

Figura 4.5

Nota. Reacciones de la nitritación.

El proceso de la nitritación puede generar óxido nitroso (N_2O) gas que si se pierde en la atmósfera constituye una pérdida de eficiencia del proceso. El consumo de oxígeno en este proceso es grande. Los protones generados disminuyen el pH acidificando el medio. Entre las bacterias oxidantes del amonio podemos encontrar a *Nitrosococcus nitrosus*, *Nitrosomonas europea* y *Nitrosospira briensis*. El proceso de nitritación por lo tanto incluye las dos reacciones descritas y como resultado del proceso se acumulan NO_2^- en el suelo.

La **nitratación** es llevada a cabo por un grupo de bacterias distinto al anterior, conocidas como nitratadoras, tienen la capacidad de oxidar el NO_2^- a NO_3^- , debido a que tienen la enzima nitrito-oxidoreductasa (NIR), que se encuentra en la membrana (Figura 4.6).

Figura 4.6

Nota. Ubicación de la enzima nitrito-óxido reducasa.

Figura 4.7

Nota. Reacción de la nitratación.

La enzima transfiere electrones a través de la cadena transportadora de electrones y la energía de los mismos es utilizada por la bacteria para sintetizar ATP por la vía de fosforilación oxidativa, que es la misma vía que utilizan los procesos descritos anteriormente.

El NO_3^- , como se dijo, es una de las formas en que el N se encuentra en el suelo, y es la forma en que es absorbida por los microorganismos y las plantas, en estas últimas en este estado es trasladado hacia la parte aérea. Entre los microorganismos oxidantes de nitrito se encuentra *Nitrobacter winogradsky*, *Nitrococcus mobilis*, *Nitrospira gracilis*.

La eficiencia bioquímica de los procesos es: para *Nitrosomonas* (N inorgánico oxidado/C-CO₂ asimilado) 14-70/1 y para *Nitrobacter* 76-135/1. Los oxidantes de amonio obtienen más energía de la reacción y deben metabolizar menos N por unidad de C asimilado.

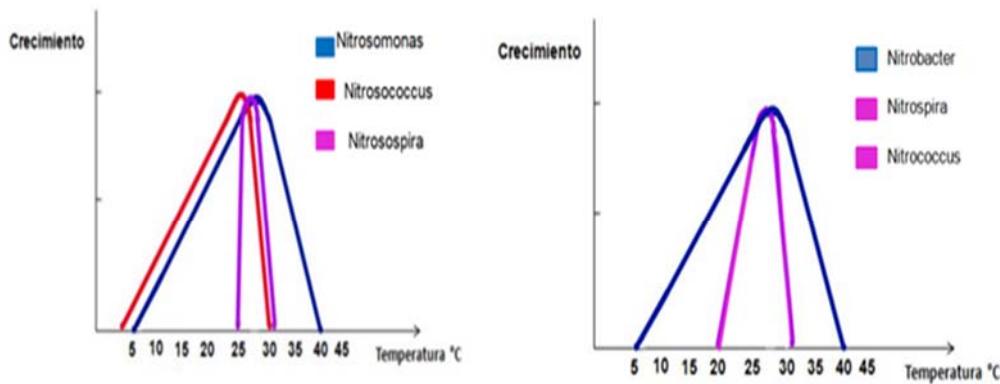
La Figura 4.8 muestra los diferentes géneros y características de las bacterias nitrificantes autotróficas. La Figura 4.9 representa las temperaturas de crecimiento de estas bacterias.

Figura 4.8

	GÉNERO	MORFOLOGÍA	HÁBITAT
$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$	Nitrosomonas	Bacilos, la mayoría con movilidad. Con 1 o 2 flagelos polares	Suelo, agua corriente y residuales, paredes de edificios.  
	Nitrosococcus	Cocos en pares o tétradas, flagelo polar	Suelo y medio marino 
	Nitrospira	Espiral con o sin movilidad, flagelos periféricos	suelo, rocas, agua  
$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$	Nitrobacter	Bacilos cortos, con o sin movilidad, flagelo polar	Suelos, agua corrientes, lagunas  
	Nitrospira	helicoidal	Suelo, medio marino, manantiales de agua caliente  
	Nitrococcus	Cocos móviles con flagelos que pueden perderse	Medio marino, halófilos obligados 
	Nitospina	formas alargadas delgadas	Medios marinos, halófilas 

Nota. Características de bacterias nitrificadoras autótrofas.

Las especies más representativas pertenecen a los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, el resto de los nitrificantes autótrofos aparecen en general en bajo número y tienen rangos estrechos de temperatura y pH para su desarrollo. En comparación con otros grupos funcionales del suelo, las bacterias oxidantes de amonio y nitrito autótrofas tienen una baja diversidad, una tasa de crecimiento lenta, sensibilidad a la acidez y a diferentes productos químicos.

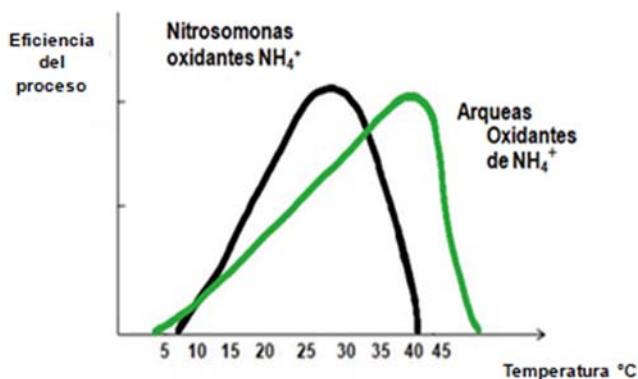
Figura 4.9

Nota. Temperatura óptima de crecimiento de bacterias nitritadoras y nitratadoras.

El proceso de nitrificación se puede realizar en el suelo, en ambientes marinos, y en procesos de depuración de aguas residuales.

La nitrificación también puede producirse por medio de microorganismos heterótrofos, los cuales utilizan compuestos orgánicos como fuente de energía para su metabolismo, con lo que sintetizan sus componentes celulares y además la utilizan para metabolizar el amonio o el nitrato, liberando nitritos o nitratos al suelo. Aunque la tasa de mineralización es menor, con un aporte a la producción de NO_3^- insignificante respecto a la nitrificación autotrófica, el proceso puede realizarse en situaciones donde los microorganismos nitrificadores autotróficos pueden ser inhibidos por la acidez del terreno, como son los suelos forestales, suelos con altas temperaturas o bajo nivel de oxígeno, incluso pueden desarrollar en el mar como es el caso de *Nitrocystis oceanus*. La oxidación de compuestos orgánicos nitrogenados produce tan poca energía que no cubre el costo energético de los procesos de biosíntesis. Aunque la eficiencia es baja, estos microorganismos se pueden encontrar en alta densidad por lo que la cantidad de N liberado al suelo puede ser importante. Entre los microorganismos heterótrofos del suelo en los cuales se ha reportado nitrificación, están las bacterias *Arthrobacter spp.*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Aerobacter aerogens*, *Proteus sp.*, *Actinomycetes* como *Streptomyces sp.* y *Nocardia sp* y los hongos *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp* y *Neurospora sp.*

En los últimos años se ha descubierto que no solo las bacterias del dominio Bacteria pueden oxidar el amonio, esta reacción también puede ser efectuada por bacterias del dominio Archaea. Las arqueas oxidantes de amonio (AOA) son microorganismos no termófilos del phylum Crenarchaeota. El avance en las técnicas empleadas para el conocimiento de las comunidades microbianas, especialmente aquellas que son independientes del cultivo, ha permitido comprender mejor el papel de las AOA en la nitrificación. Particularmente, en los suelos inundados se ha sugerido que estas podrían tener una actividad nitrificante más importante que la de las bacterias como también en suelos ácidos.

Figura 4.10

Nota. Diferencias en las temperaturas óptimas del proceso de oxidación de amonio, para Nitrosomonas y Arqueas.

Más recientemente se ha descrito el proceso conocido como OCOMA (oxidación completa del amonio a nitrato, COMMAMOX Complete Ammonia Oxidation).

Este consiste en la transformación de NH_4^+ a NO_3^- pero a diferencia del proceso descrito anteriormente en donde intervienen dos grupos de bacterias, BOA (bacterias oxidantes de amonio) y BON (bacterias oxidantes de nitrito), en el COMMAMOX interviene un solo grupo de microorganismos pertenecientes al género Nitrospira. Este posee los genes que codifican las proteínas involucradas en la oxidación de amonio y de nitrito y esta única ruta metabólica es lo que hace distinto al proceso. Simulaciones realizadas con el proceso convencional de nitrificación de dos pasos y commamox sugieren que el último podría estar convirtiendo porcentajes considerables del NH_4^+ del suelo.

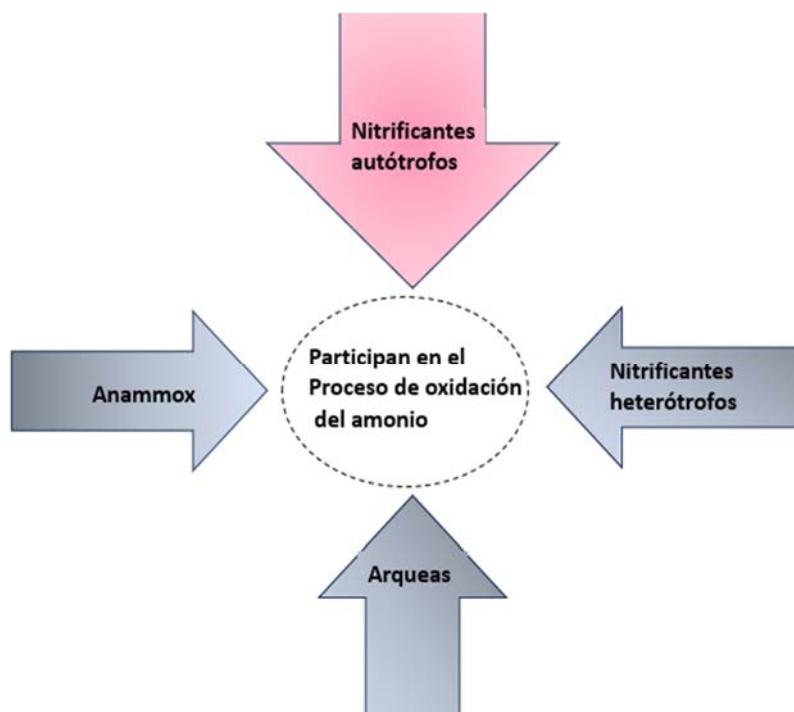
La oxidación biológica del amonio en condiciones anaeróbicas, es llevada a cabo por las bacterias denominadas ANAMMOX, (oxidación anaeróbica de amonio) son bacterias autótrofas, de crecimiento extremadamente lento que obtienen su energía para el crecimiento de la oxidación del amonio, usando nitrito como acceptor de electrones en condiciones de ausencia total de oxígeno, liberando N_2 al medio. En diferentes muestras ambientales, estos microorganismos han sido detectados por técnicas moleculares. Estas bacterias pertenecen a los géneros Brocadia, Scalindua y Kuenenia del phylum Planctomycetes y se encuentran ampliamente distribuidas en diversos ambientes que incluyen océanos, lagos y suelos. Su estudio se ha centrado como proceso ideal en el tratamiento de efluentes residuales ricos en nitrógeno, donde el amonio y nitrito se convierten directamente en nitrógeno molecular. Con este tipo de tecnologías se eliminan los intermediarios de óxidos nitrosos que contribuyen al efecto invernadero. Los organismos anammox pueden vivir en baja cantidad, pero son capaces de tener un crecimiento y metabolismo significativo cuando hay un cambio en los parámetros ambientales

que les permita crecer. La temperatura óptima del proceso ocurre entre los 20-43°C y el pH óptimo se encuentra en valores de entre 6.4-8.3

Es muy alta la contribución del proceso Anammox a nivel del ciclo global de N; se calcula que en medios marinos más del 50% de la producción de N₂ es realizada por estas bacterias. En ambientes marinos, las especies de *Candidatus Scalindua* fueron dominantes.



Figura 4.11



Nota. Distintos grupos que modifican el nitrógeno.

Condiciones ambientales que modifican el proceso de mineralización en el suelo

El proceso de nitrificación se activa cuando los suelos están bien drenados lo que hace que el oxígeno esté disponible, o sea cerca a capacidad de campo o con un 50-60% del espacio poroso ocupado por agua. En los suelos secos, la nitrificación está limitada por el efecto que la falta de agua provoca sobre el crecimiento y la actividad metabólica de las bacterias nitrificantes. Aunque tanto los nitratos (NO₃⁻) como los nitritos (NO₂⁻) pueden acumularse en el suelo o en el agua, los nitritos son más tóxicos para plantas, animales y seres humanos. Su acumulación

puede afectar la respiración celular y la salud del ecosistema, por lo que su transformación rápida en nitrato durante la nitrificación es clave para mantener el equilibrio del ciclo del nitrógeno.

La nitrificación ocurre en suelos que tienen rango de pH de neutro a alcalino. Por debajo de pH 6.0 la nitrificación disminuye y por debajo de pH 4.5 es mínima (Figura 4.12). El encalado favorece el proceso en suelos ácidos.

La mayor actividad de nitrificación se presenta cuando la temperatura se encuentra entre los 25 y 35°C; por debajo de 5°C y por encima de 40°C, el nivel de nitrificación es muy bajo.

La nitrificación es un proceso cuya actividad es una función de la disponibilidad de amonio y nitrito ya que el crecimiento y actividad de las bacterias nitrificantes, depende de la energía que genera el proceso.

La mineralización de la materia orgánica varía a lo largo del año, generalmente en zonas templadas, será mayor en otoño y primavera, comportamiento que puede ser alterado por variaciones de humedad, temperatura y prácticas agronómicas. En zonas áridas o semiáridas la mineralización puede tener variaciones espaciales, ya que se suelen desarrollar islas de fertilidad (microclima) bajo el dosel de árboles y arbustos en comparación con los espacios abiertos. Bajo el dosel, los suelos contienen mayor humedad, mayor cantidad de nutrientes que provienen de los residuos de las plantas, favoreciendo a las comunidades microbianas, por lo tanto, la nitrificación es más intensa y sobre todo cuando el dosel está formado por leguminosas, ya que estas fijan nitrógeno de manera simbiótica.

La mineralización también puede ser alterada ya que ciertas plantas son capaces de liberar compuestos químicos desde sus raíces al suelo, que actúan como inhibidores de la nitrificación en la rizósfera, este proceso se denomina inhibición biológica de la nitrificación, esto es considerado como un rasgo de la fisiología de las plantas que les confiere competitividad en el uso eficiente de N por parte de los cultivares.

Los nitratos son altamente solubles y móviles en el perfil del suelo y cuando no son absorbidos por las plantas percolan y pueden contaminar el agua subterránea o pueden ser lavados del suelo por la escorrentía superficial llegando a lagunas o ríos, limitando el uso de esas fuentes para el consumo humano. La Resolución conjunta N 22/2021 de la secretaría de calidad en salud y secretaría de alimentos, bioeconomía y desarrollo regional, establece que para que el agua sea potable deberá cumplir con el siguiente nivel guía: Nitrato máx.:45 mg/l, Nitrito máx.: 0,10 mg/l. Los nitratos se reducen en la sangre a nitritos, que se unen a la hemoglobina transformándola en metahemoglobina, de esta forma deja de transportar el O₂ a los tejidos corporales, esta condición genera una patología conocida como metahemoglobinemia.

Las arqueas tienen una distribución ubicua en el planeta y se encuentran en cantidades importantes en el suelo, en el plancton marino, en los sedimentos marino y en ecosistemas artificiales.

Estudios de metagenómica y cultivo han proporcionado pruebas de que las arqueas de ambientes terrestres y marinos son capaces de oxidar el amonio y actúan de forma importante en el ciclo del nitrógeno, al descubrir genes homólogos de la enzima amonio mono-oxigenasa. Se ha aislado una nueva cepa de arquea amonio-oxidante (AOA) *Candidatus N. maritimus*, que contiene genes para las tres subunidades, amoA, amoB y amoC de la amonio mono-oxigenasa, la enzima responsable de la oxidación del amonio.

Técnicas de PCR- DGGE, permiten estimar y evaluar la estructura de la comunidad de las arqueas en diferentes áreas. Determinadas condiciones interfieren en la actividad de las AOA del suelo, como la concentración de NH_4^+ , manejo de especies vegetales, el pH y la temperatura entre otros. Hay estudios que han reportado que las AOA se pueden adaptar a pH bajos y que crecieron tanto en bajas como en altas concentraciones de amonio, mientras que las bacterias oxidantes amonio (AOB) crecen en altas concentraciones del compuesto y pH cercano a la neutralidad. Esto sugiere que las AOA y las AOB ocupan nichos ecológicos distintos. Se considera que en suelos agrícolas es más importante el papel de las AOB en la oxidación de amonio, a pesar de la dominancia de las AOA, dado que no se ha encontrado relación entre la abundancia de AOA y las tasas de nitrificación.

Diferentes investigadores afirman que las arqueas halófilas poseen atributos como la solubilización de fósforo, mineralización de nitrógeno, producción de sideróforos, producción de ácido indol acético, por lo que las arqueas podrían ser usados como biofertilizantes para la promoción de crecimiento vegetal en suelos salinos, como alternativa para una agricultura sustentable.

Considerando la gran diversidad de microorganismos que intervienen en el proceso de nitrificación está claro que este ocurre en diferentes condiciones, aunque las tasas de producción de NO_2^- y NO_3^- más importantes se generan con las bacterias nitrificantes autótrofas los cuales necesitan una temperatura, pH y humedad determinada para que el proceso se desarrolle a su mayor potencial.

Pérdida del NO_3^- del suelo

Desnitrificación

Las dos formas de pérdida más importantes de NO_3^- son la desnitrificación y la lixiviación.

La desnitrificación es un proceso de transformación del N, llevado a cabo por microorganismos no relacionados filogenéticamente, que en condiciones de baja tensión de oxígeno, respiran utilizando al NO_3^- como acceptor de electrones. El proceso de reducción de NO_3^- a N_2 , es catalizado por un conjunto de enzimas, cada una de las cuales libera productos intermedios como nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y finalmente nitrógeno molecular (N_2) que se pierde como gas y va a la atmósfera.

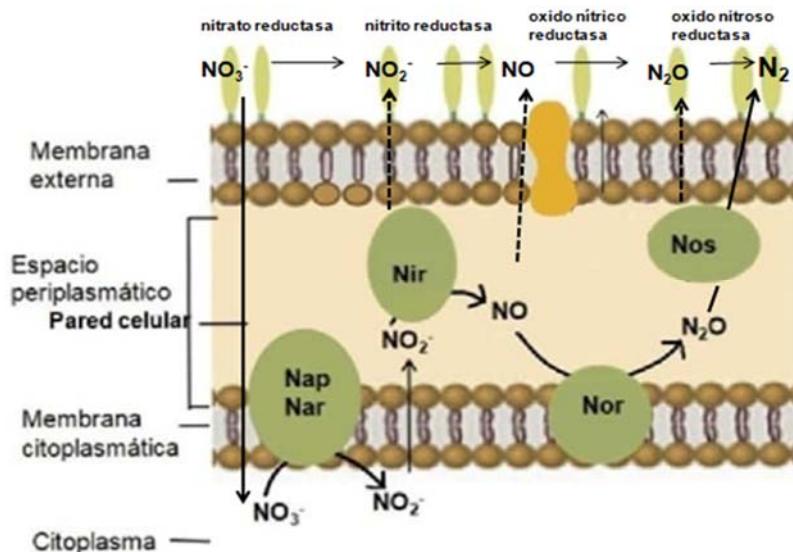
La desnitrificación es llevada a cabo generalmente por bacterias anaerobias facultativas, heterótrofas, y ocurre en ambientes con baja tensión de oxígeno, ya que el proceso es una respiración anaeróbica que genera ATP y poder reductor. Esto ocurre en el sedimento de cuerpos de agua como ríos y lagos, cuando hay presencia de materia orgánica y de nitratos y la cantidad del oxígeno disuelto es baja. También ocurre en suelos anegados o con alta humedad como pueden ser los arrozales, o en suelos que tengan densidades aparentes altas, generadas por procesos de compactación llevados a cabo por maquinaria pesada o por el pisoteo continuo de animales. La desnitrificación es, en síntesis, una reducción que conduce a la desasimilación de NO_3^- del suelo y consecuentemente una pérdida de N del sistema.

La reducción del nitrato también es realizada por los microorganismos o por las plantas, estos forman amonio y este es asimilado a esqueletos carbonados para formar compuestos nitrogenados celulares, a este proceso se lo conoce como reducción asimilativa del N.

El proceso de desnitrificación sigue una ruta metabólica donde la baja concentración de O_2 origina una cascada de señalización que comienza en la pared celular y termina en la producción de enzimas que se ubican en la membrana o el espacio periplasmico en donde reducen las diferentes formas de N, (Figura 4.12).

La desnitrificación es un proceso metabólico de óxido reducción que altera el estado de oxidación del N que ocurre por la actividad de los microorganismos del suelo, en etapas. Estas constituyen la secuencia de pasos de la reducción del N, cada uno de los cuales es catalizado por la actividad de enzimas específicas como, la nitrato reductasa (Nar), la nitrito reductasa (Nir), la óxido nítrico reductasa (Nor), y la óxido nitroso reductasa (Nos). Cuando las condiciones aeróbicas se establecen las bacterias continúan respirando aeróbicamente ya que la célula obtiene una eficiencia energética más alta de la reducción del O_2 que de la reducción del NO_3^- .

Algunas de las enzimas son inhibidas por la presencia del O_2 , como la nitrato reductasa de la membrana y como la nitroso reductasa, pudiendo detenerse el proceso, en este caso quedando N_2O como producto de la reacción.

Figura 4.12

Nota. Proceso de desnitrificación y enzimas involucradas.

No todos los organismos desnitrificadores poseen el complejo total de enzimas para llevar a cabo el proceso completo. Es decir que diversos microorganismos pueden generar distintas formas moleculares de N. Así, la diversidad de microorganismos puede conducir a una desnitrificación completa o incompleta. Las bacterias desnitrificadoras verdaderas, contienen el complejo enzimático completo que cataliza la reducción del NO_3^- hasta N_2 , lo que ocurre en condiciones de baja concentración de O_2 (0,2 mg/L en medio líquido) es decir anaeróbicas, algunos ejemplos de desnitrificadoras verdaderas son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Micrococcus*.

Se conocen microorganismos autótrofos que desnitrifican, oxidando un sustrato mineral como S° , H_2S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, como fuente de energía y utilizando CO_2 como fuente de carbono, sin embargo, su número en el ecosistema no es alto y por ello las mayores pérdidas de nitrógeno ocurren como resultado de la actividad de microorganismos heterótrofos. Sin embargo, los microorganismos autótrofos son útiles para el tratamiento de agua potable que carece de carbono. *Thiobacillus desnitriticans* y *Thiobacillus thioparus* son ejemplos de bacterias que pueden remover el N del agua. Son bacterias mesófilas, con un óptimo de temperatura entre 25-35°C y pH óptimo 7-8, con valores menores de 7 se producen compuestos intermedios de N y por debajo de 6 y por encima de 9 el proceso es muy limitado.

Otro proceso no convencional es la desnitrificación llevada a cabo por bacterias nitrificantes; se encontró que *Nitrosomonas europea* es capaz de reducir el NO_2^- a N_2O y N_2 en condiciones limitantes de O_2 .

Algunos hongos saprófitos pueden producir N_2O y N_2 en presencia de nitratos y nitritos cuando la concentración de O_2 es baja y en arqueas también se observó capacidad desnitrificadora.

Factores que favorecen la desnitrificación

El grupo de organismos desnitrificadores está formado por pocos géneros de bacterias en las que el ambiente tiene un impacto relevante, lo que sugiere que las prácticas agrícolas podrían modificar sustancialmente el proceso.

Debido a que los microorganismos desnitrificadores durante la respiración celular, sustituyen al O₂, por el NO₃⁻ la presencia de esta forma mineral de N es clave. Otra característica de los organismos desnitrificadores es que en su mayoría son heterótrofos y quimioorganótrofos, por lo cual la disponibilidad de materia orgánica en el suelo condiciona la actividad de estos microorganismos. La materia orgánica provoca que haya aumento en el número de microorganismos del suelo, la mayoría aerobios, que mediante la respiración disminuyen el nivel de O₂, facilitando la desnitrificación.

La concentración de O₂ está sujeta al contenido de agua del suelo, a su capacidad de drenaje, y a su compactación. En un evento de precipitación y anegamiento, la concentración de O₂ disminuye creando un ambiente anaeróbico que desencadena la utilización de NO₃⁻ por los microorganismos desnitrificantes. Cuando el contenido de humedad en el suelo es mayor al 75% favorece al proceso de desnitrificación y se libera N₂.

La temperatura es uno de los principales factores ambientales que afectan la desnitrificación; a medida que aumenta la temperatura, va aumentando la tasa de emisión de N porque disminuye la solubilidad de los gases en la solución del suelo. Aunque cuando esta es baja la desnitrificación también ocurre. El proceso es óptimo a pH neutro, coincidente con la máxima actividad bacteriana,

La textura del suelo también afecta el proceso, los suelos de textura fina tienen mayores emisiones que los de textura gruesa.

Periodos de desecación y anegamiento del suelo (lluvia intermitente) favorece los procesos de nitrificación y desnitrificación. Estudios realizados muestran que en ciclos de 10 días húmedos y 10 días secos pueden remover un 67% del N de la materia orgánica.

Las tasas de desnitrificación también pueden variar según el ciclo del cultivo, hay trabajos que señalan mayor tasa de desnitrificación en el suelo al comienzo de la estación de crecimiento de las plantas, lo que se atribuye a una mayor disponibilidad de carbono en la rizósfera, luego en estadios posteriores las menores tasas de desnitrificación se atribuyen al consumo de nitrógeno por parte del cultivo, lo que disminuye la disponibilidad de nitratos en el suelo.



Para reducir la pérdida de N se recomienda evitar el empleo de fertilizantes nítricos o utilizar inhibidores de la nitrificación. La desnitrificación es responsable de la pérdida de N en los suelos

agrícolas, pero también ocurre en ecosistemas naturales, afectando la calidad ambiental, porque se libera a la atmósfera N₂O, gas de efecto invernadero, que produce la destrucción de la capa de ozono.

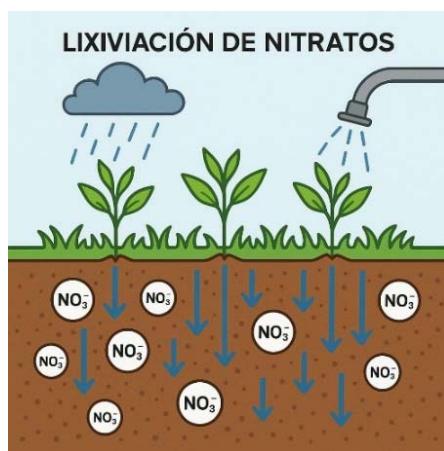
La desnitrificación es vital en la continuidad del ciclo de nitrógeno, si no ocurriera este proceso el N se acumularía, impidiendo la vida terrestre. A escala global, la cantidad de nitrógeno perdido por desnitrificación puede ser balanceada por fijación biológica del nitrógeno en ecosistemas terrestres y marinos. Estudiar los procesos de nitrificación y desnitrificación incorpora conocimientos útiles por lo que se podría aumentar la productividad agrícola, cuidando la calidad del ambiente.

Lixiviación

La lixiviación del nitrógeno es el lavado de los nitratos del perfil del suelo y se produce cuando los mismos son arrastrados fuera de la zona de absorción de las raíces de las plantas, por lluvias intensas o el riego excesivo (Figura 4.13). Este proceso es más importante en suelos arenosos, también cuando hay alta concentración de nitratos en la solución del suelo debido a las fertilizaciones y a condiciones de alta humedad en el suelo, lo que determina que al producirse precipitaciones intensas el agua percola en el perfil arrastrando los nitratos, que son móviles.

La eficiencia del uso de fertilizantes nitrogenados en agroecosistemas se considera que es baja, principalmente a causa de las pérdidas atribuidas a procesos como la lixiviación de los nitratos; lo que conduce a la contaminación de acuíferos como también a la eutrofización de las aguas superficiales.

Figura 4.13



Relación Carbono/Nitrógeno (C/N)

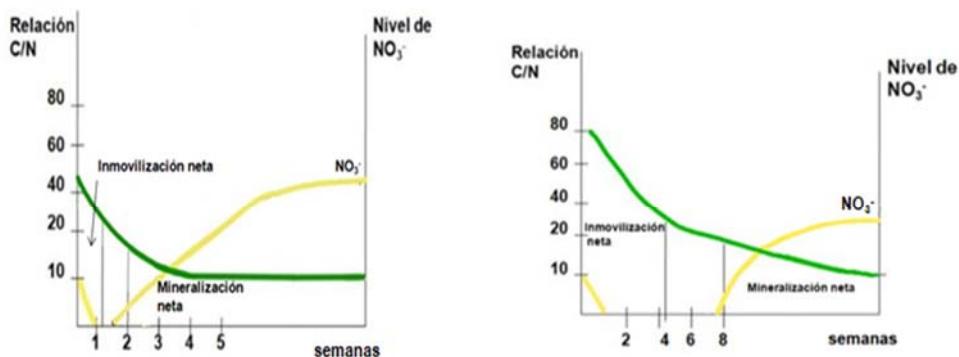
La relación carbono/nitrógeno (C/N) se conforma considerando el contenido de C orgánico y N total del suelo o del rastrojo y se considera como un estimador de la velocidad del proceso de mineralización de la materia orgánica del suelo.

Al incorporar un material vegetal al suelo se desencadenan distintos procesos que dependerán de la relación C/N del mencionado material. Las plantas tienen generalmente un contenido de carbono similar, 40% del peso seco, pero el contenido de nitrógeno puede variar según la especie y estado de madurez de la planta, por lo que habrá diferencias en la relación C/N (trébol 3,14% N; paja de trigo 0,5 %N). A esto se debe además considerar que ciertas especies de plantas tienen una mayor capacidad para removilizar el N de sus tejidos. Cuando se agrega al suelo un material orgánico, los microorganismos encargados de la descomposición asimilarán el N disponible para formar compuestos nitrogenados y se multiplicaran, por lo que habrá inmovilización de los nutrientes, que serán liberados posteriormente por procesos de excreción o cuando se produce la muerte de las comunidades bacterianas desarrolladas.

Al oxidar la materia orgánica, los microorganismos liberan CO₂ por medio de la respiración, de esta manera se reduce la cantidad de compuestos carbonados, lo que conduce a que se reduzca la relación C/N, llegando a valores de 25-30/1. La actividad microbiana se reduce y aumenta el proceso de mineralización, por lo que aumenta el contenido de los nitratos en la solución del suelo. El valor de equilibrio de la relación C/N del suelo es de 10/1, valor que tienen los microorganismos y el humus.

Cuando se incorpora al suelo rastrojo con alta relación C/N (70-80/1) por ejemplo rastrojo de trigo o de sorgo, al inicio del proceso de degradación habrá un incremento de la actividad microbiana y los microorganismos utilizarán la escasa cantidad de N del material que se agregó, entonces utilizan una cantidad considerable de los NO₃⁻ presentes en el suelo, por lo que en una primera fase habrá un predominio de la inmovilización sobre la mineralización. El proceso de mineralización será lento, y los nutrientes no estarán disponibles para los cultivos hasta pasadas varias semanas. En contraposición, si se adiciona material orgánico con baja relación C/N (35-40/1) por ejemplo rastrojo de soja, el proceso de inmovilización será de menor duración, debido a la mayor cantidad de N presente y habrá predominio de la mineralización en menor tiempo, estando disponibles los NO₃⁻ en el suelo; siempre que los factores bióticos y abióticos sean los adecuados, siendo las temperaturas del suelo y la humedad los más determinantes.

En la Figura 4.14 se presentan dos ejemplos de adición de materia orgánica con diferente relación C/N. El periodo de inmovilización y mineralización será para cada uno de ellos de distinta duración. También se observa cómo se modifica la cantidad de nitratos a lo largo del tiempo. El NO₃⁻ que estaba presente en el suelo se inmovilizará debido a que es asimilado por los microorganismos, y no se detectará en la solución del suelo durante los primeros días, para volver a hacerse presente a medida que va produciéndose la mineralización.

Figura 4.14

Nota. Mineralización de rastrojo con baja y alta relación C/N. y la variación de nitratos en el suelo.

Además del valor absoluto de la relación C/N, la calidad de los constituyentes carbonados y nitrogenados del rastrojo ejerce una fuerte influencia sobre la dinámica del N en el suelo; por ejemplo, restos vegetales con alta cantidad de lignina son degradados más lentamente, de la misma manera que rastrojos con bajo contenido de N. En la Figura 4.15 se muestra la velocidad de descomposición según la relación C/N de distintos materiales.

La mineralización e inmovilización si bien pueden ocurrir simultáneamente en el suelo, frecuentemente uno predomina sobre el otro. Mientras que la mineralización resulta en un aumento en la disponibilidad del N mineral (N disponibles para las plantas), la inmovilización resulta en una reducción. La mineralización neta es la cantidad de nitrógeno que se encuentra disponible en el suelo, después de restarle el nitrógeno de la inmovilización microbiana y se usa para estimar el nitrógeno disponible para las plantas. Otro proceso que ocurre en el suelo es la humificación, donde la materia orgánica del rastrojo es transformada por procesos de degradación y síntesis formando ácidos húmicos y fúlvicos.

Figura 4.15

Material	Rastrojo de centeno	Rastrojo de trigo	Rastrojo de maíz	Rastrojo de leguminosas	Estiércol vacuno	Vicia estado vegetativo
Relación C/N	82/1	70-80/1	60/1	35-40/1	20/1	11/1
Velocidad de degradación	-	+	+			

Nota. Velocidad de descomposición según la relación C/N de diferentes materiales.

En general, sustratos que contienen más de 1,8% de N favorecen la mineralización neta mientras que los rastrojos que posean entre 0,5 -1,5 % de N, favorecen la inmovilización neta. La inmovilización por parte de los microorganismos también puede producirse durante períodos

de sequía, donde los microorganismos incorporan solutos para ajustarse osmóticamente a la ausencia de agua en el suelo, inmovilizando nutrientes disponibles en el medio.

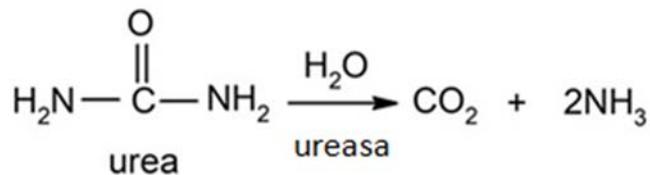
La utilización de abonos verdes es una técnica de manejo cada vez más empleada. Un abono verde es cualquier especie herbácea o forrajera, que se siembra y se incorpora al suelo, mientras está verde o antes de su floración, con el propósito de mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas. El uso de estos cultivos de cobertura puede controlar la erosión, reducir la compactación, minimizar la lixiviación de nitratos residuales, contribuir al aumento de la materia orgánica, ya que entre el 20 y el 30% de la materia seca permanece en el suelo como materia orgánica estable, también puede controlar malezas y aportar N mineral al cultivo siguiente.

En zonas templadas, las especies más utilizadas son generalmente las pertenecientes a las familias gramíneas y leguminosas. Los residuos o rastrojos con baja relación C/N, como los que se generan con leguminosas, liberan más rápidamente el N al suelo, aumentando la disponibilidad para los microorganismos y posteriormente al cultivo. Los incrementos temporales en la actividad de las bacterias nitrificantes podrían permitir una disminución en el uso de fertilizantes nitrogenados o aumentar los *pools* de N disponible del sistema. Conociendo la relación C/N del material que se agrega al suelo se puede lograr una óptima sincronía entre el nitrógeno liberado y la absorción por el cultivo y, por ende, un manejo adecuado de los abonos verdes.

El tamaño y el estado del material que se agrega al suelo también determinan la velocidad del proceso, material fresco y picado será más rápidamente mineralizado que un material seco; como también variará la velocidad del proceso si el material se deja en superficie o si se entierra. Al quedar en la superficie actúa de aislante de la temperatura del suelo, en cambio al enterrarlo aumenta la temperatura y por lo tanto la mineralización.

Actualmente la búsqueda de tecnologías que permitan hacer un uso más eficiente del nitrógeno y disminuir las pérdidas, ha conducido al estudio de nuevos materiales capaces de mejorar su eficiencia de uso a través de la sincronización del N aportado con los requerimientos del cultivo. Fertilizantes de liberación lenta o controlada como la urea ESN (environmentally smart nitrogen) disminuyen las cantidades de N contaminante ya que los mismos están encapsulados en una cubierta constituida por un polímero especial que va degradándose con el tiempo, lo que conduce a un mejor aprovechamiento del fertilizante por el cultivo, y favorece en términos de beneficio económico, ya que permite reducir la dosis de N aplicado.

La urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ es el fertilizante más utilizado en el mundo, aunque sufre grandes pérdidas de N antes de ser absorbida por el cultivo, ya que su degradación es muy rápida y también debido a que gran parte de los microorganismos tienen la capacidad de degradar urea por actividad enzimática (ureasa).



Para que la descomposición sea más lenta se emplean compuestos químicos que tienen efecto bacteriostático sobre las poblaciones de microorganismos. El Tiofosfato de N-n-butiltriamida (NBPT) es un compuesto que actúa como inhibidor de la enzima ureasa para evitar pérdidas por lixiviación o volatilización. También se recomienda incorporar los fertilizantes a unos pocos centímetros del suelo reduciendo las pérdidas de N entre un 25 y un 75% comparado a cuando estos fertilizantes son dejados solamente sobre la superficie del suelo.

La nitrificación también puede modificarse usando compuestos como la diciandiamida ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4$) (DCD) la cual tiene efecto bacteriostático específico para el género *Nitrosomonas*; el 3,4 DMPP (3,4 dimetil Pirazol Fosfato) es actualmente uno de los inhibidores de la nitrificación más eficientes, ya que tiene la capacidad de inhibir el desarrollo de las bacterias y actúa como bactericida. El éxito del método depende de la velocidad a la que los microorganismos degradan al inhibidor.

Actualmente en países desarrollados existen programas que tienen el fin de reducir las emisiones de gases de nitrógeno, donde establecen límites de reducción de amoniaco para el año 2030. Como una parte de las emisiones provienen de la utilización de fertilizantes nitrogenados, se están desarrollando y fomentando técnicas para reducir las emisiones ligadas a las fertilizaciones con urea, como son el enterramiento y, por otro lado, la utilización de inhibidores de la ureasa o de la nitrificación.



Eutrofización

La eutrofización es uno de los procesos más frecuentes de deterioro del agua a nivel mundial, que se encuentra estrechamente relacionado con la actividad humana. Este proceso está provocado por el exceso de nutrientes en el agua, principalmente nitrógeno y fósforo, que en un ecosistema generalmente se encuentran en cantidades limitadas. El N y el P proceden mayoritariamente de la actividad del hombre: fertilizantes utilizados en la agricultura, excretas de los animales en la ganadería, aguas residuales urbanas con detergentes ricos en fosfatos, descargas industriales de efluentes con compuestos nitrogenados y fosfatados, las emisiones de óxidos de nitrógeno y azufre que reaccionan en la atmósfera produciendo lluvia ácida, llevando nutrientes de este modo a las masas de agua. Un ecosistema eutrofizado es aquel caracterizado por una abundancia anormalmente alta de nutrientes, de forma que se produce una proliferación desmesurada de algas y cianobacterias que forman una capa en la superficie, que impide el paso de la luz solar y como consecuencia, se impide la fotosíntesis productora de oxígeno libre en la masa de agua. A la vez, a medida que las algas mueren y se acumulan en el fondo, aumenta la descomposición de la materia orgánica y se genera un ambiente anaeróbico, afectando la supervivencia de otros organismos. La eutrofización tiene impactos como el aumento del costo de depuración del agua para uso humano; también produce modificaciones en el ecosistema afectando a los organismos acuáticos y afecta el uso recreativo o turístico de los cuerpos de agua.

La reducción de la cantidad de fosfatos y nitratos en los vertidos, una utilización más eficiente de fertilizantes y el tratamiento de los efluentes previo a su disposición final, son medidas que pueden implementarse para evitar la eutrofización. Las bacterias nitrificadoras y desnitrificadoras, en los sistemas de tratamiento de efluentes regulan los excesos de nitrógeno en los sistemas de tratamiento.

Referencias

- Andrade Ochoa, S; Erosa de la Vega, G y Nevarez Moorillon, G. (2015). Amonio-oxidasa bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. *Terra Latinoamericana*, 33 (3)233-245. ISSN 2395-8030.
- Barrios, M; Killorn, R y Garcia, J. (2010). Nitrificación del amonio a partir de un fertilizante de liberación controlada y urea convencional en dos suelos de Iowa, EEUU. *Bioagro*, 22(3)193-200. ISSN 1316-3361.
- Boccolini M F, Aimetta B, Cazorla C y Conde B. (junio de 2013). Efecto del residuo de vicia (*Vicia sativa L.*) sobre el potencial de nitrificación del suelo. Contribución de los cultivos de cobertura a la sustentabilidad de los sistemas de producción. 83-86. Ediciones INTA EEA Anguil.
- Boccolini, M F. (2016). Impacto de la aplicación prolongada de urea sobre la comunidad de bacterias oxidantes del amoníaco en un suelo argiudol típico de Argentina. (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Córdoba.
- Celaya H. M y Castellanos Villegas A. E. (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas - *Terra Latinoamericana*, 29(3)343-356
- Cerón Rincón, L. E., y Ancízar Aristizábal Gutiérrez, F. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285-295.

- Cortada, A., y González, J. S. (2004). Aplicación de microorganismos de acción dirigida en procesos de nitrificación y desnitrificación biológica. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 14(2), 70-82.
- Culchac Cuaran, L. Y, Estrada Marcillo J. S, y. Ordóñez Jurado H. R. (2021). Cuantificación de bacterias nitrificantes en un suelo Typic Melanudands. En Tres Condiciones de uso de suelo Colombia. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 22(2), doi:10.219. art:1424.
- de Sá Pereira, E., Galantini, J., & Quiroga, A. (2017). Calidad de cultivos de cobertura en sistemas de siembra directa del sudoeste bonaerense. *Ciencia del suelo*,35(2), 337-350.
- Frioni L (2006). Microbiología básica, ambiental y agrícola. Universidad de la República, Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
- Kuenen, J.G. (2020). Anammox y más allá. *Microbiología Ambiental*. 22(2)525-536. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14904>
- Madigan, M; Martink O, J. and Parker, J. Brock. (2003). Biología de los microorganismos. 10^a. Edición. Madrid: Pearson- Prentice Hall.
- Qing Qiao Jiang, L. R. Bakken. (1999). Comparación de cepas de *Nitrosospira* aisladas de ambientes terrestres. *FEMS Microbiology Ecology*. 30(2)171-186.
- Rivera, G. M. y Darmys Pérez. (1999). Efecto de la temperatura sobre la mineralización del nitrógeno de dos especies de abonos verdes en suelo ferralítico rojo. *Cultivos Tropicales* 20(2)15-19.
- Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G., & Zuberer, D. A. (2005). *Principles and application of soil microbiology* (No.QR111 S674 2005).New Jersey .Pearson.

CAPÍTULO 5

Fijación de nitrógeno

Graciela N. Pastorino y Pedro A. Balatti

¿Qué es la fijación de nitrógeno?

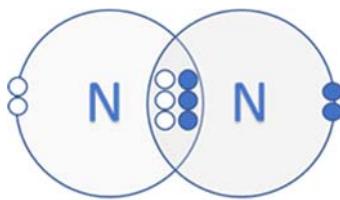
El nitrógeno (N) es un elemento que está presente en grandes cantidades en la atmósfera, en donde se encuentra como N₂ (dinitrógeno o nitrógeno molecular), que constituye el 78% del aire. Dos átomos de N se unen por tres uniones covalentes logrando de esta manera una estabilidad, que vuelven al N₂ no reactivo, con muchas similitudes a los gases nobles (Figura 5.1). Por esto el N₂ de la atmósfera no está disponible para los seres vivos, excepto para un grupo de microorganismos que tienen en común la capacidad de sintetizar una enzima, la nitrogenasa, que metaboliza al N₂. Estos organismos realizan la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), e incluyen diversos representantes bacterianos de grupos específicos como los rizobios, las cianobacterias y los actinomicetes, entre otros. Este grupo de microorganismos representa una fuente fundamental de nitrógeno para los ecosistemas.

El proceso de fijación de nitrógeno consiste en romper ese triple enlace estable de manera de reducir el N₂ y generar NH₄⁺ (amonio) que es asimilado por los organismos, proceso que requiere gran cantidad de energía (ATP) y poder reductor, que ocurre a temperatura ambiente y presión atmosférica. El N que se incorpora a los ecosistemas ingresa como amonio, que es asimilado por los organismos, de manera que pasa a formar parte de un esqueleto carbonado formando aminoácidos, y estos son los insumos clave para la síntesis de proteínas y el crecimiento.

La FBN genera unos 100 a 140.000 millones de kg.año⁻¹ de N reactivo, mientras que otro proceso que también fija nitrógeno, pero de manera fisicoquímica, son las descargas eléctricas, 1.000 millones de kg.año⁻¹ de N reactivo, aproximadamente.

Esta estabilidad del N₂ es la que hace que la producción de fertilizantes nitrogenados se realiza a altas temperaturas y presiones, lo que demanda un consumo importante de combustible fósil y por eso es costosa. El proceso industrial conocido como Haber Bosch reduce el N atmosférico a amonio, el triple enlace de la molécula de N₂ se rompe a temperaturas entre 400 a 500°C, y presiones de 100 a 200 atmósferas, generando un gasto de 8.000 kilocalorías por kilo de nitrógeno reducido, para producir un kilo de fertilizante nitrogenado. De manera similar, la enzima nitrogenasa de los organismos fijadores, para romper las moléculas de nitrógeno e incorporarlo a la materia orgánica gasta mucha energía, 4.000 kilocalorías por kilo de nitrógeno.

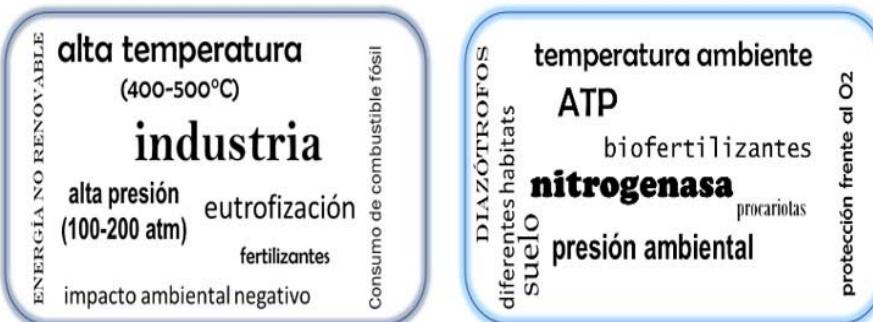
Figura 5.1



Nota. Molécula de N₂, con triple enlace covalente.

Sin embargo, se debe destacar que la FBN se produce en condiciones de temperatura y presión ambiental, es decir que además de ser más eficiente porque gasta menos kilocalorías por kilo de N, genera también moléculas más estables de nitrógeno (nitrógeno unido a cadenas carbonadas) en el suelo (Figura 5.2).

Figura 5.2



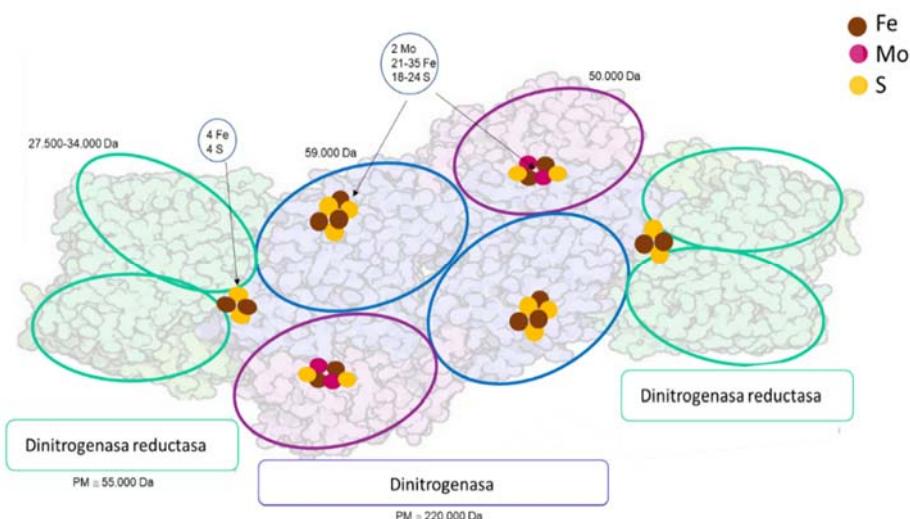
Nota. Palabras clave relacionadas con los dos procesos principales que reducen el N₂: Haber Bosch (a la izquierda) y Fijación Biológica (a la derecha).

Proceso de fijación biológica de nitrógeno

La enzima nitrogenasa es un complejo enzimático, formado por dos metaloproteínas:

- el componente I, llamado ferromolibdoproteína, MoFe proteína, o dinitrogenasa, que consiste en un tetrámero (dos copias de dos subunidades) que contienen centros redox Fe-S y Mo.
- el componente II, más pequeño, dímero de dos subunidades iguales, que interactúa solo con Fe, por eso se la conoce como ferroproteína, Fe proteína o dinitrogenasa reductasa (Figura 5.3).

El PM de la MoFe proteína es de 220.000Da, en tanto que la Fe proteína es de 55.000Da, aproximadamente.

Figura 5.3

Nota. Esquema del complejo enzimático Nitrogenasa. Se indican los sitios activos con los átomos de Fe-Mo y S de cada polipéptido.

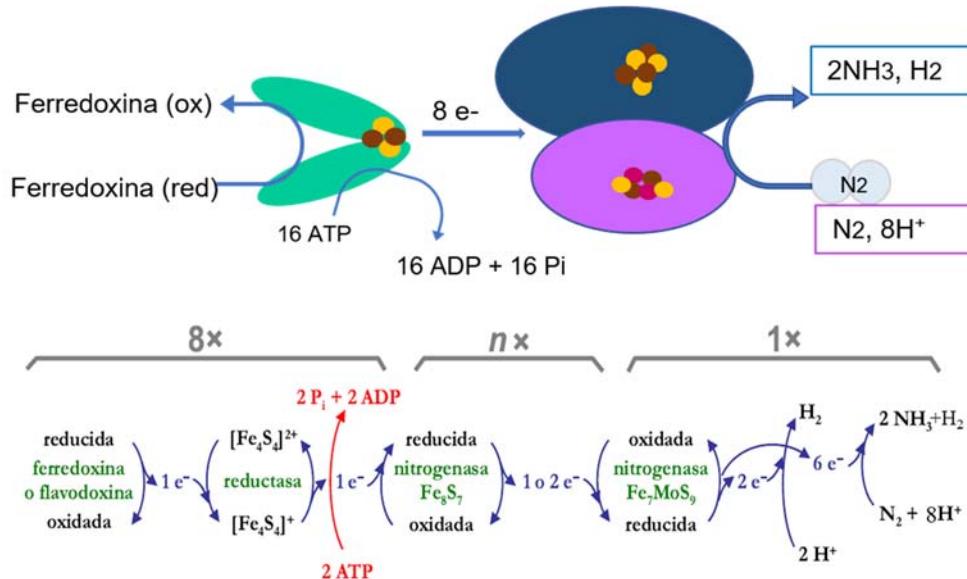
En el proceso de fijación biológica del nitrógeno, el polipéptido más pequeño del complejo nitrogenasa, la dinitrogenasa reductasa (también conocida como componente Fe-proteína), recibe electrones de una ferredoxina o flavodoxina, que poseen un bajo potencial redox. Esta proteína hidroliza ATP en ADP y Pi (fósforo inorgánico), utilizando la energía liberada para transferir los electrones con un aumento en su potencial reductor hacia la dinitrogenasa (componente MoFe-proteína). La dinitrogenasa utiliza estos electrones de alta energía para reducir el nitrógeno molecular (N_2) a amonio (NH_4^+). La transferencia ocurre de a un electrón por ciclo, requiriéndose 2 moléculas de ATP por electrón transferido. Por lo tanto, para reducir una molécula de N_2 (que requiere 8 electrones), se necesitan 16 ATP.

Este proceso reductivo, llevado a cabo por los organismos que fijan N_2 , varía en su eficiencia, ya que parte de los electrones reducen el protón (H^+), liberando H_2 , que es una pérdida de energía del sistema (Figura 5.4).

El complejo de la nitrogenasa está codificado por un conjunto de genes que se agrupan en los regulones *nif* y *fix*, que albergan los genes que codifican a todas las proteínas reguladoras y estructurales relacionadas con la fijación de nitrógeno (Figura 5.5).

Los genes que regulan la nitrogenasa son parte de un operón complejo llamado regulón *nif*. Si bien el gen *nifH* es el más conservado muchas veces se producen recombinaciones entre los genes de dos organismos.

La proteína MoFe está codificada por los genes *nifDK*, y es un heterodímero ($\alpha_2\beta_2$) (4 polipéptidos). Los otros cuatro polipéptidos, que forman la proteína Fe, codificada por el gen *nifH*, es un homodímero.

Figura 5.4

Nota. Reacción de reducción del N₂, catalizada por el complejo de la enzima nitrogenasa. Los electrones son transferidos a la ferredoxina (o flavodoxina), que se reduce. Luego los electrones reducen la Fe proteína (dinitrogenasa reductasa), quedando la ferredoxina o flavodoxina oxidada. El ATP se une a la Fe proteína y su posterior hidrólisis confiere energía para transferir electrones a la dinitrogenasa. La Fe proteína reduce a la MoFe proteína y ésta transfiere electrones al N₂ para reducirlo a NH₃. En paralelo, se forma una molécula de H₂. Esquema adaptado de Taiz y Zeiger (2006).

Regulación de la Fijación de Nitrógeno

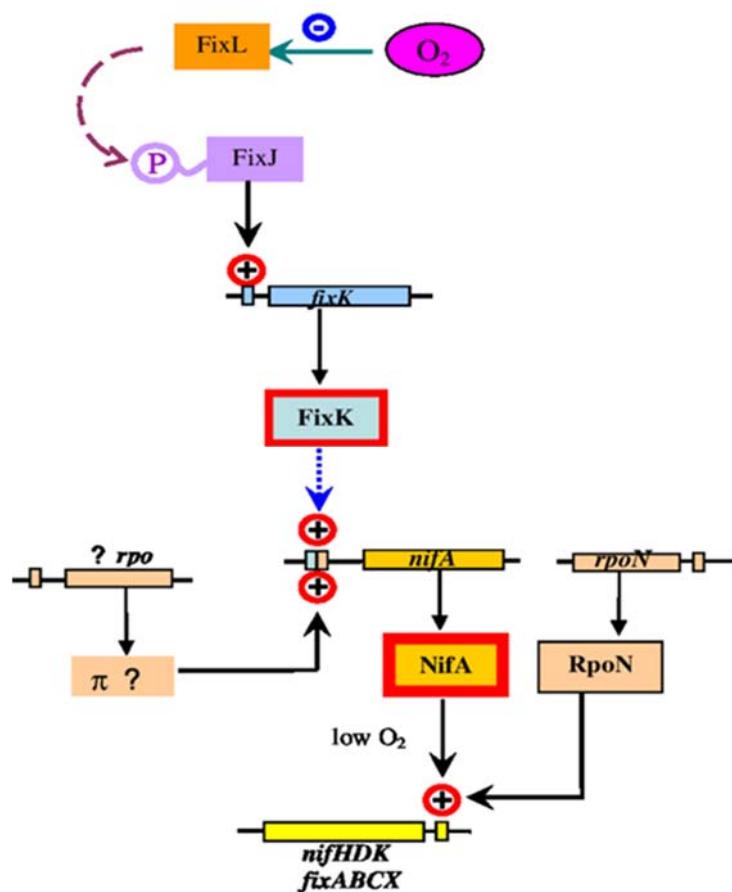
La regulación de la fijación de nitrógeno está gobernada por genes regulados por las condiciones ambientales. NifA un activador transcripcional, activa los genes *nifHDK* que codifican los péptidos que conforman la nitrogenasa y otras proteínas. En algunos rizobios el sistema de dos componentes FixL/FixJ está involucrado en el control transcripcional de los genes *nif*, lo que está en relación con la disponibilidad de oxígeno. En condiciones microaerofílicas, FixL se autofosforila y le transfiere el fosfato a FixJ que de esta manera activa la expresión de otros genes reguladores como *nifA*, que regulan la expresión de *nifHDK*, y *fixGHIS*, proteínas que intervienen en la fijación y respiración. Esto es tan así, que FixL, FixJ, NifA y FixK están conservados en los rizobios, solo difieren en su conectividad y proteínas sobre las que impactan. En *Sinorhizobium meliloti* el sistema FixL/FixJ controla directamente la transcripción de *nifA* y *fixK*. NifA activa 19 genes, incluyendo los genes *fixN*, *fixB*, *fixABCX*, *fixU*, *nifHDKEX*, *nifB*, *nifV*, y FixK activa 97 genes incluyendo los genes de respiración (*fixNOQP*, *fixGHSI*, *cysB2*), genes regulatorios (*fixT*, *fixM*) los genes de desnitrificación (*napEFDABC*, *nodRZDFYLX*, *norBCE*).

Función	
Genes de Fijación de Nitrógeno	
<i>rpoN</i>	ç54
<i>modC</i>	Transporte de Molibdeno; proteínas de unión-ATP
<i>modB</i>	Transporte de Molibdeno; permeasa proteica
<i>Moda</i>	Transporte de Molibdeno; proteína periplásmica de que se une a molibdeno
<i>nifA</i>	<i>Activador Transcripcional</i>
<i>nifB</i>	Cofactor de síntesis Fe-Mo
<i>fdxN</i>	Ferredoxina
<i>nifZ</i>	Maduración y activación
<i>nifH</i>	Estructura de la nitrogenasa; Proteína Fe
<i>nifD</i>	Estructura de la nitrogenasa Subunidad proteica alfa de Fe-Mo
<i>nifK</i>	Estructura de la nitrogenasa Subunidad proteica beta de Fe-Mo
<i>Nife</i>	Estructura de la nitrogenasa Subunidad proteica beta de Fe-Mo
<i>nifN</i>	Cofactor de síntesis Fe-Mo
<i>nifX</i>	Cofactor de síntesis Fe-Mo
<i>fdxB</i>	Ferredoxina
<i>nifQ</i>	Cofactor de síntesis Fe-Mo
<i>nifU</i>	Maduración y activación; ensamblaje de clusters de Fe y Azufre
<i>nifS</i>	Maduración y activación Desulfurasa cisteínica homodimérica
<i>nifV</i>	Cofactor de síntesis Fe-Mo; homocitrato sintasa
<i>nifW</i>	Maduración y activación; proteína Fe-Mo de protección frente al oxígeno

El rendimiento final se puede resumir en la ecuación que aparece más abajo, donde el nitrógeno molecular en presencia de compuestos orgánicos que actúan como fuentes de carbono, energía y poder reductor, genera dos moléculas de amonio, hidrógeno molecular y libera 16 ADP y Pi.

Se puede observar que, por el alto consumo de ATP, es una reacción muy demandante de energía y además parte se pierde al generar un subproducto como el H₂.



Figura 5.5

Nota. Modelo de la regulación de los genes nif y fix en *Azospirillum argentinense*.

La FBN, como se explicó más arriba, es un proceso reductivo, que genera NH₄⁺. Esta molécula satisface las demandas de N del organismo fijador. Sin embargo, en condiciones de alta fijación se puede generar una alta concentración de amonio que en ciertos organismos es excretado al ambiente en donde es utilizado por otros organismos que conviven en el sistema. Por eso, la fijación de nitrógeno también forma parte de las transformaciones del N en el suelo, en las que también impactan.

Organismos que fijan N₂

La FBN es el resultado de la actividad de microorganismos pertenecientes a los Dominios Bacteria y Archaea, que se encuentran distribuidos en el suelo, en el agua, asociados a las raíces de las plantas y otros establecen asociaciones más estrechas (symbiosis), como los rizobios con las leguminosas. Los microorganismos que fijan N₂, porque utilizan esta molécula como fuente de nitrógeno, se conocen como diazótrofos. En todos los casos, la enzima que fija el nitrógeno es la **nitrogenasa**, que se caracteriza por ser sensible al oxígeno. Considerando entonces que

los microorganismos son muy diversos, establecen distintas asociaciones y se distribuyen en diferentes ambientes, queda claro que tienen varias estrategias para que la nitrogenasa se encuentre en condiciones de baja tensión de oxígeno. En la Tabla 5.1 se presenta la diversidad de fijadores según su relación con el O₂ y fuente de energía.

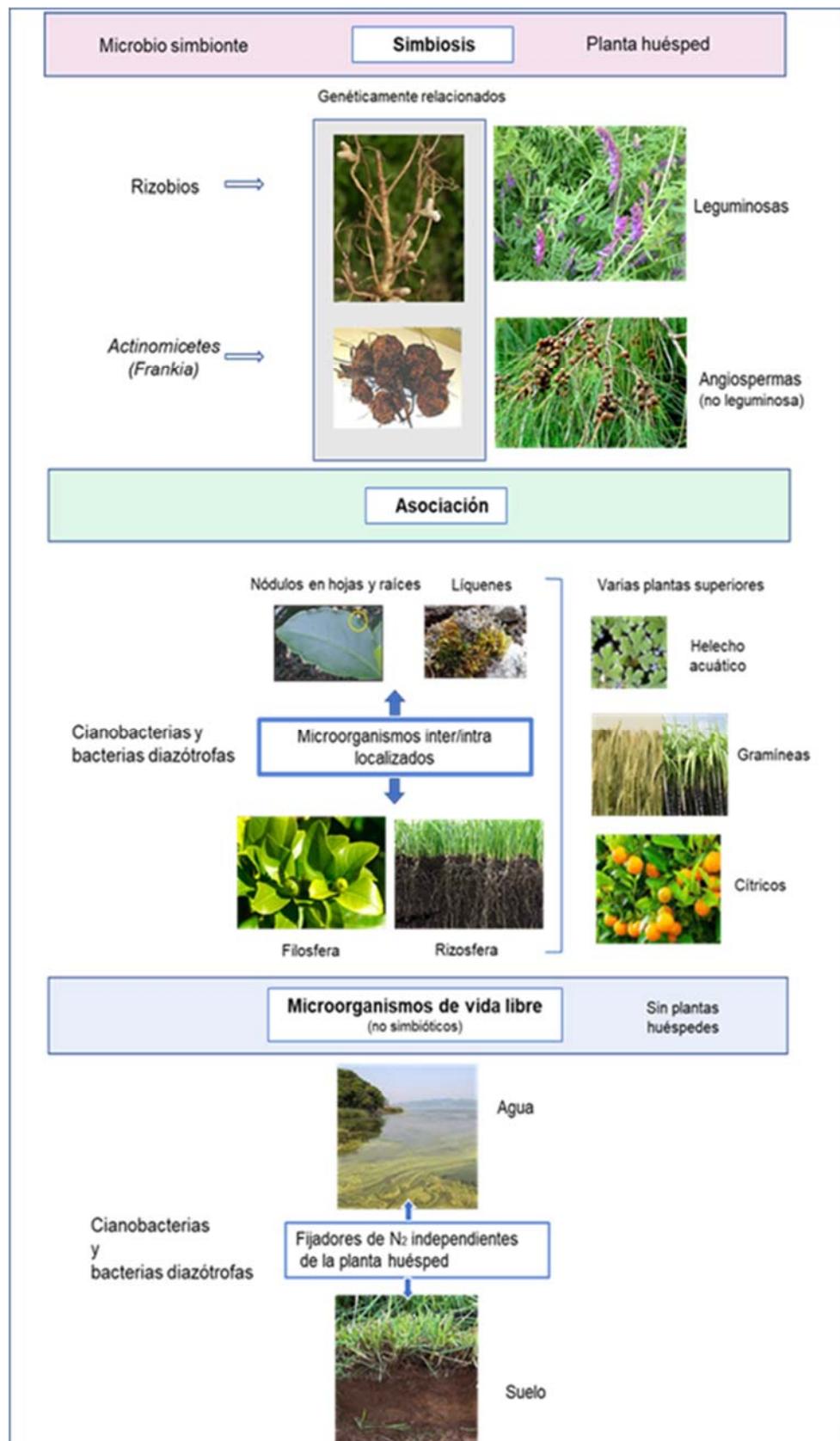
Tabla 5.1

Relación con el O ₂	Obtención de la energía	Géneros
AEROBIOS	Quimiótrofos 	<i>Azotobacter, Azotococcus, Azomonas, Beijerinckia, Derrxia, Pseudomonas, Azoarcus, Gluconacetobacter, Rhizobium, Frankia.</i>
	Fotótrofos 	<i>Anabaena, Nostoc, Calothrix, Gloeothecae.</i>
FACULTATIVOS Fijan nitrógeno solo en condiciones de anaerobiosis.	Quimiótrofos 	<i>Klesiella, Bacillus, Enterobacter, Citrobacter, Escherichia, Propionibacterium, Paenibacillus</i>
	Fotótrofos 	<i>Rhodospirillum, Rhodopseudomonas</i>
MICROAEROFILOS Fijan nitrógeno en condiciones de bajo nivel de oxígeno.	Quimiótrofos 	<i>Xanthobacter, Acidithiobacillus, Azospirillum, Aquaspirillum, Methylosinus, Herbaspirillum, Burkholderia</i>
	Fotótrofos 	<i>Plectonema, Lyngbya, Oscillatoria, Spirulina</i>
ANAEROBIOS ESTRICITOS	Quimiótrofos 	<i>Clostridium, Desulfovibrio, Methamosarcina, Methanococcus</i>
	Fotótrofos 	<i>Chromatium, Chlorobium, Thiopedia, Ectothiopspira</i>

Nota. Listado de algunos géneros de microorganismos fijadores de N₂ y su relación con el oxígeno y la fuente de energía.

De acuerdo a la interacción de los microorganismos fijadores con las plantas podemos agruparlos en Microorganismos de Vida Libre, Asociativos o Simbióticos (Figura 5.6).

Figura 5.6



Nota. Principales sistemas involucrados en la FBN (de mayor complejidad a más simple): Simbióticos, Asociativos y Vida libre.

Microorganismos de vida libre

Dentro de este grupo se encuentran bacterias que viven en el suelo o agua, donde fijan N₂, aunque es en la rizósfera donde se ha encontrado la mayor concentración debido a la liberación de exudados orgánicos por las raíces, que le sirven como fuente de nutrientes y energía.

Entre los fijadores se incluyen anaerobios obligados, facultativos, microaerófilos y aerobios. Algunos ejemplos son:

- Anaerobios obligados: *Clostridium pasteurianum*, *Desulfovibrio* sp., Bacterias púrpuras anoxigénicas como *Chromatium* y *Thiopedia*. Estos microorganismos no poseen protección para la enzima nitrogenasa, debido a que viven en ausencia de O₂.
- Anaerobios facultativos, de la familia Enterobacteriaceae: *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Erwinia*. Sólo fijan nitrógeno en condiciones de anaerobiosis.
- Aerobios y Microaerófilos: *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azomonas*. Se comportan como microaerófilos durante la fijación de N₂. Poseen diversos mecanismos de protección de la nitrogenasa (ver Protección de la nitrogenasa frente al O₂).

Azotobacter es un género bacteriano que incluye organismos aerobios que viven en los suelos, puede formar quistes de paredes gruesas que le otorgan resistencia a los factores ambientales adversos. Produce grandes cantidades de mucopolisacáridos (alginato) como forma de proteger a la enzima nitrogenasa, y cuando se encuentra fijando N₂ la cápsula protectora es más compacta y gruesa, esta bacteria también puede ajustar su tasa de respiración a un amplio rango de tensiones de O₂ (Fig. 5.7, A-B).

Otros microorganismos dentro del grupo de fijadores de vida libre son las cianobacterias. Estas son bacterias Gram (-) que contienen clorofila a, lo que les permite realizar la fotosíntesis oxigénica. Están ampliamente distribuidas en suelo y en aguas dulces y saladas, con climas diversos. Se distinguen tres grupos por su morfología y presencia de células especializadas llamadas "heterocistos" (ver sección Protección de la nitrogenasa frente al O₂):

- I- Formas filamentosas que poseen heterocistos, donde se realiza la fijación (ej. *Anabaena*, *Nostoc*, *Aulosira*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Scytonema*, *Tolypothrix*, *Fischerella*, *Mastigocladius* y *Stigonema*).
- II- Formas unicelulares y filamentosas sin heterocistos que fijan en aerobiosis, separados temporalmente la fotosíntesis de la fijación de N₂ (ej. *Gloeothecce*, *Gloeocapsa*).
- III- Formas unicelulares y filamentosas sin heterocistos que fijan en microaerobiosis - anaerobiosis (e.j. *Plectonema boryanum*, *Synechococcus* sp, *Synechocystis* sp, *Oscillatoria*, *Lyngbya* y *Plectonema*).

Microorganismos asociativos

La asociación de los microorganismos y plantas vasculares puede darse por la interacción de los mismos sobre la superficie de distintos órganos (hojas, tallos, frutos o raíces), o también en el interior de los mismos, en este último caso se los llama endófitos. Los endófitos, en general, viven sin causar daño y pueden localizarse en los espacios intercelulares (apoplasto) o en el tejido vascular, desde donde mediante su actividad metabólica benefician a la planta huésped. El interior de los vegetales ofrece mayor protección frente a las condiciones adversas que se presentan en el medio ambiente, mayor disponibilidad e intercambio de nutrientes que en la rizósfera.

Bacterias en la filósfera y endófitos de las hojas

La filósfera comprende la superficie de las hojas, las bacterias que la colonizan se diferencian de las de suelo especialmente porque sintetizan pigmentos para protegerse de la radiación solar. Como ejemplo: *Methylobacterium mesophilicum*, *Bacillus spp.* Otros microorganismos se comportan como endófitos, p.ej. *Burkholderia*.

Bacterias en rizósfera/rizoendorizósfera

El suelo que rodea a las raíces (rizósfera y rizoplano) es rico en nutrientes, ya que contiene exudados de las plantas, y por esto es un sitio en donde los microorganismos se desarrollan con mayor facilidad y con frecuencia se encuentran en mayor número. Muchas especies fijadoras de N₂ habitan ese espacio: *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*.

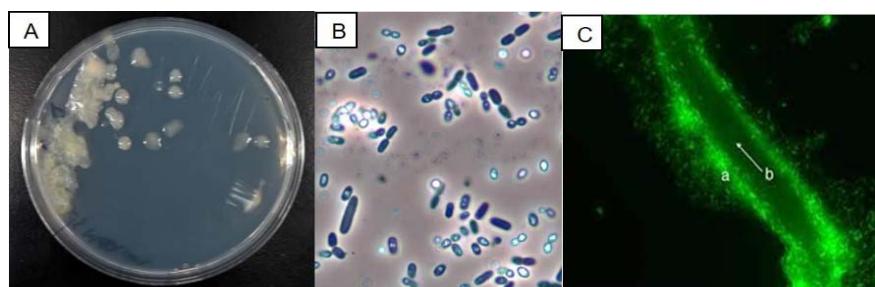
Algunos diazótrofos se asocian a las plantas como endófitos, viven en los espacios intercelulares de la raíz (rizoendorizósfera) de la planta hospedadora y frecuentemente fijan N₂ de manera más eficiente que si vivieran libres en el suelo. Dentro de esta clase de asociaciones se encuentran bacterias de mayor relevancia para la producción agronómica como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que se relaciona a la caña de azúcar y *Azospirillum spp.* en raíces de diversas gramíneas. La importancia de estas bacterias radica en su capacidad de promover el crecimiento de las plantas por varios mecanismos (ver capítulo 7), además de la fijación de N₂.

- ‘ *Azospirillum* habita suelos de una amplia región geográfica, en zonas tropicales, templadas y frías. Ha sido aislada de raíces de muchas plantas (maíz, trigo, arroz, sorgo y dicotiledóneas) como endófito facultativo (Figura 5.7-C), donde puede colonizar tanto la superficie como los espacios intercelulares, aunque principalmente actúa como diazótrofo rizosférico. Las células de *Azospirillum* tienen morfología vibrioide, pero en ciertas condiciones (envejecimiento celular, presencia de metales pesados) tienen la capacidad de formar "quistes" (refringentes al microscopio, conocidos como formas C). Probablemente la acumulación de poli-β-hidroxibutirato (PHB) es responsable de las características de los quistes: mejora su sobrevivencia, mayor resistencia a la desecación, a la radiación y a cambios osmóticos. Es un microorganismo aerobio, más específicamente microaerófilo, es

decir que protege a la nitrogenasa, responsable de la fijación de N₂ creciendo en ambientes con baja tensión de O₂ y además produce grandes cantidades de exopolisacáridos. En la Argentina se han desarrollado inoculantes comerciales en base a la cepa de *A. argentinense* Az39.

- ‘ *Gluconacetobacter diazotrophicus*, fue aislada por primera vez en Brasil, como endófito de raíces y tallos de caña de azúcar cultivada, además se la ha encontrado en maíz, batata, arroz, pastos forrajeros y en los insectos cochinillas, que actúan como vectores de infección. Es un bacilo aerobio Gram negativo, que se destaca por la capacidad de fijar N₂, en condiciones microaerofílicas, en presencia de nitratos y a pH ácido. Tiene hábitat endófito casi exclusivamente, dado que sobrevive muy poco en el suelo sin la presencia de plantas huésped. Por su afinidad con la caña de azúcar es capaz de crecer en concentraciones de sacarosa hasta del 30% en el medio de cultivo.

Figura 5.7



Nota. A: Crecimiento de colonias de Azotobacter en medio sólido, con producción de exopolisacáridos. B: Observación microscópica de quistes de Azotobacter. C: Colonización de segmento de raíz de *Arabidopsis thaliana* por la cepa *Azospirillum argentinense* Az39 marcado con la proteína fluorescente GFP. a) Aglomeración de células fluorescentes en la superficie. b) Células fluorescentes en el interior de la raíz.

Microorganismos simbóticos

Entre los sistemas fijadores simbóticos se encuentran las interacciones que cianobacterias, actinomicetes y rizobios establecen con diversos organismos.

Cianobacterias y diversos organismos (Hongos, Brifofitas, Helechos, Angiospermas, Gimnospermas)

Estos organismos viven en hábitats muy diversos (suelos, árboles, rocas) y con frecuencia en condiciones extremas. En algunas zonas áridas, desprovistas de vegetación, las comunidades microbióticas (cianobacterias, musgos, líquenes) tienen gran importancia porque aportan materia orgánica que retiene agua, y además las cianobacterias son una de las principales fuentes de nitrógeno del sistema.

Las cianobacterias que establecen simbiosis con diversos organismos son aerobias, por lo que la fijación de N₂ se realiza en los heterocistos (ver sección Protección de la nitrogenasa). El beneficio que recibe la cianofícea del huésped, cuando establece simbiosis, es protección frente a predadores, evitan la desecación, obtienen agua y minerales, a cambio las cianobacterias exudan compuestos nitrogenados y en algunos casos carbohidratos. La actividad nitrogenasa de las cianobacterias en simbiosis es significativamente mayor que en vida libre, como lo demuestra un aumento del 25-35% en la formación de heterocistos en cianobiontes.

Nostoc es la cianofícea que se encuentra con mayor frecuencia en simbiosis con hongos (formando líquenes) y briofitas (como musgos y hepáticas).

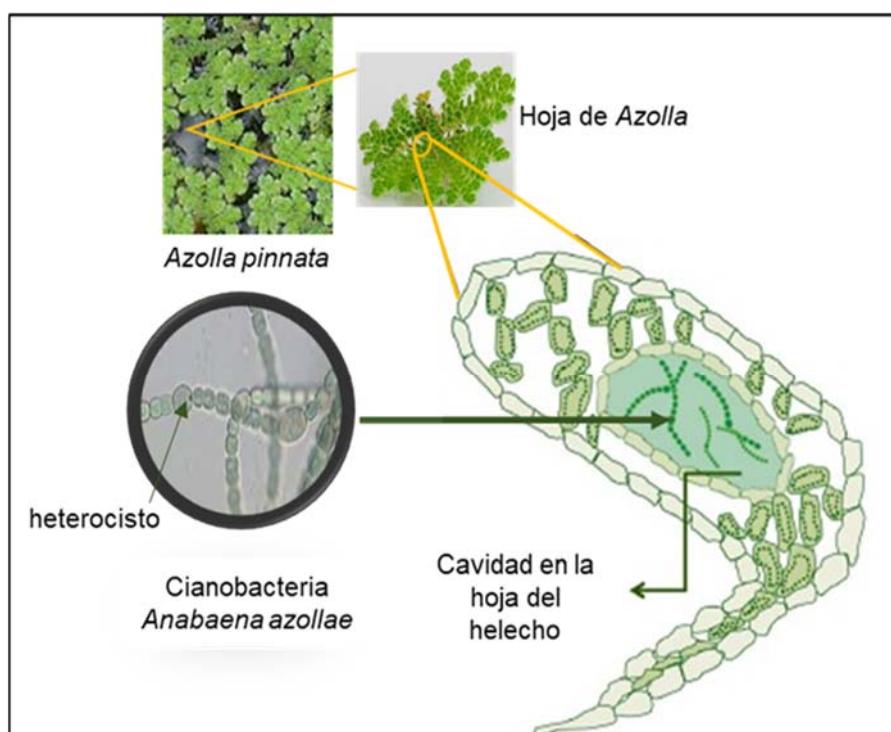
La bacteria *Anabaena azollae* en simbiosis con el helecho acuático *Azolla*, se ubica en una cavidad especializada en el interior de las hojas del helecho (Figura 5.8).

En esta asociación ocurre un intercambio, donde los compuestos nitrogenados que son excretados por la cianobacteria son utilizados por el helecho, que a su vez le provee fotosintatos a la bacteria. Esta simbiosis tiene relevancia debido a que es utilizada en muchos países como biofertilizante, especialmente en cultivos de arroz y también como alimento para animales.

Solo se ha encontrado simbiosis de *Nostoc* con una Angiosperma del género *Gunnera* (planta rarastrera de Sudamérica). Las cianobacterias se localizan en glándulas de la base del pecíolo (Figura 5.9 A-B).

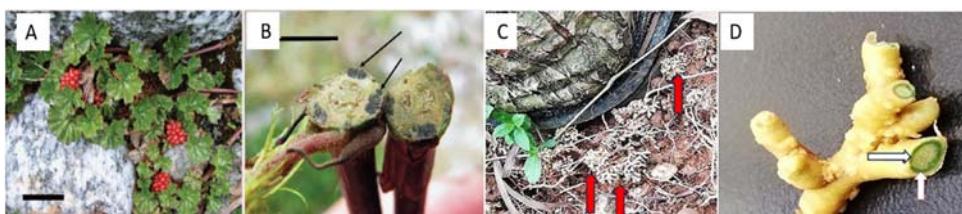
Diversas cianobacterias (*Nostoc* spp., *Spirulina* sp., *Oscillatoria* sp., *Anabaena* spp., *Rivularia* sp. y *Calothrix* sp.) son endosimbiontes de algunas raíces del grupo de las cícadas (e.j. *Cycas*, *Zamia*, *Bowenia*), y estos órganos vegetales adquieren en esta interacción una morfología coraloides (Figura 5.9, C-D).

Figura 5.8



Nota. Esquema de la simbiosis entre el helecho acuático Azolla pinnata, y la cianofícea Anabaena azollae que habita la cavidad de sus hojas y realiza la fijación de N₂ en los heterocistos.

Figura 5.9



Nota. Gunnera magellanica de Tierra del Fuego (la barra es de 5 cm); B: sección transversal de las bases del pecíolo de G. magellanica que muestra colonias de cianobacterias (las flechas apuntan a las colonias, la barra mide 1 cm). C: Raíces coraloides de Cycas, D: sección transversal de raíces coraloides mostrando una capa verde, conteniendo cianobacterias (anillo verde señalado por las flechas blancas).

Cuando el cianobionte se ubica de manera intracelular, como en briofitas, helechos, Gimnospermas y Angiospermas, ocurre el intercambio de compuestos nitrogenados entre la cianobacteria y el huésped, pero es posible que en estas condiciones la cianobacteria pierda su capacidad fotosintética, entonces recibe del huésped las sustancias carbonadas.

Los cereales como el maíz, el arroz, el trigo y el sorgo son cultivos que en conjunto acumulan los volúmenes más grandes de granos destinados a la alimentación de la humanidad. Como otras plantas cultivadas, los cereales se asocian con diversas bacterias, incluidas las bacterias fijadoras de nitrógeno llamadas diazótrofas y hongos, con los que establecen interacciones benéficas. En general, la producción de grandes volúmenes de granos demanda reponer los nutrientes al suelo y por eso siempre ha sido un objetivo promover o incorporar la capacidad de fijar nitrógeno a los cultivos de cereales. Los intentos por incorporar la capacidad de fijar N comenzaron hace mucho tiempo, y en los inicios esto consistió en inducir protuberancias en las raíces, aplicando reguladores vegetales, lo que fue acompañado de la inoculación de bacterias fijadoras de N. Sin embargo, nunca se obtuvieron nódulos fijadores de nitrógeno seguramente porque los cereales no presentan las características de las leguminosas que es única. Sin embargo, más recientemente se encontró que los organismos fijadores de N interactúan con los cereales proveyendo de N a las plantas, pero también promueven el crecimiento y/o la sanidad de las plantas basado en otras capacidades de las bacterias. Las fuentes de diazótrofos de los cereales han sido semillas, suelos y también diazótrofos de la rizósfera o endófitos de la raíz o parte aérea. Recientemente, estudios con herramientas moleculares mostraron que algunos rizobios viven como endófitos en los cereales en los que las proteínas que conforman la nitrogenasa, de estos organismos endófitos fijan N, aunque los niveles de fijación son menores que los de las leguminosas. Por estos motivos, se continúan realizando diferentes estudios y desarrollos destinados a incrementar la fijación de nitrógeno en los cereales. Por ello se continúa

trabajando en la obtención y/o selección de bacterias/mutantes diazótrofos con capacidades mejoradas para fijar y liberar el N fijado para promover el crecimiento de plantas. Además, existen proyectos destinados a modificar genéticamente el maíz y otros cereales para mejorar la colonización de bacterias diazótrofas, su capacidad de fijación de nitrógeno asociadas a las plantas o para formar nódulos fijadores de nitrógeno.

Sitio de consulta

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01794/full>.

Rizobios-Leguminosas

Las leguminosas constituyen una gran familia de plantas, la tercera en importancia considerando el número de especies que incluye, entre las que se encuentran cultivos de gran relevancia económica, a nivel nacional y mundial. Forman parte de la alimentación humana y animal. Tienen la particularidad de establecer simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno, conocidos como “rizobios”. Estas bacterias son bacilos móviles, aeróbicos, Gram (-), no formadores de esporas, que habitan el suelo y que tiene la capacidad de interactuar con la mayor parte de la familia Fabaceae (leguminosas) y con el género *Parasponia* (familia Cannabaceae). Esta interacción conduce a la formación de estructuras especializadas en las raíces que se denominan nódulos en donde ocurre la fijación del N₂. Dentro de ellos las bacterias adoptan forma de bacteroides (ver Cap.6) y en este estado fijan N₂.

En la actualidad hay un importante número de géneros y especies dentro de esta categoría de bacterias fijadoras simbióticas (ej., *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*) los cuales tienen diverso grado de especificidad para establecer la simbiosis con sus huéspedes.

Entre todos los sistemas conocidos que fijan nitrógeno, esta simbiosis es la más estudiada y aquella en la que mayor desarrollo tecnológico se ha alcanzado, debido a su importancia agronómica, económica y social.

Entre las principales técnicas utilizadas que se suelen utilizar para cuantificar la fijación del nitrógeno se encuentran técnicas tradicionales si bien hoy se destacan técnicas moleculares que han contribuido entre otras cosas a la identificación de los organismos como es la amplificación y secuenciación de los genes nifH y el 16S rRNA. En cuanto a la capacidad de fijar N₂, uno de los métodos actuales es el de la dilución de isótopos de nitrógeno; uso de espectros de reflectancia hoja/dosel para identificar ¹⁵N, y técnicas menos precisas como diferencia del N total, balance del N en el sistema, diferencia de N total en las plantas, masa nodular, suministro de carbohidratos a la raíz, contenido de ureidos, reducción de acetileno, Kjeldahl, contenido de leghemoglobina en nódulos y el ensayo GlnLux a partir de sensores que detectan glutamina. El test de reducción del acetileno a etileno si bien es un test que solo permite comparar actividades de bacterias, se sigue utilizando porque es relativamente simple. En ambiente cerrado una raíz nodulada es incubada en presencia de 10% de acetileno, este es convertido por

la nitrogenasa a etileno, el que se detecta con un cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de llama.

No obstante, en el campo la forma más práctica de determinar la nutrición nitrogenada es determinando la biomasa de las plantas considerando peso seco, ya que refleja el crecimiento que depende directamente de la disponibilidad de N. Esto ha impulsado el estudio de procedimientos más eficientes para el análisis de los flujos de la entrada y salida del nitrógeno en los sistemas agropecuarios, aunque también se han utilizado en otros sectores económicos, principalmente en la industria.

Frankia (Actinomicetes)- Angiospermas

Los actinomicetos son bacterias Gram (+), que se encuentran en suelos alcalinos, pobres y con poca humedad. Tiene una morfología particular, son filamentosas, presentan hifas ramificadas y septadas con esporangios, que contienen esporas no resistentes como forma de propagación.

El género más importante a nivel de FBN es *Frankia*, que puede fijar nitrógeno en vida libre o en simbiosis con ciertos árboles (*Casuarina*, *Alnus*, *Aliso*, y otros) donde forma nódulos (actinorrizas). Es una simbiosis muy importante para suelos pobres.

En la siguiente figura (Figura 5.10) se presenta una estimación del promedio de FBN por los organismos específicos y asociaciones.

Figura 5.10



Nota. Estimación del promedio de FBN por organismos específicos y asociaciones, expresado en N₂ fijado (kg. ha⁻¹. año⁻¹)

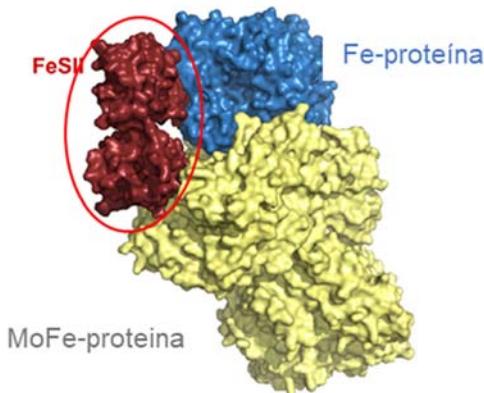
Protección de la enzima nitrogenasa frente al oxígeno (O_2)

La nitrogenasa sufre un daño irreversible en presencia de tensión de oxígeno de la atmósfera, en general atribuida a la oxidación de los grupos Fe-S presentes en dicha proteína y también hay estudios que confirman un cambio conformacional que impide la recepción de los electrones. Como gran parte de los diazótrofos son aeróbicos, esta enzima requiere cierta protección, que es diferente según el ambiente en el que viven. Los microorganismos pueden proteger a su nitrogenasa con más de un mecanismo.

Dentro de las diversas estrategias que generan las condiciones adecuadas para el funcionamiento de la enzima nitrogenasa encontramos:

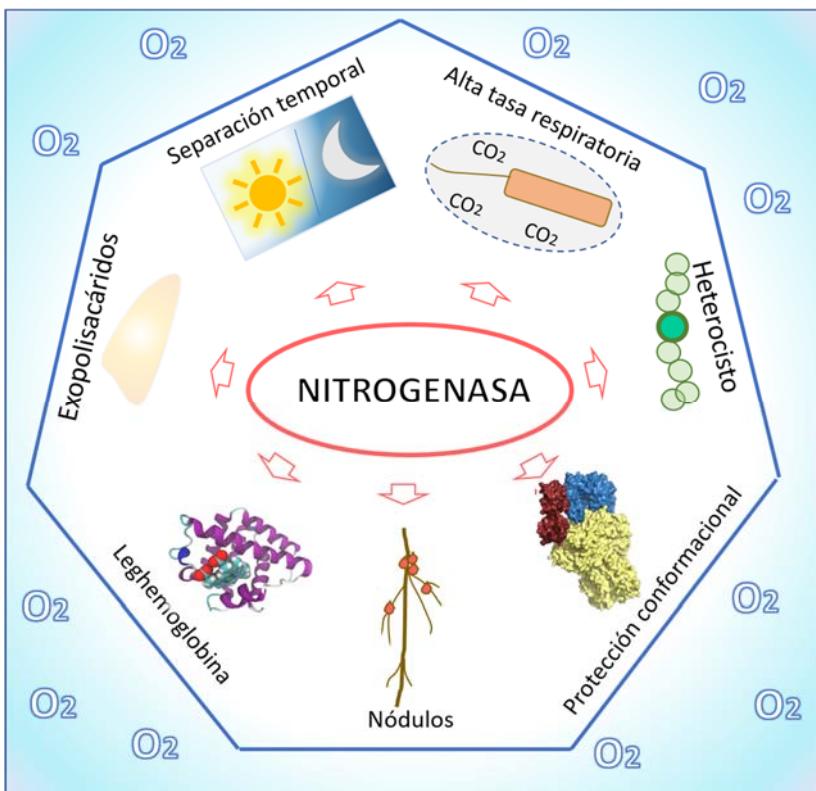
- **Microorganismos anaerobios:** se desarrollan en ausencia de oxígeno por lo cual la nitrogenasa no debe ser protegida de la oxidación (*Clostridium*). También se conoce este mecanismo de protección como “evasión”.
- **Microaerobios:** se refiere a un grupo de microorganismos (microaerofílicos) que viven en condiciones de baja tensión de O_2 (entre el 2-5%). Para poder fijar N_2 , se ubican dentro de la rizósfera en sitios cercanos a las raíces o en los espacios intercelulares, donde el O_2 es consumido por la planta y se generan zonas de bajas tensiones de oxígeno, de manera que se dan las condiciones para poder expresar la nitrogenasa (*Azospirillum*).
- **Actividad respiratoria protectora:** consiste en una respiración activa, a expensas de un alto consumo de carbono y energía. Como el aceptor de los electrones es el O_2 , se forma agua, este consumo de O_2 del ambiente mantiene el citoplasma en un estado casi anóxico y genera un ambiente adecuado para la FBN, como en los diazótrofos de vida libre *Azotobacter*, *Gluconacetobacter* y cianobacterias.
- **Secreción de polisacáridos extracelulares:** la producción de estas sustancias limita el flujo de oxígeno a la célula. En *Azotobacter*, la producción y excreción de alginato cumple con esa función, además protege a las células de la desecación.
- **Estructuras específicas como los nódulos:** las paredes (corteza del nódulo) proporcionan una barrera física a la difusión del O_2 . Dentro de esta estructura se produce la fijación de N_2 , es el caso de rizobios y actinorizas.
Los nódulos que forman las leguminosas en su interacción con los rizobios tienen paredes engrosadas y película de agua. En tanto que los nódulos de *Frankia*, tienen varias capas lipídicas. En ambos se sintetiza la proteína leghemoglobina.
- **Proteína con alta afinidad por el O_2 :** En los casos de simbiosis de rizobios y actinomicetes, la planta expresa una hemoproteína férrica, la leghemoglobina. Esta proteína se localiza en el citosol de las células infectadas dentro de los nódulos activos, cuya función es unirse al oxígeno de manera reversible, facilitando la difusión de este gas en bajas concentraciones, para la respiración de los bacteroides fijadores pero que al mismo tiempo esté protegida la nitrogenasa.

- **Células especializadas para FBN:** son células con paredes engrosadas donde se limita la difusión del O₂. Por ejemplo, los heterocistos en cianobacterias y las vesículas en *Frankia*. En las especies de cianobacterias pluricelulares, como *Anabaena*, la FBN ocurre en los heterocistos, por ello se lo define como separación espacial de la fijación (Fig. 8). En estas células especializadas, se encuentra confinada la nitrogenasa, y carecen del fotosistema II (productor de O₂), además tienen una gruesa pared glicolipídica que reduce la difusión del oxígeno. En tanto que la fotosíntesis (involucrando los fotosistemas I y II) solo sucede en las células vegetativas. Los heterocistos se conectan a las células vegetativas contiguas de manera que se produce el intercambio de los nutrientes y energía. Las vesículas de *Frankia* consisten en compartimentos que contienen a la nitrogenasa, recubiertos por una multicapa lipídica, cuya función es retardar la difusión de los gases.
- **Separación temporal de la nitrogenasa:** En cianobacterias unicelulares, o filamentosas sin heterocistos, los procesos de fotosíntesis y fijación ocurren en la misma célula, pero separados temporalmente, en el día se produce la fotólisis del agua que libera O₂ y se genera ATP, y en la noche se produce la activación de la nitrogenasa.
- **Protección conformacional o reacción de "apagado":** Una proteína o un cofactor, interacciona con el complejo nitrogenasa y como resultado se produce la estabilización de un complejo reversiblemente inactivo, pero tolerante al oxígeno, que les permite sobrevivir períodos limitados de estrés por oxígeno y revertir esta situación cuando la concentración de oxígeno sea la adecuada para el funcionamiento de la nitrogenasa (Figura 5.11).

Figura 5.11

Nota. En el círculo rojo se indica el cofactor FeSII, que se une de manera reversible a la nitrogenasa, protegiendo el sitio activo a la presencia de O₂.

En la siguiente figura (Figura 5.12) se resumen las principales estrategias que poseen los microorganismos para proteger al complejo enzimático de la nitrogenasa del oxígeno.

Figura 5.12

Nota. Representación esquemática de los principales mecanismos de protección de la nitrogenasa.

Impacto en el ecosistema y sector agrícola

La tasa global de fijación de N_2 en el planeta es aproximadamente de 413 millones de toneladas de N . año $^{-1}$. La FBN, incluye la fijación biológica terrestre y acuática, procesos que son responsables de alrededor del 60% de la cifra anterior. Sin embargo, en los últimos años, la magnitud de las contribuciones humanas a la fijación anual total de N molecular a formas reactivas ya es comparable con la fijación natural. El hombre con su intervención aporta nitrógeno al sistema dentro de tres áreas: mediante la fijación industrial (principalmente para la producción de fertilizantes nitrogenados por el método Haber-Bosch), con 120 millones de toneladas de N . año $^{-1}$; por la utilización de combustibles fósiles, con 30 millones de toneladas de N . año $^{-1}$; y debido a la fijación biológica asociada a la agricultura (principalmente en cultivos de leguminosas), con 60 millones de toneladas de N . año $^{-1}$.

El uso masivo de productos químicos en la agricultura, especialmente el exceso de fertilizantes nitrogenados genera problemas climáticos, de salud humana y de funcionamiento del ecosistema. Algunos de ellos son la contaminación de aguas por nitratos, nitritos, nitrosaminas, la eutrofización de ecosistemas acuáticos por el crecimiento excesivo de cianobacterias, la destrucción de la capa de ozono y efecto invernadero por la liberación a la atmósfera de óxidos de nitrógeno, y la metahemoglobinemia, que es un trastorno de la sangre

donde la hemoglobina no transporta oxígeno a los tejidos. A diferencia de la agricultura convencional, el concepto de agricultura sostenible consiste en producir alimentos en un marco económico viable (rendimiento sostenido) sin comprometer el futuro de los recursos productivos y del medio ambiente. La existencia de un equilibrio en el ciclo del nitrógeno es fundamental para la vida en la tierra y esto conlleva al mantenimiento de los ecosistemas microbianos terrestres y acuáticos.

La capacidad de fijación de nitrógeno es relativamente baja en los fijadores libres, éstos sólo aportan al suelo unos cientos de gramos de N. ha^{-1} al año que, si bien son suficientes en condiciones naturales, están muy lejos de satisfacer las necesidades de los suelos bajo cultivo. Sin embargo, la fijación en los sistemas simbióticos es mucho más eficiente, calculando que sólo la asociación rizobio-leguminosa puede llegar a aportar entre 100 - 300 Kg de N. ha^{-1} al año.

Por ello, en general las leguminosas no se fertilizan con N para incrementar el contenido de proteínas, y aun así contribuyen al enriquecimiento del suelo en N, que puede ser aprovechado por cultivos asociados o por los sucesivos cultivos posteriores en una rotación. También algunos microorganismos asociados a plantas fijan importantes cantidades de N (100-150 g de N. $\text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$) como *Gluconacetobacter diazotrophicus* en caña de azúcar.

Hay que considerar que, dados los costos de energía de la FBN, generalmente este proceso se inhibe en presencia de fuentes de nitrógeno disponibles en el sustrato, como iones de amonio y nitratos, en esa situación también se inhibe la formación de nódulos o los nódulos desarrollados se inactivan.

Los efectos benéficos de la FBN se conocen desde hace mucho tiempo, en la antigüedad se empleaban plantas pertenecientes a la familia de las leguminosas porque nutrían al suelo y mejoraban el rendimiento de los cultivos. Así también, en la América precolombina, los incas realizaban intersembras de poroto y maíz. Mucho después (siglo XIX) se demostró que la actividad de bacterias que interactuaban específicamente con las raíces de las leguminosas generaba la capacidad de la FBN, aportando N al suelo que queda a disposición de los cultivos sucesivos. En este contexto adquieren gran importancia los inoculantes microbianos, como alternativa respetuosa del medio ambiente.

Referencias

- Chang, A., Chen, T., Li, N. y Duan, J. (2019) Perspectives on endosymbiosis in coraloids roots: Association of cycads and cyanobacteria. *Frontiers. Microbiol.* 10:1888. doi: 10.3389/fmicb.2019.01888.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01888/full>
- Díaz Herrera, S., Rossello, F., Benavides, M., Groppa, M. & Zawoznik. (2017). Azospirillum brasiliense Az39 marcado con GFP en raíces de *Arabidopsis thaliana*. *Revista argentina de microbiología*, 49(2), 203-205. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.12.006>. Foto raíces Azospirillum

- Fonseca López, D., Vivas Quila, N., y Balaguera López, H. (2020). Técnicas aplicadas en la investigación agrícola para cuantificar la fijación de nitrógeno: una revisión sistemática. Cienc Tecnol Agropecuaria, Mosquera (Colombia), 21(1) e1342.
- Huamin Li, Feng Xu, Xiaojie Ren y Sanfeng Chen (2010). Functional analysis of the fixL/fixJ and fixK genes in *Azospirillum brasiliense* Sp7. Ann Microbiol 60: 469–480.
- Lery L., Bitar M., Costa M., Rössle S. y Bisch P. (2010). Unraveling the molecular mechanisms of nitrogenase conformational protection against oxygen in diazotrophic bacteria. BMC Genomics, 11 (Suppl 5): S7. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/S5/S7>
- Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. Revista Científica UDO Agrícola, ISSN 1317-9152, Vol. 4, Nº 1, pags. 1-20.
- Olivares, J., (2006). Nitrogenasa. Enzima clave en la fijación. In SEFIN, ed. Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Granada, pp. 29–34.
- Robson, R. y Postgate, J. (1980). Oxígeno e hidrógeno en la fijación biológica de nitrógeno. Revisiones anuales en microbiología, 34 (1), 183-207.
- Rosenblueth M., Ormeño-Orrillo E., López López A., Rogel M., Reyes-Hernández B., Martínez Romero J., Reddy P. y Martínez Romero E (2018). Nitrogen Fixation in Cereals. Front. Microbiol., Sec. Microbial Symbioses Volume 9.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01794/full>
- Taiz L. & E. Zeiger, Fisiología Vegetal, Vol. I, Castellón de la Plana 2006.
- Yang, C.-J., & Hu, J.-M. (2018). Bacterial Leaf Nodule Symbiosis in Flowering Plants. InTech. doi: 10.5772/intechopen.73078
- Yang, C. y Hu, J. (2022). Molecular phylogeny of Asian Ardisia (Myrsinoideae, Primulaceae) and their leaf-nodulated endosymbionts, Burkholderia s.l. (Burkholderiaceae). PLoS ONE 17(1): e0261188.

CAPÍTULO 6

Fijación simbiótica de nitrógeno: rizobios-leguminosas y *Frankia*-plantas no leguminosas

Pedro Alberto Balatti

Introducción

Como ya se dijo anteriormente el N es un elemento clave para el crecimiento de las plantas y los microorganismos porque compone proteínas y los ácidos nucleicos, por eso su disponibilidad limita el crecimiento de los cultivos es decir la biomasa.

Si bien se describió que un amplio espectro de organismos fija N₂ en forma libre y en forma simbiótica a temperatura ambiente y presión atmosférica, constantemente se encuentran y describen nuevas especies. La mayor cantidad de N se encontró que es fijado por asociaciones de bacterias y plantas que establecen un vínculo simbiótico, dentro de este grupo encontramos a algunas especies de Cucurbitales, Fagales y Rosales que establecen simbiosis con actinomicetos del género *Frankia*, mientras que *Parasponia* y las leguminosas (Fabaceae) interactúan con bacterias filogenéticamente diversas que pertenecen a las α y β proteobacterias conocidas comúnmente como rizobios.

Las leguminosas y su capacidad de desarrollar nódulos

La familia de las leguminosas es la tercera en importancia de las plantas con flor (Angiospermas) considerando el número de especies que incluye que es de aproximadamente 20.000. Una cantidad importante de especies establecen simbiosis con bacterias Gram (-) móviles que viven en el suelo, que se conocen bajo el nombre común de rizobios. Es importante mencionar que la familia de las leguminosas está conformada por tres tribus Cesalpinoideas Papilionoideas, y Mimosoideas, solo un porcentaje relativamente bajo de las leguminosas ha sido estudiado en lo que hace a su capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno. Sin embargo, es claro que todas o la gran mayoría de las leguminosas que pertenecen a las tribus de las Papilionoideas y Mimosoideas nodulan cuando interactúan con rizobios del suelo. En contraposición, solo algunas especies de las Cesalpinoideas tienen la capacidad de desarrollar nódulos, existiendo diversas hipótesis sobre esta diversidad en la respuesta a la adición de

bacterias fijadoras de N. Por otro lado, vale la pena destacar que estructuralmente las simbiosis que desarrollan las leguminosas presentan algunas características diferenciales las cuales parecen reflejar una evolución distinta del proceso. Esto es que las bacterias ingresan a las plantas por canales formados por el crecimiento de la membrana de la planta, canal que se llama hilo infectivo. En algunas leguminosas las bacterias nunca salen de ese canal, mientras que, en otras más evolucionadas, las bacterias envueltas por la membrana se ubican en células de la planta. La primera de estas interacciones se considera una característica ancestral.

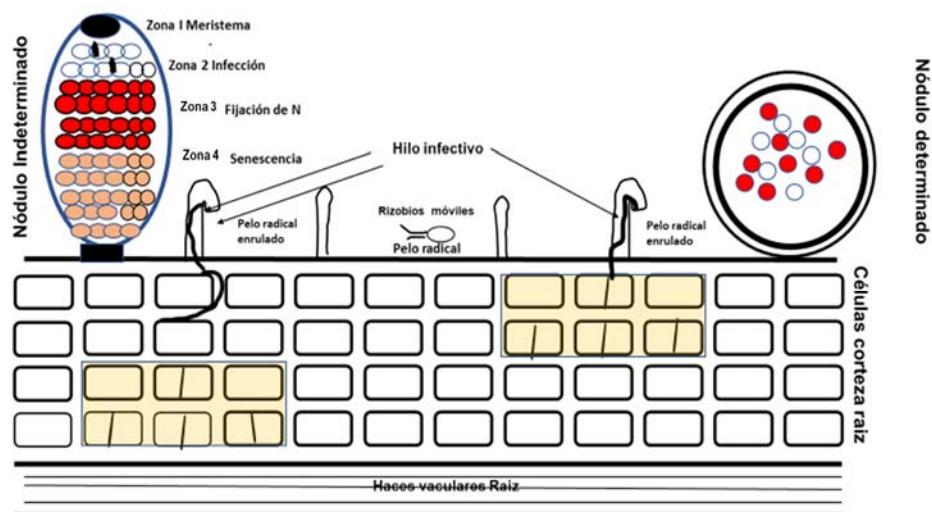
En cualquier caso, la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno es una característica propia de las leguminosas, es decir que estas plantas contienen la información genética que les permite desarrollar estructuras como los nódulos, en donde se alojan los rizobios, que encuentran ahí un ambiente que contribuye para que funcione la nitrogenasa y los rizobios fijen nitrógeno. Prueba de esa capacidad diferencial de las leguminosas para desarrollar nódulos radica en que diversos investigadores fracasaron en sus intentos de inducir la formación de nódulos en especies no leguminosas por ejemplo las gramíneas, a pesar de lo interesante que sería disponer de una gramínea fijadora de N. Pero, además, se encontró que plantas de alfalfa cultivadas en forma axénica durante un período de tiempo considerable desarrollaron nódulos, los que no contenían bacterias y que por supuesto no fijaban N. Es decir, ese programa genético que contienen las leguminosas es activado por determinadas señales específicas que evidentemente pueden ser bióticas y abioticas.

La gran cantidad de especies que incluye la familia de las leguminosas hace que encontremos entre ellas especies tropicales adaptadas a altas temperaturas y alta humedad, así como especies que viven en climas templados o fríos en donde el proceso ocurre a temperaturas bajas, en condiciones variables de disponibilidad de agua. Probablemente por esto encontramos que las leguminosas desarrollan dos tipos de nódulos Los nódulos determinados, que suelen asociarse a leguminosas de climas tropicales, en general son circulares, se originan a partir de un meristema en el que la actividad mitótica ocurre tempranamente cuando comienzan a formarse, luego crecen por alargamiento de las células. Estos nódulos suelen tener una vida media relativamente corta de 3 semanas a 1 mes. El otro tipo de nódulos que desarrollan las leguminosas son los indeterminados, como su nombre lo indica son nódulos en los que el crecimiento acompaña a la vida del nódulo, el meristema se ubica en el ápice del nódulo y debido a un continuo crecimiento toma una forma cilíndrica ya que el nódulo crece durante su larga vida que suele ser de 9 meses, si bien esto varía entre las especies.

Una de las características más interesantes de la interacción rizobio leguminosa es la especificidad, que consiste en que algunas especies de leguminosas solo nodulan con una especie bacteriana, otras leguminosas como por ejemplo la soja y el poroto desarrollan nódulos con más de una especie de rizobio. Es decir que, si bien los rizobios tienen la información genética para interactuar con la leguminosa e inducir la formación de un nódulo, la leguminosa también contiene el conjunto de genes que le permite desarrollar nódulos, eso solo ocurre cuando la interacción es compatible. Esto es particularmente interesante porque sugiere que hay un importante nivel de especificidad que además es variable entre especies de rizobios y de

leguminosas. Ejemplos de esto podrían ser las plantas del género *Galega*, *Galega orientalis* y *Galega officinalis* desarrollan nódulos solo cuando interactúan con *Rhizobium galegae*, pero la especificidad es tan grande que los rizobios aislados de *G. orientalis* no fijan N en *G. officinalis* y viceversa. Por otro lado, *Sinorhizobium sp.* NGR234 es un rizobio de crecimiento rápido que desarrolla nódulos con una cantidad muy amplia de leguminosas. En cualquier caso, esa especificidad que es típica de los rizobios es un carácter relevante y tiene un componente genético de la planta y otro de los rizobios.

Figura 6.1



Nota. Formación de nódulos indeterminados y determinados típicos de los que desarrolla la alfalfa *Medicago sativa* con *Ensifer meliloti* y la soja *Glycine max* con *Bradyrhizobium japonicum*, respectivamente. Los círculos dentro de los nódulos representan las células, las rojas son las infectadas que fijan N₂ y que producen leghemoglobina. Las zonas en amarillo marcan las divisiones celulares subepidérmicas que ocurren debido a que los rizobios interactúan con los pelos radicales que se enrulan.

Cuando se siembra una leguminosa en los suelos de su centro de diversificación las raíces de estas interactúan con los organismos saprófitos del suelo que incluyen organismos benéficos como los rizobios, así como organismos patógenos, y la planta discrimina entre ellos, permitiendo interactuar a los rizobios con la planta, pero no a los patógenos. Es por esto que la simbiosis rizobio-leguminosa ha sido el objeto de investigaciones por parte de microbiólogos y biotecnólogos que trabajan en el desarrollo de las tecnologías para utilizar y aplicar la fijación biológica de N y también por los fitopatólogos, para desentrañar las interacciones que ocurren entre la planta y los microorganismos que resultan en una simbiosis o en una enfermedad.

El proceso simbiótico de la fijación simbiótica podemos dividirlo en las etapas tempranas y que están vinculadas a la nodulación y que conduce a la formación de los nódulos y las etapas

más tardías que tiene que ver con la fijación de nitrógeno propiamente dicha que ocurre en los nódulos maduros.

Los rizobios su taxonomía y clasificación

Los organismos que desarrollan nódulos cuando interactúan con las leguminosas los conocemos con la denominación general de rizobios. Su nombre ha ido evolucionando a través del tiempo y cuando se describieron inicialmente se denominaron bacterias radicícolas. En la medida que las herramientas de análisis fueron desarrollándose, la clasificación de las bacterias que interactúan con las distintas leguminosas se fue complejizando y hoy en día la clasificación es dinámica pero no solo incluye muchas especies y no solo a las que interactúan con las diversas leguminosas, sino que también algunas plantas desarrollan nódulos con diferentes especies de rizobios que difieren y mucho entre ellos.

En la medida que se aplican con mayor énfasis los estudios moleculares para el análisis de los aislamientos se van definiendo nuevas especies de rizobios. Igualmente, estos se agrupan en algunos géneros que son los que incluyen a las bacterias que interactúan con las especies de mayor valor económico.

El género *Rhizobium* incluye bacterias de crecimiento rápido, es decir que tienen un tiempo de generación de entre 2 y 4 horas. Estas bacterias cuando se cultivan en medios de cultivo sintéticos *in vitro* los acidifican. Tienen además fragmentos circulares de ADN que se replican de manera independiente del cromosoma, a los que se conoce como plásmidos. Estos a diferencia del cromosoma bacteriano suelen llevar genes de nodulación y fijación de nitrógeno, también pueden codificar proteínas relacionadas con la resistencia a antibióticos y pueden transferirse horizontalmente a otras bacterias. Entre los rizobios de importancia económica se encuentra *Rhizobium leguminosarum* que tiene tres biovariedades, *phaseoli* que nodula el poroto, *trifolii* que nodula el trébol y *viciae* que nodula la vicia.

Otro grupo de bacterias que inicialmente se habían clasificado como *Rhizobium* hoy se agrupan en el género *Ensifer* incluye también especies de rizobios que nodulan leguminosas que son de crecimiento rápido, es decir que tienen un tiempo de generación muy corto 2 a 4 h, las bacterias contienen un cromosoma y un número variable de fragmentos extracromosómicos que se replican en forma autónoma y estas bacterias también acidifican los medios de cultivo cuando se cultivan *in vitro*. Aunque comparten muchas características con el género *Rhizobium* evolutivamente están separadas. Entre las especies conocidas se encuentran *Ensifer meliloti* que nodula la alfalfa y *Ensifer fredii* que es un simbionte de la soja.

Luego está el género *Azorhizobium* que incluye aislados de rizobios que inducen nódulos en tallos y raíces de arbustos, son de crecimiento rápido es decir tienen tiempos de generación cortos, acidifican los medios de cultivo cuando se cultivan *in vitro* y se caracterizan por fijar nitrógeno en forma libre y simbiótica. *Azorhizobium caulinodans* induce la formación de nódulos en el tallo de *Sesbania rostrata* y en las raíces de otras especies de *Sesbania*.

Mesorhizobium es otro género de rizobio que se caracteriza porque el tiempo de generación es medio entre 6 y 8 h, si bien pueden tener plásmidos estos no son simbióticos, es decir que los genes de nodulación y fijación de nitrógeno se encuentran en el cromosoma. *Mesorhizobium loti* induce nódulos en *Lotus corniculatus* y *Lotus tenuis*.

Por último, el género *Bradyrhizobium* incluye especies de crecimiento lento a muy lento, es decir que estas bacterias duplican su número en un periodo de tiempo de 12 a 16 h. Cuando se multiplican en medios de cultivos formulados con determinados azúcares alcalinizan los medios de cultivo. *Bradyrhizobium japonicum* y *B. diazoefficiens* nodulan la soja de la misma manera que *B. liaoningense*.

Especies de rizobios que fijan N₂ en estructuras como nódulos o asociadas a las plantas

Genero especie	Fuente de Aislamiento
Clase: Alphaproteobacteria	
Orden: Rhizobiales	
Familia: Rhizobiaceae	
Género: Rhizobium	
<i>R. leguminosarum</i>	symbiovar <i>viciae</i> symbiovar <i>trifolii</i> symbiovar <i>phaseoli</i>
<i>R. galegae</i>	symbiovar <i>officinalis</i> symbiovar <i>orientalis</i>
<i>R. tropici</i>	
<i>R. leucaenae</i>	
<i>R. tropici</i>	
<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus</i> <i>Mimosa affinis</i> <i>Phaseolus</i>
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Desmodium sinuatum,</i> <i>Centrosema</i>
<i>R. hainanensis</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
<i>R. huautlense</i>	<i>Medicago ruthenica,</i> <i>Phaseolus</i>
<i>R. mongolense</i>	<i>Amphicarpaea</i>
<i>R. yanglingense</i>	<i>Ficus benjamina</i>
<i>R. larrymoorei</i>	<i>Indigofera spp.</i>
<i>R. indigoferae</i>	<i>Hedysarum</i>
<i>R. sullae</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>
<i>R. loessense</i>	<i>Populus alba</i>
<i>R. cellulosilyticum</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>R. miluonense</i>	Multiple legume species
<i>R. multihospitium</i>	<i>Oryza alta</i>
<i>R. oryzae</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>R. pisi</i>	<i>Albizia, Kummerowia</i>
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Dalbergia</i>
<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>

<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>
<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>
<i>R. halophytocola</i>	Coastal dune plant
<i>R. radiobacter</i>	
<i>R. rhizogenes</i>	
<i>R. rubi</i>	
<i>R. vitis</i>	
<i>R. nepotum</i>	
<hr/>	
Género: Ensifer	
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus,</i>
<i>E. fredii</i>	<i>Trigonella</i>
	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>
	<i>Glycine</i>
<i>E. sahelense</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia,</i>
<i>E. terangae</i>	<i>Leucaena</i>
	Different host plants
	<i>Acacia</i>
	<i>Sesbania</i>
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula,</i>
<i>E. arboris</i>	<i>Melilotus</i>
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. xingianense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. adhaerens</i>	
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>
<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i>
<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>
<i>E. numidicus</i>	<i>Medicago sativa</i>
<hr/>	
Genus: Shinella	
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>
<hr/>	
Family: Phyllobacteriaceae	
Genus: Mesorhizobium	
<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis,</i>
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus,</i>
<i>M. ciceri</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. tianshanense</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>
<i>M. plurifarum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. amorphae</i>	<i>Acacia, Chamaecrista,</i>
<i>M. chacoense</i>	<i>Leucaena, Prosopis</i>
<i>M. septentrionale</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
<i>M. temperatum</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>M. thiogangeticum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. albiziae</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. caraganae</i>	<i>Albizia kalkora</i>
<i>M. gobiense</i>	<i>Caragana spp</i>
<i>M. tarimense</i>	Wild legumes
<i>M. australicum</i>	Wild legumes
<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>
<i>M. metallidurans</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>
<i>M. alhagi</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>
<i>M. camelthorni</i>	<i>Alhagi</i>
<i>M. abyssinicae</i>	<i>Alhagi sparsifolia</i>
<i>M. muleiense</i>	Different agroforestry legume
<i>M. hawassense</i>	trees
<i>M. qingshengii</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. robiniae</i>	Different agroforestry legume
<i>M. shonense</i>	trees
<i>M. shangrilense</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. silamurunense</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>
<i>M. tamadayense</i>	Different agroforestry legume
	trees
	<i>Caragana species</i>
	<i>Astragalus species</i>
	<i>Anagyris latifolia, Lotus berthelotii</i>

Género: Phyllobacterium	
<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
Familia: Methylobacteriaceae	
Género: Methylobacterium	
<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp.</i>
Género: Microvirga	
<i>M. lupini</i>	<i>Lupinus sp</i>
<i>M. lotononisidis</i>	Different legume host
<i>M. zambiensis</i>	Different legume host
Familia: Brucellaceae	
Género: Ochrobactrum	
<i>Ochrobactrum cytisi</i>	<i>Cytisus</i>
<i>Ochrobactrum lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>
Familia Hyphomicrobiaceae	
Género: Azorhizobium	
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>A. dobereinereae</i>	<i>Sesbania virgata</i>
<i>A. oxalatiphilum</i>	
Género: Devosia	
<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>
Familia: Bradyrhizobiaceae	
Género: Bradyrhizobium	
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>B. betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>
<i>B. canariense</i>	<i>Genisteae et Loteae</i>
<i>B. iriomotense</i>	<i>Entada koshunensis</i>
<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>
<i>B. lablabi</i>	<i>Lablab purpureus</i>
<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>
<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>
<i>B. oligotrophicum</i>	
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>
Clase: Beta Proeobacteria	
Orden: Burkholderiales	
Familia: Burkholderiaceae	
Género: Burkholderia	
<i>B. caribensis</i>	Vertisol microaggregates
<i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosa</i>
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>
<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata, Mimosa scabrella</i>
<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpiniifolia</i>
<i>B. mimosarum.</i>	<i>Mimosa spp</i>
<i>B. rhizoxinica</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. diazotrophica</i>	<i>Mimosa spp</i>
<i>B. endofungorum</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. helei</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>
<i>B. symbiotica</i>	<i>Mimosa spp</i>
Género: Cupriavidus	
<i>C. taiwanensis</i>	<i>Aspalatus carnosa</i>
	<i>Mimosa sp</i>
Clase: Gamma-Proteobacteria	
Orden: Pseudomonadales	
Familia: Pseudomonaceae	
<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>

Infección de las leguminosas y desarrollo de los nódulos

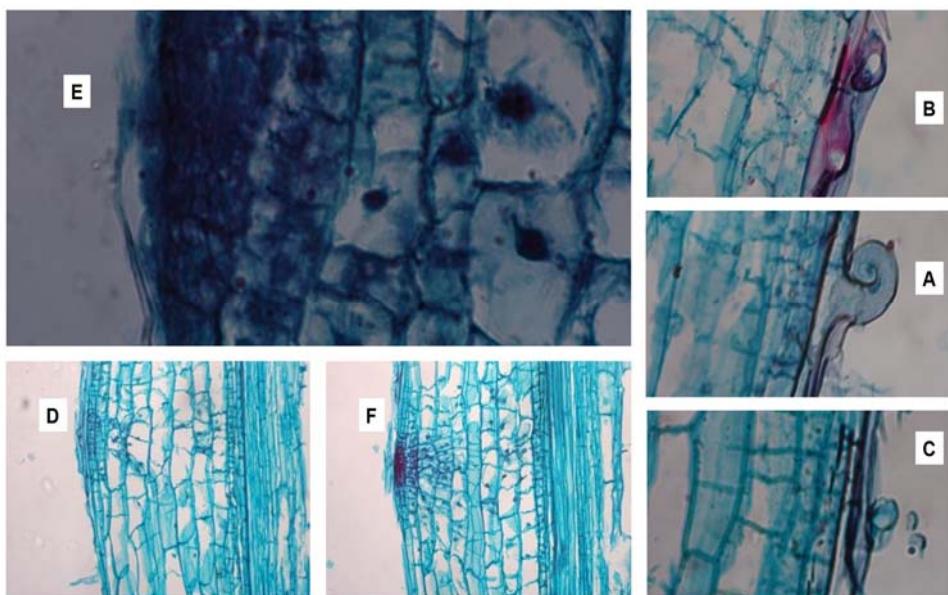
Las leguminosas, al igual que todas las raíces de las plantas liberan al medio flavonoides, la cantidad y calidad de estos compuestos son característicos de cada especie, pero además la síntesis es alterada por el estrés ambiental en el que crecen y desarrollan las plantas. Aun así, el perfil de flavonoides que sintetiza y libera la raíz de la planta es como una huella digital que es reconocida por las bacterias. Estos flavonoides cumplen varios roles, uno es el de atraer o repeler los rizobios. En realidad, cada especie de rizobio responde a un conjunto de flavonoides distintos, esta atracción o repulsión que provocan los flavonoides hace que los rizobios que son bacterias con flagelos se muevan, acercándose a la rizósfera o alejándose de esta zona. Es decir, que las plantas inducen el acercamiento o el alejamiento de las bacterias que viven en el suelo con solo liberar flavonoides al medio. Los rizobios que se acercan a la raíz encuentran allí una riqueza de compuestos orgánicos y por eso se multiplican y adhieren a la superficie de la raíz y en particular se unen a los pelos radicales. Luego de unas horas de estar en contacto con la raíz, el pelo radical se enrula, y en el centro de ese rulo o gancho que se forma, quedan atrapados los rizobios. Estos liberan una enzima hidrolítica que degrada la pared del pelo, entonces las bacterias son rodeadas por la membrana de la célula vegetal, y esta crece por el interior del pelo, forma un canal por el que se desplazan las bacterias que toma el nombre de hilo infectivo. Mientras tanto la presencia de esta interacción hace que se produzca la división de células de la corteza de la raíz, en el caso de que comience el desarrollo de un nódulo indeterminado (alfalfa) se dividen las células próximas al cilindro central de la raíz primeramente y luego la división evoluciona desde allí hacia la epidermis. Así se forma en la parte exterior un meristema que acompañará al nódulo durante toda la vida activa del mismo que será de por lo menos 7 meses. El hilo infectivo, es el canal por el que viajan las bacterias que entran en contacto con las células de la planta, donde se endoreplican. Los rizobios liberados por el hilo infectivo de alguna manera ingresan a ciertas células en las que siempre están rodeadas de una membrana de origen vegetal y desplazan el contenido de la célula. Los rizobios que son bastones en la célula se convierten en bacteroides que además de ser de gran tamaño son pleiomórficos. Estos últimos rodeados por la membrana vegetal toman el nombre de simbiosoma, son la unidad de fijación de nitrógeno que ocupan las células en las que se fija nitrógeno. Como el número de bacterias que llega es reducido, solo algunas células de los nódulos son infectadas, otras permanecen sin bacterias y van a cumplir roles clave en la asimilación y transporte del N a la planta. Como el nódulo conserva un meristema activo que genera constantemente nuevas células, el desarrollo de hilos infectivos continúa porque constantemente están ingresando bacterias que infectan a las nuevas células que genera el meristema. Por debajo de ese meristema estará una zona del nódulo más evolucionada que contendrá células conteniendo simbiosomas y células no infectadas. En esa zona se produce la fijación de nitrógeno que se puede determinar por diversas metodologías. Esta también es reflejada por la presencia de la leghemoglobina, proteína reguladora de la tensión de oxígeno que cuando trabaja en el nódulo tiene un color rojo. Esa zona del nódulo es seguida por otra en la que las células aparecen conteniendo almidón y que además presentan

un color amarronado, que indica que hay un proceso de degradación de leghemoglobina. La acumulación de almidón, se debe a que la energía no se consume porque no hay fijación. Es decir que un nódulo indeterminado, como el descrito, toma una forma cilíndrica al crecer por el extremo distal y además contiene cuatro estados de desarrollo que coexisten, una zona meristemática de multiplicación celular y desarrollo de hilos infectivos, otra zona de infección en donde las células son infectadas por las bacterias, otra zona con células contenido simbiosomas en donde ocurre la fijación y una cuarta zona de senescencia. Cuando estos nódulos senescen, es decir mueren, liberan en el suelo bacterias vivas que se encuentran en los hilos infectivos y estas son las que aseguran la sobrevivencia de esos rizobios en los suelos.

Las plantas que desarrollan nódulos indeterminados, como por ejemplo la alfalfa, transportan el N fijado por los rizobios a la planta en compuestos nitrogenados como la asparagina y la glutamina. Estos dos compuestos tienen una cantidad grande de nitrógeno y un menor contenido de C que otros compuestos orgánicos.

En el caso de las plantas que desarrollan nódulos esféricos, los estadios iniciales, es decir el acercamiento de los rizobios a la raíz, el enrulamiento del pelo y el desarrollo de un canal de infección es similar a lo que ocurre en el caso de los nódulos indeterminados. Sin embargo, en este caso se induce la división celular, en las primeras capas de las células subepidérmicas y como resultado de esto se forma un meristema que se ubica hacia adentro en la corteza de la raíz. Ese meristema genera células mitóticas en las que se van a alojar los rizobios que aumentan de tamaño y se convierten en bacteroides pleiomórficos y son rodeados por la membrana de origen vegetal formando el simbiosoma.

Figura 6.2



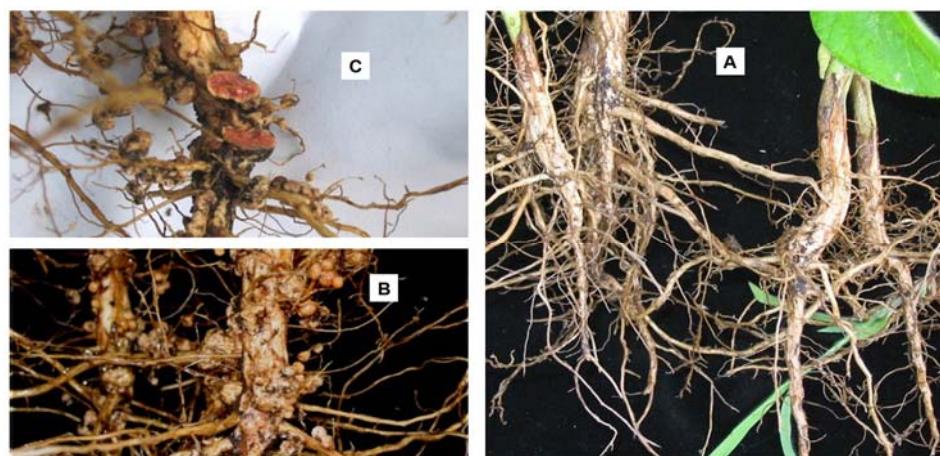
Nota. Etapas tempranas de la interacción *Ensifer fredii*/soja. A: Pelo radical enrulado debido a que interactuó con los rizobios y debajo la primera capa de células subepidérmicas en división celular. B: Dos pelos radicales enrulados debido a su interacción con los rizobios y dos capas de

(etapa I del desarrollo de nódulos) células subepidérmicas en dividiéndose (Etapa II de desarrollo de nódulos). C: Pelo radical enrulado y tres capas de células subepidérmicas de la raíz en división. D: Debajo del pelo enrulado se comienza a formar el meristema de nódulo (etapa 6 de desarrollo de nódulo). E: Aproximación al meristema del nódulo, se ven núcleos celulares y división celular de muchas capas de células de la corteza de la raíz. F: El meristema da origen así a nuevas células, todas las capas de células de la corteza se han dividido hacia el interior y comienzan a conectarse con el haz vascular central de la raíz (etapa 7 u 8 del desarrollo de nódulos).

Una vez que las células se dividieron la actividad del meristema cesa y este desaparece. Las células divididas crecen en tamaño y la única manera de expandirse es crecer hacia afuera y por eso el nódulo toma una forma esférica. En el centro del nódulo se encuentran las células conteniendo los simbiosomas fijadores de nitrógeno, que están acompañadas por células no infectadas en donde se transporta y metaboliza el N. Estos nódulos determinados tienen una vida acotada en el tiempo entre 20 y 30 días y por otro lado ellos siempre se encuentran en un solo estadio de desarrollo. Es decir, o están en formación, o están en la etapa de infección o en la de fijación o en la de senescencia. Cuando estos nódulos mueren, los bacteroides tienen la capacidad de revertir a la forma de bastón y permanecen de esa manera en el suelo asegurando su sobrevivencia y permanencia en los suelos.

La soja desarrolla nódulos determinados y de la misma forma que otras especies que desarrollan el mismo tipo de nódulos, transportan el N en compuestos como los ureidos, que son compuestos que transportan mucho nitrógeno en un esqueleto carbonado relativamente pequeño, dicho de otra manera, reducen el costo de traslado del N.

Figura 6.3



Nota. Raíces de plantas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* E109. A: control no inoculado. B: Plantas inoculadas conteniendo nódulos esféricos. C: Nódulos de la raíz principal

que muestran el interior rojo debido a la presencia de leghemoglobina lo que demuestra la activa fijación.

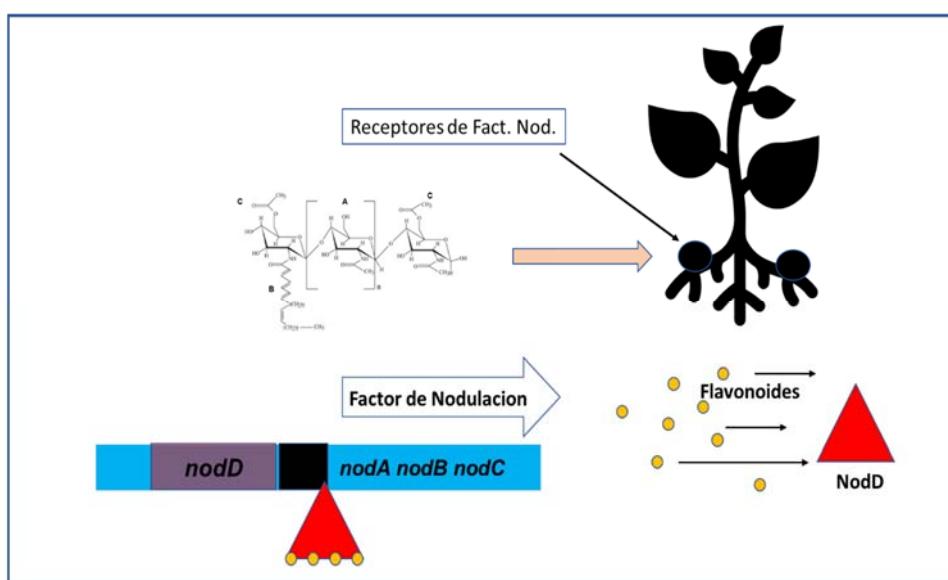
Los rizobios además de ingresar provocando la hidrólisis de las paredes del pelo radical cuando el mismo se enrula, en algunas leguminosas ingresan por un mecanismo distinto conocido como *crack entry* (entrada por roturas). Esto se refiere a que estos rizobios que se encuentran en el suelo ingresan por las roturas que se producen en la epidermis de la raíz cuando desarrollan las raíces secundarias. El ejemplo emblemático de esto es la simbiosis *Bradyrhizobium*-maní (*Arachis hypogaea* L.) en donde los *Bradyrhizobios* que ingresan por las roturas de la epidermis desarrollan en el sitio de inserción de la raíz secundaria o terciaria en la raíz principal o secundaria. Este tipo de ingreso también ocurre en el caso de las plantas que son infectadas por actinomicetes como *Frankia*, que suele alterar el desarrollo de raíces secundarias y las convierte en estructuras en las que se ubican las bacterias fijadoras de N. Debido a esto y otras razones estas plantas desarrollan nódulos en ramilletes que se distribuyen desuniformemente en la raíz. Los nódulos son las estructuras en las que los rizobios son protegidos del oxígeno en base a una película de agua y a la presencia de la leghemoglobina.

Bases moleculares de la infección de las leguminosas por los rizobios

El desarrollo de la biología molecular puso en disponibilidad herramientas que permitieron conocer en detalle los eventos tempranos que devienen en la nodulación de las leguminosas. Una de las herramientas claves fue la descripción y disponibilidad de **transposones**, que permite noquear genes que definen fenotipos. Este es el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno que establecen simbiosis con las plantas. Los investigadores establecieron que esas bacterias se destacaban por su capacidad para fijar N₂ que solo la presentaban algunos géneros bacterianos. Aproximadamente en 1980 comenzaron los trabajos utilizando transposones con lo que se generaron miles de mutantes, esto último es relativamente sencillo pero lo que sí es complejo es identificar las mutaciones que interesan, para lo cual la mutación debe tener un fenotipo que sea fácil de identificar entre los mutantes. Este es el caso de la nodulación, cuando un gen bacteriano involucrado en el proceso es inactivado la bacteria pierde la capacidad de inducir la formación de nódulos o induce una mayor cantidad. De esta manera diversos grupos de investigación realizaron mutaciones e identificaron diversos genes que cumplen roles claves en la nodulación. Así se encontró que la inactivación de algunos genes resultaba en rizobio mutantes que no nodulaban la leguminosa específica. Mas aún, se encontró que estos genes en diversas especies bacterianas eran homólogos es decir que probablemente cumplen el mismo rol, hecho que se comprobó más adelante cuando se complementaron los mutantes no nodulantes con genes homólogos provenientes de otras especies y por esto se denominaron genes comunes de nodulación. Las secuenciación y expresión de las proteínas codificadas por estos genes permitieron confirmar el número de genes y su rol en el proceso y explicar porque desarrollan la

misma función en todos los rizobios. Los genes comunes de nodulación se encontraron que eran cuatro, y se denominaron *nodA*, *nodB*, *nodC* y *nodD*. Mientras los tres primeros son genes que sólo se expresan cuando las bacterias interactúan con los flavonoides de las plantas, el gen *nodD* es constitutivo con lo que la proteína está siempre presente en los rizobios independientemente de si estos interactúan o no con las plantas. Es decir que el sistema funcionaría con la proteína NodD actuando de antena que percibe la señal que son los flavonoides de las plantas. La interacción NodD flavonoide/s activan o no la expresión de los genes comunes *nodA* *nodB* *nodC*. Las proteínas codificadas por estos genes catalizan reacciones que hacen a la síntesis de los factores de nodulación. NodA cataliza la N acilación de los factores de nodulación, NodB es una enzima que cataliza la deacetilación de chitooligosacáridos y NodC cataliza la adición.

Figura 6.4

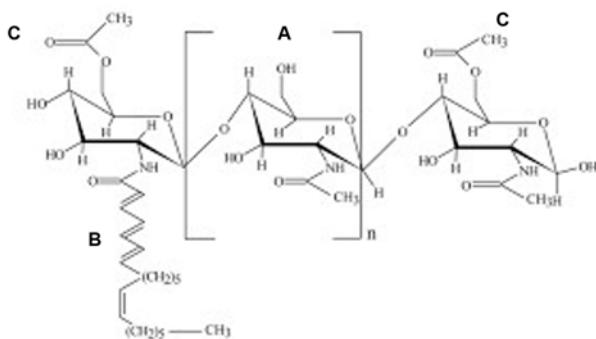


Nota. Interacciones tempranas de los rizobios y las leguminosas. Se muestran los flavonoides liberados por las plantas que interaccionan con NodD proteína que se une a la secuencia nod-box desde donde regula la expresión de los genes comunes de nodulación *nodA* *nodB* *nodC*.

Estas proteínas sintetizan los factores de nodulación (quitooligosacáridos con un lípido) que son reconocidos por los receptores de lisina-kinasa.

Además, se identificó otro grupo de genes que se denominaron de especificidad, estos son alélicos en algunas especies y en otras especies no se encuentran. Estos genes codifican enzimas que introducen grupos accesorios en esas grandes moléculas sintetizadas por los genes comunes.

El proceso de la nodulación es muy complejo y se han identificado una gran cantidad de genes relacionados, entre ellos se encuentran los genes *nod*, *nol* y *noe*, los cuales codifican proteínas involucradas en la nodulación.

Figura 6.5

Nota. Esquema general de un factor de nodulación. A unidad de N acetil glucosamina y B ácido graso que puede ser saturado o insaturado de distinta cantidad de carbono, C sitios de ingreso de decoraciones en la molécula que alteran la especificidad de la misma.

Antes de disponer de las herramientas moleculares diversos reportes científicos describieron que los sobrenadantes de cultivos de rizobios inducidos con exudados de las plantas (probablemente conteniendo flavonoides) cuando eran aplicados en raíces de plantas axénicas provocan alteraciones macroscópicas. Esto, y el hecho de que en la raíz se producían divisiones subepidérmicas aun cuando la bacteria sólo había interactuado con el pelo radical hizo suponer que el sobrenadante debería contener un compuesto orgánico y a estos se los denominaron factores de nodulación. Estudios y análisis posteriores permitieron identificar a estos factores de nodulación y se encontró que son quitooligosacáridos que tienen, un lípido que puede estar saturado o no, que además varía en tamaño. Por otro lado, también se encontró que todos los rizobios sintetizan estos factores de nodulación y que los mismos son similares y que solo varían en las dobles ligaduras y en decoraciones adicionales que sufre la molécula. Todo lo cual, de alguna manera, confirma porqué los genes son comunes de nodulación, y su rol en la síntesis de los factores de nodulación, que todos los rizobios los producen pero que aún así son un poco distintos y explican al menos en parte la especificidad de los rizobios y las leguminosas. Se encontró que los rizobios que son específicos producen un solo factor de nodulación o a lo sumo un par, mientras que los rizobios que nodulan un amplio rango de leguminosas sintetizan una mayor cantidad de factores de nodulación.

Los factores de nodulación son percibidos en las leguminosas por receptores estos son proteínas del tipo de los reguladores codificados por la planta conocidos por sus siglas en inglés (NFR: Nodulation Factor Receptor) contienen dominios Lys (Dominios de Lisina) unidos a kinasas, es decir que tienen la capacidad de transmitir un estímulo a una cadena de transcripción de señales. Estos receptores se ha demostrado que en arveja, soja y *Lotus* son determinantes de la especificidad de la simbiosis. Vale la pena mencionar que recientemente se identificó en *Lotus* un receptor proteico con actividad kinasa Epr3, que de la misma manera que los anteriores receptores pueden transmitir mensajes a una cadena de transcripción. Este receptor se une específicamente a exopolisacáridos y esta unión determina la compatibilidad de la interacción

Esta percepción del estímulo de los factores de nodulación activa un camino de transducción de señales que desatan la formación de nódulos a través de la expresión de las nodulinas tempranas y tardías de la planta. Estas proteínas son sintetizadas por la planta como resultado de la interacción del factor de nodulación y los rizobios, que se utilizan en el proceso de nodulación las tempranas y las nodulinas tardías están vinculadas al proceso de fijación de nitrógeno.

Regulación de la nodulación

El proceso de la nodulación para la planta es costoso desde un punto de vista energético, ya que no solo debe invertir energía en su desarrollo, sino que además luego la respiración y el funcionamiento de estos tienen un costo energético. Debido a esto, las leguminosas desarrollan un determinado número de nódulos que es regulado por la capacidad energética de la planta, pero además por la demanda de N que tiene la planta para expresar su potencial de crecimiento. Eso quiere decir que para la planta es energéticamente menos costoso nutrirse de NO_3^- proveniente del suelo y solo cuando este se encuentra en bajas concentraciones la planta desarrolla nódulos. El mejor ejemplo de esto es que si cultivamos plantas de soja en dos parcelas, a una la fertilizamos con NO_3^- y a la otra la inoculamos con rizobios, las plantas que se nutren del NO_3^- crecen más y desarrollan hojas más grandes, lo que se manifiesta en una mayor biomasa y rendimiento. Es decir que la presencia de nitrógeno en el suelo inhibe tanto el desarrollo de nódulos como la fijación de nitrógeno, lo cual depende de en qué momento aparece la alta disponibilidad de N.

Las raíces de las leguminosas son susceptibles de ser infectadas durante un periodo de tiempo que se le llama ventana de infección, este tiempo que es de aproximadamente seis horas es el que transcurre entre que la zona de alargamiento de la raíz desarrolle, se diferencie y forme pelos radiculares, es decir que solo ese tejido joven es susceptible a la infección por los rizobios. Quiere decir que en la medida que demoro la adición de las bacterias a la raíz los nódulos van a desarrollar en zonas de la raíz más profundas o más aún en raíces secundarias y/o terciarias. El proceso de la nodulación se puede describir en 20 etapas que van desde la interacción temprana hasta la observación de los nódulos. Sin embargo, una pregunta interesante es qué ocurre en las raíces de las leguminosas con el exceso de bacterias que se adiciona mediante la inoculación, dado que se adicionan 1×10^6 células por semilla previo a la siembra. La planta solo desarrolla un número de nódulos que es el adecuado desde un punto de vista del costo energético y que además asegura una provisión de N que no limita el crecimiento de la planta.

Sin embargo, si uno hace observaciones microscópicas de raíces de soja a los 15 días de la inoculación con una suspensión de rizobios de aproximadamente 1×10^6 células por semilla observa una cantidad muy grande pelos radicales enrulados y muchísimas infecciones, todas en diversos estados de desarrollo que no supera ninguna la etapa V del desarrollo de nódulos. Esto se ve como un pelo enrulado y divisiones celulares debajo por lo menos cuatro capas de células

subepidérmicas, que son divisiones celulares provocadas por los rizobios. Sin embargo, todas están detenidas y, además, se pueden ver algunos nódulos que se formaron de manera completa. Se ha demostrado que si se remueven los nódulos la planta libera algunas de las infecciones detenidas y a partir de ellas se forman nuevos nódulos que proveerán a la planta de N. Es decir que en la soja la planta regula el número de nódulos inhibiendo el resto de las infecciones y cuando necesita más nódulos desreprime algunas de estas infecciones preexistentes.

En el caso del trébol que desarrolla nódulos indeterminados, se inoculan menos bacterias por semilla sencillamente porque la semilla es pequeña, pero aun así las bacterias están en exceso 1×10^5 y la planta solo desarrolla algunos nódulos. Si se mira al microscopio una raíz de trébol a los 15 días de la inoculación, solo se ven los nódulos formados y no se observan infecciones detenidas, Esto sugiere que la planta regula la cantidad de nódulos impidiendo la ocurrencia de infecciones que no van a desarrollar un nódulo completo. Es decir que en las leguminosas hay dos vías distintas de control de la nodulación que seguramente involucran caminos un poco distintos.

Simbiosis *Frankia* y especies no leguminosas

Los actinomicetes son un grupo de bacterias filamentosas Gram (+) que tienen un alto contenido de guanina y citosina, en su material genético que establecen simbiosis con un numeroso grupo de especies de plantas que pertenecen a familias de plantas distintas que se conocen como especies actinorrícticas, entre estas plantas se pueden nombrar los géneros *Alnus*, *Casuarina*, *Myrica*, *Hypophaea*, *Eleagnus*, *Caenothus* y *Purshia* (Tabla 6.1). Estas plantas se distribuyen en muy diversos lugares del planeta, aunque suelen encontrarse en suelos con grandes limitaciones de N, muchos de estos son suelos que se encuentran en procesos regenerativos, en los que estas plantas cumplen roles claves. *Frankia* se cultiva desde 1978 momento en que luego de muchos intentos se aisló, pero su cultivo aún hoy es difícil de obtenerlo debido a que tiene un crecimiento lento en medios sintéticos. Esta simbiosis presenta muchas similitudes con la simbiosis que establecen las leguminosas con los rizobios, pero también muchas diferencias. Los nódulos desarrollados por *Frankia* provienen de la modificación del meristema de una raíz lateral, por lo que el nódulo tiene haces vasculares centrales que lo unen a los vasos de la raíz. *Frankia* spp. infecta a las plantas actinorrícticas a través de la raíz, mediante dos mecanismos principales de entrada: a través de grietas en la epidermis radicular ("crack entry") y mediante infecciones intracelulares en los pelos radiculares. Los nódulos que forma son indeterminados es decir tienen un meristema de crecimiento con una vida media considerable y estos nódulos fijan N₂ en cantidades comparables a las leguminosas.

Tabla 6.1*Familias y géneros de plantas que establecen simbiosis con Frankia spp***Plantas Actinorrícticas**

Family	Genera
Betulaceae	<i>Alnus</i>
Casuarinaceae	<i>Allocasuarina, Casuarina, Ceuthostoma, Gymnostoma</i>
Myricaceae	<i>Comptonia, Myrica</i>
Elaeagnaceae	<i>Elaeagnus, Hippophaë, Shepherdia</i>
Rhamnaceae	<i>Ceanothus, Colletia, Discaria, Kentrothamnus, Retanilla, Talguenea, Trevoa</i>
Rosaceae	<i>Cercocarpus, Chamaebatia, Cowania, Dryas, Purshia</i>
Coriariaceae	<i>Coriaria</i>
Datiscaceae	<i>Datisca</i>

Además de los nódulos también forma vesículas, estas son estructuras globosas que albergan actinomicetes fijadores de N en donde pueden sobrevivir durante períodos adversos. Estas vesículas de la misma manera que los nódulos contienen capas de lípidos que contribuyen a disminuir la tensión de oxígeno en los nódulos que también contienen leghemoglobina.

Además de las leguminosas y de las plantas actinorrícticas, otra planta que fija N₂ en simbiosis con *Bradyrhizobium* y que es la única no leguminosa que lo hace es *Parasponia andersonii* (familia Cannabaceae).

Inoculantes comerciales y su uso en la producción

El proceso de la fijación de nitrógeno ha sido uno de los más estudiados y explotados en el área de la Microbiología agrícola. Desde hace mucho tiempo se han desarrollado los inoculantes con bacterias fijadoras de nitrógeno para provocar la nodulación de las leguminosas. Esto ocurrió porque los suelos que contienen rizobios que establecen simbiosis con las leguminosas cultivadas de importancia económica, solo se encuentran en los suelos de los sitios de diversificación de esas leguminosas. Por ejemplo, los suelos de la China contienen muchas especies de rizobios que establecen simbiosis con la soja, porque este es el sitio de origen del cultivo.

Uso tecnológico de la fijación de N₂

Cuando se introduce un cultivo de una leguminosa exótica si se desea realizar una agricultura sustentable que se nutra de N₂ de la atmósfera en base a la simbiosis de la planta con bacterias del suelo, estas se deben adicionar en el momento de la siembra con un inoculante. Si bien en los comienzos esto se hizo transfiriendo suelos supuestamente infectados con estas bacterias, en la actualidad se utilizan los inoculantes, que son suspensiones bacterianas que vienen formuladas como sólidas si están resuspendidas en sustratos sólidos como la turba (provee humedad y materia orgánica para la sobrevivencia de las bacterias). La turba es un insumo costoso y que además muchas veces genera problemas en la maquinaria agrícola por lo que los productores no lo ven con buenos ojos. Debido a esto y al desarrollo de la tecnología, hoy están también los inoculantes líquidos, que además son los que prevalecen y que consisten en suspensiones bacterianas estabilizadas. Independientemente de la formulación, que vale la pena decir hay muchas, la semilla de las leguminosas se inocula con suspensiones de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas por su alta capacidad de fijación de nitrógeno. El éxito de la inoculación radica en que las plantas desarrollen nódulos y que los mismos presenten en su interior un color rojo, que es el color de la leghemoglobina activa que sugiere que las bacterias están fijando nitrógeno activamente.

Las formas de evaluar la fijación de nitrógeno son muchas, la más sencilla es determinar la materia seca, como el N es clave para el crecimiento las plantas con más nitrógeno crecen más. Otra manera es determinar el número y peso seco de los nódulos y el color de estos que como se dijo se debe a la presencia de leghemoglobina.

La práctica de la inoculación suele realizarse junto con la aplicación de los fungicidas y suelen producirse incompatibilidades que atentan contra la sobrevivencia de los rizobios en la superficie de la semilla lo que atenta contra la eficiencia de la inoculación. Hoy en día el tratamiento de semillas que realizan tanto empresas semilleras como fabricantes de inoculantes, están destinados a colocar fungicidas e inoculantes en diferentes capas sobre la superficie de la semilla preinoculada de manera de reducir el contacto de estos productos.

La elaboración de los inoculantes comerciales es un capítulo aparte pero que requiere cumplir diversas etapas, como disponer de una colección de microorganismos caracterizados que se adapten a diversas condiciones ambientales, que también se destaquen por su capacidad de fijar N₂ y que además se puedan multiplicar en medios sintéticos, proceso durante el cual deben tener una estabilidad genética de manera que no se alteren sus capacidades. Estos cultivos bacterianos deben estar libres de contaminantes y deben estar estabilizados con el fin de que sobrevivan en los formulados por un periodo de tiempo importante sin que caiga el número de células viables por unidad de volumen o peso del formulado, hasta la fecha del vencimiento.

Referencias

- Basile Laura A. and Viviana C. Lepek (2021) *Legume–rhizobium dance: an agricultural tool that could be improved?* Biotechnology, 14, 1897–1917
- de Faria Sergio M., Jens J. Ringelberg, Eduardo Gross, Erik J. M. Koenen, Domingos Cardoso ,George K. D. Ametsitsi, John Akomatey, Marta Maluk, Nisha Tak, Hukam S. Gehlot ,Kathryn M. Wright, Neung Teaumroong, Pongpan Songwattana, Haroldo C. de Lima ,Yves Prin, Charles E. Zartman, Janet I. Sprent, Julie Ardley, Colin E. Hughes and an K. James. (2022) *The innovation of the symbiosome has enhanced the evolutionary stability of nitrogen fixation in legumes.* New Phytologist 235: 2365–2377 2365
- Moura, Emanoel; Carvalho, Cristina; Bucher, Cassia; Souza, Juliana; Aguiar, Alana; Junior, Altamiro; Bucher, Carlos, Coelho, Katia. (2020). *Diversity of Rhizobia and Importance of Their Interactions with Legume Trees for Feasibility and Sustainability of the Tropical Agrosystems. Diversity.* 12. 206. 10.3390/d12050206.
- Mus F, Crook MB, Garcia K, Garcia Costas A, Geddes BA, Kouri ED, Paramasivan P, Ryu M-H, Oldroyd GED, Poole PS, Udvardi MK, Voigt CA, Ané J-M, Peters JW. (2016). *Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes.* Appl Environ Microbiol 82:3698 –3710. doi:[10.1128/AEM.01055-16](https://doi.org/10.1128/AEM.01055-16).

CAPÍTULO 7

Microorganismos promotores del crecimiento

Graciela N. Pastorino

Introducción

Mucho antes de que Anton van Leeuwenhoek describa la presencia de “animáculos” (1683), ya se conocía que ciertos suelos se caracterizaban por promover el crecimiento de las plantas o cultivos. En muchas publicaciones de la época se recomendaba incorporar mezclas de suelos para remediar sustratos pobres, o cultivar leguminosas y así aumentar la fertilidad de los suelos.

Klopper en 1978, introdujo el término Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR, del inglés *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) refiriéndose a bacterias que interactúan con las plantas, colonizan sus raíces y/o la rizósfera, provocando mayor desarrollo y/o aumentos de rendimiento de las mismas, debido a diversos mecanismos que mejoran la nutrición, controlan a los fitopatógenos y/o aumentan la tolerancia al estrés ambiental. Luego, el concepto de este término se amplió y hoy se utiliza para incluir a cualquier tipo de microorganismo (bacterias y hongos), no solo rizobacterias, bajo el nombre de PGPM (*Plant Growth Promoting Microorganism*).

Los PGPM se clasifican en base a la manera con que se relacionan con las plantas con las que interactúan, así se describen como simbióticos o asociativos. La simbiosis es la relación estrecha que establecen microorganismos que suelen ubicarse en los tejidos de la raíz en donde intercambian metabolitos que desencadenan procesos que no ocurren cuando los simbiontes no interactúan. Un ejemplo de organismos simbióticos son los rizobios, bacterias del suelo que establecen simbiosis con las leguminosas, otro caso es el actinomicete *Frankia* sp. con plantas angiospermas (plantas actinorrícticas), o las micorrizas que consisten en una relación de un grupo de hongos y plantas superiores.

En las interacciones asociativas se intensifican ciertos procesos pero que el microorganismo y la planta también realizan cuando están en vida libre. En general estos PGPM, viven fuera de los tejidos vegetales, cerca (rizósfera) o sobre la superficie de la raíz (rizoplano), es el caso de *Azospirillum* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., entre otros.

Mecanismos de acción

Hay varios mecanismos mediante los cuales los microorganismos estimulan el crecimiento de las plantas, es posible diferenciarlos en mecanismos directos e indirectos.

Mecanismos directos

Se conoce como mecanismos directos a aquellos que modifican el estado del nutriente en lo que hace a su disponibilidad para la nutrición de la planta, como la fijación de N₂, solubilización de P mineral y la estimulación del crecimiento de la raíz por producción de fitohormonas, principalmente.

Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN): Consultar el capítulo 5 de FBN.

Síntesis de hormonas vegetales

La fitoestimulación es el mecanismo más estudiado en las bacterias PGPM y se ha encontrado que las fitohormonas y algunos compuestos volátiles son los compuestos responsables de este mecanismo.

Las hormonas son compuestos orgánicos que se encuentran en cantidades extremadamente bajas que actúan promoviendo o inhibiendo procesos bioquímicos, fisiológicos, que redundan con frecuencia en alteraciones morfológicas de las plantas, por ejemplo: auxinas, citocininas, etileno, giberelinas y ácido abscísico. Ciertas alteraciones en el balance hormonal provocan modificaciones fisiológicas que se visualizan en incrementos en el crecimiento de la raíz y aumento del volumen radicular, cambios en la tasa respiratoria de las plantas y/o cambios a nivel del funcionamiento de las membranas de los tejidos radicales que alteran la absorción de los nutrientes presentes en la solución del suelo.

Son muchos los microorganismos que sintetizan auxinas y las liberan como metabolitos secundarios. El ácido-indol-3-acético (AIA) que es la auxina más estudiada, se sintetiza por medio de más de una vía metabólica siendo el principal precursor el triptófano. Una de las acciones más importantes de esta fitohormona consiste en promover la división celular, modificando procesos como la germinación de semillas, estimulando la elongación celular. Además, promueve el desarrollo del sistema radical ya que induce la formación de raíces laterales y adventicias, así como su crecimiento, por lo que amplía el área de suelo explorado por las mismas aumentando así el acceso a los nutrientes y agua del suelo. Esta hormona también cumple un rol clave en la multiplicación celular que ocurre en las leguminosas que desarrollan nódulos.

Otro grupo de fitohormonas producidas por las PGPM son las citocininas, que entre otras funciones estimulan la actividad metabólica de las células, el desarrollo de las yemas laterales, la división celular en la raíz, la elongación y el incremento del área de la raíz mediante la

formación de raíces adventicias y la proliferación de pelos radiculares, y también demoran la senescencia de los tejidos.

Las giberelinas son hormonas que estimulan la división y elongación celular pero además interrumpen la dormición que presentan las yemas y semillas de numerosas especies, e inducen el alargamiento de entrenudos, es decir que promueven el crecimiento vegetativo de la planta.

Algunos ejemplos de géneros y especies bacterianas reportados con capacidad de producir fitohormonas son: *Arthrobacter giacumelloi*, *Azospirillum argentinense*, *Aeromonas veronii*, *Alcaligenes piechaudii*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Azotobacter sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium leguminosarum*, *R. phaseoli*.

Solubilización/mineralización de fosfatos

El fósforo (P), junto con el nitrógeno (N), limitan el crecimiento de los cultivos. Las plantas absorben los nutrientes de la solución del suelo en donde se encuentran en forma de fosfatos solubles, específicamente el P se encuentra como ortofosfato mono y divalente ($H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}) o como sales de amonio. Aunque suele agregarse al suelo en el momento de la siembra, frecuentemente cuando se fertiliza, ciertos nutrientes, en especial el P, forman un complejo con minerales del suelo (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+}), poniéndose de esta manera no disponible para las plantas. En los suelos tropicales y subtropicales (predominantemente ácidos) el P forma complejos insolubles con Fe y Al, elementos que suelen estar en alta concentración en esos ambientes. Por otro lado, en suelos neutros o calcáreos el P se combina con el Ca, formando compuestos de muy baja solubilidad.

Las moléculas de P orgánicas del humus y otros restos orgánicos del suelo se hallan formando parte de moléculas que cumplen roles biológicos claves como el ADN, ATP, fosfolípidos (en membranas), y constituyen en conjunto un importante reservorio de P inmovilizado, entre el 20-80 % del total del P del suelo.

En función de lo descrito es clave el rol que cumplen los microorganismos que tienen la capacidad de solubilizar/mineralizar el fósforo, ya que utilizan de manera más eficiente las enmiendas que se realizan al suelo, como el agregado de materia orgánica o fertilización.

Los organismos solubilizadores de P presentan diversos mecanismos de acción:

- producción de enzimas: fosfatasa, fitasa, C-P liasas,
- producción de ácidos orgánicos (quelación),
- liberación de protones, reemplazo de iones,
- acidificación.

Las bacterias liberan los fosfatos presentes en la materia orgánica a través de un proceso llamado mineralización del fósforo (P). Esto sucede gracias a la acción de ciertas enzimas — como las fosfatasa, fitasa o C-P liasas — que son producidas y secretadas por microorganismos especializados en disolver compuestos. Estas enzimas microbianas actúan

sobre la materia orgánica, rompiendo los enlaces tipo éster, lo que permite liberar iones fosfato (PO_4^{3-}), dejándolos disponibles para que las plantas y otros organismos los puedan utilizar.

Los procesos de transformación del P están influenciados por la humedad, la temperatura y fundamentalmente por el pH del suelo, la máxima disponibilidad de P ocurre entre pH 5,5 a 7.

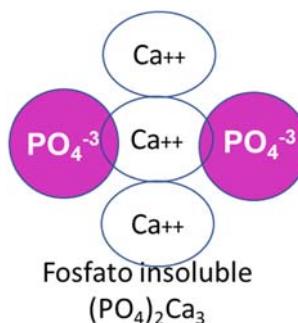
Dentro de los mecanismos que liberan P a partir del fósforo mineral, se encuentran la producción de ácidos orgánicos como el ac. cítrico, glucónico, oxálico, succínico, láctico, acético, mágico, etc. Estos compuestos orgánicos pueden quelar (“atrapar”) iones (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Al^{+3}) en el suelo evitando que estos se unan a los fosfatos. Algunos grupos microbianos acidifican el medio y de esta manera liberan P de las formas insolubles del suelo (rocas), lo que suele ocurrir en suelos alcalinos. Por último, otro mecanismo de solubilización es la producción de H^+ que reemplazan a los iones Ca^{+2} , lo que resulta en la producción de formas más solubles de P.

Los microorganismos involucrados en la solubilización de P incluyen bacterias y hongos (Figura 7.1).

Se han descrito un gran número de aislados con una buena capacidad de solubilización de P de los géneros bacterianos *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Micromonospora*. Entre los hongos, se encuentran cepas de *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.

Figura 7.1

Mecanismos de solubilización de P



Quelación de cationes	Producción de protones (H^+)	Descenso del pH
<p>Los ácidos orgánicos quelan cationes (Ca^{+2}) impidiendo que se combinen con el fosfato y se insolubilicen, quedando el P biodisponible.</p>	<p>La sustitución de cationes (Ca^{+2}) por los H^+ que producen las bacterias, generan fosfatos solubles.</p>	<p>El descenso de pH, en suelos alcalinos ($\text{pH} > 6$), produce que la roca fosfórica libere los fosfatos naturalmente.</p>

Mecanismos indirectos

Los mecanismos de acción indirectos son los que no actúan directamente sobre el crecimiento, sino que su actividad repercuten en las plantas mediante el control biológico de patógenos, la reducción del impacto de las enfermedades y/o estreses abióticos.

Se pueden enumerar diferentes actividades biocontroladoras: 1) síntesis de enzimas hidrolíticas, que contribuyen a la muerte de las células fúngicas patógenas; 2) competencia por nutrientes (sideróforos) y espacio, mediante la formación de *biofilms* y colonización de las superficies de la planta; 3) regulación del nivel de hormonas vegetales, como por ejemplo la síntesis del etileno, que se genera como resultado de un estrés y es regulada por la actividad de la enzimas ACC-deaminasas; 4) producción de metabolitos como antibióticos, bacteriocinas, metabolitos antifúngicos, compuestos orgánicos volátiles, que tienen capacidad antagónica; 5) incremento de la respuesta de defensa de las plantas, mediante la estimulación de la resistencia sistémica inducida (RSI).

Síntesis de enzimas hidrolíticas

Diversas especies de bacterias PGPR producen enzimas hidrolíticas, como quitinasas, glucanasas, proteasas, celulasas, pectinoliasas y lipasas. Estas enzimas pueden lisar las células fúngicas patógenas, degradando la pared celular de los hongos, evitando la extensión de sus hifas.

Se ha descubierto que las PGPR que sintetizan una o más de estas enzimas tienen actividad de biocontrol contra una variedad de hongos patógenos, incluidos *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora spp.*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum*.

Un género que contiene una cantidad importante de especies con esta capacidad es *Bacillus*.

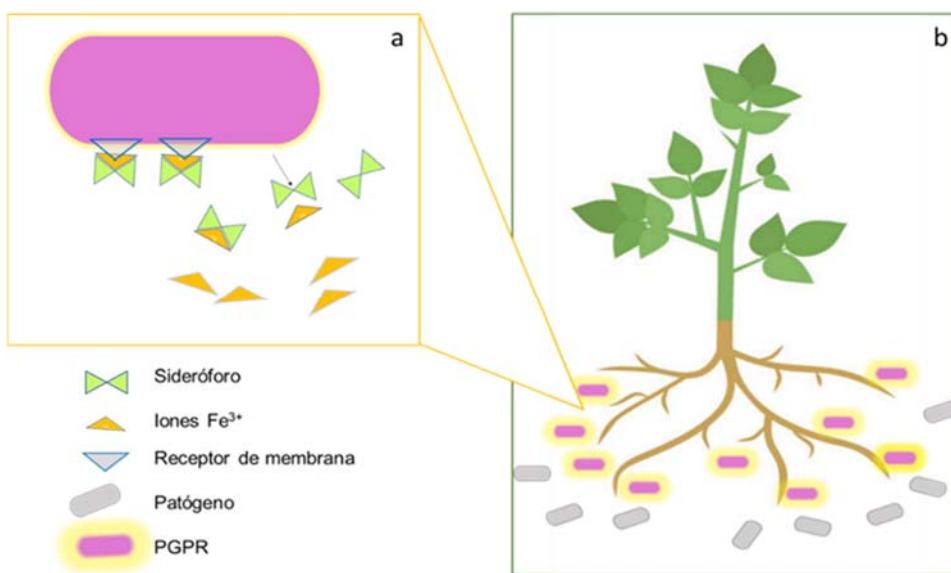
Sideróforos

Los sideróforos son metabolitos secundarios de bajo peso molecular que sintetizan muchas especies de bacterias y hongos, que se destacan por su afinidad por el hierro. Los microorganismos suelen producirlos y secretarlos en condiciones de deficiencia de hierro. Aunque este nutriente es abundante en la corteza terrestre, en general su disponibilidad es baja. En el ambiente aeróbico, el hierro se presenta principalmente como Fe^{3+} y forma hidróxidos insolubles, estado en que se encuentra no disponible para las plantas y los microorganismos.

Los sideróforos, son moléculas que tienen la capacidad de atraer y unir al Fe (quelantes de hierro). Esta capacidad representa una ventaja para los microorganismos que los producen ya que de esta manera acceden a un recurso que muchas veces es escaso. Estas moléculas se clasifican según sus características estructurales en: carboxilatos, hidroxamatos, fenol cateoles y pioverdinas. El mecanismo de acción consiste en la formación de un complejo sideróforo- Fe^{3+} , luego un receptor específico localizado en la membrana reconoce al Fe y lo transporta por medio de un mecanismo activo (con gasto de energía) hacia el interior de la célula y en el citoplasma es reducido a Fe^{2+} que es el estado de oxidación del nutriente activo. En otros organismos, como

los hongos, el complejo sideróforo- Fe^{3+} puede ser reducido a Fe^{2+} fuera de las células, es decir, extracelularmente (Figura 7.2).

Figura 7.2



Nota. a) Una bacteria produce y excreta sideróforos, que se unen al Fe^{3+} y son translocados al interior de la célula a través del receptor de membrana. b) De esta manera las bacterias productoras de sideróforos sustraen del medio el Fe y se establece una competencia por el nutriente con otros microorganismos patógenos que sufren la carencia.

Son muchos los estudios que han reportado la promoción del crecimiento de las plantas provocada por microorganismos que absorben hierro por su capacidad para sintetizar sideróforos. Sin embargo, se destaca el biocontrol de fitopatógenos con microorganismos productores de sideróforos. La interacción consiste sencillamente en que, en un entorno limitado en hierro, los microorganismos que producen sideróforos lo sustraen del medio, evitando así que potenciales competidores como por ejemplo organismos patógenos accedan al Fe lo que limita su crecimiento. Además, se encontró que los sideróforos pueden activar la resistencia sistémica inducida (RSI) de las plantas.

Dentro de las bacterias productoras de sideróforos que inhiben el desarrollo de patógenos se encuentran *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *B. tropica*, *Azospirillum argentinense*, *Burkholderia gladioli* y *Ensifer meliloti*.

Colonización de la superficie de la raíz (formación de *biofilms*)

Ciertas especies de bacterias PGPR sintetizan un amplio espectro de polisacáridos, estos suelen interactuar con diferentes sustratos y además actúan protegiendo a los microorganismos del estrés ambiental y la deshidratación. Los exopolisacáridos (EPS) cumplen un rol clave en la formación de biopelículas, en donde comunidades estructuralmente complejas de células, se rodean de una matriz polimérica extracelular formada por EPS que además adhiere los microorganismos a las superficies con las que interactúan (*biofilm*).

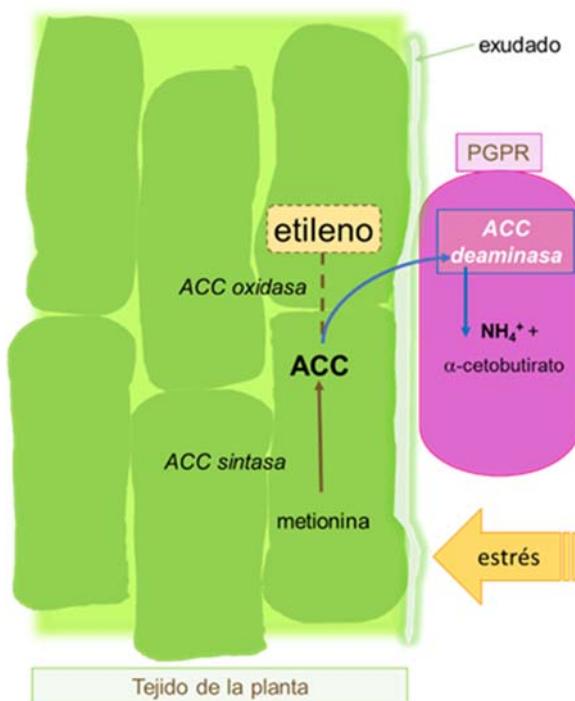
Las bacterias PGPR forman *biofilms* como los descritos, colonizan las raíces y así, entre otras funciones, ayudan a retener el fósforo soluble, facilitan la circulación de nutrientes esenciales para la planta, brindan protección del ataque de patógenos al competir por nutrientes y espacio. Otro beneficio que ofrecen los *biofilms* es que pueden unirse a los iones de sodio para proteger contra el estrés por salinidad.

Entre las bacterias PGPR que forman biopelículas se encuentran: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Serratia*.

Enzimas ACC-deaminasas

El etileno, es una hormona de las plantas superiores, es un gas que difunde rápidamente, actúa en la germinación de las semillas, la elongación y proliferación celular, la maduración de los frutos o la senescencia y la caída de hojas y frutos. También interviene en la respuesta al estrés que ocasionan factores bióticos o abióticos adversos, como son la acumulación de metales y ciertas sustancias químicas (orgánicas e inorgánicas), la exposición a la luz ultravioleta, las temperaturas extremas, condiciones de exceso o déficit hídrico, el daño producido por insectos, nematodos, infección por fitopatógenos (hongos y bacterias) y las heridas mecánicas.

La vía de síntesis de etileno se inicia en la producción de ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) a partir de metionina por acción de la enzima ACC sintasa. El compuesto ACC luego, por actividad de la ACC oxidasa, libera etileno. Parte del ACC que sintetizan las plantas es exudado y ciertas bacterias de la rizósfera que sintetizan la enzima ACC deaminasa, lo degradan a α -cetobutirato y amonio (Figura 7.3). Esto causa una disminución de la concentración de etileno que, entre otras cosas, demora la senescencia y la muerte prematura como consecuencia del estrés y por otro lado la molécula nitrogenada resultante de la reacción (amonio) queda disponible para la planta y otros microorganismos.

Figura 7.3

Nota. Esquema de la interacción entre una bacteria PGPR y la raíz. A partir de la metionina se sintetiza el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) mediante la enzima ACC sintasa. Parte del ACC se convierte en etileno, otra es exudada y bacterias de la rizósfera la degradan causando así una disminución de la concentración de etileno. Esto demora la senescencia y la muerte prematura de la planta en respuesta al estrés.

Las PGPR que sintetizan ACC deaminasas suelen encontrarse en la superficie de los órganos de las plantas o viviendo como endófitos en los tejidos vegetales como raíces, hojas, flores o semillas. Probablemente por esto las plantas asociadas a las PGPR-ACC deaminasas suelen ser resistentes a la inhibición del crecimiento causado por el estrés.

La aplicación en maní, pimiento y tomate de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, o ciertas bacterias halotolerantes como *Arthrobacter nicotianae*, *Bacillus stratosphericus*, *Corynebacterium variabile*, proporcionan resistencia al estrés salino y con ello incrementan la producción del cultivo. En condiciones de estrés anaeróbico, cepas de *Enterobacter cloacae* protegen a las plantas de tomate del estrés que genera la inundación; promueven el desarrollo vegetal, aumentan la cantidad de clorofila en las hojas y reducen sustancialmente la producción foliar de etileno.

Antibióticos- Enzimas

Los antibióticos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que producen ciertos microorganismos y afectan el crecimiento o las actividades metabólicas de otros (ver Capítulo 1). Es decir que son agentes antagonistas que eliminan, reducen o inhiben el crecimiento de los fitopatógenos. El aumento del empleo de este tipo de PGPR como biocontrol, podría llevar a que ciertos patógenos desarrollen resistencia a antibióticos específicos. Por ello se sugiere la

utilización de cepas bacterianas que además de antibióticos sinteticen cianuro de hidrógeno (HCN), parece actuar de forma sinérgica con los antibióticos codificados por bacterias.

Algunos aislados de *Pseudomonas fluorescens* y *P. chlororaphis* producen antibióticos como la pirrolnitrina y la fenazina, la primera protege de *Rhizoctonia solani* a plantas de algodón, y la segunda inhibe a *Fusarium oxysporum* y *Gaeumannomyces graminis*. La mayoría de las especies del género *Bacillus* sp. inhiben bacterias y hongos fitopatógenos a través de la síntesis de antibióticos como lipopéptidos, polimixina, circulina y colistina.

Se han encontrado numerosos actinomicetes (*Micromonospora* sp., *Streptomyces* sp., *Streptosporangium* sp. y *Thermobifida* sp) que actúan como promotores del crecimiento por su capacidad para controlar fitopatógenos dado que son una fuente importante de diversos metabolitos antimicrobianos.

Resistencia sistémica inducida (RSI)

El sistema inmune de la planta está conformado por varios mecanismos de defensa, algunos de ellos se inducen por la interacción de la planta con organismos saprófitos que viven en el suelo e interactúan con las raíces de las plantas, a este mecanismo se lo conoce como Resistencia Sistémica Inducida (RSI). Esta resistencia se desencadena ante estímulos químicos o bióticos específicos, donde participan el ácido jasmónico (AJ) y el etileno (ET), lo que resulta en una resistencia parcial o completa contra el ataque posterior de patógenos.

Algunos PGPM que promueven RSI pueden suprimir enfermedades de la planta o disminuir la severidad de la sintomatología de la infección generada por patógenos, confiriendo resistencia a bacterias, virus, hongos patógenos, nematodos y algunos insectos.

Los géneros bacterianos más estudiados que desencadenan RSI, son *Azospirillum* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. La interacción entre la PGPR y la planta es específica, es decir que ciertas cepas son capaces de desencadenar respuestas en una especie vegetal y pueden no ser efectivas en otra.

Otra forma de protección que tienen las plantas, diferente a la RSI, es vía la señalización con ácido salicílico y el desarrollo de la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA). Este mecanismo ocurre luego de una primera infección por un patógeno necrotrófico, que puede desencadenar una reacción de resistencia sistémica que hace que el huésped sea menos susceptible a infecciones posteriores en los tejidos distales y les confiere resistencia frente a infecciones secundarias causadas por un amplio espectro de patógenos durante semanas o meses. El ácido salicílico activa conjuntos específicos de genes asociados con la defensa llamados proteínas relacionadas con la patogénesis.

La RSI no proporciona una protección total frente a las enfermedades, pero las PGPR emplean varias estrategias que evitan que se desarrolle resistencia de los patógenos.

Dentro de los bioinoculantes PGPR que se comercializan en el mundo y en Argentina la mayor parte están formulados en base a *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

Azospirillum, Pseudomonas y Bacillus: microorganismos clave para sistemas agrícolas sustentables

Entre las PGPR más estudiadas y utilizadas se encuentran los géneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, por su efectividad en diferentes cultivos y condiciones edáficas. A continuación, se describen sus principales características y aplicaciones agronómicas.

Azospirillum

El género *Azospirillum* es el más estudiado dentro del grupo de los microorganismos PGPR, después de los rizobios, por su habilidad para mejorar el crecimiento, desarrollo y consecuentemente el rendimiento de numerosas especies cultivables.

Esta bacteria que fue aislada de la rizósfera y de la superficie de la raíz de una amplia variedad de plantas (cereales, pastos forrajeros, cactáceas, etc.), coloniza los tejidos internos y externos de las raíces de numerosas especies vegetales (maíz, trigo, arroz, sorgo y plantas no gramíneas como endófitos facultativos). Pertenece a la clase α-Proteobacteria y se la describe como bacilo ligeramente curvo, Gram (-), aerobio, móvil.

Si bien inicialmente el interés en esta bacteria se centró en su capacidad para fijar N₂ en vida libre (diazótrofo rizosférico), luego se encontró que cumple un rol clave como PGPR en base a otras capacidades (Figura 7.4).

Algunos de los modos de acción evaluados en este género son:

- fijación de N₂ en vida libre o como endófito
- producción de fitohormonas: estimula el desarrollo del sistema radicular
- desencadena la RSI: mitiga el estrés abiótico, como la salinidad, la sequía, acumulación de metales pesados.

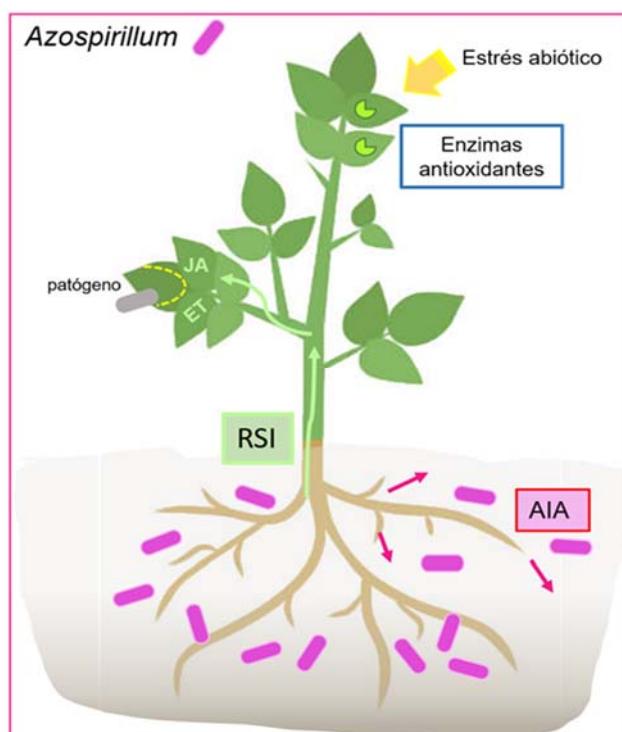
La interacción entre *Azospirillum* y la planta se inicia en la rizósfera, donde se encuentran los sustratos para el crecimiento bacteriano, como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, vitaminas, nucleótidos y otros metabolitos con actividad biológica como las auxinas. La presencia de estos compuestos estimula en *Azospirillum* la síntesis de AIA. El AIA exógeno puede variar dependiendo de la cantidad de bacterias en los tejidos, pero podría suplementar transitoriamente el déficit de hormonas del hospedador y en ese caso promover el crecimiento. Las plantas inoculadas con *Azospirillum* aumentan la densidad y longitud de los pelos radicales, y el número y volumen de raíces laterales; lo que produce un aumento significativo en la absorción de nutrientes por parte de la planta huésped (K⁺, Ca²⁺, PO₄³⁻, H₂O, etc.). Esto se ha comprobado tanto en invernadero como a campo, en cultivos de maíz, trigo y otras gramíneas.

La evaluación del desarrollo del sistema radicular en gramíneas es un parámetro fisiológico clave para seleccionar las cepas con mejor capacidad de promoción del crecimiento. Las plantas

que desarrollan una raíz fuerte con numerosas raíces laterales y adventicias tienen una ventaja adaptativa, ya que pueden anclarse al suelo más rápidamente y obtener agua y nutrientes con mayor eficiencia.

Los estreses abióticos y el ataque de patógenos provocan como mecanismo inicial de respuesta, en la planta, el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) (superóxido, radicales hidroxilos, peróxido de hidrógeno). Las ROS peroxidan los lípidos afectando así la permeabilidad selectiva de las membranas celulares y con ello la vida de las células. Las plantas sintetizan enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa que las protegen del estrés oxidativo. *Azospirillum*, induce la síntesis de enzimas antioxidantes en las plantas, lo que reduce el efecto de las ROS inducidas por estrés.

Figura 7.4



Nota. Efectos de *Azospirillum* sobre el crecimiento de la planta estimulando el desarrollo de la raíz por síntesis de fitohormonas-AIA y el biocontrol induciendo la producción de ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) por la planta, como respuesta a la estimulación de la Resistencia Sistémica Inducida RSI, y la producción de enzimas antioxidantes como defensa ante el estrés abiótico.

La aplicación de esta PGPR como bioinoculante puede realizarse de varias maneras: en el sustrato, en el riego de los plantines y también, a pesar de que es una bacteria rizosférica, mediante pulverización foliar. En este último caso se asume que la producción de fitohormonas es responsable de la respuesta favorable, en ensayos realizados sobre maíz. *Azospirillum* se presenta como una tecnología prometedora no solo por su acción como promotor del crecimiento, sino también por su impacto en la mitigación del estrés abiótico.

La producción de inoculantes comerciales de *Azospirillum* a nivel mundial se ha realizado con *A. brasiliense* y *A. lipoferum*, y en nuestro país se emplea *A. argentinense* Az39.

Pseudomonas

Pseudomonas es un género que se caracteriza por ser bacilos aerobios, Gram (-), móviles, pertenecientes a la clase GammaProteobacterias. Tienen la característica de ser ubicuas, se las ha aislado de la rizósfera y la filósfera de diversos ecosistemas terrestres y acuáticos. Algunas especies son benéficas, en tanto que otras pueden ser patogénicas de plantas, animales y humanos.

La importancia de esta bacteria en la producción agropecuaria se ha incrementado básicamente por la gran cantidad de aislados que se encuentran en formulados que se recomiendan utilizar para promover el crecimiento vegetal y biocontrolar patógenos (Figura 7.5).

Pseudomonas, de la misma manera que otras bacterias PGPR, basa su actividad en diversos mecanismos. Entre las estrategias de *Pseudomonas* se puede mencionar:

- producción de fitohormonas (AIA)
- producción de sideróforos (cromopeptídicos, muy característicos, como pioverdina)
- solubilización de fósforo mediante el ácido glucónico y cítrico
- fijación de nitrógeno atmosférico a amoníaco (NH_3)
- producción de ácido cianhídrico (HCN) que actúa como biocontrol de hongos patógenos y también contribuye a la quelación de ciertos metales, en el sustrato.
- estimulación de la resistencia sistémica inducida (RSI) en las plantas, mediante los lipopolisacáridos de la superficie celular
- producción de diversos compuestos antimicrobianos como el 2,4-diacetilfluoroglucinol (DAFG), y secreción de enzimas celulolíticas.

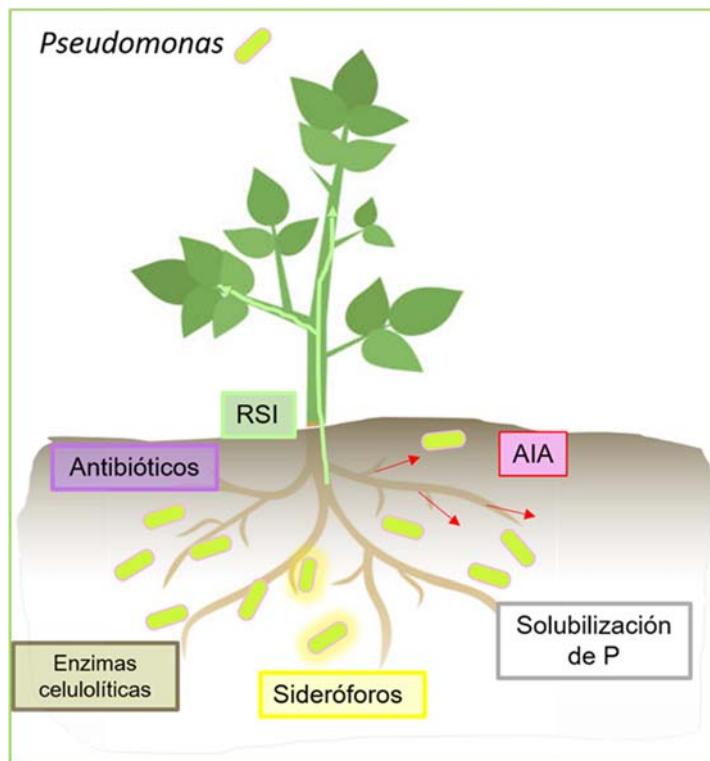
Estos microorganismos son habitantes del suelo, su proliferación provoca cambios en el ambiente que evita que los patógenos logren establecerse o dañen de manera significativa a las plantas ya sea por la síntesis y liberación de múltiples metabolitos y/o por la competencia que ocasionan. A estos suelos se los conoce también como supresivos.

Los cultivos de trigo que se inoculan con *P. fluorescens* y *P. chlororaphis* se comportan mejor frente a patógenos fúngicos y suelen rendir entre un 10 y 20% más, demostrando la capacidad biocontroladora de *Pseudomonas*. Entre los metabolitos que se han asociado a esta capacidad se encuentran los sideróforos, el ácido antranílico, el ácido 2-hidroxifenazina-1-carboxílico (2-OH-PCA), la 2-hidroxifenazina (2-OH-PZ) y el HCN.

Este género produce una amplia variedad de antibióticos, algunos de ellos son el 2,4-diacetilfluoroglucinol (DAFG), la pirrolnitrina, la pioluteorina, compuestos derivados de la fenazina y lipopéptidos cíclicos. La producción de dichos compuestos es modulada por factores exógenos, bióticos o abiotícos. Estos compuestos son de amplio espectro, inhiben bacterias, hongos,

nematodos e insectos. Son claves en el biocontrol de enfermedades de raíces y plántulas. El mecanismo de acción de estos compuestos, en general, se inicia con alteraciones en la membrana celular y producción de radicales oxidantes, que resultan en daños irreversibles al organismo.

Figura 7.5



Nota. Mecanismos de acción de *Pseudomonas* como PGPR: producción de fitohormonas (AIA), solubilización de P inorgánico por ácidos orgánicos, disponibilidad de Fe por sideróforos y biocontrol de patógenos por producción de antibióticos, síntesis de enzimas celulolíticas, estimulación de RSI y competencia por el Fe.

La pirrolnitrina es de gran importancia en el ámbito agrícola, farmacéutico e industrial, por su eficiencia como antifúngico y frente a bacterias Gram (+).

Las enzimas celulolíticas (e.j. β -1,3-glucanasa) que sintetiza *Pseudomonas*, degradan la pared celular, tienen acción quitinolítica y ejercen un efecto inhibidor directo en el crecimiento de los patógenos.

Los microorganismos que colonizan las raíces/rizopano rápida y eficientemente, disponen de herramientas que les permite competir con mayor eficiencia por los nutrientes y los nichos del suelo, tal es el caso de *Pseudomonas*, que limita el crecimiento de microorganismos no deseados protegiendo indirectamente a las plantas.

Pseudomonas es una bacteria de relevancia para el control de patologías y la promoción del crecimiento debido a su habilidad para distribuirse en los tejidos radicales y en la rizósfera, multiplicarse y persistir, en presencia de la microflora autóctona.

En condiciones de estrés por falta de agua, sequía, se encontró que la inoculación con *Pseudomonas* indujo la síntesis de prolina, aminoácidos y azúcares solubles, que condujeron a una mejor absorción de humedad y nutrientes y en consecuencia un mayor crecimiento de las plantas. Además, las plantas inoculadas, contuvieron una mayor cantidad de exopolisacáridos (EPS), lo que contribuyó a mantener el nivel de humedad alrededor de la raíz, protegiendo a los microorganismos y las plantas de la falta de agua.

En resumen, *Pseudomonas* presenta características que le confieren ventajas para la aplicación como biofertilizante, puede habitar la rizósfera donde emplea una amplia variedad de exudados como nutrientes, se adapta a distintas condiciones, se multiplica en forma rápida y constituye poblaciones de elevada densidad, que colonizan la rizósfera y compiten agresivamente con otros microorganismos; produce amplio rango de metabolitos bioactivos que inhiben patógenos (antibióticos, sideróforos, compuestos volátiles), estimula la resistencia sistémica inducida, presenta capacidad diazotrófica y promueve el crecimiento mediante auxinas, sideróforos y solubilización de fósforo. Además, es fácil de cultivar in vitro, puede ser producido en masa y reintroducido mediante la inoculación de semillas.

Pseudomonas fluorescens ha sido la especie más estudiada y en segundo lugar *P. chloraphis*, que son las que se emplean para la formulación de bioinoculantes en nuestro país.

Bacillus

Bacillus es un género constituido por bacilos Gram (+), aerobios o anaerobios facultativos, móviles. Tiene la capacidad de formar endosporas, lo que le otorga resistencia y le permite sobrevivir a condiciones adversas. Pertenece a la clase Bacilli, filo Firmicutes. Son microorganismos saprófitos, ubicuos, que habitan suelos y sedimentos acuáticos en ambientes muy diversos.

Algunas especies de *Bacillus* tienen capacidad para el biocontrol de patógenos del suelo y para el control de insectos. Entre los primeros se puede mencionar a *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. amyloliquefaciens* y entre los segundos se puede mencionar a *B. thuringiensis* y *B. popilliae*.

De la misma manera que otras especies bacterianas las especies del género *Bacillus* disponen de un conjunto de mecanismos que utilizan aisladamente o en conjunto para cumplir su rol de organismo biocontrolador (Figura 7.6). Su capacidad de esporular le brinda ventajas a la hora de generar biotecnológicamente formulados de una extendida vida media en las góndolas.

Los mecanismos que se han encontrado y descripto en diversas cepas de *Bacillus* y en las que aparentemente reside su capacidad biocontroladora son:

- producción de compuestos antimicrobianos, como antibióticos, bacteriocinas, lipopéptidos (LP) y policétidos (PKs),
- producción de hormonas,
- capacidad de colonización, competencia por espacio y nutrientes (sideróforos, desplazamiento de nicho, formación de biopelículas),
- síntesis de enzimas líticas como quitinasa, glucanasa, proteasas y acil homoserin lactonasa (AHSL),
- producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs); como acetona, etil propionato, isobutilalcohol,
- inducción de resistencia sistémica (RSI). Elicitores: VOCs, flagelina, LP, enzimas líticas.

Entre los compuestos antimicrobianos que se han descrito se destacan tres familias de lipopéptidos (LP): surfactinas, iturinas y fengicinas. Estas moléculas tienen una gran diversidad estructural y se conocen comúnmente como bacteriocinas, son efectivas biomoléculas anfifílicas activas contra un amplio rango de entes y microorganismos como virus, bacterias, hongos y oomicetes fitopatógenos. Estos compuestos, por otro lado, pueden influir en la aptitud ecológica de la cepa productora, cumplen un rol en la capacidad de colonización de las raíces y su persistencia en la rizósfera, y suelen además tener un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas estimulando los mecanismos que defienden a las plantas de los patógenos.

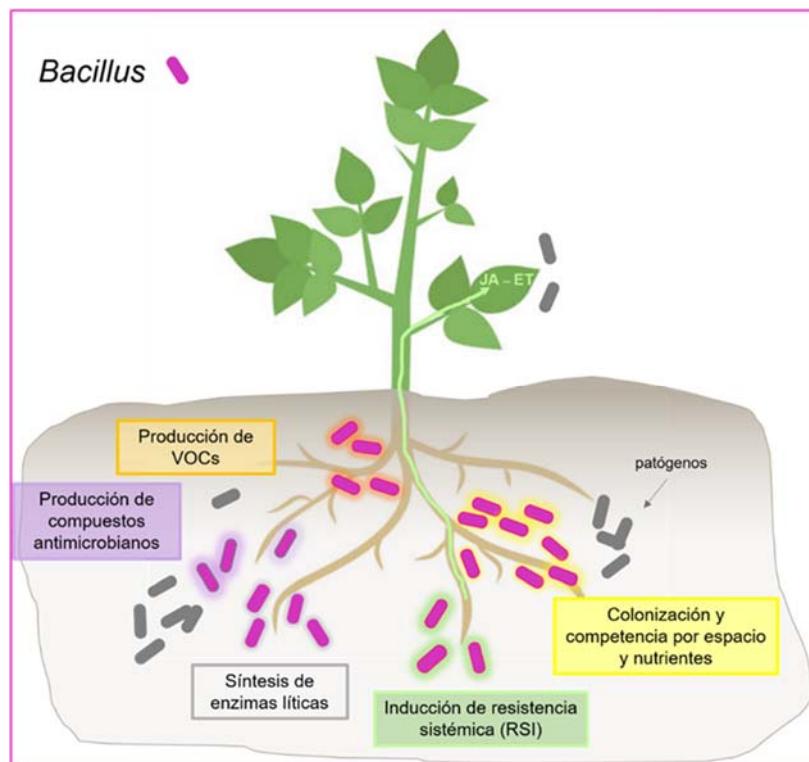
Los LP se sintetizan y liberan al medio primordialmente en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano durante la esporulación, son biotensioactivos poderosos con propiedades emulsionantes y espumantes excepcionales. Interfieren con la integridad de la membrana biológica y su actividad es función de la dosis, es decir de la concentración del producto.

Las bacteriocinas son biomoléculas de origen proteico que presentan la capacidad de alterar la membrana de patógenos, formando poros y generar una desestabilización del sistema celular provocando la muerte del microorganismo.

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) pueden inhibir el crecimiento del micelio y la germinación de esporas de varios hongos patógenos. Se han identificado numerosos compuestos, en su mayoría alcoholes o cetonas, pero también se han encontrado aldehídos, hidrocarburos, ésteres, ácidos orgánicos y otros.

Bacillus forma microcolonias que suelen considerarse un tipo de biopelícula que se puede formar en las superficies de las partículas del suelo y de la raíz, con participación de surfactinas.

Las colonias bacterianas se multiplican y las bacterias se mueven sobre el sistema de raíces para alcanzar nuevos nichos con más nutrientes. Esto se puede lograr a través del movimiento de enjambre (*swarming*). Este desplazamiento impulsado por flagelos, que permite que las bacterias se muevan colectivamente como una biopelícula sobre la superficie de la raíz, depende en gran medida de la producción de biosurfactantes. Diversos estudios demostraron que los LP de *Bacillus* están involucrados en la motilidad superficial. Los LP funcionan como agentes humectantes al reducir la tensión superficial.

Figura 7.6

Nota. Mecanismos de acción de *Bacillus* como Biocontrolador de patógenos mediante la producción de compuestos antimicrobianos, la síntesis de enzimas líticas, la estimulación de RSI, la competencia por espacio y por el Fe mediante sideróforos.

Si bien las surfactinas cumplen un rol en los organismos biocontroladores, no está claro si el efecto protector frente a fitopatógenos se debe a la actividad bactericida directa o al efecto inhibidor de las mismas en la adherencia de las células patógenas a la superficie de la raíz, es decir la formación de biopelículas de organismos patógenos. Además, diversos estudios demostraron que el biocontrol de varios patógenos de plantas que viven en el suelo y en la superficie de las hojas ocurre por la acción de las iturinas y fengicinas en diferentes especies de plantas (tomate, melón) y aplicado sobre frutos (manzanas).

Las diversas actividades biológicas que son típicas de los LP no sólo contribuyen a la actividad antagonista de patógenos, sino que además hacen que las poblaciones de *Bacillus* compitan eficientemente con otros grupos microbianos en la rizósfera.

Las bacterias *Bacillus* se consideran bacterias benéficas y una alternativa ecológica a los productos químicos para el control de enfermedades e insectos.

Bacillus subtilis se encuentra en el suelo y suele formularse como un biofungicida de contacto preventivo y curativo, que actúa formando una barrera física sobre la raíz de la planta, pero además detiene la formación de esporas e interrumpe el crecimiento de hongos. Controla enfermedades como: *Botrytis*, *Oídio*, *Antracnosis*, *Alternaria* y *Cercospora beticola*.

Las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *B. popilliae* son utilizadas como bioinsecticidas de distintos estadios larvales de insectos del orden Lepidóptera (polillas y mariposas). Estas

bacterias se desarrollan en el suelo, forman endoesporas con la particularidad que en el esporangio se forman cristales proteínicos llamados cuerpos parasporales, que se disuelven en condiciones alcalinas. Cuando se esparcen las bacterias sobre las plantas, las orugas comen las hojas e ingieren las endosporas, en su intestino, que es alcalino, las proteínas sufren una proteólisis y se transforman en una potente toxina. La toxina altera la permeabilidad de la membrana del epitelio intestinal de la oruga, de modo que los líquidos alcalinos del intestino pasan a la hemolinfa, que incrementa su pH, provocando la parálisis del insecto y finalmente su muerte. Es importante que las aplicaciones se efectúen durante los primeros estadios ninfales para lograr un rápido y efectivo control. Controla plagas como la polilla del repollo (*Plutella xylostella* L) y el gusano de la acelga (*Spodoptera frugiperda*).

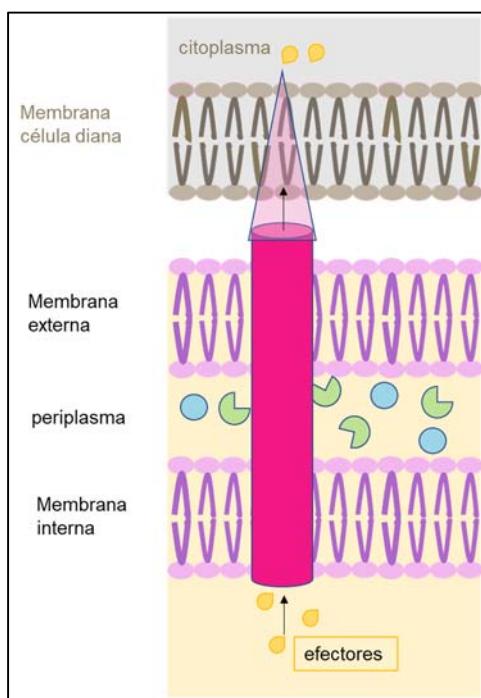
Nuevos mecanismos de biocontrol

Recientemente se ha descubierto un mecanismo de biocontrol en *Pseudomonas putida* KT2440, el sistema de secreción de tipo VI (T6SS, por sus siglas en inglés *Type VI Secretion System*) que es responsable de su capacidad controladora.

Los sistemas de secreción bacterianos son maquinarias de naturaleza proteica, que llevan a cabo muchos procesos biológicos como la conjugación, la competencia interbacteriana o la interacción con células hospedadoras. Estas maquinarias se encargan de translocar proteínas desde el interior celular hacia el espacio extracelular, inyectar en otras células diana o depositarlas en su propia superficie.

El T6SS es un sistema bacteriano que permite inyectar efectores (toxinas) principalmente al interior de células procariotas, donde puede tener efectos letales y juega un papel esencial en la competencia entre bacterias por el mismo hábitat. Algunos efectores tienen como diana células eucariotas y en este caso el T6SS está implicado en patogénesis. Dentro de las toxinas antibacterianas se encuentran amidasas, peptidasas hidrolasas de peptidoglicano, fosfolipasas y nucleasas, las cuales van dirigidas hacia el periplasma, la membrana o el citoplasma de la bacteria con la que compiten.

Es por ello que esta herramienta molecular juega un papel extremadamente importante en la competencia entre bacterias y así, las estirpes bacterianas que expresan de forma activa este sistema de secreción presentan grandes ventajas con respecto al resto de organismos presentes en ambientes polimicrobianos complejos.



La estructura del T6SS se asemeja a un bacteriófago invertido que se ancla a la membrana a través de un complejo de membrana, el sistema termina en una punta, que una vez eyectada perfora las membranas celulares. Una vez que se ensambla el sistema, existen señales mayoritariamente desconocidas que producen un cambio conformacional a nivel de placa base y esto se traduce en la contracción de la vaina que expulsa el tubo interno (Hcp) y su punta (VgrG y PAAR), ambos cargados con toxinas (efectores) hacia el exterior celular para ser secretados en el interior de la célula diana. Entre estos efectores, denominados Tke (del inglés, T6SS KT2440 effector), se encuentran nucleasas y colicinas formadoras de poros principalmente y una gran parte de ellos tienen función desconocida.

Las bacterias biocontroladoras deben sintetizar también proteínas inmunitarias, que son necesarias para evitar la intoxicación con efectores antimicrobianos sintetizados por la propia célula (T6SS+) y para protegerse del ataque indiscriminado de células hermanas. Mediante este sistema puede eliminar fitopatógenos de importancia comercial tales como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi* y *Xanthomonas campestris*. La eficacia de esta nueva arma biológica para el control de plagas es sumamente relevante para futuras aplicaciones biotecnológicas aplicadas a la agricultura, ya que evitaría el uso de pesticidas químicos controlando los fitopatógenos con eficientes agentes de biocontrol sin huella ecológica.

Referencias

- Beneduzi, A., Ambrosini, A. & Passaglia, L. (2012). *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents*. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4) (suppl): 1044-1051.
- Bernal, P., Furniss, R., Fecht, S., Leung, R., Spiga, L., Mavridou, D. & Filloux, A. (2021). *A novel stabilization mechanism for the type VI secretion system sheath*. Proc Natl Acad Sci U S A. 118(7): e2008500118. doi: 10.1073/pnas.2008500118. PMID: 33558227; PMCID: PMC7896307.
- Chaitanya, K. & Meenu, S. (2015). *Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review*. E3 Journal of Agricultural Research and Development Vol. 2015, 5(2) 0108-0119. ISSN: 2276-9897 © E3 Journals.

- Felipe, V., Bianco, M., Terrestre, M., Mielnichuk, N., Romero, A. & Yaryura, P. (2021). *Biocontrol of tomato bacterial spot by novel Bacillus and Pseudomonas strains*. Eur J Plant Pathol 160:935–948.
- Fukami, J., Cerezini, P. & Hungria, M. (2018). *Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation*. AMB Expr 8:73.
- Ribaudo, C., Riva, S., Curá, J., Ponds, C. y Granell-Richart, A. y Cantore, M. (2012). *Etileno como mediador de los mecanismos directos e indirectos de la promoción del crecimiento vegetal ejercido por rizobacterias*. En libro: Rizósfera, biodiversidad y agricultura sustentable. (págs.215-239). Capítulo: 12. Editorial: Asociación Argentina de Microbiología. Editores: IE García de Salamone. S. Vázquez, C. Peña, FD Cassan.
- Villarreal Delgado, M., Villa Rodríguez, E., Cira Chávez, L., Estrada Alvarado, M., Parra Cota, F., De los Santos Villalobos, S. (2017). *The genus Bacillus as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity*. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 95-130.
- Zeffa, D., Perini, L., Silva, M., de Sousa, N., Scapim, C. & Oliveira, A. (2019). *Azospirillum brasiliense promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes*. PLoS ONE 14(4): e0215332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215332>

CAPÍTULO 8

Microbiología de la leche. Bacterias Ácido lácticas. Microbiología del agua

Gabriela Diosma, Laura Balagué y Alejandra Londero

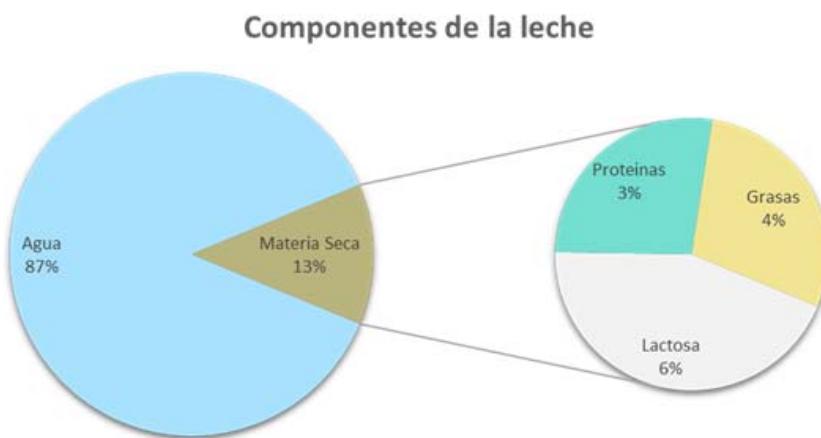
Microbiología de la leche

Composición de la leche

La leche vacuna es el producto de la secreción de la glándula mamaria. Está compuesta por una mezcla compleja de lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales que le confieren un alto valor nutricional. La composición química global promedio de la leche vacuna se presenta en la Figura 8.1.

Figura 8.1

Composición química global promedio de la leche vacuna



Debido a su pH cercano a la neutralidad, su alta actividad acuosa y su contenido de macro y micronutrientes, la leche constituye un medio ideal para el desarrollo de microorganismos.

Fuentes de contaminación de la leche

Los microorganismos pueden introducirse en la leche cruda por diferentes vías. Las principales fuentes de contaminación y puntos de proliferación microbiana de la leche cruda, así como las prácticas de prevención se presentan en la Figura 8.2.

Figura 8.2

Puntos de contaminación microbiana de la leche cruda y prácticas de prevención



Los bovinos pueden presentar patologías al infectarse con agentes zoonóticos y estos pueden ser transferidos a la leche. Por lo tanto, los animales que se encuentran en un tambo y que son ordeñados diariamente, deben estar bajo el control de un veterinario calificado de manera de garantizar la sanidad del rodeo. Es decir, que el mismo no esté afectado por enfermedades como la brucellosis, la tuberculosis, la fiebre aftosa, la paratuberculosis, entre otras. En Argentina existen planes nacionales de control y erradicación de tuberculosis (Res. 128/2012) y brucellosis (Res. 67/2019) instrumentados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) que establecen medidas de control y vigilancia en los establecimientos productores a fin de erradicar progresivamente estas enfermedades.

Otra enfermedad que suele afectar al rodeo de ordeño, es la mastitis que altera considerablemente la sanidad y calidad de la leche. Esta patología consiste en una inflamación de la glándula mamaria que se produce debido a una infección microbiana. Las bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y algunas otras Gram (-), son los agentes causales del 90 % de los casos de mastitis. Esta enfermedad resulta en alteraciones

que reducen la producción de leche que, además, es de menor calidad debido a cambios físicos, químicos o bacteriológicos de la misma. La probabilidad de mastitis y la contaminación bacteriana inicial de la leche se pueden reducir realizando el despunte, que consiste en descartar los 2 ó 3 primeros chorros de leche de cada pezón sobre un recipiente con fondo negro y constatar que la misma no presente anomalías. En ciertos casos se recomienda colocar un antiséptico en el pezón antes del ordeño (*predipping*), que se seca con papel absorbente o toallas, inmediatamente luego del ordeño debe realizarse el sellado de los pezones, que consiste en sumergirlos o pulverizarlos con una solución antiséptica y emoliente, protegiéndolos de patógenos y agrietamientos.

Otra área de impacto en la calidad de la leche es la higiene de los operarios y de los establecimientos de producción, así como las prácticas de bienestar animal y control de plagas. Todo lo anterior debe ir acompañado del uso de agua potable.

Un factor clave en la calidad de la leche consiste en la aplicación de protocolos de limpieza y desinfección, que se detallan más adelante en este capítulo. Estos deben aplicarse en las ordeñadoras, inmediatamente después de cada ordeño, y en los tanques de frío luego de cada retiro. Esto evita que queden remanentes bacterianos que podrían actuar como fuente de contaminación recurrente.

Luego del ordeño la leche debe ser almacenada a 5°C con el fin de controlar el crecimiento microbiano. Posteriormente, debe ser transportada en frío y sin demora a la planta de tratamiento térmico, para evitar la proliferación de bacterias psicrótrofas.

Limpieza y desinfección en los establecimientos de producción

Uno de los pilares fundamentales sobre los cuales se debe establecer el funcionamiento de una empresa de alimentos responsable, es el correcto procedimiento de limpieza y desinfección, ya que estas actividades garantizan que las áreas de trabajo sean aptas y permitan preservar la seguridad e inocuidad de los alimentos, así como prolongar su vida útil. Aunque se habla de limpieza y desinfección como un solo proceso, en realidad son dos procesos diferentes pero complementarios.

Una vez realizada la limpieza, que consiste en retirar la suciedad de los equipos y superficies, se procede a la desinfección para remover microorganismos patógenos y/o causantes de deterioro.

Los elementos necesarios para una buena limpieza y desinfección están determinados por cuatro pilares (Figura 8.3). Estos deben tenerse en cuenta en todo momento durante la limpieza, de modo que si queremos disminuir alguno de estos elementos debemos incrementar otro para completar el círculo.

Figura 8.3*Pilares requeridos para una buena limpieza y desinfección*

En la industria láctea es muy utilizado el sistema CIP (*Cleaning in place*) es decir limpieza *in situ*, donde se realiza la limpieza en el interior de los circuitos de las plantas de producción sin desmontar los equipos. Este sistema consiste en dos fases:

- Alcalina: emplea hidróxido de sodio, 0,15-1% a temperatura de 70-80°C durante 10-30 minutos.
- Ácida: emplea ácido nítrico 0,15-1% a temperatura ambiente durante 5 a 20 minutos.

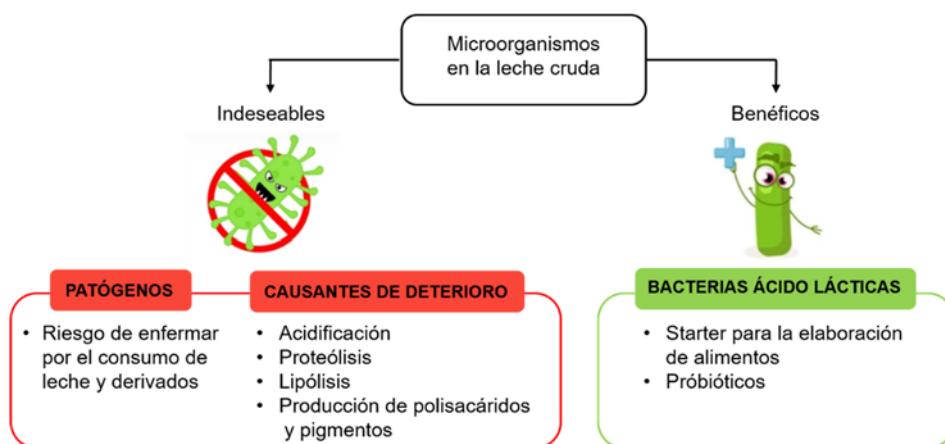
En el caso de los camiones cisterna, las tuberías de descarga y los tanques de recepción de leche, que están en contacto con leche cruda, se suele utilizar la limpieza en una sola fase, en este sentido se alternan en el tiempo, productos alcalinos con alto poder desincrustante y productos ácidos con capacidad desengrasante.

En cuanto a la desinfección, los productos no deben generar espuma, se emplea ácido peracético combinado con peróxido de hidrógeno, en bajas concentraciones y a temperatura ambiente para evitar efectos corrosivos en el circuito. Para monitorear la eficacia de la desinfección, se recoge agua del enjuague del circuito y se realiza un análisis microbiológico.

Para las superficies de trabajo se utiliza alcohol de 70° o una mezcla de aminoácidos.

Microorganismos presentes en la leche

La leche cruda contiene una amplia diversidad microbiana en la que se incluyen microorganismos indeseables por ser patógenos o causantes de deterioro, así como microorganismos benéficos para la salud del consumidor (Figura 8.4).

Figura 8.4*Tipos de microorganismos presentes en la leche cruda*

Microorganismos patógenos

Durante la producción primaria, la leche puede contaminarse con microorganismos patógenos tales como *Salmonella*, *Escherichia coli* productora de toxina shiga, *Listeria*, *Campylobacter*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella abortus*, entre otros. Estos causan enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) que son especialmente riesgosas para personas con sistema inmunitario debilitado, lactantes, niños, adultos mayores y mujeres embarazadas.

Por este motivo la venta al público de leche cruda de cualquier especie se encuentra actualmente prohibida por el Código Alimentario Argentino (artículo 556 bis). Los tratamientos térmicos de pasteurización que se aplican a la leche tienen por objeto eliminar cualquier microorganismo potencialmente patógeno que pueda comprometer su inocuidad.

Microorganismos causantes de deterioro

Cuando los microorganismos ingresan a la leche y se multiplican en ella, utilizan sus nutrientes y, como resultado de su actividad metabólica, sintetizan compuestos y/o excretan desechos que modifican sus características físico-químicas provocando su deterioro. Las principales alteraciones que ocurren son la acidificación, la proteólisis y la lipólisis.

La presencia de una alta cantidad de bacterias productoras de ácido láctico en la leche provoca una disminución del pH. El pH ácido desestabiliza la estructura de las micelas de caseína pudiendo conducir a la coagulación durante el proceso de pasteurización. Los principales microorganismos acidificantes son *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y algunas enterobacterias. Estas últimas, además, producen gas a partir de la lactosa.

Otra alteración de la leche es provocada por microorganismos que degradan proteínas y lípidos, denominados proteolíticos y lipolíticos respectivamente. Este grupo incluye especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, entre otros.

La proteólisis se produce principalmente por enzimas que hidrolizan la caseína. Esto puede occasionar la formación de un gel, debido a la desestabilización y coagulación de las micelas de caseína, así como la aparición de un sabor amargo o pútrido debido a la presencia de péptidos

originados durante la proteólisis. Además, la acción de las proteasas reduce el rendimiento de algunos productos lácteos derivados como por ejemplo los quesos.

Otras enzimas microbianas relevantes son las lipasas, que actúan sobre los glóbulos gramos de la leche. La membrana del glóbulo graso protege a los triglicéridos de la leche del ataque enzimático, sin embargo, la integridad de la misma puede sufrir alteraciones por agresión mecánica durante el ordeño (ej. entradas de aire, turbulencias en las máquinas de ordeño, caída fuerte de la leche al tanque de almacenamiento, entre otras) o por choques térmicos (ej. mezcla rápida de leche a diferentes temperaturas u oscilación de la temperatura de almacenamiento). En estos casos, las lipasas hidrolizan los triglicéridos liberándose diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos. La presencia de ácidos grasos libres, tales como el ácido butírico y caproico, otorgan sabores rancios, jabonosos y/o amargos a la leche y los productos lácteos.

Muchos microorganismos proteolíticos y lipolíticos son psicrótrofos, es decir capaces de desarrollarse a temperaturas inferiores a 7°C independientemente de cuál sea su temperatura óptima de crecimiento. Por lo tanto, pueden multiplicarse durante el almacenamiento refrigerado de la leche cruda, antes de que la misma sea sometida al tratamiento térmico. La mayoría de los microorganismos psicrótrofos son destruidos por los tratamientos térmicos, sin embargo, algunas bacterias de los géneros *Bacillus*, *Clostridium* y *Streptococcus*, tienen características termodúricas, siendo resistentes a las altas temperaturas. Esto se ve agravado por el hecho de que las enzimas proteolíticas y lipolíticas son resistentes al calor y la actividad enzimática no es inactivada por el tratamiento térmico, afectando la calidad de la leche durante toda su vida útil.

La presencia de microorganismos psicrótrofos en la leche hace que su vida útil sea limitada. El número de estos microorganismos aumentan significativamente durante el almacenamiento, por eso el tiempo que transcurre entre el ordeño y el tratamiento térmico es crítico para que la leche sea de buena calidad.

Además de las alteraciones descriptas, algunos microorganismos producen polisacáridos (gomas, mucina) que aumentan la viscosidad de la leche, por ejemplo, *Streptococcus*, *Alcaligenes* y *Enterobacter*, mientras que otros sintetizan compuestos pigmentados de color azul (*P. aeruginosa*) y rojo (*Serratia marcescens*).

Control de calidad de la leche

El análisis de la calidad de la leche debe realizarse a fin de asegurar la ausencia de toxinas de microorganismos patógenos, así como la presencia de adecuadas características fisicoquímicas, propiedades reológicas y sensoriales y composición de nutrientes. También es relevante para evitar el fraude, por ejemplo, a través de la adición de agua a la leche o de la sustitución de constituyentes por otros ingredientes más económicos y de menor calidad.

La reglamentación actual (Res.739 y 495/2011) establece un sistema de pago de la leche cruda sobre la base de atributos de calidad composicional e higiénico-sanitaria. Las características que se tienen en cuenta son: contenido de sólidos (porcentaje de proteína y grasa

butirosa), las unidades formadoras de colonias por mililitro de leche, el recuento de células somáticas, la presencia de inhibidores y la crioscopía (aguado). Se exige que los rodeos estén libres de brucelosis y tuberculosis.

Los operadores comerciales cada vez que reciben leche, cargan en un sistema informático los litros que se envían y las muestras se analizan en laboratorios habilitados y auditados por el Instituto Nacional de Tecnología Industrial – INTI Lácteos (Laboratorio Nacional de Referencia). En base a los resultados, se aplican bonificaciones y/o penalizaciones según corresponda, definiendo el precio final de la materia prima que será pagado al productor.

Control microbiológico de la calidad de la leche

El Código Alimentario Argentino (CAA) indica que la leche destinada al consumo o la elaboración de productos lácteos debe presentar, en el momento de la recepción en el establecimiento de tratamiento térmico y/o transformación, un recuento de bacterias totales a 30°C menor a 2×10^5 UFC/cm³ (método ISO 4833:2003) y de células somáticas totales de 4×10^5 UFC/cm³ (método FIL 148A:1995). Los datos deben corresponder a la media geométrica de 2 meses, tomando 2 muestras por mes, provenientes de la cisterna del camión y en la plataforma de recibo del establecimiento de tratamiento.

La leche luego de ser tratada (seleccionada, higienizada por medios mecánicos, estandarizada según su contenido de materia grasa, homogeneizada, tratada térmicamente, enfriada, envasada y conservada a baja temperatura) debe además estar exenta de microorganismos patógenos. Las pruebas requeridas para garantizar esta norma consisten en la determinación de: a) la concentración de bacterias mesófilas totales y de bacterias coliformes, b) la ausencia de *Escherichia coli*, y c) la prueba de la fosfatasa. Los límites en estos parámetros varían ligeramente entre los distintos tipos de leche. Se presentan, a modo de ejemplo, los valores límite establecidos por el CAA para 2 tipos de leche (Figura 8.5).

Figura 8.5

Exigencias de la composición microbiológica de la leche establecidas por el Código Alimentario Argentino

	Enteraria Pasteurizada ¹	Enteraria Selecciónada Pasteurizada ²
Recuento total en placa (abril-septiembre)	< 5 x 10 ⁴ UFC/ cm ³	< 2.5 x 10 ⁴ UFC/cm ³
Recuento total en placa (octubre-marzo)	< 1 x 10 ⁵ UFC/ cm ³	< 3.5 x 10 ⁴ UFC/cm ³
Bacterias coliformes	< 50/ cm ³	<10/cm ³
Ausencia de <i>Escherichia coli</i> en:	1 cm ³	1 cm ³
Prueba de la fosfatasa	Negativo	Negativo

¹Res MSyAS N° 047, 28.01.98 y ²Res MSyAS N° 047, 28.01.98

Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las BAL son un grupo diverso de bacterias que se caracterizan por producir ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos. Estos microorganismos son cocos o bacilos Gram (+), inmóviles, que no forman esporas, catalasa y oxidasa negativos. Suelen tener requerimientos nutricionales complejos, la mayoría de las especies desarrollan en medios de cultivos suplementados con aminoácidos y vitaminas del grupo B.

Estas bacterias se agrupan en homo y heterofermentativas lo que está relacionado con los productos que genera su actividad metabólica. Las homofermentativas generan como principal producto ácido láctico, por ejemplo, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y algunas especies de *Lactobacillus*. Las bacterias heterofermentativas generan, además de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético. Son ejemplos algunas especies del género *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. brevis*).

Además, las BAL, mediante fermentación de hidratos de carbono, proteólisis y lipólisis, pueden producir una amplia gama de metabolitos, tales como ácidos orgánicos, péptidos, ácidos grasos libres, y compuestos volátiles y no volátiles de bajo peso molecular. Con frecuencia también producen compuestos antimicrobianos, exopolisacáridos, péptidos bioactivos, vitaminas y enzimas.

Las modificaciones que ocasionan en los alimentos contribuyen a extender su vida útil, mejorar su textura, propiedades nutritivas y aromas, haciéndolos más agradables para los consumidores. Por este motivo se utilizan en la elaboración de diversos productos en la industria. En la industria láctea se emplean para agregar valor a la leche y sus subproductos.

Aplicaciones de las bacterias ácido lácticas

Ensilado

El ensilado consiste en la preservación del forraje fresco destinado para el consumo animal, que se genera a través de un proceso de fermentación láctica bajo condiciones anaeróbicas.

La elaboración de silos permite obtener un alimento de alta calidad nutricional y mayor palatabilidad con un costo relativamente bajo. También estabiliza la oferta de nutrientes durante todo el año, especialmente en invierno, cuando con frecuencia no es posible el pastoreo a campo debido al menor crecimiento de las pasturas y a las precipitaciones.

Los cultivos destinados al ensilado son principalmente gramíneas como maíz, trigo, cebada, sorgo, avena, que tienen un alto contenido de carbohidratos hidrosolubles. Estos constituyen el sustrato de fermentación de las bacterias lácticas, que generan ácido láctico y en menor cantidad ácido acético, que ocasionan un descenso del pH e inhiben la actividad de microorganismos causantes de putrefacción.

La práctica del ensilado consiste en el corte y picado fino del forraje, su compactación para lograr un ambiente anaeróbico y finalmente el sellado del mismo. Posteriormente el silo se estabiliza permitiendo la conservación del forraje a través del tiempo (Figura 8.6).

Podemos resumir el proceso de ensilado en 4 etapas:

1 - Fase aeróbica. Es una fase que dura pocas horas, donde el oxígeno presente en el forraje picado disminuye rápidamente debido a la respiración de los materiales vegetales y de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, como las levaduras y las enterobacterias. En esta etapa también actúan varias enzimas vegetales como las proteasas y carbohidrasas. En cuanto a los aspectos prácticos se recomienda compactar rápidamente el material para evitar las pérdidas de nutrientes que podría provocar la respiración aeróbica.

2 - Fase de fermentación. En esta etapa se produce una disminución de la tensión de oxígeno, que favorece la actividad de los microorganismos anaeróbicos. La extensión de la misma depende de las características del material ensilado y de las condiciones en que se realizó la práctica, si éstas fueron adecuadas, las bacterias lácticas serán la población predominante, y la producción de ácido láctico generado por fermentación producirá una disminución del pH.

3 - Fase de estabilización. En esta etapa las condiciones de baja tensión de oxígeno y de bajo pH se extienden a todo el silo, donde desarrollan preferentemente bacterias lácticas y se reduce, en gran parte, la presencia de otras poblaciones de microorganismos. De manera que sólo se encuentran en esta etapa del silo algunas enzimas y microorganismos que toleran la acidez, como *Lactobacillus buchneri*.

4 - Fase de apertura del silo. En esta etapa el material se abre para el consumo quedando más propenso al deterioro por estar expuesto al aire. En estas condiciones se degradan los ácidos orgánicos (responsables de la conservación del ensilaje) debido a una mayor actividad microbiana, generando un aumento del pH y de la temperatura. La tasa de deterioro depende de

la concentración y de la actividad de los microorganismos que la producen. Para reducir las pérdidas se han desarrollado diversos métodos de entrega del material a los animales.

Figura 8.6

Variación del oxígeno, pH y ácido láctico en las fases del ensilado



La microbiota de la filósfera de las plantas contiene, entre otras comunidades microbianas, a las bacterias lácticas. Si bien la fermentación láctica puede tener lugar de manera espontánea, también puede inducirse mediante el empleo de inoculantes para silos, y algunos productos que aceleran el metabolismo de las bacterias lácticas. Existen inoculantes comerciales para silos, formulados principalmente con lactobacilos, lográndose así beneficios en la productividad y rentabilidad económica en comparación con la fermentación espontánea.

Los inoculantes de silo son suspensiones de bacterias que pueden ser homo y/o heterofermentativas estabilizadas, que se utilizan con el fin de acelerar el proceso metabólico fermentativo de manera de reducir las pérdidas en nutrientes y materia seca que suelen ocurrir debido a fermentaciones secundarias.

Las bacterias heterofermentativas, con que se formulan los inoculantes acidifican en forma rápida el medio inhibiendo el crecimiento de microorganismos indeseables y de este modo, mejoran la estabilidad del silo.

Son ejemplos de BAL homofermentativas que se emplean en ensilado *Lactobacillus acidifidans*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Lactococcus lactis* ssp.*lactis*. Entre las heterofermentativas encontramos a *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei*.

Ambas cumplen roles complementarios en la fermentación del silo, se han desarrollado inoculantes que combinan ambos tipos de bacterias. El empleo apropiado de estos productos permite controlar y dirigir la fermentación microbiana favoreciendo la rápida disminución del pH, evitando la proliferación de levaduras, de clostrídios que generan ácido butírico, de enterobacterias, de *Listeria* spp., y de hongos que generan micotoxinas.

En la Figura 8.7 se presentan las características adecuadas que debe presentar el material ensilado.

Figura 8.7*Características óptimas del material ensilado*

Químicas	pH 3,5 - 4	Ácido láctico más de 3% Ácido acético menos de 0,5% Ácido butírico ausente
Organolépticas	Color Olor Textura	amarillo verdoso a marrón verdoso avinagrado suave firme

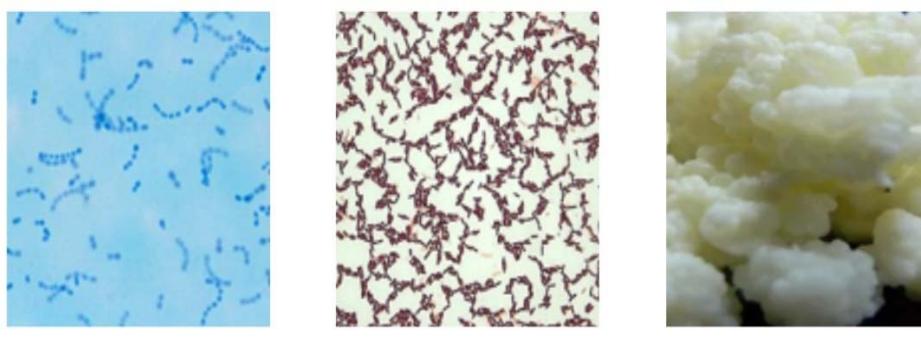
Leches fermentadas

En la fermentación de la leche, ciertos microorganismos, naturalmente presentes en el sustrato o agregados intencionalmente, utilizarán parte de los nutrientes de la misma para multiplicarse y producir ácidos orgánicos, alcoholes, compuestos volátiles de aroma, exopolisacáridos, péptidos bioactivos, bacteriocinas y/o sustancias antimicrobianas, entre otros metabolitos. Los productos lácteos fermentados son conocidos desde épocas milenarias por sus beneficios sobre la salud de los consumidores. A partir de allí surge el concepto de probiótico: son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, ejercen un efecto benéfico para la salud del consumidor, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial para la Salud (OMS).

Los probióticos por lo general se agregan a la leche o productos lácteos, en la concentración final deseada (aproximadamente 10^{7-8} UFC/ml). Entre los beneficios que aportan se pueden citar la reducción de los riesgos de contraer enfermedades, la mejora de la digestibilidad de la lactosa, la estimulación del sistema inmune y la mejora del balance de la microbiota intestinal, entre otros.

Si a la leche se le incorporan bacterias como *Streptococcus salivarius* ssp. *termophilus* y *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus*, el producto de esta fermentación es el que se conoce como yogur (Figura 8.8). Entre las dos bacterias que producen el yogur, se establece una simbiosis donde una bacteria produce metabolitos que son aprovechados por la otra. El lactobacilo estimula el desarrollo del estreptococo por liberación de aminoácidos a partir de la caseína de la leche, por otra parte, el estreptococo produce ácido fórmico que estimula el desarrollo del lactobacilo. De esta manera, cuando la leche se coloca a 42-43°C durante un período de incubación de 2 a 3 horas se modifican las características de la leche, por la liberación de ácido láctico y de otros ácidos orgánicos, que generan el descenso del pH hasta valores de 4,6-4,9, que se corresponde con el punto isoeléctrico de la caseína, en el que se produce la coagulación de la leche y se detiene el proceso, dando como resultado un producto espeso con sabor levemente ácido.

Esta leche fermentada presenta características que la hacen beneficiosa para la salud. En las leches fermentadas aparecen como resultado de la actividad fermentativa de las bacterias numerosos metabolitos microbianos que no se encuentran presentes en la leche.

Figura 8.8*Inóculos utilizados en la elaboración de leches fermentadas**Streptococcus thermophilus**L. delbrueckii subsp. bulgaricus*

Gránulos de kefir

El menor contenido de lactosa en el yogur respecto de la leche permite su consumo a personas intolerantes a este azúcar, la presencia de péptidos potencialmente bioactivos, derivados de la acción hidrolítica de las bacterias lácticas sobre la caseína, le otorgan la cualidad de ser más digestible; la presencia de exopolisacáridos ejercen un efecto positivo sobre la mucosa intestinal; el calcio se vuelve biodisponible, y ejerce un fortalecimiento del sistema inmune y un efecto antiinflamatorio. Además, durante la fermentación de la leche se pueden originar galactooligosacáridos con propiedades prebióticas. Los prebióticos son compuestos presentes en los alimentos, no digeribles, que estimulan la actividad de la microbiota intestinal.

El kefir también es una leche fermentada, de consistencia viscosa, sabor ácido, levemente efervescente, que se produce inoculando la leche con gránulos de kefir (Figura 8.8). Estos son masas gelatinosas, irregulares, de color blanco o ligeramente amarillento, de forma semejante a las inflorescencias de coliflor y de tamaño variable oscilando desde pocos milímetros a 2 ó 3 centímetros de diámetro (Figura 8.9).

La composición microbiológica del kefir es compleja y se han aislado a partir del mismo una gran variedad de microorganismos. Los gránulos de kefir contienen bacterias ácido-lácticas (10^8 - 10^9 UFC/g), levaduras (10^7 - 10^8 UFC/g) y bacterias ácido-acéticas (10^5 - 10^6 UFC/g).

Cuando los gránulos son adicionados a la leche, parte de los microorganismos pasan a ella donde se multiplican y producen metabolitos que otorgarán a la leche fermentada sus características químicas y físicas particulares.

Figura 8.9*Composición de los gránulos de kefir*

El consumo regular de leche fermentada con gránulos de kefir ha sido asociado a propiedades benéficas para la salud. Estas propiedades se atribuyen a la presencia de una microbiota compleja y a sus productos metabólicos, entre los que podemos mencionar: ácidos orgánicos, vitaminas (fundamentalmente del grupo B), proteínas de superficie de algunos microorganismos que se liberan al medio (capa S), y un exopolisacárido soluble en agua que constituye un 25% del peso seco de los gránulos, llamado kefirán.

En la Figura 8.10 se describen comparativamente el yogur y el kefir.

Figura 8.10*Comparación entre yogur y kefir*

	Yogur	Kefir
Inóculo	Cultivos liofilizados de <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (10^{11} UFC/g)	Gránulos de kefir (5% p/v)
Materia prima	Leche de buena calidad, pasteurizada	Leche de buena calidad, pasteurizada
T de incubación	42-43°C.	20°C
Otros agregados	Antes de la fermentación: leche en polvo para elevar el contenido de sólidos totales, también azúcares, almidón, gelatina, edulcorantes, frutas.	Después del proceso de fermentación, previo a su consumo: azúcar, edulcorantes, frutas, semillas.
Proceso	Industrial	Artesanal

Quesos

Los quesos son productos frescos o madurados que se obtienen por la separación del suero de la leche, coagulada por la acción física del cuajo. El cuajo es un fermento que contiene enzimas peptidasas que rompen la estructura cuaternaria de la caseína. Durante la elaboración del queso se realiza el agregado de fermentos constituidos por bacterias lácticas, que aportan cualidades de sabor y aroma característicos para cada tipo de queso. Sus diferentes variedades dependen del origen de la leche empleada, de los métodos de elaboración seguidos y del grado de madurez alcanzada.

Los quesos frescos son los que se consumen en un período de tiempo inmediato posterior a su elaboración, mientras que el queso madurado es el que, luego del proceso de elaboración, es almacenado en determinadas condiciones y tiempo durante el cual ocurren cambios bioquímicos y físicos necesarios que resultan en las características típicas de la variedad de queso.

Vegetales fermentados

Pepinos: en la fermentación de estos frutos interviene una secuencia de microorganismos que se suceden en función de su tolerancia a la salinidad y a la acidez del medio y permiten la conservación de los mismos a través del tiempo. Estos producen CO₂, aldehídos y ésteres, que son los responsables del aroma. La fermentación se realiza en presencia de 5-7% de cloruro de sodio, que inhibe el crecimiento de microorganismos no deseables y la actividad de enzimas que modifican la textura firme del pepino, pero permite el desarrollo de las bacterias lácticas tolerantes a la salinidad. Entre las bacterias responsables en este proceso podemos mencionar a *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.* y *Pediococcus spp.*

Chucrut: es otro producto cuyo sustrato son las hojas de *Brassica oleracea* (repollo blanco) que son picadas, suplementadas con cloruro de sodio y fermentadas por bacterias lácticas. Al igual que en el caso anterior la adición de sal inhibe el crecimiento de microorganismos no deseables y frena la actividad de enzimas que ablandan los tejidos. Esta fermentación espontánea es iniciada por *L. mesenteroides*, seguida por *L. plantarum*.

Aceitunas: también son el producto obtenido por la fermentación láctica de los frutos de las distintas variedades del olivo (*Olea europaea*), que se envasan en una solución de cloruro de sodio; con o sin la adición de ácidos. Este tratamiento de las aceitunas tiene como objetivo hidrolizar la oleuropeína que da sabor amargo e inhibe el desarrollo de las bacterias lácticas. El proceso sintéticamente consiste en lavar las aceitunas con agua, luego agregar sal en cantidad suficiente para generar una salmuera de 5-8% a la que además se le adicionan azúcares fermentables. El proceso fermentativo es llevado a cabo por *L. plantarum* y tiene una duración de varias semanas, el producto final alcanza un pH de 3,8-4,2 y una concentración de sal que varía entre 4 a 8% (p/v).

Usos de las bacterias lácticas en otros sustratos alimenticios

Los **productos cárnicos fermentados** son muy populares en Europa, donde existe una importante variedad y constituyen el grupo de alimentos listos para el consumo directo sin necesidad de cocción u otro tipo de transformación. Estos productos poseen propiedades organolépticas únicas y forman parte del acervo cultural de los pueblos que los consumen de forma habitual. Los embutidos fermentados poseen una microbiota particular, y constituyen una importante reserva de biodiversidad, que impacta positivamente en el microbioma intestinal de sus consumidores. Durante la fermentación y maduración se generan barreras específicas que impiden el crecimiento de ciertos microorganismos y favorecen la proliferación de bacterias lácticas y de bacterias nitrato reductoras que garantizan la fermentación y estandarizan la producción. En la actualidad se utilizan cultivos iniciadores autóctonos, aislados de la propia matriz a fermentar, por la capacidad de conferir una impronta única a productos regionales. Los embutidos fermentados son productos elaborados con una mezcla de carne y grasa picadas, cloruro de sodio, agentes de curado (nitrato y nitrito), azúcares, especias y aditivos autorizados, introducidos en una tripa (natural o artificial) a manera de relleno, luego de lo cual experimentan un proceso de fermentación-maduración acompañado de una etapa de secado y/o de ahumado, según sea la tecnología aplicada. La estabilidad y el bajo riesgo sanitario de este tipo de productos se basan en: a- el descenso de los valores de pH por la fermentación de los hidratos de carbono que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos y de deterioro; b- la reducción de la actividad acuosa a causa de los solutos añadidos; c- la deshidratación progresiva durante la maduración; y d- la adición de nitratos y nitritos y especias con actividad antimicrobiana.

Las características organolépticas (textura, aroma y sabor) únicas de las carnes fermentadas son consecuencia de una serie de transformaciones bioquímicas y fisicoquímicas que ocurren durante la fermentación y la maduración. El ácido producido también contribuye a la textura y sabor característicos de estos productos cárnicos. Por otra parte, se produce la oxidación de los ácidos grasos y las interacciones entre la mioglobina con el óxido nítrico proveniente de los nitritos y nitratos adicionados, que por acción de la microbiota generan el desarrollo del color de estos embutidos fermentados. Asimismo, la transformación de las proteínas cárnicas es uno de los procesos complejos que ocurren durante la fermentación y maduración, catalizado por enzimas musculares y microbianas cuyos productos de hidrólisis (péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres) impactarán sobre el sabor, aroma y textura. La interacción entre múltiples factores como tipo de carne, grasa, microorganismos y procesos tecnológicos aplicados generan una amplia variedad de productos cárnicos fermentados.

Bacterias en agua

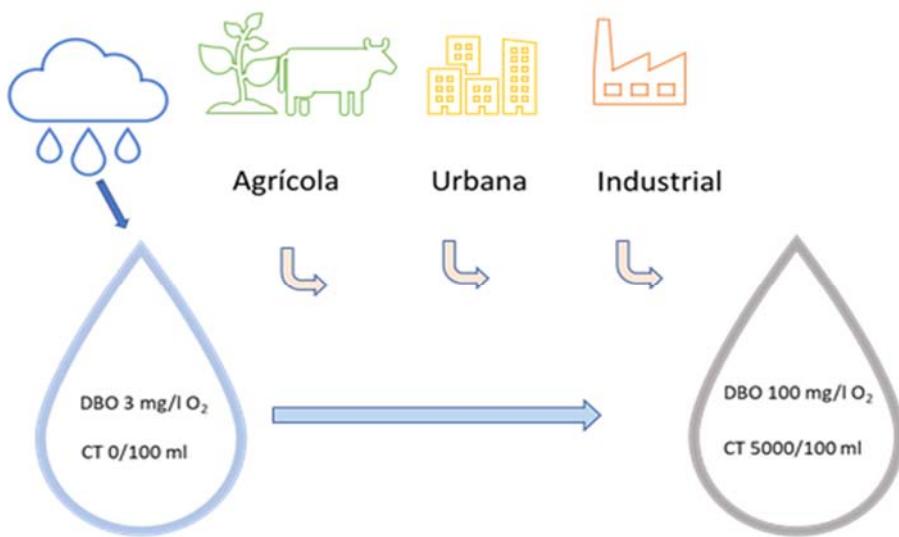
El agua potable de uso domiciliario es el agua proveniente de un suministro público, de un pozo o de otra fuente, ubicada en los recipientes domiciliarios. El Código Alimentario Argentino en el Art. 982 establece que el agua potable apta para la alimentación y uso doméstico no deberá contener sustancias o cuerpos extraños de origen biológico, orgánico, inorgánico o radiactivo en tenores tales que la hagan peligrosa para la salud. Esta deberá presentar un sabor agradable y ser prácticamente incolora, inodora, limpia y transparente.

Las aguas contaminadas son aquellas que contienen organismos o sustancias no deseadas. En este caso nos ocuparemos de la contaminación microbiológica del agua que suele producirse por el ingreso a los cursos de agua de materia orgánica, que es la fuente de nutrición de los microorganismos que la contaminan.

En la Figura 8.11 se observa como el incremento de sustancias orgánicas vertidas en el agua incide aumentando la demanda biológica de oxígeno (DBO), que expresa el consumo de oxígeno que los microorganismos emplean para degradar esa materia orgánica. Los efluentes que contaminan el agua generan un incremento de los microorganismos presentes y la aparición de ciertos grupos microbianos como por ejemplo los coliformes, cuya importancia en el control de la calidad del agua potable veremos más adelante.

Figura 8.11

Actividades antrópicas que causan contaminación del recurso agua y algunos parámetros que se modifican



Nota. DBO: demanda biológica de oxígeno, CT: bacterias coliformes totales.

Los contaminantes biológicos que puede contener el agua son bacterias, virus, hongos y/o parásitos todos los cuales están relacionados con la actividad humana. Entre los microorganismos patógenos que pueden estar más frecuentemente presentes en las aguas

contaminadas se incluyen *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolítica*, *Vibrio cholerae*, *Leptospira* y *Campylobacter*. El agua puede además contener enterovirus, entre los que se puede mencionar a los Rotavirus, Norovirus, virus de la Hepatitis A y protozoarios parásitos humanos como *Cryptosporidium*. Todos estos desarrollan en el intestino, por lo que pueden estar presentes en las heces, y ser la fuente de contaminación de los suministros de agua y provocar así epidemias, en las que el agente etiológico se dispersa por las redes de distribución o fuentes de agua. Las vías de transmisión de estos patógenos a los humanos son por ingesta, inhalación de aerosoles y por contacto dérmico o de otras mucosas (Figura 8.12).

Figura 8.12

Vías de transmisión de microorganismos patógenos presentes en el agua de consumo

Vía de transmisión		Microorganismos patógenos
1	Ingesta	<i>Shigella spp.</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Vibrio cholerae</i>
2	Inhalación (aerosoles)	<i>Legionella pneumophila</i> Micobacterias (no tuberculosas) Adenovirus
3	Contacto (mucosas, piel)	<i>Aeromonas spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Organismos indicadores

El monitoreo de la calidad del agua tiene como fin evitar la dispersión de patógenos en esta para así contribuir a la sanidad humana. La detección de contaminaciones es crítica para asegurar la calidad microbiológica del agua.

La calidad bacteriológica del agua se evalúa mediante la utilización de "organismos indicadores" que son aquellos que comparten los mismos ambientes que las bacterias patógenas y por ello su presencia indica que el agua pudo haber estado o está en contacto con una fuente de contaminación.

Los organismos indicadores se caracterizan por cumplir los siguientes requisitos:

- Forman parte habitualmente de la flora intestinal de individuos sanos
- No suelen multiplicarse fuera del ambiente entérico (el intestino de los animales),
- Tienen un tiempo de supervivencia igual o superior al de las bacterias patógenas de los animales,
- Deben ser viables o detectables durante un tiempo más prolongado que los microorganismos patógenos;
- Deben estar en mayor número que los organismos patógenos.
- Deben ser fáciles de aislar y desarrollan en un período corto en el laboratorio.
- Deben ser seguros de medir para los trabajadores de campo y laboratorio, y no causar enfermedades humanas graves.

Las metodologías que se utilizan para detectar a los organismos indicadores deben poder aplicarse a distintos tipos de muestras de aguas (aguas tratadas y no tratadas), las técnicas de identificación deben ser simples y de características definidas para dar mayor exactitud.

La fuente más riesgosa de patógenos son las heces humanas, por lo que los indicadores de contaminación fecal son empleados como criterio de detección de aguas no aptas para consumo. En este sentido, siguen existiendo desafíos importantes en cuanto a la evaluación y caracterización del riesgo por contaminación fecal y es necesario realizar investigaciones adicionales para mejorar aún más los indicadores ya empleados. Un solo indicador fecal es poco probable que prediga todos los patógenos o enfermedades; por lo tanto, se recomienda utilizar múltiples indicadores en combinación para evaluar la calidad del agua y los riesgos para la salud en todo momento. Algunos países en los últimos años han incorporado en sus estándares de calidad de agua potable la detección de protozoos patógenos (en USA y Australia) y de virus (en Francia) además de los métodos bacterianos. Algunos ejemplos de indicadores de contaminación fecal se resumen en la Figura 8.13.

Figura 8.13

Organismos Indicadores de contaminación fecal empleados para evaluar la calidad del agua

	Grupo microbiano	Ejemplos de indicadores
1	Bacterias	Gram negativo Bacterias Coliformes <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gram positivo <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Clostridium perfringens</i>
2	Virus	Bacteriófagos Colifagos (somáticos C y F+ específicos)
3	Parásitos	Helmintos <i>Schistosoma mansoni</i> Protozoos <i>Giardia spp.</i> <i>Cryptosporidium spp.</i>

Microorganismos coliformes

Uno de los indicadores de contaminación del agua más utilizado es el grupo de las bacterias coliformes, esto se refiere a los bacilos Gram (-), no esporulados, que desarrollan en presencia de sales biliares, que fermentan la lactosa con producción de ácido, gas y aldehído a 35 ó 37°C en un período de 24 a 48 horas.

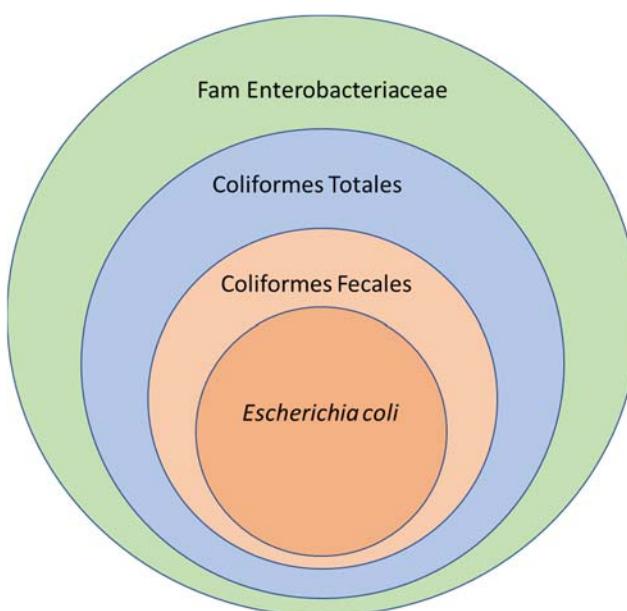
Agrupan ciertas especies bacterianas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y forman parte de este grupo varios géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*.

Dentro del grupo de coliformes hay un subgrupo, conocido como “coliformes fecales”, que tienen algunas características distintivas: son termotolerantes, desarrollan a una temperatura de 44 a 45°C en 24 horas. Es claro que estas bacterias son bacterias coliformes de origen fecal y por lo tanto sugieren la presencia de una fuente de contaminación con heces.

La especie clave de este grupo de coliformes fecales es *Escherichia coli* (Figura 8.14). La presencia de esta especie nos indica una contaminación fecal cercana en el tiempo y por lo tanto un riesgo mayor de la presencia de una gran diversidad de otros patógenos. Este microorganismo indicador debe estar ausente en todos los estándares de calidad de agua potable a nivel mundial.

Figura 8.14

*Relación entre los coliformes totales y *Escherichia coli**



Pseudomonas aeruginosa

Esta bacteria indicadora tiene forma de bastón, es Gram (-), patógena oportunista, pudiendo infectar los pulmones, las vías respiratorias, las vías urinarias o heridas en la piel de individuos immunosuprimidos. Se caracteriza por desarrollar en bajas concentraciones de compuestos carbonados y cuando lo hace forma biopelículas. Además, tolera un amplio rango de condiciones ambientales y es resistente a diversos compuestos químicos y es por esto que se suele utilizar para evaluar la eficiencia de los sistemas de potabilización. Su resistencia al cloro es superior a la de otros microorganismos aislados del agua.

Otros indicadores

Los clostridios que reducen sulfitos constituyen otro ejemplo de indicador. *Clostridium perfringens* es una bacteria Gram (+), anaeróbica, esporulada. Sus esporas resisten los procesos de desinfección y sobreviven en el agua durante un periodo de tiempo más extenso que las bacterias coliformes, como *E. coli*. La incapacidad de multiplicarse en ambientes no entéricos y

la viabilidad ambiental prolongada de sus esporas hacen que se seleccione como indicador de la contaminación fecal a largo plazo. La norma ISO 14189 especifica un método para el recuento de *C. perfringens*.

Los enterococos, como *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. hirae*, se encuentran con frecuencia en las heces de humanos y animales homeotérmicos por ello suelen también ser utilizados como organismos indicadores, sin embargo, es importante destacar que algunos enterococos presentes en las aguas pueden proceder de hábitats no relacionados a desechos humanos o animales. Como enterococos intestinales se consideran aquellos microorganismos capaces de reducir el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) y de hidrolizar la bilis-esculina en ciertas condiciones y medios de cultivo específicos. La norma ISO 7899-2 describe un método de prueba para la detección y enumeración de enterococos intestinales en agua mediante filtración por membrana.

Los colifagos son bacteriófagos (virus) que infectan específicamente coliformes. Existen dos grupos de bacteriófagos que infectan a *E. coli*, los colifagos somáticos C y los F+ específicos que han sido reportados como indicadores. Las técnicas de estudios en el laboratorio se basan principalmente en la visualización de la lisis de las células huésped bacterianas a las que infectan (ISO 10705-1, ISO 10705-2).

Bacterias mesófilas

El recuento de las “bacterias mesófilas” incluye todas las bacterias heterótrofas, aerobias o anaerobias facultativas, mesófilas que desarrollan en medio de cultivo agar nutritivo a 37°C. La presencia de microorganismos en el agua sugiere que la misma tiene contacto con una fuente proveedora de microorganismos y para agua potabilizada este test es útil para evaluar la eficacia de este proceso. Además, permite valorar el estado de contaminación microbiológica de los sistemas de distribución. En zonas rurales el valor del recuento de bacterias mesófilas puede variar según el período de lluvias y la permeabilidad de los suelos.

Calidad del agua potable en Argentina

En Argentina, según el Código Alimentario Argentino el análisis de una muestra de agua para evaluar su potabilidad debe incluir las determinaciones de los siguientes indicadores microbiológicos: bacterias coliformes, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y recuento de bacterias mesófilas. En la última actualización del año 2021 se acordó la incorporación de las técnicas ISO y las técnicas del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA), Edición 23, como Metodologías Oficiales de referencia. En la Figura 8.15 se mencionan los parámetros elegidos, su criterio de aceptación y las metodologías de referencia que deben ser empleadas. Para algunos parámetros se puede elegir una de las dos metodologías equivalentes, es necesario señalar que cuando se realiza un procedimiento de control y/o monitoreo se debe utilizar una única metodología para que los resultados sean comparables.

Figura 8.15

Parámetros microbiológicos y Metodologías de Referencia según el Código Alimentario Argentino (CAA)

Parámetro	Criterio de aceptación	Metodología de Referencia (1)
Opción 1 Bacterias coliformes /100 ml (Filtro de Membrana)	Ausencia	ISO 9308-1, ISO 9308-2, APHA 9222 B, APHA 9222 J, APHA 9222 K, APHA 9221 B, APHA 9221 D, APHA 9223 B
Opción 2 Bacterias coliformes NMP/100 ml	$m < 1,1$	ISO 9308-2, APHA 9221 B, APHA 9223 B
<i>Escherichia coli</i> /100 ml	Ausencia	ISO 9308-1, ISO 9308-2, APHA 9222 J APHA 9222 K, APHA 9222 H, APHA 9222 I, APHA 9221 F, APHA 9223 B
Opción 1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /100ml	Ausencia	ISO 16266, ISO 16266-2, APHA 9213 E
Opción 2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NMP/ 100 ml	$m < 1.8$	ISO 16266-2, APHA 9213 F
Bacterias mesófilas (microorganismos cultivables) UFC/ml	$m=500$	ISO 6222, APHA 9215 B

Nota. Fuente: <https://www.boletinoficial.gob.ar/#!DetalleNorma/248217/20210817>

Referencias

ADA: Autoridad del Agua. (2006). Resolución ADA 42/2006: Criterios de Calidad de Agua para la Franja de Jurisdicción Exclusiva Argentina del Río de la Plata y su Frente Marítimo. Disponible en <http://www.gob.gba.gov.ar> /legislacion/legislacion/ada-06-42.html.

AWWA, APHA, WEF. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22th edition. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation; Washington, D.C.

Cimmino F, Catapano A, Villano I, Di Maio G, Petrella L, Traina G, Pizzella A, Tudisco R, Cavaliere G. (2023). Invited review: *Human, cow, and donkey milk comparison: Focus on metabolic effects*. *J Dairy Sci.*; 106(5):3072-3085. doi: 10.3168/jds.2022-22465.

CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO. Capítulo XII. Bebidas hídricas, agua y agua gasificada.

Disponible:

<https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/>

contenido/marco/CAA/Capitulo_12.php, consulta: mayo de 2023.

- Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H., & Spoelstra, S.F. (1999). *Anaerobic lactic acid degradation in maize silage inoculated with Lactobacillus buchneri inhibits yeast growth and improves aerobic stability*. *J. Appl. Microbiol.*, 87: 583-594
- FAO (2004). *Código de Prácticas de Higiene para la Leche y Productos Lácteos*. CAC/RCP 57-2004.
- Ferrari, Alejandro (2020). *Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura*. 1a ed Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Danone del Cono Sur. Libro digital, PDF Archivo Digital: descarga ISBN 978-987-25312-2-5
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2010). *Microbial Interactions in Kefir: A natural probiotic drink. Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*, 327.
- Holcomb, D. A., & Stewart, J. R. (2020). *Microbial indicators of fecal pollution: recent progress and challenges in assessing water quality*. Current environmental health reports, 7, 311-324.
- Li, E., Saleem, F., Edge, T. A., & Schellhorn, H. E. (2021). *Biological indicators for fecal pollution detection and source tracking: A review*. Processes, 9(11), 2058.
- Martin NH, Evanowski RL, Wiedmann M. (2023). Invited review: Redefining raw milk quality-Evaluation of raw milk microbiological parameters to ensure high-quality processed dairy products. *J Dairy Sci*. Mar; 106(3):1502-1517. doi: 10.3168/jds.2022-22416.
- Owusu-Kwarteng J, Akabanda F, Agyei D, Jespersen L. (2020). Microbial Safety of Milk Production and Fermented Dairy Products in Africa. *Microorganisms*. 17;8(5):752. doi: 10.3390/microorganisms8050752.
- Wen, X., Chen, F., Lin, Y., Zhu, H., Yuan, F., Kuang, D. & Yuan, Z. (2020). *Microbial indicators and their use for monitoring drinking water quality*. A review. *Sustainability*, 12(6), 2249.

CAPÍTULO 9

Hongos que impactan en la producción agro-forestal

Mario Saparrat

Hongos promotores del crecimiento vegetal

La rizósfera es la porción de suelo que rodea a las raíces de las plantas, en donde ocurren relaciones complejas entre la planta, los microorganismos asociados y el sistema suelo. También se la suele definir como el volumen de suelo que rodea y está en contacto con las raíces y en el que se producen diversos fenómenos de interacción química, física, bioquímica y biológica entre los componentes bióticos y abióticos del suelo.

La microbiota asociada a la rizósfera tiene una constitución compleja que incluye bacterias, hongos y virus, donde los hongos cumplen varios roles claves asociándose a diferentes plantas de importancia económica. Existe un amplio rango de especies de hongos de la rizósfera que promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como su sanidad, que pertenecen a grandes grupos funcionales (Figura 9.1):

1) Hongos saprótrofos de los phyla Ascomycota y Mucoromycota que degradan la materia orgánica, participan en la formación del humus y liberan o dinamizan nutrientes claves para el crecimiento de las plantas. Además, ellos pueden sintetizar diferentes metabolitos como sideróforos u otros compuestos que actúan en la movilización del P y/o en la detoxificación de compuestos xenobióticos y otros fitotóxicos. Un ejemplo es *Penicillium bilaii* que es agente solubilizador de fósforo y además promueve la proliferación de pelos radiculares. Otro ejemplo es el hongo endófitico *Lewia* sp. (Pleosporaceae) que vive en la rizósfera de *Festuca arundinacea*, cumpliendo un rol en la rizorremediación de hidrocarburos.

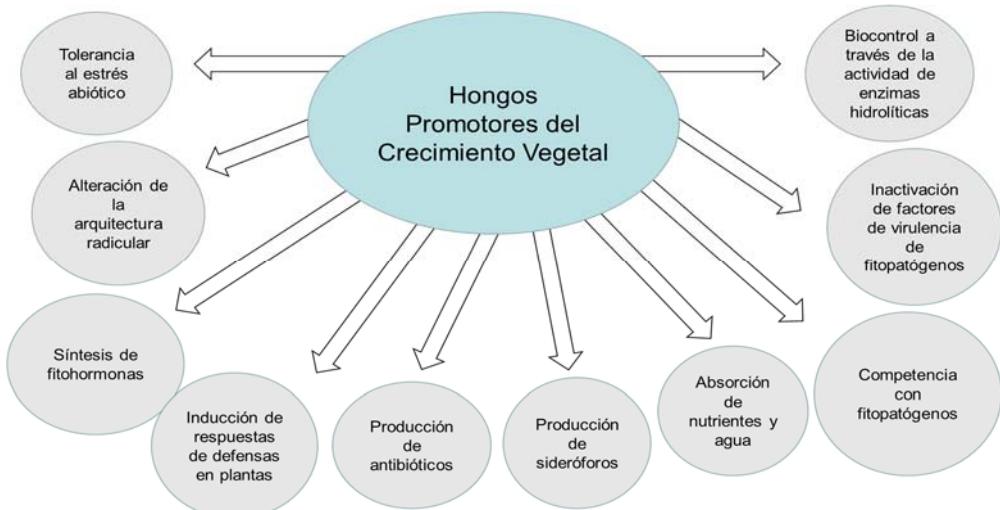
2) Hongos antagonistas de fitopatógenos. Este grupo incluye a hongos del género *Trichoderma* que suelen utilizarse como agentes de biocontrol, ya que parasitan hongos y oomicetes fitopatógenos. Los mecanismos antagónicos que utilizan las especies de *Trichoderma* incluyen estrategias de competencia por nutrientes, por oxígeno o por espacio, antibiosis mediante la producción de un amplio espectro de metabolitos, incluyendo solubles y volátiles, y micoparasitismo directo con producción de enzimas extracelulares o metabolitos secundarios, sin ser estos mecanismos mutuamente excluyentes. Además, las especies de *Trichoderma* pueden generar promoción directa del crecimiento vegetal e inducción de resistencia en la planta huésped.

3) Hongos patógenos de insectos y de animales como los hongos entomopatógenos y nematófagos. Mientras que los hongos entomopatógenos producen patogénesis letal o severa en insectos y arácnidos tales como los representantes del género *Cordyceps*, los hongos nematófagos son aquellos con capacidad de atacar, matar y digerir nematodos (adultos, juveniles y huevos). Estos dos grupos de hongos tienen aplicación para el control biológico de plagas fitopatógenas.

4) Hongos simbiontes con las raíces de las plantas representados por los hongos formadores de micorrizas (micorrizas arbusculares (MA), micorrizas ericoides, orquidoides y ectomicorrizas (ECM)).

5) Hongos endófitos mutualistas como los septados negros, que son un grupo de hongos de suelo muy comunes en diferentes ambientes, pertenecientes al phylum Ascomycota, distribuidos en más de 80 géneros y que están caracterizados por la presencia de hifas septadas pigmentadas y de microesclerocios en raíz, lo que les brinda a las plantas con las que interactúan la capacidad de tolerar condiciones ambientales extremas o tóxicas.

Figura 9.1



Nota. Hongos como promotores del crecimiento vegetal. Diversos mecanismos involucrados.

Por lo tanto, muchos hongos del suelo que establecen interacciones mutualistas con las plantas (incluyendo unas de tipo simbiótica como otras asociaciones simples que no son estrictas) pueden actuar como agentes promotores del crecimiento vegetal. Estos hongos involucran diferentes mecanismos que aumentan la disponibilidad de los nutrientes y el agua a las raíces y/o incrementan el crecimiento vegetal o su sanidad en forma indirecta reduciendo a través de interacciones antagónicas la incidencia de fitopatógenos. Esto tiene potencial en el desarrollo de estrategias sustentables en la producción vegetal a través de la formulación de biofertilizantes a base de diferentes estructuras de propagación, supervivencia y/o dispersión de los mencionados hongos que suelen ser eficientes en la colonización del suelo y/o la rizósfera.

Los hongos, sus esporomas y las producciones forestales

Los hongos que colonizan diferentes sustratos en los ecosistemas forestales son un recurso forestal importante. Ellos cumplen diferentes roles que deben tenerse en cuenta al momento de decidir sobre la explotación y el manejo forestal de un área de bosque nativo y plantación. Entre éstos, encontramos:

1. Distintas especies de hongos de suelo que establecen asociaciones simbióticas con las raíces de los árboles. Estos hongos que son micorrílicos forman simbiosis mutualistas aumentando de esta manera la capacidad de la planta para absorber agua y nutrientes inorgánicos a cambio de carbono orgánico.
2. Muchos hongos que se encuentran en el ambiente de los bosques son agentes etiológicos de enfermedades de los árboles, estos patógenos conducen a la muerte de especies forestales, conduciendo a la generación de claros en el dosel del bosque, lo que altera la diversidad de plantas en el ecosistema, pero también al ambiente en cuanto a las condiciones fisicoquímicas que se generan debido a la acumulación de madera muerta y otros restos de materia orgánica. En este sentido, los hongos patógenos a su vez alteran la comunidad de hongos que colonizan los nuevos sustratos orgánicos acumulados que sufren procesos de descomposición. Otros hongos que se encuentran en el bosque son los xilófagos que atacan el duramen de los árboles, que, aunque no los matan, contribuyen con el reciclado de la materia orgánica y a los ciclos de otros nutrientes, así como también promueven el desarrollo de nuevos hábitats en donde además pueden proliferar otras especies que impactan en el bosque como es el caso de los pájaros carpinteros.
3. Agentes saprótrofos involucrados en el proceso de descomposición: Hongos que degradan y mineralizan la madera y la hojarasca del bosque reciclando el carbono y además otros nutrientes para el desarrollo de otros organismos, proceso que además impacta en las propiedades fisicoquímicas del suelo forestal. Muchos esporomas macroscópicos de estos hongos que colonizan sustratos orgánicos son un destino fuerte de nitrógeno, fósforo y potasio que provienen de la degradación de las plantas, particularmente en las primeras etapas de la descomposición.
4. Fuente de alimento para otros componentes del ecosistema: Los hongos proporcionan una importante fuente de alimento para muchas especies heterótrofas, incluyendo microorganismos, artrópodos, nematodos y mamíferos.
5. Fuentes de alimento y metabolitos para el hombre: La existencia de diferentes especies de hongos que crecen en el bosque y/o en diferentes plantaciones, ya sea como saprótrofos o simbiontes asociados a las plantas, que diferencian bajo ciertas condiciones esporomas comestibles o medicinales. Esto conduce a prácticas de cosecha de setas (por ejemplo, el hongo ectomicorrílico comestible *Suillus luteus*, asociado a plantaciones de *Pinus spp.*). Aunque esto puede ser aprovechado como una alternativa laboral o como una recolección recreativa vinculado a actividades de ecoturismo, puede conducir a problemas de micetismo por consumo de hongos tóxicos y venenosos.

Hongos formadores de micorrizas

Las micorrizas representan a una asociación simbiótica entre hongos del suelo y las raíces (o rizoides) de las plantas. Los dos componentes de la interacción micorrízica mutualista se benefician, conduciendo generalmente al movimiento de la energía y el carbono reducido de la planta al hongo y los recursos inorgánicos del hongo a la planta. Los hongos son organismos heterótrofos que utilizan los hidratos de carbono sintetizados por la planta. A su vez, éstos toman nutrientes del suelo y los transfieren a las raíces de las plantas (principalmente fósforo y nitrógeno) pero además protegen a las plantas de los patógenos y de condiciones hídricas desfavorables.

Además de mejorar la nutrición y con ello el crecimiento de las plantas, la simbiosis micorrízica ofrece otros beneficios, como la protección ante el ataque de parásitos, hongos patógenos y nemátodos, así como también al aumento de la resistencia a la herbivoría, ya que influyen en la producción de sustancias defensivas por parte de la misma planta, la limitación de la absorción de metales pesados como el zinc y el cadmio, que son retenidos en las hifas del hongo, y además aumentan el volumen de suelo explorado por la raíz, de manera que acceden a más agua. Además, la biomasa fúngica, así como la actividad metabólica de los hongos simbiontes mejoran las propiedades fisicoquímicas del suelo que se enriquece de materia orgánica y, en el caso específico de los hongos MA, se estimula la agregación de las partículas del suelo que se mezclan con los exudados de glicoproteínas hidrofóbicas, denominadas glomalinas. Esto mejora la estructura y estabilidad al suelo, reduciendo su erosión y aumentando su capacidad de retención de agua.

El 90% de las plantas de diversos ambientes en la Tierra están micorrizadas, lo que resulta fundamental para la supervivencia de muchos taxones de plantas, incluyendo las de interés agroforestal. La distribución mundial de las asociaciones micorrízicas hace que éstas se consideren cosmopolitas y generalistas, lo que resulta de la co-evolución convergente de hongos y plantas en diferentes ambientes y momentos de la historia de la vida en la Tierra. Se considera que los hongos micorrízicos fueron cruciales para que las plantas simbiontes prosperen en ciertos ambientes de la Tierra y se adapten a condiciones estresantes y/o cambiantes.

Las micorrizas no son simplemente interacciones entre la raíz de una planta y una especie de hongo, sino que constituyen una comunidad compleja formada por diferentes especies fúngicas y los sistemas radiculares asociados con ellas. Existen estudios que reportan que la micorriza genera una extensa red de micelio externo que explora el suelo en la búsqueda de recursos e interconecta a las raíces de plantas de la misma especie o de especies diferentes que comparten su hábitat.

Las micorrizas y sus tipos

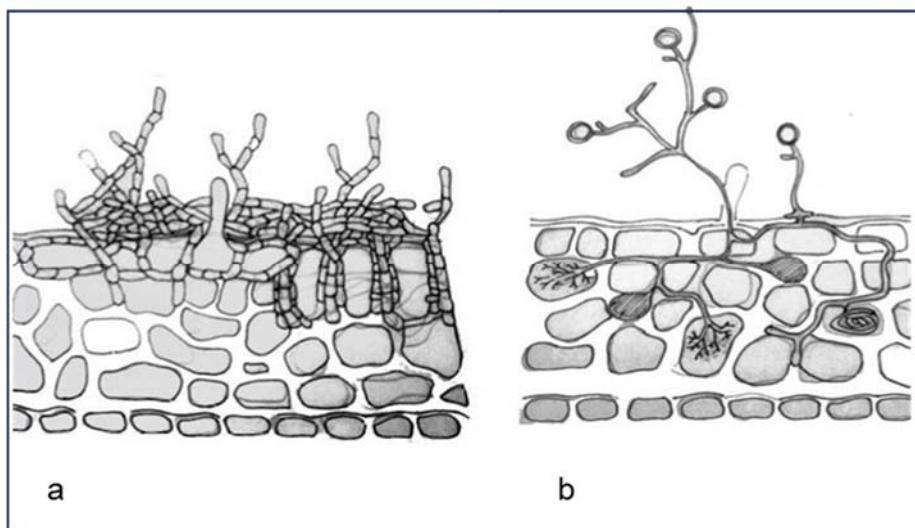
Las micorrizas se clasifican en base a las características morfológicas del hongo simbionte, como el tipo de hifas que diferencia, el nivel de penetración en la raíz o tejido, así como el grupo taxonómico al cual pertenecen los organismos que forman parte de la interacción. Los dos tipos de micorrizas más relevantes que se distinguen son las ECM y las endomicorrizas, que se definen en base a la penetración y/o interacción de las hifas con las células de la raíz (Figura 9.2). También se han descrito otros tipos que responden a interacciones que se podrían considerar intermedias de los dos grandes tipos ya mencionados, que se conocen como ectendomicorrizas.

Las ECM diferencian un manto pseudoparenquimático formado por agregados de hifas alrededor de la rizodermis, en conexión al micelio que el hongo diferencia intercelularmente en el tejido cortical conformando así la red de Hartig. En cambio, las ectendomicorrizas se caracterizan por presentar también un manto hifal, una red de Hartig, pero además hay también una penetración de la hifa en el lumen de las células corticales de la raíz.

El grupo de las endomicorrizas está formado por subtipos como monotropoide, ericoide, orquideoide y MA. Mientras que en las primeras tres no se observan estructuras particulares, las MA presentan vesículas y arbúsculos que son estructuras típicas de este subgrupo.

Ectomicorrizas (ECM)

Las ECM tienen un carácter que las distingue y es la formación de un manto hifal alrededor de las raíces de la planta simbionte. Las hifas no penetran las células de la planta hospedante, sino que crecen únicamente intercelularmente, invadiendo la vía de transporte del agua que es el apoplasto radical. De esta manera, las hifas se disponen entre las primeras células del tejido radical formando una red que toma el nombre del investigador que las describió “*Red de Hartig*”. La red de hifas que conforma el manto fúngico puede representar hasta un 40% de la masa alrededor de las raíces, cuyas hifas se extienden a nivel extraradicular aumentando el volumen de exploración del suelo rizosférico y los pelos radiculares suelen estar ausentes o totalmente cubiertos.

Figura 9.2

Nota. Representación esquemática de una ectomicorriza (a) y una micorriza arbuscular (b).

Los hongos formadores de ECM corresponden mayoritariamente a representantes de los phyla Ascomycota y Basidiomycota, con unos pocos ejemplos que pertenecen a Endogonales (Mucoromycota). Los simbiontes incluyen grupos de plantas de porte arbóreo o arbustivo, tales como representantes de Pinaceae, Araucariaceae, Cupressaceae, Gnetaceae, Polygonaceae, Nyctaginaceae, Myrtaceae, Salicaceae y Fabaceae. Así también, algunas hepáticas foliosas pueden formar este tipo de asociaciones. Es importante destacar que el porcentaje de plantas estableciendo una asociación de ECM es menor comparado a las plantas que forman MA, siendo considerado que esto es debido al límite de distribución biogeográfica (climática) que tienen las plantas hospedantes que establecen ECM que naturalmente está restringida a regiones templadas y frías.

Se estima que más de 6000 especies de hongos formadores de setas son, a su vez, formadores de ECM. Entre algunas especies comestibles podemos nombrar a *Lactarius deliciosus* (níscalos, robellón), *Amanita caesarea* (oruga o huevo de Rey) y *Tuber melanosporum* (trufa negra), además de otras especies tóxicas y carentes de interés culinario. También existen especies con diferentes grados de especificidad, es decir que crecen sólo asociadas con ciertas familias, géneros o especies de plantas.

Hongos ectomicorrícos del género *Tuber* como fuente de alimento en complemento a la producción forestal

Muchos hongos ectomicorrícos, además de contribuir a la promoción del crecimiento vegetal, son una alternativa para generar productos con valor de mercado, ya que generan esporomas (cuerpos fructíferos, carpóforos) comestibles. Un ejemplo de este tipo dual de aprovechamiento se encuentra en

diferentes especies del género *Tuber*, cuyos esporomas llamados vulgarmente “trufas” tienen un valor que ronda en los 2.000 dólares por kilo.

El género *Tuber* pertenece a la familia Tuberaceae, orden Pezizales, phylum Ascomycota y es un hongo ectomicorrílico que diferencia esporomas hipogeo, como producto de su reproducción sexual, en asociación con las raíces con las cuales establece la simbiosis.

La simbiosis micorríca entre los hongos del género *Tuber* y sus plantas hospedantes se origina con la germinación de las ascosporas diferenciadas en el interior de los esporomas y con ella se inicia el ciclo biológico de las “trufas”. Por medio de la dispersión provocada por el viento, por factores bióticos o por intervención humana a través de la inoculación *per se*, las esporas de las “trufas” acceden al suelo rizosférico de su futuro simbionte y con temperaturas aproximadas a 20°C y humedad adecuada, en primavera, germinan emitiendo una hifa que forma un micelio que coloniza a la raíz simbionte. Luego en la raíz de la planta ocurren una serie de transformaciones morfológicas y funcionales que finalmente conducen a la formación de la ectomicorriza, caracterizada por la diferenciación de un manto micelial en torno a la raíz. Del manto parten hifas hacia otras raicillas que promueven la colonización y amplían la micorrización. A medida que el árbol crece, se generan nuevos ápices radicales, cuyos tejidos son colonizados por las hifas cercanas del hongo. A partir de este momento comienza una fase que tiene una duración de cinco a nueve años, en los que el hongo se limita a colonizar raíces hasta adquirir una densidad micorrízica importante. Estos hongos micorrílicos son heterotálicos, por ello necesitan de dos micelios compatibles para que se lleve a cabo la reproducción sexual y la consecuente diferenciación de fructificaciones.

Las condiciones del suelo que deben tener las zonas truferas son suelos calizos, con pH 7,7 – 8,7; con un 63-87 % de fracción con arena, que permita un correcto drenaje de agua para cubrir las necesidades de ambos simbiontes; los suelos franco-arenosos son los ideales. El clima debe ser mediterráneo-continental, con precipitaciones por encima de los 400 mm/año, con inviernos fríos y veranos lo más frescos posible. Estas condiciones pueden variar según la especie de *Tuber*. Por ejemplo, en el caso de la “Trufa negra” (*Tuber melanosporum*) el pH óptimo es cercano a 8.

Se conocen 86 especies del género *Tuber* en el mundo. Entre ellas podemos nombrar a: *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum* (Trufa negra de verano), *Tuber brumale* (Trufa negra de otoño), *Tuber albidum* (Trufa Bianchetti), *Tuber borchii* (Trufa bianchetto), *Tuber lyonii* (Trufa del Pecán), entre otras. Muchas de ellas son de consumo humano, pero solo algunas son de importancia económica.

Tuber melanosporum o Trufa negra de Périgord, es la especie más importante a nivel mundial. Los esporomas de este hongo presentan un gran valor por la forma

en que se obtienen y por su gran difusión como producto gastronómico. Si bien los rendimientos por hectárea no son muy altos, un promedio de 30-50 kg es rentable debido al alto costo por kilo. La zona de producción natural de trufas está delimitada en el sur de Europa por España, Francia e Italia. Sin embargo, se producen trufas en lugares como Oceanía (Australia y Nueva Zelanda) y América (Chile, Argentina y EE.UU.). En este caso, plantaciones de distintas especies arbóreas son inoculadas con el hongo que desarrolla las trufas (estructuras reproductivas) en condiciones ambientales predisponentes. Las especies arbóreas con las que establece simbiosis son: *Quercus ilex* L. subsp. *ilex* (encina), *Quercus ilex* subsp. *ballota* (carrasca), *Quercus faginea* Lam. subsp. *faginea* (quejigo), *Quercus pubescens* Willd. (roble pubescente), *Quercus cerrioides* WK et Costa (roble cerrioide), *Quercus coccifera* L. (coscoja), *Quercus robur* L. (roble europeo), *Corylus avellana* L. (avellano europeo), entre otras. Además, se asocia con otras especies arbóreas, pero con las que no se llega a tener una producción estable de esporomas, como *Fagus* sp., *Populus* sp., *Salix* sp., *Ostrya* sp., *Carpinus* sp., *Alnus* sp., *Betula* sp., *Castanea* sp., *Tilia* sp., *Cistus* sp., *Eucalyptus* sp., *Pinus* sp. y *Abies* sp. Una de las características que presenta la producción con esta especie de hongos es que se produce el “quemado”, lo que consiste en la inhibición del crecimiento de otras especies vegetales en torno a su huésped, lo que proporciona mejores condiciones para el árbol ante sequía y aumenta la disponibilidad de nutrientes, ya que no cuenta con competidores.

Al igual que *Tuber melanosporum*, *Tuber magnatum* o “trufa blanca” también se desarrolla naturalmente al sur de Europa, principalmente en la región del Piamonte en Italia. Es llamada también “oro blanco” por su alto valor gastronómico y porque solo se obtiene naturalmente en ese lugar. Se asocia con especies arbóreas similares a las que se asocia *Tuber melanosporum*, como el avellano europeo (*Corylus avellana*), encinas y robles (*Quercus* sp.).

Hasta el momento no hay referencias acerca de la producción a gran escala de inóculo de hongos del género *Tuber*. Sin embargo, se han hecho algunos ensayos para la obtención *in vitro* de micelio en cultivo puro, tanto a partir de los cuerpos fructíferos como de secciones de raicillas de plantas micorrizadas, incluyendo aislamientos de la especie *Tuber melanosporum*. Más allá de esto, hoy en día, tanto en España como en Francia e incluso en producciones forestales en Argentina, se puede obtener inóculo de *Tuber melanosporum*, ya que se comercializa.

La truficultura, hoy en día, es una actividad económica que se encuentra en continua expansión y crecimiento, además de estar atravesando un proceso de tecnificación, lo que revela el potencial aprovechamiento de los esporomas (fructificaciones) de estos hongos ectomicorrílicos del género *Tuber* como fuente de alimento en complemento a la producción forestal.

Endomicorras y Micorrizas Arbusculares

En el caso de las endomicorras, las hifas de los hongos crecen en los espacios intercelulares de la corteza radical y además desarrollan en el lumen de sus células, siempre utilizando la vía apoplástica, en donde el hongo coloniza las células de la corteza, pero no alcanza la endodermis.

El grupo más grande y frecuente de endomicorras que se encuentran en la mayoría de las plantas de interés agrícola es el de las MA, siendo los arbúsculos, las estructuras típicas y críticas para la simbiosis. Los arbúsculos son las estructuras donde se realiza el intercambio de carbono y fósforo entre el hongo y la planta. Algunos hongos micorrícos arbusculares también forman vesículas en el micelio intraradicular, las cuales son estructuras de reserva del hongo.

Los hongos que se asocian para formar las MA pertenecen al Phylum Glomeromycota y se caracterizan por sus hifas cenocíticas que no presentan septos y además porque son hongos biótrofos obligados. A nivel reproductivo, ellos pueden diferenciar esporas asexuales en el micelio extraradicular, cuyos rasgos morfológicos tienen utilidad para la identificación de diferentes géneros y morfoespecies.

Su temprana aparición en el registro fósil sugiere que esta asociación representa el tipo más ancestral de micorrizas en las plantas terrestres. Esto explicaría su presencia en la mayoría de las especies vegetales y su amplia distribución cosmopolita, que permite encontrarlas tanto en ambientes naturales como en casi todos los cultivos agrícolas.

A continuación, se muestra un cuadro comparativo de diferentes características entre las ECM y las MA (**Tabla 9.1**).

Tabla 9.1

Cuadro comparativo de aspectos generales entre ECM y MA

ECTOMICORRIZAS	MICORRIZAS ARBUSCULARES
Regiones frías a templadas	Amplia distribución geográfica
Árboles y arbustos	Todos los tipos de vegetación
+ de 6000 especies principalmente Basidiomycota	Cerca de 200 especies de Glomeromycota
Cambia la morfología de la raíz	La morfología de la raíz no cambia
La planta es simbionte obligado	La planta es simbionte facultativo
El hongo es simbionte facultativo	El hongo es simbionte obligado

Referencias

- Cairney, J. W. G. (2011). Ectomycorrhizal fungi: the symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils. *Plant and Soil*, 344, 51–71.
- Saparrat, M. C. N.; Ruscitti, M. F.; Arango, M. C. 2020. "Micorrizas Arbusculares: Ecología y Aplicaciones en el Sector Agroforestal". Primera edición. ISBN: 978-987-8348-41-4. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). Serie: Libros de Cátedra. © 2020 – Edulp, CDD 578.757. 134 pp. (<https://www.libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/1504>)
- Sylvia, D. M., Hartel, P. G., Fuhrmann, J. J. y Zuberer, D. A. (2005). *Principles and applications of soil microbiology, 2nd ed.* New Jersey: Pearson Prentice Hall.

CAPÍTULO 10

Ecología microbiana y biotecnología ambiental

Sabrina Festa y Virginia Martínez Alcántara

La ecología microbiana

La microbiología ambiental es un área de la microbiología que estudia la fisiología, la genética, las interacciones y las funciones de los microorganismos en el ambiente y pone en continua evidencia la importancia de conocer la interacción de los microorganismos con los parámetros ambientales.

La microbiología ambiental reside en la interfase de dos disciplinas: las ciencias ambientales y la ecología microbiana. El objeto de estudio de ambas son sistemas muy complejos y poco explorados.

La ecología microbiana estudia las relaciones entre los microorganismos y sus entornos bióticos y abióticos. Esta disciplina demostró que algunos de los conceptos generales de ecología son también aplicables a los microorganismos (como el concepto de diversidad, estabilidad, competencia, redundancia). Esta área de la ciencia tuvo sus comienzos de la mano de Martinus W. Beijerinck y Sergei N. Winogradski quienes generaron un cambio de paradigma: los microorganismos están presentes en todas partes en los ambientes naturales, a menudo asociados a un huésped. Por primera vez informaron que los microorganismos tenían efectos beneficiosos para sus huéspedes. Durante el último siglo se demostró que la gran mayoría de los microorganismos son esenciales para el funcionamiento del ecosistema y que solo una pequeña proporción están asociados con enfermedades o patogenicidad. A su vez, gracias a este nuevo paradigma surgió el concepto de que los microorganismos no se encuentran como células individuales, sino que se encuentran dentro de conjuntos complejos, de una comunidad. Una comunidad microbiana consiste en un conjunto de poblaciones de diferentes especies que cohabitan en un mismo entorno e interactúan entre sí. Comunidades microbianas complejas se encuentran en todos los ecosistemas incluyendo el suelo, las plantas y las aguas superficiales y subterráneas.

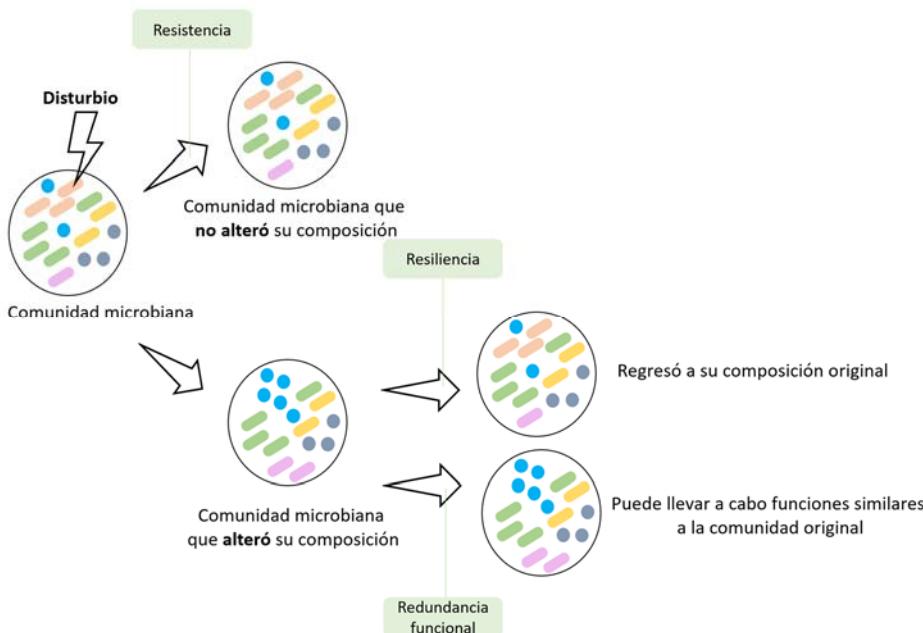
En la actualidad, continúa siendo difícil comprender el vínculo de lo que sucede a nivel de la fisiología y el comportamiento de cada microorganismo individual y las propiedades emergentes de una comunidad, que son aquellas que no se aprecian en los individuos sino en el conjunto, estas pueden ser: la estabilidad, la diversidad, la productividad y la resiliencia, conceptos que abordaremos más adelante en este capítulo.

Parte del interés de la ecología microbiana es conocer la diversidad microbiana taxonómica y funcional. La diversidad taxonómica es una función del número de especies presentes y la uniformidad con la que los individuos se distribuyen entre estas especies, es decir la equitatividad. El otro componente de la diversidad de una comunidad es la diversidad funcional, que refleja lo que pueden hacer o lo que están haciendo los microorganismos en sus hábitats en relación con los procesos que ocurren, como la transformación de nutrientes, la descomposición, la promoción o supresión del crecimiento de las plantas, la modificación de los procesos físicos de un suelo y cómo sus actividades contribuyen a los ciclos biogeoquímicos. Se pone cada vez más atención en clasificar las especies en función de su actividad (de su función) dentro de un ecosistema, en lugar de su genotipo. Esto es muy relevante para la ecología microbiana, dado que en ocasiones las especies de microorganismos son difíciles de definir por la alta tasa de transferencia horizontal de genes. Es un desafío comprender cómo la pertenencia de un microorganismo a una comunidad microbiana, compleja y dinámica se relaciona con la función de esa comunidad.

Problemática de la contaminación ambiental

El aumento de la población a nivel mundial demandó un incremento en la producción agrícola que, junto con la actividad industrial y la urbanización fueron las principales fuentes de contaminación ambiental durante el siglo XX. La contaminación se define como la introducción de elementos, compuestos o energía en el ambiente a concentraciones que impactan en las funciones biológicas y que presentan un riesgo para la salud de los ecosistemas y la salud humana. Muchos compuestos contaminantes suelen ser recalcitrantes y persisten en el ambiente. En la actualidad, la sociedad se enfrenta a las consecuencias ambientales de la liberación diaria de compuestos contaminantes por encima de los límites máximos permitidos (incluso estos límites máximos se desconocen para muchos compuestos nocivos).

Al ser considerado el suelo como el soporte de nuestro ecosistema (la biosfera), se intenta comprender su respuesta a los disturbios. Los disturbios pueden ser ocasionados por las actividades humanas, como el uso del suelo, la contaminación, pero también pueden ser eventos naturales como incendios o congelamiento. La respuesta del ecosistema del suelo frente a un disturbio tiene dos componentes: la **resistencia** y la **resiliencia**. Mientras que el primero es la capacidad del sistema para tolerar un disturbio, la resiliencia es la capacidad de recuperación después del disturbio; ambos componentes pueden ser cuantificados como medida de estabilidad del ecosistema. Es más probable que los sistemas que presenten **redundancia funcional**, es decir que contienen diversas especies que pueden cumplir la misma función, retengan una función después de un estrés ambiental. Esto podría deberse a la probabilidad de que una especie residente de esa comunidad sea más resistente al estrés.

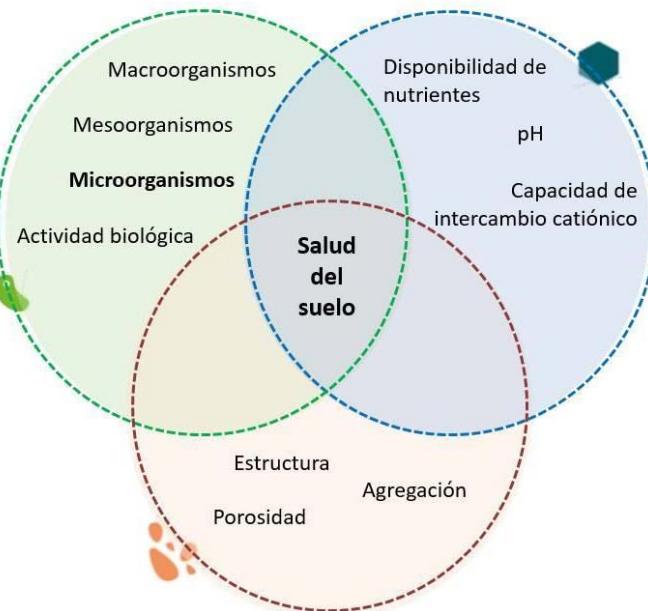
Figura 10.1

Nota. Esquema de la resistencia, resiliencia y redundancia funcional de una comunidad.
Modificada de Allison, S. D., & Martiny 2008

Indicadores biológicos de la calidad del suelo

La salud del suelo puede definirse como la capacidad del suelo para sostener la productividad, la diversidad y los servicios ambientales de los ecosistemas terrestres. Los suelos saludables mantienen una comunidad diversa de organismos que, a través de varios procesos, sostienen la productividad de los agroecosistemas. Si bien los microorganismos del suelo son numerosos y diversos, no solo es importante su número y la diversidad, sino también sus actividades o funciones.

A través del concepto de salud del suelo (o calidad del suelo), los suelos son considerados como muy dinámicos, diversos y como sistemas vivos con procesos específicos, que garantizan su continua capacidad para funcionar. La salud del suelo se puede dividir en tres categorías: química, física y biológica, cada una de ellas de igual importancia y cuya interacción es la que finalmente define la salud del suelo (Figura 10.2).

Figura 10.2

Nota. Las tres dimensiones de la salud del suelo. Adaptada de FAO, 2022

Las comunidades microbianas se adaptan rápidamente a los cambios en las condiciones ambientales, y debido a ello los cambios en las comunidades y actividades microbianas pueden funcionar como un excelente indicador para monitorear la calidad del suelo o la respuesta del suelo a un disturbio. Se desprende entonces que las comunidades microbianas no son estáticas en el tiempo, sino que fluctúan continuamente y con ellas sus funciones. En la naturaleza, las comunidades de un ecosistema están moldeadas por los factores ambientales. Algunas de las fuentes más importantes de estrés ambiental pueden ser cambios en la disponibilidad de agua, el pH, la radiación, la temperatura, la salinidad, la presencia de un contaminante, entre otras. Cuando se dan estos cambios en los factores ambientales la sucesión ecológica ocurre.

La sucesión ecológica comienza con la colonización o invasión de un hábitat por poblaciones microbianas. Si el hábitat no fue previamente colonizado el proceso se conoce como sucesión primaria. Cuando la sucesión ocurre en hábitats con una historia previa de colonización o sucesión se llama sucesión secundaria. En particular, esta última es una secuencia en la que una comunidad es reemplazada por otra dentro de un mismo hábitat hasta que se establece la mejor adaptada. En una comunidad microbiana, cada una de las poblaciones ocupan un nicho ecológico, es decir tienen un rol funcional en esa comunidad (se encargan de una serie de procesos). Sin embargo, con el tiempo o a causa de un disturbio algunas poblaciones son reemplazadas por otras que se adaptan mejor a dicha perturbación y ocupan ese nicho ecológico. En particular, la sucesión secundaria puede estar impulsada por la disponibilidad de recursos limitantes y la capacidad de las poblaciones para utilizar estos recursos. Este concepto refleja la selección de estrategias de vida de los microorganismos, los estrategas r versus los K. Los estrategas r tienen altas tasas de reproducción y son quienes primero colonizan un hábitat,

mientras que los estrategas K tienen tasas más bajas de reproducción y tienden a sobrevivir en situaciones donde los recursos son limitados. La sucesión terminaría cuando se logra un ensamblado de poblaciones relativamente estable.

Se busca constantemente microorganismos indicadores asociados con la calidad del suelo. Se puede hacer referencia a microorganismos indicadores específicos que dependen de la zona geográfica, el clima, el tipo de suelo y la historia de uso del suelo. Sin embargo, es necesario adoptar un enfoque más integrador (a nivel de comunidad) más allá de los microorganismos individuales. Sumado a que la relación entre las especies y un proceso común en el suelo es difícil de identificar, frecuentemente los microorganismos del suelo son asignados a **grupos funcionales de microorganismos**. Un grupo funcional son todos los microorganismos que comparten una función, por lo que incluye distintos taxones, es decir son todos los microorganismos que directamente contribuyen a un proceso particular en un ecosistema. Por ejemplo, diferentes especies de microorganismos pueden participar de la misma función de descomposición de la materia orgánica, lo que lleva a su identificación como grupo funcional. En la Tabla 10.1 se muestran los grupos funcionales asociados a los ciclos del carbono y del nitrógeno.

Tabla 10.1

Grupos funcionales de microorganismos asociados al ciclo del C y N

Grupos Funcionales de los microorganismos del suelo	Proceso
Microorganismos celulolíticos	Degradación de celulosa
Microorganismos amonificadores	Degradación de compuestos orgánicos y producción de amonio
Bacterias oxidantes del amonio	Nitrificación
Bacterias oxidantes del nitrito	Nitrificación
Bacterias desnitrificadoras	Desnitrificación
Bacterias fijadoras de nitrógeno	Fijación biológica del nitrógeno

La salud del suelo se puede abordar a través del estudio de indicadores de calidad del suelo, incluyendo una gama de características físicas, químicas y biológicas del suelo.

Entre los indicadores biológicos (Tabla 10.2), que están conectados con las funciones del suelo, suelen incluirse mediciones de la diversidad microbiana, de las actividades o funciones de los microorganismos y de la biomasa microbiana. También pueden incluirse análisis de procesos metabólicos, como la evolución de dióxido de carbono (CO_2), utilizada como una medida de la actividad microbiana relacionada a la descomposición de la materia orgánica del suelo y, los grupos funcionales que permiten poner en evidencia organismos que realizan un proceso metabólico o función. Otros indicadores biológicos ampliamente estudiados son los productos

metabólicos de los microorganismos y algunas enzimas tales como celulasas, arilsulfatasa, fosfatasas, relacionadas con las funciones específicas de degradación de sustratos o a la mineralización de compuestos orgánicos del N, S o P del suelo. También pueden servir como indicadores biológicos de la calidad del suelo, las tasas de descomposición de residuos de plantas.

Tabla 10.2*Indicadores biológicos de la calidad del suelo*

Indicador	Método
Actividad biológica	Actividad enzimática microbiana
	Actividad respiratoria microbiana
Grupos funcionales (amonificadores, celulolíticos, nitritadores, nitratadores, diazótrofos, otros)	Número Más Probable (NMP)
Carbono de biomasa microbiana	Proporción del carbono orgánico total que está como biomasa
Diversidad microbiana	Utilización de sustratos (perfil catabólico de la comunidad microbiana)
	Análisis de los componentes celulares mediante metodologías moleculares independientes de cultivo (se aborda más adelante en este capítulo).

Biotecnología ambiental

La biotecnología es toda aplicación tecnológica que utiliza organismos vivos o componentes celulares para la producción de bienes y servicios. Una de las ramas de la biotecnología, es la biotecnología ambiental que gestiona comunidades microbianas para brindar servicios a la sociedad, incluyendo no sólo la eliminación de contaminantes del agua, aguas residuales, lodos, sedimentos o suelo sino también la captación de productos valiosos como nutrientes o metales a partir de recursos renovables, como puede ser la biomasa. Es un campo de la ciencia que avanza rápidamente y tiene una promesa casi ilimitada para abordar muchos de los desafíos ambientales emergentes de la sociedad.

Estrategias biológicas para el tratamiento de matrices contaminadas

La contaminación tiene un impacto directo en el funcionamiento y la salud del ecosistema. La necesidad de remediación de ambientes contaminados se volvió imprescindible. Si bien existen diferentes métodos para la eliminación de estos contaminantes (químicos, físicos y biológicos), los métodos biológicos representan una opción más económica y amigable con el medio ambiente.

La biorremediación es una biotecnología ambiental que busca resolver los problemas de contaminación en ambientes impactados o perturbados por la actividad productiva. Es una tecnología sostenible que busca la atenuación o transformación de los compuestos contaminantes mediante el uso de las comunidades microbianas (hongos o bacterias), plantas o ambos. Distintas estrategias de biorremediación se pueden aplicar a distintas matrices como suelos, sedimentos y agua o para el tratamiento de efluentes líquidos como las aguas residuales domésticas e industriales y el tratamiento de barros o lodos producidos en sistemas de tratamiento de aguas residuales, previo a su disposición final.

La aplicación de una estrategia de biorremediación u otra (se describirán más adelante en este capítulo), dependerá del tipo de contaminante presente en un ambiente (orgánicos - hidrocarburos aromáticos, aromáticos policlorados, solventes orgánicos, hidrocarburos alifáticos - o inorgánicos -metales pesados, elementos radiactivos y sales-). Los contaminantes orgánicos se pueden biodegradar, es decir pueden sufrir procesos de oxidación microbiana. En el mejor de los casos se alcanza una mineralización y metabolización completa del contaminante, donde los productos principales son CO₂, H₂O y biomasa. La ausencia de biodegradación en un sitio contaminado se podría deber a condiciones ambientales físicas y/o biológicas desfavorables, limitando parcial o totalmente la degradación de los contaminantes. La aplicación de estrategias de biorremediación en sitios contaminados contribuiría a que los procesos de biodegradación ocurran más rápido, es decir más eficientemente.

Se desprende entonces, que los microorganismos son actores clave en la descontaminación del ambiente porque son nutricionalmente flexibles y tienen la habilidad de adaptarse a condiciones ambientales extremas. También poseen numerosas enzimas intracelulares y extracelulares que pueden actuar sobre los contaminantes complejos y convertirlos finalmente en fuentes de carbono y energía.

Para poder hacer uso de las comunidades microbianas y obtener el servicio deseado (la remoción del contaminante en este caso) es esencial comprenderlas; es decir es necesario conocer qué microorganismos están presentes en la comunidad, qué funciones podrían llevar a cabo, cuáles de ellas están realmente realizando y cómo se relacionan con otros miembros de la comunidad y con el ambiente. Por lo expuesto previamente se entiende que es la ecología microbiana la que nos brinda esa comprensión.

Existen diferentes estrategias para explotar el potencial de biodegradación de las comunidades microbianas y convertir a los contaminantes en productos inocuos para la salud ambiental y humana. Para que sean efectivas es necesario generar las condiciones ambientales

que permitan el crecimiento y actividad de los microorganismos. Algunas de las estrategias de biorremediación, que pueden usarse solas o algunas de ellas de forma combinadas, son:

- 1- atenuación natural monitoreada: Es un proceso de biodegradación de contaminantes que ocurre *in situ*, llevado a cabo por los microorganismos autóctonos o indígenas, bajo condiciones favorables, sin intervención humana, solo se realiza un monitoreo. Durante la atenuación natural los contaminantes pueden ser transformados a formas menos tóxicas o inmovilizados en el suelo. El tiempo requerido para la atenuación natural varía considerablemente según las condiciones del sitio. Es probable que muchos sitios contaminados no requieran otra estrategia de remediación y la atenuación resulte eficiente y rentable.
- 2- bioestimulación: busca estimular a las comunidades microbianas del sitio contaminado para permitir su máxima actividad degradadora, manipulando las condiciones del sitio mediante aireación, adición de nutrientes, aceptores de electrones o surfactantes (compuestos que aumentan la solubilidad, y posterior disponibilidad, de los contaminantes más hidrofóbicos);
- 3- bioaumento: busca mejorar la capacidad de un suelo (u otra matriz) de eliminar un contaminante mediante la inoculación de microorganismos capaces de degradar el contaminante presente en el sitio. Como inoculantes se pueden utilizar microorganismos autóctonos del sitio contaminado o alóctonos, aislados de otros ambientes con un problema similar de contaminación. Estos inoculantes pueden ser cepas puras o consorcios microbianos. Un consorcio microbiano es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas que actúan conjuntamente como una unidad, donde todos se benefician de las actividades de los demás. En estas comunidades coordinadas, la biodegradación involucra la transferencia de sustratos y productos, un proceso conocido como cooperación metabólica. Es por esta cooperación metabólica que se postula que los consorcios podrían ser inoculantes más efectivos para establecerse en nuevo ambiente que una cepa pura.
- 4- compostaje: esta estrategia se puede realizar de dos maneras ya sea mediante el compostaje del material a tratar o bien mediante el añadido de compost maduro a dicho material. Ambas pueden ser herramientas poderosas para establecer y mejorar la actividad microbiana y la degradación de contaminantes orgánicos de suelos contaminados. Debido a la enorme diversidad metabólica de microorganismos que se desarrollan en sucesión ecológica durante los procesos de compostaje, se puede esperar una diversidad metabólica muy compleja. Por lo tanto, la adición de compost puede considerarse como una especie de bioaumento de suelos contaminados con una mezcla natural compleja de microorganismos degradadores con potencial metabólico muy diverso, alta redundancia funcional y una amplia gama de posibles cooperaciones metabólicas. Esto se combina con una bioestimulación por los nutrientes y los diversos sustratos orgánicos adicionados, contenidos en el material de compost, así como por los efectos

positivos sobre las propiedades físicas del suelo, principalmente sobre la retención y disponibilidad de agua.

5- Fitorremediación: este término es utilizado para hacer referencia al conjunto de tecnologías que emplean plantas para eliminar contaminantes. Es el uso de plantas para remover, estabilizar o transformar contaminantes del ambiente (suelos y cuerpos de agua) y en la que también los microorganismos contribuyen. En estas tecnologías se incluyen dos sistemas, (a) las raíces de las plantas y las poblaciones de microorganismos asociados y (b) la planta en sí misma. Se basa en varios procesos fisiológicos de las plantas y los microorganismos, como la fotosíntesis, la asimilación de minerales, la transpiración y el metabolismo. Las plantas extienden sus raíces en el agua, sedimentos y suelo y absorben compuestos o fijan sustancias en sus superficies exteriores mientras interactúan los microorganismos. La interacción entre las plantas y los microorganismos en el suelo promueve la eficiencia de la biodegradación. La selección de especies de plantas es un factor crítico para el éxito de la fitorremediación, idealmente deben tener ciertas características: crecimiento rápido, raíces extensas y profundas, alta tasa de producción de biomasa, tolerar un amplio rango de elementos nocivos en sus raíces y tener capacidad de acumularlos.

Mecanismos de fitorremediación

Fitoextracción/fitoacumulación: en este proceso, ciertas plantas tienen la capacidad para captar, a través de las raíces, cantidades significativas de contaminantes del suelo o el agua, como los metales pesados, traslocarlos y almacenarlos. La hiperacumulación es la clave de este mecanismo. Una planta hiperacumuladora es una planta capaz de crecer en suelos con grandes concentraciones de metales pesados, extraer metales del suelo a través de sus raíces y concentrarlos hasta niveles extremadamente altos en sus tejidos. Las plantas con metales acumulados generalmente son cosechadas y la biomasa es dispuesta en otro sitio y tratada, en algunos casos puede ser factible la recuperación de metales. Las plantas acumuladoras tienen interés por su potencial para ser utilizadas en la recuperación de metales (fitominería).

Fitovolatilización: algunos contaminantes que son fitoextraídos pueden ser volatilizados desde los tejidos de las plantas, por el mecanismo de transpiración.

Fitoestabilización/fitoinmovilización: las plantas junto con los microorganismos son utilizadas para estabilizar contaminantes en el suelo y reducir su movilidad y biodisponibilidad, es decir que los contaminantes permanecen en el suelo. Las plantas inmovilizan los contaminantes por adsorción o absorción en la raíz y precipitación en la rizósfera. Algunos contaminantes o los productos de su transformación pueden unirse químicamente a la materia orgánica del suelo o ser incorporados en la materia orgánica del suelo a través

de la humificación o pueden ser atrapados en las fracciones minerales o húmicas del suelo, proceso conocido como secuestro de una sustancia o compuesto.

Rizofiltración/Fitofiltración: las plantas acuáticas (flotantes o sumergidas) son utilizadas para eliminar contaminantes orgánicos o inorgánicos presentes en una solución, a través de las raíces, concentrándolos y precipitándolos sobre o dentro de las raíces.

Rizodegradación/fitoestimulación: se refiere a la degradación de contaminantes orgánicos en el suelo rizosférico por las comunidades microbianas asociadas a las raíces. La acción combinada de la alta actividad metabólica de las poblaciones microbianas con enzimas capaces de degradar compuestos contaminantes.

Fitodegradación: es la transformación de compuestos orgánicos llevada a cabo dentro de las plantas por sus enzimas. Los contaminantes son transformados en productos simples e integrados en los tejidos de las plantas para su crecimiento. Este proceso implica la absorción directa de contaminantes del suelo o agua y los metabolitos resultantes que se acumulan dentro de los tejidos pueden ser no tóxicos o menos tóxicos que el contaminante original.

Definiciones importantes

Biorremediación: es una tecnología sostenible, amigable con el medio ambiente y económica que mediante el uso de comunidades microbianas busca la atenuación o transformación de los compuestos contaminantes. Las estrategias de biorremediación generalmente se clasifican como *in situ* o *ex situ*. La biorremediación *in situ* involucra el tratamiento del material contaminado en el sitio, mientras que la *ex situ* involucra la remoción del material contaminado para ser tratado en otro lugar. Un proceso de biorremediación puede ser efectivo cuando las condiciones ambientales permiten el crecimiento y la actividad de los microorganismos.

Comunidad microbiana: conjunto de poblaciones de diferentes especies que coexisten en un mismo entorno e interactúan entre sí en un entorno contiguo. En una comunidad microbiana, la diversidad y abundancia de microorganismos está controlada por los recursos (alimentos) y por las condiciones ambientales (temperatura, pH, concentración de oxígeno, etc.).

Contaminantes emergentes: son compuestos orgánicos antropogénicos (hechos por el ser humano) muchos de los cuales tienen riesgo potencial para la salud humana y de los ecosistemas aún en muy bajas concentraciones.

Ecología microbiana: el campo de la ciencia que estudia las relaciones entre los microorganismos y sus entornos bióticos y abióticos. Provee información sobre la dinámica ecológica y evolutiva de las comunidades microbianas

Estructura de una comunidad: es el número de partes o elementos dentro de un sistema, en particular en ecología microbiana es el número de especies diferentes presentes (riqueza de especies).

Microbioma: El término incluye a la comunidad de microorganismos, y también a su “teatro de actividad”. Esto último sería todo el espectro de moléculas producidas por los microorganismos, incluidos sus elementos estructurales (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, polisacáridos) y metabolitos (moléculas de señalización, toxinas, moléculas orgánicas e inorgánicas) (Figura 10.3).

Microbiota: la colección física total de microorganismos dentro de un entorno específico.

Nicho ecológico: el rol funcional de un microorganismo en un ecosistema; es la descripción combinada del hábitat físico, el rol funcional y las interacciones de los microorganismos que ocurren en un lugar dado.

Población microbiana: grupo de células que derivan de una única célula parental por divisiones celulares sucesivas. Sin embargo, la definición de población bacteriana es un tópico complejo porque se conoce que la mayoría de las poblaciones bacterianas también están sujetas a complejos procesos de diversificación del genoma que implican la transferencia horizontal de material genético. La heterogeneidad dentro de una población bacteriana puede resultar de la diversidad genética a nivel de población o de las diferencias fenotípicas entre células genéticamente idénticas. Esta diversidad dentro de una población puede beneficiar al grupo como un todo, especialmente cuando se dan cambios ambientales repentinos, al promover la supervivencia a nivel de población cuando hay genotipos que presentan una ventaja en esas situaciones frente a otros.

Metodologías para el seguimiento de comunidades

El objetivo principal de un proceso de biorremediación es eliminar el contaminante y restaurar la salud del suelo y sus capacidades funcionales. Como se mencionó previamente, las comunidades microbianas poseen la capacidad de dar una medida integral de la salud del suelo, aspecto que es más difícil obtener con medidas físicas/químicas y/o análisis de diversidad de organismos superiores (son procesos que suelen ocurrir más lento). Entonces, hacer un seguimiento de las comunidades microbianas durante un proceso de biorremediación permitiría conocer qué microorganismos están involucrados en el proceso. Se podría estudiar el papel de los microorganismos degradadores de los contaminantes midiendo por ejemplo la tasa de crecimiento, la nutrición, la respiración y los cambios que suceden en las comunidades microbianas a lo largo del proceso de degradación.

El suelo es uno de los ecosistemas más dinámicos debido a la inmensa diversidad microbiana que alberga. Del total de bacterias en un gramo de suelo se estima que sólo menos del 1% de

estas pueden cultivarse en el laboratorio, es decir existe un 99% de bacterias no cultivables. El término para hacer referencia a un “microorganismo no cultivable” indica que las técnicas actuales de cultivo de laboratorio no pueden cultivar una bacteria dada en el laboratorio, y no significa que “nunca podrá ser cultivado”. Más bien, significa que se carece de información crítica sobre su fisiología como para elaborar un medio de cultivo que satisfaga sus necesidades para crecer. En este punto entonces, es necesario decidir qué metodologías utilizar para monitorear a las comunidades microbianas teniendo en cuenta la condición no cultivable de varios microorganismos.

Al utilizar metodologías de análisis que son **dependientes de cultivo** (recuento en placa, por ejemplo) es necesario hacer un enriquecimiento y/o aislamiento de microorganismos en medios de cultivo. Si bien, este tipo de metodologías demostraron ser el pilar de la microbiología durante más de un siglo, recuperan una pequeña porción de la diversidad del suelo por la característica de no cultivables de muchos de los miembros de las comunidades del suelo. Existen otras metodologías que son **independientes de cultivo**, donde el análisis se lleva a cabo directamente sobre la muestra ambiental, como el estudio de una actividad enzimática o la respiración. En la actualidad diferentes metodologías moleculares independientes de cultivo se utilizan para el estudio de una comunidad, que se basan en la caracterización de componentes celulares como ácidos nucleicos, proteínas y ácidos grasos. Las metodologías moleculares independientes de cultivo revelaron una cantidad inimaginable de diversidad microbiana en suelos. Combinando metodologías dependientes de cultivo con independientes de cultivo se obtiene una visión menos sesgada, considerando la importancia ecológica de los microorganismos no cultivados en sitios contaminados.

Metodologías moleculares independientes de cultivo

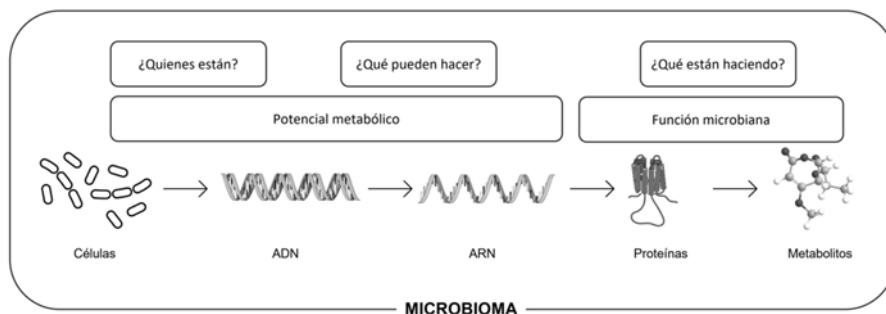
Hasta principios de 1980 la caracterización de una comunidad microbiana se limitaba al cultivo de microorganismos a partir de muestras ambientales o medidas de actividades enzimáticas netas. Si bien estas técnicas continúan siendo muy importantes, en la actualidad, existen metodologías moleculares modernas que eluden la necesidad de cultivar los microorganismos en el laboratorio y que se basan en la extracción y caracterización de constituyentes celulares como ácidos nucleicos, proteínas y ácidos grasos de toda la comunidad. De esta manera este tipo de análisis permite estudiar simultáneamente los microorganismos cultivables y no cultivables, reflejando no solo la composición de la comunidad microbiana (*¿Quiénes están?*), sino también sus roles funcionales en el medio ambiente (*¿Qué pueden hacer? o ¿Qué están haciendo?*).

La aplicación de herramientas moleculares modernas no se centra solamente en estudiar macromoléculas individuales, sino permite estudiar vías metabólicas completas. Hoy en día existen las conocidas herramientas ómicas que, apoyadas por los avances bioinformáticos, permiten obtener una imagen más pulida de las

comunidades microbianas. El sufijo ómica se refiere a una variedad de disciplinas a menudo agrupadas como un conjunto de herramientas para análisis de comunidades microbianas. En estas disciplinas se caracteriza un conjunto de moléculas biológicas para detectar la función, la estructura, la fisiología y los mecanismos moleculares de un microorganismo o un conjunto de microorganismos. En este segundo escenario, al sufijo ómica se le suma el prefijo meta-, porque lo que se estudia es el conjunto de moléculas de una comunidad y no solo solo de un microorganismo.

La caracterización del microbioma se puede realizar a distintos niveles, con distintos enfoques, tal como se muestra en la Figura 10.3 y en la Tabla 10.4.

Figura 10.3



Nota. Áreas de estudio, comenzando por células completas y terminado en metabolitos. El enfoque del análisis cambia desde el potencial microbiano (aprender sobre los microorganismos presentes en un ambiente y su material genético) hacia el funcionamiento microbiano (conocer nuevas vías metabólicas activas).

Al analizar el ADN de toda la comunidad se puede obtener un perfil taxonómico. En general para estudiar el perfil taxonómico de las comunidades bacterianas se utiliza el gen 16S rRNA, y su equivalente en eucariotas, el gen 18S rRNA. Se utilizan estos genes porque están universalmente distribuidos, son estables en su función y están conservados (incluso entre especies evolutivamente distantes). Además, estudiar el ADN de una comunidad permite conocer qué genes están presentes en los genomas de los microorganismos, es decir conocer posibles funciones de una comunidad, su potencial metabólico (metagenómica). Alternativamente se puede extraer todo el ARN y determinar qué microorganismos podrían estar activos y qué genes se están transcribiendo (metatranscriptómica). El control de la expresión génica es la clave para adaptarse a los cambios ambientales y, por lo tanto, para la supervivencia. Por su parte, las proteínas son el último producto de la regulación génica y proveen evidencia directa de la función de los genes, indican qué están haciendo

los microorganismos en una comunidad. Como las perturbaciones pueden actuar como desencadenante del ajuste de la respuesta fisiológica de los microorganismos, estudiar las proteínas de una comunidad (metaproteómica) puede ayudar a adquirir una visión detallada de las modificaciones globales celulares e identificar proteínas específicas relacionadas con la respuesta a la perturbación.

Por último, el estudio de los metabolitos, que sería el conjunto de compuestos químicos producidos y consumidos por una comunidad como resultado de un proceso metabólico (metabolómica), informarían sobre el estado funcional real de la comunidad. En ambientes contaminados con compuestos orgánicos, la metabolómica podría ayudar a entender el proceso de biodegradación de estos, porque permitiría identificar qué intermediarios de degradación se acumulan o no en un ambiente.

Tabla 10.4

Molécula biológica	Metodología	Target	Objetivo
Enfoque basado en:	ADN	ADN metabarcoding	Un solo gen Mapear la taxonomía y la diversidad filogenética de una comunidad
		Metagenómica	Todos los genes de la comunidad Reconstruir genomas e identificar las rutas metabólicas presentes en una comunidad
	ARN	RNA metabarcoding	Los transcriptos de un solo gen Mapear la taxonomía y la diversidad filogenética de las células activas de una comunidad
		Metatranscriptómica	Los transcriptos de todos los genes expresados de la comunidad Identificar las rutas metabólicas activas conocidas en una comunidad
	Proteínas	Proteómica	Un solo grupo de proteínas con un rasgo común Caracterizar dicha proteína
		Metaproteómica	Todos las proteínas producidas por una comunidad Crear un perfil de las proteínas expresadas por una comunidad en un momento específico
Metabolitos	Metabolómica	Todos los metabolitos producidos por una comunidad	Crear un perfil funcional del estado fisiológico de una comunidad en un momento específico

Nota. Metodologías de análisis dirigidos a distintas moléculas biológicas, incluyendo su target y el objetivo del enfoque.

Tecnologías ecológicas para el tratamiento de aguas residuales. Los humedales construidos

Las aguas residuales pueden ser de distintos tipos: domésticas industriales y de escorrentía superficial agrícola y urbana. Las aguas residuales domésticas, urbanas e industriales se tratan por diferentes tecnologías convencionales que comprenden distintas etapas: el tratamiento primario que comprende procesos físicos como cribado, remoción de arena, trituración y sedimentación, removiendo materiales grandes y pesados que flotan o se depositan fácilmente, el secundario que reduce los niveles de contaminación química (DQO) y biológica (DBO) mediante procesos químicos y/o biológicos y el terciario que mejora la calidad de las aguas residuales antes de que se descarguen en el ambiente (el suelo o un cuerpo de agua) o se reutilicen.

Las tecnologías convencionales para la depuración de aguas residuales suelen ser ambientalmente no sostenibles y costosas durante su operación. La biorremediación demostró ser una alternativa de depuración de aguas residuales.

Los **humedales artificiales o humedales construidos** (HC), son sistemas de tratamiento que imitan los procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren en los humedales naturales y que están diseñados y construidos para utilizar los procesos que involucran a las plantas, el suelo o los sustratos y los microorganismos asociados. En términos generales, el sistema consiste en el desarrollo de un cultivo de macrófitas (plantas y algas acuáticas visibles a simple vista), enraizadas sobre un sustrato impermeabilizado o flotantes libres, a través del cual el agua residual afluente es depurada progresiva y lentamente.

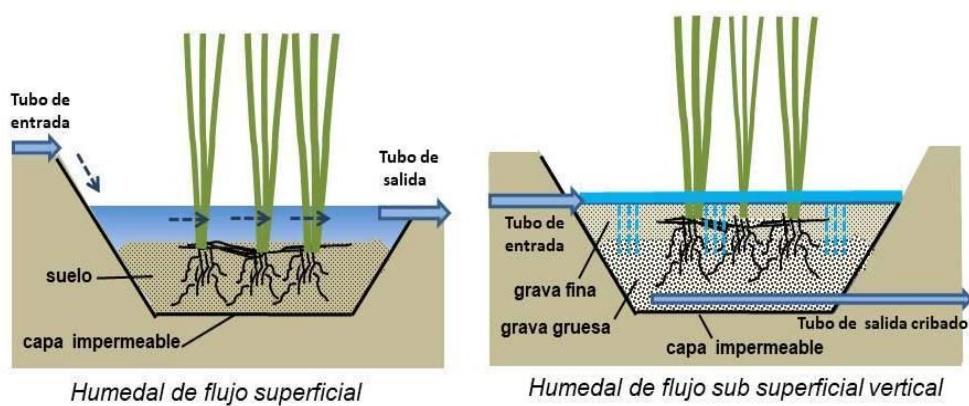
Los HC son tecnologías verdes asequibles y confiables para el tratamiento de varios tipos de aguas residuales, se han utilizado para tratar aguas residuales domésticas y urbanas, industriales (incluyendo la fabricación de papel, productos químicos y de la industria de la alimentación, refinerías, mataderos, y otras), efluentes agropecuarios y aguas pluviales, entre otras y para el tratamiento de lodos o barros de depuradoras convencionales, mediante la deposición superficial en humedales de flujo sub superficial donde se deshidratan y mineralizan.

El diseño de estos sistemas requiere del conocimiento de distintos campos de la ciencia como la ingeniería y la biología y su beneficio más atractivo es que constituye una forma ecológica, amigable con el ambiente, de tratar las aguas residuales, con bajos costos operativos y fácil mantenimiento. Debido a estas características, los HC han sido reconocidos como una alternativa al tratamiento convencional de aguas residuales.

Los HC pueden ser clasificados según el tipo de macrófitas que empleen: los basados en macrófitas enraizadas emergentes pueden ser de dos tipos, de acuerdo a la circulación del agua que se emplee (Figura 10.4): 1) humedales de flujo superficial que son una modificación del sistema de lagunas convencionales, cuando el agua circula en forma superficial por entre los tallos de las plantas y 2) humedales de flujo sub superficial, si el agua circula por debajo de la superficie del estrato del humedal y estos pueden ser de flujo vertical y de flujo horizontal. En el primer caso, el agua es aplicada en la parte superior de un extremo, se trata a medida que pasa

por un medio poroso y es recogida en una red de drenaje (tubos cribados) situada en el fondo del humedal. Las aguas se infiltran verticalmente a través de un sustrato inerte (arenas, gravas) de varias capas y se recogen finalmente en un tubo de descarga que recibe la red de tubos. La aplicación de agua se efectúa de forma intermitente, para preservar y estimular las condiciones aerobias. La vegetación emergente se planta en el medio granular. Adicionalmente, para favorecer las condiciones aerobias del medio poroso, se suele colocar un sistema de aireación, que son tuberías con salidas al exterior.

Figura 10.4



Nota. Esquema de dos humedales construidos con macrófitas emergentes. Adaptado de David et al., 2022.

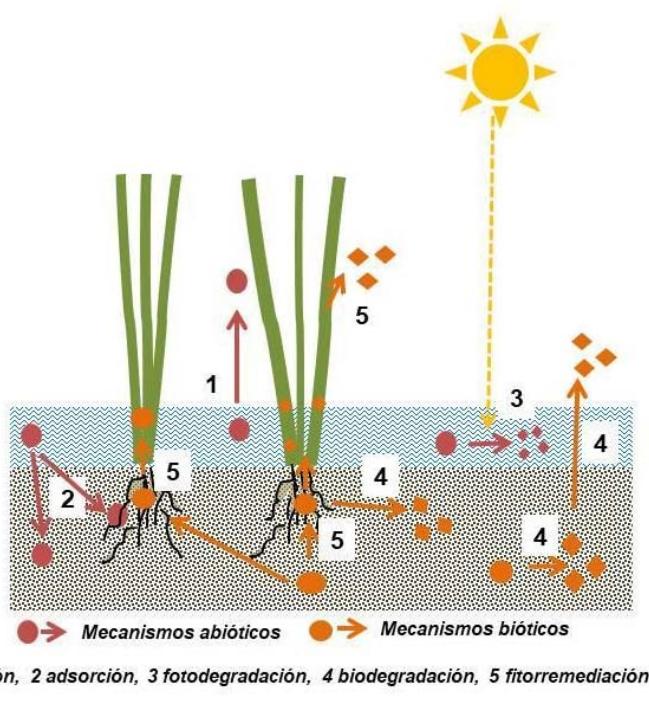
Otros tipos de HC son los de flujo subsuperficial horizontal y los de sistemas híbridos (combinación de al menos dos humedales sucesivos). Además, en los llamados HC intensificados o aumentados, se han incorporado modificaciones como el agregado de flujos de aireación, para aumentar la eficiencia del tratamiento.

Los humedales naturales y los HC, son conocidos por su capacidad de transformar y asimilar nutrientes y otros compuestos, es decir que son sistemas biogeoquímicos complejos con mecanismos bióticos y abióticos interrelacionados que se demostraron efectivos para remover materia orgánica, sólidos suspendidos, sólidos inorgánicos disueltos, nitrógeno, fósforo, xenobióticos orgánicos, metales pesados y microorganismos patógenos. Actualmente, también tienen interés para su aplicación en la eliminación de los **contaminantes emergentes** (CE). Si bien las tecnologías de tratamiento avanzado como la ozonización, la filtración por membrana y la radiación ultravioleta mostraron ser efectivas para eliminar algunos CE, estas son intensivas en el consumo de energía y costosas, especialmente para comunidades pequeñas.

Los mecanismos bióticos y abióticos de eliminación de contaminantes de los HC son variados (Figura 10.5) y ellos están interrelacionados unos con otros, su relevancia dependerá del tipo de contaminante y del tipo de humedal. La eliminación se entiende como la disminución de la

concentración de un compuesto en la fase acuosa que engloba la transformación, la degradación o mineralización de contaminantes generando productos de transformación y metabolitos, como también el secuestro de los compuestos en los diversos compartimentos del humedal (agua, tejido vegetal o sustrato). El sustrato (medio granular) es responsable directo de la extracción de algunas sustancias contaminantes mediante interacciones físicas y químicas.

Figura 10.5



Nota. Esquema representativo de algunos mecanismos bióticos y abiotícos de eliminación de compuestos en humedales naturales y construidos. Adaptado de Overton et al., 2023

La remoción de bacterias patógenas y virus está basada en una combinación de mecanismos físicos (sedimentación, agregación y la acción de la radiación ultravioleta), químicos (adsorción) y biológicos (predación, exposición a toxinas de otros microorganismos y el ataque por bacteriófagos). La eficiencia de remoción de bacterias coliformes fecales puede llegar al 98% o 99%.

Además de los contaminantes químicos, biológicos y nutrientes, los CE son una tendencia creciente en el suelo y cuerpos de agua dulce, aunque se encuentran en concentraciones muy bajas (en el rango de ng/L) no solo dañan la calidad del suelo y las fuentes de agua dulce, sino que también pueden incorporarse en la cadena alimentaria y afectar la salud humana y animal. Los suelos sanos y productivos como también la disponibilidad de los recursos de agua dulce son críticos para la productividad agrícola, dado que la agricultura es una de las actividades de mayor consumo de agua dulce. A pesar de las ventajas de reutilizar las aguas residuales tratadas por los métodos convencionales, debido a que estas no eliminan o no son eficientes para eliminar

CE, aún las aguas residuales tratadas terciariamente, se han planteado preocupaciones respecto de su seguridad para su uso como agua de riego.

El grado de eficiencia en la eliminación de contaminantes en los HC depende de una combinación de condiciones como: la edad del sistema, el patrón de flujo, el tipo de sustrato, la vegetación, la profundidad, velocidad y el tiempo de retención del agua, la forma en que se aporta el influente al HC (continuo, intermitente) y las características fisicoquímicas de los contaminantes.

En cuanto al mantenimiento, a lo largo de los años la descomposición de la vegetación acumula precipitados insolubles que junto con alta densidad de raíces producen obstrucciones en el flujo de agua. También puede disminuir la porosidad y la permeabilidad, reduciendo la eficiencia de los HC. Para evitar la incorporación de materia orgánica adicional al agua y el reciclado de nutrientes absorbidos por las plantas, se cosecha la biomasa vegetal.

Los principales microorganismos presentes en los humedales son: bacterias, hongos y protozoarios. Las poblaciones de bacterias y hongos utilizan los contaminantes como fuentes de carbono y energía y resultan favorecidas las que utilizan estos compuestos y que además toleran la potencial toxicidad del compuesto contaminante al cual están expuestas. En estas comunidades es importante entender las relaciones metabólicas entre las poblaciones, ya que la biodegradación puede ser el resultado del metabolismo directo o del co-metabolismo, involucrando microorganismos que no consumen el contaminante de interés directamente. La biomasa microbiana consume gran parte del carbono y muchos nutrientes como el fósforo y el nitrógeno y transforma un gran número de sustancias orgánicas e inorgánicas en sustancias inocuas.

Referencias

- Allison, S. D., & Martiny, J. B. (2008). *Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(supplement_1), 11512-11519.
- Antwis, R. E., Griffiths, S. M., Harrison, X. A., Aranega-Bou, P., Arce, A., Bettridge, A. S. & Sutherland, W. J. (2017). *Fifty important research questions in microbial ecology*. FEMS Microbiology Ecology, 93(5).
- Atlas, R. M. (1998). *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Pearson Education India.
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., ... & Schloter, M. (2020). *Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges*. Microbiome, 8, 1-22.
- Cycoń, M., Mrozik, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2017). *Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review*. Chemosphere, 172, 52-71

- David G., Rana M. S., Saxena S., Sharma S., Pant D., Prajapati S. K. (2022) *A review on design, operation, and maintenance of constructed wetlands for removal of nutrients and emerging contaminants*. Science and Technology 3
- Davis, K. M., & Isberg, R. R. (2016). *Defining heterogeneity within bacterial populations via single cell approaches*. Bioessays, 38(8), 782-790.
- Delgadillo Oscar, Camacho Alan, Fernando Pérez Luis, Mauricio Andrade (2010). Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales Centro Andino para la Gestión y Uso del Agua (Centro AGUA) ISBN: 978-99954-766-2-5
- Epelde, L., Mijangos, I., Becerril, J. M., & Garbisu, C. (2009). *Soil microbial community as bioindicator of the recovery of soil functioning derived from metal phytoextraction with sorghum*. Soil Biology and Biochemistry, 41(9), 1788-1794.
- FAO (2022). A review of the impacts of crop production on the soil microbiome: Innovations and policy recommendations to address environmental degradation, climate change and human health. Rome, FAO.
- Griffiths, B. S., & Philippot, L. (2013). *Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community*. FEMS microbiology reviews, 37(2), 112-129.
- Joyce, E. A., Chan, K., Salama, N. R., & Falkow, S. (2002). *Redefining bacterial populations: a post-genomic reformation*. Nature Reviews Genetics, 3(6), 462-473.
- Kanissery, R. G., & Sims, G. K. (2011). *Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil*. Applied and Environmental Soil Science, 2011
- Kästner, M., & Miltner, A. (2016). *Application of compost for effective bioremediation of organic contaminants and pollutants in soil*. Applied microbiology and biotechnology, 100, 3433-3449.
- Khan, Shaista, Tariq H. Masoodi, Nazir A. Pala, Shah Murtaza, Javeed A. Mugloo, Parvez A. Sofi, Musaib U. Zaman, Rupesh Kumar, and Amit Kumar. (2023). *Phytoremediation Prospects for Restoration of Contamination in the Natural Ecosystems* Water 15, no. 8: 1498. <https://doi.org/10.3390/w15081498>
- Khudur, L. S., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., & Ball, A. S. (2018). *A review on the bioremediation of petroleum hydrocarbons: current state of the art*. Microbial Action on Hydrocarbons, 643-667.
- Konopka, A. (2009). *What is microbial community ecology?* The ISME journal, 3(11), 1223-1230.
- Lobanov, V., Gobet, A., & Joyce, A. (2022). *Ecosystem-specific microbiota and microbiome databases in the era of big data*. Environmental Microbiome, 17(1), 1-17.
- Latif, A., Abbas, A., Iqbal, J., Azeem, M., Asghar, W., Ullah, R., & Chen, Z. (2023). *Remediation of Environmental Contaminants Through Phytotechnology*. Water, Air, & Soil Pollution, 234(3), 139.
- Lopes, P. R. M., Cruz, V. H., de Menezes, A. B., Gadanho, B. P., Moreira, B. R. D. A., Mendes, C. R. & Montagnolli, R. N. (2022). *Microbial bioremediation of pesticides in agricultural soils: an integrative review on natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 21(4), 851-876.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). Brock. biología de los microorganismos. 12 Edición Pag. 707 a 7011.
- Madsen, E. L. (2015). *Environmental microbiology: from genomes to biogeochemistry*. John Wiley & Sons.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R., 2011. *Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective*. Environ. Int. 37, 1362-1375.
- Montgomery, B. L. (2020). *Lessons from microbes: what can we learn about equity from unculturable bacteria?* Msphere, 5(5), e01046-20.
- Overton, Olivia Celeste, Leif Hans Olson, Sreemala Das Majumder, Hani Shwiyyat, Mary Elizabeth Foltz, and Robert William Nairn. (2023). *Wetland Removal Mechanisms for Emerging Contaminants Land* 12, no. 2: 472. <https://doi.org/10.3390/land12020472>
- Rosas, I. (2004). Microbiología ambiental. Instituto Nacional de Ecología.
- Sanjit, L., & Bhatt, D. (2005). *How relevant are the concepts of species diversity and species richness?* Journal of Biosciences, 30, 557-560.
- Teixeira, D. (2020). Microbiología Básica. Teófilo Otoni: Núcleo de Investigação Científica (NICE).
- Wu, S., Lyu, T., Zhao, Y., Vymazal, J., Arias, C. A., & Brix, H. (2018). *Rethinking Intensification of Constructed Wetlands as a Green Eco-Technology for Wastewater Treatment*. Environmental science & technology, 52(4), 1693–1694. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00010>
- Xu, J. (2006). *Invited review: microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances*. Molecular ecology, 15(7), 1713-1731.

Los autores

Coordinadores

Balatti, Pedro Alberto

Ing. Agrónomo graduado en la Universidad Nacional de La Plata 1980. Becario Externo CONICET 1988-1990. Visiting Scientist University of Missouri 1989-1990. Beca PhD. de la Food for the XXI Century University of Missouri. Columbia, MO USA Enero 1992-Diciembre 1994. PhD. Plant Pathology Diciembre 1994. Profesor Titular ordinario de Microbiología Agrícola y de Fitopatología. Investigador Superior de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. Director del Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI). Editor Asociado de Australasian Plant Pathology. Miembro del comité editorial de Biology and Fertility of soils y de Physiological and Molecular Plant Pathology.

Saparrat, Mario Carlos Nazareno

Dr. en Ciencias Naturales, Lic. en Biología orientación Botánica, Fac. de Cs. Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata (UNLP). Profesor Titular Ordinario UNLP en la Cátedra: Botánica Sistemática I (Fac. de Cs. Naturales y Museo, UNLP). Profesor Adjunto Ordinario UNLP en la Cátedra: Microbiología Agrícola (Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, UNLP). Docente Investigador UNLP Categoría II. Investigador Principal CONICET en el Instituto de Fisiología Vegetal INFIVE CONICET-UNLP. Especialista en Docencia Universitaria, UNLP. Editor Asociado de Darwiniana Nueva Serie. Integrante de la Comisión Asesora Honoraria de Ciencias Agrícolas, Producción y Salud Animal de la CICPBA. Miembro titular de la Comisión ad-hoc de Trabajo Final de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP.

Autores

Balague, Laura J.

Licenciada en Biología, egresada de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM, UNLP) (1990). Especialista en Ambiente y Patología Ambiental (UNLP) (1997). Jefe de Trabajos Prácticos del Curso de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF, UNLP) (2022).

Diosma, Gabriela

MSc en Tecnología e Higiene de los Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata. Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP. Jefe de Trabajos Prácticos, dedicación exclusiva, por concurso en la cátedra de Microbiología Agrícola

(Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, UNLP). Docente Investigador UNLP Categoría III. Carrera Docente Universitaria.

Publicaciones Científicas en revistas con referato: 12. Presentaciones en Congresos de Investigación: 53. Participación en Proyectos de Investigación acreditados: 20

Coordinadora de Proyecto de Extensión Fac. Cs. Exactas UNLP. Coordinadora del Programa de Extensión de la UNLP “Promoción de Derechos y Fortalecimiento de la Organización Comunitaria.

Fermoselle, Geraldina Eugenia

Ingeniera Agrónoma. Egresada de la facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. (FCAyF) UNLP. Becaria Doctoral de la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación FONCYT- Becaria Doctoral UNLP. Ayudante Diplomada Microbiología Agrícola desde el año 2003. (FCAyF) Codirectora pasantías. Docente de talleres extracurriculares. Directora de tesis de grado.

Festa, Sabrina

Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP); Licenciada en Biotecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Investigadora Asistente de CONICET. Ayudante Diplomada en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP. Áreas de experiencia: Ecología Microbiana, Biorremediación

Lonero, Alejandra

Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP); Licenciada en Biología orientación Ecología, UNLP. Profesional de Apoyo Principal de CONICET. Ayudante Diplomada en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP.

Martínez Alcántara, Virginia.

Lic. en Biología (orientación ecología). Becaria de Iniciación y de Perfeccionamiento de la Comisión de Investigaciones de la Pcia de Buenos Aires. Docente investigadora de los cursos Microbiología Agrícola y Componentes de la Agrobiodiversidad (Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales-UNLP). Profesora adjunta del curso Evaluación de Impacto Ambiental en la Universidad Nacional de Avellaneda. Consultora

Pastorino, Graciela Noemí

Ingeniera Agrónoma, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF), UNLP. Magister en Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica (.), UBA. Doctora en Ciencias Naturales, Facultad de Cs Naturales y Museo (FCNyM), UNLP. Ayudante Diplomada de Microbiología Agrícola, FCAyF, UNLP. Docente-investigadora del Departamento de Ciencias Biológicas,

FCAyF. Especialista en Docencia Universitaria, UNLP. Área de investigación-extension:
Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (micorrizas, rizobios, endófitos).

Balatti, Pedro Alberto

Los microorganismos y su rol en la producción agrícola / Pedro Alberto Balatti ; Mario Carlos Nazareno Saparrat ; Coordinación general de Pedro Alberto Balatti ; Mario Carlos Nazareno Saparrat. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; La Plata : EDULP, 2025.
Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-950-34-2556-5

1. Microbiología. 2. Microorganismo. 3. Hongos. I. Saparrat, Mario Carlos Nazareno II. Balatti, Pedro Alberto, coord. III. Saparrat, Mario Carlos Nazareno, coord. IV. Título.
CDD 579.5

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina
+54 221 644 7150
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2025
ISBN 978-950-34-2556-5
© 2025 - Edulp

n
naturales


edulp
EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA