

TJA

---

**Universidad de Granada**  
**Facultad de Ciencias**  
**Departamento de Microbiología**



**Interacción micorrizas arbusculares-rizobacterias  
como herramienta biotecnológica en relación  
con la nutrición y protección de la planta  
frente a estreses abióticos**

**Tesis Doctoral**

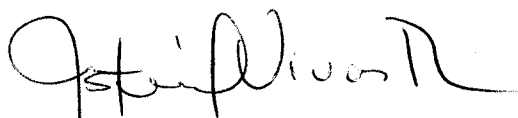
**Astrid Coromoto Vivas Ramírez**

**Granada, 2003**

---

**Interacción micorrizas arbusculares-rizobacterias  
como herramienta biotecnológica en relación  
con la nutrición y protección de la planta  
frente a estreses abióticos**

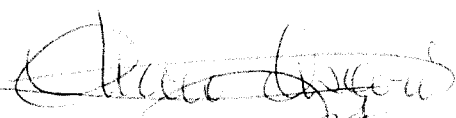
**Memoria que presenta la Licenciada  
Astrid Coromoto Vivas Ramírez  
para optar al grado de Doctor.**



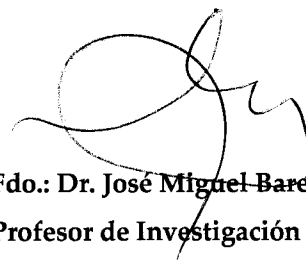
**Fdo.: Astrid Coromoto Vivas Ramírez**

**Vº Bº**

**Los directores del trabajo**



**Fdo.: Dr. Rosario Azcón González de Aguilar  
Profesora de Investigación del CSIC**



**Fdo.: Dr. José Miguel Barea Navarro  
Profesor de Investigación del CSIC**

---

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), gracias a una beca predoctoral concedida por la Fundación Gran Mariscal Ayacucho.

---

*La grandeza del faro, no es su tamaño*

*Tampoco es la magnífica construcción de calicanto y barro*

*Menos aun las miles de caracolas y conchas marinas que decoran su base*

*Su verdadera belleza?*

*Esa luz que guía en la oscura noche, luciérnaga constante que contra viento y marea siempre esta allí...siempre.*

*Ustedes han sido ese faro, que con su optimismo me han dado ejemplo de constancia, nunca me dejaron de titilar. Humildemente les agradezco y solo pido al mar que tanto golpea el cimienta perimetral del muro, que nunca le derribe, que el oleaje en la mas fatal tormenta, siempre se acuerde, que mas noble que el sol y las gaviotas, ustedes como faro me acompañaron.*

*A todos aquellos que nunca dudaron de mí y en especial a ese ángel que como faro nunca nos abandonó.*

---

## AGRADECIMIENTOS

*Y por fin, empiezo a escribir la parte mas emotiva y mas dificil, tantas/os a quienes agradecer que casi escribo un libro mas, porque han sido muchas las situaciones donde nunca me faltó quien, para animarme y decir: ANIMO, TU PUEDES!*

*Al Dr. José Miguel Barea, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación para realizar esta tesis doctoral. Así como por su incansable búsqueda de proyectos y fondos para sacar adelante el grupo y sobretodo por buscar siempre un hueco para que las cosas salieran a tiempo.*

*A la Dra. Rosario Azcón, (Charo) por su contribución en el desarrollo de todo el trabajo, por su paciencia, por darme la confianza que necesitaba para saber que tarde o temprano todo saldría adelante, y sobre todo por haberme enseñado de una forma indirecta los verdaderos valores de la vida, en especial porque he aprendido que se puede hacer Ciencia sin dejar de ser madre.*

*A la Dra. Conchi Azcón, por las críticas constructivas en nuestras investigaciones, ejemplo de disciplina y amor al trabajo.*

*Paqui y JuanMa, porque en el mundo deberían existir muchos como ustedes, sin vuestra ayuda y paciencia no estuviéramos leyendo estos agradecimientos, porque siempre existió para mi, una palabra y un consejo a tiempo. Gracias, siempre les recordaré con mucho cariño, lo mejor para ustedes porque se lo merecen.*

*Al Dr. Juan Luis Ramos, y su grupo por el asesoramiento y haberme prestado toda la ayuda que he necesitado y por haberme acogido muchas veces como una becaria mas del grupo.*

*A todo el Departamento de Microbiología de Suelo y Sistemas Simbióticos, al Dr. Juan Antonio Ocampo y su grupo (Julia, Pepe, Inma, Cesar, Inma2, Mohamed), al grupo de Rhizobium, a Don José Olivares por interesarse siempre por mi, al Dr. Juan Sanjuán, a Julio, Soco (por nuestras charlas de madres en los pasillos, porque siempre te has preocupado por mi salud y saber como voy, gracias), Quina (por estar siempre a tiempo sin importarte nada, por cada palabra de ánimo especialmente en estos últimos meses, ohhhh (ss), suerte chiqui!!), Mjosé, Dani, Rebeca, Ana, Juan; al Dr. Eulogio Bedmar y Maria Angeles, por cada palabra de ánimo al vernos, Maria Jesús, Maria José y José. Al grupo del Dr. Nicolás Toro, en especial a José Ignacio, por nuestras charlas de fútbol todos los lunes y Antonio, por el ánimo en estas ultimas semanas. Pero sobretodo, a todos mis compañeros del Grupo de Micorrizas: Nuria, Bert, Manolo, Rut, Alejandro, Agustín, Sonia, Chon, Pili, Rosita: porque sois muy especiales para subirme la moral todos los días. Custi por estar siempre en especial el apoyo incondicional que me diste aquel 27 de junio, siempre te recordaré y lo mejor para ti.*

---

A los chicos del Lab. 03: los de la vieja y nueva generación: Mary Pepa (por cuidarme tanto y por los consejitos de abuelita en el invernadero), Estefi, Gilberto, Maria Luisa, German, Sonia (por hacer tantas veces de abuelita) y Javi. Por que siempre quedará el buen sabor del té de los viejos tiempos, por soportar mis berrinches de todos los días y POR TODO, siempre seguirá siendo mi Labo. Maryam y MariPo, hermanitas mayores en el mundo de las micorrizas, por los gratos momentos que compartimos, en especial los días en Ciudad Real y la pandorga. Nicolay y Maria, por tantos consejos que me habéis dado.

A los nenes de la tercera: Pablo (porque has llegado a tiempo y ayudarme tanto con la Estadística), Adri (ayuda tan deseada y que por fin vino a materializarse en ti, por los días de terror que compartimos con tanto trabajo, por estar siempre para escuchar), Ceci y Claudia por soportar mis canciones, en especial: el Chachi chuli guay piruli!, a Carlitos por nuestras discusiones de siempre, pero también por tu buena disposición cada vez que te necesitaba. Mayra y Anita, por no importar nada con tal de ayudarme, por los consejos y charlas que siempre quedarán, espero que volvamos a coincidir por mas tiempo, ha sido muy lindo conocerles.

Dianita y Juan Haro, por vuestra ayuda al final, suerte con todo, chikis!!! Y gracias.

Estefi por compartir ese 24/02/01, por el amor que nos has dado en especial al Migue desde la barriguita, te acuerdas?. Cory, porque no solo nos ha unido la mala pata desde hace 4 años, sino por todos los momentos buenos y no buenos que siempre compartimos, por nuestras charlas, y por el mail de todos los días, gracias Chiki, suerte que eres la mejor!!. A Lázaro, por la gran calidad humana, por todos los momentos que compartimos y especialmente porque siempre me hacías reír (y lo sigues haciendo por vía internet!!!),

Almu, Emilio y Celia, por estar siempre, por animarme en los bajones, porque aun lejos de Granada siempre estuvisteis, por cuidarnos tanto y tener siempre un detalle para Migue y para mi cuando mas hacía falta, Gracias!...EEEEHHHH QUE YA ESTAIS LEYENDO MIS AGRADECIMIENTOS!

A Carmelita, Ma Angustias, Angelines y Vicky, por los buenos días, todos los días, y por el amor que siempre me habéis brindado en estos cuatro años. Por fin, la peque lee su tesis!!!!

Rogelio, Espe, Manolo, Celini, Raque, María: por acordarse siempre de mi cafelillo, por los consejos, por preocuparse tanto y por todo. Gracias es poco.

Lolita, Arancha y Maryam Saharawi, por ser tan buenas amigas, por los cafelitos, pero especialmente por las veces que conté con ustedes.

Raque y Raúl, amigos incondicionales, por el entrenamiento de papis que habéis hecho esta semana, por querer tanto a mi bichito, porque nunca existió un "no puedo" de vuestra parte, para las muchas veces que les necesité. David, Mary Carmen por tanto!!! que ya no lo recuerdo.

---

*Silvia Marquez, Mari Trini, Abraham, Antonio y Chechu (ex vecinos), Maria, Carlota, Patri, Raul, Juande, Manuel, Iñiqui, Javi, Cesar, la Shica, Maribel Ramos, Manolo Espinoza, Javi, Jesús, Inma Peralta, Jose, Peter, Amparo, Maychu, Jesús, Carmen, Lourdes, Laura, Paqui Ruano, Estefi, Luisa, Cynthia, Licy, German, Manolo (compras), Jaime, Carlos y Emi, Pedro, Ricardo, Antonio, Adela, Enrique Barahona, Matilde Barón, Edu Molina, Silvia, Carlos, Alzena, Ana C, porque siempre me habéis demostrado el mucho aprecio que me tienen, por cada palabra de confianza y ánimo, gracias.*

*A Antonio, porque sin tu apoyo hace 5 años, no estuviera aquí, por todo lo que habéis sacrificado por Migue y por mi, y especialmente por cambiarme tanto para bien. A mi gordi: lo mejor que me ha pasado, por entenderme desde el vientre, por ser mi amiguito y el motorcito para seguir adelante. Gracias Migue por existir, por ese beso y abrazo que tanto me llena la vida, te agradezco también lo mucho que me has cambiado y espero que podamos recuperar nuestro tiempo.*

*A Emi, Ana, Encarna grande, Encarna chica, Mary, Maryam grande y Maryam chica, Luisa, por el amor con que nos habéis tratado, por hacer muchas veces de madres, titas, abuelas y sobretodo de amigas con quien compartir al final de la tarde. Por las muchas veces que le recibisteis estando mal, por todo, por enseñarme a hacer mamá.*

*Jaber, Sonia, Maryam, Kika, Pepe y Cristina, por hacerme sentir una hija y hermana mas, gracias por todo lo que han hecho por nosotros.*

*A la meño, (madre y amiga), a mis hermanos y a toda mi familia, porque siempre les he sentido tan cerca, porque nunca perdisteis la confianza en mi, por quererme como soy, por ese REENCUENTRO que ya llega, gracias son lo mejor del mundo.*

*Al cambio de milenio*

<b>I. Introducción .....</b>	<b>3</b>
1. INTERÉS DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.....	3
2. REVISIÓN DE LOS ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	9
2.1. Conceptos genrales sobre "calidad del suelo" .....	9
2.2. Concepto y significado de la rizosfera.....	10
2.3. Principales grupos de microorganismos rizosféricos, su significado y modo de acción .....	12
2.4. Rizobacterias beneficiosas para el sistema suelo-planta (PGPR) .....	14
2.4.1. <i>Conceptos generales sobre microorganismos saprofitos</i> <i>beneficiosos</i> .....	14
2.4.2. <i>Modo de acción de las PGPR en control biológico de patógenos</i> .....	16
2.4.3. <i>Modo de acción de las PGPR en promoción directa de</i> <i>crecimiento</i> .....	17
2.5. <b>Micorrizas Arbusculares (AM)</b> .....	19
2.5.1 <i>Conceptos generales sobre micorrizas</i> .....	19
2.5.2. <i>Taxonomía de los hongos MA</i> .....	21
2.5.3 <i>Formación y Morfología de las MA</i> .....	21
Precolonización.....	22
Desarrollo de unidades de colonización.....	23
Crecimiento del hongo en el suelo .....	24
2.5.4. <i>Efecto de las MA sobre el desarrollo de las plantas</i> .....	24
Incremento en el aporte de nutrientes a las plantas.....	25
Aprovechamiento de recursos hídricos y respuesta la salinidad....	27
Presencia de metales pesados .....	27
Mejora en la estructura del suelo, participando en la formación de agregados estables.....	27
Cambios en el estado fisiológico y hormonal de la planta.....	28
Cambios en la diversidad de las comunidades de planta y la sucesión vegetal.....	28
Control biológico de patógenos.....	29
2.6. <b>Aspectos generales de interacción hongos MA-PGPR</b> .....	30
2.7. <b>Microorganismos y degradación del suelo en condiciones</b> <b>de aridez</b> .....	30
2.7.1 <i>Conceptos generales</i> .....	32
2.8. <b>Estrés osmótico PGPR y MA</b> .....	33
2.8.1. <i>Impacto del estrés osmótico sobre los microorganismos del suelo</i> ...	32
2.8.2. <i>Impacto del estrés osmótico sobre las PGPR y MA</i> .....	33
2.9. <b>Microorganismos y contaminación por metales pesados</b> .....	34
2.9. 1. <i>Conceptos generales</i> .....	34
2.9.2. <i>Absorción de metales pesados por las plantas</i> .....	35



2.10. Metales pesados, PGPR y MA.....	37
2.10.1. Desarrollo de los hongos MA y de la simbiosis en suelos contaminados por metales pesados.....	37
2.10.2. Adaptación de los hongos MA y de la simbiosis en suelos contaminados por metales pesados.....	38
2.10.3. Absorción de metales pesados y su transporte en plantas micorrizadas.....	39
2.10.4. Mecanismos de tolerancia de los hongos MA a metales pesados .....	40
2.10.5. Significado y potencialidad de los hongos MA en fitoremediación..	41
2.10.6. Efectos de los metales pesados sobre los microorganismos del suelo (incluyendo PGPR) .....	42
Aspectos generales.....	42
Mecanismos de desintoxicación de metales pesados por PGPR.....	43
Potencialidad del uso conjunto de hongos AM y bacterias en fitoremediación.....	44
<b>II. Plan de trabajo.....</b>	<b>47</b>
<b>III. Materiales y Métodos .....</b>	<b>51</b>
1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELOS EMPLEADOS .....	51
2. AISLAMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE SUELO RIZOSFÉRICO.....	51
3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS BACTERIANOS.....	51
3.1. Amplificación del ADNr 16S .....	52
3.2. Clonado del ADNr 16S.....	52
3.3. Transformación de células competentes .....	52
3.4. Secuenciación de ADN.....	53
3.5. Análisis de las secuencias de ADN.....	53
4. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) EN MEDIO DE CULTIVO.....	53
5. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE BACTERIAS.....	54
5.1. Determinación de prolina.....	54
5.2. Determinación de glutamato.....	55
5.3. Determinación de proteínas .....	55
6. OBTENCIÓN DE ESPORAS Y ESPOROCARPOS DE HONGOS MA MEDIANTE LA TÉCNICA DEL TAMIZADO HÚMEDO Y DECANTACIÓN .....	56
7. IDENTIFICACIÓN DE ESPORAS DE HONGOS MA.....	56

8. PRODUCCIÓN DE INÓCULOS PUROS DE HONGOS MICORRÍCICOS .....	57
9. ESTERILIZACIÓN DE ESPORAS DE HONGOS MA.....	57
9.1. Medio para cultivo "in vitro" de esporas MA .....	57
9.2. Germinación de esporas de hongos MA .....	58
9.3. Desarrollo del micelio de hongos MA .....	58
9.4. Análisis estadístico de los resultados .....	59
10. CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN .....	59
10.1. Tinción de raíces .....	59
10.1.1. Tinción con Azul de Tripán (TB).....	59
10.1.2. Tinción vital de la succinato deshidrogenasa (SDH).....	59
10.1.3. Tinción vital de la fosfatasa alcalina (ALP) .....	60
11. LONGITUD DE MICELIO EXTRARADICAL.....	60
12. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN SUELO... 61	
12.1. Deshidrogenasa (García et al., 1997).....	62
12.2. Fosfatasa (Nannipieri et al., 1982) .....	62
12.3. $\beta$ -glucosidasa (Hayano & Tubaki, 1985).....	62
13. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS.....	63
14. GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS .....	63
15. INOCULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	63
15.1. Inoculación de micorrizas .....	63
15.2. Inoculación de bacterias .....	64
16. ENSAYOS DE INOCULACION DE PLANTAS.....	64
16.1. Ensayos en microcosmos bajo condiciones controladas.....	64
16.2. Análisis estadísticos de los resultados.....	64
<b>IV. Interacción MA-rizobacterias en ecosistemas típicos de la cuenca mediterránea .....</b>	<b>67</b>
1. ENSAYOS EN SUELO PROCEDENTE DEL PARQUE NATURAL "SIERRA DE BAZA" (PROVINCIA DE GRANADA) .....	67
1.1. Aislamiento de Hongos MA y PGPR del suelo objeto de estudio (Granada) .....	67
1.2. Selección de Hongos MA y PGPR más efectivos de los aislados en el suelo objeto de estudio (Granada) .....	67
1.2.1. Planta hospedadora y aplicación de los tratamientos biológicos .....	67
1.2.2. Ensayos de invernadero: Características del suelo y condiciones experimentales .....	68
1.2.3. Objetivo .....	68
1.2.4. Diseño Experimental .....	68
1.2.5. Resultados.....	68

1.3. Evaluación de la concentración óptima del inóculo bacteriano (aislado 4) PGPR por sus efectos sobre la formación y respuesta de las plantas a la simbiosis MA ( <i>Glomus mosseae</i> autóctono) .....	71
1.3.1. <i>Objetivo</i> .....	71
1.3.2. <i>Diseño Experimental</i> .....	71
1.3.3. <i>Resultados</i> .....	71
1.4. Identificación de los aislados bacterianos autóctonos (Sierra de Baza, Granada) más eficientes, mediante clonado y secuenciación del ADN ribosómico 16S.....	74
1.5. Efectos de PGPRs (2 razas de <i>Bacillus endophyticus</i> autóctonos, Granada) y hongo MA autóctono, <i>Glomus mosseae</i> , sobre el crecimiento de una planta representativa de la sucesión natural ( <i>Retama sphaerocarpa</i> ), en suelo natural provisto de su microbiota habitual .....	74
1.5.1. <i>Planta hospedadora y aplicación de los tratamientos biológicos</i> .....	74
1.5.2. <i>Objetivo</i> .....	74
1.5.3. <i>Diseño Experimental</i> .....	74
1.5.4. <i>Resultados</i> .....	75
1.6. Efectos de la bacteria PGPR <i>B. endophyticus</i> (raza 2) y el hongo MA <i>G. intraradices</i> ambos autóctonos (Granada) seleccionados, sobre el crecimiento de una planta representativa de la sucesión natural ( <i>Genista umbellata</i> ), en suelo natural (Granada) provisto de su microbiota habitual, a diferentes niveles hídricos.....	77
1.6.1. <i>Objetivo</i> .....	77
1.6.2. <i>Diseño Experimental</i> .....	77
1.6.3. <i>Resultados</i> .....	77
2. ENSAYOS CON SUELO PROCEDENTE DE LA PROVINCIA DE ALICANTE.....	79
2.1. Aislamiento de Hongos MA y PGPR del suelo objeto de estudio (Alicante) .....	79
2.2. Selección de Hongos MA y PGPR aislados en el suelo objeto de estudio (Alicante) .....	79
2.2.1. <i>Planta hospedadora y aplicación de los tratamientos biológicos</i> .....	79
2.2.2. <i>Ensayos de invernadero: Características del suelo y condiciones experimentales</i> .....	80
2.2.3. <i>Objetivo</i> .....	80
2.2.4. <i>Diseño Experimental</i> .....	80
2.2.5. <i>Resultados</i> .....	80

<b>2.3. Evaluación de la concentración óptima de los inóculos PGPR seleccionados, por sus efectos sobre la formación y la respuesta de las plantas a las MA (<i>G. occultum</i>, autóctono, Alicante).....</b>	<b>83</b>
2.3.1. <i>Objetivo</i> .....	83
2.3.2. <i>Diseño Experimental</i> .....	83
2.3.3. <i>Resultados</i> .....	84
<b>2.4. Identificación de los aislados bacterianos autóctonos (Alicante) más eficientes, mediante la secuenciación del ADN ribosómico 16S.....</b>	<b>87</b>
<b>2.5. Interacción de 6 <i>Bacillus</i> spp. y <i>G. occultum</i> (autéctonos) sobre el crecimiento de una planta representativa de la sucesión natural (<i>Medicago arbórea</i>), en suelo natural provisto de su microbiota habitual.....</b>	<b>88</b>
2.5.1. <i>Planta hospedadora y aplicación de los tratamientos biológicos</i> .....	88
2.5.2. <i>Objetivo</i> .....	88
2.5.3. <i>Diseño Experimental</i> .....	88
2.5.5. <i>Resultados</i> .....	88
<b>2.6. Interacción de la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i>(autéctono, seleccionada como la mas efectiva) y diferentes Hongos MA autóctonos: <i>G. mosseae</i>, <i>G. occultum</i> y <i>G. constrictum</i>, sobre el crecimiento, nutrición y características de la micorrización en una planta representativa de la sucesión natural (<i>Medicago arbórea</i>), en suelo natural provisto de su microbiota habitual .....</b>	<b>91</b>
2.6.1. <i>Planta hospedadora y aplicación de los tratamientos biológicos</i> .....	91
2.6.2. <i>Objetivo</i> .....	91
2.6.3. <i>Diseño Experimental</i> .....	92
2.6.6. <i>Resultados</i> .....	92
<b>2.7. Efecto de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Ballester) sobre aspectos fisiológicos de la planta y las actividades metabólicas (SDH y ALP-asa) de la colonización micorrícica desarrollada por 2 hongos de colección: [<i>G. mosseae</i> (BEG 122) y <i>G. intraradices</i> (BEG 121)]: Ensayo en sustrato inerte .....</b>	<b>95</b>
2.7.1. <i>Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos</i> .....	95
2.7.2. <i>Condiciones experimentales</i> .....	96
2.7.3. <i>Objetivo</i> .....	97
2.7.4. <i>Diseño experimental</i> .....	97
2.7.5. <i>Resultados</i> .....	97

3	EFFECTOS DEL ESTRÉS HÍDRICO Ó SALINO "IN VITRO" SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS: FITOHORMONAS (ACIDO INDOL ACÉTICO) Y SOLUTOS COMPATIBLES (PROLINA Y GLUTAMATO) POR LOS AISLADOS BACTERIANOS SELECCIONADOS (BAZA Y ALICANTE) .....	103
3.1.	Objetivos .....	103
3.2.	Condiciones experimentales .....	103
3.3.	Resultados.....	104
V.	<b>Interacción hongos MA-rizobacterias en suelos contaminados</b> .....	<b>109</b>
1.	AISLAMIENTO DE HONGOS MA Y PGPR DE LOS SUELOS CONTAMINADOS CON Zn Ó Cd .....	111
2.	SELECCIÓN DE HONGOS MA Y BACTERIAS (PGPR) DE LOS SUELOS OBJETO DE ESTUDIO (HUNGRÍA) .....	111
2.1.	Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos .....	111
2.2.	Ensayos de invernadero: características del suelo y condiciones experimentales .....	112
2.3.	Objetivo .....	112
2.4.	Diseño experimental.....	112
2.5.	Efecto de la inoculación con aislados autóctonos en suelo contaminado con niveles de Cd.....	113
2.6.	Efecto de la inoculación con aislados autóctonos en suelo contaminado con niveles de Zn.....	118
3.	IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS BACTERIANOS AUTÓCTONOS MÁS EFICIENTES EN SUELOS CONTAMINADOS MEDIANTE CLONADO Y SECUENCIACIÓN DEL ADN RIBOSÓMICO 16S.....	122
4.	ESTUDIO DE LA TOLERANCIA "IN VITRO" AL Cd Y AL Zn DE LOS AISLADOS BACTERIANOS MÁS EFICIENTES EN SUELOS CONTAMINADOS (HUNGRÍA) .....	123
4.1.	Objetivo.....	123
4.2.	Condiciones experimentales.....	123
4.3.	Resultados.....	123
5.	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) POR <i>BREVIBACILLUS BREVIS</i> TOLERANTE AL CD Y <i>Brevibacillus brevis</i> TOLERANTE AL Zn .....	126
6.	EFFECTO DE LA INOCULACIÓN SIMPLE Y COMBINADA DE LOS AISLADOS AUTÓCTONOS DE <i>Brevibacillus brevis</i>	

(ADAPTADO A Cd Ó Zn) Y *G. MOSSEAE* (AUTÓCTONO) Ó  
*G. MOSSEAE* (BEG 119) SOBRE LA TOLERANCIA AL Cd Y AL Zn  
*DE TRIFOLIUM REPENS* .....126

6.1. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos ..... 126

6.2. Ensayos de invernadero: características del suelo y  
condiciones experimentales..... 127

6.3. Objetivo..... 127

6.4. Diseño experimental..... 127

6.5. Resultados del efecto de la inoculación de *Brevibacillus brevis*  
y dos *G. mosseae* (autóctono o de colección) en suelo  
contaminado con Cd ..... 128

6.6. Resultado del efecto de la inoculación de *Brevibacillus brevis*  
(adaptado) y dos *G. mosseae* (adaptado ó no) en suelo  
contaminado con Zn..... 131

7 EFECTO DE *BREVIBACILLUS BREVIS*. (ADAPTADO AL Cd) SOBRE  
LAS CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS (ACTIVIDADES SDH Y ALP)  
DE *G. MOSSEAE* (ADAPTADO AL Cd) O *G. MOSSEAE* (BEG 119) Y  
ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS RIZOSFÉRICAS EN SUELO  
CONTAMINADO CON Cd ..... 135

7.1. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos ..... 135

7.2. Características del suelo y condiciones experimentales..... 135

7.3. Objetivo..... 135

7.5. Determinaciones..... 136

7.6. Resultados..... 136

8. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DEL  
MICELIO GENERADO POR *G. MOSSEAE* (ECOTIPO AUTOCTONO Ó  
DE COLECCION) EN SUELO CONTAMINADO CON Zn Y EFECTO  
DE *BREVIBACILLUS BREVIS* SOBRE ESTE VALOR. RELACIÓN  
ENTRE VITALIDAD Y/O ACTIVIDAD DE LA COLONIZACIÓN  
INTRARADICAL ..... 142

8.1. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos ..... 142

8.2. Características del suelo y condiciones experimentales..... 142

8.3. Objetivo..... 142

8.4. Diseño experimental..... 143

8.5. Determinaciones..... 144

8.6. Resultados..... 145

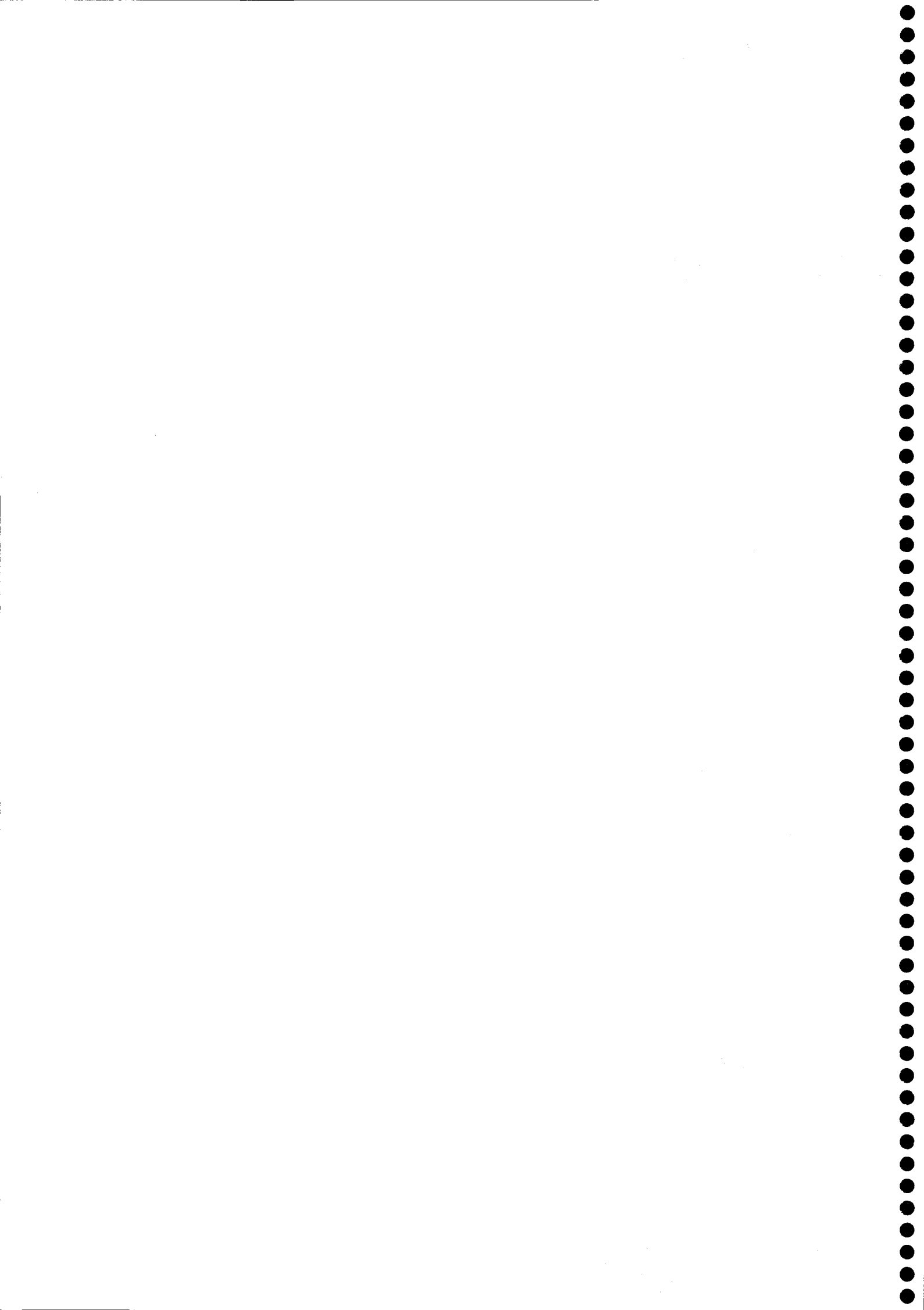
9. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD DE  
BIOACUMULACIÓN DE Cd Y Zn "IN VITRO" DE *BREVIBACILLUS*

<b>BREVIS (AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS POR ZN Ó CD) RESPECTO A UN <i>BREVIBACILLUS BREVIS</i> DE REFERENCIA.....</b>	<b>151</b>
9.1. Condiciones experimentales .....	151
9.2. Resultados .....	153
<b>10. EFECTO DE <i>BREVIBACILLUS BREVIS</i> SOBRE LA GERMINACIÓN "IN VITRO" DE ESPORAS Y DESARROLLO DEL MICELIO DE <i>G. MOSSEAE</i> (AUTOCTONO) .....</b>	<b>154</b>
10.1. Objetivo .....	154
10.2. Condiciones experimentales .....	155
10.3. Resultados .....	155
<b>VI. Discusión.....</b>	<b>161</b>
<b>VII. Conclusiones.....</b>	<b>179</b>
<b>VIII. Bibliografía .....</b>	<b>183</b>

---

## **I. Introducción**





## 1. INTERÉS DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

Tanto los sistemas agrícolas como los ecosistemas naturales pueden recibir el impacto negativo de actividades, procesos o productos diversos, que inciden en la productividad y calidad de las cosechas y/o en la estabilidad, diversidad y productividad de los ecosistemas. La desertificación y la contaminación por metales pesados son ejemplos significativos de procesos que llegan a provocar desajustes más o menos severos en los sistemas suelo-planta y que repercuten en la calidad medioambiental y/o en la producción de alimentos sanos. La desertificación (desertización con intervención humana) es un proceso complejo cuyo origen está ligado a unas condiciones de clima específicas, exacerbadas por actividades humanas mal controladas, que tiene una repercusión especial en el caso de los ecosistemas de la cuenca Mediterránea. La contaminación por metales pesados ocurre como consecuencia de actividades industriales o de manejo de agrosistemas mal reguladas, que causan daños ecológicos y económicos de gran importancia. La remediación de los daños que estos dos tipos de estrés causan a los sistemas suelo planta, ha sido objeto de varias investigaciones, pero sigue siendo un tema con muchos aspectos aun por resolver, por lo que son necesarios más estudios. La presente Tesis Doctoral trata de contribuir con sus investigaciones a elucidar algunos de esos aspectos.

Antes de precisar los **Objetivos del Trabajo** se hace una breve presentación de la temática y propuesta de investigación. Puesto que después, en este apartado (2), se lleva a cabo una **Revisión Bibliográfica** sobre el tema de estudio, en esta presentación del tema se evita premeditadamente el uso de referencias bibliográficas, para dar fluidez a la lectura de la misma.

La premisa de partida es proponer el uso de microorganismos beneficiosos para el sistema suelo-planta, como componentes de una estrategia de revegetación orientada a paliar las problemáticas desencadenadas por la desertificación y contaminación por metales pesados. Es bien conocido que determinados microorganismos ayudan a las plantas a establecerse y prosperar en las situaciones adversas que se trata de remediar, y la propuesta es investigar esa posibilidad para los casos concretos que aquí se presentan.

En efecto, en los sistemas suelo-planta viven poblaciones diversas de microorganismos beneficiosos que llevan a cabo diferentes acciones, fundamentales para la calidad del suelo y el desarrollo de las plantas, lo que ayuda a la sostenibilidad de los mismos. En este sentido, cabe destacar dos grupos de microorganismos: los hongos

formadores de micorrizas arbusculares (MA) y las rizobacterias promotoras del crecimiento, conocidas en la literatura científica por su acrónimo en inglés: PGPR (de Plant Growth Promoting Rhizobacteria), cuyos efectos beneficiosos en la recuperación de suelos se han puesto de manifiesto en diversos estudios. Los hongos MA forman dicha simbiosis con las raíces de la mayoría de las plantas, beneficiándose ambos (micro y macrosimbiontes) de tal asociación. La presencia del hongo en las raíces de la planta hace que esta mejore su capacidad para la adquisición de nutrientes a partir del suelo, así como su nivel de tolerancia a situaciones de estrés, mientras que el hongo heterótrofo se beneficia de los sustratos carbonados procedentes de la fotosíntesis y del nicho ecológico protegido que encuentra dentro de la raíz.

Las PGPRs desarrollan un amplio espectro de actividades, bien como antagonistas de microorganismos patógenos de plantas o bien como estimuladoras de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes; sea como fijadores de N<sub>2</sub> o como solubilizadores de P, o como mineralizadoras de la materia orgánica. Los efectos más apreciados de las PGPRs se basan en la producción de compuestos biológicamente activos tales como fitohormonas, sustancias quelantes, sideróforos, enzimas, vitaminas, antibióticos, etc.

Durante el proceso de desertificación, como es bien conocido, la degradación de la cubierta vegetal suele ir acompañada de la erosión del suelo. Sin embargo, es menos obvio, aunque ampliamente demostrado, que la erosión del suelo afecta a la microbiota que en él reside. Este fenómeno es de suma importancia ya que el funcionamiento y estabilidad de un sistema edáfico depende, en gran medida, de la actividad microbiana asociada a las raíces de las plantas, particularmente de los hongos MA y de las PGPRs, microorganismos que, a su vez, precisan de la presencia de la planta para desarrollarse, y cuyas funciones son críticas para el establecimiento y la promoción del crecimiento de las plantas, como se indicó anteriormente. La erosión de los sistemas suelo-planta no solo afecta al número y actividad de los propágulos microbianos, sino también a su diversidad, un factor clave en la fertilidad del suelo y en la estabilidad y funcionamiento de los ecosistemas naturales y de los agroecosistemas. Es obvio que cuando se pretenda reestablecer la diversidad de plantas en una comunidad degradada, mediante programas de revegetación, es preciso inocular las plantas con los microorganismos beneficiosos, que representen la diversidad del sistema. Así, cuando se restaura la biodiversidad, se reestablecen diversas y complejas interacciones entre el suelo, plantas y microorganismos que resultan beneficiosas para el binomio suelo-planta y, a su vez, para las poblaciones de microorganismos.

Con respecto a la contaminación por metales pesados, cuya concentración en el suelo puede incrementar de forma considerable como consecuencia de las actividades

humanas, es obvio el impacto negativo que estos metales pueden provocar en los agrosistemas o ecosistemas naturales. En efecto, dichos metales por su elevada toxicidad para los seres vivos, cuando están en exceso, y por su carácter acumulativo pueden causar problemas medioambientales muy graves. La mayor parte de los metales contaminantes se acumulan en la capa superior del suelo, integrándose en los complejos órganos-minerales, o bien quedan absorbidos a coloides del suelo, integrados en el complejo de cambio, o permanecen como iones libres en solución.

Los metales pesados constituyen un grupo de unos 50 elementos. La toxicidad de los metales en el suelo va a depender de su biodisponibilidad, definida como la capacidad de ser transferido desde el suelo a un organismo viviente, estado que no solo depende de la concentración total del metal sino también de factores físico-químicos (pH, materia orgánica, contenido de arcillas; potencial redox, presencia de fosfatos y carbonatos, etc.) y biológicos (bioabsorción, bioacumulación y solubilización).

La presencia de metales pesados en suelos a concentraciones elevadas actúa como agente selectivo de la actividad biológica, que da lugar a poblaciones resistentes a estos elementos, si bien con una baja diversidad de especies. Por ello, es interesante estudiar la capacidad de tolerancia de los microorganismos a los metales en el suelo no solo como modelos de estudio para conocer los mecanismos de adaptación de los organismos vivientes a condiciones extremas del medio ambiente, sino también porque se ha sugerido que los microorganismos resistentes puedan ser utilizados para reducir la contaminación originada por el exceso de metales pesados. Es por ello que el potencial de algunos microorganismos para paliar el poder tóxico de metales pesados del suelo ha atraído el interés de los investigadores para tratar de aplicar el fenómeno de resistencia microbiana como herramienta de remediación. Precisamente, se acuñó el término "bioremediación" para referirse a las técnicas de remediación que utilizan seres vivos para paliar los problemas de la contaminación. Existen variantes de la bioremediación, como es la "fitoremediación", basada en el uso de plantas para descontaminar. La fitoextracción y la fitoestabilización son modalidades de la fitoremediación. La fitoextracción utiliza plantas como acumuladores de metales. La fitoestabilización consiste en promover el crecimiento vegetal para reducir la disponibilidad de los metales, disminuir la erosión producida por el viento y el agua, y mejorar la calidad del suelo evitando así la filtración de metales. Dado el efecto beneficioso de las micorrizas sobre el desarrollo de las plantas, se pensó en utilizar hongos MA como un componente del sistema de fitoremediación, pensando como un potencial incrementando la capacidad de tolerancia de la planta a los metales pesados, como una mera mejora de la nutrición

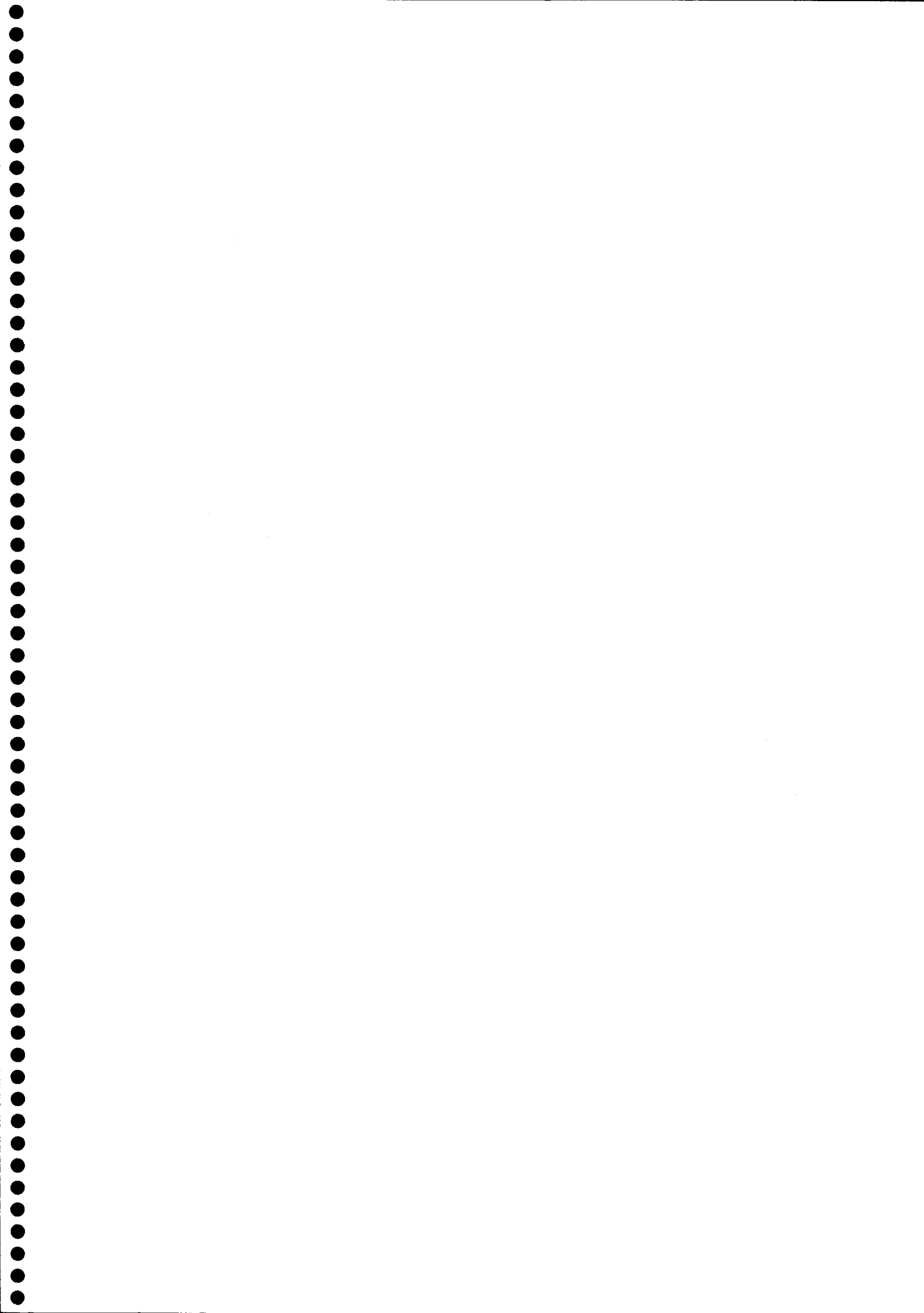
vegetal, y en consecuencia del desarrollo de las plantas, ya que normalmente los suelos contaminados son muy pobres en nutrientes.

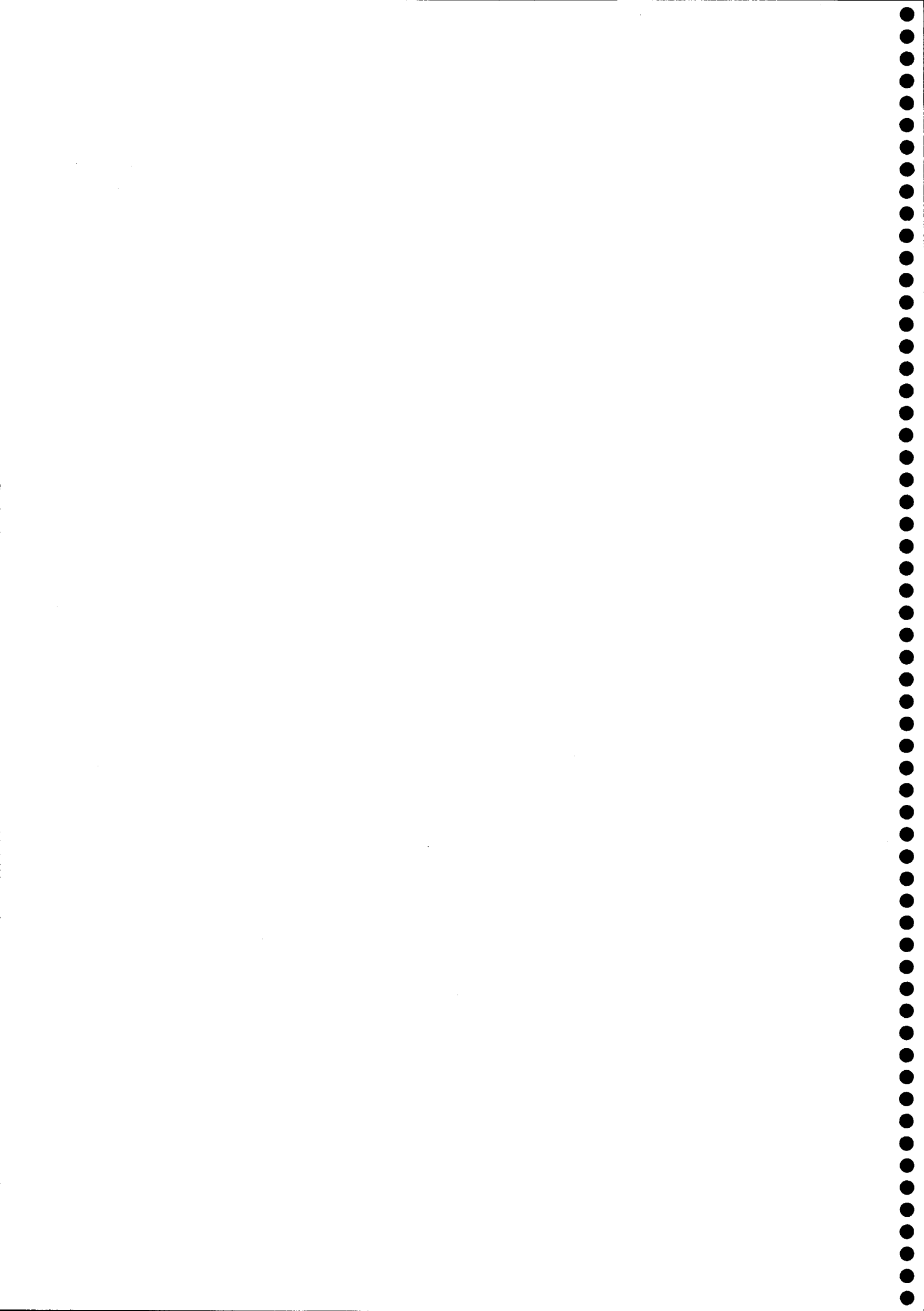
El uso de MA o PGPR como componentes de la fitoremediación es un tema de investigación abierto, en virtud de los resultados contradictorios hasta ahora obtenidos, sin que se disponga información sobre el uso conjunto e interactivo de MA y PGPR.

De acuerdo con las premisas anteriores se propuso la presente Tesis Doctoral cuyo **Objetivo General** fue: *Estudiar la interacción de hongos MA y PGPRs como una posible herramienta biotecnológica que permita a la planta mejorar su capacidad de resistencia frente a dos tipos de estreses abióticos: la sequía, factor relacionado con la desertificación, y la contaminación por metales pesados.* Para llevar a cabo este estudio se eligieron como base de investigación suelos procedentes de tres localidades: (a) el Parque Natural "Sierra de Baza", situado en el extremo nororiental de la provincia de Granada; (b) determinadas áreas de la provincia de Alicante. Ambos suelos como modelos en el caso de áreas degradadas por desertificación; y (c) suelo de una parcela experimental contaminada artificialmente ubicada en Nagyhörcsök (Hungría), a la que se le aplicaron en 1991 diferentes metales pesados entre ellos cadmio y cinc, a diferentes concentraciones, con fines de investigación.

Los **Objetivos específicos** del presente estudio fueron:

- Aislar y caracterizar hongos MA y PGPRs de los suelos objeto de estudio, y seleccionarlos en base a su capacidad de resistencia a estrés inducido por metales pesados o hídrico, característicos de los suelos objeto de estudio.
- Estudiar las interacciones PGPR-hongo MA, tanto en relación al establecimiento de ambos microorganismos en la rizosfera como en lo relativo a la protección de las plantas en las situaciones de estrés objeto de estudio.
- Investigar los mecanismos ecofisiológicos y bioquímicos implicados tanto en la adaptación de las PGPRs al estrés como en el efecto de éstas sobre el funcionalismo de la micorriza.





## 2. REVISIÓN DE LOS ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

De acuerdo con lo que antecede, se analizan los antecedentes bibliográficos de la problemática de estudio, objeto de esta Tesis Doctoral. Para ello, la información disponible, se sistematiza de la siguiente forma:

1. Conceptos generales sobre "calidad del suelo".
2. La rizosfera.
3. Principales grupos de microorganismos rizosféricos, su significado y modo de acción.
4. Rizobacterias beneficiosas para el sistema suelo planta (PGPRs).
5. Micorrizas Arbusculares (MA).
6. Interacción PGPRs-hongos MA.
7. Microorganismos y degradación del suelo en condiciones de aridez.
8. Estrés osmótico, PGPRs y hongos MA.
9. Microorganismos y contaminación por metales pesados.
10. Metales pesados, PGPRs y hongos MA.

Es obvio que esos diversos aspectos se van a tratar con un nivel muy diferente de intensidad, tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo.

### 2.1. Conceptos generales sobre "calidad del suelo"

La estabilidad y productividad tanto de los ecosistemas naturales como de los sistemas agrícolas depende en gran medida de lo que se conoce como "calidad del suelo", factor importante para la sostenibilidad de los sistemas suelo-planta (Altieri, 1994). Un aspecto a tener en cuenta es que la calidad de suelo es fundamental no solo para producir plantas sanas o para lograr la auto-sostenibilidad de los ecosistemas, sino también para resistir la erosión y minimizar los impactos medio-ambientales adversos, como pueden ser la sequía y la contaminación por metales pesados. Se sabe que la calidad del suelo está determinada por diversos factores de índole física, química y biológica, y de las interacciones entre ellos. Por tanto, para el manejo adecuado de los sistemas suelo-planta es crítico conocer como los componentes físico-químicos y biológicos del suelo funcionan e interactúan (Kennedy & Smith, 1995)



En los últimos tiempos se están acumulando evidencias experimentales que demuestran que el mantenimiento de comunidades microbianas activas y diversas es fundamental para propiciar y mantener la calidad del suelo (Kennedy & Smith, 1995; Barea, 1997). Las actividades microbianas son particularmente relevantes en las interfaces que ocurren entre suelo y raíces de las plantas, conocidas como rizosfera, donde microorganismos, raíces y componentes del suelo interactúan (Lynch, 1990; Kennedy, 1998; Werner *et al.*, 2002, 1998; Bowen & Rovira, 1999; Palomino, 2003).

## 2.2. Concepto y significado de la rizosfera

La población de microorganismos del suelo está en un equilibrio inestable. Cuando se introduce una planta, ésta suministra sustratos energéticos al suelo y la situación de los microorganismos cambia drásticamente, además la raíz constituye un sistema dinámico donde la formación de nuevas raíces y la muerte y descomposición de otras viejas ocurre de manera continua. A principios del siglo XX, Hiltner introdujo el término rizosfera para describir la zona del suelo influenciada por el desarrollo de las raíces, las cuales inducen la proliferación de microorganismos. Las actividades metabólicas de tales poblaciones estimuladas en la rizosfera tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, son de vital importancia para el desarrollo de las plantas (Barea & Azcón-Aguilar, 1982). El incremento de actividad microbiana en la rizosfera, ejercido por el suministro de compuestos orgánicos que aportan los exudados radicales y otros materiales, en general residuos vegetales o microbianos, recibe el nombre de efecto rizosférico.

La rizosfera constituye un microcosmos donde proliferan los microorganismos estimulados por el denominado efecto rizosférico. Generalmente se acepta que la causa primaria de este efecto rizosférico es la presencia de compuestos solubles e insolubles liberados (exudados) por células vivas o muertas de la raíz que son sustrato para la microbiota. También constituirán sustrato para los microorganismos los detritus, mucílagos, lisados y secreciones. Dentro de los exudados radicales se encuentran compuestos difusibles solubles en agua, y otros volátiles, así como compuestos no difusibles. De todos ellos los que parecen más importantes desde el punto de vista funcional son los exudados solubles, pero las sustancias volátiles pueden ejercer la función de mensajeros, al ser capaz de moverse en considerables distancias (varios centímetros en el suelo), y más rápidamente de lo que lo hacen los compuestos solubles en agua. Esto es de gran importancia ya que los microorganismos pueden ser estimulados por señales de la planta lejos de la superficie radical. Tanto el sistema radical de la planta como el suelo rizosférico a él asociado constituyen una zona de intensos

cambios y actividades y va a ser en esta zona donde ocurra la mayor parte de ciclado de nutrientes en suelo (Kennedy, 1998; Bowen & Rovira, 1999).

En la rizosfera existe una considerable densidad poblacional de microorganismos, pudiendo alcanzar valores superiores a  $10^9$  células por  $\text{cm}^3$ , dando los valores máximos por lo general en la rizoplana o superficie radical, existiendo un gradiente poblacional de pendiente regular que se extiende a unos pocos milímetros de la raíz, llegando a densidades del orden de 10-100 veces inferiores a la encontrada en la rizosfera. Por lo general entre un 7-15% de la rizoplana esta cubierta por microorganismos (Weller & Thomasshow, 1994; Kennedy, 1998), los cuales se encuentran agrupados en microcolonias en sitios donde los nutrientes son más abundantes. Esta proporción puede ser modificada en el caso de raíces por asociaciones simbióticas tales como las micorrizas.

Las actividades que llevan a cabo los microorganismos en la rizosfera son extremadamente diversas e importantes, como después se comenta. En este momento, y enlazando con el apartado anterior: calidad del suelo, se introducen unos conceptos-resumen de ciertas actividades que tienen lugar en la rizosfera y que globalmente se conocen por "actividades enzimáticas". En efecto, en los microhábitats rizosféricos ocurren diversos procesos controlados por determinadas enzimas. El estudio de diferentes actividades enzimáticas del suelo rizosférico ha sido utilizado para la diagnosis y el seguimiento de procesos que causan algún tipo de perturbación en el suelo, así como para la predicción del éxito en la recuperación de un suelo alterado (Dick & Tabatabai, 1993). Concretamente, se han investigado los cambios en las actividades enzimáticas del suelo provocados por la acumulación de metales pesados, pesticidas y otros productos químicos industriales o agrícolas (Maccari *et al.*, 1994). La determinación de determinadas actividades enzimáticas, junto con el uso de parámetros agroquímicos tradicionales, parece ser uno de los mejores métodos para evaluar el estado de actividad microbiana del suelo y para comprender la respuesta del mismo a diferentes prácticas de cultivo, enmiendas orgánicas o cambios ambientales (Nannipieri *et al.*, 1990).

Es evidente que el análisis de actividades enzimáticas concretas no refleja el nivel de actividad microbiológica del suelo, ya que las enzimas son específicas de un determinado sustrato y están relacionadas con determinadas reacciones. Por tanto, la medida simultánea de varias actividades enzimáticas en el suelo puede ser mucho más válido que la determinación de una sola actividad para estimar la actividad microbiológica total del mismo y dinámica de nutrientes, así como la respuesta a prácticas de cultivo, estrés ambiental y cambios en las condiciones climáticas (Nannipieri *et al.*, 1990).

En este sentido, Ceccanti *et al.*, (1994), proponen el uso de una oxido-reductasa (deshidrogenasa) y de una serie de hidrolasas (proteasa, fosfatasa,  $\beta$ -glucosidasa) para

evaluar los efectos de diferentes prácticas de cultivo (agricultura intensiva o periodos de barbecho). Los resultados del estudio de este grupo enzimático se relacionaron con diferentes propiedades del suelo: nivel de fertilidad biológica en el suelo, transformación metabólica de macrocompuestos en compuestos minerales simples y presencia de nutrientes disponibles para la planta.

### **2.3. Principales grupos de microorganismos rizosféricos, su significado y modo de acción**

Aunque entre los componentes microbianos del suelo hay que considerar bacterias, hongos, algas, nemátodos, protozoos y virus, la inmensa mayoría de los estudios sobre microbios del suelo se refieren, principalmente, a hongos y bacterias (Lynch, 1990; Kennedy, 1998; Bowen & Rovira, 1999).

Desde el punto de vista de sus relaciones con la planta, los microorganismos del suelo se dividen en tres grandes grupos (Barea & Azcón-Aguilar, 1982):

- Saprofitos, que utilizan compuestos orgánicos procedentes de residuos animales, vegetales o microbianos.
- Simbiontes parasíticos o patógenos, causantes de enfermedades en plantas.
- Simbiontes mutualistas o simplemente simbiontes, como se les denomina en la literatura científica, los cuales benefician el desarrollo y nutrición vegetal.

En resumen, las acciones que desarrollan los microorganismos en la rizosfera son muy diversas, y serán tratadas en más detalle al hablar de las funciones propias de hongos MA y de PGPRs. Sin embargo, se adelanta una breve síntesis de la información disponible de aquellas actividades que resultan beneficiosos en los sistemas suelo-planta, que pueden concretarse en las siguientes:

- *Estimulación de la germinación de las semillas y del enraizamiento.* Las comunidades microbianas de los suelos, especialmente las de la rizosfera, producen una amplia variedad de metabolitos, entre los que se encuentran fitohormonas que pueden afectar directa o indirectamente al crecimiento de las plantas (fitoestimuladores).
- *Incremento en el suministro/disponibilidad de nutrientes.* Este efecto deriva del protagonismo de los microorganismos (biofertilizantes) en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes.
- *Mejora de la estructura del suelo.* Consecuencia de la contribución microbiana en la formación de agregados estables (mejoradores de agroecosistemas).

- *Protección de la planta frente a estreses bióticos y abióticos.* Actividad microbiana que emana de fenómenos de antagonismo microbio-microbio (agentes de control biológico de patógenos) o de eliminación de productos xenobióticos (biorremediadores) o incremento de la resistencia/tolerancia a salinidad, sequía (mejoradores eco fisiológicos).
- *Benefician el desarrollo y la productividad vegetal.* Efecto consecuencia global de los anteriores.

La presente memoria se va a centrar, de forma directa, en el estudio de dos grupos de microorganismos beneficiosos: las rizobacterias promotoras del crecimiento y los hongos que forman micorrizas arbusculares. De forma indirecta, dado que se van a usar leguminosas, este estudio también incluye la aplicación de bacterias que colectivamente se conocen como *Rhizobium*. Aunque más adelante se profundiza en los conceptos y funciones de hongos micorrícicos y rizobacterias saprofitas, se adelanta un resumen de las principales actividades de dichos hongos y bacterias.

Las bacterias rizosféricas saprofitas, conocidas en la literatura científica (Kloepper, 1992; Glick, 1995) con el acrónimo PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria), desempeñan funciones importantes para la planta: control biológico de patógenos, solubilización de elementos minerales (en general), movilización de fosfatos (en particular), fijación de nitrógeno, o fitoestimulación, al facilitar la emergencia o el enraizamiento. El atributo de rizobacteria refiere la capacidad de dichos microorganismos para colonizar extensamente las interfases suelo-raíz, donde mantienen poblaciones de individuos a un nivel que permite su efectividad (Kloepper *et al.*, 1991; Linderman, 1992).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) y las bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> son los componentes más destacados entre los simbioses mutualistas.

Los hongos MA, una vez que colonizan de forma biotrófica la corteza de la raíz, desarrollan un micelio externo que la conecta con los microhábitats del suelo tanto rizosférico como, fundamentalmente, el no-rizosférico (Barea, 1991), lo que les permite desarrollar actividades tales como ciclado de nutrientes (P y N fundamentalmente), protección frente a estreses bióticos y abióticos, conservación del suelo (formación de agregados), establecimiento de plántulas, reguladores de la sucesión vegetal, etc.

Las bacterias simbióticas fijadoras de N<sub>2</sub> (*Rhizobium*, *Frankia* y cianobacterias) efectúan su relevante función en la rizosfera de plantas de interés tanto en agrosistemas como en ecosistemas naturales perturbados (Cervantes & Rodríguez-Barrueco, 1992; Postgate, 1998; Barea & Olivares, 1998; Jeffries & Barea, 2001). Las simbiosis en

leguminosas son extremadamente importantes tanto en sistemas agrícolas como en ecosistemas naturales y representan una fuente fundamental de N para la biosfera (Postgate, 1998; Vance, 2001). Las bacterias responsables de la formación de nódulos en las raíces, en los que se desencadena la actividad nitrogenasa, se conocen colectivamente como *Rhizobium*, aunque se reconoce que pertenecen a diversos géneros, que se han ido escindiendo del primitivo: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*.

Junto a las actividades de los microorganismos que resultan beneficiosas para el sistema suelo-planta, se sabe también que determinadas bacterias del suelo llevan a cabo actividades negativas en la rizosfera, entre ellas están las denominadas DRB, acrónimo del inglés "deleterious rhizobacteria" (Nehl *et al.*, 1996). Esas bacterias resultan ser patogénicas para la planta. Sin embargo, la mayoría de las enfermedades de los vegetales, que tienen importantes repercusiones agronómicas, son causadas por hongos, fundamentalmente especies pertenecientes a los géneros: *Fusarium*, *Phytophthora*, *Gaeumanomyces*, *Thielaviopsis*, *Sclerotium*, *Verticillium*, *Aphanomyces*, *Pythium* y *Rhizoctonia*, o por nemátodos tales como *Rotylenchus*, *Pratylenchus*, *Meloidogyne*, etc. Estos organismos producen graves daños en las plantas cultivadas que se deben principalmente a una sustracción de materia, originada por la secreción de enzimas que degradan paredes celulares, y muy especialmente, a la producción de metabolitos tóxicos.

## **2.4. Rizobacterias beneficiosas para el sistema suelo-planta (PGPR)**

### **2.4.1. Conceptos generales sobre microorganismos saprofitos beneficiosos**

Microorganismos saprofitos beneficiosos de los sistemas suelo planta son aquellos que utilizan compuestos orgánicos procedentes de residuos animales, vegetales o microbianos como fuente de energía y esqueletos carbonados, y que realizan actividades que benefician al sistema suelo-planta (Bowen & Rovira, 1999). Dentro de este grupo se encuentran fundamentalmente bacterias y hongos que intervienen en procesos tan importantes como la descomposición de materia orgánica procedentes de restos vegetales o animales, constituyendo un eslabón importante en el ciclo de la materia, de aquí que sean muy útiles en la purificación del agua en las llamadas "fosas sépticas", y en la preparación de "compost", para usarlo posteriormente como enmienda agrícola (Vassileva *et al.*, 1998). También desempeñan un papel importante en los procesos implicados en la formación de humus, carbón y petróleo.

Como se indicó anteriormente, el término PGPR (Kloepper *et al.*, 1989; Kloepper, 1994; Bashan, 1999; Dobbelaere *et al.*, 2001; Probanza *et al.*, 2002), se usa para describir bacterias colonizadoras "agresivas" de la raíz, que pueden resultar beneficiosas para las plantas. Se trata de bacterias que aunque viven de forma libre en el suelo, colonizan masivamente la rizosfera donde mantienen poblaciones de individuos a un nivel elevado, durante el tiempo preciso en el que deben expresar su efectividad en el proceso que las caracteriza (Kloepper *et al.*, 1991; Linderman, 1991). En el proceso de colonización la bacteria es atraída quimiotácticamente a la rizosfera por los exudados radicales para posteriormente unirse a la superficie radical. Algunas bacterias, como es el caso de *Azospirillum* spp., pueden incluso llegar a penetrar en la raíz y colonizar los espacios intercelulares, aunque no forman estructuras especializadas como ocurre en el caso de la asociación *Rhizobium*-leguminosa. Dentro de este grupo se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacteria*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus*. (Kloepper *et al.*, 1989; Bashan & Levany, 1990., Okon & Labandera, 1994; Probanza *et al.*, 2002; Palomino, 2003). Las bacterias conocidas colectivamente como *Rhizobium* se podrían considerar dentro de este grupo, entendiéndose, además, que éstas pueden actuar como PGPR cuando no forman simbiosis con leguminosas (Galleguillos *et al.*, 2000). Dadas sus importantes funciones, se aplican como inoculantes de las semillas, algunos de ellos comercializados, bien como "agentes de control biológico" o como "promotores directos del crecimiento de las plantas".

De todos los microorganismos que colonizan la rizoplana (superficie de la raíz) y el suelo rizosférico, los más comunes son las bacterias Gram negativas, y de todas ellas parece que *Pseudomonas* son las dominantes, probablemente debido a su gran versatilidad metabólica, que contribuye a su competitividad. También es de destacar la capacidad de quimiotaxis y adherencia a raíces (de los cereales) en el caso de *Azospirillum* (Vande Broek & Vanderleyden, 1995).

Con respecto a los hongos saprofitos beneficiosos, componentes comunes e importantes en la rizosfera, que aportan una cantidad considerable de biomasa microbiana, hay que resaltar el papel que desempeñan en la descomposición de la materia orgánica, y que en algunos casos están implicados en complejas interacciones tales como la antibiosis, la fungistasis y el micoparasitismo (Jeffries, 1995). *Trichoderma* y *Gliocladium* son hongos saprofitos frecuentemente encontrados en suelos que han mostrado capacidad como agentes de control biológico frente a otros hongos capaces de causar enfermedades en raíces (Baker, 1989; Datnoff *et al.*, 1995). La inhibición de la

colonización o del ataque por patógenos puede ser ejercida bien de forma directa, lo que implica la interacción entre los dos hongos, (micoparasitismo o por la producción de compuestos antimicrobianos), o bien de forma indirecta mediante la inducción de mecanismos de defensa de la planta (Wyss *et al.*, 1992; Jeffries, 1995).

#### **2.4.2. Modo de acción de las PGPR en control biológico de patógenos**

Una de las principales funciones de las PGPR es la relacionada con el control biológico de patógenos, actividad que benefician el crecimiento y desarrollo de las plantas de forma indirecta. Los mecanismos descritos por los cuales ocurre el control biológico de patógenos por PGPR son los siguientes:

- ✓ Producción de Sideróforos. Determinados microorganismos, fundamentalmente *Pseudomonas*, secretan compuestos de bajo peso molecular con gran afinidad por el Fe <sup>+3</sup> (sideróforos), lo quelan, lo transportan dentro de sus estructuras celulares y lo utilizan para su propio crecimiento (Briat, 1992), de esta forma el nutriente no está disponible, para otros microorganismos lo que puede resultar efectivo para prevenir la actividad de los patógenos que dependan de la presencia de Fe.
- ✓ Producción de antibióticos. Es el mecanismo más común de biocontrol. El principal grupo de productores de antibióticos en la rizosfera lo constituyen las *Pseudomonas*, considerándose estas bacterias, como agentes altamente efectivas en la supresión de enfermedad por fitopatógenos (Weller, 1988).
- ✓ Síntesis del ácido cianhídrico. La propia bacteria productora es resistente a este producto, aunque el papel de este compuesto en la supresión de la enfermedad no parece estar firmemente establecido (Kloepper, 1993).
- ✓ Hidrólisis del ácido fusárico. Compuesto causante de los daños producidos por el ataque de *Fusarium* (Toyoda & Utsami, 1991).
- ✓ Síntesis de enzimas que hidrolizan las paredes celulares de hongos patógenos. Cabe destacar la quitinasa, la laminarinasa (Lim, 1991) y la β-1,3-glucanasa (Fridlender *et al.*, 1993).
- ✓ Competición por nutrientes y sitios de infección en la superficie de la raíz. Al parecer es el mecanismo responsable de un pequeño o moderado grado de supresión de la enfermedad por muchas PGPRs (O'Sullivan & O'Gara, 1992).
- ✓ Inducción de Resistencia Sistémica en la planta. Esta basado en la activación de la síntesis de algunos metabolitos antipatogénicos en la planta, que se expresan a distancia del sitio de inducción y de forma generalizada. Es un mecanismo que no implica interacción directa entre patógeno y PGPR (Tuzun & Kloepper, 1994).

- ✓ Cambios en las poblaciones rizosféricas. Ello puede estimular el número de antagonistas frente a un patógeno (Linderman, 1991).

#### 2.4.3. *Modo de acción de las PGPRs en promoción directa del crecimiento*

Dentro de los mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal, se han descrito:

- ✓ *Fijación de N<sub>2</sub> atmosférico por bacterias de vida libre.* Fue el primer mecanismo propuesto para explicar los beneficios de la inoculación de ciertas bacterias rizosféricas. Posteriormente se ha visto que el aporte de N es limitado, e insuficiente para paliar las propias necesidades de las bacterias y el suministro posterior a la planta (Hong *et al.* 1991). La eficiencia de la fijación de esta asociación no es muy grande a menos que existan suficientes sustratos carbonados disponibles para obtener energía, (en el caso de *Azotobacter*, se requieren 100 Kg de glucosa/Kg de N fijado). Pero en el mejor de los casos no se llegan a superar unos cientos de gramos de N fijado por ha y año, frente a 300g/ha/año atribuidos a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Por otra parte el nitrógeno fijado por vía libre no es directamente utilizable por la planta, ya que forma parte de la célula fijadora y sólo a su muerte y lisis entrará dentro del proceso de mineralización correspondiente. Tal complejidad sugieren que deben existir mecanismos adicionales que permitan explicar los incrementos en cosecha observados tras una inoculación con bacterias diazótrofes, grupo en el que se encuentran especies pertenecientes a los géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas* y *Bacillus*.
- ✓ *Producción de fitohormonas.* Sustancias que pueden estimular el crecimiento en distintos estadios del desarrollo vegetal, este es el mecanismo más usado para explicar los efectos de las PGPRs, sobre la planta. De todas las fitohormonas las auxinas, y más concretamente el ácido indol acético (AIA) es el más común y mejor caracterizado, siendo el principal responsable del mayor desarrollo de las plantas inoculadas (Patten & Glick, 1996). Estas sustancias son sintetizadas también por la planta, por lo que es necesario distinguir entre éstas y las producidas por la bacteria. En este sentido, para evaluar los efectos de una PGPR será útil realizar estudios comparativos entre cepas silvestres y otras modificadas genéticamente que, o bien hayan perdido la capacidad de producción de la fitohormona, o bien sean, sobreproductoras. El crecimiento de la planta puede afectarse por la cantidad de AIA que la PGPR secreta y la respuesta puede variar de una planta a otra (Dubeikovsky *et al.*, 1993). A veces los efectos observados no



se deben a la producción de hormonas por la bacteria en sí misma, sino que es la propia planta la que los produce en respuesta a la colonización radical por la bacteria (Zimmer *et al.*, 1988). En cualquiera de los casos, la producción de fitohormonas va a conducir a un mayor desarrollo de la raíz, lo que a su vez puede facilitar la captación de nutrientes minerales, lo que redundará en beneficio de la planta. Un beneficio especial que la producción de AIA puede tener sobre el desarrollo de la planta se manifiesta en las leguminosas, ya que las fitohormonas producidas por *Azospirillum* promueven la diferenciación de las células epidérmicas de los pelos radicales, con lo que se aumenta el número de sitios susceptibles de infección por *Rhizobium* (Yahalom *et al.*, 1990; Andreeva *et al.*, 1993). La auxina AIA no parece ejercer ningún papel significativo en la fisiología de la bacteria, sugiriéndose que la producción y excreción de AIA al medio es una forma de reducir niveles tóxicos de triptófano precursor inmediato en la biosíntesis de AIA (Bar & Okon, 1992).

- ✓ *Solubilización de minerales.* Especialmente estudiada en el caso de compuestos insolubles de P (Toro *et al.*, 1997; 1998). Es un mecanismo que hace a los nutrientes accesibles para su captación por las raíces. Dentro de este grupo se encuentran especies pertenecientes a los géneros: *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y otros.
- ✓ *Síntesis de compuestos de bajo peso molecular o enzimas que modulen el crecimiento y desarrollo de la planta.* Estas sustancias son secretadas por las bacterias transfiriéndolas a las plantas y una vez que cruzan la pared celular y son reconocidas por las membranas de la planta, se desencadenan una serie de procesos que en definitiva conllevarán a una alteración del metabolismo de la planta, pudiendo actuar a nivel metabólico disminuyendo los niveles de respiración en plantas inoculadas, o aumentando actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Michielis *et al.*, 1989), la glicólisis, la síntesis de aminoácidos aromáticos, etc. Por otro lado, pueden producir una mejora del nivel hídrico en la planta, probablemente debido a que mejora la extracción de humedad del suelo, muy importante en condiciones de sequía, por lo que las plantas inoculadas presentan mayor potencial hídrico en hoja y mayor conductancia estomática y transpiración (Saring *et al.*, 1988; Michiels *et al.*, 1989).

## 2.5. Micorrizas Arbusculares (MA)

### 2.5.1. *Conceptos generales sobre micorrizas*

Las micorrizas (del griego hongo-raíz) son asociaciones simbióticas mutualistas que se establecen entre determinados hongos y más del 90% de las plantas que crecen en la corteza terrestre (Smith & Read, 1997).

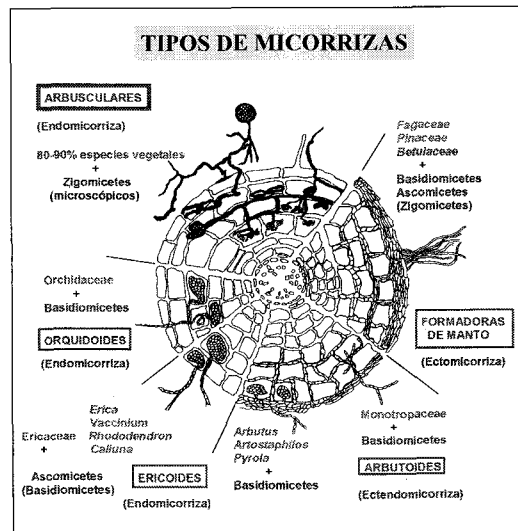
Se sabe que las hifas del hongo que se desarrollan en la raíz y emergen de ella poseen un papel importante en la translocación de nutrientes minerales a la planta. Este hecho convierte en esencial la actividad micorrícica, sobretodo en aquellos suelos con niveles bajos de fósforo asimilable. Por su parte, la planta suministra al hongo fuentes de carbono procedentes de la fotosíntesis, además de un nicho ecológico protegido, al resguardo de fenómenos de antagonismos microbiano propias de la rizosfera. Salvo escasas excepciones de familias de plantas no micorrizables, puede afirmarse que las plantas cuando se desarrollan en condiciones naturales son organismos dobles, si entendemos que la raíz (órgano de absorción de agua y nutrientes), está constituido por la raíz propiamente dicha y el hongo que convive simbióticamente en ella (Barea & Honrubia, 1993).

Durante el establecimiento de la simbiosis el hongo coloniza biotróficamente la corteza de la raíz, llegando a ser parte integrante de dicho órgano. Desarrolla un extenso micelio externo que, a modo de sistema radical complementario y altamente efectivo, ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales y agua del suelo. De hecho esta simbiosis se considera la parte metabólicamente más activa de los órganos de absorción de nutrientes de las plantas. A su vez, la planta hospedadora proporciona nutrientes orgánicos y un nicho ecológico protegido al hongo (Smith & Read, 1997).

El establecimiento de la simbiosis micorrícica implica cambios cualitativos y cuantitativos de las poblaciones microbianas en la zona próxima a la raíz. En el caso de las plantas micorrizadas se emplea también el término de micorrizosfera (Linderman, 2000; Barea 1997, 2000; Gryndler, 2000; Barea *et al.*, 2002b,c). A pesar de que este segundo término no puede considerarse conceptualmente igual al primero, en la práctica resulta muy difícil establecer las diferencias entre ambos (Bowen & Rovira, 1999). Precisando más aun, los microambientes derivados de la proliferación del propio micelio micorrícico permitiría hablar de la denominada hifosfera (Gryndler, 2000).

Las micorrizas se encuentran prácticamente en todos los hábitats de la tierra y las establecen una gran cantidad de especies vegetales. Solo algunas familias botánicas entre ellas como las Crucíferas, Ciperáceas y Quenopodiáceas, no forman micorrizas. Esta universalidad de la simbiosis sugiere una gran diversidad en lo que a morfología y a fisiología de las asociaciones micorrícicas se refiere, lo que permite reconocer unos cinco

tipos principales entre ellas: ectotróficas, endotróficas arbusculares, orquidoides y ericoides, y ectendotróficas (Harley & Smith, 1983). Todas ellas se caracterizan porque el hongo no penetra nunca la endodermis de la raíz, ni produce reacciones típicas de defensa, limitándose el hongo a la colonización del cortex radical (Alvarez, 1991). De todos estos tipos, las micorrizas arbusculares (MA) son el grupo mas extendido en la naturaleza formando esta asociación plantas pertenecientes al 80-90% de las familias botánicas. Los hongos formadores de MA, son simbiontes biotrofos obligados puesto que sólo pueden completar su ciclo de vida en presencia de la planta hospedadora.



Tipos de micorriza (Barea, 1998).

### 2.5.2. Taxonomía de los hongos MA

La sistemática de estos hongos ha sufrido diversas modificaciones en la medida en que se han ido intensificando su estudio. El número de especies aumenta y las revisiones de taxones son frecuentes. Hasta no hace mucho los trabajos de taxonomía se desarrollaban sobre la morfología de esporas sexuales, lo que acarrea mucho tiempo en trabajo descriptivo y aunque el uso de criterios morfológicos sigue vigente, se progresa en el uso de criterios basados en técnicas moleculares. A partir del 2001 se ha propuesto la creación de un nuevo phylum Glomeromycota que engloba los hongos MA, que hasta entonces estaban ubicados en los Zygomycetes (Morton & Benny, 1990). La nueva

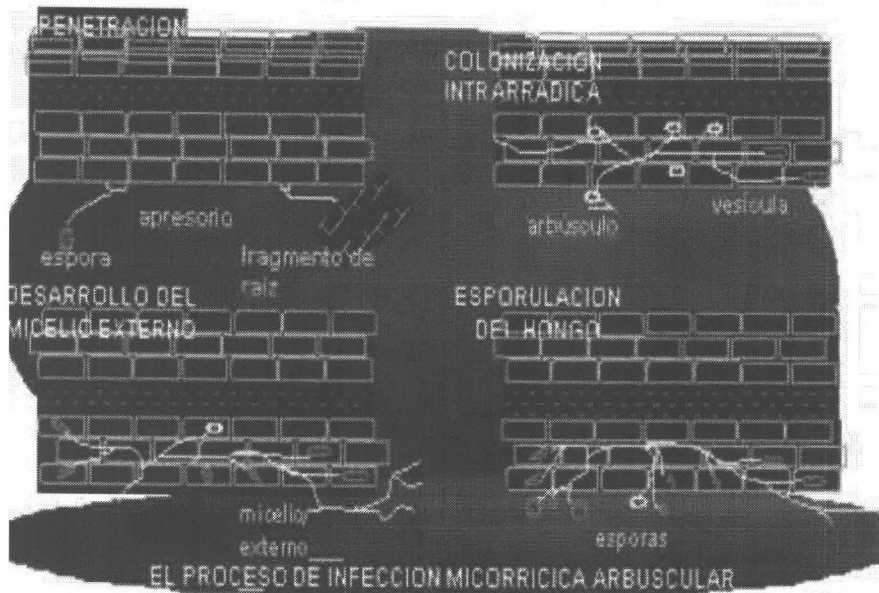
clasificación se promueve el hecho de que un género clave: *Glomus*, no es monofilético y se basa en el empleo de técnicas moleculares para el análisis filogenético usando el ADNr 18S del ARNr (Schüßler *et al.*, 2001a, b).

La nueva clasificación distingue 9 familias: Paraglomaceae, Archaeosporaceae, Familia inédita aun sin denominación, Geosiphonaceae, Acaulosporaceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae, Glomeraceae grupo A y Glomeraceae grupo B. Estas nueve familias contienen los siguientes géneros: *Paraglomus*, *Archaeospora*, *Scutellospora*, *Geosiphon*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Glomus* que engloban más de 100 especies distintas. En algún caso, un mismo género se encuentra repartido entre dos o mas familias como ocurre con *Glomus* (Glomeraceae grupo A y B y Diversisporaceae) y *Scutellospora* (Gigasporaceae y Familia inédita) (Schüßler *et al.*, 2001a, b).

### 2.5.3. Formación y Morfología de las MA

La colonización fúngica no produce alteraciones morfológicas distinguibles reseñables, por lo que las técnicas microscópicas juegan un papel importante en el análisis de la colonización micorrícica. La colonización solo tiene lugar en la epidermis y en el parénquima cortical de las raíces. El hongo MA no penetra nunca en el cilindro vascular, ni en las regiones meristemáticas (Bonfante-Fasolo *et al.*; 2001).

En una micorriza activa se considera que existe una fase extraradical del hongo, el micelio externo, que incluye micelio, esporas y células auxiliares en su caso y una fase intraradical del mismo, con hifas intra e intercelulares, arbuscúlos y a veces vesículas. La colonización por el hongo sigue un proceso de desarrollo con distintas etapas.



### *Precolonización*

La colonización micorrízica puede iniciarse a partir de tres tipos de propágulos: esporas, raíces previamente colonizadas e hifas. De todos ellos las esporas son los propágulos que pueden ser clasificados taxonómicamente, siguiendo criterios morfológicos. Tienen una cierta capacidad para dispersarse a través del agua y del viento y constituyen las estructuras de resistencia de estos hongos (Koske & Gemma, 1990).

A partir de las esporas se produce el desarrollo del tubo de germinación, el cual está determinado fundamentalmente por las condiciones físicas, químicas y fisicoquímicas del suelo ( $\text{CO}_2$ , temperatura, pH, etc.). Cuando las hifas producidas no encuentran una raíz susceptible de ser colonizada comienzan a tabicarse por sus extremos y retraen el citoplasma hacia la espora madre entrando de nuevo en reposo y así sucesivamente hasta que encuentre una raíz que pueda colonizar con éxito o degenerar para siempre. Sin embargo, cuando alguna hifa llega a la rizosfera de una planta hospedadora, se ramifica lateralmente cerca de la superficie de la raíz dando lugar a una estructura de preinfección con forma de abanico, y finalmente alguna hifa contacta con la raíz, forma el apresorio y a partir de esta estructura se produce la colonización de la raíz (Barea *et al.*, 1991; Giovannetti *et al.*, 1993; 2000). Aquí termina la única etapa independiente del desarrollo del hongo. Una vez que se ha producido el contacto, la adhesión de la hifa con la raíz y el apresorio el hongo penetra en la epidermis e inicia la colonización después de 2 o 3 días (Becard & Fortín, 1988).

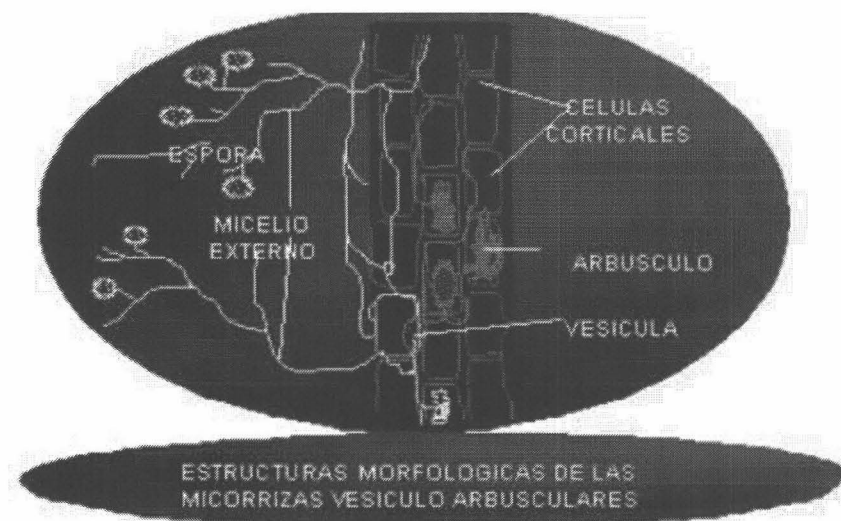
### Desarrollo de unidades de colonización

La hifa de penetración atraviesa la epidermis y en la zona más externa de la corteza da lugar a unas estructuras intercelulares típicas, que se denominan ovillos o "coils". Se forman mediante circunvoluciones de hifas intracelulares y aunque no se conoce su función se ha propuesto que pueden estar implicados en una toma inicial de compuestos hidrocarbonados por el hongo (Smith, 1997).

A continuación la hifa colonizadora se ramifica y extiende a través del cortex medio e interno; finalmente las hifas intracelulares se ramifican repetidamente en forma dicotómica, para dar lugar a la estructura típica de la simbiosis: el arbusculo. Los arbusculos, se forman poco después de la penetración inicial del hongo en la raíz (2-5 días). El hongo cuando coloniza una célula, no perfora el plasmalema de la célula hospedadora, aunque sí induce su invaginación. Esta interfase hongo-planta es de gran importancia para el funcionamiento de la simbiosis y es donde se presupone que tiene lugar el flujo bidireccional de nutrientes (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1990). Normalmente los arbusculos tienen un tiempo de vida corto, de 4 a 10 días, después de los cuales degeneran y son digeridos por la célula hospedadora que vuelve a su función normal.

Al mismo tiempo, o poco después que se produce la formación de los arbusculos, algunas especies de hongos MA forman vesículas intra y/o intercelulares (Abbott, 1982). Las vesículas, son estructuras de forma diversa según la especie (redondeadas, ovoides, etc.) y de paredes finas, que se producen por el hinchamiento terminal o intercalar de las hifas. Estas estructuras almacenan gran cantidad de lípidos y actúan como órgano de reserva del hongo durante situaciones de estrés, como es la falta de carbohidratos. Ninguna de las especies pertenecientes a los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* forman vesículas dentro de la raíz, aunque sí producen células auxiliares en el micelio externo.

El conjunto de colonización originado a partir de un único punto de entrada se denomina unidad de colonización (Wilson, 1984), a partir de ella se produce una fase de colonización exponencial, en la que el hongo se desarrolla más rápido que la raíz. Esto se debe a que el establecimiento de las primeras unidades de colonización vigoriza el micelio externo del hongo, que continúa produciendo unidades de colonización de forma especial. Después se produce una fase de estabilización de la colonización, durante la cual la raíz y el hongo crecen al mismo ritmo. En ambas fases el proceso de formación y degradación de arbusculos se produce de forma continuada.



### ***Crecimiento del hongo en el suelo***

Simultáneamente a la colonización intraradical del hongo, se produce el desarrollo del micelio externo en el suelo que rodea la raíz. Este micelio externo funciona como un sistema radical complementario que se extiende más allá de la zona de agotamiento en nutrientes cercana a la raíz. Su función es la búsqueda, absorción y transporte de nutrientes a la planta, especialmente aquellos de lenta difusión en la solución del suelo como son el fósforo, zinc, cobre y amonio (Sieverding, 1991; Burkert & Robson, 1994). Además como ya se ha indicado anteriormente, el micelio juega un papel importante como fuente de inóculo para continuar la colonización en el mismo sistema radical o en algún otro próximo (Barea *et al.*, 1991).

#### ***2.5.4. Efecto de las MA sobre el desarrollo de las plantas***

El efecto de la formación de MA sobre las plantas abarca desde la mejora del crecimiento, potenciación de captación de nutrientes, protección frente a estreses ambientales y culturales y mejora de la estructura del suelo (Barea *et al.*, 1997; 2002b,c).

### ***Incremento en el aporte de nutrientes a las plantas***

El efecto mejor y más estudiado que ejercen las MA sobre las plantas es, sin duda, el que conduce a una mejora del crecimiento, así como de su estado nutricional. Las MA han demostrado su efectividad contribuyendo en un mejor aprovechamiento y absorción de los nutrientes disponibles en el suelo. Esta mejora en la absorción se observa en elementos de movilidad baja como P, Zn y Cu. Las plantas micorrizadas presentan una mayor eficiencia en la absorción de estos micronutrientes que las plantas no colonizadas. La absorción de estos elementos por las hifas es independiente de la nutrición fosforada (Tinker, 1980; Weissenhorn *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2001). Este fenómeno se observa claramente en plantas que crecen en suelos poco fértiles en donde la disponibilidad y movilidad de elementos es escasa (Barea, 1991). La estimulación de captación de nutrientes y la subsiguiente traslocación de éstos a la parte aérea, ocasiona que se transfieran a la raíz relativamente menos productos de la fotosíntesis y que una mayor proporción de los mismos sea retenida en la parte aérea, para su utilización en la producción de materia verde. La relación de peso seco de parte aérea: peso seco raíz, es normalmente mayor en las plantas MA (Smith, 1980).

Se ha confirmado que el micelio externo de los hongos MA, pueden absorber P, NO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub> de microhábitats distantes en más de 25 cm de la superficie de la raíz (mucho mas

allá de la zona de agotamiento que la rodea) y transferírseles a las plantas con las que se asocian (Bürker & Robson, 1994; Tobar *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2001).

Como se indicó anteriormente, el efecto micorriza más característico en plantas es el incremento en la captación de P. Para explicarlo hay que recordar que entre un 95-99% del P en suelo se encuentra en forma no disponible para las plantas (Bielecki, 1973). Los iones fosfato, además de encontrarse en muy baja concentración, difunden muy lentamente al estar formando parte de compuestos insolubles ligados a Ca, Fe ó Al, o absorbidos a coloides del suelo. Una vez que el ión fosfato llega a la superficie de la raíz, las plantas lo toman mucho más rápido de lo que estos iones pueden difundir hacia la superficie radical. Consecuentemente, se desarrollan zonas de agotamiento alrededor de los órganos de absorción de P, gracias a la capacidad del hongo para (a) incrementar los sitios de absorción de P, al explorar la red de micelio externo mucho más volumen del suelo; (b) transportar los iones fosfato a través del micelio externo a partir de distancias relativamente grandes y (c) transferir el nutriente a la planta en las células corticales de la raíz a través de los arbuscúlos (Gianinazzi & Azcón-Aguilar, 1991). El P es transportado a las estructuras internas en forma de gránulos de polifosfato contenidos en el interior de vacuolas, contribuyendo al almacenamiento de este elemento (Gianinazzi-Pearson & Azcón-Aguilar, 1991; Barea & Honrubia, 1993). También se ha descrito actividad fosfatasa alcalina específica del hongo MA, sugiriéndose que estas fosfatasas pueden jugar un papel clave en la traslocación activa y/o mecanismos de transferencia de P en las MA (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1995). Hoy día existen evidencias genéticas de la existencia de transportadores de P en hongos MA (Harrison & van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001), así como de la implicación de ATPasas de membrana (Ferrol *et al.*, 2002).

La presencia de determinadas actividades enzimáticas en el micelio externo o interno del hongo se propuso como marcador de la funcionalidad de las MA (Gianninazzi-Pearson *et al.*, 1995). Estas actividades se ponen de manifiesto por medio de las llamadas "tinciones vitales". Dos de las más utilizadas son la succinato deshidrogenasa (SDH), implicada en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, y que indica que el hongo MA está vivo y activo y la fosfatasa alcalina (ALP), que indica que el hongo está transfiriendo P a la planta (Tisserant *et al.*, 1993; Guillemin *et al.*, 1995).

Algunas especies de plantas son más dependientes del P que otras para su desarrollo, este hecho junto a dificultades de las especies inherentes a las características del sistema radical, hacen que la respuesta a la MA varíe en función de la planta, lo que condiciona el concepto de "dependencia de la planta a la micorriza". Es decir, el grado en el que una planta depende de la micorriza para producir su máximo nivel de crecimiento o cosecha a un nivel dado de fertilidad del suelo. En general, las plantas con un sistema radical con



raíces tróficas de diámetro inferior a 0.5 mm y carentes de pelos radicales serán las más dependientes de las micorrizas (Baylis, 1972).

Análogamente las hifas del micelio externo son capaces de absorber y traslocar otros nutrientes como el N en forma de amonio o nitrato (Tobar *et al.*, 1994; Bago *et al.*, 1996), habiéndose demostrado la expresión genética de transportadores específicos de N (Bothe & Hildebrandt, 2002), así como de genes que codifican para la nitrato reductasa.

El amonio, ión de muy baja movilidad, puede dar lugar a zonas de agotamiento cuando es absorbido por la planta al igual que ocurre con el P. el micelio extraradical puede alcanzar zonas no accesibles a las raíces de las plantas y contribuir así a la nutrición nitrogenada de la misma. Con iones de mayor movilidad, como es el caso del nitrato o sulfato, es menos probable que se agoten las zonas próximas a las raíces y posiblemente estos iones no se muevan más rápidamente a través de las hifas que por la solución del suelo (Gianinazzi-Pearson, 1991). Sin embargo, se ha evidenciado la capacidad del micelio externo de absorber nitrato del medio (Tobar *et al.*, 1994; Bago *et al.*, 1996), aunque los mecanismos de cesión de elementos nitrogenados a la planta no están totalmente establecidos (Bago *et al.*, 2001).

#### ***Aprovechamiento de recursos hídricos y respuesta a la salinidad***

Diversos estudios han comprobado como las MA mejoran la relaciones hídricas de las plantas en condiciones de sequía por lo que las plantas micorrizadas responden mejor que sus controles a condiciones de sequía (Augé *et al.*, 1987; Faber *et al.*, 1991; Augé, 2001; Ruíz-Lozano, 2003).

La aplicación de fertilizantes puede interferir en la absorción de nitratos, fosfatos y otros nutrientes debido al exceso de iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en el suelo. Se ha comprobado que las MA ayudan a las plantas a superar el estrés salino causado (Tsang y Maun, 1999; Al-Karaki, 2001; Ruiz-Lozano & Azcón, 2000; Cantrell & Linderman, 2001; Ruíz-Lozano, 2003).

Dado que en la presente Tesis Doctoral se ha seleccionado el impacto de salinidad y sequía (típico en suelos de la Cuenca Mediterránea) como modelos de estrés abiótico a investigar, se le dedica más adelante un estudio más amplio al efecto de este tipo de estrés sobre los microorganismos, con especial referencia a los hongos MA.

#### ***Presencia de metales pesados***

En general se puede generalizar que cuando se acumulan metales en el suelo, a concentraciones supraóptimas para el desarrollo de la planta, los hongos micorrícicos lo absorbe lo que resulta de interés en la fitoestabilización de suelos contaminados con

metales (Entry *et al.*, 1999). Las distintas especies de hongos micorrícicos, y fundamentalmente, los distintos ecotipos difieren en el grado de resistencia que muestran frente a metales y en el nivel de adaptación a los mismos (del Val *et al.*, 1999). Es conveniente por lo tanto la utilización de hongos micorrícicos adaptados a la presencia de metales, con vistas a mejorar el establecimiento de la cubierta vegetal en zonas contaminadas (Díaz *et al.*, 1996; Leyval *et al.*, 2002; Vivas *et al.*, 2003).

Dado que en la presente Tesis Doctoral se ha seleccionado el impacto de los metales pesados como modelo de estrés también abiótico a investigar, se le dedica más adelante un estudio más amplio al efecto de tal estrés sobre los microorganismos en general, y sobre las MA y PGPRs, en particular.

### ***Mejora en la estructura del suelo, participando en la formación de agregados estables***

En este proceso, como en otros que ocurren en la naturaleza, todos los componentes bióticos interactúan en la formación de su matriz biótica. Mientras que cada microorganismo del suelo tiene un papel en la formación de la estructura del mismo, los hongos y los actinomicetos filamentosos desempeñan un papel importante en la formación de agregados. La contribución de las hifas de la MA a la formación de agregados puede quedar resumida de la siguiente forma (Miller & Jastrow, 1997; 2000): (a) crecimiento de las hifas en el suelo, creando un esqueleto al cual se unen las primeras partículas. (b) las raíces e hifas crean las condiciones físicas y químicas para la producción de un material orgánico amorfo al cual se unirán las partículas (c) este material favorece la unión de microagregados para terminar formando macroagregados, merced a la cooperación de las hifas de la micorriza y a la acción cementante de los productos de origen microbiano (mucílago, polisacáridos) o vegetal. Estos agregados, almacén de C y nutrientes, constituyen un microhábitat para otros microorganismos del suelo. La formación de estos agregados es un proceso importante para la estabilización de la estructura del suelo, factor clave en la recuperación de suelos degradados y erosionados.

### ***Cambios en el estado fisiológico y hormonal de la planta***

Se ha descrito la capacidad de los hongos MA para sintetizar fitohormonas tales como auxinas, citoquininas y giberelinas "*in vitro*" y otras sustancias que pueden alterar la morfología y fisiología de la raíz (Azcón-Aguilar & Barea, 1992). Como resultado se produce una modificación en la composición de los exudados radicales. Lo que da a lugar a la llamada "micorrizosfera" o zona de la rizosfera bajo la influencia de la micorriza, donde la población microbiana difiere de la que se desarrolla en la propia rizosfera, no

solo cuantitativa sino cualitativamente (Azcón-Aguilar y Barea, 1992; Linderman, 1992; Barea, 1997; Barea *et al.*, 2002 b, c).

De otro lado, y dado que las MA representan un drenaje de fotosintetizados, la simbiosis desarrolla la llamada "compensación fotosintética" que se traduce en un incremento de la eficacia de dicho proceso (Gianinazzi-Pearson & Azcón-Aguilar, 1991).

### ***Cambios en la diversidad de las comunidades de planta y la sucesión vegetal***

Se ha demostrado que cada planta muestra un nivel de compatibilidad mayor con determinados ecotipos de hongos MA, por lo que la conservación de la diversidad de estos hongos beneficia la diversidad y sucesión de las plantas (Requena *et al.*, 2001).

### ***Control biológico de patógenos***

Los microorganismos patógenos son componentes habituales de los ecosistemas naturales y agronómicos, que pueden causar importantes pérdidas en el rendimiento agrícola como consecuencia de su ataque y el consiguiente desarrollo de enfermedades. En los últimos tiempos despierta un elevado interés el papel que las MA ejercen confiriendo una mayor resistencia/tolerancia a las plantas frente al ataque de patógenos que causan enfermedades a los cultivos. Tales efectos son difíciles de generalizar y dependen en gran medida de la especie vegetal implicada, del hongo MA, el patógeno y su nivel de virulencia y de las condiciones medioambientales (Hooker *et al.*, 1994; Azcón-Aguilar & Barea, 1996, 2002). En general se ha descrito que las MA reducen los daños de la enfermedad producida por los patógenos que infectan el sistema radical (Slezack *et al.*, 2000). Una condición imprescindible para que se manifieste esta protección es que la simbiosis esté establecida antes de que se produzca el ataque del patógeno (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Azcón-Aguilar *et al.*, 2002).

## **2.6. Interacción hongos MA-PGPRs**

Como se ha indicado anteriormente, los cambios fisiológicos inducidos por la colonización MA en la planta afectan a las poblaciones de otros organismos que habitan en la rizosfera y/o rizoplana (Linderman, 1988; Azcón-Aguilar & Barea, 1992; Barea, 1997; Gryndler, 2000; Barea *et al.*, 2002b,c). Se ha evidenciado que determinadas bacterias y hongos aparecen asociados a estructuras de hongos MA (Filippi *et al.*, 1998; Budi *et al.*, 1999).

La co-inoculación de hongos MA y PGPRs puede afectar al establecimiento recíproco de ambos tipos de microorganismos en la rizosfera (Puppi *et al.*, 1994; Barea, 1997; Andrade *et al.*, 1998; Ravnskov *et al.*, 1999), particularmente, en lo que se refiere al establecimiento de poblaciones nativas o inoculadas de PGPR solubilizadoras de fosfato (Toro *et al.*, 1997; Barea *et al.*, 2002a). Igualmente se han descrito efectos negativos o neutros de la coinoculación de hongos MA y PGPR sobre el establecimiento recíproco de estos microorganismos (Meyer & Linderman, 1986; Barea *et al.*, 1997; Vosátka & Gryndler, 1999). Estos resultados sugieren que la interacción PGPR-hongo MA puede ser selectiva y dependiente de la bacteria y el hongo implicado, lo cual había sido ya sugerido previamente (Azcón, 1989).

Los microorganismos de la rizosfera afectan los estadios presimbóticos de la MA (Azcón-Aguilar y Barea, 1995; Giovanetti *et al.*, 2000), influyendo en la germinación de las esporas y el desarrollo del micelio. Se han propuesto varias hipótesis que expliquen el efecto estimulante de los microorganismos del suelo sobre las esporas de los hongos MA. Estas incluyen: (a) detoxificación del medio, ya que los microorganismos pueden eliminar inhibidores del crecimiento del hongo; (b) utilización de autoinhibidores fúngicos; (c) Producción de compuestos estimulantes hidrosolubles de fácil difusión en el medio y compuestos volátiles (o ambos). Determinadas sustancias activas biológicamente, tales como aminoácidos, hormonas vegetales, vitaminas y otros compuestos orgánicos que pueden ser sintetizados por los microorganismos del suelo incrementan la tasa de crecimiento de los hongos MA. En este contexto, la liberación de compuestos volátiles es también importante (Azcón-Aguilar & Barea, 1995). Las denominadas Mycorrhiza Helper Bacteria, son un ejemplo claro de este tipo de microorganismos que ayudan a la formación de ectomicorrizas (Garbaye, 1994). Igualmente, se ha verificado que determinadas bacterias estimulan el desarrollo del micelio y potencian la formación de MA (Azcón-Aguilar y Barea, 1995; Gryndler, 2001; Barea *et al.*, 2002b, c).

## 2.7. Microorganismos y degradación del suelo en condiciones de aridez

Un amplio rango de factores naturales (geomórficos, paleotectónicos o hidrotermales) pueden afectar la estabilidad y funcionamiento de los ecosistemas naturales (Herrera *et al.*, 1993). Adicionalmente, diversas actividades humanas, que pueden causar la contaminación del aire, agua y suelo, el mal uso del suelo para fines ganaderos y agrícolas, o la deforestación, están causando un fuerte impacto negativo sobre una amplia gama de ecosistemas. La degradación de los ecosistemas puede llegar a un punto, en el que la recuperación espontánea es difícil, especialmente si el agente causal está presente

continuamente. En general, el éxito de la restauración, requiere la reconstrucción de condiciones morfológicas, hidrológicas, físico-químicas y biológicas adecuadas. Una de las causas que motiva el fracaso de muchos intentos de restauración es el no reconocer el hecho de que el sistema planta/suelo está asociado con una diversa comunidad de microorganismos. Cada vez hay mas evidencias de que estas asociaciones planta-microorganismos rizosféricos puede facilitar el establecimiento de plantas bajo condiciones hostiles y ayudar al mantenimiento de la sucesión (Requena *et al.*, 2001; Turnau *et al.*, 2002; Jeffries *et al.*, 2002). Es por ello que el manejo de la rizosfera mediante el uso combinado de varios microorganismos incluyendo PGPR, bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> y hongos MA, puede presentarse como una interesante alternativa en ambientes degradados ya que provocan en las plantas beneficios cruciales para su desarrollo, lo que generaría la restauración de su propio hábitat (Jeffries *et al.*, 2002).

En el caso concreto de los ambientes mediterráneos, caracterizados por un mecanismo climático de alternancia regular de una estación cálida y seca, con otra fría y húmeda, lo que condiciona unas características ecológicas muy especiales, comunes en varias áreas del planeta, que definen el llamado "clima mediterráneo" (López-Bermúdez & Albaladejo, 1990). La sequía estival pronunciada, abundante energía solar y precipitaciones irregulares y esporádicas, pero torrenciales, en otoño-invierno, son factores esenciales que definen las cualidades y funcionamiento de los ecosistemas mediterráneos. Concretamente, en los procesos interactivos que concurren en la degradación de los sistemas suelo-planta en ambientes mediterráneos, se ha demostrado un descenso en el número de propágulos de la microbiota del suelo, de su diversidad y/o de su actividad (Requena *et al.*, 2001). El deterioro de los sistemas suelo-planta, en cuanto que afecta a las relaciones planta-microorganismos, desencadena un círculo vicioso de efectos negativos: Si no hay plantas, se degrada la vida microbiana, y si no hay propágulos microbianos, los procesos naturales o experimentales de revegetación presentarán problemas para prosperar adecuadamente.

Hoy día se considera que las MA son claves en estrategias destinadas a frenar la erosión y la desertificación, basadas en la revegetación con especies arbustivas autóctonas de ambientes mediterráneos (Jeffries *et al.*, 2002). Los avances en las técnicas de aislamiento y multiplicación de hongos MA procedentes de ecosistemas desertificados están permitiendo establecer bancos de hongos autóctonos del ecosistema a restaurar, lo que facilita la producción de plantas autóctonas con micorrización optimizada. Es preciso indicar sin embargo, que el máximo beneficio de la inoculación con hongos MA solo se consigue después de una selección muy controlada del hongo más idóneo (el que demuestre más alto nivel de compatibilidad funcional y ecológica para cada sistema

planta-suelo). Hay que considerar también a las PGPR, que asociadas a las MA son capaces de promover acciones beneficiosas para la planta (Jeffries & Barea, 2001).

En el presente estudio se concede énfasis a los efectos producidos por componentes clave de la degradación de los sistemas suelo planta en condiciones de aridez, provocada por sequía y salinidad (estrés osmóticos), sobre rizobacterias y hongos MA y, a su vez, como ese tipo de microorganismos ayudan a la planta a superar situaciones de estrés osmótico. Por ello se dedica un apartado especial a la interacción de dicho estrés abiótico y esos microorganismos del suelo.

## 2.8. Estrés osmótico PGPRs y MA

### 2.8.1. Impacto del estrés osmótico sobre los microorganismos del suelo

Es obvio que el agua es esencial para la supervivencia y funcionamiento de los seres vivos. El papel crítico del agua para la vida sobre la tierra depende de su función como solvente de distintos solutos de importancia biológica. Además, el agua está asociada directamente en reacciones químicas y constituye el medio adecuado para las transformaciones bioquímicas (Kempf & Bremer, 2000). Dadas las marcadas diferencias metabólicas y fisiológicas entre microorganismos, no sorprende que en el transcurso de la evolución estos se hayan adaptado efectivamente no solo a ambientes con un buen suministro hídrico, sino también a hábitats sujetos a frecuentes fluctuaciones en cuanto a contenido de agua o a déficit permanente del mismo, como ocurre en el suelo (da Costa *et al.*, 1998; Booth *et al.*, 1999).

La exposición de los organismos a ambientes con alta osmolaridad, (medios con alta concentración de solutos, principalmente sales, o medios con bajo nivel hídrico) produce una rápida salida de agua a través de la membrana semipermeable citoplasmática a favor del gradiente osmótico que causa la reducción de la turgencia de la célula y la deshidratación del citoplasma, en estos casos, se habla de estrés osmótico, para referirnos a todas aquellas condiciones que dan lugar a una disminución del potencial hídrico celular (Kempf & Bremer, 2000 )

Los microorganismos responden activamente a las variaciones de osmolaridad de su hábitat en un proceso que se conoce como osmorregulación u osmoadaptación y cuyo objetivo es mantener la turgencia y el volumen de la célula dentro de unos niveles aceptables para la fisiología celular y proteger al organismo de los efectos letales de la deshidratación. La turgencia de las células en condiciones de estrés osmótico se mantiene mediante el acúmulo de determinadas sustancias las cuales se conocen con el nombre de

compuestos osmorreguladores y que incluyen iones inorgánicos y solutos orgánicos como aminoácidos, azúcares y alcoholes. (Csonka *et al.*, 1991; Millar *et al.*, 1996; Kempf & Bremer, 1998; 2000).

Se han identificado dos estrategias básicas de adaptación de los microorganismos a medios de alta osmolaridad. Una de ellas consiste en la acumulación de altas concentraciones de iones en el interior celular, estrategia que es seguida por arqueobacterias halófilas y bacterias halotolerantes; mientras que la otra estrategia seguida por multitud de organismos, es la acumulación de determinados compuestos en el citoplasma de las células, llamados solutos compatibles (Kempf & Bremer, 2000; Dover & Padan, 2001). La mayoría de los solutos compatibles son compuestos de bajo peso molecular entre los que se encuentran compuestos con alto número de grupos alcohol como el glicerol, la sacarosa y la trehalosa, aminoácidos libres y sus derivados como la prolina, la taurina y la  $\beta$ -alanina y las metilaminas como la betaína y sarcosina. La función que los solutos compatibles proporcionan al mantenimiento de la estructura proteica creando un microambiente protector alrededor de la proteína es lo que hace que las proteínas puedan seguir desempeñando su función en condiciones de estrés.

### **2.8.2. Impacto del estrés osmótico sobre las PGPRs y MA**

Diversos estudios a nivel ecofisiológico sobre el papel de la simbiosis MA frente a estreses de tipo osmótico han demostrado que dicha simbiosis origina una alteración en las tasas de movimiento de agua dentro, hacia y fuera de las plantas hospedadoras, con los consiguientes efectos sobre la hidratación de los tejidos y la fisiología de la planta (Augé, 2001). En los primeros trabajos sobre este tema, Safir *et al.* (1971) concluía que la simbiosis MA probablemente afectaba las relaciones hídricas de plantas de soja de forma indirecta, a través de una mejora de la nutrición fosforada de las mismas. Esta idea de que los efectos de las MA sobre las relaciones hídricas de las plantas eran de naturaleza meramente nutricional prevaleció durante varios años. Sin embargo, otros estudios posteriores demostraron que las relaciones hídricas e intercambio gaseoso de las plantas podía ser afectada por la simbiosis MA de forma independiente de la nutrición fosforada, y esto supuso un paso decisivo en los estudios de relaciones hídricas en la simbiosis MA. Así, hoy en día está totalmente aceptado que la simbiosis MA modifica las relaciones hídricas de las plantas, de una forma totalmente independiente del incremento en la captación de P (Augé, 2001).

Los estudios realizados han permitido sugerir posibles mecanismos a través de los cuales la simbiosis MA incrementa la tolerancia de las plantas frente a estreses de tipo osmótico (Ruíz-Lozano, 2003). Entre estos mecanismos destacan:

- (1) Absorción y transferencia de agua a través de las hifas fúngicas
- (2) Ajuste osmótico
- (3) Mejora del intercambio gaseoso
- (4) Cambios en la capacidad de retención de agua del suelo
- (5) Estimulación de actividades asimilativas esenciales para la planta
- (6) Cambios hormonales
- (7) Protección frente al daño oxidativo generado por la limitación hídrica

## 2.9. Microorganismos y contaminación por metales pesados

### 2.9.1. *Conceptos generales*

Como consecuencia de actividades industriales mal controladas las concentraciones de metales pesados en el suelo pueden incrementar en forma considerable. Por su elevada toxicidad para los seres vivos cuando están en exceso y por su carácter acumulativo, pueden causar problemas medioambientales muy graves. Los metales pesados comprenden un grupo aproximado de 60 elementos. Algunos de ellos como el cobre, cinc, manganeso, hierro, molibdeno, níquel y cobalto son esenciales para el crecimiento y metabolismo de los seres vivos, como componentes de muchos sistemas enzimáticos, por lo tanto resultan beneficiosos para la vida de las plantas cuando se encuentran en la solución del suelo a concentraciones bajas (Marschner, 1995). El término metal pesado se va a utilizar en la presente Memoria Doctoral en forma general y como tal se acepta en estudios de medio ambiente. Sin embargo, este término se refiere estrictamente a elementos metálicos con una masa específica mayor de  $5 \text{ g cm}^{-3}$  capaces de formar sulfuros (McGrath, 1998). En este sentido, el aluminio no es un metal pesado, sin embargo, se incluye en el grupo al ser uno de los metales que presenta mayores problemas de toxicidad en suelos ácidos (Horst, 1995; Borie & Rubio, 1999).

Otro grupo al que pertenece el antimonio, arsénico, bismuto, cadmio, cromo, plomo, mercurio y telurio, no son necesarios para el metabolismo celular ya que son muy tóxicos incluso a concentraciones muy bajas. (Marschner, 1995; Gadd, 2000). Algunos compuestos son utilizados por la industria como catalizadores y como conservantes de alimentos para evitar el crecimiento bacteriano. Otros son utilizados como componentes de insecticidas, herbicidas y de desinfectantes (Gadd, 2000).

La presencia de metales pesados en el suelo tiene un origen geológico (Jen & Bergseth, 1992). Sin embargo, existen diversas fuentes de metales derivadas directamente



de actividades antrópicas. Entre otras, la quema de combustibles fósiles, la fundición de minerales metalíferos, los residuos urbanos, lodos de depuradoras, fertilizantes, pesticidas, aguas residuales, pigmentos y baterías, etc. (Darbon *et al.*, 1992; Arraigada & Herrera, 1999; Li & Christie, 2001). Una fuente de contaminación importante son las actividades mineras mal controladas y los accidentes en sistemas de contención de instalaciones industriales. Un ejemplo reciente es el originado por las actividades mineras en Aznalcollar, Sevilla, con grave incidencia en los agrosistemas regados por el río Guadiamar, con un elevado riesgo para los acuíferos del Parque Nacional de Doñana, Reserva de la Biosfera.

Un problema adicional de la contaminación del suelo por metales pesados es el riesgo de transferencia de estos metales a las aguas subterráneas o la transferencia a sitios colindantes por medio del viento (Juste & Mench, 1992).

La mayor parte de los metales contaminantes se acumulan en la capa superior del suelo, integrándose en los complejos órganos-minerales, o bien quedan absorbidos a coloides del suelo, integrados en el complejo de cambio, o permanecen como iones libres en solución. Los metales que más se han citado por ser tóxicos son mercurio, cobre, níquel, plomo, cadmio, cinc, etc. La amenaza potencial de la contaminación por metales pesados para los ecosistemas y la salud pública, está conllevando a un incremento en el desarrollo de sistemas para secuestrarlos y eliminarlos del suelo, sedimentos y aguas residuales. El hecho de que los metales no se puedan degradar químicamente dificulta la recuperación de suelos contaminados con metales pesados, por lo que las opciones se limitan a técnicas de inmovilización o extracción/concentración. Hasta hace relativamente poco tiempo las técnicas de descontaminación ("remediación") se han fundamentado en métodos de ingeniería o físico-químicos, pero en años recientes el interés se ha centrado sobre la aplicación de procesos biotecnológicos ("bioremediación"). Con este fin se han establecido diversos sistemas biológicos de remediación basados en el uso de bacterias, algas, hongos y plantas (Chen, 1999; Matsunaga, 1999; Leyval *et al.*, 2002), estudios que se detallan posteriormente.

### **2.9.2. Absorción de metales pesados por las plantas**

Los metales pesados generalmente restringen el crecimiento de las plantas y el potencial de éstas para absorber nutrientes esenciales. En la mayoría de los casos los órganos que tienen el primer contacto con los metales son las raíces que los adquieren del suelo para después ser transportados, normalmente en forma de complejos y por los vasos del xilema a la parte aérea de la planta (Greger, 1999). Los metales se pueden fijar a las paredes celulares durante su transporte por la planta, lo que explica por qué muchos

metales se acumulan en las raíces, incluso hasta el 90%, mientras que en la parte aérea se encuentran en cantidades más bajas (Greger, 1999).

La absorción de metales en relación con la concentración externa del mismo suele diferir en diferentes genotipos de plantas. Así, Baker (1981) distingue entre plantas excluidoras, que puede absorber bajas cantidades de metal, aunque su concentración externa sea alta; acumuladoras, que tienden a acumular cantidades elevadas del metal aunque su concentración externa sea muy baja; y por último, las plantas indicadoras. Estas últimas se caracterizan por mantener una concentración de metales en sus tejidos que reflejan la concentración externa del metal, incrementando linealmente con un incremento en la concentración del metal en el medio externo. De esta manera hay plantas con distintos grados de absorción de metales, por lo que es necesario estandarizar valores basándose en los datos propuestos por Markert (1994), con el fin de generalizar las concentraciones de metales que se puede encontrar en una planta normal y los niveles tóxicos. Se han descrito plantas hiperacumuladoras con elevado nivel de tolerancia a los metales (Krämer *et al.*, 1997).

Hay grandes diferencias en los mecanismos de acumulación de metales entre las distintas plantas. Así, por ejemplo, plantas como maíz, arroz y cebada, que se han descrito como tolerantes al Cd (100  $\mu\text{M}$ ), presentan acumulación citoplasmática y fijación por fitoquelatina, mientras que en plantas como el pepino, tomate, y lechuga, que toleran el Cd a concentraciones de 10-30  $\mu\text{M}$ , acumulan los metales principalmente en la pared celular y no producen fitoquelatina (Inouhe *et al.*, 1992, 1994).

Como se dijo anteriormente, entre las diversas técnicas de remediación están cobrando gran interés las que globalmente se conocen como bioremediación, es decir, las basadas en el uso de seres vivos para paliar los problemas de contaminación. Particularmente, destacan la "fitoremediación", basada en el uso de plantas para descontaminar. La fitoextracción y la fitoestabilización son modalidades de la fitoremediación (Anderson & Cotas, 1994; Salt *et al.*, 2001). La fitoextracción utiliza plantas como acumuladoras de metales, normalmente pertenecientes a la familia Brassicaceae. Sin embargo, aunque son eficientes para acumular metales producen muy poca biomasa, por lo que se está considerando la utilización de especies del género *Salix* y otras, que poseen una considerable capacidad de resistencia y acumulación de metales y producen abundante biomasa, con lo cual se extrae mucha más cantidad del metal (Landberg & Greger, 1997). La fitoestabilización consiste en promover el crecimiento vegetal para reducir la disponibilidad de los metales, disminuir la erosión producida por el viento y el agua, y mejorar la calidad del suelo evitando así la filtración de metales. A

este efecto se han utilizado de forma comercial especies como *Agrostis tenuis* y *Festuca rubra* (Salt *et al.*, 2001; Van Tiechelen *et al.*, 1996).

Como se ha esbozado anteriormente y se expande con posterioridad, la micorrización cambia la capacidad de absorber y tolerar metales por parte de la planta, por lo que se han propuesto como componente de la fitoremediación (Leyval *et al.*, 2002). En cuanto a la relación tolerancia de plantas y micorrización hay dos tendencias. Una que considera que la colonización micorrícica no ha evolucionado como un sistema eficiente de tolerancia a metales, apoyada en el hecho de que plantas acumuladoras de metales, como *Thalaspia caerulescens*, que pueden soportar concentraciones de Ni 1000 veces superiores a las normales, no son susceptibles de formar micorrizas (Martens & Boyd, 1994). En el lado opuesto, se encuentra la capacidad que confiere la micorrización a ciertas plantas para sobrevivir bajo condiciones de estrés por contaminación con metales pesados (Leyval *et al.*, 2002).

## 2.10. Metales pesados, PGPRs y MA

### 2.10.1. Desarrollo de los hongos MA y de la simbiosis en suelos contaminados por metales pesados

La presencia de hongos MA en suelos contaminados con metales ha sido descrita desde hace más de dos décadas. Concretamente, Gildon & Tinker (1981) fueron los primeros que encontraron raíces colonizadas de forma natural en zonas mineras, con posteriores descripciones en este sentido (Zak & Parkinson, 1986; Díaz & Honrubia 1993; Shetty *et al.*, 1994). Incluso, *Oxalis acetosella*, muestra una colonización MA mucho mayor cuando crecía en un desecho industrial con altas cantidades de Cd, Zn y Pb, que cuando lo hacía en el correspondiente suelo control (Turnau *et al.*, 1996, 2001). Estos estudios sugieren que las plantas micorrizadas pueden presentar ciertas ventajas que les facilite la colonización de suelos contaminados con metales pesados, como se ha ido corroborando posteriormente, de acuerdo con las revisiones de Leyval *et al.*, (2002) y Turnau & Haselwandter (2002). Otros autores también han encontrado niveles de colonización MA considerables en suelos agrícolas contaminados con metales de diversos orígenes, incluyendo la deposición atmosférica (Weissenhorn *et al.*, 1995a) y la adición de lodos (Weissenhorn *et al.*, 1995 b).

Un hecho destacable es que no siempre se encuentra correlación entre la concentración total de un metal en raíz o en suelos agrícolas adicionados con lodos contaminados con metales pesados y la colonización MA de los hongos presentes

(Weissenhorn *et al.*, 1995a, 1995b). También es destacable un experimento en el que se encontró una correlación negativa entre la "infectividad" de los hongos MA en diferentes suelos contaminados con metales pesados y los contenidos de Cd y Zn extraíbles mediante  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en esos suelos (Leyval *et al.*, 1995). Desafortunadamente, en la mayoría de estos estudios no se midió la disponibilidad de metales en los suelos experimentales, lo cual hace imposible el establecimiento de cualquier comparación entre los resultados obtenidos en diferentes ensayos (Haselwandter & Berreck 1994).

### **2.10.2. Adaptación de los hongos MA y de la simbiosis en suelos contaminados por metales pesados**

En general, se sabe que concentraciones de metales elevadas en el suelo son tóxicas para diversas especies de bacterias y hongos, pero también se ha demostrado la tolerancia de los microorganismos a los metales en el suelo (Giller *et al.*, 1998). En efecto, la presencia de metales pesados en suelos, a concentraciones elevadas, actúa como agente selectivo de la actividad biológica, dando como resultado un ecosistema con una población muy resistente a estos elementos y derivando en una baja diversidad de especies en cada uno de sus niveles. Los fenómenos de adaptación de los microorganismos del suelo a elevadas concentraciones de metales en el suelo se han encontrado, lógicamente, también para los hongos MA.

La adaptación de los microorganismos a la contaminación es un tema de sumo interés para los Objetivos de la presente investigación, por lo que se analizará en detalle posteriormente, para centrar inicialmente la atención en un grupo concreto de estos microorganismos: los hongos MA, dados el carácter de asociación de estos con las plantas. Ello permitirá relacionar mejor la actividad de los hongos MA con los conceptos que acaban de exponerse sobre plantas y metales.

El hecho de que se encuentren colonizaciones MA espontáneas en la mayoría de observaciones realizadas "*in situ*" sugiere una cierta tolerancia de los hongos MA a los metales pesados (Turnau & Haselwandter, 2002). En efecto, existen evidencias experimentales que demuestran que las poblaciones de hongos MA en el suelo logran adaptarse a concentraciones elevadas de metales pesados (Biró *et al.*, 1993; Griffioen *et al.*, 1994; Köves-Péchy *et al.*, 1999; Del Val *et al.*, 1999a y b; Takács *et al.*, 2001). La selección de ecotipos adaptados al estrés se facilita por la enorme plasticidad genética de estos hongos y por tener un ciclo de vida mas corto que la planta (Leyval *et al.*, 2002).

El estudio sobre la tolerancia a metales de hongos MA presenta dificultades ya que es difícil separar la tolerancia de la planta, de los mecanismos de tolerancia o mitigación del hongo a este tipo de estrés (Merharg & Cairney, 2000). Es obvio que se puede estudiar la

reacción de sensibilidad de hongos MA a metales pesados en cultivo axénico, sin embargo, los efectos no tienen por que corresponder necesariamente con la sensibilidad que presentan en estado simbiótico (Colpaert & Van Assche, 1992b). En este contexto, hay que tener en cuenta que la mayoría de los experimentos que han estudiado la colonización por hongos MA en presencia de metales, se han realizado empleando hongos que no procedían de suelos contaminados, lo cual limita la posible interpretación de los resultados (Gildon & Tinker, 1983; Graham *et al.*, 1986; McGee, 1987; Chao & Wang, 1990). Por estas razones, se recomienda el uso de hongos MA adaptados al ecosistema contaminado y poder ir incrementando los conocimientos y generalizando las conclusiones (Leyval *et al.*, 2002).

Hasta los años 1999, se habían aislado muy pocos hongos MA tolerantes a metales (del Val, 1999). Por citar algunos ejemplos, se ha descrito que un ecotipo de *Glomus mosseae* aislado de suelos contaminados de forma natural, demostró una mayor tolerancia a metales que otro ecotipo de la misma especie aislado de una zona no contaminada (Leyval *et al.*, 1995). Normalmente, la tolerancia a los metales de ecotipos adaptados se determina en relación a la capacidad de germinación de sus esporas y el desarrollo del micelio en suelos contaminados con metales y comparando los resultados con los de una cepa sensible de referencia (Weissenhorn *et al.*, 1993, 1994). En estos estudios, la germinación de las esporas fue más sensible que la extensión de las hifas, una vez que la espora había germinado. Sin embargo Joner & Leyval (1997), observaron que el crecimiento de las hifas se inhibe a determinadas concentraciones de metal, lo que sugiere un grado de sensibilidad a los metales diferente para la germinación de esporas y para el crecimiento de las hifas.

### ***2.10.3. Absorción de metales pesados y su transporte en plantas micorrizadas***

Mediante la utilización de sistemas de cultivo compartimentados que separan las hifas extraradicales de las raíces se ha podido demostrar la absorción y traslocación de metales por hongos MA (Cooper & Tinker, 1978; Burket & Robson, 1994; Joner & Leyval 1997).

En general, se sabe que, una vez que los metales han entrado en las hifas, estos pueden ser inmovilizados o transferidos a la raíz, y una vez allí, pueden ser quelados o transferidos a la parte aérea (Salt *et al.*, 1995). Según Salt, la traslocación de metales de la raíz a la parte aérea tiene lugar por el xilema, donde los ácidos orgánicos complejos y las fitoquelatinas actúan como agente acomplejantes (Marschner, 1995).

Loth & Hofner (1995), encontraron que la mayor absorción de Cu, Zn y Cd en plantas de avena micorrizada crecida en suelo contaminado, no implicaba un aumento en la

traslocación de metales a la parte aérea. Los resultados de Joner & Leyval, (1997a), sobre la captación de Cd<sup>109</sup>, sugieren una inmovilización del Cd por el hongo dentro del sistema radical. Esto concuerda con la acumulación de metales pesados en las hifas que colonizan *Pteridium aquilinum*, principalmente como material rico en fósforo almacenando dentro de las vacuolas (Turnau *et al.*, 1993). La verdadera contribución de diferentes ecotipos de hongos MA tolerantes a los metales pesados, a la tolerancia de las plantas, bien mediante la acumulación de metales en la raíz, o bien impidiendo su translocación a la parte aérea, tampoco se conoce con exactitud. A concentraciones elevadas de metales los resultados son contradictorios. Algunos estudios muestran un incremento en la concentración de metales parte aérea de plantas micorrizadas (Gildon & Tinker, 1983; Weissenhorn & Leyval, 1995), mientras que en otros estudios se describen concentraciones mas reducidas en parte aérea (Schüepp *et al.*, 1987; El-Kerbawy *et al.*, 1989). Los mismos resultados contradictorios se reflejan en publicaciones recientes (Leyval *et al.*, 2002).

Lo que si parece claro es que el resultado final de la interacción va a estar determinado por una gran cantidad de factores. A modo de ejemplo en dos experimentos realizados con plantas de maíz micorrizadas, dependiendo de las condiciones de crecimiento de la planta y del inóculo empleado se producía un aumento en la micorrización y decrecían las concentraciones de Cd, Zn, Cu y Mn en raíz y parte aérea, o no se producía ningún efecto sobre el crecimiento y la absorción de metales (Weissenhorn, 1995). El-Kherbawy (1989) demostró que el efecto de los hongos en la toma de metales de la planta dependía también del pH del suelo. A mayor pH, se transferían más cantidades de Cd, Zn y Mn a la parte aérea, mientras que a valores de pH menores decrecía la transferencia de los metales aunque, en ambos casos se producía un aumento en el crecimiento de la planta por los hongos MA.

En resumen, se puede concluir que a concentraciones bajas de un metal (micronutriente) la micorrización incrementa la captación del metal y el crecimiento de la planta, mientras que a concentraciones elevadas (tóxicas), la micorrización suele disminuir la concentración de metales en la parte aérea de la planta, aunque favorece el desarrollo de éstas (Dueck, 1986; Borie *et al.*, 2002).

#### **2.10.4. Mecanismos de tolerancia de los hongos MA a metales pesados**

Globalmente, se puede considerar que los microorganismos, en general, y los hongos MA en particular, pueden desarrollar mecanismos de resistencia a metales pesados, bien restringiendo su absorción o incrementando su nivel de tolerancia, lo que les confiere una capacidad incrementada para sobrevivir con elevadas concentraciones internas de los mismos (Joho *et al.*, 1985; Turnau *et al.*, 1996b). El primer mecanismo implica una

absorción reducida de metales propiciada por un incremento en la formación de complejos metálicos fuera de la célula, mediante la liberación de ácidos orgánicos. El segundo, implica una quelación de los metales intracelularmente a través de la síntesis de metalotioninas, fitoquelatinas, polifosfatos y/o la compartimentación dentro de las vacuolas. Las paredes celulares podrían estar también implicadas en la fijación del metal.

Aunque existen diferencias considerables entre hongos MA y hongos formadores de ectomicorrizas, la información disponible sobre mecanismos de resistencia en estos últimos puede ayudar a vislumbrar los posibles mecanismos implicados en MA. Se ha comprobado la existencia natural de hongos formadores de ectomicorrizas tolerantes a metales pesados y esta tolerancia va acompañada de una gran variabilidad genética de las poblaciones (Wilkinson & Dickinson, 1995) lo que se traduce en una gran variedad de mecanismos de tolerancia/resistencia. Entre ellos se encuentran la producción de metalotioninas en *Pisolithus tinctorius* (Morselt *et al.*, 1986), la biosíntesis de poliaminas que mantienen la integridad de la membrana en *Paxillus involutus*, la precipitación de metales (Turnau & Dexheimer, 1995), la acumulación en *P. tinctorius* de Zn en la pared externa de las hifas y la acumulación de los metales en el interior de las hifas mediante su absorción a polifosfatos (Tam, 1995).

En la actualidad se conoce muy poco a cerca de la estabilidad de la tolerancia/resistencia a los metales tanto en hongos MA como en hongos formadores de ectomicorrizas, aunque los resultados preliminares muestran que la tolerancia a metales de un ecotipo de *Glomus mosseae* no desaparecía tras su cultivo en un sustrato libre de contaminación (del Val, 1999).

#### **2.10.5. Significado y potencialidad de los hongos MA en fitoremediación**

Teniendo en cuenta los mecanismos por los cuales las micorrizas benefician el desarrollo de las plantas, se deduce que la fitoestabilización, y en ciertos casos la fitoextracción, podrían potenciarse por la micorrización debido a su capacidad para inmovilizar metales en las hifas del hongo, reduciendo así su translocación a la parte aérea de la planta y, en consecuencia, el flujo de metales a la cadena trófica (Wilkinson & Dickinson, 1995; Díaz *et al.*, 1996). En la revegetación de antiguas zonas mineras se ha demostrado que la micorrización permitió el crecimiento de plantas como *Andropogon gerardii* y aumentó el crecimiento de *F. rubra*, que normalmente crece bien en suelos contaminados (Hetrick *et al.*, 1994). En general se ha demostrado que la utilización de micorrizas mejora el establecimiento de la cubierta vegetal en zonas contaminadas por actividades mineras (Shetty *et al.*, 1994). El efecto beneficioso de las micorrizas en este tipo de práctica se debe tanto al incremento de la tolerancia de la planta a los metales

pesados, como a la mejora de la nutrición vegetal y, en consecuencia, del desarrollo de las plantas, ya que normalmente estas zonas son muy pobres en nutrientes. Es importante considerar que los hongos formadores de micorrizas protegen a las plantas frente a la toxicidad de los metales y, a su vez, éstas parecen propiciar cierta capacidad adaptativa de los hongos a suelos contaminados, al proporcionarles un nicho ecológico protegido (Del Val *et al.*, 1999 a y b). Este beneficio mutuo hace que la utilización de plantas micorrizadas presenten ventajas frente a la utilización de plantas no micorrícicas, o de microorganismos de vida libre (Donnelly & Fletcher, 1994).

En resumen, los hongos MA parecen proteger a las plantas frente a la toxicidad de los metales y, a su vez, la planta protege a los hongos en cierta medida al proporcionarle un nicho ecológico protegido. Estos hechos apoyan una posibilidad factible para el empleo de hongos MA en programas de fitoremediación (del Val *et al.*, 2000; Leyval *et al.*, 2002).

#### **2.10.6. Efectos de los metales pesados sobre las bacterias del suelo (incluyendo PGPRs)**

##### **Aspectos generales**

Es conocido que, de un lado, las bacterias del suelo son sensibles a concentraciones elevadas de metales y, de otro, que llevan a cabo diferentes procesos que influyen en la biodisponibilidad de los metales para otros organismos vivos (Giller *et al.*, 1998). Dado que algunos metales juegan un papel importante como elementos traza en reacciones bioquímicas, cuando un metal con función bioquímica desconocida reemplaza a un metal funcional da como resultado la toxicidad así como también la formación de complejos no específicos en la célula (Crowley & Dungan, 2002).

Los estudios pioneros sobre el impacto de lodos de depuradora que contenían cantidades elevadas de diversos metales pesados demostraron el impacto negativo de dichos productos en la biomasa y actividad de las bacterias del suelo (Koomen, 1990). En efecto, el tema ha merecido la atención de los investigadores por lo que se ha acumulado abundante información bibliográfica que permite concluir los metales pesados afectan negativamente a la diversidad y actividad de los microorganismos en el suelo (Giller *et al.*, 1998; Crowley & Dungan, 2002).

Como se indicó anteriormente, las bacterias del suelo han desarrollado mecanismos de resistencia a concentraciones tóxicas de metales (Giller *et al.*, 1998). Los fenómenos de adaptación siguen dos mecanismos básicos: (1) la alteración específica del transporte de iones, que puede ser interna (evitando la entrada dentro de la célula) o externa (bombeando hacia el exterior) y (2) la alteración química o por unión a factores celulares resultando una forma menos tóxica para la célula. En ecosistemas contaminados por



acción antrópica o de forma natural, por metales pesados, van a persistir las bacterias resistentes a los mismos.

En este contexto, es oportuno señalar que los conceptos de resistencia y tolerancia se confunde con frecuencia ya que han sido definidos de forma arbitraria. Es más apropiado usar el término resistencia para describir un mecanismo directo como resultado a la exposición al metal pesado, por ejemplo la síntesis de metalotioninas en levaduras. En cambio, la tolerancia, esta más relacionada a una propiedad bioquímica y estructural intrínseca del microorganismo, por ejemplo la pared celular impermeable, presencia de polisacáridos en membrana y excreción de metabolitos. Sin embargo, la distinción es difícil en muchos casos, ya que mecanismos directos o indirectos, fisicoquímicos y biológicos pueden contribuir a la supervivencia bacteriana (Gadd, 2000).

### ***Mecanismos de desintoxicación de metales pesados por PGPRs***

Se han descrito diversos mecanismos por los cuales las bacterias pueden paliar la toxicidad de los metales. Entre estos, la formación de complejos extracelulares con el metal, la precipitación y la cristalización. Los metabolitos microbianos implicados son polisacáridos, ácidos orgánicos, pigmentos, proteínas, y otros que pueden eliminar las formas iónicas de los metales y/o convertirlas en menos tóxicas. Los sideróforos quelantes del hierro, pueden quelar otros metales reduciendo sus efectos tóxicos (Gadd, 2000). Se han descrito numerosos ejemplos de cristalización y precipitación de metales mediados por procesos dependientes e independientes del metabolismo microbiano (Gadd, 2000).

De otro lado, la impermeabilidad de la pared y/o membrana celular, la falta de mecanismos de transporte o el aumento de la presión de turgencia se han descrito como mecanismos de resistencia. Sin embargo, algunas cepas resistentes pueden acumular más metal que cepas sensibles, por poseer sistemas de desintoxicación interna muy eficientes. Otro mecanismo se basa en la capacidad que tienen algunas bacterias para transportar metales pesados solubles fuera de la célula. Estos transportadores bacterianos no cambian la estabilidad del metal (propiedades redox), ni tampoco producen compuestos organometálicos estables, por lo que quedan restos solubles del metal disponible, para ejercer efectos tóxicos, sobre las poblaciones bacterianas no resistentes (Southam, 2002).

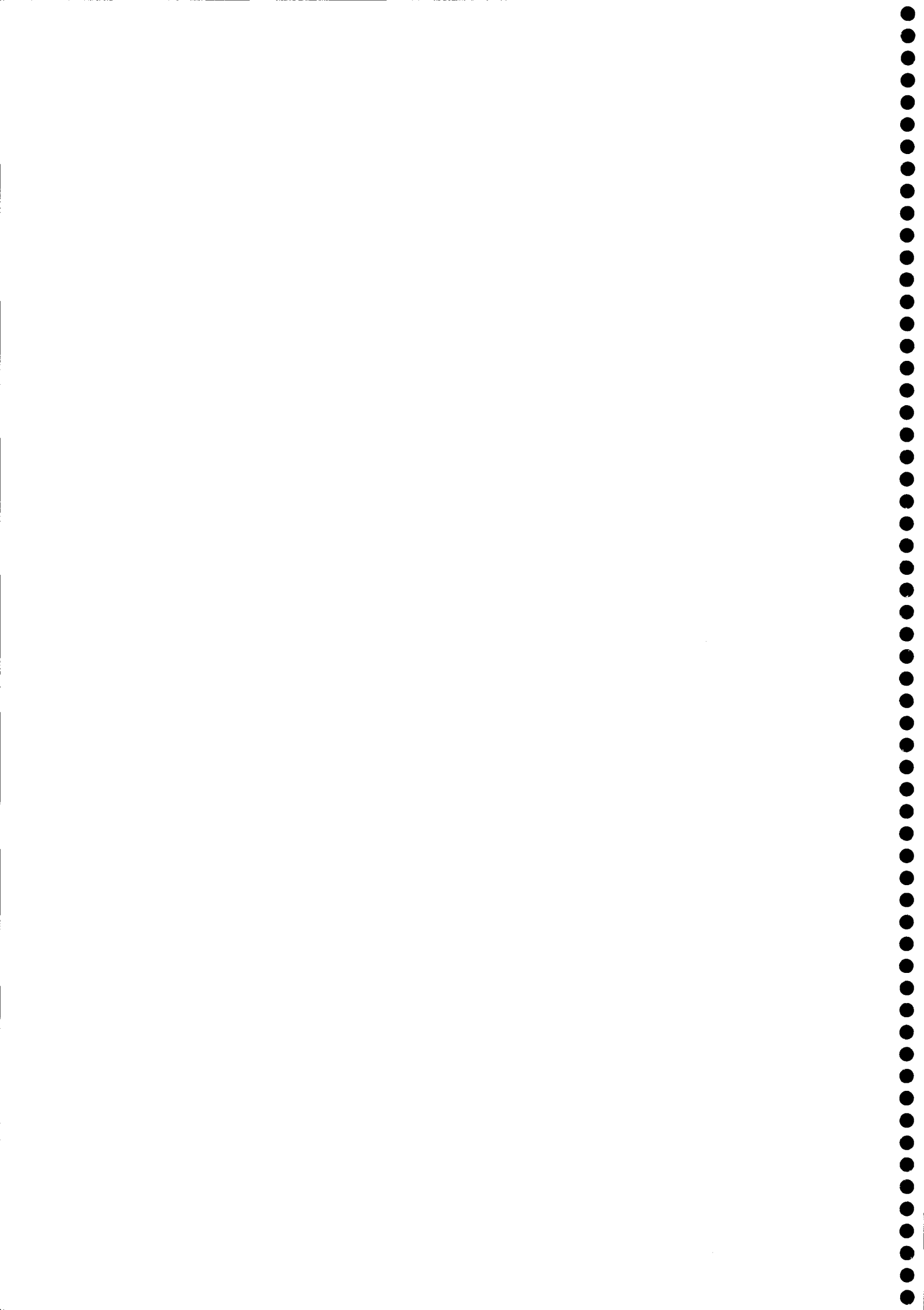
Dentro de la célula, los iones metálicos pueden ser mantenidos en compartimentos dentro de organelas específicas. El metal puede quedar secuestrado en forma de material granular, por ejemplo, como gránulos de fosfato, como proteínas con afinidad con metales, tales como las metalotioninas y péptidos  $\gamma$ -Glu-Cys. Las metalotioninas, son polipéptidos pequeños ricos en cisteína, que pueden unir metales esenciales como Cu y Zn, además de metales no esenciales como el Cd. Las transformaciones bioquímicas de

especies de metales por microorganismos pueden también constituir un mecanismo de detoxificación como por ejemplo la reducción bacteriana del Hg. Otros mecanismos de desintoxicación están basados en la transformación de metales en formas volátiles (Gadd, 2000).

La presente Tesis Doctoral se va a centrar en el estudio del impacto de dos metales pesados: Zn y Cd. Ambos están normalmente asociados en la naturaleza y para ambos se ha descrito ecotipos de bacterias resistentes, adaptadas a concentraciones elevadas de estos metales (Crowley y Dungan, 2002).

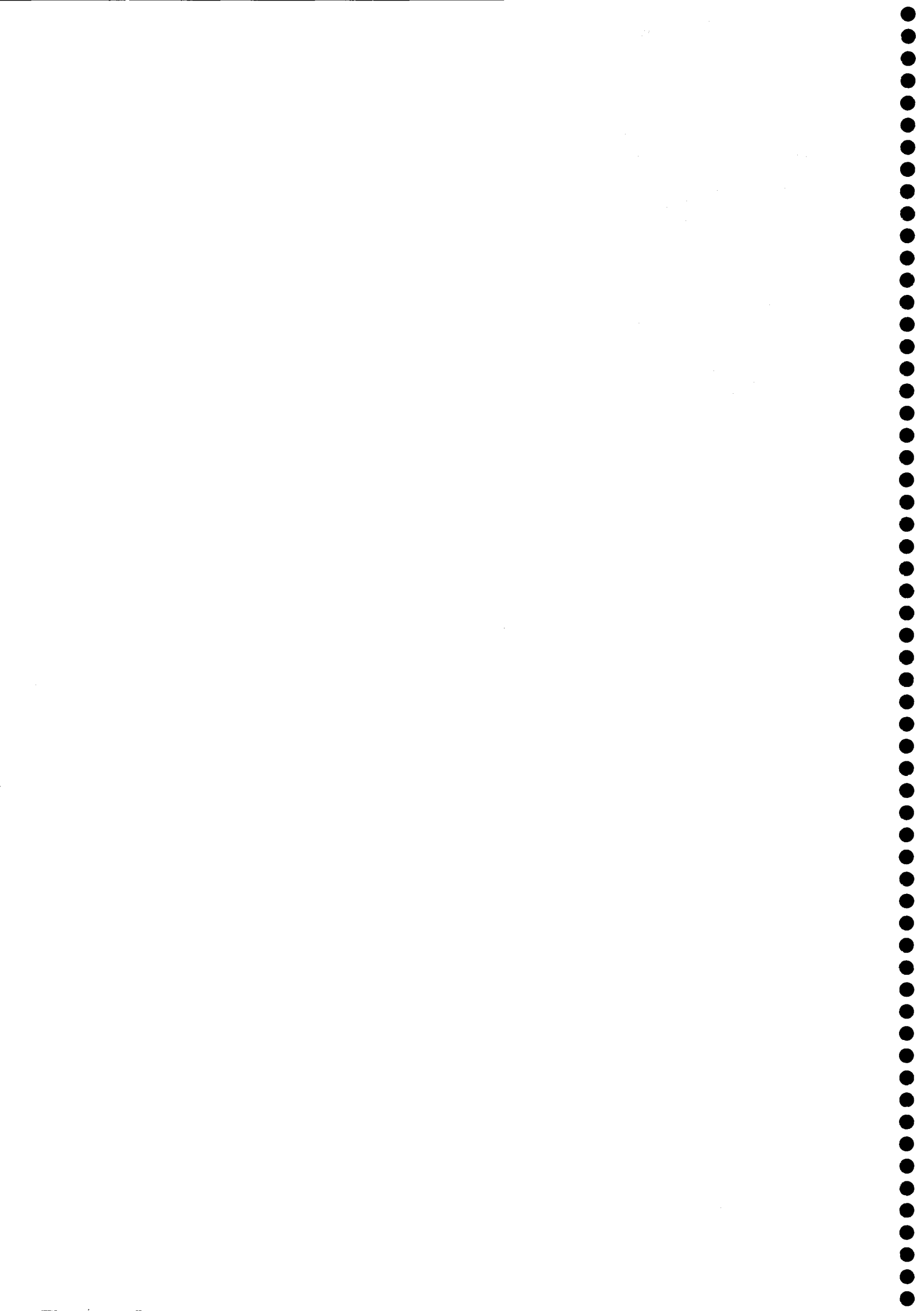
#### ***Potencialidad del uso conjunto de hongos AM y bacterias en fitoremediación***

El hecho de que los metales pesados puede actuar seleccionando poblaciones resistentes o tolerantes de microorganismos hizo pensar en la utilización de estos ecotipos en programas de biorremediación (Burd *et al.*, 1998 y 2001; Grichko *et al.*, 2000). Dado el potencial de las MA en fitoremediación (Leyval *et al.*, 2002) y dado que se ha demostrado la efectividad de las interacciones entre rizobacterias beneficiosas y MA en la micorrizosfera (Barea *et al.*, 2002b y c), parece obvio plantear estudios basados en la utilización conjunta de ambos tipos de microorganismos en fitoremediación de suelos contaminados por metales pesados. No se dispone de información bibliográfica en este sentido por lo que, de acuerdo con unas Acciones Bilaterales entre la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) y la Academia de Ciencias de Hungría, se propusieron las investigaciones correspondientes cuyos resultados son parte de la presente Tesis Doctoral.



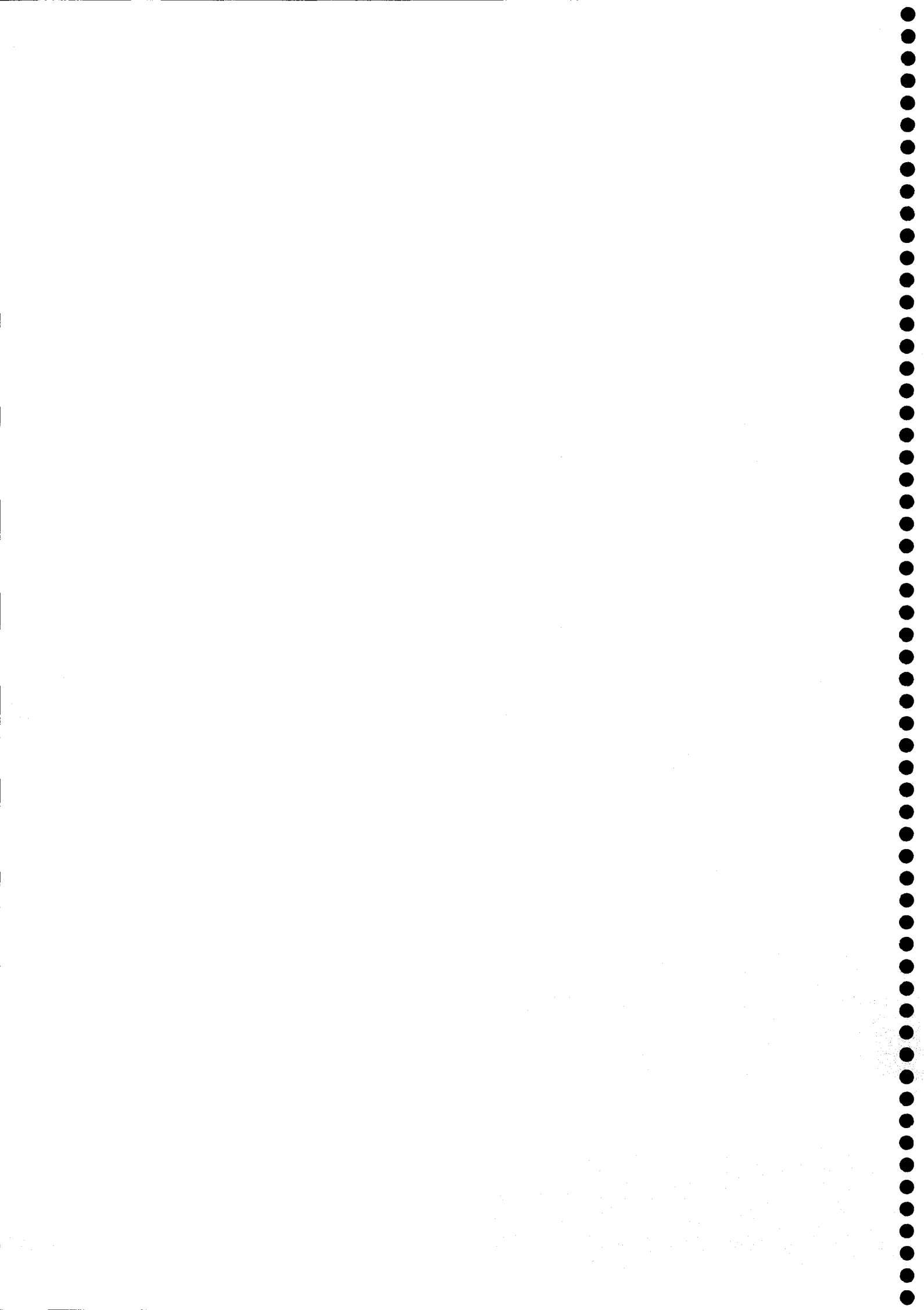
---

## **II. Plan de trabajo**



Se parte de muestras representativas de suelos procedentes de diferentes áreas que muestran síntomas de degradación, como ambientes mediterráneos del sureste español y 3 zonas de la Provincia de Alicante, o contaminadas por metales pesados (Hungría). Teniendo en cuenta los Objetivos propuestos, y considerando la Revisión Bibliográfica de la Temática de la presente Tesis Doctoral, se propuso el siguiente Plan de Trabajo:

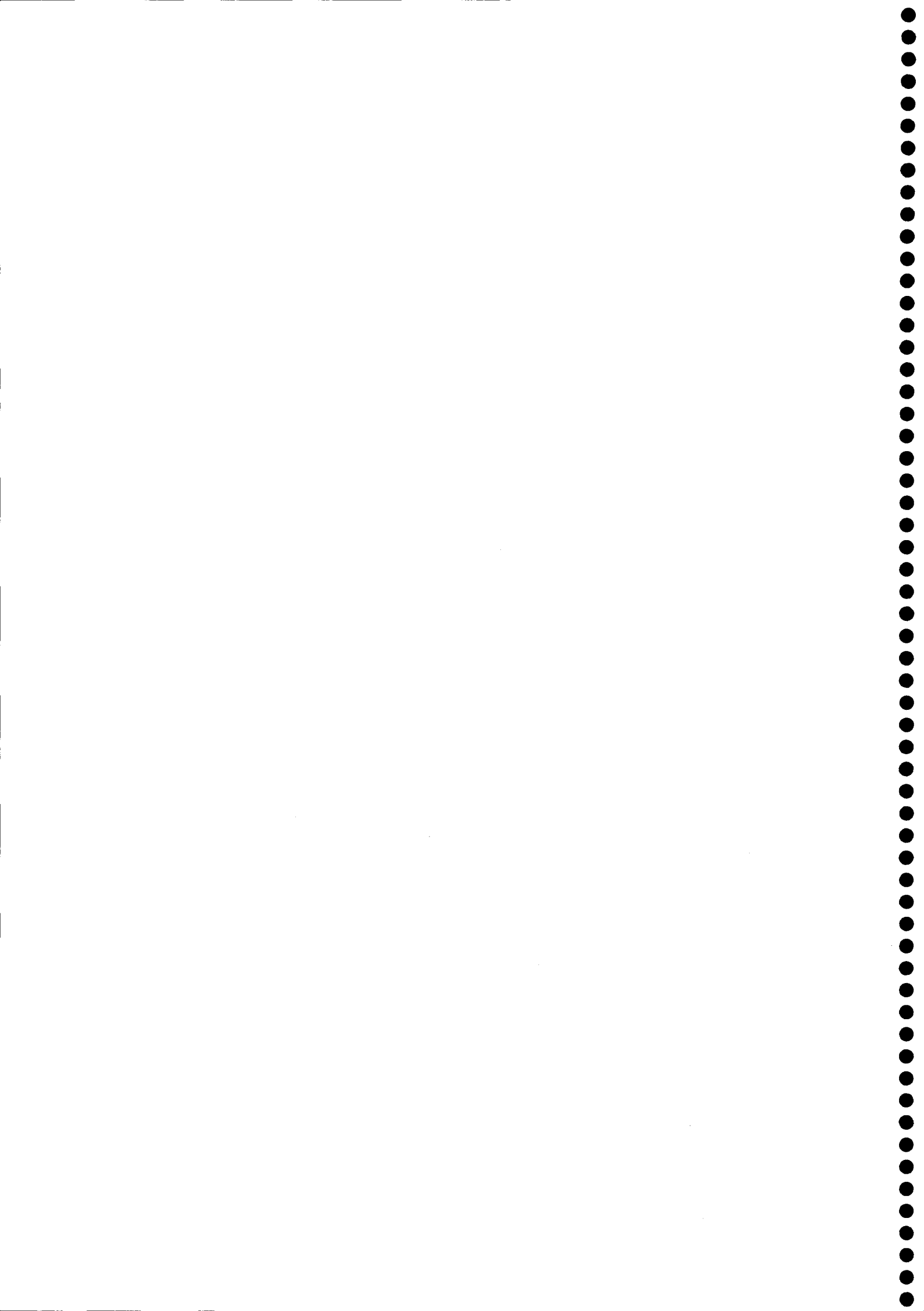
- Aislamiento de hongos MA y PGPRs de los suelos degradados objeto de estudio.
- Selección, mediante ensayos en microcosmos bajo condiciones controladas, de los hongos MA y las PGPRs, aisladas de suelos objeto de estudio, en cuanto a sus efectos interactivos y por su capacidad de aliviar a las plantas del estrés correspondiente.
- Caracterización de los hongos MA (criterios morfológicos) y PGPRs (criterios moleculares) seleccionados.
- Demostración de la eficacia de consorcios hongos MA/PGPRs para incrementar la resistencia de las plantas a los estreses inducidos (osmótico o por metales), en suelos provistos de su microbiota habitual.
- Estudio de los posibles mecanismos de resistencia/adaptación a estreses osmóticos o presencia de metales pesados (Zn ó Cd) de los aislados bacterianos seleccionados.
- Estudio *"in vitro"* del efecto de los aislados bacterianos sobre la germinación de esporas de los hongos MA, en presencia de Zn ó Cd.
- Estudio del efecto de los aislados bacterianos sobre la fisiología de la MA y del desarrollo de actividades enzimáticas en la micorrizosfera, en suelos sometidos a la presencia de Zn ó Cd.



---

### **III. Materiales y Métodos**





## 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELOS EMPLEADOS

Se utilizaron suelos procedentes de tres localidades, cuyas características se describen al presentar el grupo de ensayos específicos que utilizaron dicho suelo. El suelo se utilizó en la mayoría de los ensayos en condiciones naturales, tamizado a través de una malla de 2 mm de abertura. En algunos de los ensayos se mezcló con arena gruesa, para mejorar la aireación y evitar la compactación en las macetas, la proporción será indicada en la descripción de cada ensayo. En aquellos ensayos en los que se necesitaba eliminar los propágulos micorrízicos naturales para evaluar la actividad de los introducidos, el suelo o su mezcla con arena, se tinalizó a vapor fluente durante una hora cada día durante tres días seguidos.

## 2. AISLAMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE SUELO RIZOSFÉRICO

Para el aislamiento de las bacterias, se siguió el método descrito por Ponchon & Tardieux (1962). Se procedió a tomar 1 gramo de suelo rizosférico, se seleccionó aquel que estaba asociado más íntimamente a la raíz de plantas crecidas en condiciones naturales, y se transfirió a tubos que contenían 9 mL de solución salina al 0.85% estéril. Los tubos se agitaron por un periodo de 2 min, tras el cual se realizaron diluciones seriadas en condiciones de esterilidad. Se tomaron las diluciones  $10^5$  y  $10^7$  y se sembraron 0.2 mL con medio de cultivo NB (Nutrient Broth, Oxid, 8 g L<sup>-1</sup>) suplementado con agar (1.6%). Una vez sembradas las placas, se incubaron a 28 °C durante dos días. Los microorganismos se seleccionaron en función de su abundancia relativa. El número de unidades formadoras de colonia (ufc) resultantes se refirió a gramo de suelo seco.

## 3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

La identificación de los aislados bacterianos seleccionados, se realizó mediante secuenciación del ADN que codifica la subunidad ribosómica 16S. El ADN se extrajo a partir de cultivos puros según el método de Giovanetti *et al.*, 1990. La amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando oligonucleótidos universales de procariotas 27f y 1495r (Lane *et al.*, 1991) que permite la amplificación de casi la totalidad del gen.

### 3.1. Amplificación del ADNr 16S

Se realizó mediante PCR en un volumen final de 40 $\mu$ L. La mezcla de reacción contenía: 0.5 $\mu$ M de cada primer, 100 $\mu$ M dNTPs, tampón de PCR 1X (Sigma), 2.5 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 10 ng de ADN bacteriano y 0.25 U Taq polimerasa (Sigma).

Se incluyeron controles negativos en todas las amplificaciones de PCR para detectar la presencia de posibles contaminantes en los reactivos. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer con el siguiente programa: en primer lugar, la mezcla de reacción se incubó a 95°C durante 4 min, para desnaturalizar el ADN molde. Posteriormente se realizaron las extensiones utilizando un programa que consistía en 30 ciclos de 30 a 94 °C (desnaturalización), 45 a 56 °C (unión), 1 min a 72 °C (extensión). Finalmente, y para completar la extensión, un ciclo de 5min a 72 °C .

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (1.2%), usando TAE 1X como tampón de electrodo. Las bandas correspondientes al ADNr 16S en cada aislado bacteriano fueron cortadas en la agarosa para su posterior purificación [utilizando el kit Qiaex II (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante].

### 3.2. Clonado del ADNr 16S

Los fragmentos de ADN purificados de la agarosa fueron ligados al vector plasmídico pGEM-T (Promega) en una proporción vector: inserto de 1:3. La ligación se llevó a cabo añadiendo 5  $\mu$ L de tampón de ligación 2X y 1 $\mu$ L de ADN-ligasa (Promega) en un volumen final de 10  $\mu$ L completado con agua mQ. La mezcla de reacción se incubó a 4 °C, durante 16 horas

### 3.3. Transformación de células competentes

La transformación de células competentes de *E. coli* con ADN plasmídico, se realizó utilizando el método descrito por Nishimura *et al.*, 1990.

Una alícuota de 100  $\mu$ L de la suspensión celular (células competentes), mantenida a -80 °C, se transfirió a un baño de hielo y se le añadieron 4  $\mu$ L de los productos de ligación (ADNr 16S-pGEM-T). La mezcla se incubó primero en un baño de hielo durante 30 min, a continuación a 42 °C durante 1 minuto y finalmente en un baño de hielo durante 2 min. Posteriormente se añadieron 900  $\mu$ L del medio LB y las células se incubaron a 37 °C durante una hora con agitación.

Las células que habían adquirido el plásmido, y por tanto la resistencia a la ampicilina, se seleccionaron sembrando alícuotas de 100  $\mu$ L en placas de LB sólido

suplementado con ampicilina (100µg/mL), 40µL IPTG (stock 20 mg/mL) y 40µL x-GAL (stock 20mg/mL). Este sistema permite la selección por color de las colonias que han adquirido el plásmido con el inserto de ADNr 16S (color blanco) frente a las que adquieren el plásmido vacío (color azul).

Tras la selección de colonias blancas con el inserto de ADNr 16S en el plásmido pGME-T se procedió a su cultivo en medio líquido LB suplementado con ampicilina (100µg/mL) para posterior purificación del ADN plasmídico mediante minipret con el kit comercial QIAprep spin Miniprep de QIAGEN.

#### 3.4. Secuenciación de ADN

La secuenciación del ADNr 16S, se llevó a cabo por el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra utilizando un secuenciador Applied Biosystems (modelo 373 STRECH). El método de secuenciación utilizado fue ABI PRISM, Dye Terminator con "Ampli Taq" ADN Polimerasa (Perkin Elmer), basado en la utilización de dideoxynucleotidos marcados con cromóforos fluorescentes.

#### 3.5. Análisis de las secuencias de ADN

El análisis de la homología de las secuencias de ADNr 16S correspondientes a cada aislado bacteriano se realizó mediante los programas FASTA y BLAST disponibles universalmente en los servidores NCBI y EBI.

### 4. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) EN MEDIO DE CULTIVO

Para la cuantificación del ácido indol acético producido por parte de los aislados bacterianos, estos se crecieron en 150 mL de medio líquido NB (Oxid, 8 g L<sup>-1</sup>), pH 7.5, 28 °C de temperatura y a 150 rpm de agitación. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica equivalente a 10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup>, se centrifugaron a 7000 g, durante 10 min, tomando posteriormente alícuotas de 3 mL del sobrenadante y haciéndolas reaccionar con 2 mL del reactivo de Salper (2mL cloruro férrico 0.5 M y 98 mL de ácido perclórico al 37%), dejándose 30 min de incubación en la oscuridad a temperatura ambiente, (Wöhler, 1997). La absorción de la mezcla de reacción fue medida posteriormente a 535 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. La concentración de ácido indol acético se

determinó a partir de una curva patrón elaborada con concentraciones conocidas de esta auxina y valoradas del mismo modo que las muestras problemas.

## 5. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE BACTERIAS

La determinación del contenido de prolina, glutamato y proteínas en la biomasa bacteriana se realizó a partir de extractos celulares siguiendo el protocolo de Belgrader *et al.*, 1999. Con algunas modificaciones que se describen a continuación: cada cultivo se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. El primer sobrenadante se conservó a 4 °C para el análisis del AIA. Posteriormente el pellet obtenido se lavó dos veces con solución salina al 0.85%, centrifugando de nuevo a 10000 rpm, 10 min a 4 °C. El sobrenadante se retiró y el pellet se resuspendió en 4 mL de buffer de lisis (100mM EDTA, 50 mM NaCl pH 6.9) y lisozima 1 mg/mL (Sigma), incubando a 30 °C durante 90 minutos. A continuación se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 14000 rpm durante 25 min. El sobrenadante final obtenido se mantuvo en hielo o se conservó a -20 °C, hasta su utilización.

### 5.1. Determinación de prolina

El contenido de prolina se determinó por colorimetría (Bates *et al.*, 1973). Para ello se tomaron alícuotas de 1 mL del extracto bacteriano (obtenido por el procedimiento descrito en el apartado anterior) que se hicieron reaccionar con 1 mL de ninhidrina ácida (se prepara calentando 1.25 g de ninhidrina en 20 mL de ácido fosfórico 6M y 30 mL de ácido acético glacial; la mezcla resultante, se conserva a 4 °C durante no más de 24 horas) y 1 mL de ácido acético glacial durante 1 hora a 100 °C. La reacción se detuvo introduciendo los tubos en baño de hielo. La mezcla de reacción se extrae con 2 mL de tolueno, agitando vigorosamente durante 20 s. El cromóforo obtenido, ahora en el tolueno, se deja a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 530 nm, utilizando tolueno como blanco. La concentración de prolina se determina a partir de una curva patrón elaborada con concentraciones conocidas de este aminoácido y valoradas del mismo modo que las muestras problemas.

### 5.2. Determinación de glutamato

Se empleó el método descrito por Bergensen, 1982 (Soussi *et al.*, 2001). Las bacterias se cultivaron y aislaron siguiendo la metodología de Belgrader *et al.*, 1999, como se ha descrito anteriormente. Después de la obtención del extracto bacteriano se procedió a la precipitación de proteínas por adición de ácido tricloro acético (TCA) al 5%, dejando actuar 3 horas a 4 °C. El precipitado obtenido se eliminó por centrifugación a 10000 g durante 10 min. El sobrenadante resultante se neutralizó con KOH previo a su utilización como extracto enzimático. El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 mL de una mezcla de reacción que contenía:

Tampón glicina-hidrazina pH 9 .....	300/250 mM
NAD <sup>+</sup> .....	1.6 mM
ADP .....	1.0 mM
GDH .....	4.5 U mL <sup>-1</sup>

La reacción se inicio añadiendo 100  $\mu$ L de extracto enzimático. El NAD<sup>+</sup> y la hidrazina forman un compuesto que absorbe considerablemente a 340 nm. La reducción de NAD<sup>+</sup> se siguió a 340 nm durante un tiempo de 45 min a 30 °C en un espectrofotómetro termostatzado. Como control se adicionaron todos los reactivos de la mezcla excepto la glutamato deshidrogenasa.

El contenido en glutamato expresado en mg glutamato, se calculó según las expresiones:

$$\Delta E \text{ glutamato} = \Delta E \text{ muestra} - \Delta E \text{ control}$$

### 5.3. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas de los extractos bacterianos se determinó por el método de Bradford (1976) basado en la unión del azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas. Se utilizaron alícuotas de 0.1 mL convenientemente diluidas para que contengan entre 10 y 50 mg de proteína. El cálculo de la concentración de proteínas se realizó por comparación con una curva patrón de seroalbumina bovina (Sigma).

## 6. OBTENCIÓN DE ESPORAS Y ESPOROCARPOS DE HONGOS MA MEDIANTE LA TÉCNICA DEL TAMIZADO HÚMEDO Y DECANTACIÓN

La obtención de esporas de hongos MA mediante la técnica del tamizado húmedo y decantación (Gerdeman & Nicolson, 1963) consiste en realizar una suspensión de 50-100 g de suelo en aproximadamente 1 L de agua. Tras dejar decantar la mezcla unos instantes, se procede a su tamizado a través de una serie de tamices de diámetro de poro decreciente. De esta forma, las esporas y los esporocarpos del hongo (si los hubiera), que se mantienen en suspensión más tiempo que el resto de las partículas del suelo, serán retenidas, según su tamaño, en los distintos tamices empleados. Específicamente, se utilizaron 3 tamices superpuestos de 500, 250 y 50  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. En cada uno de los cuales, quedará retenida una fracción distinta de la suspensión, así en el tamiz superior (500  $\mu\text{m}$ ) quedan restos de material vegetal (raíces) y fragmentos grandes del suelo. En el intermedio (250  $\mu\text{m}$ ), quedan raíces muy finas, esporas unidas al micelio del hongo y esporocarpos en caso de que el hongo los produjera. En el tamiz inferior (50  $\mu\text{m}$ ) se retienen las esporas aisladas.

La operación de tamizado se realiza varias veces, agitando y decantando sucesivamente. Las esporas y esporocarpos recogidos de sus respectivos tamices se obtienen con ayuda de un microscopio estereoscópico y unas pinzas de relojero, se transfieren, a placas Petri, con papel de filtro humedecido conservándose a 4 °C hasta su posterior uso.

## 7. IDENTIFICACIÓN DE ESPORAS DE HONGOS MA

Tras la extracción de esporas del suelo, mediante el método anteriormente descrito, se colocaron en agua y examinaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico con luz reflejada. Las esporas se separaron en tipos distintos en base a su morfología, color, tamaño y organización. Una vez realizada una separación inicial, las esporas se depositaron en portaobjetos con una gota de medio de montaje. Por lo general se utilizan dos tipos de medios: PVLG y Melzer- PVLG en proporción 1:1.

<i>PVLG</i>	<i>Reactivo de Meltzer</i>
Alcohol de polivinilo (APV) ..... 1.66 g	IK ..... 1.5 g
Acido láctico ..... 10 mL	Yodo ..... 0.5 g
Glicerina ..... 1 mL	Hidrato de Cloral ..... 100 g
H <sub>2</sub> O ..... 10 mL	H <sub>2</sub> O ..... 22 mL

La observación al microscopio óptico permite ver el número de capas de la espora, las características de las mismas, color, si da reacción en presencia del reactivo de Meltzer, morfología de la hifa de sustentación, si presentan sáculo esporogénico, cicatrices, etc. Para la identificación de las especies, en aquellos casos en los que ésta fue posible, se utilizaron las claves contenidas en la página web del INVAM (Internacional Culture Colection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi) (<http://www.invam.caf.wvu.edu>).

## 8. PRODUCCIÓN DE INÓCULOS PUROS DE HONGOS MICORRÍDICOS

Se utilizaron *Sorghum bicolor* y *Trifolium repens* como plantas hospedadoras. Las semillas se esterilizaron, pregerminaron y plantaron. Como sustrato de crecimiento se empleo una mezcla suelo:arena:vermiculita (1:1:1) estéril. Las plántulas se inocularon con las esporas de cada uno de los morfotipos aislados y se dejaron crecer durante 4 meses bajo condiciones de invernadero. Tras este tiempo se aislaron esporas de suelo rizosféricos y en el caso de encontrar tipos diferentes se volvió a repetir el proceso de sembrado hasta obtener un solo tipo de esporas y por tanto un inóculo puro.

## 9. ESTERILIZACIÓN DE ESPORAS DE HONGOS MA

A partir de cultivos puros de *G. mosseae* autóctono aislado de suelo contaminado por Zn o suelo contaminado por Cd (Nagyhörcsök, Hungría), se seleccionaron esporas y se esterilizaron en superficie según el método descrito por Mosse (1962). Las esporas se colocan sobre un papel de filtro en el portafiltros de un quitasato y se hace pasar a través del mismo una solución que contiene estreptomycin 0.04%, cloramina T 2%, y Tween 80 al 0.1%, durante 18 min, transcurridos los cuales se lavan lentamente con 500 mL de agua destilada estéril para eliminar el exceso de detergente. Una vez finalizado el proceso, se extrae el papel de filtro con las esporas en superficie y se coloca sobre una placa Petri estéril, quedando así disponible para su posterior uso.

### 9.1. Medio para cultivo "in vitro" de esporas MA

Una vez esterilizadas en superficie las esporas se transfieren, mediante pipeta capilar estéril, a placas de Petri de 9 cm de diámetro, con un medio de crecimiento consistente en MES [ácido 2-(N-monofolin) etano sulfónico] 10 mM. Este compuesto no ejerce ningún efecto significativo sobre la germinación de las esporas o el desarrollo del micelio de



hongos MA (Carr & Hinkley, 1985). Adicionalmente, al medio tamponado se le aplicó Gel-Groth

La composición del medio tamponado es el siguiente: 0.195 g de MES, 0.4 mg/mL, 0.05mg/mL sulfato magnésico, 100 mL de agua destilada. Además, como complemento al medio de crecimiento, se aplicó las correspondientes concentraciones de  $\text{CdSO}_4$  (0, 5, 15 y 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y  $\text{ZnSO}_4$  (0, 10, 50 y 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Este ensayo de germinación sólo se realizó en los aislados MA obtenidos a partir de suelos contaminados.

El medio de crecimiento, donde se depositaron las esporas (aislados autóctonos), se esterilizó a 120 °C, durante 20 min. Este medio presenta como característica principal, el carecer prácticamente de nutrientes, dado que se ha demostrado que la mayoría de estos ejercen un efecto inhibitor sobre la germinación de esporas MA (Hepper & Smith, 1976). Una vez colocadas las esporas en las placas de Petri se sellaron con parafilm.

## 9.2. Germinación de esporas de hongos MA

Una vez esterilizadas las esporas en superficie y sembrados ó no la suspensión bacteriana, se colocaron en cada placa de Petri 5 esporas/placa, (7 placas por tratamiento). Las esporas se colocaron ocupando las posiciones de los vértices de un pentágono imaginario. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron en oscuridad a 25 °C.

El proceso de germinación se inicia, por lo general, a los 3 días de incubación, realizándose observaciones al microscopio óptico a diario, al inicio, y posteriormente de forma periódica (4, 7, 10, 15, 20 y 30 días) para evaluar el porcentaje de germinación de las mismas. Una espóra se consideró germinada cuando se detectó la aparición del tubo germinativo.

## 9.3. Desarrollo del micelio de hongos MA

La cuantificación de la extensión de micelio se realizó al microscopio óptico, contándose el número de intersecciones de la hifa en una cuadrícula de 0.5 mm de lado, según el sistema propuesto por Marsh (1971).

## 9.4. Análisis estadístico de los resultados

Los datos de germinación de esporas en cada tratamiento se sometieron a un test de hipótesis en relación a los respectivos controles. El estadístico "Z" calculado se comparó con el valor tabulado para el nivel de significación del 5%.

El análisis estadístico para el desarrollo de micelio se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

## 10. CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN

### 10.1. Tinción de raíces

#### 10.1.1. Tinción con Azul de Tripán (TB)

La extensión de la colonización por parte del hongo de la micorriza fue determinada una vez aplicado el método de tinción de Phillips & Hayman, 1970. Este consiste en calentar las raíces en KOH al 10% durante 20 min., al baño maría, pasados los cuales se lavan con abundante agua y se acidifican con HCl al 1% durante 10 min. Una vez eliminado el HCl se adiciona una solución de azul de tripán al 0.05% en ácido láctico y se mantienen nuevamente al baño maría durante 10 min. Se elimina después el exceso de colorante y las raíces se conservan en ácido láctico hasta posterior observación. De esta forma se tiñen los componentes del hongo en el interior de la raíz, permaneciendo esta sin colorearse.

#### 10.1.2. Tinción vital de la succinato deshidrogenasa (SDH)

Revela las estructuras fúngicas MA vivas (Smith & Gianinazzi Pearson, 1990). Las raíces recién cortadas y depositadas en baño de hielo, se dejaron incubando en solución incubadora adecuada a 37 °C durante 16-18 horas. Transcurrido este tiempo se eliminó a solución incubadora, las raíces se cubrieron con hidrato cloral al 75% y se dejaron durante 15 min al baño maría. En lugar de hidrato cloral se puede usar hipoclorito sódico al 3% de cloro activo, en cuyo caso, después de eliminar la solución incubadora, las raíces se lavan y se dejan en la solución de hipoclorito a temperatura ambiente durante 15-20 min, pasados los cuales se eliminará el hipoclorito y lavaran las raíces nuevamente. Las raíces se conservan en ácido láctico durante no más de 2 de semanas.

<i>Solución incubadora tinción SDH (50mL)</i>	
Succinato de sodio.....	5 mL

Azul de tetrazolio (4 mg/mL) .....	12.5 mL
Tris-HCl 0.2M pH 7.....	12.5 mL
MgCl <sub>2</sub> 5 mM.....	5 mL
Agua destilada.....	15 mL

### 10.1.3. Tinción vital de la fosfatasa alcalina (ALP)

Revela las estructuras fúngicas MA activas (Tisserant *et al.*,1993). Las raíces recién cortadas y depositadas en baño de hielo, se dejaron incubando en solución incubadora adecuada a 37 °C durante 16-18 horas. Transcurrido este tiempo se eliminó la solución incubadora, se lavaron las raíces y se dejaron cubiertas con hipoclorito sódico al 1% de cloro activo, a temperatura ambiente durante 15-20 min, pasados los cuales se eliminará el hipoclorito y lavaran las raíces nuevamente. Las raíces se conservan en ácido láctico durante no más de un par de semanas

<i>Solución incubadora tinción ALP</i>	
Tris ácido cítrico 0.05 M pH .....	9.2
Ácido naftil fosfato.....	0.001%
Fast Blue RR .....	0.001%
MgCl <sub>2</sub> anhidro .....	0.05%
MnCl <sub>2</sub> .....	0.05%

Filtrar una vez preparado.

## 11. LONGITUD DE MICELIO EXTRARADICAL

El micelio extraradical constituye la interfase activa entre el suelo y la planta y se considera la estructura más importante para el cumplimiento de la función de la micorriza en cuanto a captación de nutrientes y agua. La determinación de la longitud de micelio por unidad de peso de suelo se considera un indicador del posible beneficio que reciben las plantas de esta simbiosis y de su contribución al mejoramiento de las propiedades físicas del suelo.

La técnica utilizada esta basada en la de (Jones & Mollison, 1948) consta de los siguientes pasos:

- Pesar 1 gramo de suelo (seco) y colocarlo en un Erlenmeyer de 250mL.

- Agregar 5 mL de solución de hexametáfosfato sódico ó 0.2 g de NaCl. La función de estas sales es ayudar a la dispersión de los agregados del suelo, liberando de esa manera las fracciones de hifas presentes en ellos. Se adicionó 10 mL de azul tripán al 0.05% en ácido láctico y agua destilada hasta ajustar el volumen a 100 mL.
- Se calentó la mezcla en baño María con agitación durante 20 a 30 min.
- Pasar la mezcla por los tamices de 50 y 100  $\mu\text{m}$  con la finalidad de eliminar las fracciones más finas del suelo que dificultan la observación de las hifas al microscopio. Recuperar cuantitativamente el material retenido en ambos tamices depositándolo nuevamente en el matraz.
- Agregar 0.6 g de agar bacteriológico y ajustar el volumen a 100 mL con agua destilada.
- Calentar nuevamente en baño maría para disolver el agar, agitando continuamente. Mientras se agita, manteniendo homogénea la suspensión, se toma una alícuota de 10 mL depositando este volumen en una placa Petri.
- Se deja enfriar sobre una superficie horizontal hasta la formación de un gel semisólido y se observa al microscopio estereoscópico, colocando en la base de la placa una rejilla cuadrículada a exactamente 0.5 cm. Se cuentan las intersecciones hifa-línea y se transforman a longitud de micelio por unidad de peso de suelo utilizando la formula de Newman, 1966:

$$R = \pi AN / 2H$$

Donde: R = longitud de micelio por unidad de peso de suelo

A = Área de la placa

N = Número de intersecciones hifa-línea

H = longitud total de líneas sobre las que se cuentan.

## 12. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN SUELO

Los métodos de detección de las distintas enzimas que se describen a continuación se realizaron sobre muestras de suelo rizosférico previamente aireado para eliminar el exceso de humedad si la hubiera y conservados a 4 °C hasta su utilización. Para cada determinación se añadieron controles que permitieron deducir la descomposición no enzimática del suelo, valor que se le restará al obtenido para cada problema. La concentración del producto de la hidrólisis enzimática se determinó leyendo la densidad

óptica, a la longitud de onda que posteriormente se señala para cada actividad, comparando los resultados con los obtenidos por una curva patrón de concentraciones conocidas.

### 12.1. Deshidrogenasa (García *et al.*, 1997)

Para la determinación de la actividad deshidrogenasa, a 0.1 g de material orgánico ó 1 g de suelo se le añaden 0.2 mL de INT (iodofenil-3-p-nitrofenil-5 tetrazolium cloruro) al 0.4% (p/v). Posteriormente se deja incubar durante 20 horas a 25 °C en oscuridad. Transcurrido este tiempo el producto de la reacción INTF (Iodonitrotetrazolium formazán) se extrae con una mezcla de acetona:tetracloroetileno (1:5) y se mide la absorbancia en espectrofotómetro a longitud de onda  $\lambda = 490$  nm. Este método surge como una combinación de dos métodos anteriores (Benfield *et al.*, 1977; Trevors, 1984). Los resultados se expresan como  $\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$

### 12.2. Fosfatasa (Nannipieri *et al.*, 1982)

Para la determinación de la actividad fosfatasa, a 0.1 g de material orgánico ó 1 gramo de suelo se le añaden 0.5 mL de p-nitrofenilfosfato 0.115M y 2 mL de tampón Maleato 0.1M pH 6.5 se incuba a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente se extrae el producto de la reacción PNP (p-nitrofenol) con NaOH 0.5 M y CaCl<sub>2</sub> 0.5M y se mide la absorbancia en espectrofotómetro a longitud de onda  $\lambda = 398$  nm. Los resultados se expresan como  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$

### 12.3. $\beta$ -glucosidasa (Hayano & Tubaki, 1985)

Para la determinación de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, a 0.1 g de suelo rizosférico se le añadió 0.5 mL de sustrato PNG (4-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranoside) 0.05M y 2mL de tampón maleato 0.1M pH 6.5. A continuación se incubó 37 °C, durante 2 horas y se extrajo el producto de la reacción PNP (p-nitrofenol) con NaOH 0.5 M y CaCl<sub>2</sub> 0.5M.

Finalmente el PNP producido se midió en espectrofotómetro a longitud de onda  $\lambda = 398$  nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Las unidades mediante las cuales se expresan los valores están referidos al peso seco de las muestras. En este caso los resultados se expresan en  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

### 13. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS

La esterilización de semillas se hizo de acuerdo al tipo de semilla a utilizar en cada ensayo. *Trifolium repens*, *Sorghum bicolor*, *Medicago sativa*, *Medicago arborea*, *Genista umbellata* y *Lactuca sativa*, fueron esterilizadas durante 15 min. con lejía comercial al 10%, tras lo cual se lavaron en abundante agua destilada estéril y se dejaron en imbibición un tiempo variable en función del tipo de semilla.

Las semillas de *Retama sphaerocarpa*, se imbibieron, durante 30 min., en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98%. Posteriormente se enjuagaron con abundante agua hasta la eliminación total del ácido. Se cubrieron con HCl al 5%, durante 5 min. A continuación se hicieron varios lavados con agua destilada estéril (mínimo 5 veces cada 3 min.).

### 14. GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

Una vez esterilizadas y embebidas, las semillas se transfirieron a un semillero con vermiculita estéril como sustrato para posteriormente ser transferidas a las macetas definitivas.

### 15. INOCULACIÓN DE MICROORGANISMOS

#### 15.1. Inoculación de micorrizas

El inóculo consistió en una mezcla de suelo que contenía esporas, hifas y fragmentos de raíces micorrizadas. La cantidad y tipo de inóculo aplicado varió en función del tipo de ensayo.

### **15.2. Inoculación de bacterias**

Se realizó aplicando 1 mL del inoculante sobre la radícula de cada planta, (en caso de que estuvieran germinadas) o directamente sobre la semilla, la densidad de cada inóculo aplicado se indica en cada ensayo.

## **16. ENSAYOS DE INOCULACION DE PLANTAS**

### **16.1. Ensayos en microcosmos bajo condiciones controladas**

El tamaño de los contenedores para cultivo de las plantas en este tipo de ensayos nunca excedió de 1 L. En algunos casos las plantas crecieron bajo condiciones de invernadero con temperaturas entre 19-25 °C, fotoperíodo de 16/8 luz/oscuridad y humedad relativa de 70-90%. En los ensayos en los que las plantas crecieron en cámara de cultivo, las condiciones de la cámara fueron: 50% de humedad relativa, con temperaturas entre 18-27 °C, fotoperíodo de 14 h. Las plantas fueron regadas diariamente según necesidades, a excepción de aquellos ensayos en los cuales se pretendió estudiar el efecto del estrés hídrico, en cuyo caso las macetas se pesaron y regaron diariamente ajustándose la cantidad de agua a 70 y 100% de la capacidad de campo según tratamientos.

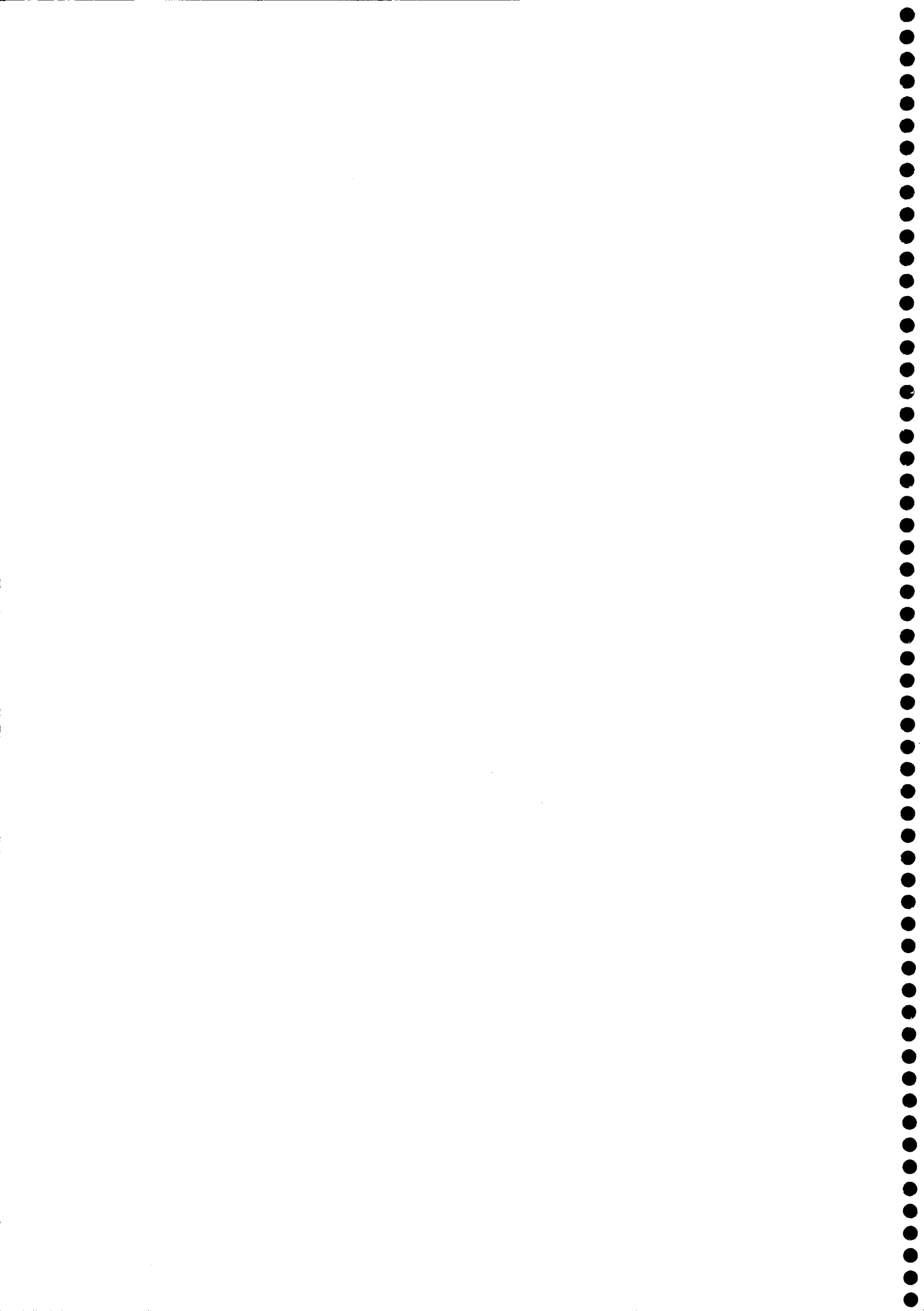
### **16.2. Análisis estadísticos de los resultados**

Los efectos de los distintos tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en cada uno de los experimentos realizados fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA) con un número de vías variables en función de las fuentes de variación del experimento. Las barras en las columnas indican el error estándar y los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente distintos según el test de Fisher, (LSD). Los datos correspondientes a variables experimentales que se expresan en porcentaje se representan como tales valores porcentuales en gráficas, pero el análisis estadístico de los mismos se efectuó tras su transformación arco seno.

---

**IV. Interacción hongos MA-rizobacterias autóctonas, en ecosistemas típicos de la cuenca mediterránea**





## 1. ENSAYOS EN SUELO PROCEDENTE DEL PARQUE NATURAL "SIERRA DE BAZA" (PROVINCIA DE GRANADA)

### 1.1 Aislamiento de Hongos MA y PGPR del suelo objeto de estudio (Granada)

Los hongos formadores de micorriza, se aislaron a partir de suelo rizosférico de plantas de *Retama sphaerocarpa* crecidas en condiciones naturales. Para aumentar la población nativa de los hongos micorrícicos, se prepararon cultivos con planta trampa utilizando *Sorghum bicolor* y *Trifolium repens*, elegidas por su rápido crecimiento y rápida proliferación de raíces. Para el aislamiento de los hongos MA más representativos y la producción de inóculos puros se siguió el protocolo descrito en el apartado **MATERIAL Y METODOS GENERALES**.

De igual forma, a partir de suelo rizosférico de la misma planta seleccionada, (*Retama sphaerocarpa*), se aislaron y seleccionaron las cuatro rizobacterias más abundantes (como se ha descrito en el apartado correspondiente de materiales y métodos).

### 1.2. Selección de Hongos MA y PGPR más efectivos de los aislados en el suelo objeto de estudio (Granada)

#### 1.2.1. *Planta hospedadora y aplicación de los tratamientos biológicos*

La planta seleccionada para la realización de los dos experimentos que se describen a continuación fue *Medicago sativa*, (alfalfa). Las plántulas pregerminadas se sembraron directamente en macetas (de 300 g capacidad), donde el sustrato había recibido, en los tratamientos micorrizados, 10 g de inóculo de cada uno de los hongos MA ensayados (*G. mosseae* ó *G. intraradices*). Los inóculos bacterianos se aplicaron una semana después de la siembra. La concentración de inóculo bacteriano aplicado para el experimento #1 fue de  $10^8$  ufc. En el experimento # 2 se aplicó el inóculo bacteriano a cuatro concentraciones ( $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  y  $10^9$  ufc). Todas las plantas fueron inoculadas con 1 ml de *Sinorhizobium meliloti* a una concentración de  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>.

#### 1.2.2. *Ensayos de invernadero: Características del suelo y condiciones experimentales*

El sustrato utilizado fue una mezcla esterilizada de suelo: arena 1:1, v/v. El suelo fue tamizado y tinalizado durante 1 hora en un autoclave a vapor fluyente, durante 3 días consecutivos. De esta forma el suelo queda libre de propágulos de micorriza. La arena se

esterilizó en el autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Posteriormente la mezcla suelo:arena se reinoculó con 2 ml/maceta del filtrado del suelo para reincorporar la microbiota exenta de propágulos de micorriza. El suelo utilizado procedía del Parque Natural de la Sierra de Baza (Provincia de Granada) y presenta las siguientes características químicas: P disponible (Olsen) = 2.4 mg Kg<sup>-1</sup>; N: 1.2 mg Kg<sup>-1</sup> M.O (Wakley & Black) = 0.49%, pH (H<sub>2</sub>O)=8.2.

### 1.2.3. *Objetivo*

Evaluar, en microcosmos, el efecto de los aislados bacterianos y/o fúngicos de forma individual y de la interacción bacteria-hongo MA con objeto de seleccionar el inóculo más efectivo para el crecimiento de las plantas.

### 1.2.4. *Diseño Experimental*

El experimento se diseñó con dos factores de variación. El factor hongo MA, contenía 3 tratamientos: Control sin micorrizar (C), inoculación con *Glomus mosseae* (M) ó *Glomus intraradices* (I) (ambos autóctonos). El segundo factor fué la inoculación de los cuatro aislados bacterianos. Incluyéndose un control no inoculado con la bacteria (C). Ello dio lugar a un total de 15 tratamientos con 5 repeticiones de cada uno (75 unidades experimentales).

Las plantas se cosecharon a las 12 semanas de cultivo. Una vez cosechadas, se determinaron las siguientes variables experimentales:

- Peso seco de parte aérea y de raíz.
- Extensión de la colonización MA (% de micorrización)
- Número de nódulos en cada planta.

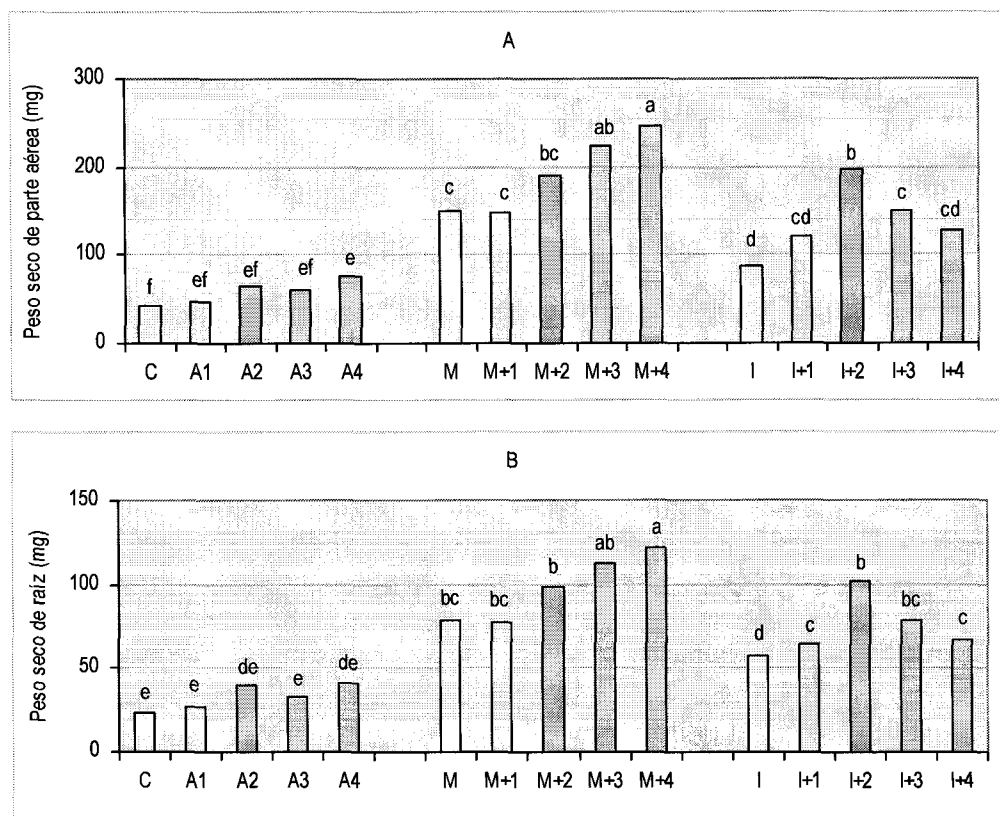
### 1.2.5. *Resultados*

En la tabla 1 se resumen los resultados del análisis estadístico realizado con los datos obtenidos. Se puede comprobar que las diferencias observadas se deben a los factores MA y aislado bacteriano (en algunos casos), y con un mayor grado de significación a la interacción entre factores. La inoculación con los cuatro aislados bacterianos en interacción con los hongos MA, (M\*B) incrementó las distintas variables experimentales analizadas. Los valores medios de los resultados obtenidos en la producción de biomasa vegetal se muestra en la Figura1; los efectos sobre nodulación e infección MA en la Figura 2.

**Tabla 1.** Resultados del ANOVA (Valor de F) realizado para estudiar el efecto de la inoculación combinada micorriza- bacterias.

	Valores de F		
	MA	Aislados Bac.	MA*BAC
Peso seco de parte aérea	8.4*	6.1*	15**
Peso seco de raíz	9.1*	5.4*	22**
Número de nódulos	7.2**	4.8*	8**
% Micorrización	5.1*	3.2 ns	11**

ns: no significativo    \*: 0.05    \*\*: 0.01



**Fig. 1.** Efecto de la inoculación simple o combinada de hongos formadores de micorriza [*G. mosseae* (M) ó *G. intraradices* (I)]-Aislados bacterianos (A1, A2, A3 y A4) sobre el desarrollo de *M. sativa*. (A) Peso seco de parte aérea. (B) Peso seco de raíz.

La Figura 1 muestra el efecto positivo del aislado bacteriano 4 sobre el desarrollo de parte aérea. *G. mosseae*, fue el endofito más efectivo. En el caso de la doble inoculación *G. mosseae*-bacterias se potenció el efecto de este hongo por los aislados bacterianos 3 y 4 siendo más efectiva la interacción de *G. mosseae* con el aislado 4. En el caso de *G.*

*intraradices* fue más efectiva su interacción con el aislado 2. Las plantas micorrizadas con *G. mosseae* presentaron la máxima nodulación y este valor no varió al ser inoculado conjuntamente con los aislados bacterianos (Fig. 2-A). La interacción de *G. intraradices*-aislado 2, produjo un efecto positivo sobre la nodulación, similar al producido por *G. mosseae* y ello pese a que el tratamiento con *G. intraradices*, no varió este valor respecto al control no micorrizado.

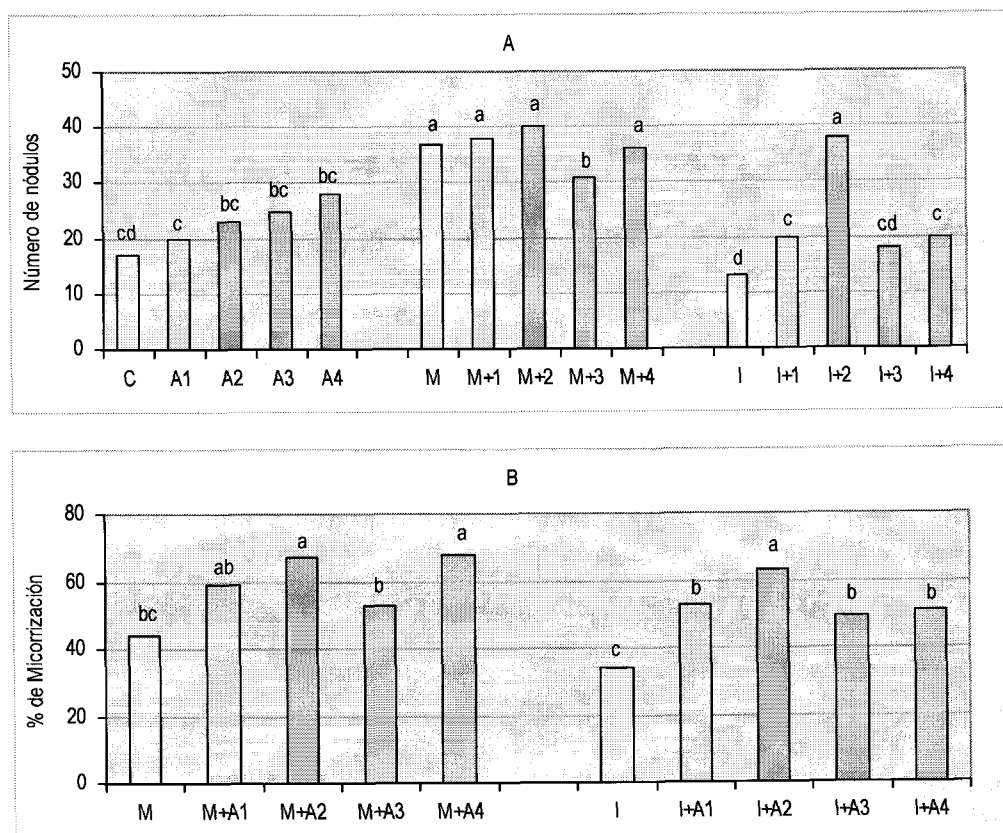


Fig. 2. Efecto de la inoculación simple o combinada de hongos formadores de micorriza [(*G. mosseae* (M) ó *G. intraradices* (I))-aislados bacterianos (A1, A2, A3 y A4)] sobre el número de nódulos (A) y (% infección MA (B)).

La capacidad colonizadora de *G. mosseae* fue estimulada por la inoculación conjunta con los aislados bacterianos 2 y 4 (Fig. 2-B). La interacción de *G. intraradices* con el aislado 2 fue la que produjo la mayor colonización de este endofito.

En base a los resultados expuestos se seleccionaron para el siguiente ensayo la interacción: *G. mosseae* y aislado bacteriano N° 4, por mostrar una mayor efectividad y compatibilidad funcional hongo/bacteria. *G. intraradices* interaccionó mejor con el aislado bacteriano 2, por lo que se seleccionaron estos microorganismos, para ensayos posteriores en suelo natural, por ser *G. intraradices* un endofito muy frecuente en suelos áridos de la cuenca Mediterránea.

### 1.3. Evaluación de la concentración óptima del inóculo bacteriano (aislado 4) PGPR por sus efectos sobre la formación y respuesta de las plantas a la simbiosis MA (*Glomus mosseae* autóctono)

#### 1.3.1. Objetivo

Estudiar, en microcosmos, el efecto de concentraciones crecientes del inóculo bacteriano (aislado 4) aplicado de forma individual o en asociación con *G. mosseae* sobre el desarrollo vegetal de la planta y sobre la infectividad de este hongo MA.

#### 1.3.2. Diseño Experimental

En este estudio se consideró la densidad del inóculo bacteriano como la principal fuente de variación. El inóculo bacteriano fue aplicado a cuatro concentraciones ( $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  ufc ml<sup>-1</sup>) tanto individualmente como en asociación con *G. mosseae*. Ello, comparado con controles bien con la bacteria ó bien con el hongo MA lo que proporcionó 10 tratamientos que, con cinco repeticiones cada uno, resultó en un total de 50 macetas. Las plantas se cosecharon a las 8 semanas de crecimiento y una vez cosechadas, se determinaron las siguientes variables experimentales:

- Peso seco de parte aérea y de raíz.
- Extensión de la colonización MA (% de micorrización)
- Número de nódulos en cada planta.

#### 1.3.3. Resultados

El aislado bacteriano 4 estimuló el crecimiento de la parte aérea de la planta al aplicarse a una concentración equivalente a  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup> tanto en forma individual (92% en comparación con el control sin micorrizar) como en interacción con *G. mosseae* (57% de incremento comparado con el control MA) (Fig. 3-A).

El inóculo bacteriano fue más efectivo sobre el desarrollo radicular a una concentración de  $10^9$  ufc ml<sup>-1</sup> e incrementó este parámetro en un 258% (respecto al

control sin micorrizar). En asociación con *G. mosseae* la máxima efectividad se evidenció a la concentración de  $10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ , incrementando el peso de raíz en un 60% (al comparar con el control MA) (Fig. 3-B).

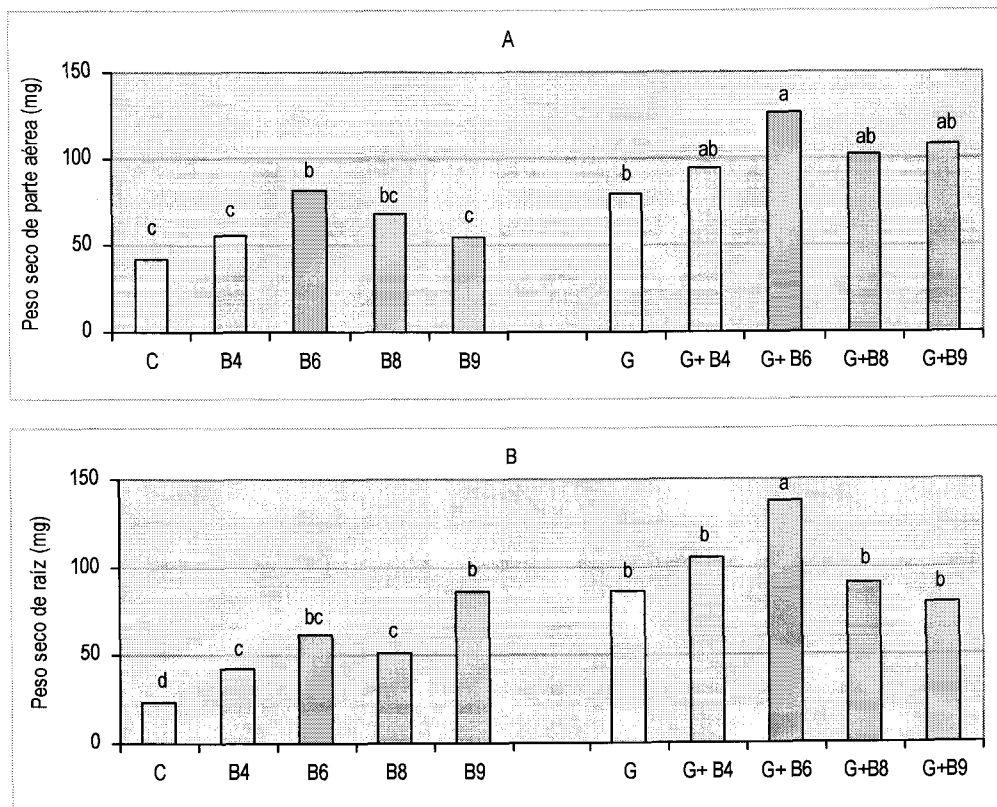


Fig. 3. Efecto de la aplicación del inóculo bacteriano (B) a cuatro concentraciones [ $10^4$  (B4),  $10^6$  (B6),  $10^8$  (B8),  $10^9$  (B9) ufc  $\text{ml}^{-1}$ ] asociado o no con *G. mosseae* sobre el desarrollo de *M. sativa* [parte aérea (A) y raíz (B)]

En la Fig. 4-A observamos que solo el tratamiento con *G. mosseae* incrementó significativamente (en un 45%) la nodulación. La doble inoculación de los microorganismos no afectó significativamente este parámetro respecto a la inoculación solo con *G. mosseae*. En contraste, la doble inoculación de *G. mosseae* con la bacteria fué efectiva incrementando el porcentaje de micorrización. Particularmente a las densidades más bajas del inóculo bacteriano, ( $10^4$  y  $10^6$  ufc), se produjo un incremento de colonización MA de un 116 % ( $10^4$  ufc) y 100% ( $10^6$  ufc) respectivamente (Fig. 4-B).

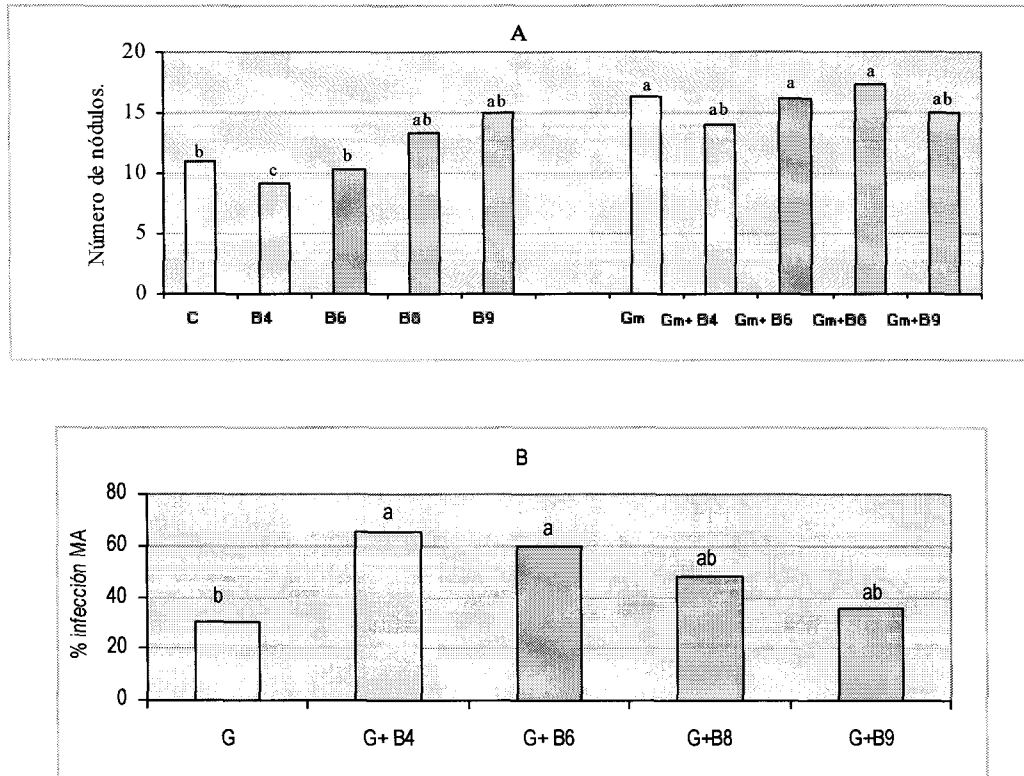


Fig. 4. Efecto de la aplicación del inóculo bacteriano (B) a cuatro concentraciones [ $10^4$  (B4),  $10^6$  (B6),  $10^8$  (B8),  $10^9$  (B9) ufc ml<sup>-1</sup>] asociado o no con *G. mosseae* sobre la nodulación (A) y % de infección MA (B) en *M. sativa*.

Puesto que los valores máximos de crecimiento se obtuvieron al inocular el aislado bacteriano a una densidad de  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup> en asociación con *G. mosseae*. Se seleccionó esta concentración por ser la más beneficiosa tanto para el desarrollo de la planta y la nodulación como para el desarrollo del hongo MA.

#### 1.4. Identificación de los aislados bacterianos autóctonos (Sierra de Baza, Granada) más eficientes, mediante clonado y secuenciación del ADN ribosómico 16S

Los aislados bacterianos catalogados como Bacterias 2 y 4 en los ensayos 2 y 3, se identificaron mediante la secuenciación del ADNr 16S. La amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando primers universales de procariotas 27f y 1495r (Lane *et al*, 1991) como se ha descrito en Material y Métodos.



Los dos aislados bacterianos dieron más de 98% de identidad con *Bacillus endophyticus*, y un 99% de homología entre ellas. Por lo tanto fueron consideradas como dos razas de la misma especie, al presentar diferentes respuestas cuando fueron sometidas "in vitro" a déficit de nutrientes y a estrés osmótico y salino como se describirá en el apartado correspondiente.

### 1.5. Efectos de PGPRs (2 razas de *Bacillus endophyticus* autóctonos, Granada) y hongo MA autóctono, *Glomus mosseae*, sobre el crecimiento de una planta representativa de la sucesión natural (*Retama sphaerocarpa*), en suelo natural provisto de su microbiota habitual

#### 1.5.1. *Planta hospedadora y aplicación de los tratamientos biológicos*

La planta seleccionada para la realización del experimento que se describe a continuación fue *Retama sphaerocarpa*. El sustrato (mezcla de suelo natural: arena 1:1, v/v) había recibido, en los tratamientos micorrizados, 10 g de inóculo de *G. mosseae*. Los inóculos bacterianos (*Bacillus endophyticus* raza 2 y 4) se aplicaron a la semana de la siembra ( $10^6$  ufc/ml por planta), después de dejar una plántula por contenedor. Todas las plantas fueron inoculadas con 1 ml de *Rhizobium* sp. a una concentración de  $10^8$  ufc/ml.

#### 1.5.2. *Objetivo*

Evaluar en suelo natural, el efecto de la interacción de *Bacillus endophyticus* (razas 2 y 4) y *G. mosseae* (autóctono) en *Retama sphaerocarpa*.

#### 1.5.3. *Diseño Experimental*

El diseño experimental correspondió a un diseño completamente al azar, bifactorial, donde un primer factor venía dado por los inóculos bacterianos (*Bacillus endophyticus* 2 y 4) y su respectivo control sin inocular con bacteria, y un segundo factor dado por la combinación de *G. mosseae* con cada uno de los aislados bacterianos así como un control sin bacterias dando un total de seis tratamientos con cinco repeticiones.

A las 20 semanas de crecimiento vegetal, se cosecharon las plantas determinándose el peso seco de parte aérea y raíz. La extensión de la colonización de la micorriza (% de micorrización) así como también el número de nódulos en cada planta.

#### 1.5.4. *Resultados*

En inoculación individual, *Bacillus endophyticus* (raza 2) incrementó en un 24% la biomasa de parte aérea y *Bacillus endophyticus* (raza 4) lo hizo en un 60%. *G. mosseae*, en

inoculación aislada afectó favorablemente el desarrollo vegetal en un 109%. La inoculación de *B. endophyticus* raza 4 en asociación con *G. mosseae* incrementó la biomasa vegetal en un 208 %. Ambos factores: aislados bacterianos, *G. mosseae* y la interacción resultaron significativos en cuanto a biomasa de parte aérea (Fig. 5-A).

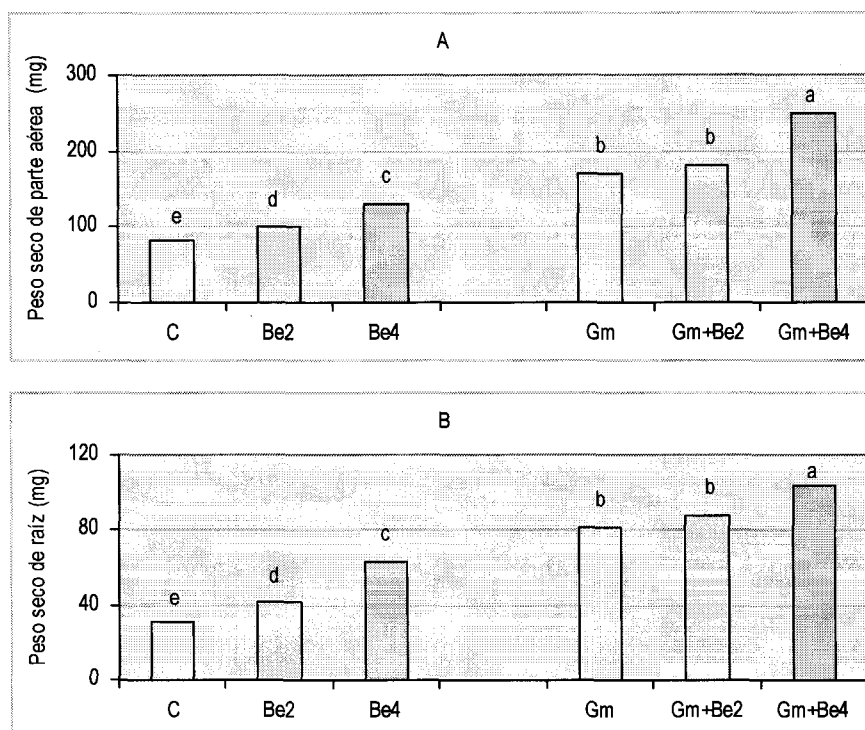


Fig. 5. Efecto de la inoculación simple y combinada de *G. mosseae* (Gm) y *Bacillus endophyticus* razas 2 y 4 (Be2 y Be4) sobre el desarrollo de *R. sphaerocarpa*. (A) Peso seco de parte aérea. (B) Peso seco de raíz.

En relación al desarrollo de raíz (Fig. 5-B), el efecto de *G. mosseae* y de cada uno de los dos aislados bacterianos en inoculación individualizada mantuvo la tendencia observada sobre la biomasa de parte aérea. *G. mosseae* incrementó el peso seco de la raíz en un 161% respecto al control y *B. endophyticus* (raza 4), el más efectivo de los dos aislados, en un 103%. En inoculación conjunta estos valores fueron superiores y el incremento de raíz fue de un 183% cuando se inoculó *G. mosseae*-*B. endophyticus* (raza 2) y de un 235% con el tratamiento *G. mosseae*-*B. endophyticus* (raza 4) (Fig. 5-B). La nodulación solo fue afectada por *B. endophyticus* raza 4 y por *G. mosseae*. La doble inoculación de *G. mosseae* con cualquier *Bacillus* (raza 2 y 4), no varió el efecto beneficioso de *G. mosseae*. (Fig. 6-A).

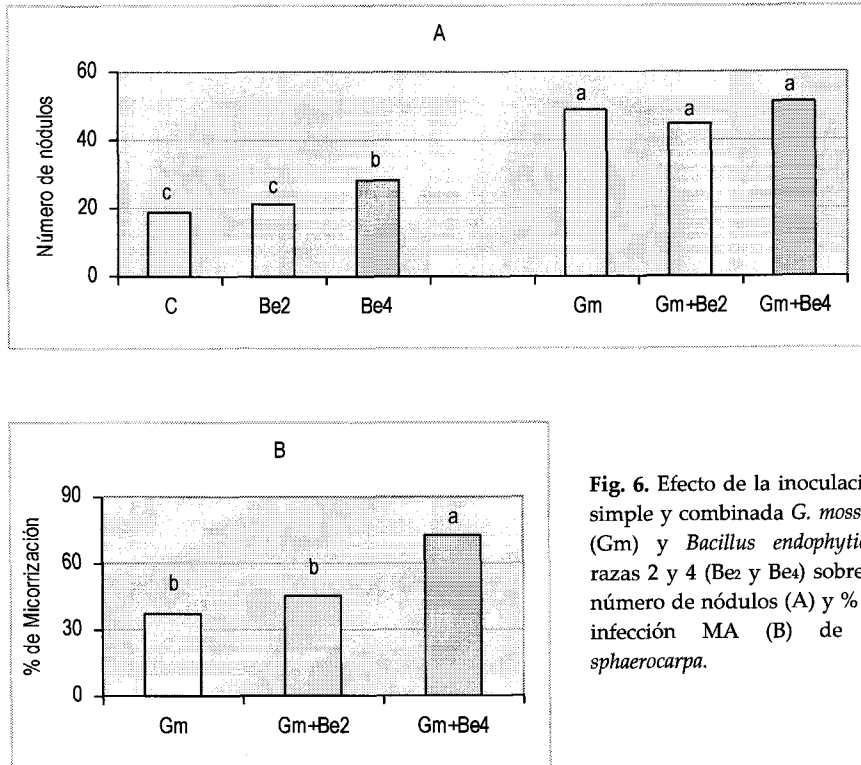


Fig. 6. Efecto de la inoculación simple y combinada *G. mosseae* (Gm) y *Bacillus endophyticus* razas 2 y 4 (Be2 y Be4) sobre el número de nódulos (A) y % de infección MA (B) de *R. sphaerocarpa*.

La colonización intraradical de *G. mosseae* incrementó en un 97% en presencia de *B. endophyticus* (raza 4). *B. endophyticus* (raza 2) no afectó la infección producida por este endofito (Fig. 6-B).

#### 1.6. Efectos de la bacteria PGPR *B. endophyticus* (raza 2) y el hongo MA *G. intraradices* ambos autóctonos (Granada) seleccionados, sobre el crecimiento de una planta representativa de la sucesión natural (*Genista umbellata*), en suelo natural (Granada) provisto de su microbiota habitual, a diferentes niveles hídricos

##### 1.6.1. Objetivo

Evaluar en suelo natural, a dos niveles hídricos (uno de ellos estresante), el efecto de la interacción de *G. intraradices* y *Bacillus endophyticus* (raza 2), sobre *Genista umbellata*.

### 1.6.2. Diseño Experimental

Los dos factores considerados en el diseño experimental fueron: (1) el nivel hídrico del medio, se aplicaron dos niveles de capacidad de campo: al 75% y al 100% y (2) los inoculantes microbianos (*G. intraradices* y *B. endophyticus* raza 2) resultando, en inoculación simple y combinada más el correspondiente control, un total de 8 tratamientos y cinco repeticiones de cada uno.

A lo largo de todo el ensayo, se mantuvieron constantes, por pesada, los dos niveles hídricos utilizados (75% c.c y 100% c.c).

Las plantas se cosecharon a las 20 semanas de crecimiento vegetal. Una vez cosechadas se determinó el peso seco de parte aérea y de raíz, número de nódulos y el porcentaje de la colonización micorrícica.

### 1.6.3. Resultados

*B. endophyticus* (raza2) incrementó la biomasa de parte aérea de *Genista umbellata* en un 78% cuando se cultivó en condiciones de déficit hídrico (75% c.c). El incremento de *G. intraradices* fue del 200% (al 100% c.c) y 220% en condiciones de estrés hídrico (75 %c.c). La doble inoculación MA-bacteria resultó ser la más efectiva e incrementó la biomasa de parte aérea en un 325% cuando las plantas fueron sometidas a estrés (75% c.c) y en un 282% al 100% c.c (Fig. 7-A).

En el caso del desarrollo de raíz, *B. endophyticus* incrementó este valor en un 57% (75% c.c) y en un 44% (100% c.c), mientras que *G. intraradices* lo hizo en un 133% (75% c.c) y en un 107% (100% c.c). Estos datos demuestran que el efecto de *G. intraradices* en condiciones de estrés hídrico (75% cc) fue más pronunciado. La inoculación conjunta de *G. intraradices* y *B. endophyticus* fue, así mismo, mucho más efectiva en situación de estrés e incrementó el desarrollo de la raíz en un 300% (Fig. 7-B).

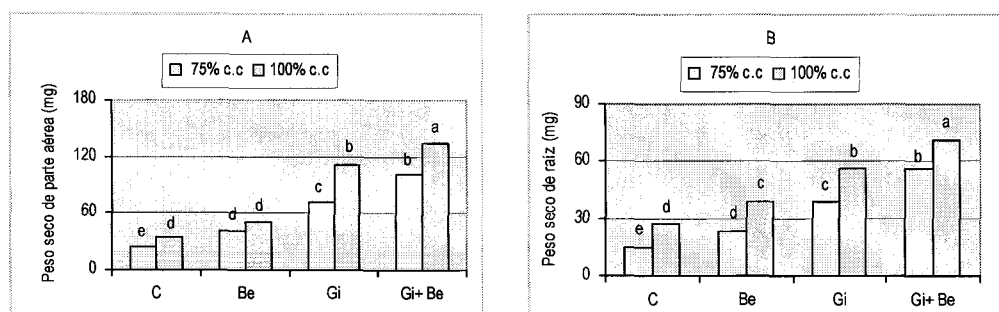


Fig. 7. Efecto de la inoculación simple y combinada de *G. intraradices* (GI) y *Bacillus endophyticus* razas 2 (Be) sobre el desarrollo de *Genista umbellata* al 75% c.c y 100% c.c. (A) Peso seco de parte aérea. (B) Peso seco de raíz.

En cuanto a los parámetros simbióticos analizados (nodulación y micorrización) se encontró que al 100% de la capacidad de campo, la nodulación incrementó en presencia de la bacteria en un 77%. *G. intraradices* incrementó esta variable independientemente de la presencia o ausencia de la bacteria. Al 75% c.c., *B. endophyticus* raza 2 en interacción con *G. intraradices* incrementaron este valor en un 79% con respecto al control micorrizado (Fig. 8). La infección de la raíz por *G. intraradices* fue solo afectada por la presencia de *B. endophyticus* al 75% c.c., la infección incrementó en presencia de la bacteria en un 42%. Al 100% c.c., la doble inoculación también favoreció la colonización MA pero el efecto no fue significativo como en el caso anterior (Fig. 9).

Fig. 8. Efecto de la inoculación simple de *G. intraradices* (GI), ó combinada con *Bacillus endophyticus* razas 2 (Be) sobre la nodulación en *Genista umbellata* crecidas en suelo natural al 75% y 100% de c.c.

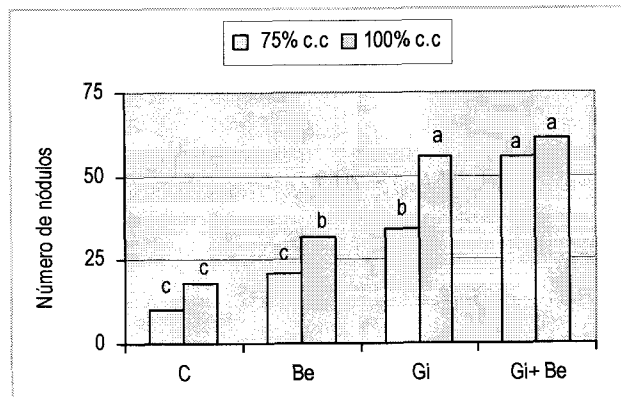
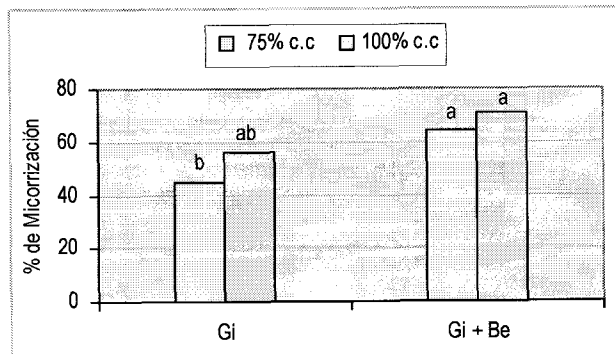


Fig. 9. Efecto de la inoculación simple de *G. intraradices* (GI), ó combinada con *Bacillus endophyticus* razas 2 (Be) sobre la nodulación en *Genista umbellata* crecidas en suelo natural al 75% y 100% de c.c.



## 2. ENSAYOS CON SUELO PROCEDENTE DE LA PROVINCIA DE ALICANTE

### 2.1. Aislamiento de Hongos MA y PGPR del suelo objeto de estudio (Alicante)

Los hongos MA, se aislaron a partir de suelo rizosférico de las tres zonas seleccionadas de la Provincia de Alicante: Aguas Claras, Ballestera y Campello. Para obtener inóculo de la población de hongos MA nativos, se prepararon cultivos con planta trampa utilizando *Sorghum bicolor* y *Trifolium repens*, como se ha descrito en MATERIAL Y METODOS GENERALES.

De la forma ya descrita, a partir del mismo suelo se aislaron y seleccionaron las 6 rizobacterias más abundantes (dos por área de estudio). Estos inóculos bacterianos y los aislados de hongos MA se utilizaron para los ensayos que se describen a continuación (como consta en el apartado correspondiente a materiales y métodos).

### 2.2. Selección de Hongos MA y PGPR aislados en el suelo objeto de estudio (Alicante)

#### 2.2.1. Planta hospedadora y aplicación de los tratamientos biológicos

La planta seleccionada para la realización de los dos experimentos que se describen a continuación fue *Trifolium repens* (trébol). Las semillas se sembraron directamente en las macetas (con 400 g de capacidad), donde el sustrato había recibido, en los tratamientos micorrizados 10 g de inóculo de *G. occultum*. Los inóculos bacterianos, se aplicaron a una semana de la siembra y la densidad de inóculo bacteriano aplicado para el experimento #1 fue de  $10^8$  ufc. En el experimento # 2 se aplicó el inóculo bacteriano a cuatro densidades ( $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  y  $10^9$  ufc). Todas las plantas fueron inoculadas con  $10^8$  ufc de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*.

#### 2.2.2. Ensayos de invernadero: Características del suelo y condiciones experimentales

El suelo utilizado procedía de las parcelas seleccionadas de la provincia de Alicante y presentaron las siguientes características químicas: M.O (Walkley & Black) = 0.39 %; pH (H<sub>2</sub>O)=7.9; P disponible (Olsen) = 2.64 mg Kg.<sup>-1</sup>, N: 1.2 mg Kg.<sup>-1</sup>. El sustrato fue una mezcla esterilizada de suelo: arena 1:1, v/v.

#### 2.2.3. Objetivo

Evaluar, en microcosmos, el efecto de los 6 aislados bacterianos (autóctonos) procedentes de tres zonas distintas inoculados de forma individual, y la combinación de

estas bacterias con *G. occultum*, seleccionando las más efectivas para el crecimiento de la planta.

#### 2.2.4. Diseño Experimental

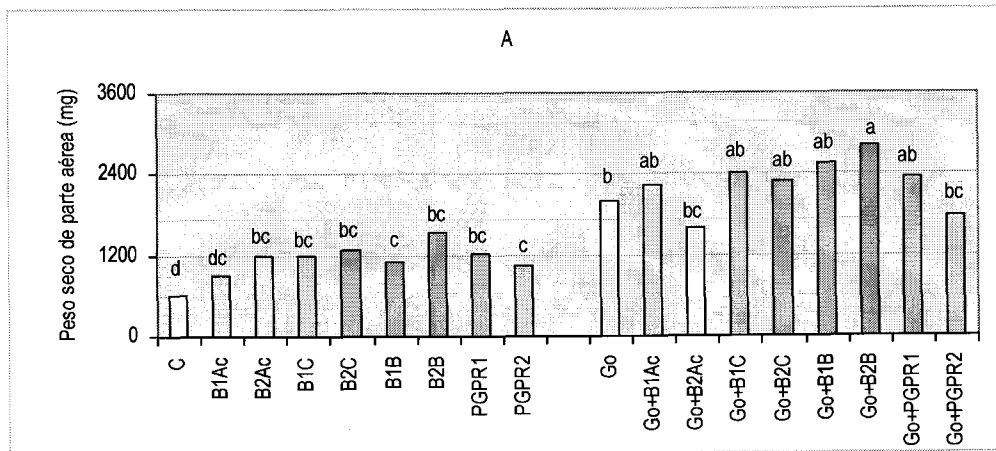
El experimento se diseñó con dos factores de variación: el primer factor hongo MA, consistía en dos tratamientos, control sin micorrizar (C) y otro tratamiento inoculado con *G. occultum* (aislado autóctono de Alicante). El segundo factor fue la inoculación de 8 bacterias (6 aislados bacterianos autóctonos y dos especies de *Bacillus* catalogados por su efecto PGPR) y un control sin inocular. Ello dio lugar a un total de 18 tratamientos con 5 repeticiones cada uno (90 unidades experimentales).

Las plantas se cosecharon a las 30 semanas de crecimiento vegetal tras cinco cortes sucesivos. Una vez cosechadas se determinaron las siguientes variables experimentales:

- Peso seco de parte aérea y de raíz.
- Extensión de la colonización MA
- Número de nódulos en cada planta.

#### 2.2.5. Resultados

Los resultados de cosecha (Fig. 10-A y 10-B) muestran que la inoculación de *G. occultum* y la de cada una de las bacterias, tanto individualmente como en interacción (*Glomus*-bacteria), resultaron efectivas incrementando el desarrollo de la planta.



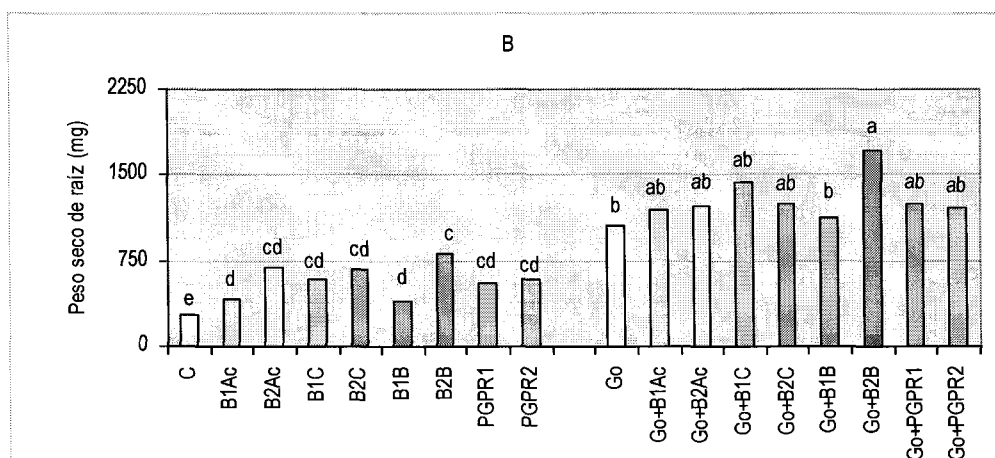


Fig. 10. Efecto de la inoculación simple o combinada *G. occultum* (Go) – Aislados bacterianos [Aislados bacterianos de Aguas Claras (B1Ac y B2Ac), Aislados bacterianos de Campello (B1C y B2C), Aislados Bacterianos de Ballestera (B1B y B2B), PGPR<sub>1</sub> (*B. pumillus*) y PGPR<sub>2</sub> (*B. licheniformis*)] sobre el desarrollo de *T. repens*. (A) Peso seco de parte aérea. (B) Peso seco de raíz.

Los 6 aislados bacterianos autóctonos manifestaron un efecto igual o superior al de los dos *Bacillus* PGPR de referencia ensayados. El aislado bacteriano 2 de Ballestera (B2B), fue el más efectivo incrementando la biomasa de parte aérea en un 46% y en un 200% la de raíz. En plantas colonizadas por *G. occultum*, los valores de biomasa de parte aérea y raíz incrementaron con la interacción *G. occultum*-B2B (Aislado bacteriano 2 de Ballestera). Esta combinación incrementó en un 350% la biomasa de parte aérea y en un 536% la de raíz.

La nodulación fue estimulada por la mayoría de los tratamientos microbianos aplicados. B2B y cada uno de los *Bacillus* de referencia incrementaron la nodulación en un 255%, 249% y 196% respectivamente. *G. occultum*, incrementó esta variable en un 326% y en asociación con B2B este incremento fue máximo y superior en un 69% que en ausencia de B2B (Fig.11).



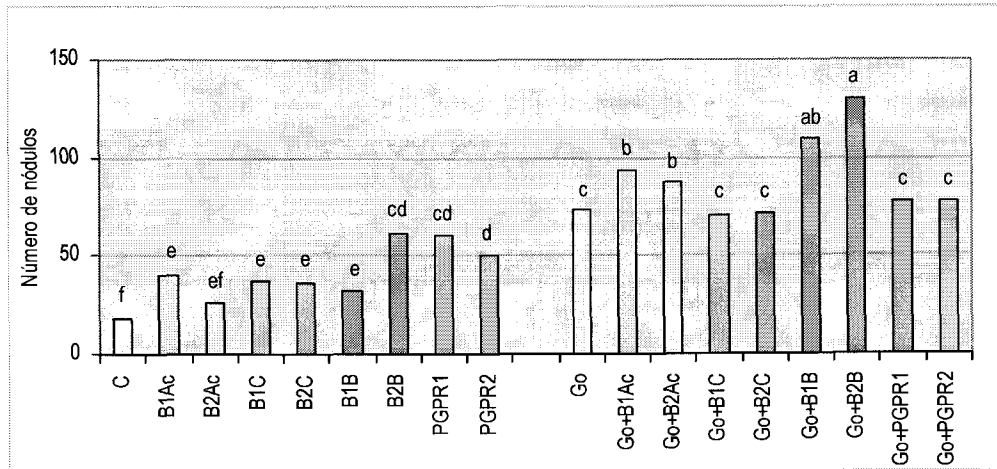


Fig. 11. Efecto de la inoculación simple o combinada *G. occultum* (Go) – Aislados bacterianos [Aislados bacterianos de Aguas Claras (B1Ac y B2Ac), Aislados bacterianos de Campello (B1C y B2C), Aislados Bacterianos de Ballestera (B1B y B2B), PGPR<sub>1</sub> (*B. pumillus*) y PGPR<sub>2</sub> (*B. licheniformis*)] sobre el número de nódulos.

La colonización de las raíces por *G. occultum* en presencia de B2B fue incrementada en un 61% al ser comparado con el control MA. Las plantas mejor micorrizadas fueron las que mostraron un mejor desarrollo (Fig. 12).

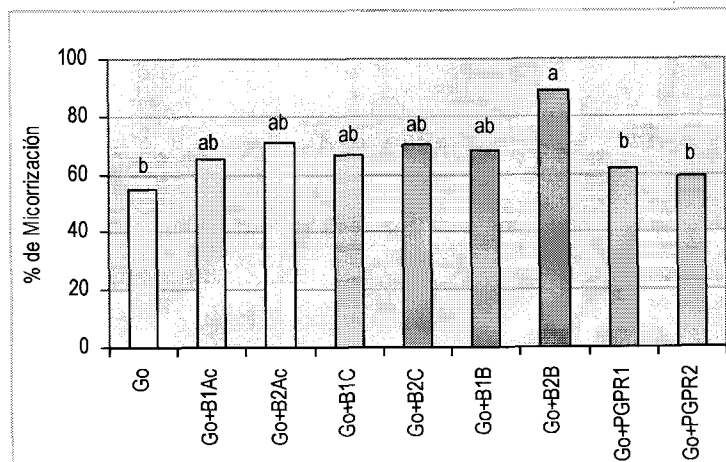


Fig. 12. Efecto de la inoculación simple o combinada *G. occultum* (Go) – Aislados bacterianos [Aislados bacterianos de Aguas Claras (B1Ac y B2Ac), Aislados bacterianos de Campello (B1C y B2C), Aislados Bacterianos de Ballestera (B1B y B2B), PGPR<sub>1</sub> (*B. pumillus*) y PGPR<sub>2</sub> (*B. licheniformis*)] sobre la infección MA

Los dos factores ensayados en este experimento (*G. occultum* y los aislados bacterianos) demostraron un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las plantas. El aislado bacteriano 2, procedente de Ballestera, (B2B), fue el más efectivo para todas las

variables experimentales analizadas. En base a estos resultados, se procedió a diseñar un segundo experimento, donde una de las fuentes de variación a considerar fue la concentración del inóculo bacteriano. El objetivo era seleccionar la concentración óptima que en mayor medida favoreciera cada uno de los parámetros de crecimiento y determinar posibles cambios en las variables experimentales (crecimiento y parámetros simbióticos) al modificar la concentración bacteriana aplicada a cada unidad experimental.

### 2.3. Evaluación de la concentración óptima de los inóculos PGPR seleccionados, por sus efectos sobre la formación y la respuesta de las plantas a las MA (*G. occultum*, autóctono, Alicante)

#### 2.3.1. Objetivo

Estudiar, en microcosmos, el efecto de la aplicación de concentraciones crecientes de los 6 aislados bacterianos autóctonos (procedentes de Alicante) y 2 *Bacillus* PGPRs de referencia (*B. pumillus* y *B. licheniformis*), sobre el desarrollo de la planta, aplicado en forma individual y en coinoculación con *G. occultum*.

#### 2.3.2. Diseño Experimental

En este estudio se consideró la concentración del inóculo bacteriano como la principal fuente de variación. El inóculo bacteriano fue aplicado individualmente y en asociación con *G. occultum* a tres concentraciones ( $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>). Ello proporcionó 50 tratamientos que con cinco repeticiones cada uno resultó un total de 250 macetas. Las plantas se cosecharon a las 32 semanas de crecimiento vegetal tras siete cortes sucesivos. Una vez cosechadas se determinaron las siguientes variables experimentales:

- Peso seco acumulado de parte aérea y de raíz.
- Extensión de la colonización MA
- Número de nódulos en cada planta.

#### 2.3.3. Resultados

Cinco de las 8 bacterias ensayadas incrementaron la biomasa vegetal cuando fueron inoculadas a las dos concentraciones más altas ( $10^6$  y  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>). Las excepciones fueron los aislados bacterianos 1 y 2 procedente de Aguas Claras (B1, B2Ac) y el aislado B1 de Ballestera, que inoculados a una densidad de  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>, no fueron efectivos (Fig. 13-A y 13-B).

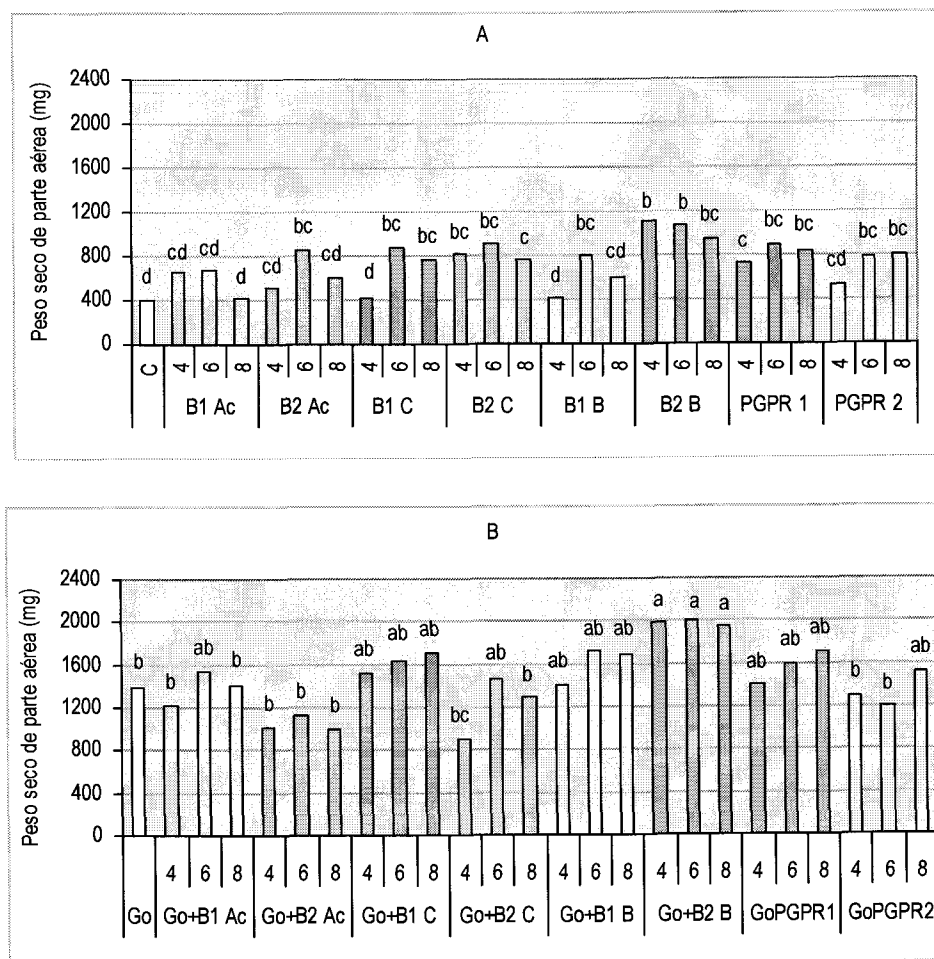


Fig. 13. Efecto de la aplicación del inóculo bacteriano a tres densidades ( $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  ufc ) sobre el desarrollo de la planta asociado o no con *G. occultum* (Go). (A) Peso seco parte aérea control (C) y Aislados bacterianos (B1Ac y B2Ac, Aislados bacterianos de Aguas Claras; B1C y B2C, Aislados bacterianos de Campello, B1B y B2B, Aislados Bacterianos de Ballestera; PGPR<sub>1</sub> (*B. pumillus*) y PGPR<sub>2</sub> (*B. licheniformis*)). (B) Peso seco parte aérea (Go) *G. occultum* (control MA) e interacciones Go-Bacterias.

El aislado bacteriano 2 procedente de Ballestera (B2 B), independientemente de la concentración aplicada, en ausencia y presencia de *G. occultum*, fue el mejor tratamiento bacteriano aplicado. El incremento de peso seco por la interacción *G. occultum*-B2 B, fue de un 42% (media del incremento de las tres concentraciones) al compararse con el respectivo control MA.

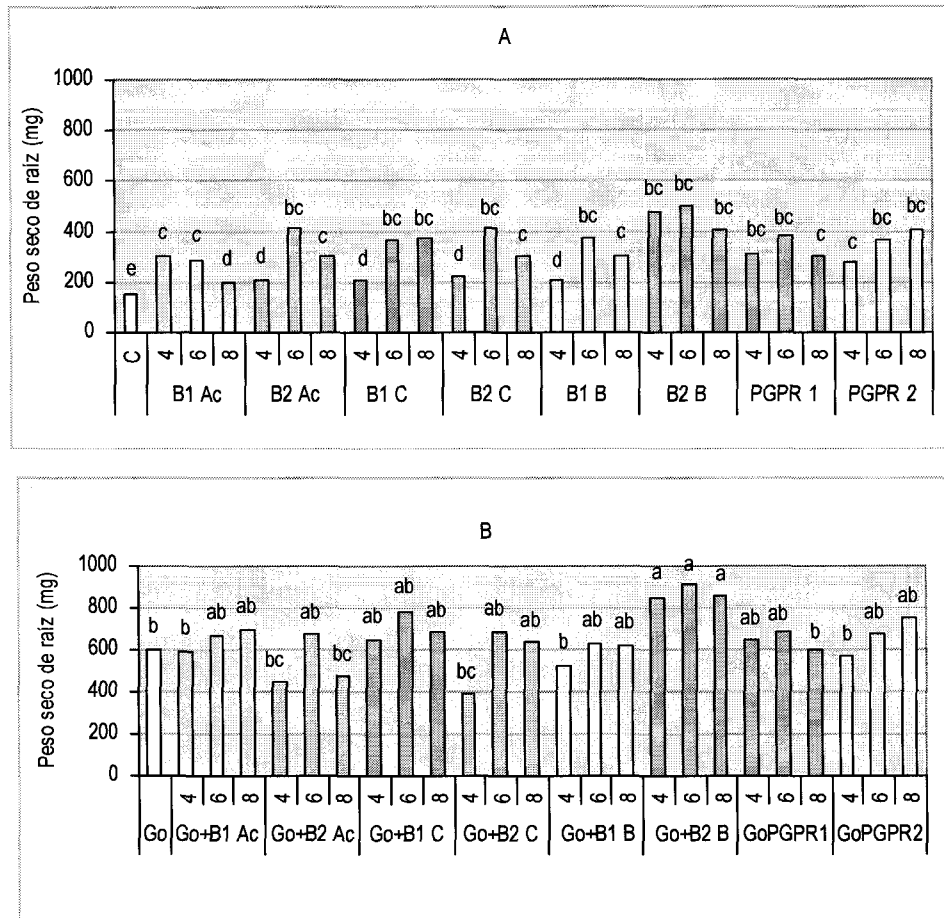


Fig. 14. Efecto de la aplicación del inóculo bacteriano a tres densidades ( $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  ufc) sobre el desarrollo de la planta asociado o no con *G. occultum* (Go). (A) Peso seco raíz control (C) y Aislados bacterianos (B1Ac y B2Ac, Aislados bacterianos de Aguas Claras; B1C y B2C, Aislados bacterianos de Campello, B1B y B2B, Aislados Bacterianos de Ballestera; PGPR<sub>1</sub> (*B. pumillus*) y PGPR<sub>2</sub> (*B. licheniformis*)). (B) Peso seco raíz (Go) *G. occultum* (control MA) e interacciones Go-Bacterias.

El efecto de los inoculantes bacterianos sobre la nodulación, no presentó las tendencias observadas sobre peso seco de parte aérea y raíz. B2 B incrementó el número de nódulos, particularmente a la más alta concentración de inóculo ( $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>). En presencia de *G. occultum*, solo este aislado bacteriano 2 procedente de Ballestera (B2 B), y el aislado bacteriano 2 procedente de Aguas Claras (B2 Ac) a la más baja concentración ensayada ( $10^4$  ufc ml<sup>-1</sup>), incrementaron la nodulación (Fig.15-A y 15-B).

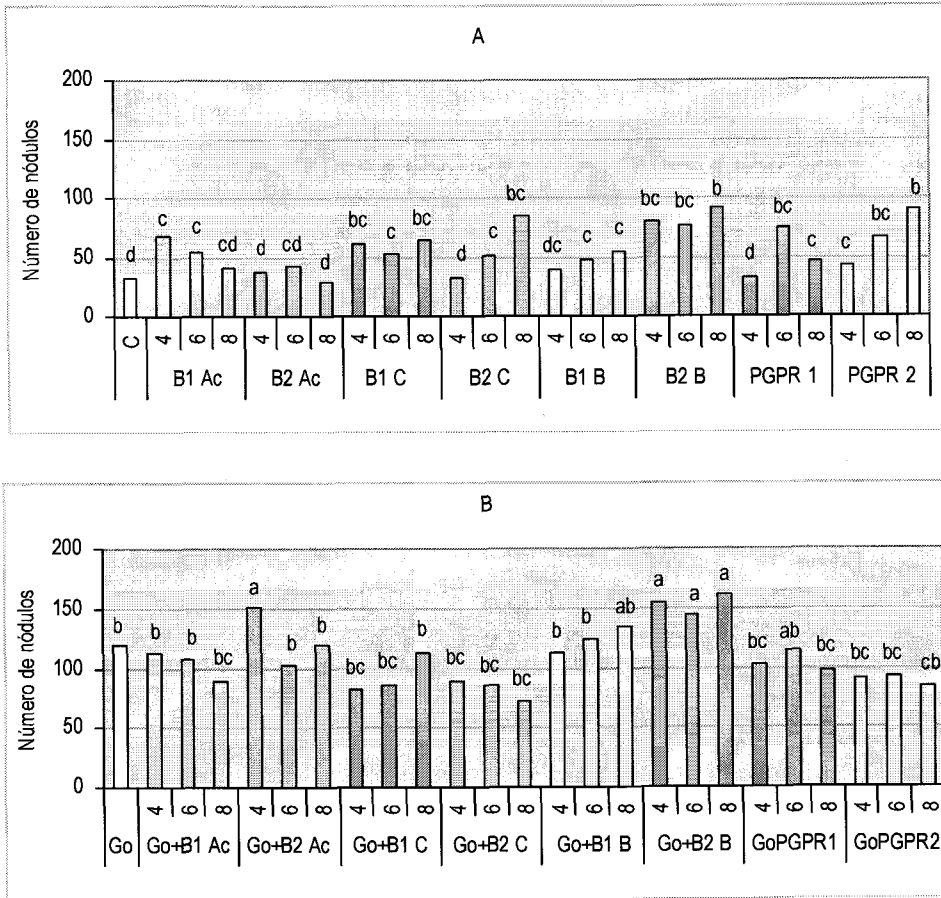


Fig. 15. Efecto de la aplicación del inóculo bacteriano a tres densidades (104, 106, 108 ufc) sobre el desarrollo de la planta asociado o no con *G. occultum* (Go). (A) Número de nódulos en los tratamientos control (C) y Aislados bacterianos (B1Ac y B2Ac, Aislados bacterianos de Aguas Claras; B1C y B2C, Aislados bacterianos de Campello, B1B y B2B, Aislados Bacterianos de Ballestera; PGPR1 (*B. pumilus*) y PGPR2 (*B. licheniformis*)). (B) Número de nódulos en los tratamientos (Go) *G. occultum* (control MA) e interacciones Go-Bacterias.

La presencia de algunos aislados bacterianos favoreció, la infección intraradical de *G. occultum*. Así pues destacamos la efectividad de B2 B (aislado bacteriano 2 procedente de Ballestera) a las tres concentraciones ensayadas, y B2 Ac (aislado bacteriano 2 procedente de Aguas Claras) a la concentración más alta (Fig. 16). Reproduciéndose en este valor los resultados obtenidos en el primer ensayo.

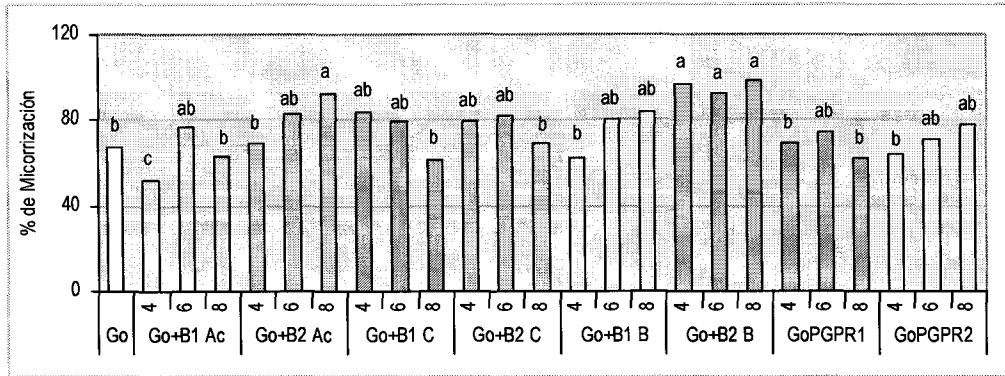


Fig. 16. Efecto de la inoculación simple o combinada micorriza (*G. occultum* (Go)) – Aislados bacterianos (B1Ac y B2Ac, Aislados bacterianos de Aguas Claras; B1C y B2C, Aislados bacterianos de Campello, B1B y B2B, Aislados Bacterianos de Ballestera; PGPR<sub>1</sub> (*B. pumillus*) y PGPR<sub>2</sub> (*B. licheniformis*)) sobre la infección MA a tres concentraciones del inoculo bacteriano (10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup>).

#### 2.4. Identificación de los aislados bacterianos autóctonos (Alicante) mediante la secuenciación del ADN ribosómico 16S

Los 6 aislados bacterianos procedentes de Alicante, se identificaron mediante la secuenciación del ADNr 16S, como se ha descrito en Material y Métodos.

En la tabla 2, se muestra, en forma resumida, los resultados de la identificación, de acuerdo a la zona de procedencia de cada aislado.

Tabla 2. Resultados de la identificación de los 6 Aislados bacterianos autóctonos procedentes de las tres parcelas de Alicante: Aislados de Agua claras (B1 Ac y B2 Ac), Aislados de Campello (B1 C y B2 C) y Aislados de Ballestera (B1 B y B2 B)

Procedencia	Aislados	Identificación	% de identidad
Aguas Claras	B1 Ac	<i>B. thuringiensis</i> I	98,5
	B2 Ac	<i>B. thuringiensis</i> II	99
Campello	B1 C	<i>B. thuringiensis</i>	98
	B2 C	<i>B. macroides</i>	98
Ballestera	B1 B	<i>B. macroides</i>	99
	B2 B	<i>B. thuringiensis</i>	98,5

## 2.5. Interacción de 6 *Bacillus* spp. y *G. occultum* (autóctonos) sobre el crecimiento de una planta representativa de la sucesión natural (*Medicago arbórea*), en suelo natural provisto de su microbiota habitual

### 2.5.1. *Planta hospedadora y aplicación de los tratamientos biológicos*

Se estudia, en condiciones más naturales, la interacción de los 6 *Bacillus* spp. (autóctonos, y previamente ensayados en suelo estéril) en combinación con HMA nativos de Alicante. Se diseñó un experimento empleando como sustrato suelo en condiciones naturales, *G. occultum* como endofito MA (autóctono) y *Medicago arbórea* como planta representativa de la sucesión natural.

El sustrato (mezcla de suelo natural:arena 1:1, v/v) había recibido, en los tratamientos micorrizados, 10 g de inóculo de *G. occultum*. Los inóculos bacterianos se aplicaron a la semana de la siembra (1 ml de la suspensión bacteriana  $10^6$  ufc por planta), después de dejar una plántula por contenedor. Todas las plantas fueron inoculadas con  $10^8$  ufc de *Sinorhizobium* sp.

### 2.5.2. *Objetivo*

Evaluar en suelo natural, el efecto de la interacción de cada uno de los 8 *Bacillus* (6 autóctonos y 2 PGPR de colección) y *G. occultum* (autóctono) en *Medicago arbórea*.

### 2.5.3. *Diseño Experimental*

El diseño experimental fue bifactorial: el primer factor MA, consistía de dos tratamientos, control sin micorrizar (C) y otro tratamiento inoculado con *G. occultum*. El segundo factor consistió en la inoculación de los 6 *Bacillus*, (ya identificados), dos PGPR de referencia (*B. pumillus* y *B. licheniformis*) y un control sin inocular. Ello dio lugar a un total de 18 tratamientos con 5 repeticiones cada uno (90 macetas).

A las 12 semanas de crecimiento vegetal se cosecharon las plantas determinándoles la biomasa de parte aérea y raíz (peso seco). La extensión de la colonización micorriza (% de micorrización), así como el número de nódulos.

### 2.5.4. *Resultados*

Los 8 aislados bacterianos, *G. occultum* y la interacción entre ambos, fueron efectivos sobre el crecimiento de *M. arbórea* siendo nuevamente la interacción *G. occultum*-*B. thuringiensis* (Ballester) la más activa incrementando la biomasa de parte aérea y raíz en

un 75% con respecto al tratamiento inoculado sólo con *G. occultum* y en un 114% y 233% respecto al control sin inocular(Fig. 17-A y 17-B).

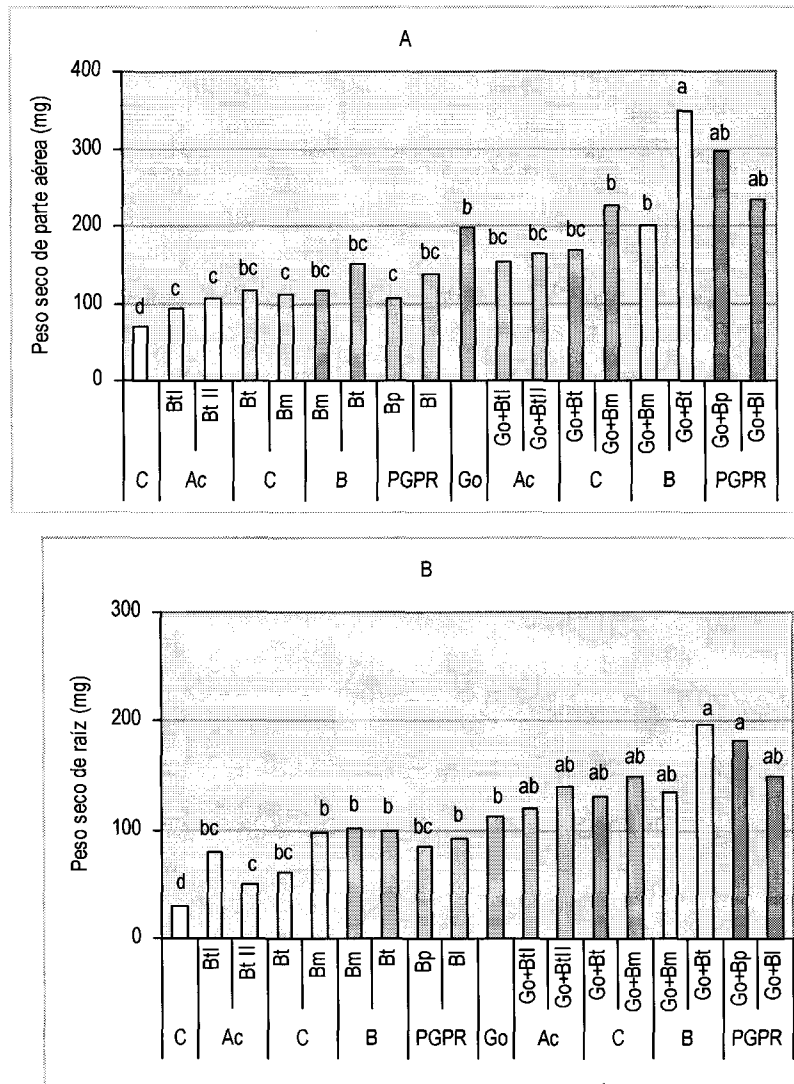


Fig. 17. Efecto de la inoculación simple o combinada de *G. occultum* (Go) y/o Aislados bacterianos [*B. thuringiensis* I y II (Bt I y Bt II) de Aguas Claras; *B. thuringiensis* (Bt) y *B. macroides* (Bm) de Campello; *B. macroides* (Bm) y *B. thuringiensis* (Bt), de Ballestera; PGPR<sub>1</sub> (*B. pumillus*) y PGPR<sub>2</sub> (*B. licheniformis*)] sobre el desarrollo de *M. arborea* crecida en suelo natural. (A) Peso seco parte aérea. (B) Peso seco raíz.

El efecto sobre el desarrollo de la raíz de *M. arborea*, por cada uno de los dos aislados bacterianos de Ballestera (*B. macroides* y *B. thuringiensis*), y de *B. macroides* (aislado de Campello), fue similar al efecto de *G. occultum* o *B. licheniformis* (PGPR de referencia). El



desarrollo de raíz producido en estos tratamientos fue aproximadamente tres veces mayor que el de las plantas control (Fig. 17-B).

En la Fig. 18 se muestran los efectos de los tratamientos microbianos, sobre la nodulación de *M. arbórea*, crecida en condiciones naturales. Solo el tratamiento inoculado con *B. thuringiensis* (Ballestera) incrementó en un 100% este parámetro. Las interacciones entre *G. occultum*-*B. thuringiensis* (Ballestera) y *G. occultum*-en asociación con cada una de las dos PGPR de referencia (*B. pumillus* ó *B. licheniformis*) fueron las más efectivas incrementando este parámetro en un 33%, 13% y 20% respectivamente al compararse con el valor obtenido en las plantas inoculadas sólo con *G. occultum*.

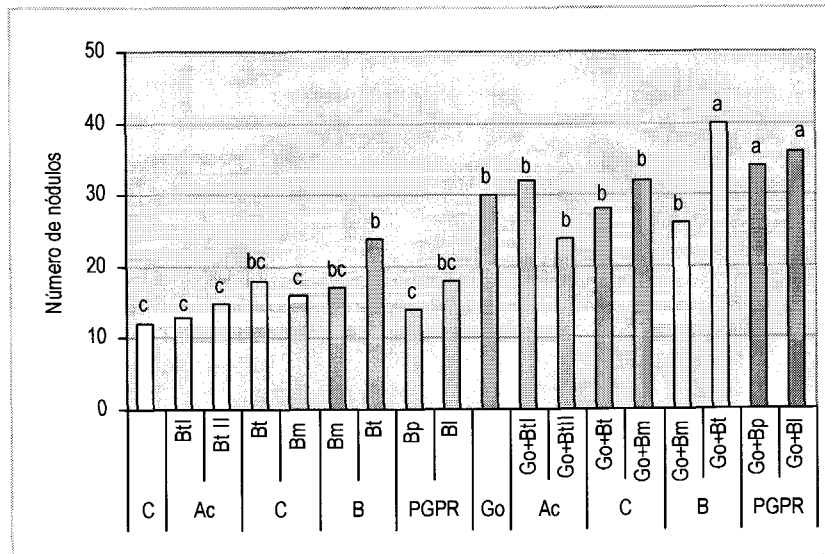


Fig. 18. Efecto de la inoculación simple o combinada de *G. occultum* (Go) y/o Aislados bacterianos [*B. thuringiensis* I y II (Bt I y Bt II) de Aguas Claras; *B. thuringiensis* (Bt) y *B. macroïdes* (Bm) de Campello; *B. macroïdes* (Bm) y *B. thuringiensis* (Bt), de Ballestera; PGPR<sub>1</sub> (*B. pumillus*) y PGPR<sub>2</sub> (*B. licheniformis*)] sobre el número de nódulos.

Así mismo, la infección de *G. occultum* fue estimulada por *B. thuringiensis* (Ballestera) en un 74%.

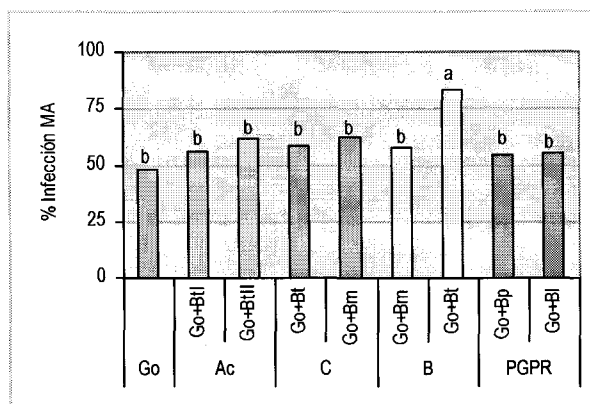


Fig. 19. Efecto de la inoculación simple o combinada de *G. occultum* (Go) y/o Aislados bacterianos [*B. thuringiensis* I y II (Bt I y Bt II) de Aguas Claras; *B. thuringiensis* (Bt) y *B. macroides* (Bm) de Campello; *B. macroides* (Bm) y *B. thuringiensis* (Bt), de Ballestera; PGPR<sub>1</sub> (*B. pumillus*) y PGPR<sub>2</sub> (*B. licheniformis*)] sobre la infección MA.

## 2.6. Interacción de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (aislado autóctono de Ballestera, seleccionada como la más efectiva) y diferentes Hongos MA autóctonos: *G. mosseae*, *G. occultum* y *G. constrictum*, sobre el crecimiento, nutrición y características de la micorrización en una planta representativa de la sucesión natural (*Medicago arborea*), en suelo natural provisto de su microbiota habitual

### 2.6.1. Planta hospedadora y aplicación de los tratamientos biológicos

En este experimento en microcosmos en suelo natural Alicante bajo condiciones controladas, se ensayó la inoculación individualizada y conjunta de *Bacillus thuringiensis* (aislado de Ballestera) y se amplió el número de los aislados MA nativos: *G. occultum*, *G. constrictum* y *G. mosseae*.

El sustrato empleado fue suelo natural en las condiciones experimentales anteriormente descritas (mezclado con arena 1:1 (v/v)). Las semillas pregerminadas de *Medicago arborea* se transfirieron a las macetas donde el suelo había recibido, en los tratamientos micorrizados, 10 g por maceta de los correspondientes inóculos MA. Se aplicaron  $10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  de *Bacillus thuringiensis*. Todas las plantas fueron inoculados con  $10^8$  ufc de *Sinorhizobium* sp.

### 2.6.2. Objetivo

Estudiar, sí el efecto de *B. thuringiensis* como posible MHB (Mycorrhizal Helper Bacteria), en asociación con *G. occultum*, (efecto observado tanto en suelo estéril como en suelo natural, y en dos tipos de leguminosas: *T. repens* y *M. arborea* era extensible y generalizable a otros hongos MA igualmente especies autóctonas.

### 2.6.3. Diseño Experimental

El experimento se diseñó con dos factores de variación: el primer factor hongo MA, consistía de 4 tratamientos: (1) Control sin micorrizar, (2) tratamiento inoculado con *G. constrictum*, (3) tratamiento inoculado con *G. mosseae* y (4) tratamiento inoculado con *G. occultum* (todos aislados autóctonos de Alicante). El segundo factor considerado fue la inoculación con (1) *B. thuringiensis* (aislado de Ballestera) y (2) su respectivo control sin inocular. Ello dio lugar a un total de 8 tratamientos con 5 repeticiones cada uno (40 macetas).

Las plantas se cosecharon a las 20 semanas de crecimiento vegetal. Una vez cosechadas se determinó el peso seco de parte aérea y raíz el número de nódulos en cada planta y parámetros de nutrición como los contenidos en nitrógeno, fósforo y potasio. Este estudio se amplió con la determinación de las características de la colonización micorrícica (cuantificada por el método de Trouvelot et al. 1989),

### 2.6.6. Resultados

El efecto de las distintas interacciones entre los tres hongos MA y *B. thuringiensis* sobre el crecimiento vegetal, fue totalmente diferente. *G. mosseae* y *G. occultum* en interacción con *B. thuringiensis* incrementaron el peso seco de la parte aérea en un 43% y 94%, respecto al control sin inocular (Fig.20). *B. thuringiensis*, incrementó este valor en un 47%, y fue mucho mas efectivo que *G. constrictum*, o que el mismo *G. mosseae*.

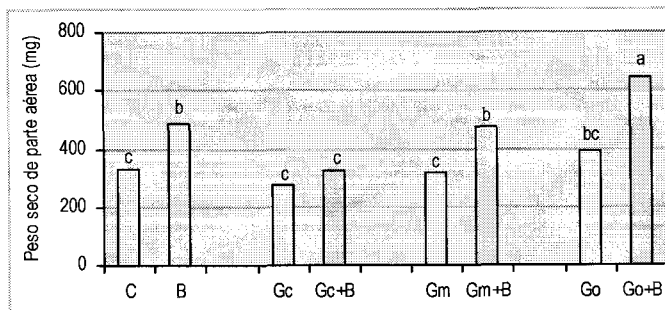


Fig. 20. Efecto de la inoculación simple o combinada de *B. thuringiensis* (B) (aislado de Ballestera)-hongo formador de micorriza [*G. constrictum* (Gc); *G. mosseae* (Gm) y *G. occultum* (Go)] sobre el desarrollo de la parte aérea (peso seco) de *M. arborea* en suelo natural.

Con respecto al efecto de estos tratamientos sobre el desarrollo de raíz (Fig. 21) se observa que *B. thuringiensis* solo y en interacción con *G. mosseae* y *G. occultum*, mantuvieron la tendencia observada sobre parte aérea e incrementaron el valor en raíz en un 100%, 157% y 240% sobre el control.

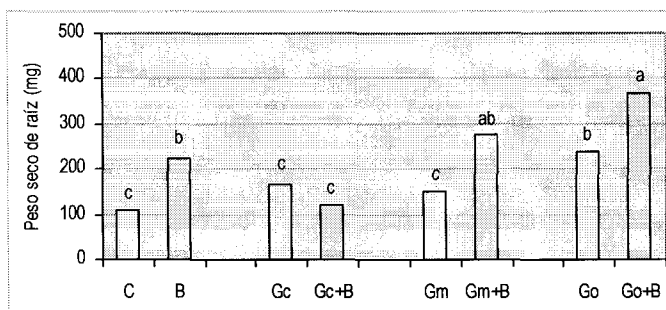


Fig. 21. Efecto de la inoculación simple o combinada de *B. thuringiensis* (B) (aislado de Ballestera)-hongo formador de micorriza [*G. constrictum* (Gc); *G. mosseae* (Gm) y *G. occultum* (Go)] sobre el desarrollo de raíz de *M. arborea* en suelo natural.

La nodulación también fue estimulada por los tratamientos ensayados: Hongos MA y *B. thuringiensis*. Las interacciones *B. thuringiensis*-*G. mosseae* y *B. thuringiensis*-*G. occultum* incrementaron este parámetro en un 64% y 78% (al compararse con sus respectivos controles micorrizados). *B. thuringiensis*, incrementó el número de nódulos en un 76%, tanto como *G. constrictum* ó *G. mosseae* en inoculación individual (Fig.22).

Observando las tres variables experimentales analizadas anteriormente (biomasa de parte aérea, peso seco de raíz y nodulación), vemos que en el comportamiento de los tres hongos MA no se repite patrón alguno en asociación con la bacteria pero si se mantiene la tendencia previamente observada al inocular *B. thuringiensis* y *G. occultum*, usando otra planta y suelo estéril.

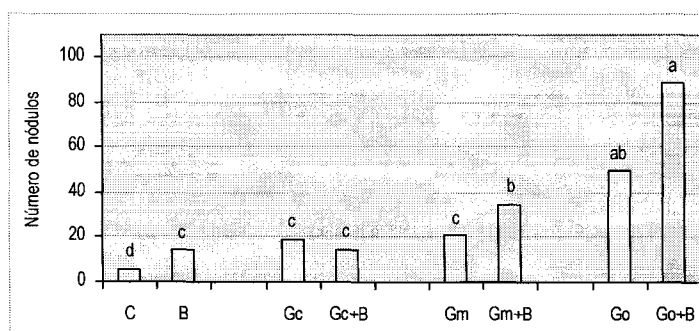
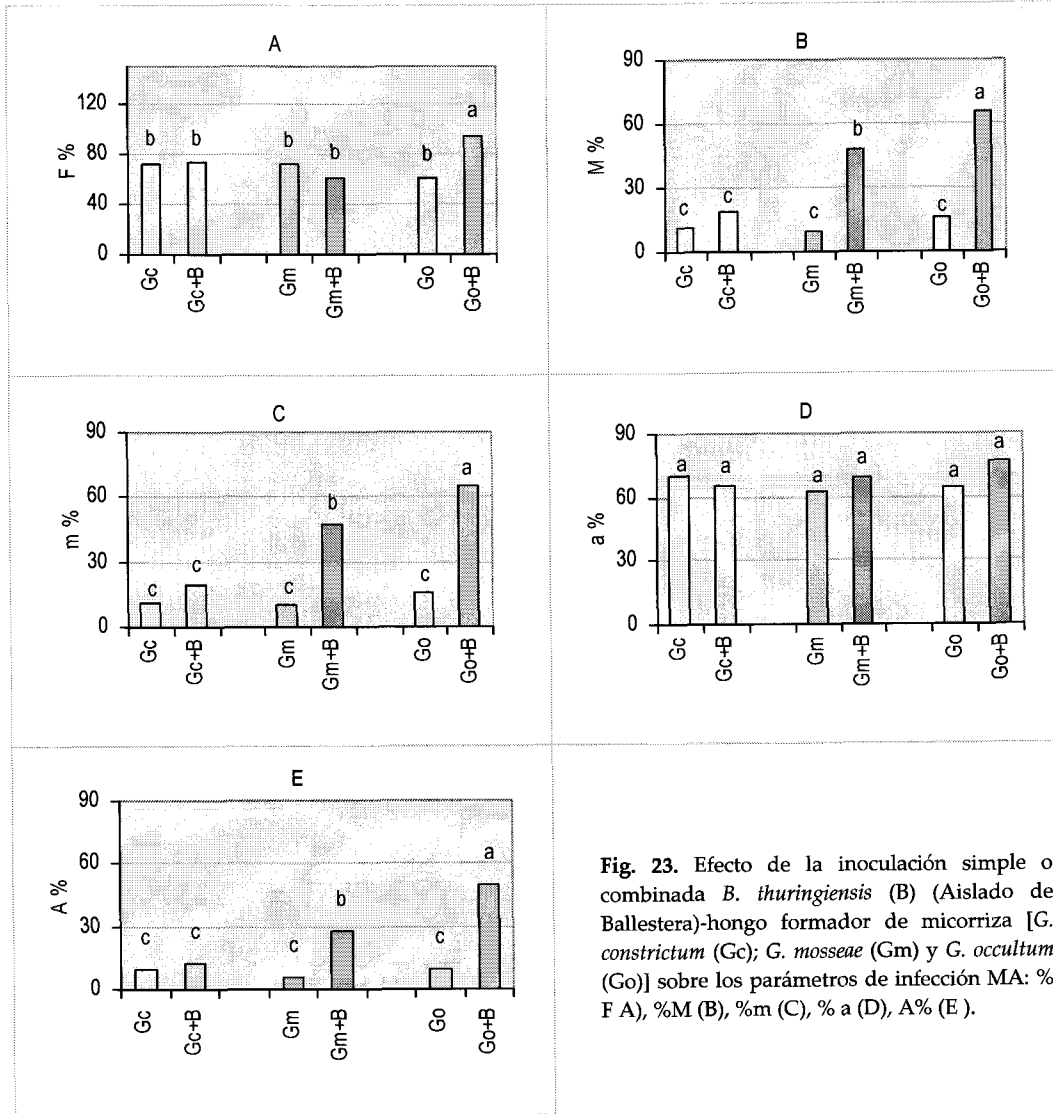


Fig. 22. Efecto de la inoculación simple o combinada de *B. thuringiensis* (B) (aislado de Ballestera)-hongo formador de micorriza [*G. constrictum* (Gc); *G. mosseae* (Gm) y *G. occultum* (Go)] sobre el número de nódulos en *M. arborea* crecida en suelo natural.

En la Fig. 23, se representa las características anatómicas de la micorrización dada por los valores de los 5 parámetros de la infección MA: %F, %M, %m, %a, %A.

El valor de F, índice de la relación entre los fragmentos de raíz colonizados con respecto al total de fragmentos observados, solo se afectó por la bacteria en las raíces colonizadas por *G. occultum*. *B. thuringiensis*, incrementó este valor en un 54% (Fig. 23-A). El valor m indicativo de la intensidad de colonización, estima la cantidad de corteza

radical micorrizada referido únicamente a la fracción de raíz micorrizada, mientras que M indica la intensidad de colonización referida al total de raíz. Ambos incrementaron por la presencia de la bacteria en un 300% (m) y en un 420%(M) en raíces micorrizadas por *G. mosseae* y *G. occultum* respectivamente (Fig. 23-B y 23-C).



*B. thuringiensis* no alteró la riqueza de arbusculos en la fracción de raíz micorrizada (a) (Fig. 23 D). La riqueza de arbusculos en el total de raíz (A) siguió la tendencia

observada para los valores de M y m. *G. mosseae* y *G. occultum* en asociación con *B. thuringiensis* incrementaron estos valores en un 300% y 400% respectivamente (Fig. 23-E).

La doble inoculación de *G. occultum* y *B. thuringiensis*, incrementó el contenido de K y P en un 121% y 54% respectivamente, (en relación al control inoculado sólo con *G. occultum*) siendo el tratamiento más efectivo sobre los contenidos de los nutrientes analizados (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la inoculación simple o combinada de *B. thuringiensis* (Aislado de Ballestera) y hongo formador de micorriza (*G. constrictum*; *G. mosseae* ó *G. occultum*) sobre el contenido de Nitrógeno, Fósforo y Potasio (mg) en parte de aérea de *M. arborea*.

	<i>B. thuringiensis</i> (-)			<i>B. thuringiensis</i> (+)		
	N	P	K	N	P	K
control	4.73 b	0.43 bc	8.14 bc	7.33 ab	0.78 ab	12.36 b
<i>G. constrictum</i>	4.65 b	0.28 c	4.41 c	6.20 ab	0.30 c	6.18 c
<i>G. mosseae</i>	5.17 b	0.56 b	7.42 bc	7.79 ab	0.59 b	10.60 b
<i>G. occultum</i>	6.89 ab	0.64 b	9.63 b	11.25 a	0.99 a	21.37 a

## 2.7. Efecto de *Bacillus thuringiensis* (Ballestera) y del estrés osmótico sobre aspectos fisiológicos de la planta y las actividades metabólicas (SDH y ALP) de la colonización micorrícica desarrollada por 2 hongos de colección: [*G. mosseae* (BEG 122) y *G. intraradices* (BEG 121)]: Ensayo en sustrato inerte

### 2.7.1. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

La planta seleccionada para este experimento fue *Lactuca sativa*. Se eligió esta planta, no leguminosa, como modelo experimental por presentar una serie de ventajas de gran utilidad para el objetivo perseguido en este estudio. Como sistema de cultivo se utilizó un sustrato inerte compuesto por (arena/vermiculita/sepiolita) (1v:1v:1v), esterilizado y suministrado periódicamente de solución nutritiva. De esta forma, se puede evaluar si los efectos de la interacción entre *B. thuringiensis* y cada uno de las especies de *Glomus* es directa o mediada por aspectos nutricionales. *B. thuringiensis* se inoculó a una densidad de  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup>. A los tratamientos micorrizados se les aplicaron 5 gramos de los inóculos de *G. mosseae* (BEG 122) ó *G. intraradices* (BEG 121), con características infectivas similares. Los tratamientos exentos de inóculo micorrícico, recibieron la misma cantidad de inóculo MA autoclavado junto con 2 ml de filtrado del inóculo con el objeto de restaurar la microbiota libre de propágulos MA.

### 2.7.2. Condiciones experimentales

Este sustrato sin limitación de nutrientes, se seleccionó por ser un medio idóneo, para la interpretación directa del mecanismo implicado en la interacción bacteria-HMA. A cada planta se les aplicó dos veces por semana 25 mL de solución nutritiva pH 6.8-7.0 (Hewitt, 1952), conteniendo la mitad de concentración de fósforo, ya que este nivel de P no se afecta la infección MA, y se obtienen niveles altos de colonización en plantas inoculadas con *G. mosseae* ó *G. intraradices* (Ruiz-Lozano & Azcón, 1996).

Antes de cosechar se analizaron aspectos fisiológicos y para ello se realizaron las medidas de actividad fotosintética, tasa transpiratoria, conductancia estomática y eficiencia en el uso del agua. Estas determinaciones se midieron 2 horas después de que se iniciara el periodo de luz. Para estas determinaciones se utilizó un analizador de CO<sub>2</sub> infrarrojo, integrado y portátil (Modelo LCA-3, Analytical Development Company) y una lámpara halógena con una intensidad luminosa de 1180  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Long & Hällgren, 1987)

Las plantas fueron crecidas en cámara de cultivo bajo condiciones controladas. El estrés osmótico fue inducido mediante la aplicación de una solución al 15% de PEG a la mitad de las macetas de cada tratamiento. La aplicación del PEG se realizó en dos fases diferentes de crecimiento vegetal, (una semana tras la siembra y 24 horas antes de cosechar) como han descrito Ruiz-Lozano & Azcón, (1997). El resto de macetas de cada tratamiento se mantuvieron sin adición de PEG como controles. Al sustrato (arena/sepiolita/vermiculita) antes de ser esterilizado, se le adicionó un gramo de fosfato de roca (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) a una concentración de 19 mg Kg.<sup>-1</sup> (Olsen *et al.*, 1954). Las plantas se cosecharon a las 8 semanas de crecimiento vegetal. Las raíces fueron cuidadosamente lavadas y una vez pesadas se tomaron tres alícuotas. Una alícuota para la tinción (no vital) con azul de tripán, donde se cuantifica todo el tejido fúngico. Las otras dos fracciones de raíz fueron usadas para las tinciones histoquímicas metabólicas como son la actividad SDH y ALP (técnicas descritas en el Apartado de Material y Métodos Generales).

La actividad de SDH, se reveló de acuerdo al procedimiento descrito por Smith & Gianinazzi-Pearson (1990). La actividad ALP, fue determinada por el procedimiento descrito por Tisserant (1993). El micelio intraradical, tanto el total (Tinción TB), como el vivo (SDH) y el activo (ALP), se evaluó por el Método de Trouvelot *et al* (1986).

El micelio extraradical desarrollado en suelo se evaluó siguiendo una adaptación del Método descrito por Jones y Mollison (1948) (Descrito en Material y Métodos Generales).

El contenido de prolina en hojas y raíz se realizó por colorimetría (Bates *et al.*, 1973). Se determinó en hoja la concentración de P (Olsen y Dean, 1965), N (micro-Kjeldahl) y K (Lachica, 1973).

### 2.7.3. *Objetivo*

- Evaluar los efectos de la doble inoculación (*B. thuringiensis*-hongos MA) en medio sin limitación nutritiva sobre crecimiento, nutrición y parámetros fisiológicos de la planta, bajo condiciones de estrés osmótico [(inducido por polietilenglicol (PEG))].
- Estudiar el efecto de *B. thuringiensis* sobre el desarrollo, la fisiología y el metabolismo, de la colonización producida por *G. mosseae* (BEG 122) ó *G. intraradices* (BEG 121).

### 2.7.4. *Diseño experimental*

Los dos factores considerados en el diseño experimental fueron: (1) el estrés osmótico inducido por PEG y (2) la interacción hongos MA (*G. mosseae* ó *G. intraradices* de colección) -*Bacillus thuringiensis*. Con un total de 12 tratamientos y 5 repeticiones de cada uno. *Tratamientos controles sin PEG*: Control (C), *B. thuringiensis* (B), *G. mosseae* BEG 122 (Gm), *G. intraradices* BEG 121 (Gi), interacciones bacteria-endofitos (Gm+B; Gi+B). Los tratamientos del factor estrés osmótico (PEG) son los mismos que los descritos para el control.

### 2.7.5. *Resultados*

La mezcla inerte usada en este estudio como sustrato (arena/vermiculita/sepiolita) resultó ser un buen medio para el desarrollo de la infección de los hongos MA. Es más, las plantas micorrizadas crecieron mejor y desarrollaron abundantes arbusculos en este sistema de cultivo. (Fig. 24 y Tabla 4).

*B. thuringiensis*, en condiciones de estrés incrementó el desarrollo radical en un 67% y el peso de la parte aérea en un 56% (Fig. 24). *G. intraradices* fue más efectivo sobre el desarrollo de parte aérea e incrementó su valor en un 222% (sin estrés), y en un 127% en las plantas estresadas (PEG).



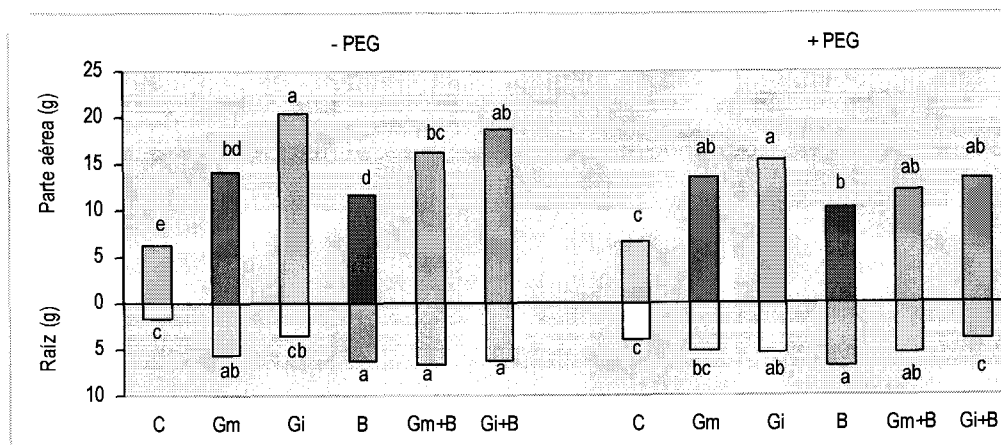


Fig. 24. Efecto de *B. thuringiensis* y/o el estrés osmótico inducido por PEG sobre el peso fresco de parte aérea y raíz en plantas de *Lactuca sativa*. Los tratamientos son: C (Control), B (*B. thuringiensis*) Gm (*G. mosseae*), Gi (*G. intraradices*), Gm+B (*G. mosseae* + *B. thuringiensis*.) y Gi+B (*G. intraradices* + *B. thuringiensis*)

Casi la totalidad de parámetros infectivos valorados, usando la tinción TB, fueron más alto en plantas colonizadas por *G. intraradices* en ausencia de estrés. Sin embargo, estos valores de infección fueron igualados por *G. mosseae* cuando se inoculó en forma conjunta con la bacteria. En el medio de cultivo utilizado, la gran infectividad de los hongos no estuvo relacionada el desarrollo de la planta (Tabla 4 y Fig. 24). En general, la inoculación bacteriana no afectó a los parámetros de crecimiento en las plantas micorrizadas pero si mejoró los parámetros infectivos del hongo (Tabla 4). *B. thuringiensis* favoreció las actividades metabólicas (SDH y ALP) de los dos endofitos ensayados. La actividad ALP se duplicó en presencia de la bacteria, encontrándose los valores más altos en los tratamientos de interacción entre *G. intraradices* y la bacteria, en ausencia de estrés.

Bajo condiciones de estrés hídrico, las raíces colonizadas por *G. intraradices*, presentan mayor actividad ALP que las raíces infectadas por *G. mosseae* aunque la actividad SDH fue mayor en *G. mosseae* que en *G. intraradices*. Es por ello que la proporción de actividad (ALP) versus vitalidad (SDH), del micelio intraradical fue mayor en raíces colonizadas por *G. intraradices*. El efecto de *B. thuringiensis* sobre la actividad SDH de *G. intraradices* fue mayor en condiciones de estrés. El resultado más importante de destacar es que *B. thuringiensis* favoreció la colonización MA y la actividad metabólica de los dos hongos, tanto en ausencia como en presencia del estrés.

Table 4. Efecto de *B. thuringiensis* (B) y/o estrés inducido por PEG sobre la colonización MA observada por la tinción Tripán Blue (TB), actividad succinato deshidrogenasa (SDH) y fosfatasa alcalina (ALP) en raíces de *Lectuca sativa* colonizadas por *G. mosseae* (Gm) ó *G. intraradices* (Gi)

	%F	%M	%m	%a	%A
TB					
No PEG					
Gm	98 a	46.4 c	47.3 c	68.0 c	31.5 c
Gm+B	97 a	87.6 a	90.3 a	98.0 a	85.8 a
Gi	99 a	73.4 ab	74.1 ab	84.0 b	61.6 b
Gi+B	99 a	87.6 a	88.5 a	99.0 a	86.7 a
PEG					
Gm	97 a	44.1 c	45.5 c	88.0 ab	38.8 bc
Gm+B	97 a	69.9 b	72.0 b	89.8 ab	62.8 b
Gi	99 a	42.4 c	42.8 c	84.0 b	35.6 c
Gi+B	97 a	72.0 ab	74.2 ab	100.0 a	72.0 a
SDH staining					
No PEG					
Gm	99 a	33.0 c	33.3 c	67.4 c	22.2 d
Gm+B	99 a	73.0 a	73.7 a	97.1 a	70.9 a
Gi	98 a	69.7 a	71.1 a	80.5 b	56.1 b
Gi+B	97 a	76.7 a	79.0 a	97.7 a	75.0 a
PEG					
Gm	97 a	42.9 c	44.2 c	87.7 b	37.4 d
Gm+B	98 a	60.4 b	61.6 b	83.1 b	50.2 b
Gi	98 a	34.7 c	35.4 c	83.8 b	29.1 cd
Gi+B	99 a	71.7 a	72.4 a	96.1 a	68.9 a
ALP staining					
No PEG					
Gm	97 a	18.3 c	18.8 c	61.4 c	11.2 d
Gm+B	97 a	34.3 b	35.3 b	71.4 b	24.5 b
Gi	99 a	18.5 c	18.7 c	84.8 a	15.7 c
Gi+B	97 a	48.2 a	49.6 a	82.2 a	39.7 a
PEG					
Gm	99 a	17.5 c	17.6 c	60.8 c	10.6 d
Gm+B	98 a	47.4 a	48.3 a	76.7 b	36.4 a
Gi	98 a	30.0 b	30.6 b	62.1 c	18.5 c
Gi+B	98 a	42.2 a	43.0 a	80.9 ab	34.1 a

*B. thuringiensis* redujo el intercambio de gases en la planta y la tasa de transpiración (Tabla 5). La conductancia estomática fue incrementada considerablemente por los dos hongos micorrícicos bajo condiciones de estrés, inducido por PEG y solo *G. mosseae* bajo estas mismas condiciones incrementó el intercambio de CO<sub>2</sub> y UEA. Por tanto *B. thuringiensis* afectó estos parámetros fisiológicos en forma diferente de acuerdo con la especie de hongo asociado. La coinoculación de *B. thuringiensis* con *G. intraradices* incrementó la fotosíntesis, la conductancia estomática y el UEA en la plantas, pero estos

efectos no se observaron en interacción con *G. mosseae*. El estrés hídrico disminuyó en mayor medida el intercambio de gases en las plantas colonizadas por *G. intraradices* que por *G. mosseae*. Bajo condiciones de estrés se encontraron diferencias considerables en la tasa de intercambio de CO<sub>2</sub>, y en el UEA entre plantas colonizadas por el hongo menos efectivo (*G. intraradices*) y el más efectivo para estas variables consideradas (*G. mosseae*) (Tabla 5).

**Table 5.** Efecto de *B. thuringiensis* (B) y/o estrés inducido por PEG sobre la tasa de transpiración (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), tasa fotosintética (μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), eficiencia en el uso del agua EUA (mmol CO<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>) y conductancia estomática (mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) sobre plantas de *Lactuca sativa*. Los tratamientos son indicados como: C (Control), B (*B. thuringiensis*), Gm (*G. mosseae*), *G. intraradices* (Gi).

Tratamientos	Tasa de Transpiración	Tasa Fotosintética	Eficiencia en el uso del agua	Conductancia estomática
No PEG				
C	2.59 a	8.92 e	3.45 d	7.43 d
B	2.36 b	5.79 f	2.46 e	12.14 c
Gm	2.32 b	10.48 c	4.52 c	14.26 ab
Gi	2.34 b	12.35 b	5.28 b	13.45 b
Gm+B	2.32 b	9.81 d	4.22 c	14.09 ab
Gi+B	2.25 b	12.86 a	5.75 a	15.19 a
PEG				
C	2.22 b	4.52 bc	1.79 c	7.95 d
B	2.31 a	3.59 d	1.56 d	12.33 c
Gm	2.06 e	5.50 a	2.67 a	16.15 a
Gi	2.23 b	2.52 e	1.23 e	14.22 b
Gm+B	2.17 cd	4.22 c	1.95 c	15.04 ab
Gi+B	2.12 de	4.73 b	2.23 b	15.95 a

En ausencia de estrés hídrico inducido por PEG, el máximo valor de contenido de prolina en hoja se encontró en las plantas colonizadas por *G. intraradices* (Fig. 25). En condiciones de estrés, los máximos valores se encontraron en las plantas colonizadas por *G. mosseae*.

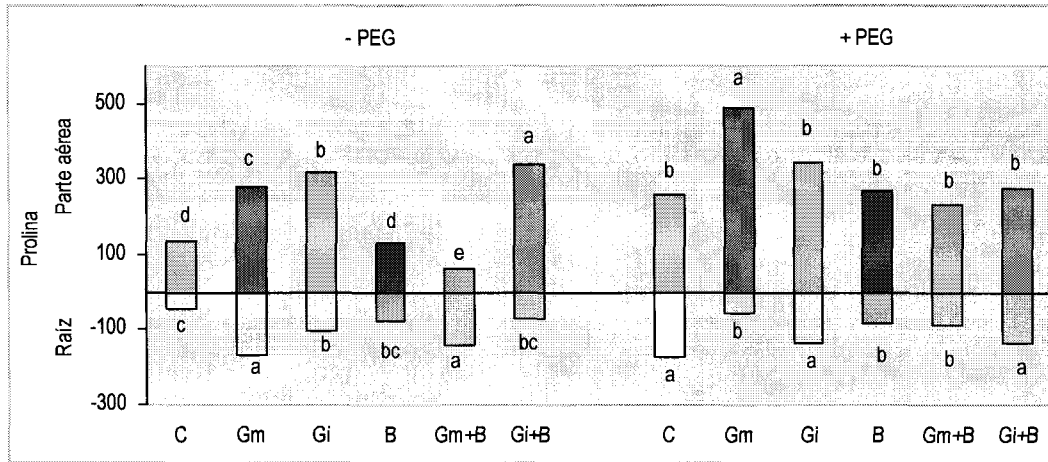


Fig. 25. Efecto de *B. thuringiensis* y/o el estrés osmótico inducido por PEG sobre el contenido de prolina en parte aérea y raíz (mg de prolina/g. de peso fresco). Los tratamientos son: C (Control de plantas no inoculadas), B (*B. thuringiensis*), Gm (*G. mosseae*), Gi (*G. intraradices*), Gm+B (*G. mosseae* + *B. thuringiensis*.) y Gi+B (*G. intraradices* + *B. thuringiensis*)

En ausencia de PEG, el alto desarrollo de micelio extraradical producido por *G. intraradices*, se correlacionó con la alta capacidad del hongo para la colonización intraradical. *B. thuringiensis*, en condiciones adversas inducidas por la aplicación de PEG, incrementó (significativamente) la longitud de micelio extraradical de este endofito en un 35% (Fig. 26). El micelio extraradical producido por *G. mosseae* no se afectó por la presencia de *B. thuringiensis* en ninguna de las condiciones ensayadas.

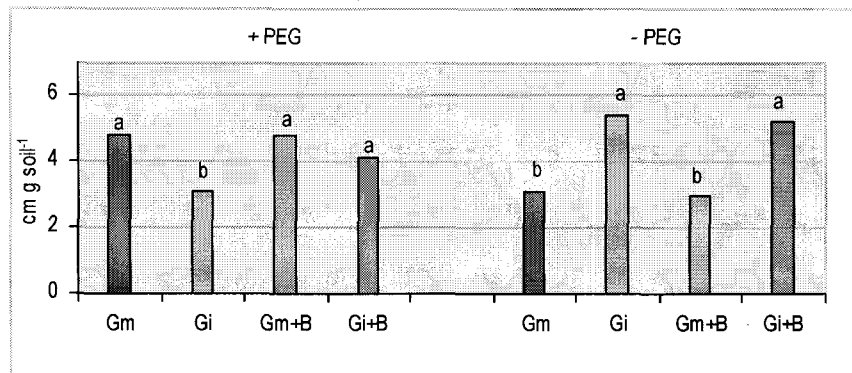


Fig. 26. Efecto de *B. thuringiensis* (B) y el estrés osmótico inducido por PEG sobre la producción de micelio extraradical (cm g suelo<sup>-1</sup>) en plantas micorrizadas por Gm (*G. mosseae*) ó Gi (*G. intraradices*).

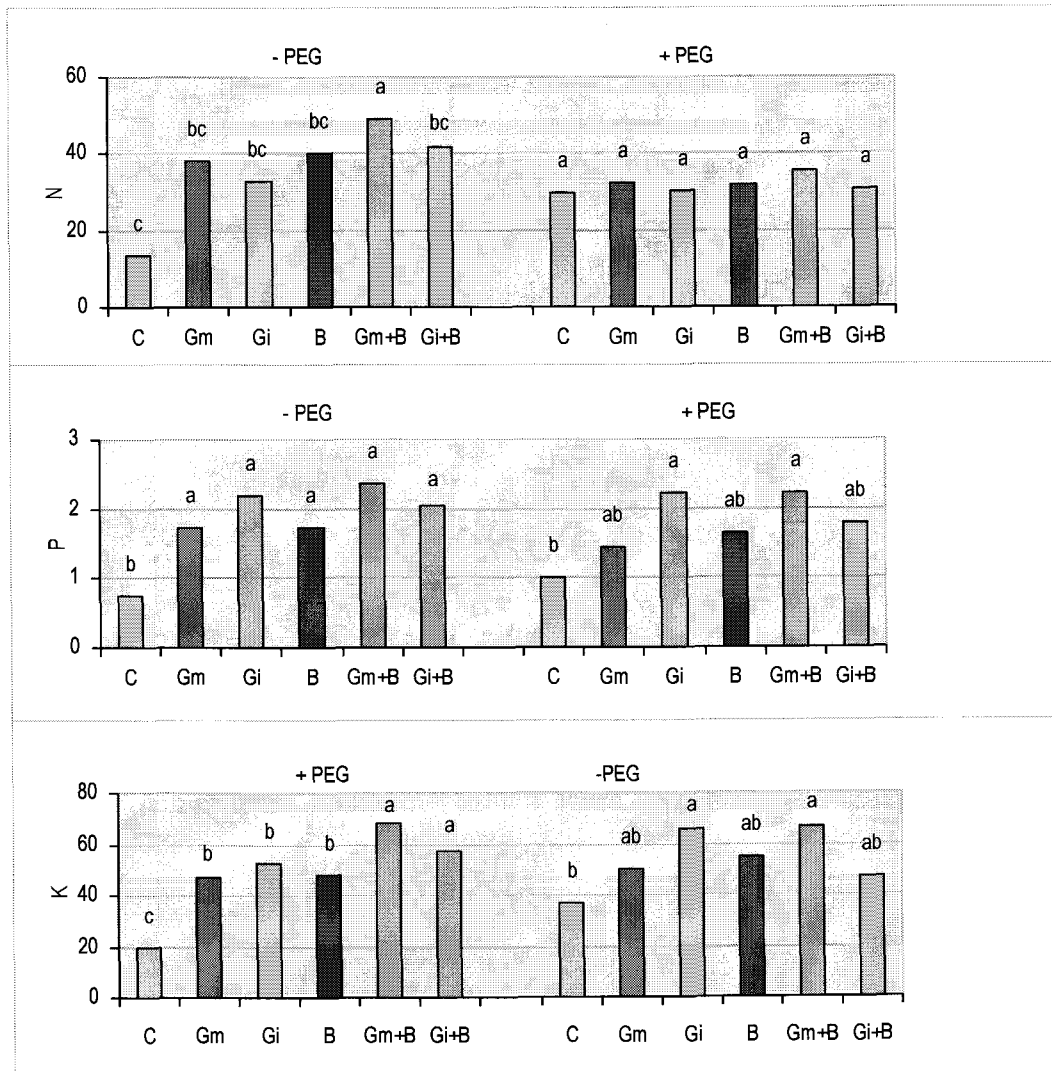


Fig. 27. Efecto del estrés osmótico inducido por PEG sobre los contenidos N, P and K en parte aérea (mg plant<sup>-1</sup>) de plantas de *Lactuca sativa* no inoculadas C (Control) o inoculadas con B (*B. thuringiensis*), Gm (*G. mosseae*), Gi (*G. intraradices*), Gm+B (*G. mosseae* + *B. thuringiensis*.) y Gi+B (*G. intraradices* + *B. thuringiensis*).

En ausencia de PEG, EL contenido de N fue incrementado por todos los tratamientos y particularmente en un 260% sobre el control, por la doble inoculación de *G. mosseae* y *B. thuringiensis* (Fig. 27). En condiciones de estrés hídrico, este parámetro no varió entre los distintos tratamientos. Igualmente que con el N, el contenido de P en planta incrementó con todos los tratamientos microbianos en ausencia de estrés, pero en condiciones de

estrés *G. mosseae* en asociación con *B. thuringiensis* y *G. intraradices* sólo fueron los tratamientos más efectivos. En cuanto al contenido de K en condiciones de estrés, *G. mosseae* inoculado conjuntamente con *B. thuringiensis* fue el tratamiento más efectivo incrementando este valor en un 85% con respecto al control sin inocular. *B. thuringiensis* solo fue efectivo incrementando el contenido de K de plantas micorrizadas y no micorrizadas en ausencia de estrés osmótico (Fig. 27).

### 3 EFECTOS DEL ESTRÉS HÍDRICO Ó SALINO "in vitro" SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS: FITOHORMONAS (ACIDO INDOL ACÉTICO) Y SOLUTOS COMPATIBLES (PROLINA Y GLUTAMATO) POR LOS AISLADOS BACTERIANOS SELECCIONADOS (BAZA Y ALICANTE)

#### 3.1. Objetivos

- Estudiar "in-vitro" los mecanismos fisiológicos y metabólicos de 9 aislados de *Bacillus* sp, incluyendo una cepa de referencia, en respuesta a niveles crecientes de estrés hídrico ó salino.
- Evaluar los cambios inducidos por estos estreses sobre el crecimiento de los aislados bacterianos, en el contenido proteico y en la acumulación de aminoácidos como glutamato y prolina.
- Determinar la capacidad de dichos aislados para producir ácido indol acético bajo las condiciones de estrés mencionadas.

#### 3.2. Condiciones experimentales

Los aislados bacterianos utilizados para este ensayo "in vitro" fueron 8 bacterias del género *Bacillus*, de los cuales 6 aislados se obtuvieron a partir de suelo rizosférico de tres parcelas de la Provincia de Alicante. Los aislados utilizados fueron los siguientes: Aguas Claras: *B. thuringiensis* I y *B. thuringiensis* II; Ballestera: *B. thuringiensis* y *B. macroides*; Campello: *B. thuringiensis* y *B. macroides*. También se utilizaron dos *B. endophyticus* (razas 2 y 4) aislados de suelo rizosférico de *Retama sphaerocarpa* de la Sierra de Baza y como referencia una raza de *B. thuringiensis* de la Colección Española de Microbiología.

Para determinar las características de crecimiento de las bacterias en condiciones de estrés salino, se crecieron en medio de cultivo NB (Nutrient Broth) suplementado con

diferentes concentraciones de NaCl (100, 200, 300 y 400 mM) y como inductor de estrés hídrico se utilizó PEG: al 0, 1, 5 y 10 %. Todos los medios fueron inoculados con 1 ml de un precultivo en fase exponencial. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 48 horas a 170 rpm de agitación. El crecimiento se determinó siguiendo la turbidez de los cultivos a intervalos de una hora a 600 nm.

La determinación del contenido de prolina, glutamato y proteínas en la biomasa bacteriana se realizó a partir de extractos celulares siguiendo el protocolo de Belgrader *et al.*, 1999 como se ha descrito en el apartado de material y métodos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada aislado. Solo se sometieron a estrés hídrico inducido por PEG, aquellos aislados que crecieron previamente y mostraron diferencias en la producción de los metabolitos estudiados en condiciones de salinidad.

### 3.3. Resultados

Los resultados obtenidos demuestran las diferentes capacidades de respuesta de los aislados bacterianos pertenecientes al género *Bacillus*, sometidas tanto al estrés causado por NaCl como al estrés hídrico (causado por disminución del potencial osmótico inducido por PEG) (Tablas 6-9).

En presencia de estrés salino producido por NaCl, los aislados bacterianos toleraron las condiciones ensayadas, incluyendo el *B. thuringiensis* de colección, que llegó a soportar 400 mM de NaCl. Por el contrario, bajo condiciones de estrés hídrico inducido por PEG, solo llegó a soportar el 1% de PEG adicionados al medio. En cuanto a su capacidad de producir AIA, se encontraron valores muy bajos incluso en condiciones óptimas. No obstante se observó una disminución de la auxina estudiada a medida que aumentaba el grado de estrés en el medio. En cambio la producción de osmolitos protectores, (glutamato y prolina) se obtuvo un incremento gradual de prolina al incrementar el estrés salino. Solo cuatro de los aislados bacterianos acumularon glutamato en respuesta a la salinidad del medio (Tabla 7).

**Tabla 6.** Producción de prolina ( $\mu\text{g}$  prolina  $\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>) por los aislados bacterianos autóctonos a dosis crecientes de NaCl (0, 100, 200, 300, 400 y 600 mM) en el medio de cultivo.

nc: No creció. nd: No se detectó por el método usado.

	Prolina (mg pro mg proteína -1)					
	0	100	200	300	400	600
<i>B. thuringiensis</i> I (Aguas Claras)	0.50	1.09	9.69	18.67	39.28	nc
<i>B. thuringiensis</i> II (Aguas Claras)	2.10	12.14	17.65	36.02	43.57	nc
<i>B. thuringiensis</i> (Campello)	nd	26.83	31.12	33.16	37.65	nc
<i>B. macroides</i> (Campello)	nd	nc	nc	nc	nc	nc
<i>B. macroides</i> (Ballestera)	1.26	107.24	143.77	148.06	175.20	nc
<i>B. thuringiensis</i> (Ballestera)	1.12	12.14	38.60	39.49	107.24	151.00
<i>B. thuringiensis</i> (Referencia)	1.73	2.75	4.79	8.51	6.42	nc
<i>B. endophyticus</i> (Baza raza 2)	1.45	91.35	110.30	113.36	118.67	192.00
<i>B. endophyticus</i> (Baza raza 4)	2.79	350.10	352.14	357.04	373.57	415.00

**Tabla 7.** Producción de glutamato ( $\mu\text{g}$  glutamato  $\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>) por los aislados bacterianos autóctonos a dosis crecientes de NaCl (0, 100, 200, 300, 400 y 600 mM) en el medio de cultivo.

nc: No creció. nd: No se detectó por el método usado.

	Glutamato (mg glu mg proteína -1)					
	0	100	200	300	400	600
<i>B. thuringiensis</i> I (Aguas Claras)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>B. thuringiensis</i> II (Aguas Claras)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>B. thuringiensis</i> (Campello)	nd	26.83	31.12	33.16	37.65	nd
<i>B. macroides</i> (Campello)	nd	nc	nc	nc	nc	nd
<i>B. macroides</i> (Ballestera)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>B. thuringiensis</i> (Ballestera)	9.2	15	26	28	44	51
<i>B. thuringiensis</i> (Referencia)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>B. endophyticus</i> (Baza raza 2)	7.8	21	32	39	41	62
<i>B. endophyticus</i> (Baza raza 4)	6.4	18	43	68	77	79

**Tabla 8.** Producción de ácido indol acético (AIA) ( $\mu\text{g}$   $\text{ml}^{-1}$ ) por los aislados bacterianos autóctonos a dosis crecientes de NaCl (0, 100, 200, 300, 400 y 600 mM) en el medio de cultivo. nd: No se detectó por el método

	Acido Indol Acético (mg ml-1 )					
	0	100	200	300	400	600
<i>B. thuringiensis</i> I (Aguas Claras)	2.80	0.283	0.375	0.328	0.060	
<i>B. thuringiensis</i> II (Aguas Claras)	2.60	0.109	0.202	0.169	0.090	
<i>B. thuringiensis</i> (Campello)	2.10	0.261	0.332	0.204	0.223	
<i>B. macroides</i> (Campello)	nd	0	0	0	0	
<i>B. macroides</i> (Ballestera)	1.60	0.743	0.369	0.156	0.061	
<i>B. thuringiensis</i> (Ballestera)	2.28	0.683	0.746	0.713	0.743	0.7
<i>B. thuringiensis</i> (Referencia)	0.358	0.410	0.287	0.180	0.094	
<i>B. endophyticus</i> (Baza raza 2)	1.06	0.787	0.779	0.829	0.655	0.598
<i>B. endophyticus</i> (Baza raza 4)	2.80	0.738	0.923	0.671	0.603	0.733



**Tabla 9.** Producción de prolina ( $\mu\text{g}$  prolina  $\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>), glutamato ( $\mu\text{g}$  glutamato  $\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>) y ácido indol acético ( $\mu\text{g}$   $\text{ml}^{-1}$ ) por los aislados bacterianos autóctonos a dosis crecientes de PEG (0, 1, 5 y 10%) en el medio de cultivo (NB).

PEG (%)	0	1	5	10
<i>B. thuringiensis</i> (Ballestera)				
Prolina	2.12	8.14	40.50	52.18
Glutamato	8.60	12.00	42.00	54.00
IAA	2.30	0.89	0.62	0.41
<i>B. thuringiensis</i> (Referencia)				
Prolina	2.12	2.92	nc	nc
Glutamato	nd	nd		
IAA	0.325	0.112		
<i>B. endophyticus</i> (Baza raza 2)				
Prolina	2.50	75.20	115.20	130
Glutamato	6.92	9.20	35.00	78
IAA	1,045	0.682	0.791	0.754
<i>B. endophyticus</i> (Baza raza 4)				
Prolina	2.79	241	310	420
Glutamato	5.18	15	54	95
IAA	3.01	0.618	0.725	0.710

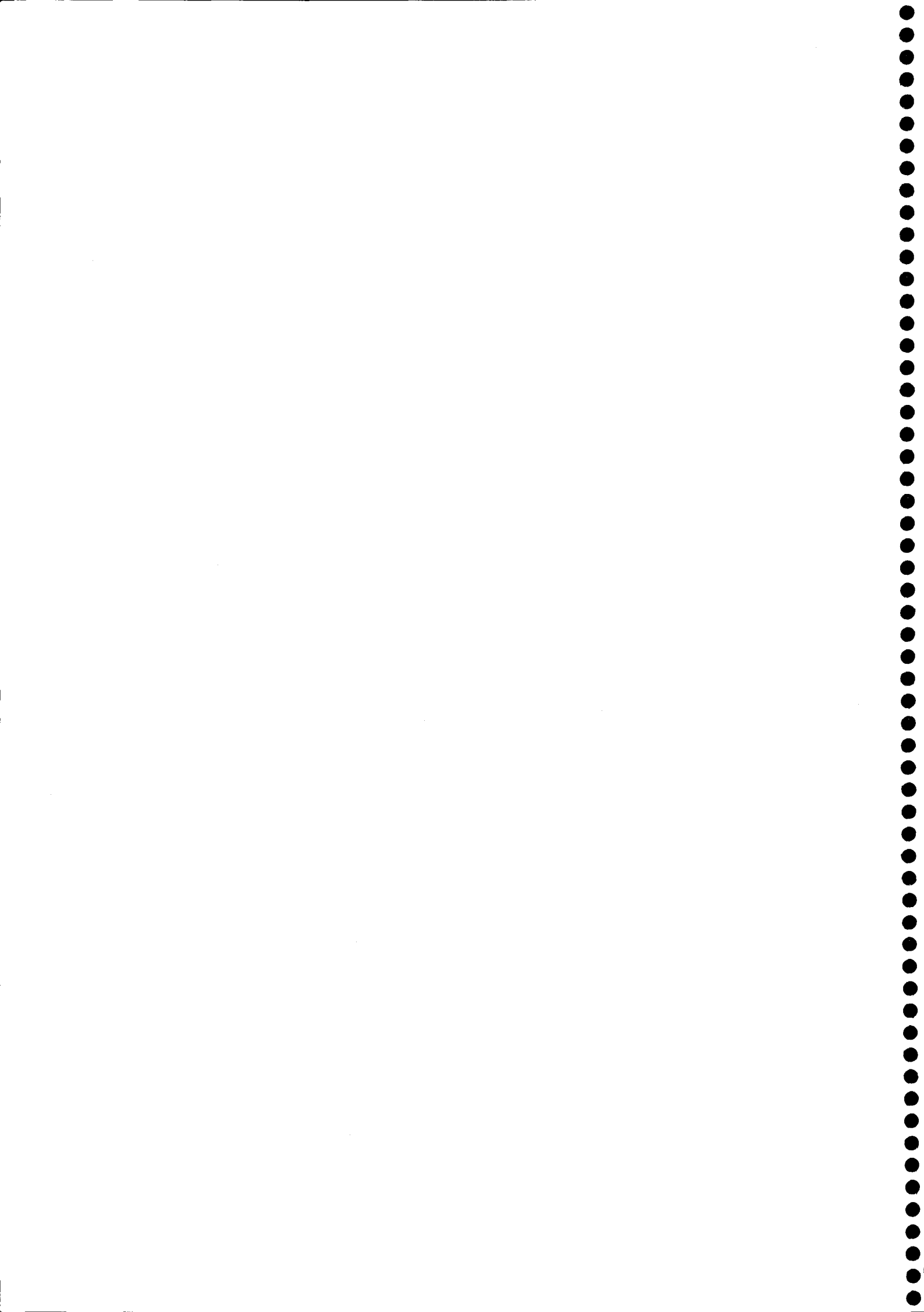
Las bacterias autóctonas de las áreas estudiadas (Aguas Claras, Campello y Ballestera pertenecientes a la provincia de Alicante ó Baza), demostraron comportamientos diferentes, incluso tratándose de la misma especie. Los dos *B. thuringiensis* de Aguas Claras, acumularon prolina (en cantidades muy diferentes a pesar de ser la misma especie) particularmente a determinados niveles de NaCl. El glutamato no se detectó en ninguno de estos dos aislados y el AIA disminuyó al aumentar el estrés salino en ambas bacterias. El aislado *B. thuringiensis* I fue el que produjo mas cantidad de AIA y el aislado *B. thuringiensis* II fue el mas efectivo acumulando prolina. *B. thuringiensis* de Campello fue un efectivo productor de prolina particularmente a 100 y 200 mM de NaCl y de glutamato a cualquier nivel de salinidad. Este aislado mantuvo prácticamente constante y en un alto nivel la producción de AIA a cualquier nivel de NaCl. En cambio *B. macroides* procedente de esta misma zona no soportó el estrés salino limitándose su crecimiento fuertemente a 100mM de NaCl, a diferencia de *B. macroides* de Ballestera que soportó los 400 mM de NaCl con una gran acumulación de prolina (175.2  $\mu\text{g}$  /  $\text{mg}$  de proteína), aunque el glutamato, como en algunos de los casos anteriores, no se pudo detectar.

*B. thuringiensis* aislado a partir de suelo rizosférico de Ballestera (Alicante) resistió los 600 mM de NaCl y los valores de prolina incrementaron al aumentar el estrés hídrico en un rango que osciló entre los 12.14  $\mu\text{g} / \text{mg}$  de proteína a los 100mM de NaCl hasta los 151 $\mu\text{g} / \text{mg}$  de proteína a 600 mM de la sal. El mismo comportamiento se observó con la producción de glutamato, (desde 9.2 hasta 51  $\mu\text{g} / \text{mg}$  de proteína), encontrando que la prolina triplicaba los valores de glutamato en la mayoría de los casos que se pudo detectar. La poca sensibilidad de estos aislados al NaCl, en relación a la mostrada por *Bacillus macroides* (Campello) sugiere una mayor capacidad de osmoadaptación que permite el crecimiento a elevada osmolaridad a partir de la síntesis de solutos compatibles.

Los dos *Bacillus endophyticus* (razas 2 y 4) aislados de suelo rizosférico de Baza también demostraron tolerancia a los 600 mM de NaCl, donde se detectaron los valores más altos de prolina (192 y 415  $\mu\text{g} / \text{mg}$  de proteína) y de glutamato (62 y 79  $\mu\text{g} / \text{mg}$  de proteína). Para las especies de *Bacillus* ensayadas en este experimento, la prolina fue el osmoprotector producido endógenamente en mayor proporción.

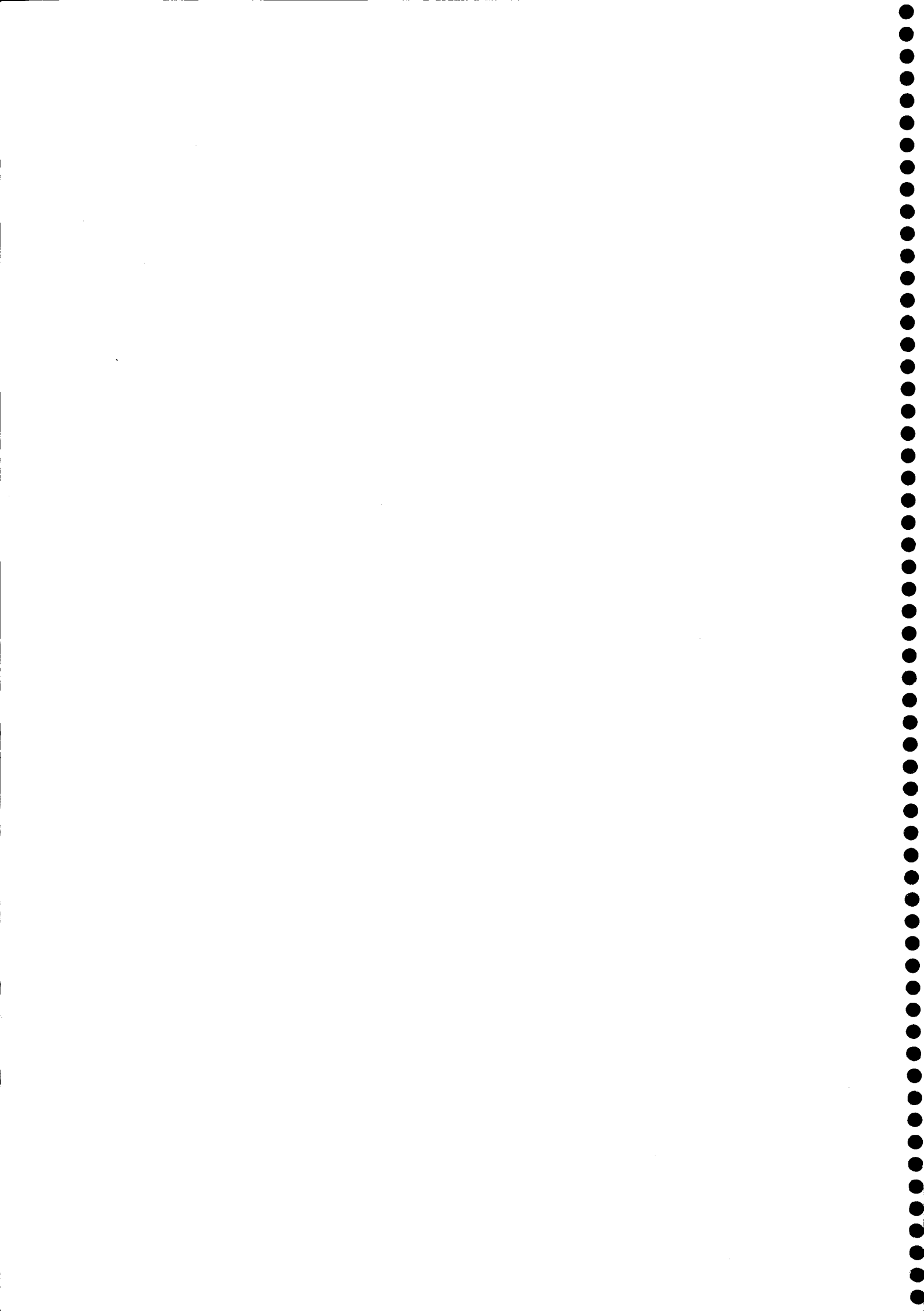
En el estudio de estrés osmótico inducido por PEG, solo se seleccionaron los aislados que llegaron a tolerar los 600 mM de NaCl incluyéndose también el *B. thuringiensis* de referencia. Tanto *B. thuringiensis* (Ballestera) como los dos *B. endophyticus* de Baza soportaron hasta el 10 % de PEG, obteniendo valores de prolina y glutamato con tendencias relativamente similares a los obtenidos a los 600mM de NaCl.

En este estudio tanto el estrés salino como el hídrico causaron una marcada acumulación de glutamato, no en todas las bacterias como se explicó anteriormente, pero si en las más tolerantes como en el caso de *B. thuringiensis* (Ballestera) y los dos *B. endophyticus* aislados de Baza. La acumulación de prolina, como la de glutamato fue inducida por las condiciones extremas ensayadas e incrementó su acumulación a medida que aumentaba el estrés, indicando estos valores, que estos compuestos han contribuido a la osmorregulación en condiciones extremas de salinidad y de déficit hídrico.



---

**V. Interacción hongos MA-rizobacterias en  
suelos contaminados**



## 1. AISLAMIENTO DE HONGOS MA Y PGPR DE LOS SUELOS CONTAMINADOS CON Zn ó Cd

Los hongos formadores de micorriza, se aislaron a partir de suelo rizosférico de plantas crecidas en suelo contaminado en 1991 (RISSAC, Nagyhörsök, Hungría), con cadmio aplicado como sulfato de cadmio  $\text{CdSO}_4$  y el Zn como  $\text{ZnSO}_4$  en forma **individualizada** (Kádár, 1995). Para aumentar la población nativa de los hongos micorrícicos en suelo contaminado con Cd o Zn y obtener inóculo MA de ellos se prepararon cultivos con suelo contaminado con  $90 \text{ mg Kg}^{-1}$  y  $270 \text{ mg Kg}^{-1}$  de Zn ó Cd (Ryssac) y como planta trampa se utilizó *Trifolium repens* (elegida por su rápido crecimiento y proliferación de raíces). Las plantas crecieron en condiciones de invernadero (temperaturas entre  $19\text{--}25 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad y humedad relativa de 70-90%) durante 4 meses.

Para el aislamiento de los hongos MA más representativos (de cada suelo) y la producción de inóculos puros de ellos se siguió el protocolo descrito en el apartado de **MATERIAL Y METODOS GENERALES**.

Igualmente, el aislamiento de las rizobacterias se realizó como está descrito en MATERIAL Y METODOS GENERALES. Se seleccionaron las dos bacterias más abundantes en cada suelo contaminado con Cd ó Zn respectivamente.

## 2. SELECCIÓN DE HONGOS MA Y BACTERIAS (PGPR) DE LOS SUELOS OBJETO DE ESTUDIO (HUNGRÍA)

### 2.1. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

La planta seleccionada para la realización de los ensayos que se describen a continuación, fue *Trifolium repens*. Las semillas se sembraron directamente en macetas (de 100 g de capacidad) donde el sustrato había recibido en los tratamientos micorrizados, 10 g de inóculo MA (inóculo que contenía el endofito nativo mas abundante *G. mosseae* en ambos casos obtenidos a partir de los suelos naturales contaminados con Cd ó Zn). Los dos aislados bacterianos ensayados para cada metal se aplicaron directamente a una densidad de  $10^8$  ufc (una semana después de la siembra). Todas las plantas fueron inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* a una concentración de  $10^8$  ufc. Los tratamientos no micorrizados recibieron 2 ml de un filtrado del inóculo para reincorporar la microbiota exenta de propágulos de micorriza.

## 2.2. Ensayos de invernadero: características del suelo y condiciones experimentales

El suelo usado para los ensayos en microcosmo bajo condiciones controladas presentaba las siguientes características: materia orgánica 1.63%, pH de 7.2. La concentración de nutrientes fue: N (total) 2.1 mg Kg<sup>-1</sup>, P (Olsen) 1.7mg Kg<sup>-1</sup> y K (extraído con NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 0.8 mg Kg<sup>-1</sup>. El suelo fue tamizado y tinalizado durante una hora a vapor fluente, durante tres días consecutivos. De esta forma el suelo queda libre de propágulos de micorriza. El suelo fue mezclado con arena en una proporción de 4:1. La arena se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min. Esta mezcla fue incubada durante seis semanas con concentraciones crecientes de sulfato de cadmio o zinc: 30 mg Kg<sup>-1</sup>, 90 mg Kg<sup>-1</sup> y 270 mg Kg<sup>-1</sup>. Posteriormente se midió la concentración de metal disponible en el suelo resultando las siguientes concentraciones de Cd: 13.6 mg Kg<sup>-1</sup>; 33.0 mg Kg<sup>-1</sup>; y 85.1 mg Kg<sup>-1</sup>. En el suelo contaminado con sulfato de cinc, se aplicaron las mismas concentraciones seleccionadas (30 mg Kg<sup>-1</sup>, 90 mg Kg<sup>-1</sup> y 270 mg Kg<sup>-1</sup>) y a las seis semanas de incubación la concentración de Zn disponible fue: 24 mg Kg<sup>-1</sup>, 68 mg Kg<sup>-1</sup> y 215 mg Kg<sup>-1</sup>.

## 2.3. Objetivo

Evaluar, en microcosmos, el efecto de los aislados autóctonos bacterianos y/o fúngicos de forma individual y la interacción bacteria-hongo MA en suelo contaminado artificialmente con concentraciones crecientes de CdSO<sub>4</sub> ó ZnSO<sub>4</sub>.

## 2.4. Diseño experimental

Se realizaron dos experimentos paralelos (uno para cada metal aplicado) y el diseño experimental de cada uno consistió de tres factores: (1) Tratamientos bacterianos: Un control y dos tratamientos con cada una de las dos bacterias aisladas de suelos contaminados (Aislado A y B, para referirnos al Cd y aislados I y II, para referirnos a los aislado bacterianos del Zn). El segundo factor: tratamientos micorrizados (un control sin inoculo MA y tratamiento inoculado por HMA autóctonos) y el tercer factor consistía en las 3 concentraciones de metal aplicadas al suelo.

Las plantas se cosecharon a las 12 semanas de crecimiento. Una vez cosechadas, se determinó el peso seco de parte aérea y raíz (tras secar las plantas en un horno a 65 °C durante 48 horas). La extensión de la colonización micorrícica (% de micorrización) y el número de nódulos en cada planta también fueron determinados. Se cuantificaron

parámetros de nutrición como contenido en: potasio, nitrógeno y fósforo, así como también, el contenido en parte aérea de Ni, Pb, Zn, Cd, (cada metal se midió por espectrometría de emisión atómica como ha descrito Vörös *et al.*, 2000) tras secar y digerir las muestras con  $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$

## 2.5. Resultados del efecto de la inoculación con aislados autóctonos en suelo contaminado con niveles de Cd

La doble inoculación de *G. mosseae* y el aislado bacteriano A, fue el tratamiento que más incrementó el desarrollo de parte aérea y de raíz a los tres niveles de Cd en el suelo. El aislado A, incrementó la parte aérea de las plantas micorrizadas en un 18% ( $13.6 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$ ), en un 26% ( $33.0 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$ ) y en un 35% ( $85.1 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$ ). Estas plantas alcanzaron un mayor desarrollo y mejor contenido de N y P en los suelos más contaminados por Cd (Fig. 28-30).

Los contenidos de N y P en parte aérea fueron afectados en forma diferente por los tratamientos biológicos de acuerdo a la cantidad de Cd en el suelo. Al nivel más bajo de Cd, el contenido de N en plantas sólo fue incrementado por la doble inoculación del aislado A y *G. mosseae*. En los niveles más altos ( $33.0 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$  y  $85.1 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$ ), la colonización MA fue determinante, no solo para la adquisición de P sino también para la del N (Fig. 28-30).

La infección MA y la nodulación, se redujeron a medida que incrementaba el Cd en el medio. La nodulación se estimuló por la micorrización, especialmente a los dos niveles más altos de Cd ( $33.0 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$  y  $85.1 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$ ). El incremento de los niveles de Cd en el medio limitó fuertemente la nodulación, hasta tal punto que las plantas no micorrizadas no nodularon cuando la concentración de Cd disponible era del  $85.1 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$ . El aislado bacteriano A, estimuló la formación de nódulos, al nivel de  $33.0 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$  en el suelo, así como también al nivel más bajo y alto de Cd, incrementó este parámetro en asociación con *G. mosseae* (Fig. 28-30).



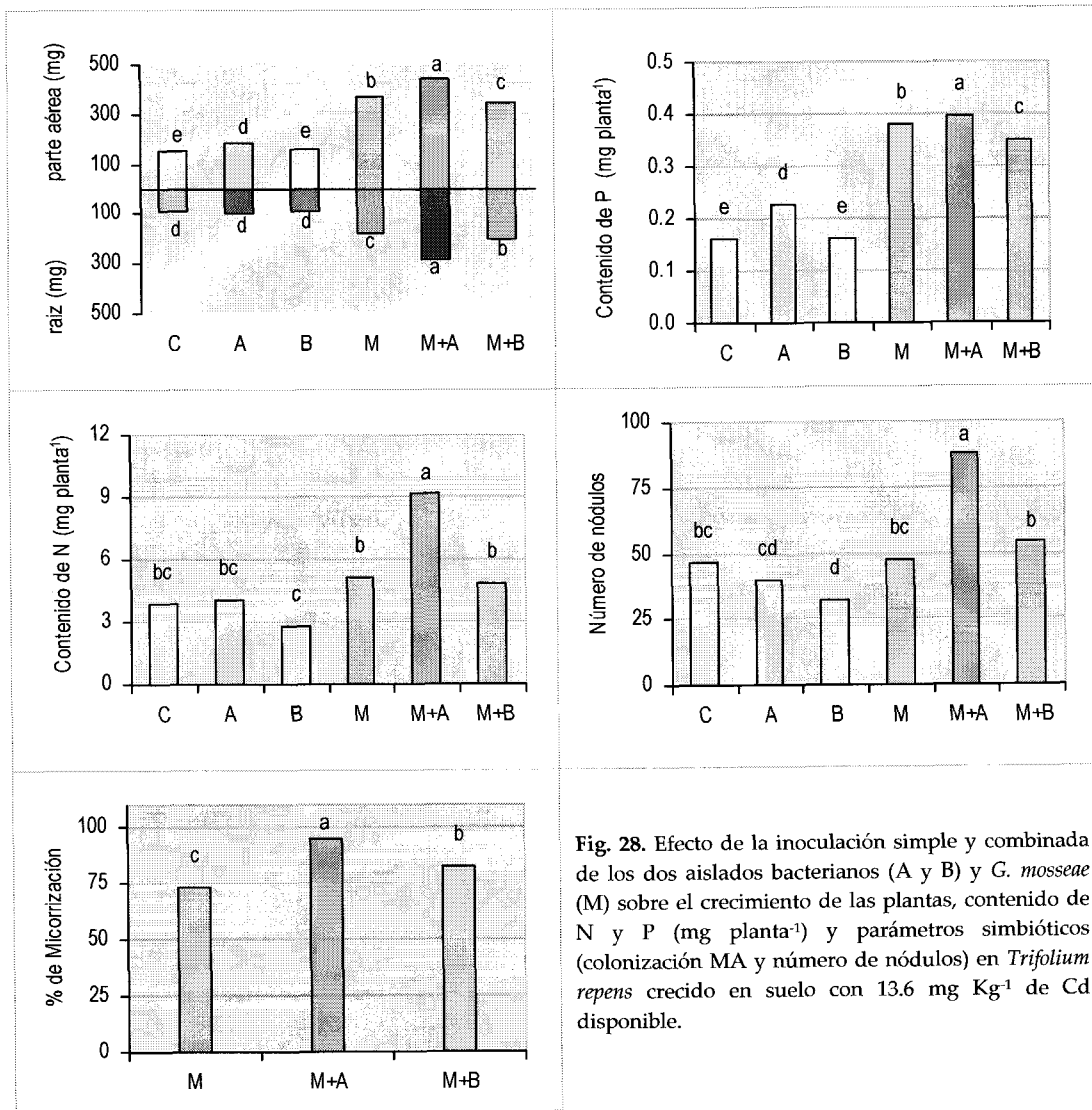


Fig. 28. Efecto de la inoculación simple y combinada de los dos aislados bacterianos (A y B) y *G. mosseae* (M) sobre el crecimiento de las plantas, contenido de N y P ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) y parámetros simbióticos (colonización MA y número de nódulos) en *Trifolium repens* crecido en suelo con  $13.6 \text{ mg Kg}^{-1}$  de Cd disponible.

Contrariamente, la concentración de Cd en la parte aérea fue reducida por los tratamientos microbianos independientemente del nivel de Cd en suelo (Tabla.10). Al nivel de  $13.6 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$ , el aislado A, no afectó la concentración de metal en planta, pero el aislado B, a este nivel y al  $33 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$  redujo la concentración de Cd en las plantas. A los dos niveles mas altos ( $33.0$  y  $85.1 \text{ Cd mg Kg}^{-1}$ ), el aislado A redujo la concentración de Cd en planta en un 53% y 33% con respecto a los controles sin inocular. Así mismo, la colonización MA redujo fuertemente la concentración de Cd en la planta, independientemente del nivel de Cd en suelo.

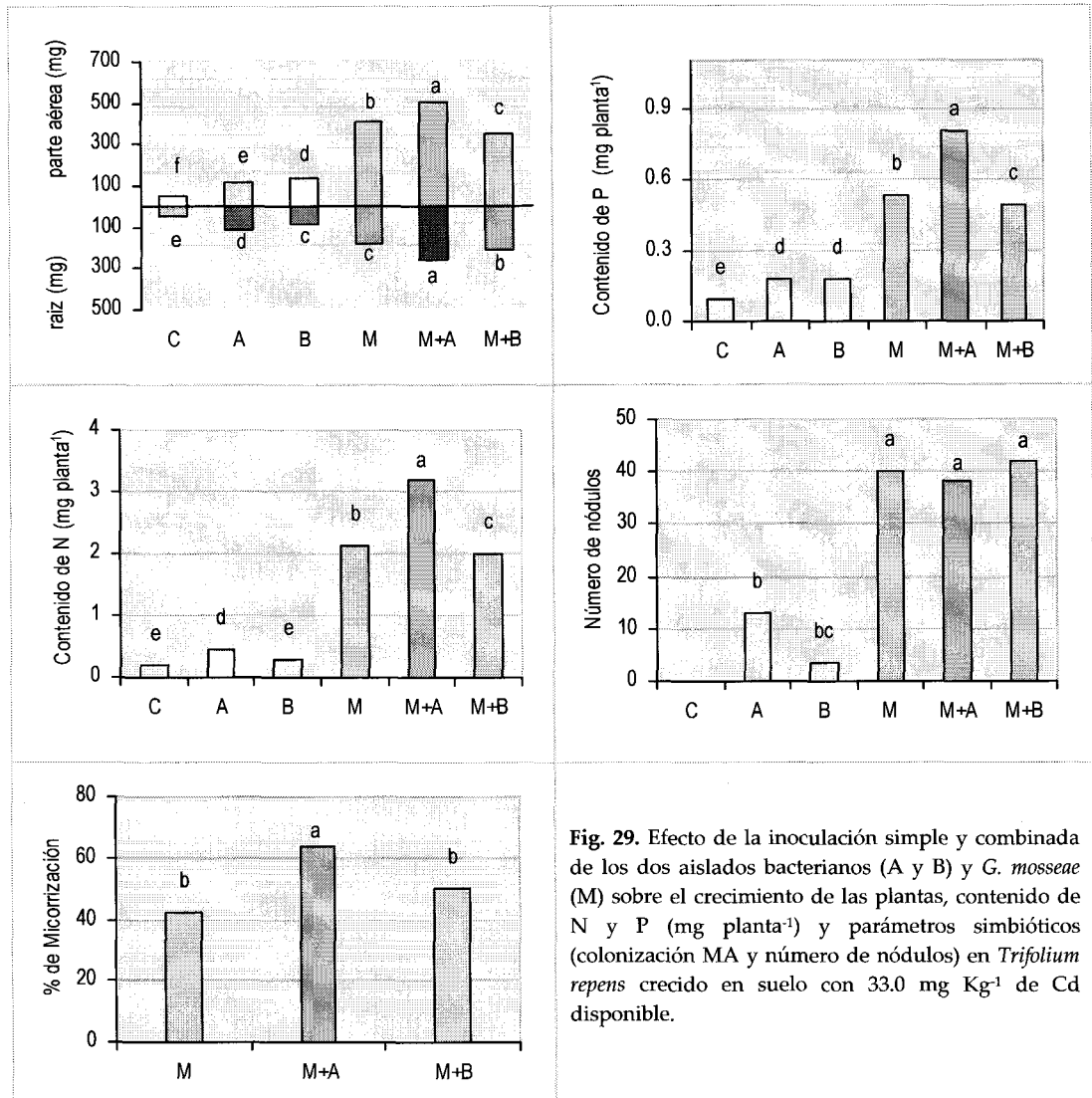
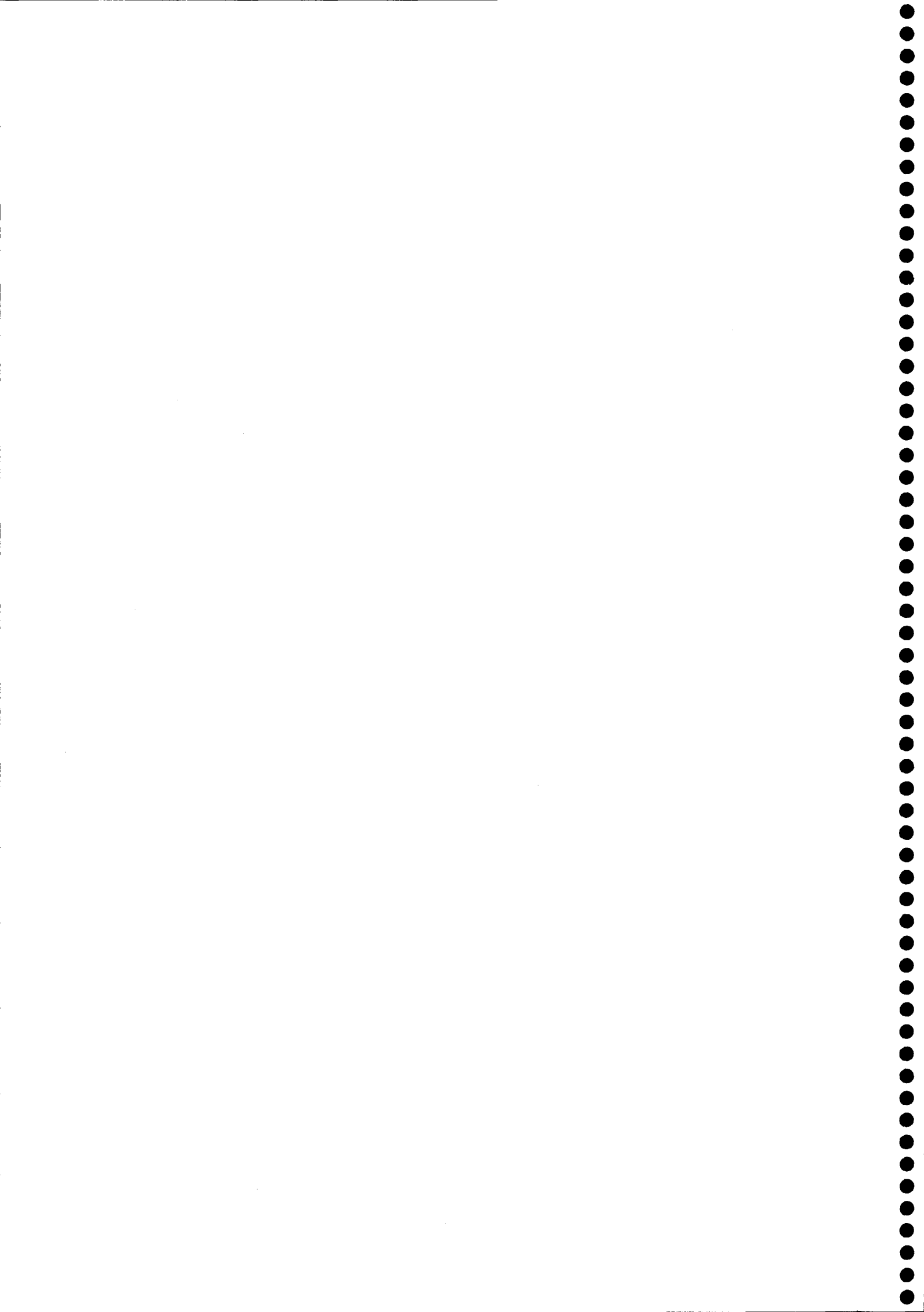
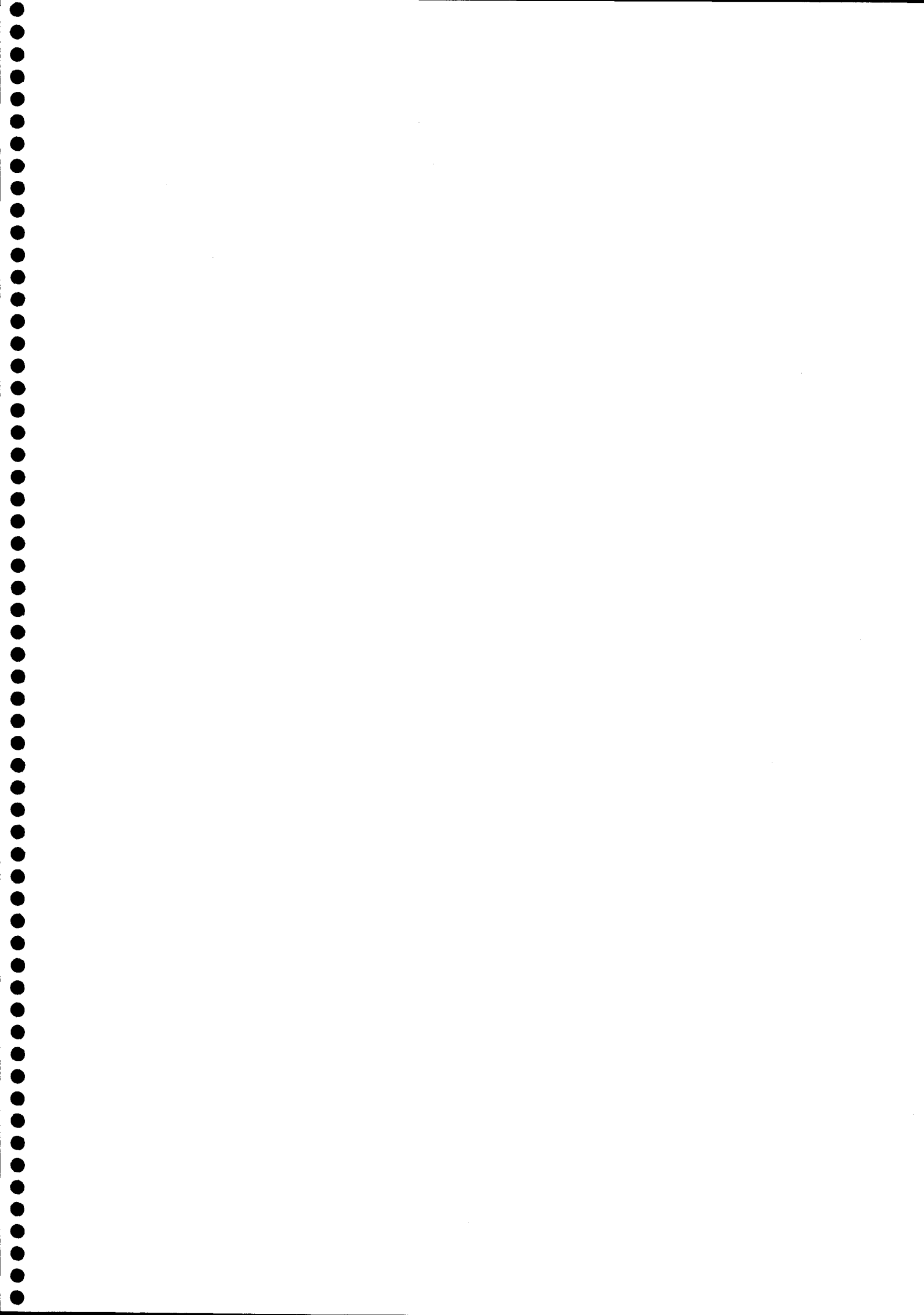


Fig. 29. Efecto de la inoculación simple y combinada de los dos aislados bacterianos (A y B) y *G. mosseae* (M) sobre el crecimiento de las plantas, contenido de N y P (mg planta<sup>-1</sup>) y parámetros simbióticos (colonización MA y número de nódulos) en *Trifolium repens* crecido en suelo con 33.0 mg Kg<sup>-1</sup> de Cd disponible.

Los resultados que se muestran en la Tabla 10 indican que al nivel medio de Cd en suelo la transferencia del metal desde el suelo a las plantas micorrizadas fue particularmente más baja que en las no micorrizadas. Al nivel más alto, el efecto limitante de la micorrización sobre la transferencia del Cd desde el suelo a la planta fue potenciado por las bacterias (Tabla. 10).





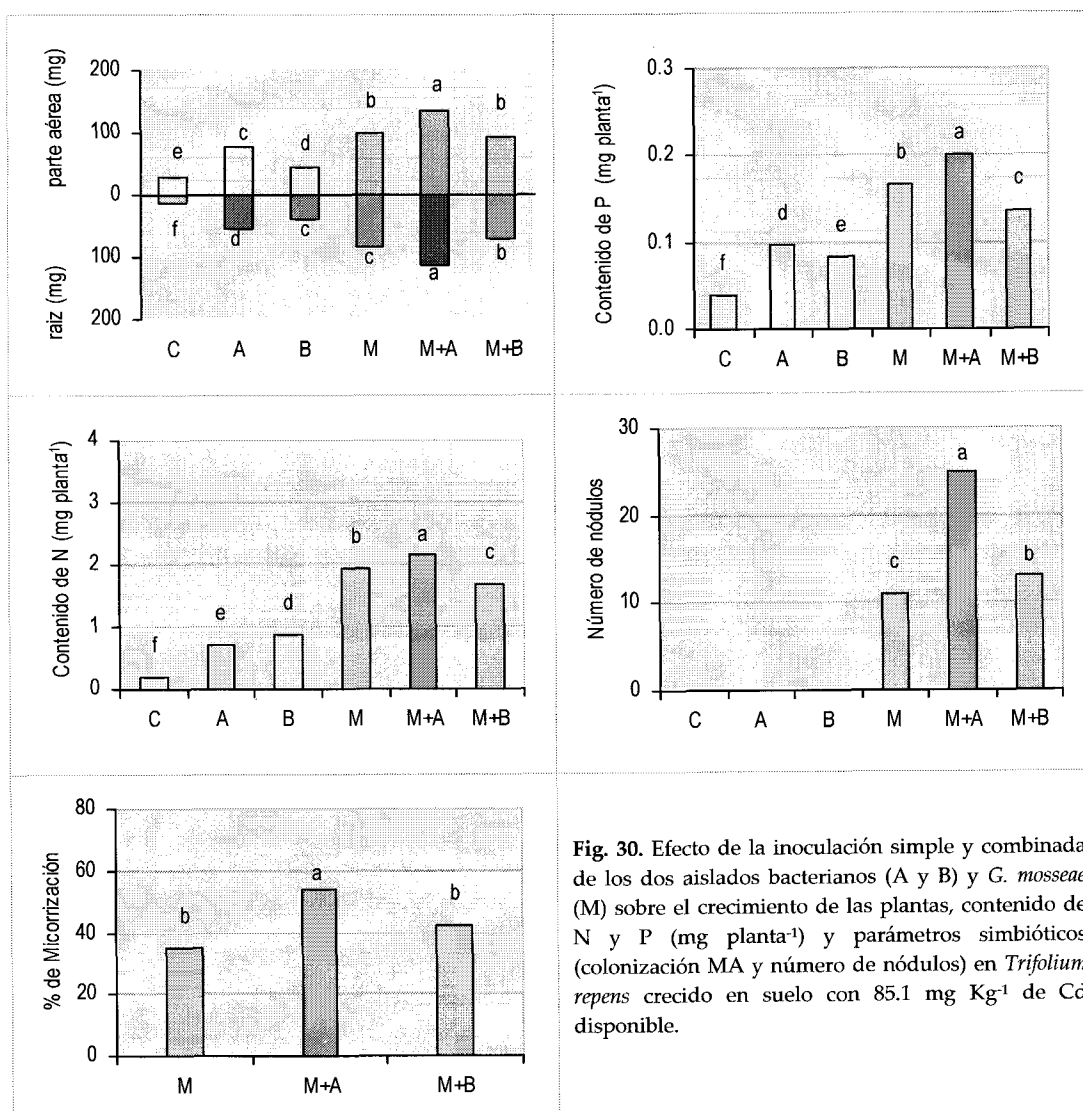


Fig. 30. Efecto de la inoculación simple y combinada de los dos aislados bacterianos (A y B) y *G. mosseae* (M) sobre el crecimiento de las plantas, contenido de N y P ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) y parámetros simbióticos (colonización MA y número de nódulos) en *Trifolium repens* crecido en suelo con  $85.1 \text{ mg Kg}^{-1}$  de Cd disponible.

En cambio, el contenido de Zn en plantas fue incrementado por la micorrización y este efecto fue más evidente al nivel más alto de Cd en el suelo (Tabla 11), mientras que el contenido de Zn en plantas no micorrizadas se redujo fuertemente a medida que incrementaba el Cd en el suelo. En cuanto al contenido de Pb, en las plantas micorrizadas se encontraron valores más bajos que en las no micorrizadas. El contenido de Ni en plantas micorrizadas fue mayor al nivel medio de Cd en suelo.

**Tabla 10.** Efecto de la inoculación simple y combinada de los dos aislados bacterianos (A y B) y *G. mosseae*, sobre la transferencia de Cd del suelo a la planta, y la concentración de Cd en la parte aérea de *Trifolium repens* crecido en concentraciones crecientes de Cd en suelo.

Tratamientos	Cd disponible (mg kg <sup>-1</sup> )					
	13.6		33.0		85.1	
	Cd transf.	Cd conc.	Cd transf.	Cd conc.	Cd transf.	Cd conc.
Control	1.20 a	16.3 a	1.78 a	58.8 a	2.60 a	149.6 a
A	1.30 a	17.8 a	0.82 c	27.0 c	1.20 b	99.7 b
B	0.80 b	12.9 b	1.21 b	40.0 b	1.50 ab	124.8 ab
M	0.65 c	10.7 c	0.45 d	15.0 d	0.88 c	75.6 c
M+A	0.83 bc	11.3 bc	0.30 d	17.6 d	0.64 d	54.4 d
M+B	0.82 bc	11.1 bc	0.24 d	14.8 d	0.90 c	76.3 c

**Tabla 11.** Efecto de la inoculación simple y combinada de los dos aislados bacterianos (A y B) y *G. mosseae*, sobre el contenido en parte aérea de Zn, Pb y Ni en *Trifolium repens*, crecido en suelo artificialmente contaminado con dosis crecientes de Cd.

Tratamientos	Contenido (mg)		
	Zn	Pb	Ni
13.6 mg kg <sup>-1</sup> Cd			
Control	6.1 c	0.15 c	0.006 d
A	8.3 b	0.65 b	0.011 c
B	6.1 c	0.26 c	0.002 e
M	11.1 a	0.60 b	0.013 c
MA	11.0 a	0.81 b	0.017 b
MB	10.0 a	1.51 a	0.019 a
33.0 mg kg <sup>-1</sup> Cd			
Control	1.42 c	0.41 d	0.08 d
A	5.26 b	1.05 ab	0.32 cd
B	6.30 b	0.27 d	0.44 c
M	11.40 a	0.71 c	1.11 b
MA	11.61 a	1.10 a	1.41 a
MB	8.85 a	0.89 bc	0.94 b
85.1 mg kg <sup>-1</sup> Cd			
Control	0.69 c	0.21 bc	0.07 c
A	0.66 c	1.26 a	0.22 b
B	0.84 bc	0.11 c	0.06 c
M	3.50 a	0.17 bc	0.29 a
MA	2.82 a	0.29 b	0.20 b
MB	1.50 b	0.20 bc	0.33 a

## 2.6. Resultados del efecto de la inoculación con aislados autóctonos en suelo contaminado con niveles de Zn

En el suelo contaminado con Zn la interacción de *G. mosseae* con el aislado bacteriano I, fue el tratamiento que proporcionó un mayor desarrollo de la planta aunque tal efecto no fue significativo en los niveles más altos de Zn en el suelo (68 y 215 mg Zn Kg<sup>-1</sup>). Al nivel medio de Zn, el aislado bacteriano I incrementó el crecimiento de la parte aérea en un 232% y en un 88% el de la raíz (Fig. 31).

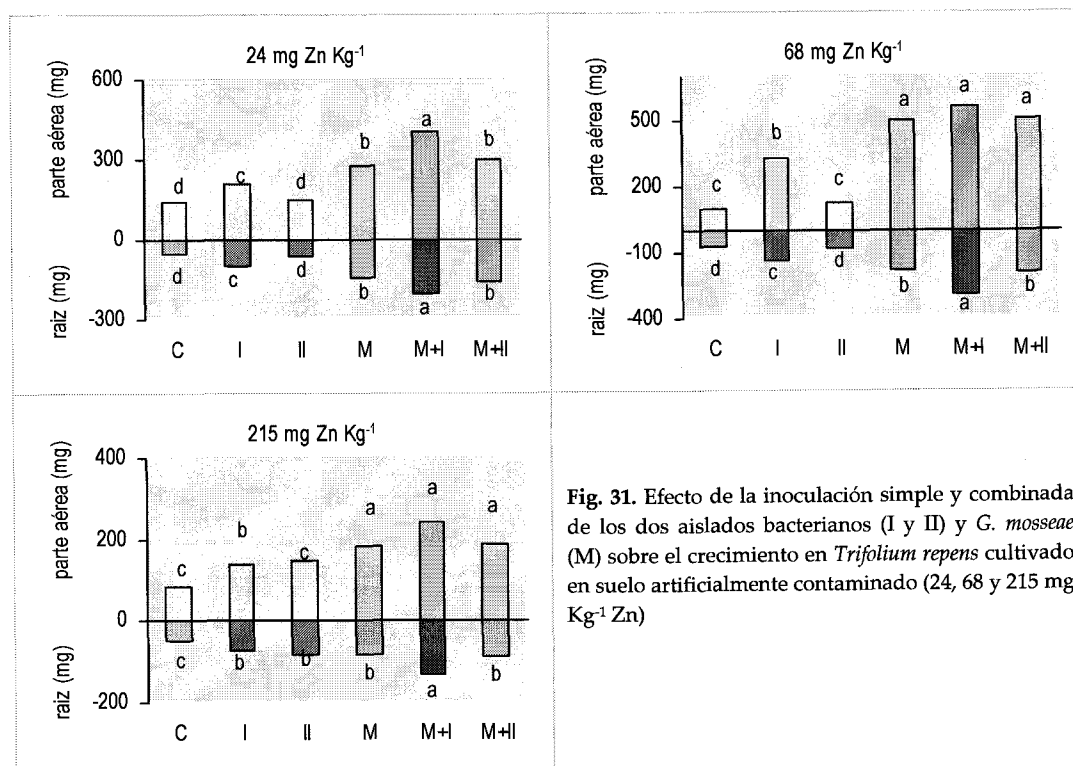


Fig. 31. Efecto de la inoculación simple y combinada de los dos aislados bacterianos (I y II) y *G. mosseae* (M) sobre el crecimiento en *Trifolium repens* cultivado en suelo artificialmente contaminado (24, 68 y 215 mg Zn Kg<sup>-1</sup> Zn)

El número de nódulos por planta y la infección MA, decreció a medida que incrementó el Zn en el suelo. A los niveles más altos de Zn la nodulación fue estimulada por la presencia de MA. Al nivel más alto de Zn (215 mg Kg<sup>-1</sup>) sólo nodularon las plantas que fueron inoculadas con *G. mosseae* y los aislados bacterianos I ó II, lo que indica un claro efecto protector frente al exceso de Zn de la micorrización y algo menor por parte de los aislados bacterianos (Fig. 32). En cuanto a la simbiosis MA, el aislado bacteriano I favoreció la infección incrementando la colonización en el nivel medio de Zn (Fig. 33).

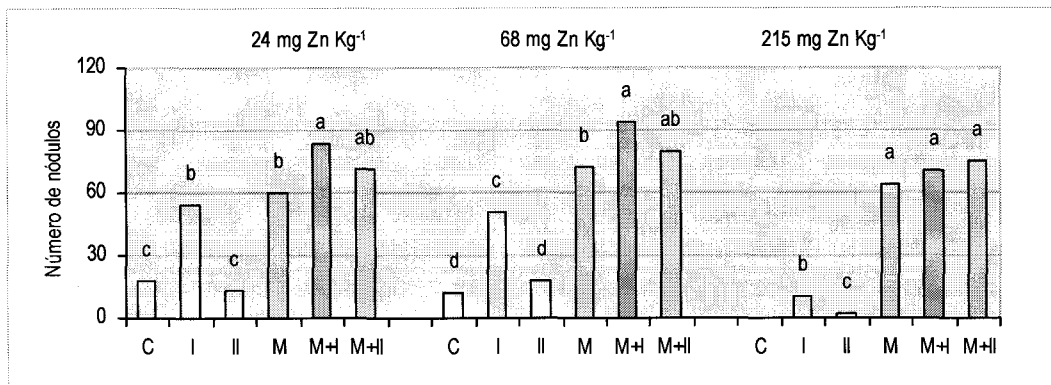


Fig. 32. Efecto de la inoculación simple y combinada de los dos aislados bacterianos (I y II) y *G. mosseae* (M) sobre la nodulación en *Trifolium repens* cultivado en suelo artificialmente contaminado (24, 68 y 215 mg Kg<sup>-1</sup> Zn)

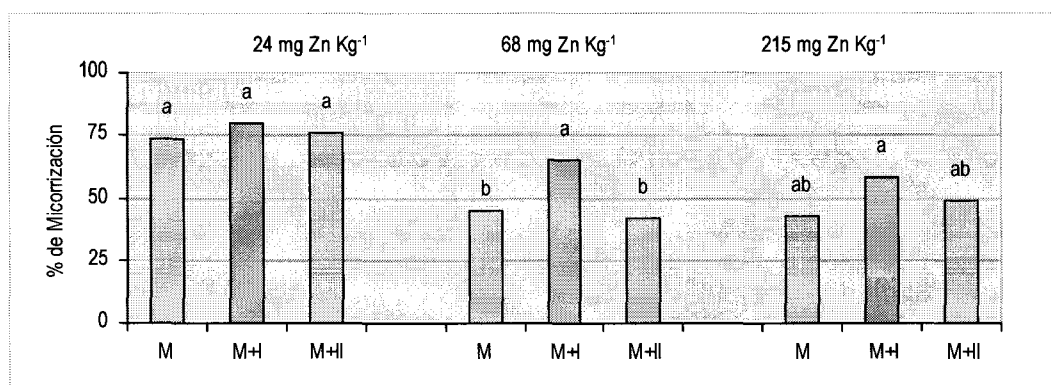


Fig. 33. Efecto de los aislados bacterianos (I y II) sobre la infección de *G. mosseae* (M) en *Trifolium repens* cultivado en suelo artificialmente contaminado (24, 68 y 215 mg Kg<sup>-1</sup> Zn)

Al nivel más bajo de Zn en el medio, el contenido de N en plantas fue incrementado en las plantas micorrizadas. Pero a los niveles más altos de Zn (68 y 215 mg Zn Kg<sup>-1</sup>), el aislado I asociado con *G. mosseae* fue el tratamiento más efectivo e incrementó este valor en un 108% y 185%, respectivamente (Fig. 4). La misma tendencia se observó en cuanto al contenido de P en plantas. Al nivel más bajo de Zn los tratamientos micorrizados, independientemente de la simple o doble inoculación, fueron los más efectivos para la adquisición de fósforo. Sin embargo, el aislado I en el nivel medio y alto de zinc en el suelo, asociado con el inóculo MA, favoreció la acumulación de P, incrementando este valor en un 80% y un 700% respectivamente (Fig. 34 y 35).



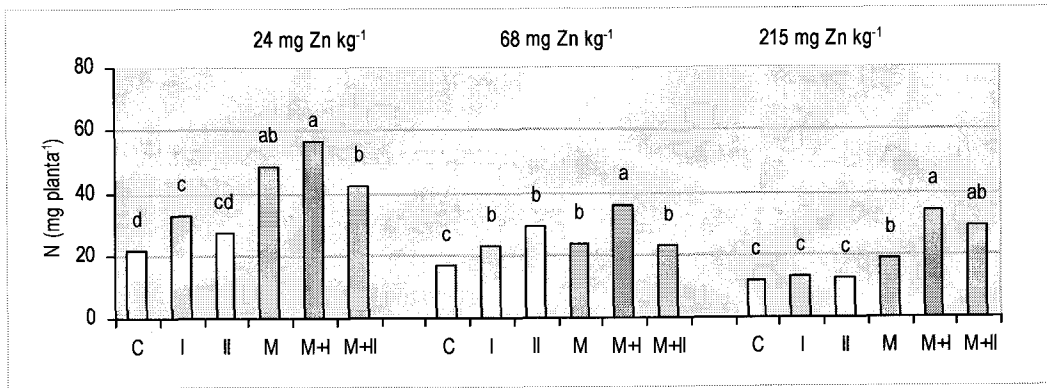


Fig. 34. Efecto de la inoculación simple y combinada de los dos aislados bacterianos (I y II) y *G. mosseae* (M) sobre el contenido de N en *Trifolium repens* cultivado en suelo artificialmente contaminado (24, 68 y 215 mg Zn kg<sup>-1</sup> Zn).

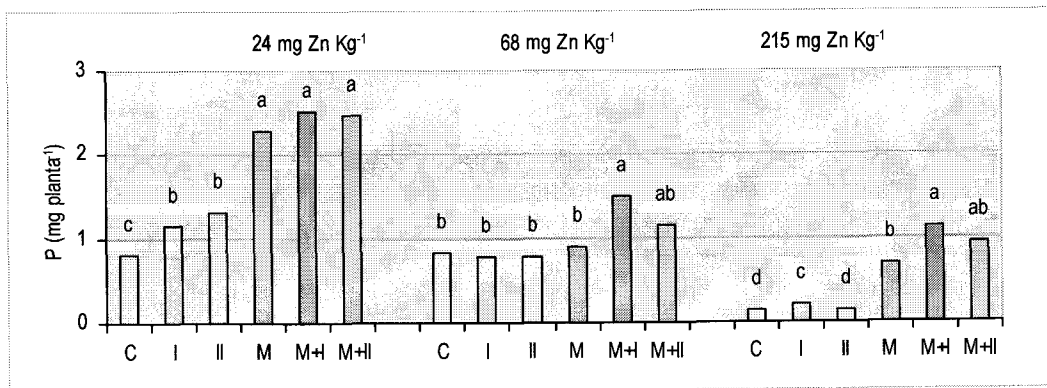


Fig. 35. Efecto de la inoculación simple y combinada de los dos aislados bacterianos (I y II) y *G. mosseae* (M) sobre el contenido de P en *Trifolium repens* cultivado en suelo artificialmente contaminado (24, 68 y 215 mg Zn Kg<sup>-1</sup> Zn).

La concentración de Zn en plantas incrementó a medida que aumentaba la disponibilidad de este elemento en el medio. Se encontraron diferencias significativas más pronunciadas entre los tratamientos micorrizados y los no micorrizados al nivel más bajo (24 mg Zn Kg<sup>-1</sup>), y al nivel medio (68 mg Zn Kg<sup>-1</sup>). Sin embargo, el aislado bacteriano I, redujo fuertemente la entrada de Zn a la planta a todos los niveles. Al nivel más alto (215 mg Zn Kg<sup>-1</sup>) la doble inoculación con cualquiera de los aislados bacterianos disminuye fuertemente el contenido de metal en las plantas (Fig. 36).

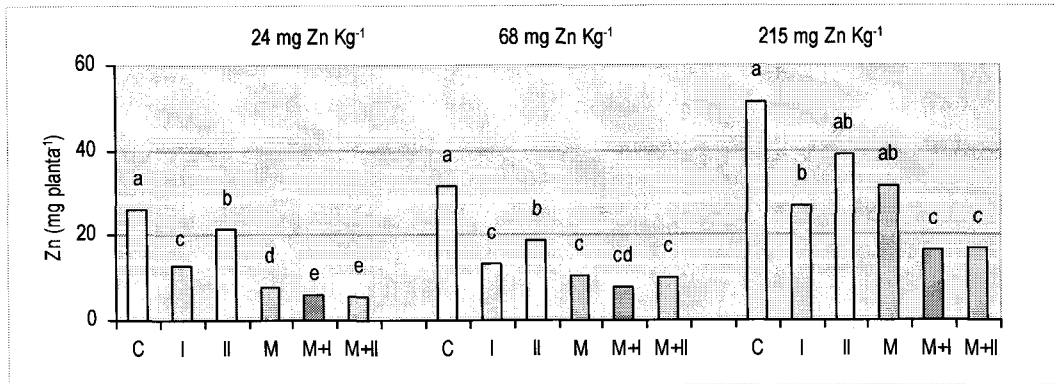


Fig. 36. Efecto de la inoculación simple y combinada de los dos aislados bacterianos (I y II) y *G. mosseae* (M) sobre el contenido de Zn en *Trifolium repens* cultivado en suelo artificialmente contaminado (24, 68 y 215 mg Kg<sup>-1</sup> Zn)

En cuanto a la concentración de Zn absorbido en planta por unidad de raíz (g) se observa que el aislado I decrece fuertemente este valor. Los tratamientos micorrizados, principalmente en presencia de los dos aislados bacterianos, producen el mismo efecto (Tabla 12).

Con respecto al contenido de metales pesados como el Cd, Ni y Pb (Tabla 13), los resultados demuestran que al nivel más bajo de Zn en el suelo, la concentración de Cd incrementó en plantas micorrizadas. Al nivel medio de Zn el aislado I y la doble inoculación *G. mosseae* con aislado I o con aislado II incrementaron significativamente el Cd en plantas. Al nivel más alto de Zn en suelo, el contenido de Cd en planta incrementó en los tratamientos inoculados por el aislado II y por la doble inoculación *G. mosseae* - aislado I

A cualquier nivel de Zn, el contenido de Ni fue incrementado por el aislado I, y en mayor medida por la doble inoculación de *G. mosseae* con cada una de las dos bacterias.

En cuanto al contenido de Pb, a los dos niveles más bajos de Zn, la doble inoculación independientemente del aislado bacteriano, incrementó este valor. Sin embargo, al nivel más alto de Zn este efecto desapareció y solo las plantas no micorrizadas e inoculadas con el aislado II, incrementaron el contenido de Pb.

**Tabla 12.** Concentración de Zn en planta absorbido por unidad de raíz (mg de Zn/g de peso seco de raíz) a niveles crecientes de Zn en el suelo.

	Zn I (24 mg Zn Kg <sup>-1</sup> )		Zn II (68 mg Zn Kg <sup>-1</sup> )		Zn III (215 mg Zn Kg <sup>-1</sup> )	
	NM	M	NM	M	NM	M
Control	0,490 a	0,050 d	0,450 a	0,050 d	1,060 a	0,400 b
I	0,130 c	0,028 e	0,100 c	0,020 e	0,370 c	0,130 e
II	0,350 b	0,033 e	0,230 b	0,052 d	0,470 b	0,190 d

**Tabla 13.** Contenido de Cd, Ni y Pb ( $\mu\text{g planta}^{-1}$ ) en *Trifolium repens* cultivado en suelo artificialmente contaminado (24, 68 y 215 mg Kg<sup>-1</sup> Zn). Los tratamientos se indican como: C (Control), I (Aislado bacteriano I), II (Aislado bacteriano II), M [*G. mosseae* (autóctono)].

Treatment	24 mg kg <sup>-1</sup>			68 mg kg <sup>-1</sup>			215 mg kg <sup>-1</sup>		
	Cd	Ni	Pb	Cd	Ni	Pb	Cd	Ni	Pb
C	0.26 b	0.18 d	0.14 c	0.14 b	0.12 d	0.24 c	0.2 c	0.11 c	0.15 c
I	0.28 b	0.38 c	0.4 b	0.34 a	0.53 c	0.63 b	0.4 b	0.26 b	0.20 b
II	0.27 b	0.07 e	0.16 c	0.17 b	0.52 c	0.18 c	1.0 a	0.08 d	0.34 a
M	0.84 a	0.21 d	0.71 a	0.15 b	0.46 c	0.56 b	0.6 ab	0.14 c	0.20 b
M+I	0.21 b	0.63 b	0.55 ab	0.2 ab	0.89 b	0.83 b	1.0 a	0.38 b	0.21 b
M+II	0.1 c	1.21 a	0.56 ab	0.22 ab	1.72 a	1.5 a	0.3 b	0.76 a	0.26 ab

### 3 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS BACTERIANOS AUTÓCTONOS MÁS EFICIENTES EN SUELOS CONTAMINADOS MEDIANTE CLONADO Y SECUENCIACIÓN DEL ADN RIBOSÓMICO 16S

Los aislados bacterianos catalogados como Aislado A (aislado del suelo contaminado por Cd) y el aislado I (aislado del suelo contaminado por Zn) que mostraron una mayor efectividad, se identificaron mediante la secuenciación del ADNr 16S. La amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando ologonucleotidos universales de procariotas 27f y 1495r (Lane *et al*, 1991) como se ha descrito en Material y Métodos.

Los dos aislados bacterianos dieron más de 98% de identidad con *Brevibacillus brevis*, y un 99% de homología entre ellas. Por tanto fueron consideradas como dos ecotipos de la misma especie.

#### 4. ESTUDIO DE LA TOLERANCIA "in vitro" AL Cd Y AL Zn DE LOS AISLADOS BACTERIANOS MÁS EFICIENTES EN SUELOS CONTAMINADOS (HUNGRÍA)

##### 4.1. Objetivo

Evaluar la tolerancia, a dosis crecientes de Cd y Zn "in vitro", de los dos aislados bacterianos más efectivos (Aislado A nativo del suelo contaminado con Cd y aislado I aislado autóctono del suelo contaminado con Zn).

##### 4.2. Condiciones experimentales

Para determinar la tolerancia "in vitro" de los aislados bacterianos seleccionados y una raza de *Brevibacillus brevis* procedente de la Colección Española de Microbiología. Se crecieron individualmente en medio de cultivo NB (Nutrient Broth) suplementado con dosis crecientes de cada metal indicadas en la Fig. 37 y Fig. 38. Todos los medios fueron inoculados con 1 ml del respectivo cultivo bacteriano en fase exponencial. Los cultivos se incubaron a 28 °C a 170 rpm de agitación. Cada ensayo de tolerancia se realizó acompañado de sus respectivos controles negativos: 1) medio líquido sin metal + bacteria, 2) medio líquido sin metal y sin bacteria, 3) medio líquido con metal sin bacteria. Se utilizaron estos controles para descartar que la densidad óptica determinada no fuese falseada por contaminaciones, o precipitaciones de los metales durante el tiempo de incubación (máximo una semana). El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm, en sucesivos periodos de tiempo. Las diluciones seriadas a las que se le media la D.O. se inocularon simultáneamente en placas con medio enriquecido, manteniéndose las condiciones de incubación, para posteriormente establecer la equivalencia entre D.O. y ufc a cada dilución.

##### 4.3. Resultados

A continuación se muestra gráficamente las curvas de crecimiento de los aislados ensayados:

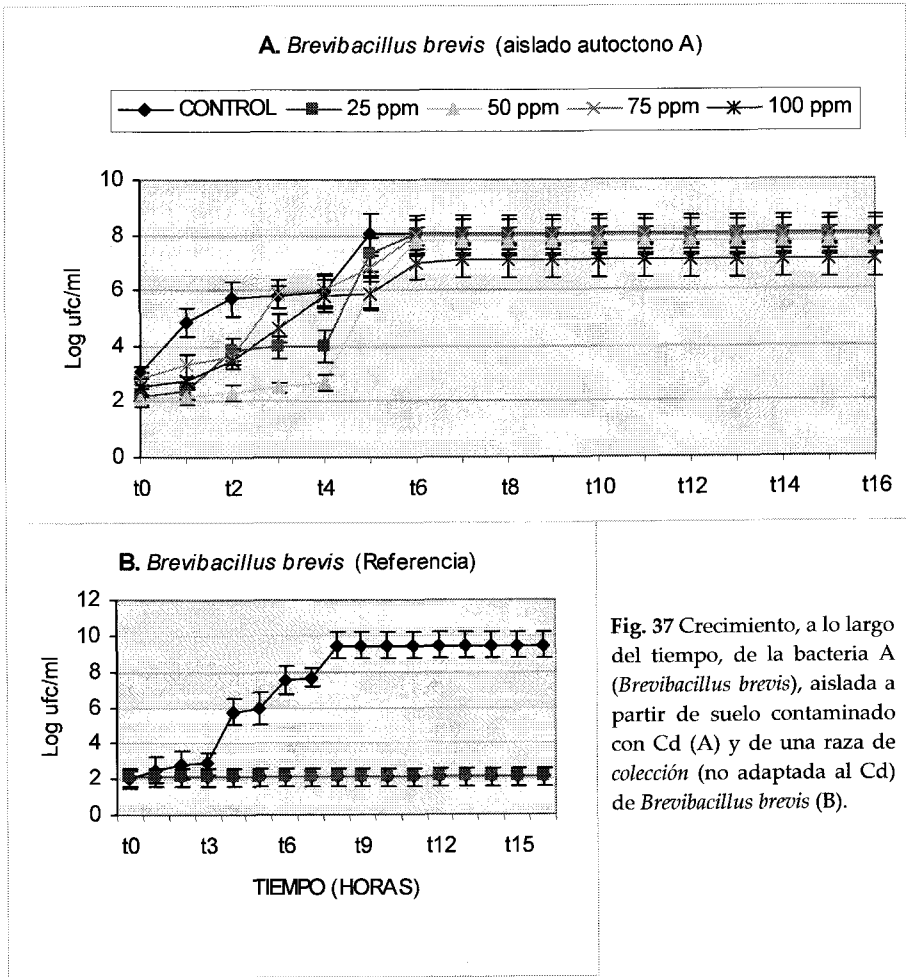


Fig. 37 Crecimiento, a lo largo del tiempo, de la bacteria A (*Brevibacillus brevis*), aislada a partir de suelo contaminado con Cd (A) y de una raza de colección (no adaptada al Cd) de *Brevibacillus brevis* (B).

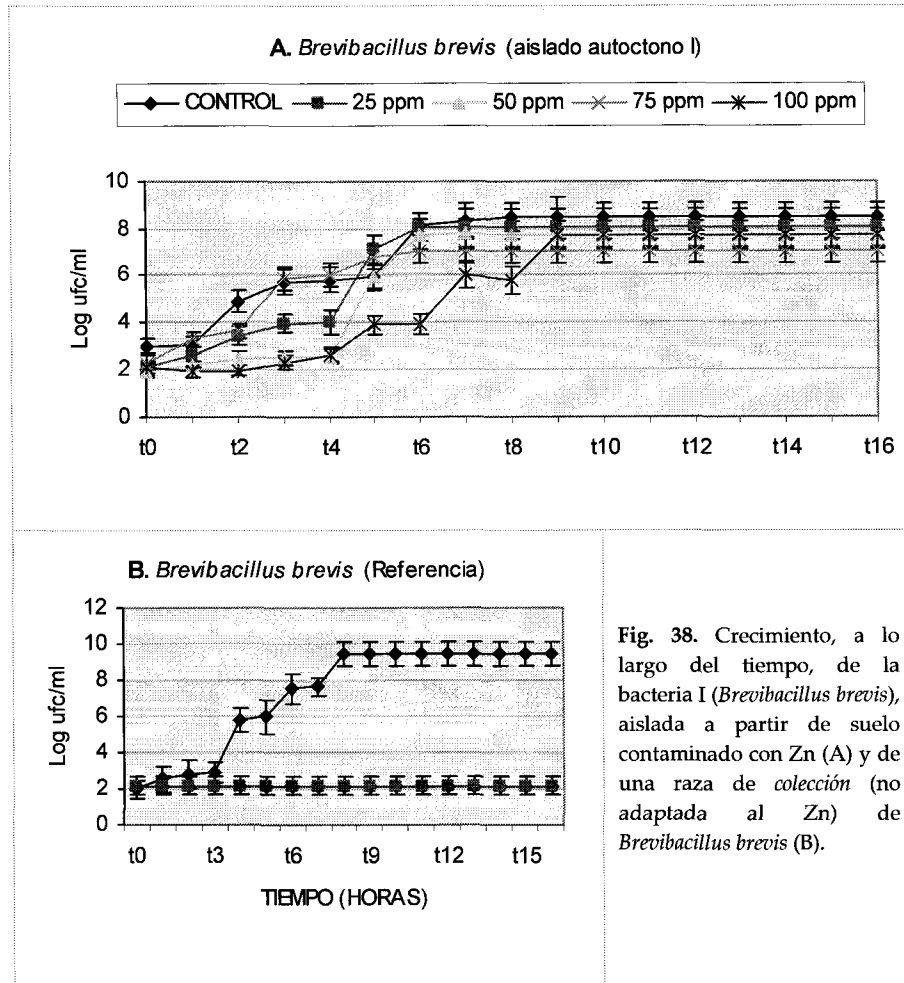


Fig. 38. Crecimiento, a lo largo del tiempo, de la bacteria I (*Brevibacillus brevis*), aislada a partir de suelo contaminado con Zn (A) y de una raza de colección (no adaptada al Zn) de *Brevibacillus brevis* (B).

Al realizar los estudios, "in vitro", sobre tolerancia bacteriana a dosis crecientes del metal, se pudo observar que el crecimiento de la cepa de colección *Brevibacillus brevis*, se redujo a cualquier concentración del metal contrastado con los aislados seleccionados de los suelos contaminados. El aislado A, procedente de suelo contaminado con Cd y el aislado I, procedente de suelo contaminado con Zn, no fueron afectados ni en tiempo de crecimiento, ni en número de ufc ml<sup>-1</sup> a las dosis crecientes de los metales ensayados.

## 5. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) POR *Brevibacillus brevis* TOLERANTE AL Cd Y *Brevibacillus brevis* TOLERANTE AL Zn

La producción de ácido indol acético (AIA) por cada uno de los dos aislados bacterianos de los suelos contaminados (*Brevibacillus brevis*), y de una raza catalogada como PGPR por su capacidad de producir esta auxina, se realizó "in vitro", (como se ha descrito en Material y Métodos Generales). La producción de AIA se estima como un posible mecanismo involucrado en la capacidad de estas bacterias para acumular metales, lo que explicaría la tolerancia bacteriana al Cd ó al Zn encontrado en el ensayo descrito. Como es conocido, y también se describe en otros apartados de esta memoria, el AIA juega un papel activo en el crecimiento vegetal e incluso puede ejercer un papel estimulante sobre los desarrollos simbióticos aquí estudiados.

A continuación se muestra la concentración (mg L<sup>-1</sup>) de AIA liberado al medio a las 12 horas de crecimiento bacteriano.

**Tabla. 14.** Producción de ácido indol acético (AIA mg L<sup>-1</sup>) por *Brevibacillus brevis* ecotipo aislado del suelo contaminado con Cd o Zn en medio de cultivo.

Aislados	IAA (mg L <sup>-1</sup> )
<i>Brevibacillus brevis</i> (Cd)	3.61±0.04
<i>Brevibacillus brevis</i> (Zn)	3.95±0.04
PGPR (Colección)	1.39±0.04

## 6. EFECTO DE LA INOCULACIÓN SIMPLE Y COMBINADA DE LOS AISLADOS AUTÓCTONOS DE *Brevibacillus brevis* (ADAPTADO A Cd Ó Zn) Y *G. mosseae* (AUTÓCTONO) Ó *G. mosseae* (BEG 119) SOBRE LA TOLERANCIA AL Cd Y AL Zn DE *Trifolium repens*

### 6.1. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

La planta seleccionada para la realización de los ensayos que se describen a continuación, fue *Trifolium repens*. Las semillas se sembraron directamente en macetas (de 100 g de capacidad) donde el sustrato había recibido 10 g de inóculo MA en los tratamientos micorrizados (inóculo puro de *G. mosseae* autóctono ó *G. mosseae* BEG 119 de colección). Los dos aislados bacterianos ensayados (con cada metal) se aplicaron directamente a una densidad de 10<sup>8</sup> ufc una semana después de la siembra. Todas las

plantas fueron inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* a una concentración de  $10^8$  ufc. Los tratamientos no micorrizados recibieron 2 ml de un filtrado del inóculo para reincorporar la microbiota exenta de propágulos de micorriza.

## 6.2. Ensayos de invernadero: características del suelo y condiciones experimentales

El suelo usado para los ensayos en microcosmo bajo condiciones controladas presentaba las siguientes características: materia orgánica 1.63%, pH de 7.2. La concentración de nutrientes fue: N (total)  $2.1 \text{ mg Kg}^{-1}$ , P (Olsen)  $1.7 \text{ mg Kg}^{-1}$  y K (extraído con  $\text{NH}_4^-$ )  $0.8 \text{ mg Kg}^{-1}$ . El suelo fue tamizado, tinalizado y mezclado con arena (lavada y autoclavada) en una proporción de 4:1. Esta mezcla fue incubada durante seis semanas con sulfato de cadmio  $30 \text{ mg Kg}^{-1}$ . Posteriormente se midió la concentración de metal que quedó disponible en concentración de  $13.4 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$ . En el suelo contaminado por sulfato de cinc, se incubó la mezcla con  $828 \text{ mg Zn Kg}^{-1}$  y a las seis semanas de incubación, la concentración de metal disponible fue de  $600 \text{ mg Zn Kg}^{-1}$ .

## 6.3. Objetivo

Comparar, en microcosmos, el efecto de *Brevibacillus brevis* (autóctono) con cada uno de los aislados de *G. mosseae* (autóctono ó de colección) de forma individual y la interacción bacteria-HMA sobre la efectividad en el crecimiento y nutrición de las plantas crecidas en las condiciones descritas (suelo contaminado artificialmente por sulfato de cadmio ó sulfato de cinc respectivamente).

## 6.4. Diseño experimental

Se realizaron dos experimentos paralelos, (uno para cada metal aplicado) y el diseño experimental de cada uno consistió de dos factores: el primer factor venia dado por los tratamientos bacterianos (un control sin inóculo bacteriano y un tratamientos inoculado con *Brevibacillus brevis* (aislado A del Cd para el ensayo del Cd ó aislado I del Zn para el ensayo del Zn). El segundo factor correspondió a los tratamientos micorrizados: un control sin inóculo del hongo MA, un tratamiento inoculado con *G. mosseae* autóctono y un tratamiento inoculado con *G. mosseae* colección (BEG 119). Ello dio un total de 6 tratamientos: (C) Control, (B) *Brevibacillus brevis* (MA) *G. mosseae* autóctono, (M) *G. mosseae* BEG 119 de colección, (MA+B) *G. mosseae* autóctono + *Brevibacillus brevis* y (M+B) *G. mosseae* BEG 119 + *Brevibacillus brevis*.



Las plantas se cosecharon a las 12 semanas de crecimiento vegetal. Una vez cosechadas, se determinó el peso seco de parte aérea y raíz. La extensión de la colonización micorrícica (% de micorrización) y el número de nódulos en cada planta también fueron determinados. Se cuantificaron parámetros de nutrición como contenido de: nitrógeno, fósforo y potasio, así como también, el contenido en parte aérea de Ni, Pb, Zn y Cd. Cada metal se midió por espectrometría de emisión atómica como se ha descrito anteriormente.

#### 6.5. Resultados del efecto de la inoculación de *Brevibacillus brevis* y dos *G. mosseae* (autóctono o de colección) en suelo contaminado con Cd

En la tabla 15 se muestran los resultados del ANOVA, y observamos que los tratamientos micorrizados y los inoculados con *Brevibacillus brevis*, fueron críticos para el crecimiento de las plantas de *Trifolium* en suelo altamente contaminado por Cd. La respuesta de la planta a la inoculación de cada uno de los dos hongos MA (*G. mosseae* autóctono y *G. mosseae* de colección) fue similar. No obstante *G. mosseae* autóctono, incrementó en mayor medida el desarrollo de parte aérea y de raíz, y tal efecto fue potenciado por la doble inoculación con la bacteria autóctona *Brevibacillus brevis* (Fig. 39).

**Tabla 15** Resultados del ANOVA (Valores de F) realizado para estudiar el efecto de la interacción micorriza- bacterias, sobre desarrollo de parte aérea, raíz y número de nódulos.

	Valores de F		
	Tratamientos micorrizados	Bacteria	Micorriza* Bacteria
Peso seco parte aérea	213.0 ***	310.0 ***	3.4 ns
Peso seco raíz	84.7 ***	40.70 ***	1.8 ns
Número de nódulos	16.43 **	7.05 *	12.3 **

\* P < 0.05    \*\* P < 0.01    \*\*\* P < 0.001    ns: no significativo

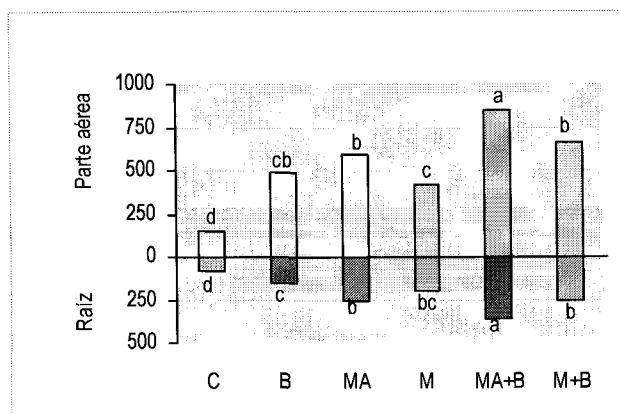


Fig. 39. Peso seco de parte aérea y de raíz (mg) en *Trifolium repens* cultivado en suelo contaminado artificialmente con 13.4 mg Kg<sup>-1</sup> Cd. Los tratamientos se indican como: C (Control), (B) *Brevibacillus brevis* (MA) *G. mosseae* autóctono, (M) *G. mosseae* de colección.

*Brevibacillus brevis* incrementó el desarrollo de parte aérea y de raíz de forma similar a *G. mosseae* de colección (BEG 119). La doble inoculación de *Brevibacillus* con *G. mosseae* (BEG 119) incrementó estas variables de crecimiento de forma similar a como lo hizo *G. mosseae* autóctono (Fig. 39). Esta respuesta positiva en el crecimiento fue también observada en la nutrición de P y en la infección MA total (Tabla 16, Fig. 40). La longitud total de raíz micorrizada fue mayor en las plantas doblemente inoculadas con los microorganismos autóctonos (*G. mosseae* y *Brevibacillus brevis*) (Fig. 40).

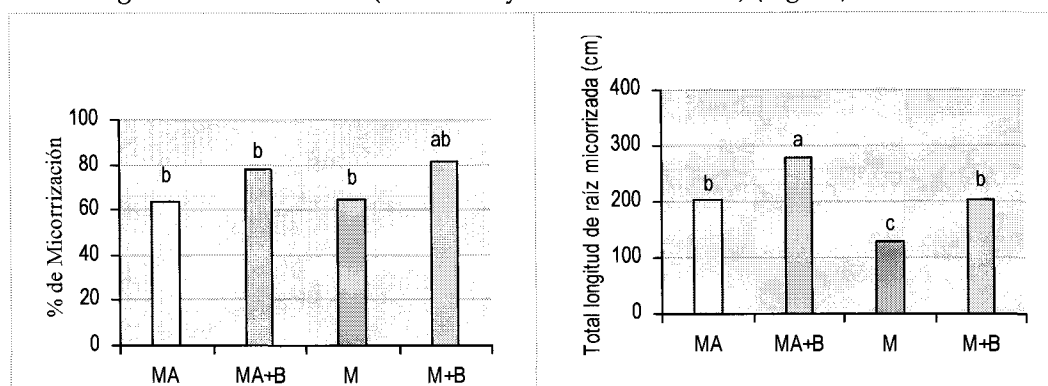


Fig. 40. Efecto de la inoculación de *Brevibacillus brevis* (B) sobre la colonización MA [porcentaje (%) y total de raíz micorrizada (cm)] por *G. mosseae* (autéctono) (MA) ó *G. mosseae* de colección (M) en suelo artificialmente contaminado con 13,4 mg Kg<sup>-1</sup> de Cd.

Así mismo, el número de nódulos formados en las raíces de *T. repens*, fue incrementado por la inoculación de los hongos MA, pero este efecto fue mucho mayor en presencia de la bacteria, particularmente en el caso de los microorganismos autóctonos (Fig. 41).

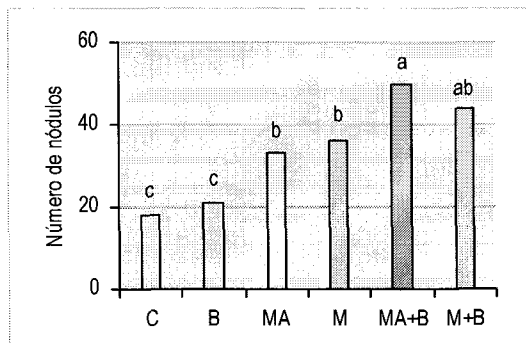


Fig. 41. Número de nódulos en *Trifolium repens* cultivado en suelo artificialmente contaminado con  $13.4 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ Cd}$ . Los tratamientos se indican como: C (Control), (B) *Brevibacillus brevis*, (MA) *G. mosseae* autóctono, (M) *G. mosseae* de colección.

El efecto de *G. mosseae* (BEG 119) sobre el contenido de P en las plantas fue menor que el producido por *Brevibacillus brevis*. Es de destacar que la doble inoculación de *Brevibacillus brevis* y *G. mosseae* (BEG 119), no afectó este valor. Pero la interacción de los dos microorganismos autóctonos (*G. mosseae* y *Brevibacillus brevis*) incrementó en un 600% el contenido de P con respecto al control (Tabla 16).

La colonización micorriza incrementó altamente el contenido de N en las plantas, particularmente cuando los dos microorganismos autóctonos fueron inoculados (*G. mosseae* + *Brevibacillus brevis*). Tal incremento fue del 680% con respecto al control. *Brevibacillus brevis*, no afectó el contenido de N en planta micorrizadas por *G. mosseae* de colección (BEG 119) (Tabla 16).

Curiosamente las plantas inoculadas por *G. mosseae* (BEG 119) y *Brevibacillus brevis* incrementaron el contenido de Ni y Pb.

La concentración de cadmio en las plantas, fue reducida fuertemente debido a la doble inoculación de los microorganismos autóctonos con respecto a la inoculación simple de estos microorganismos, siendo un resultado también destacable en este estudio.

**Tabla 16.** Concentraciones y contenidos de Cd, P, N, Fe Mn, Zn, Ni y Pb en *Trifolium repens* cultivado en suelo contaminado artificialmente con 13.4 mg Kg<sup>-1</sup> Cd. Los tratamientos se indican como: C (Control), B (*Brevibacillus brevis*), MA (*G. mosseae* autóctono), M (*G. mosseae* de colección).

Tratamientos	Cd (µg g <sup>-1</sup> )	P (mg/g)	N (mg/g)	Fe (µg g <sup>-1</sup> )	Mn (µg g <sup>-1</sup> )	Zn (µg g <sup>-1</sup> )	Ni (µg g <sup>-1</sup> )	Pb (µg g <sup>-1</sup> )
<b>Concentración</b>								
C	11.581a	1.22 b	19.46c	0.166 d	0.172 bc	0.063a	0.044d	0.040de
B	11.173 a	1.08bc	10.31d	0.389 b	0.185bc	0.062a	0.058bc	0.058c
MA	12.981a	0.97bc	17.58cd	0.241 c	0.094 d	0.054ab	0.055c	0.041de
M	11.869a	1.04ab	31.31a	0.485 a	0.202 ab	0.055ab	0.065bc	0.065 b
MA+B	2.786b	1.36a	27.86ab	0.262 c	0.124 c	0.053ab	0.032e	0.038e
M+B	2.44b	0.82c	24.40 b	0.400 b	0.230 a	0.046b	0.086 a	0.076 a
	Cd (µg)	P (mg)	N (mg)	Fe (µg)	Mn (µg)	Zn (µg)	Ni (µg)	Pb (µg)
<b>Contenido</b>								
C	1.806d	0.189e	3.03e	0.025d	0.026e	9.9d	6.9 c	6.4 d
B	5.474b	0.529c	5.05d	0.190b	0.090bc	30.5 b	28.7 b	28.4 bc
MA	7.658a	0.577b	10.37c	0.142c	0.055d	31.9 b	32.9 b	24.7 c
M	5.020b	0.442d	13.24bc	0.205b	0.085c	23.3 c	27.8 b	27.8 bc
MA+B	2.368c	1.159a	23.68a	0.222b	0.105b	45.5 a	27.5 b	32.5 bc
M+B	1.610d	0.546bc	16.10b	0.264a	0.152a	30.9 b	56.8 a	50.7 a

### 6.6. Resultados del efecto de la inoculación de *Brevibacillus brevis* (adaptado) y dos *G. mosseae* (adaptado ó no) en suelo contaminado con Zn

En el suelo contaminado con 600 mg Zn Kg<sup>-1</sup> el desarrollo de parte aérea y de raíz, de *T. repens*, fue incrementado por cualquiera de los tratamientos microbianos aplicados (*Brevibacillus brevis*, ó los dos ecotipos de *G. mosseae*), siendo mas efectiva la doble inoculación de la bacteria con cualquiera de los dos hongos ensayados (*G. mosseae* autóctono y *G. mosseae* BEG 119).

*G. mosseae* autóctono, incrementó en un 352% la parte aérea y en un 255% el desarrollo de la raíz, mientras que *G. mosseae* (BEG 119), incrementó la parte aérea en un 270% y la raíz en un 232% con respecto al control. Tal efecto se potenció por la inoculación con la bacteria ya que incrementó el desarrollo de raíz con cada uno de estos hongos en un 42% (*G. mosseae* BEG 119) y en un 50% (*G. mosseae* autóctono) (Fig. 42).

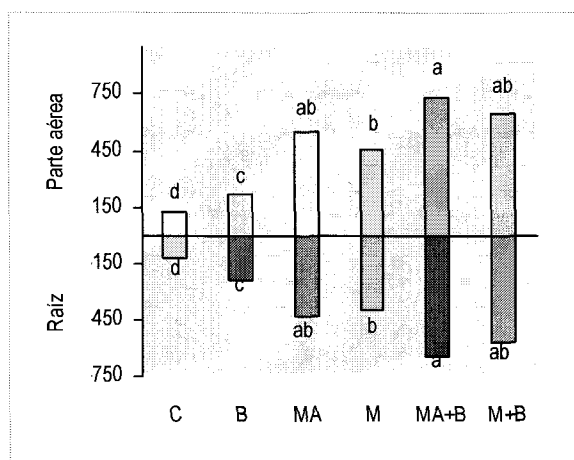


Fig. 42. Peso seco de parte aérea y de raíz (mg) en *Trifolium repens* cultivado en suelo contaminado artificialmente con 600 mg Kg<sup>-1</sup> Zn. Los tratamientos se indican como: C (Control), (B) *Brevibacillus brevis*, (MA) *G. mosseae* autóctono, (M) *G. mosseae* de colección.

Los dos hongos MA favorecieron la nodulación y *Brevibacillus brevis*, la colonización de los dos endofitos (autéctono y de colección). La doble inoculación de ellos con *Brevibacillus brevis* incrementó, en mayor medida, tanto la nodulación como la micorrización (Fig. 43 y Fig. 44). Este incremento de nodulación y micorrización se relaciona con la mejora en nutrición (N y P) de las plantas (Tabla 17).

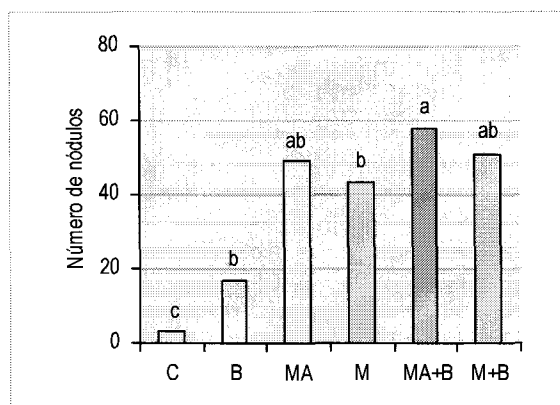


Fig. 43. Número de nódulos en *Trifolium repens* cultivado en suelo artificialmente contaminado con 600 mg Kg<sup>-1</sup> Zn. Los tratamientos se indican como: C (Control), (B) *Brevibacillus brevis*, (MA) *G. mosseae* autóctono, (M) *G. mosseae* de colección.

**Tabla 17.** Contenidos de N, P, Zn y Fe en *Trifolium repens* cultivado en suelo contaminado artificialmente con 600 mg Kg<sup>-1</sup> Zn. Los tratamientos se indican como: C (Control), B (*Brevibacillus brevis*), MA (*G. mosseae* autóctono), M (*G. mosseae* de colección).

Tratamientos	N (mg)	P (mg)	Zn (mg)	Fe(mg)
C	17.9 c	1.16 c	253.66 c	1.47 e
B	28.9 a	0.896 d	296.33 ab	2.23 cd
MA	23.2 b	1.52 b	276.33 bc	1.86 cde
M	21.4 b	1.18 c	317.66 a	1.64 de
MA+B	28.07 a	1.82 a	291.33 ab	2.46 b
M+B	28.0 a	1.045 cd	331.00 a	3.92 a

Con respecto a la acumulación del Zn no hubo grandes diferencias entre los distintos tratamientos. Sólo incrementaron estadísticamente con respecto al control los tratamientos inoculados con la bacteria (Tabla 17). El mayor contenido en Fe lo poseen las plantas doblemente inoculadas con *Brevibacillus brevis* y *G. mosseae* de colección, que incrementaron este valor en un 167% sobre el control (Tabla 17). Así mismo, las concentraciones más altas de metales como Mn, Ni, Pb y Cd se determinaron en las plantas inoculadas con *G. mosseae* (BEG 119) y *Brevibacillus brevis*, ya que la bacteria incrementó estos valores en un 41.5% (Mn), 427% (Ni), 217% (Pb) y en un 79 % el cadmio con respecto a los respectivos controles micorrizados (Tabla 18).

La diferente respuesta vegetal a cada ecotipo de *G. mosseae* (adaptado o no al Zn) en interacción con *Brevibacillus*, se observó de forma muy marcada en las concentraciones de Mn, Ni, Pb y Cd, ya que *G. mosseae* autóctono no modificó (excepto Ni) estos valores en presencia del aislado bacteriano, mientras que *Brevibacillus brevis* incrementó en gran medida estos valores en interacción con *G. mosseae* de colección (BEG 119) (Tabla 18).

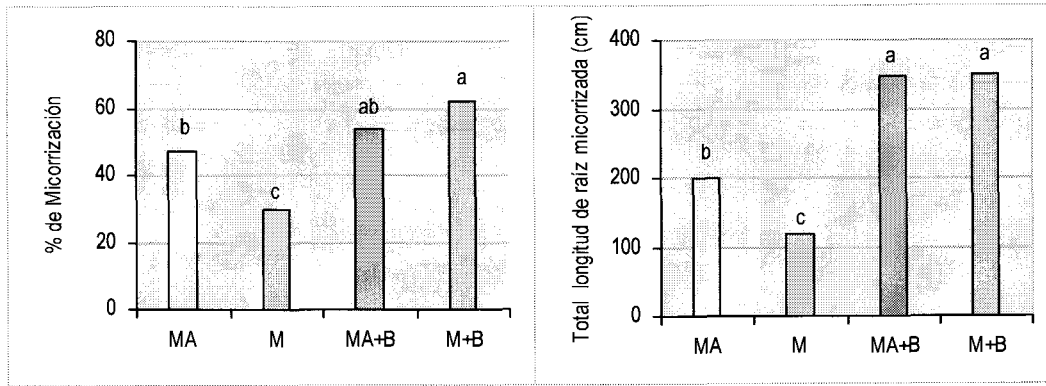


Fig. 44. Efecto de la inoculación de *Brevibacillus brevis* (B) sobre la colonización MA [porcentaje (%) y total de raíz micorrizada (cm)] por *G. mosseae* (autóctono) (MA) ó *G. mosseae* de colección (M) en suelo artificialmente contaminado con 600 mg Kg<sup>-1</sup> de Zn.

Tabla 18. Concentraciones de Mn, Ni, Pb y Cd en *Trifolium repens* cultivado en suelo contaminado artificialmente con 600 mg Kg<sup>-1</sup> Zn. Los tratamientos se indican como: C (Control), B (*Brevibacillus brevis*), MA (*G. mosseae* autóctono), M (*G. mosseae* de colección).

Tratamientos	Mn (µg g <sup>-1</sup> )	Ni (µg g <sup>-1</sup> )	Pb(µg g <sup>-1</sup> )	Cd (µg g <sup>-1</sup> )
C	17.9 c	1.16 c	253.66 c	1.47 e
B	28.9 a	0.896 d	296.33 ab	2.23 cd
MA	23.2 b	1.52 b	276.33 bc	1.86 cde
M	21.4 b	1.18 c	317.66 a	1.64 de
MA+B	28.07 a	1.82 a	291.33 abc	2.46 b
M+B	28.0 a	1.045 cd	331.00 a	3.92 a

## 7 EFECTO DE *Brevibacillus brevis*. (ADAPTADO AL Cd) SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS (ACTIVIDADES SDH Y ALP) DE *G. mosseae* (ADAPTADO AL Cd) O *G. mosseae* (BEG 119) Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS RIZOSFÉRICAS EN SUELO CONTAMINADO CON Cd

### 7.1. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

La planta seleccionada para la realización del ensayo que se describe a continuación, fue *Trifolium repens*. Las semillas se sembraron directamente en macetas de 400 g. El sustrato había recibido en los tratamientos micorrizados, 10 g de inóculo MA (inóculo puro de *G. mosseae* autóctono adaptado al Cd ó *G. mosseae* BEG 119). *Brevibacillus brevis* (aislado de suelo contaminado por cadmio) se aplicó a una densidad de  $10^8$  ufc (una semana después de la siembra). Todas las plantas fueron inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* a una concentración de  $10^8$  ufc. Los tratamientos no micorrizados recibieron 2 ml de un filtrado del inóculo para reincorporar la microbiota exenta de propágulos de micorriza.

### 7.2. Características del suelo y condiciones experimentales

El sustrato usado para los ensayos en microcosmo, bajo condiciones controladas, fue una mezcla suelo: arena en una proporción de 4:1. El suelo y la arena recibieron el mismo tratamiento y preparación descrito en los ensayos anteriores

Antes de empezar el ensayo, el suelo fue incubado durante seis semanas con sulfato de cadmio ( $18 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$ ) y en el momento de la siembra la concentración de metal disponible en el suelo era de  $8 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$ .

### 7.3. Objetivo

Evaluar, en suelo contaminado con  $8 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$ , el efecto de *Brevibacillus brevis* sobre la vitalidad y el funcionamiento de la simbiosis MA, producida por cada uno de los dos *G. mosseae* (adaptado al Cd ó de colección). Tal efecto se relaciona con el contenido de nutrientes y la asimilación de Cd por la planta. También se analiza el efecto de las inoculaciones microbianas sobre las propiedades biológicas del suelo (índice de su fertilidad), medidas a través de las actividades enzimáticas rizosféricas.



#### 7.4. Diseño experimental

El diseño experimental constaba de dos factores: el primer factor venía dado por los tratamientos bacterianos, un control (sin inóculo bacteriano) y un tratamiento inoculado con *Brevibacillus brevis* (autóctono). El segundo factor correspondió a los tratamientos micorrizados: un control sin inóculo del hongo MA, un tratamiento inoculado con *G. mosseae* (autóctono) y un tratamiento inoculado con *G. mosseae* (colección, BEG 119) resultando un total de 6 tratamientos: (C) Control, (B) *Brevibacillus brevis*, (MA) *G. mosseae* autóctono, (M) *G. mosseae* BEG 119 de colección, (MA+B) *G. mosseae* autóctono + *Brevibacillus brevis* y (M+B) *G. mosseae* BEG 119 + *Brevibacillus brevis*

#### 7.5. Determinaciones

Las plantas se cosecharon a los 90 días de crecimiento. Las raíces fueron cuidadosamente lavadas y una vez pesadas se tomaron tres alícuotas. Una alícuota para la tinción (no vital) con azul de tripán (TB), donde se cuantificó todo el tejido fúngico existente dentro de ellas. En las otras dos alícuotas de raíz se realizaron las tinciones histoquímicas indicadoras del estado fisiológico de la colonización (SDH y ALP) (técnicas descritas en el apartado de material y métodos generales).

Las actividades rizosféricas evaluadas fueron: deshidrogenasa (García *et al.*, 1997), fosfatasa (Nannipieri *et al.*, 1982) y  $\beta$ -glucosidasa (Hayano & Tubaki, 1985) y la producción de ácido indol acético (rizosférico). Estas determinaciones se realizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado de material y métodos generales.

Al finalizar el ensayo, se determinó el peso seco de parte aérea y raíz. El número de nódulos en cada planta también fue determinado. Se cuantificó el contenido de nitrógeno, fósforo y potasio, así como también Ni, Pb, Zn y Cd (cada metal se midió por espectrometría de emisión atómica Vörös *et al.*, 2000).

#### 7.6. Resultados

En el suelo artificialmente contaminado con 8 mg Cd Kg<sup>-1</sup>, la inoculación de *Brevibacillus brevis* y particularmente la de cada uno de los endofitos MA ensayados (*G. mosseae* autóctono y *G. mosseae* de colección) incrementaron significativamente el desarrollo de la parte aérea y de la raíz (Fig. 45). *Brevibacillus* incrementó la parte aérea en un 100% y la raíz en un 147%. Con la inoculación bacteriana el número de nódulos incrementó en más de un 400%. Tales efectos fueron potenciados por el *G. mosseae* autóctono. El incremento de parte aérea con la inoculación de *G. mosseae* (colección) fue

del 430% y del 600 % el de la raíz. De igual forma, la nodulación incrementó en más del 500%. La inoculación aislada de *G. mosseae* autóctono, y en mayor medida en asociación con *Brevibacillus*, fueron los tratamientos más efectivos en el desarrollo de estos valores (Fig. 45). Observamos que la interacción de microorganismos nativos (adaptados al Cd) incrementa más el desarrollo y establecimiento de la planta. Estos resultados son coincidentes, si no numéricamente, si en tendencia, con los encontrados en los ensayos anteriores, en suelo contaminado con Cd.

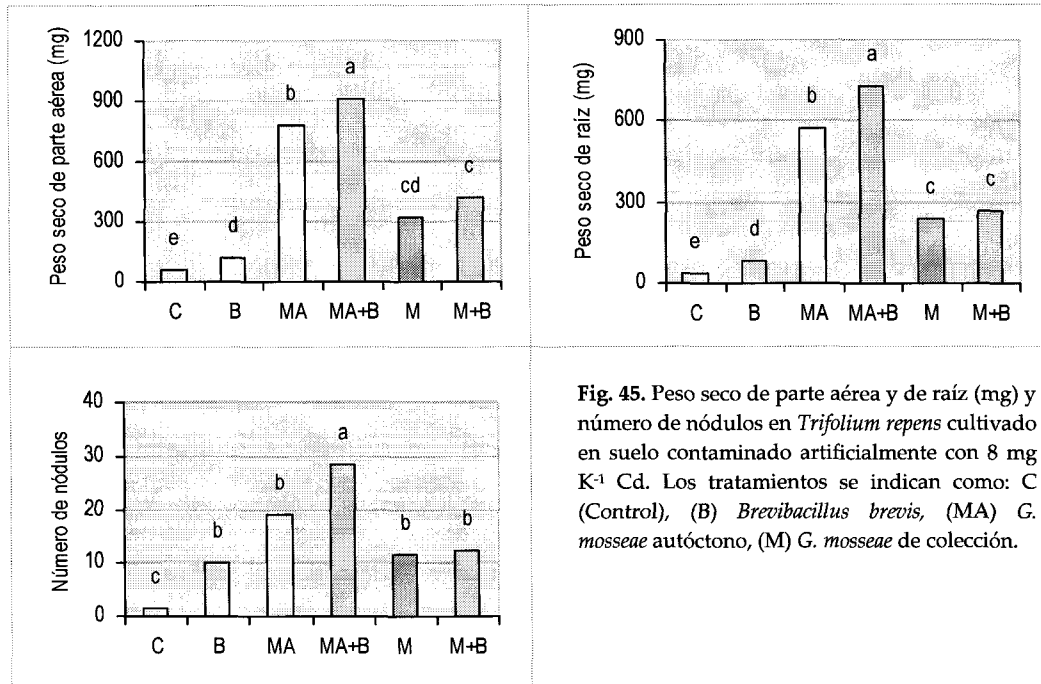


Fig. 45. Peso seco de parte aérea y de raíz (mg) y número de nódulos en *Trifolium repens* cultivado en suelo contaminado artificialmente con 8 mg K<sup>-1</sup> Cd. Los tratamientos se indican como: C (Control), (B) *Brevibacillus brevis*, (MA) *G. mosseae* autóctono, (M) *G. mosseae* de colección.

Los niveles de colonización MA variaron de acuerdo al hongo inoculado (*G. mosseae* autóctono ó de colección). *G. mosseae* autóctono fue mucho más infectivo que *G. mosseae* de colección, pero la inoculación con *Brevibacillus* incrementó, la abundancia de arbuscúlos desarrollados por los dos hongos. No obstante, la interacción de *Brevibacillus* con cada hongo MA ensayado demostró un comportamiento diferente dependiendo del parámetro infectivo determinado y de su fisiología [vitalidad (SDH), funcionalidad (ALP) e infección total (TB)].

Así pues, respecto al valor F (frecuencia infectiva), *G. mosseae* autóctono alcanzó valores superiores, a los de *G. mosseae* de colección, y la misma tendencia se observó en las actividades SDH y ALP.

Los resultados también demuestran que de este hongo, una mayor proporción del tejido fúngico se encontraba vivo (SDH) y activo (ALP). En presencia de la bacteria se incrementaron todos los valores infectivos pero no sus actividades SDH y ALP. Un resultado importante de destacar es la estimulación que ejerce *Brevibacillus* incrementando la vitalidad y actividad de los arbusculos (A) en raíces colonizadas por cualquiera de los dos hongos ensayados (Tabla 19).

**Tabla 19.** Efecto de *Brevibacillus brevis* (B) sobre la colonización MA observada por la Tinción de Tripan Blue (TB), actividad succinato deshidrogenasa (SDH) y fosfatasa alcalina (ALP) en raíces de *Trifolium repens* crecido en suelo contaminado artificialmente con 8 mg de Cd Kg<sup>-1</sup> colonizadas por *G. mosseae* autóctono (MA) ó *G. mosseae* de colección (BEG 119) (M)

	% F			% M			% m			% a			% A		
	TB	SDH	ALP	TB	SDH	ALP	TB	SDH	ALP	TB	SDH	ALP	TB	SDH	ALP
MA	90 a	86 a	60 b	52 a	16 b	2 ab	58 ab	19 b	3 b	85 a	52 a	34 a	25 b	5 b	0.9 b
MA+B	96 a	86 a	74 a	60 a	51 a	12 a	63 a	51 a	16 a	86 a	39 ab	21 b	44 a	25 a	7 a
M	47 c	28 c	20 c	47 a	5 b	0.5 b	47 ab	5 b	2 b	31 b	23 b	10 c	8 c	3 b	0.3 b
M+B	68 b	52 b	26 c	26 b	9 b	0.5 b	37 b	9 b	2 b	82 a	30 b	13 c	15 b	9 b	0.6 b

El efecto de los tratamientos aplicados sobre la actividad de poblaciones rizosféricas específicas, se evaluó mediante la medición de determinadas actividades enzimáticas. La actividad fosfatasa fue mayor en la rizosfera de las plantas inoculadas con *G. mosseae* autóctono y *Brevibacillus brevis* (Fig. 46). La inoculación de *Brevibacillus*, en forma aislada, incrementó esta actividad en un 428% con respecto al control y en asociación con *G. mosseae* autóctono y *G. mosseae* de colección lo hizo en un 824% y 596% respectivamente (Fig. 46). *Brevibacillus* y *G. mosseae* autóctono, mostraron el mismo efecto sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa, inoculados en forma aislada. La interacción de estos microorganismos autóctonos (*G. mosseae* y *Brevibacillus*), incrementó la actividad en mayor medida (un 405%), resultando el tratamiento mas efectivo (Fig. 46).

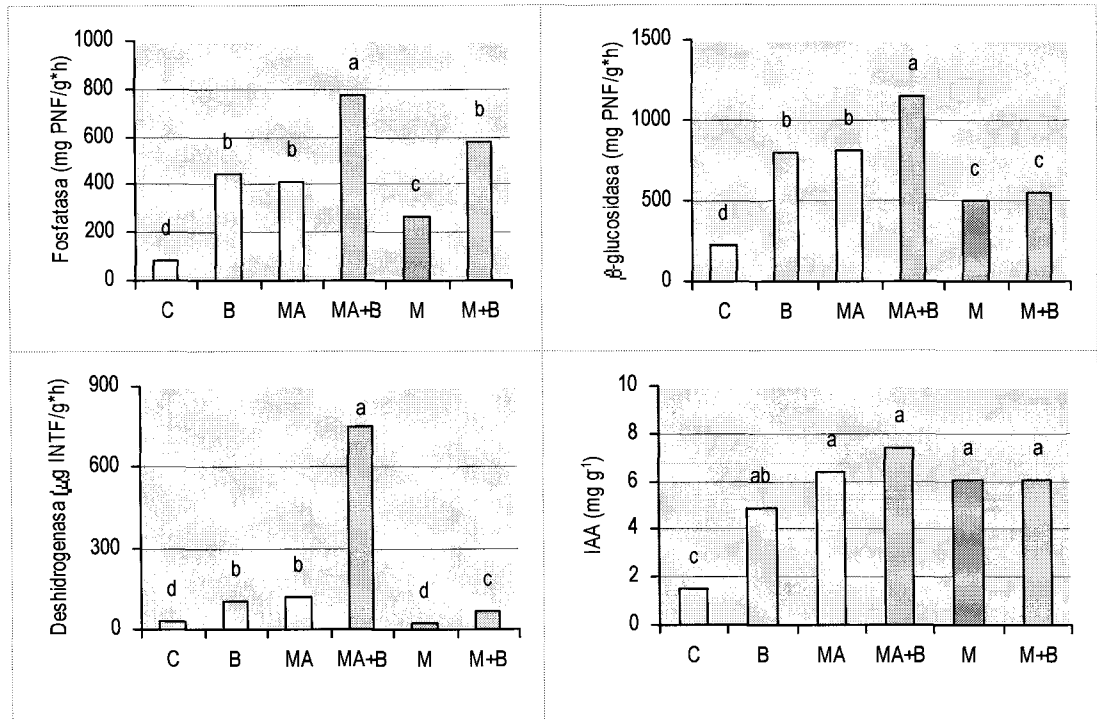
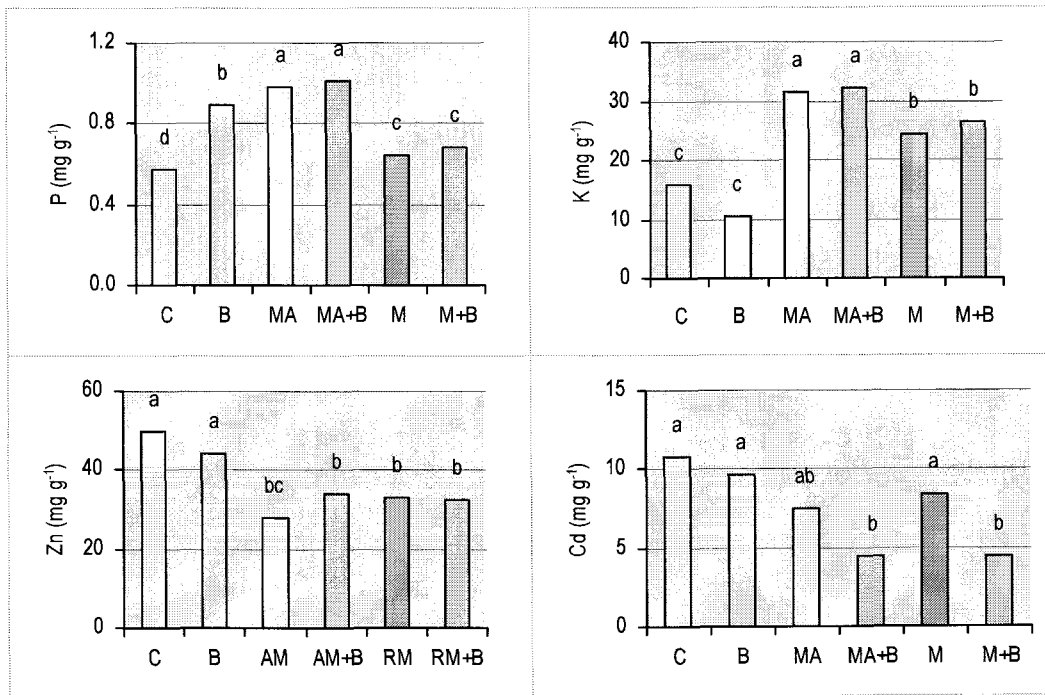


Fig. 46. Efecto de la inoculación doble y conjunta de *Brevibacillus brevis* (B) y *G. mosseae* autóctono ó de colección (MA y M) sobre las actividades rizosféricas: fosfatasa, β-glucosidasa, deshidrogenasa y la producción de ácido indol acético (AIA) a partir de suelo rizosférico de *Trifolium repens* crecido en suelo contaminado artificialmente con 8 mg Kg<sup>-1</sup> Cd. Los tratamientos se indican como: C (Control), (B) *Brevibacillus brevis*, (MA) *G. mosseae* autóctono, (M) *G. mosseae* de colección.

Con respecto a la actividad deshidrogenasa, se observó la misma tendencia que la obtenida para las actividades fosfatasa y glucosidasa, pero a diferencia de éstas solo fue altamente incrementada por la interacción de los microorganismos autóctonos (*G. mosseae* y *Brevibacillus*).

La acumulación de ácido indol acético rizosférico incrementó con todos los tratamientos, pero los valores mas altos se encontraron en la rizosfera de las plantas micorrizadas. *Brevibacillus* (inoculado en forma aislada como en interacción con los dos hongos MA) incrementó significativamente este valor (Fig. 46).



**Fig. 47** Concentraciones de P, K, Zn y Cd en *Trifolium repens* cultivado en suelo contaminado artificialmente con 8 mg Kg<sup>-1</sup>Cd. Los tratamientos se indican como: C (Control), B (*Brevibacillus brevis*), MA (*G. mosseae* autóctono), M (*G. mosseae* de colección).

Los plantas como consecuencia de la interacción de los microorganismos autóctonos (*G. mosseae* y *Brevibacillus*), presentaron una mayor concentración de P y K (Fig. 47). Sin embargo, la concentración de Cd decreció en un 73 % respecto al control. La concentración de Cr, Cu, Fe, Mn, Mo y Ni disminuyeron en los tratamientos micorrizados. Las máximas concentraciones de estos metales se encontraron en plantas inoculadas únicamente con *Brevibacillus* (Fig. 48).

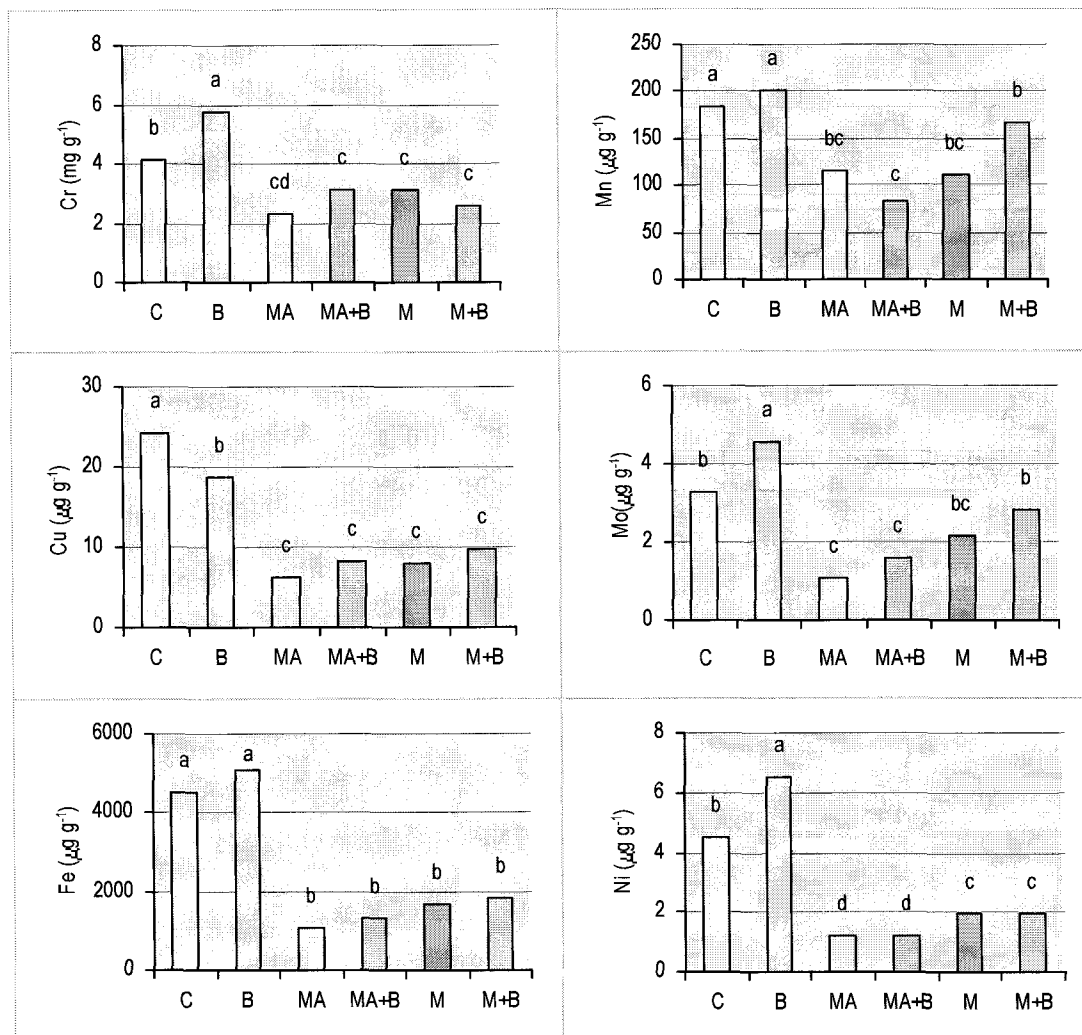


Fig. 48. Concentraciones de Cr, Mn, Cu, Mo, Fe y Ni en *Trifolium repens* cultivado en suelo contaminado artificialmente con  $8 \text{ mg Kg}^{-1}$  Cd. Los tratamientos se indican como: C (Control), B (*Brevibacillus* sp.), MA (*G. mosseae* autóctono), M (*G. mosseae* de colección).

## 8. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DEL MICELIO GENERADO POR *G. mosseae* (ECOTIPO AUTOCTONO Ó DE COLECCION) EN SUELO CONTAMINADO CON Zn Y EFECTO DE *Brevibacillus brevis* SOBRE ESTE VALOR. RELACIÓN ENTRE VITALIDAD Y/O ACTIVIDAD DE LA COLONIZACIÓN INTRARADICAL

### 8.1. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

La planta seleccionada para la realización del ensayo que se describe a continuación, fue *Trifolium repens*. El sustrato recibió en los tratamientos micorrizados, 5 g de inóculo MA (inóculo puro de *G. mosseae* autóctono o *G. mosseae* BEG 119) y/o *Brevibacillus brevis* (aislado del suelo contaminado por zinc) aplicado a una densidad de  $10^8$  ufc (una semana después de la siembra). Todas las plantas fueron inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* a una concentración de  $10^8$  ufc. Los tratamientos no micorrizados recibieron 2 ml de un filtrado del inóculo para reincorporar la microbiota exenta de propágulos de micorriza.

### 8.2. Características del suelo y condiciones experimentales

El sustrato usado para los ensayos en microcosmo fue una mezcla suelo: arena en una proporción de 4:1. El suelo y la arena recibieron el mismo tratamiento de preparación descrito en los ensayos anteriores.

El suelo fue incubado durante seis semanas con  $828 \text{ mg Zn Kg}^{-1}$  de sulfato de cinc y posteriormente se midió la concentración de metal disponible obteniéndose una concentración de  $600 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$ . Las plantas crecieron en cámara de cultivo bajo condiciones controladas y se les aplicó dos veces por semana 5 ml de solución nutritiva pH 6.8-7.0 (Hewitt 1952), carente de N y P.

### 8.3. Objetivo

En estudios anteriores se demostró que ambos ecotipos de *G. mosseae* protegían a la planta contra los efectos negativos del Zn y que tal efecto era mejorado por la coinoculación con *Brevibacillus brevis*. Los efectos más positivos, coincidentes con una mayor colonización MA, se detectaron al inocular conjuntamente los aislados autóctonos. Estos resultados plantearon los interrogantes: a) ¿Altera a bacteria las características fisiológicas y metabólicas de la colonización? b) ¿A qué nivel lo hace sobre cada ecotipo

de *G. mosseae*? C) ¿Cual es su efecto sobre el desarrollo extraradical y el potencial infectivo de este propágulo (micelio) como fuente de inóculo para posterior propagación de la colonización micorrícica?

Para resolver tales cuestiones se diseñó un sistema experimental consistente en dos compartimentos: en uno se desarrollaba la raíz micorrizada (CR) y en el otro únicamente el micelio emergente de la misma (HC).

#### 8.4. Diseño experimental

El sistema experimental utilizado se basó en el descrito por Tobar *et al.*, (1994) y Ruiz Lozano & Azcón, (2000). Consistía en dos compartimentos El compartimento radicular (CR) se hizo con una bolsa de nylon de 50 µm de diámetro de poro y contenía 240 g de suelo. Este sistema permite pasar las hifas emergentes de las raíces micorrizadas de las plantas sembradas en el CR al segundo compartimento: compartimento hifal (CH). El CR se colocó en el extremo de un contenedor de 21 cm (longitud) x 10 cm. (de ancho). El compartimento hifal, (CH) contenía 550 g de suelo.

El ensayo que aquí se describe se desarrolló en dos etapas sucesivas. En la 1ª (Parte I) solo se utilizó el sistema experimental descrito como CR y en la 2ª (Parte II) el sistema utilizado fue el HC.

##### *Parte I*

El diseño experimental constaba de dos factores: el primer factor venia dado por los tratamientos bacterianos (un control sin inóculo bacteriano y un tratamientos inoculado con *Brevibacillus brevis* (Aislado del suelo contaminado con Zn). El segundo factor correspondió a los tratamientos micorrizados: un control sin inóculo del hongo MA, un tratamiento inoculado por *G. mosseae* (autóctono) y un tratamiento inoculado por *G. mosseae* (colección BEG 119). Ello dio un total de 6 tratamientos (4 repeticiones de cada uno): (C) Control, (B) *Brevibacillus brevis* (MA) *G. mosseae* autóctono, (M) *G. mosseae* BEG 119 (de colección), (MA+B) *G. mosseae* autóctono + *Brevibacillus brevis* y (M+B) *G. mosseae* BEG 119 + *Brevibacillus brevis* Dos semillas de *T. repens* se sembraron en el compartimento limitado por la bolsa de 50 µm de luz de malla, correspondiente al CR.

##### *Parte II:*

El objetivo de esta *parte II* del experimento fue evaluar el cambio de infectividad del micelio generado por las plantas donadoras crecidas en CR, afectadas tanto por la



concentración de Zn en el sustrato, como por la inoculación de *Brevibacillus* y el ecotipo de *G. mosseae* (adaptado o de colección).

Tras cosechar las plantas de la parte I, se sembraron dos semillas de *T. repens* en el *compartimento* hifal (CH). El diseño experimental fue el mismo diseño descrito en la *parte I*, que fue donde se aplicaron los distintos tratamientos ensayados.

## 8.5. Determinaciones

### *Parte I*

Las plantas crecidas en CR se cosecharon a los 180 días de crecimiento vegetal. Las raíces fueron cuidadosamente lavadas y una vez pesadas se tomaron tres alícuotas. Una alícuota para la tinción (no vital) con azul de tripán (TB), donde se cuantificó todo el tejido fúngico. Las otras dos fracciones de raíz fueron usadas para las tinciones histoquímicas vitales como son la SDH y ALP (técnicas descritas en el apartado de material y métodos generales).

Se determinó el peso seco de parte aérea y raíz. El número de nódulos en cada planta también determinado. Se cuantificó el contenido de nitrógeno, fósforo y potasio, así como también Ni, Pb, Zn, Cd (cada metal se midió por espectrometría de emisión atómica Vörös *et al.*, 2000) tras secar y digerir las muestras con  $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ .

Las actividades rizosféricas evaluadas: deshidrogenasa (García *et al.*, 1997), fosfatasa (Nannipieri *et al.*, 1982) y  $\beta$ -glucosidasa (Hayano & Tubaki, 1985) se realizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado de material y métodos generales.

### *Parte II*

Las plantas del CH se cosecharon a los 120 días de crecimiento vegetal. En las plantas de esta segunda parte crecidas en CH, solo se les determinó crecimiento (peso seco de la parte aérea y raíz), número de nódulos e infección MA [(El micelio intraradical total (Tinción TB), como el vivo (SDH) y el activo (ALP)]. Solo el micelio extraradical se determinó solo en el suelo del CH (antes de sembrar las semillas en este compartimento) según método descrito en Material y Métodos Generales.

### 8.6. Resultados

#### Parte I

Los resultados obtenidos siguen obviamente la tendencia previamente observada en el ensayo con suelo contaminado con 600 mg Zn Kg<sup>-1</sup>. De forma similar a lo ya descrito en aquel ensayo donde el desarrollo vegetal fue afectado positivamente por los tratamientos microbianos aplicados, especialmente por la doble inoculación entre *Brevibacillus brevis* y cada uno de los hongos MA (*G. mosseae* autóctono y de colección). *Brevibacillus* incrementó en un 764% la biomasa total de la planta, *G. mosseae* autóctono en un 980 % y *G. mosseae* de colección en un 495 %. A su vez *Brevibacillus* estimuló el efecto de los hongos MA sobre el desarrollo vegetal en un 30% (*G. mosseae* autóctono) y en un 44% (*G. mosseae* de colección) (al ser comparados con sus respectivos controles MA) (Fig. 49).

La nodulación, fue igualmente estimulada por todos los tratamientos aplicados y las plantas micorrizadas presentaron los valores más altos (especialmente en las infectadas por *G. mosseae* autóctono) (Fig. 49).

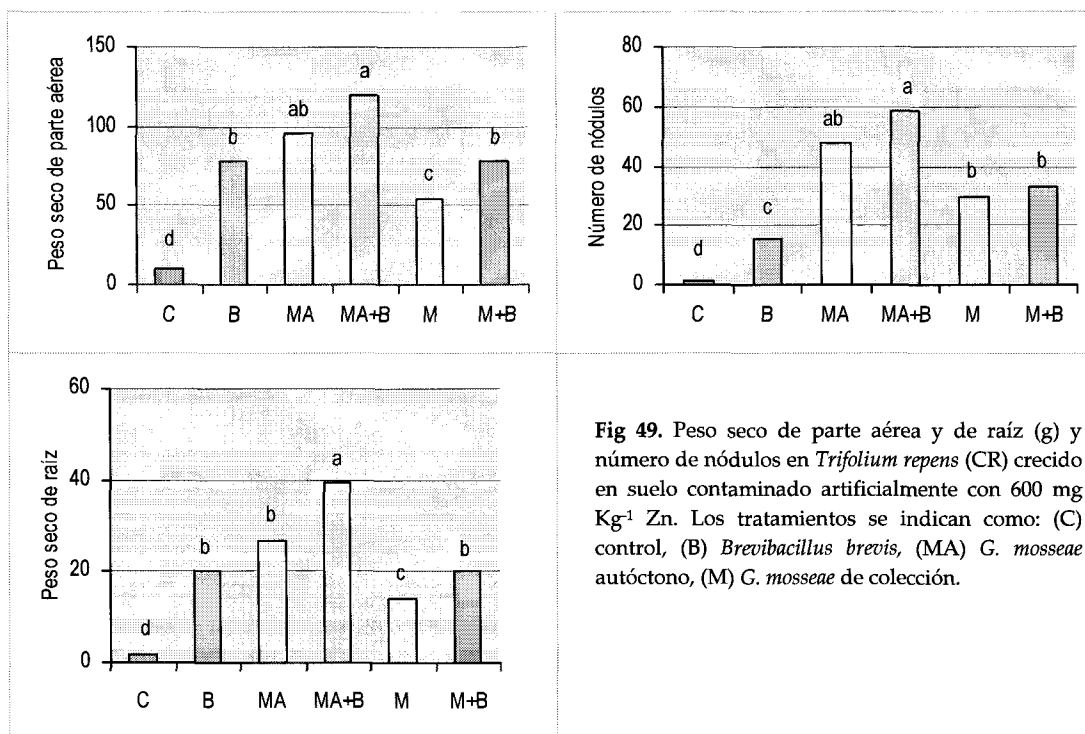


Fig 49. Peso seco de parte aérea y de raíz (g) y número de nódulos en *Trifolium repens* (CR) crecido en suelo contaminado artificialmente con 600 mg Kg<sup>-1</sup> Zn. Los tratamientos se indican como: (C) control, (B) *Brevibacillus brevis*, (MA) *G. mosseae* autóctono, (M) *G. mosseae* de colección.

Los contenidos de N, P, K y Zn, (en la parte aérea), mantiene la tendencia observada por la aplicación de los tratamientos sobre el desarrollo vegetal, y los valores mas altos se encuentran en las plantas doblemente inoculadas con los microorganismos autóctonos (*Brevibacillus brevis* y *G. mosseae* autóctono) (Fig. 50).

La tasa de absorción específica (SAR) del Cu sólo fue incrementada en las plantas micorrizadas por *G. mosseae* de colección. Sin embargo los valores mas altos de SAR del Fe, Mo y Ni, se encontraron en los controles, indicando la baja absorción de estos metales por las plantas inoculadas con los microorganismos ensayados (Tabla 20).

*Brevibacillus*, fue el tratamiento que más decreció el SAR del Fe. En el caso del Cd, Cu, Fe y Mo, el inóculo bacteriano disminuyó la tasa de absorción específica de las raíces micorrizadas por *G. mosseae* de colección, que presentaron las tasas de absorción de metales mas bajas que las micorrizadas con *G. mosseae* autóctono (Tabla 20).

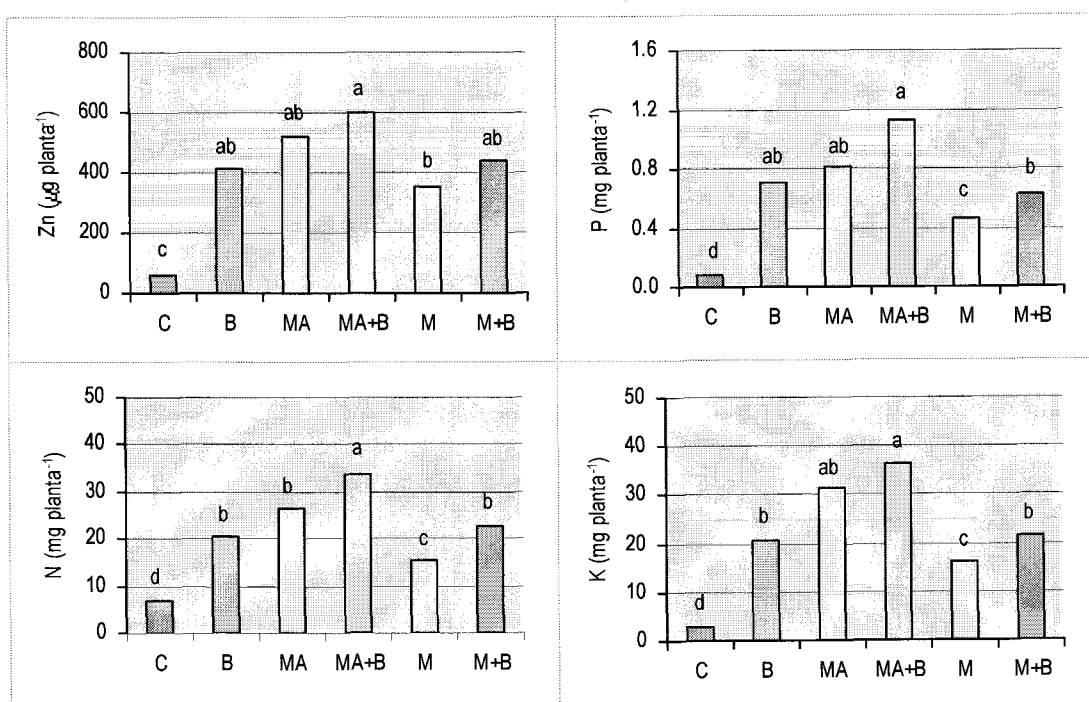


Fig 50. Contenido de Zn, P, N y K en *Trifolium repens* (CR) crecido en suelo contaminado artificialmente con 600 mg Kg<sup>-1</sup> Zn. Los tratamientos se indican como: (C) control, (B) *Brevibacillus brevis*, (MA) *G. mosseae* autóctono, (M) *G. mosseae* de colección.

**Tabla 20.** Tasa de Absorción Específica del Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo y Ni (SAR) ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) en *Trifolium repens* (CR) crecido en suelo contaminado artificialmente con  $600 \mu\text{g g}^{-1}$  Zn. Los tratamientos se indican como: (C) control, (B) *Brevibacillus brevis*, (MA) *G. mosseae* autóctono, (M) *G. mosseae* de colección.

Tratamientos	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni
C	4.1 c	2.8 b	33.9 b	3669 a	2537 bc	16.4 a	6.3 a
B	4.6 c	0.5 b	38.2 b	648 c	2267 cd	6.8 c	1.8 b
MA	14.5 b	5.6 b	36.2 b	1400 bc	2931 bc	4.7 d	3.4 ab
MA+B	11.0 b	13.2 a	32.8 b	2077 b	1626 d	4.2 d	4.6 ab
M	25.6 a	3.3 b	47.3 a	2268 b	3840 a	10.5 b	2.3 b
M+B	13.9 b	3.1 b	32.5 b	1015 c	3184 ab	6.4 cd	1.3 b

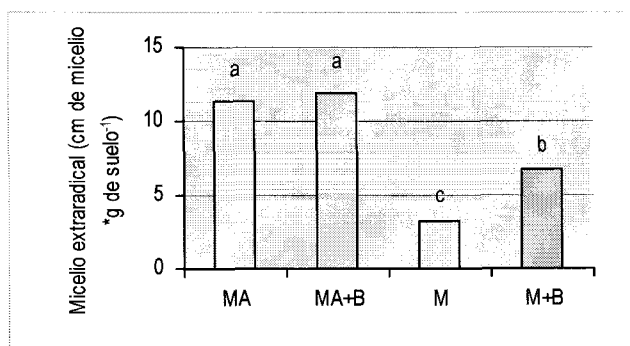
La actividad del micelio intraradical (ALP), de las plantas colonizadas por el endofito autóctono, fue mucho mayor que en las colonizadas por *G. mosseae* de colección. En general, la inoculación bacteriana incrementó todos los valores de infección MA especialmente los relacionados con la actividad ALP. Este efecto fue mucho más marcado en el caso de los arbusculos (%A y el %a), estructuras claves en el intercambio de nutrientes y que estaban reducidos fuertemente en el caso de la infección por *G. mosseae* de colección, por la alta concentración del Zn en el medio.

Estos resultados confirman el efecto positivo de *Brevibacillus* sobre el desarrollo intraradical, la vitalidad y actividad de ambos ecotipos de *G. mosseae*. Pero el efecto más importante de la bacteria fue el aumentar la vitalidad y actividad del micelio de *G. mosseae* de colección (el menos infectivo).

**Tabla 21.** Efecto de *Brevibacillus brevis* (B) sobre la colonización MA observada por la Tinción de Tripan Blue (TB), actividad succinato deshidrogenasa (SDH) y fosfatasa alcalina (ALP) en raíces de *Trifolium repens* (CR) crecido en suelo contaminado artificialmente con 600 mg de Zn Kg<sup>-1</sup> colonizadas por *G. mosseae* autóctono (MA) ó *G. mosseae* de colección (BEG 119) (M)

TB					
	%F	%M	%m	%a	%A
MA	66.3 b	23.5 ab	31.0 ab	72.8 a	17.1 ab
MA+B	83.5 a	31.0 a	36.7 a	74.8 a	24.1 a
M	49.5 c	9.8 c	16.3 c	54.8 b	5.4 c
M+B	62.2 b	18.7 b	25.8 b	66.8 ab	13.9 b
SDH					
MA	57.8 ab	6.5 b	9.9 a	39.2 b	13.2 a
MA+B	65.4 a	7.7 ab	12.6 a	54.8 a	14.3 a
M	41.4 c	5.3 b	11.8 a	45.7 ab	1.7 c
M+B	53.4 b	11.2 a	14.2 a	55.7 a	9.2 b
ALP					
MA	50.0 a	3.9 a	4.5 c	26.5 b	6.5 b
MA+B	53.8 a	5.2 a	7.2 b	42.3 a	9.4 a
M	30.1 b	1.9 b	4.1 c	12.7 c	1.2 c
M+B	32.5 b	5.6 a	10.1 a	40.6 a	4.9 b

En este suelo contaminado con Zn, *G. mosseae* autóctono, produjo un micelio extraradical mas desarrollado que *G. mosseae* de colección, pero el efecto estimulador de *Brevibacillus* fue mayor sobre el endofito menos infectivo (*G. mosseae* de colección) (Fig. 51).



**Fig 51.** Micelio extraradical producido en el compartimento hifal (cm micelio\*g de suelo<sup>-1</sup>) inoculado con *G. mosseae* autóctono (MA) ó *G. mosseae* de colección (M) en coinoculación con *Brevibacillus brevis* (B).

La acumulación de ácido indol acético rizosférico, fue incrementado en todos los tratamientos, y los valores máximos se encontraron en la rizosfera de las plantas doblemente inoculadas por los microorganismos autóctonos (Fig. 52).

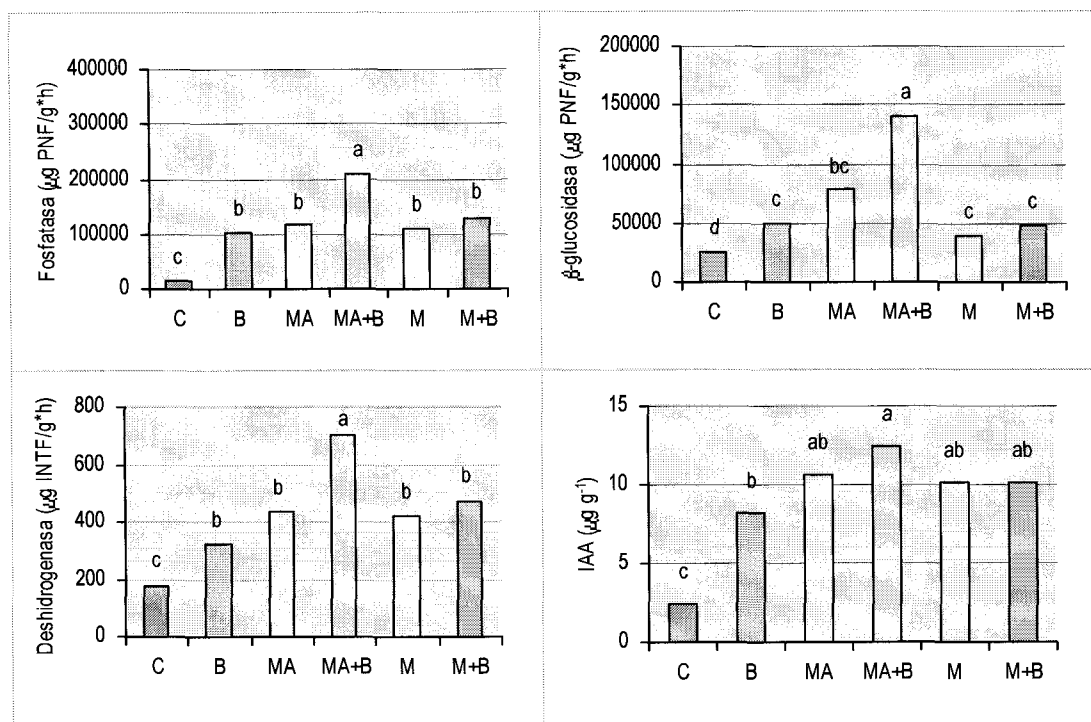
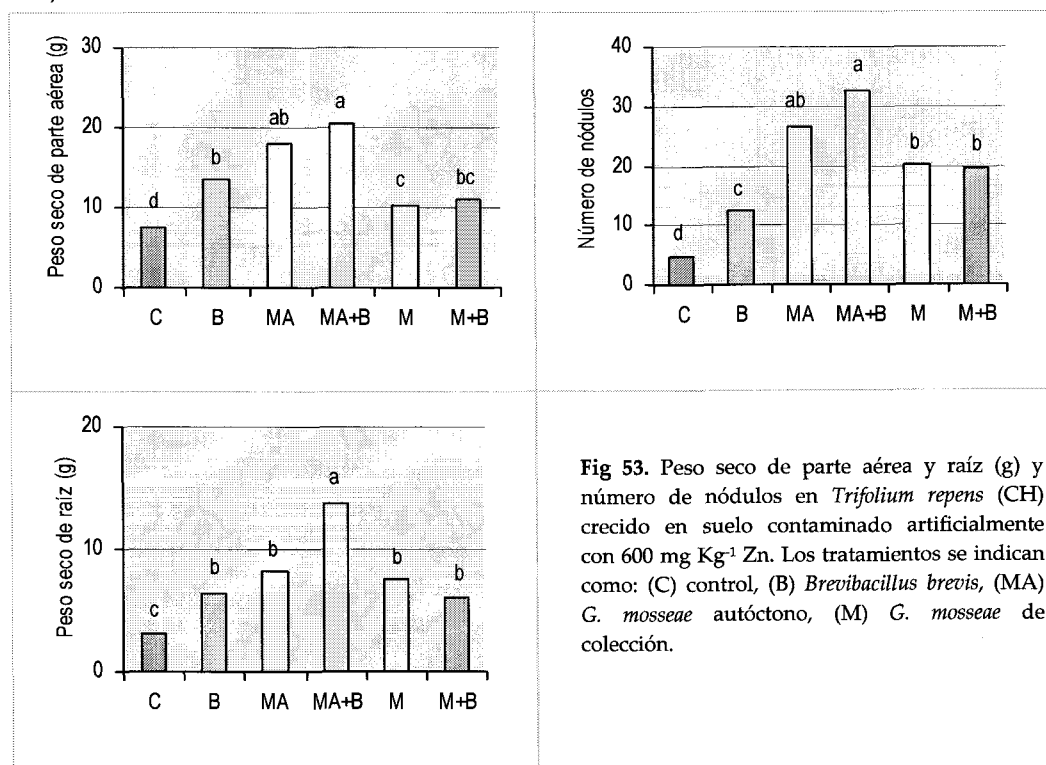


Fig 52. Efecto de la inoculación doble y conjunta de *Brevibacillus brevis* (B) y *G. mosseae* autóctono ó de colección (MA y M) sobre las actividades rizosféricas: fosfatasa,  $\beta$ -glucosidasa, deshidrogenasa y la producción de ácido indol acético a partir de suelo rizosférico de *Trifolium repens* (CR) crecido en suelo contaminado artificialmente con  $600 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ Zn}$ . Los tratamientos se indican como: (C) control, (B) (*G. mosseae* autoctono, (M) *G. mosseae* de colección.

Todos los tratamientos aplicados incrementaron las actividades rizosféricas estudiadas (fosfatasa, glucosidasa y deshidrogenasa). La interacción entre los microorganismos autóctonos dieron los valores más altos de estos parámetros que indican las propiedades biológicas del suelo y parte del ciclado de nutrientes.

## Parte II:

El desarrollo vegetal de las plantas crecidas en el *compartimento* adyacente (CH) especialmente el desarrollo de la raíz, fue particularmente mejorado por la micorrización producida, por el micelio generado en el CR en plantas inoculadas con los microorganismos autóctonos. La nodulación incrementó en todos los tratamientos (Fig. 53)



Con respecto a la colonización MA producida por el micelio extraradical generado por las plantas crecidas en la *parte I*, se mantuvieron sus características infectivas en relación a la frecuencia de la micorrización (F). Sin embargo bajaron los valores de M y m, especialmente para *G. mosseae* de colección. A y a (ALP) no variaron entre los dos endofitos, ni fueron afectados por la bacteria. Solo la riqueza de arbusculos A (TB) se encontró incrementado por *Brevibacillus* en raíces colonizadas por *G. mosseae* autóctono (Tabla 22).

Tabla 22. Efecto de *Brevibacillus brevis* (B) sobre la colonización MA observada por la Tinción de Tripán Blue (TB), actividad succinato deshidrogenasa (SDH) y fosfatasa alcalina (ALP) en raíces de *Trifolium repens* (CH) crecido en suelo contaminado artificialmente con 600 mg de Zn Kg<sup>-1</sup> colonizadas por *G. mosseae* autóctono (MA) ó *G. mosseae* de colección (BEG 119) (M),

	TB				
	%F	%M	%m	%a	%A
MA	63.83 a	13.40 b	22.17 a	54.83 a	1.83 b
MA+B	67.30 a	16.93 a	22.37 a	57.67 a	12.37 a
M	37.63 c	9.10 c	2.27 b	14.17 b	0.80 c
M+B	46.07 b	11.43 bc	2.47 b	14.73 b	1.57 bc
	SDH				
MA	41.58 a	0.41 a	1.27 a	19.33 b	0.37 a
MA+B	46.70 a	0.46 a	1.41 a	31.56 a	0.36 a
M	30.43 b	0.30 b	1.10 a	4.27 c	0.14 a
M+B	28.03 b	0.28 b	1.50 a	5.10 c	0.12 a
	ALP				
MA	21.73 b	0.22 b	1.00 a	2.73 a	0.01 a
MA+B	30.13 a	0.30 a	1.00 a	3.83 a	0.02 a
M	13.03 c	0.13 c	0.57 a	0.57 b	0.05 a
M+B	12.67 c	0.13 c	0.53 a	0.23 b	0.03 a

## 9. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD DE BIOACUMULACIÓN DE Cd Y Zn "in vitro" DE *Brevibacillus brevis* (AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS POR Zn Ó Cd) RESPECTO A UN *Brevibacillus brevis* DE REFERENCIA

### 9.1. Condiciones experimentales

En los ensayos de bioacumulación se utilizaron las 2 cepas de *Brevibacillus brevis* (autóctonos), cada una aislada de un suelo contaminado con Zn ó con Cd, respectivamente. Se siguió la metodología descrita por Kanazawa y Mori (1996) con algunas modificaciones, que se describe a continuación. En un primer ensayo, se crecieron los aislados en 200 ml de medio NB (en condiciones normales, sin adicionar el metal). Cuando cada cultivo alcanzó una densidad óptica (medida a 600 nm) equivalente a 10<sup>8</sup> ufc se centrifugaron los cultivos a 7000 g durante 12 minutos. De esta forma se recuperó la biomasa húmeda realizándose luego dos lavados con solución Ringer's compuesta por: NaCl 0.85%, CaCl<sub>2</sub> 0.03%, KCl 0.025%, NaHCO<sub>3</sub> 0.02%.



A continuación la biomasa lavada se incubó durante 1 hora, en agitación 170 rpm, a 28 °C, con cada una de las soluciones respectivas que contenía el metal. Las dosis ensayadas fueron las siguientes: para el cadmio 10 µg ml<sup>-1</sup> y zinc 300 µg ml<sup>-1</sup>. Posteriormente se centrifugaron las soluciones, recuperándose el sobrenadante y la biomasa para determinar en ella los metales absorbidos. Tal medida se realizó por absorción atómica.

**Tabla 23.** Distribución de metal en el medio de cultivo (%) después de 1 hora de incubación.

Concentración del metal añadido (µg ml <sup>-1</sup> )	Metal incorporado a la biomasa de <i>Brevibacillus brevis</i> .	Metal presente en el sobrenadante
Cd (10 µg ml <sup>-1</sup> )	76%	24%
Zn (265.5 µg ml <sup>-1</sup> )	5.6 %	94%

Al comparar los resultados experimentalmente obtenido con los cálculos teóricos, se encontró una correlación satisfactoria.

**Tabla 24.** Cálculos teóricos.

Concentración del metal añadido (µg ml <sup>-1</sup> )	Metal incorporado a la biomasa (%)	Metal presente en el sobrenadante (µg/ml)
Cd (10 µg ml <sup>-1</sup> )	73%	27%
Zn (265.5 µg ml <sup>-1</sup> )	5.1%	94.9%

Para ampliar los resultados obtenidos en este primer ensayo "*in vitro*", se procedió a realizar una cinética de acumulación. Con ello se descarta que las diferencias que existen entre los aislados con respecto a su capacidad de acumulación se deban a factores como tiempo. Para ello se realizó un nuevo ensayo manteniendo las condiciones, excepto el tiempo de incubación, que se dejó durante tres horas y se tomaron alícuotas de 1.5 ml, cada media hora. Como resultado de este ensayo se observó que el tiempo de incubación no era un factor influyente y que la capacidad que tiene cada aislado de acumular el metal a partir del tiempo 1, (media hora después de la inoculación) no variaba a las dos horas y media de incubación. De igual forma, y en paralelo, se preparó un tratamiento que se mantuvo 24 horas obteniéndose los mismos resultados.

En un tercer ensayo, se determinó si la alta capacidad acumuladora de Cd, mostrada por el aislado bacteriano adaptado a este metal, se modificaba por la presencia de otro metal y para ello seleccionamos el Pb (un metal altamente contaminante). Para ello se seleccionó el aislado bacteriano presente en suelo contaminado con el cadmio y un *Brevibacillus brevis* de colección (cedido por la Colección Española de Microbiología). Se incubó cada aislado bacteriano en soluciones adicionadas de 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de Cd ó 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de Pb ó una mezcla de Cd y Pb (10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  respectivamente). Se mantuvieron las condiciones que previamente se habían seleccionado. A la hora y media se recuperó el sobrenadante y la biomasa para su posterior análisis y detección del metal por Absorción atómica. La biomasa recuperada en cada ensayo se deshidrató durante 24 horas en estufa a 60 °C y posteriormente se les realizó una digestión con  $\text{HNO}_3$ .

Tabla 25 Porcentaje de metal acumulado por la biomasa de cada uno de los aislados bacterianos ensayados.

Aislado	% Cd en biomasa	% Plomo	% Cd y Plomo
<i>Brevibacillus brevis</i> (ref)	8.5	2.7	1.5 y 3.0
<i>Brevibacillus brevis</i> (Cd)	78.0	6.0	7 y 10

## 9.2. Resultados

En el primer estudio de bioacumulación cada uno de los aislados de *Brevibacillus brevis* procedentes de suelos contaminados con Cd ó Zn presentaron la capacidad de acumular cadmio entre un 76-80%, y zinc en un 5% (Tabla 23). En el estudio de cinética se comprobó que el tiempo no era un factor que influyera en los valores encontrados. Pero no se descarta la influencia de la cantidad de la biomasa bacteriana, y que en el caso del zinc se requiera una mayor cantidad de biomasa para retirar el metal del medio.

En el tercer ensayo, los dos *Brevibacillus brevis* (adaptados o no a la alta concentración de metal) mostraron, en el caso del aislado del Cd, una alta capacidad de retener cadmio en su biomasa (78%). En el caso del plomo solo un 6% fue retenido por el aislado del cadmio. En medio adicionado con los dos metales, el aislado del Cd acumuló solo un 7% de Cd y un 10% de plomo (Tabla 25). Estos resultados demuestran que la acumulación de cadmio por el aislado adaptado a este metal es negativamente afectado en presencia de plomo. Se puede sospechar que exista un posible transporte como mecanismo de eliminación del metal y que ambos metales puedan compartir tal mecanismo para ser eliminados del medio. La existencia de una especie de competitividad entre ambos

cationes, parece favorecer, en este caso, al plomo. En cuanto al *Brevibacillus* de colección no demostró ninguna capacidad de eliminar los metales del medio, contrastando con la actividad demostrada por la cepa autóctona seleccionada.

La alta capacidad de acumulación de cadmio por *Brevibacillus*, hace pensar que el elemento acumulado corresponde a la fracción de cadmio adsorbido por la biomasa que podría estar unido a exopolisacáridos de membrana. En cuanto a la relación adsorción/resistencia, según los datos obtenidos, *Brevibacillus* es resistente a las altas concentraciones de Cd ya que mostró una tasa de crecimiento rápido aun en presencia del metal (antes de las 24 horas). A su vez, una gran capacidad de adsorber el metal adicionado (hasta un 78%), lo diferencia ampliamente del *Brevibacillus* de colección, que no creció en presencia del metal, ni su biomasa tuvo la capacidad de adsorber metales del medio.

Aunque la pared celular juega un papel muy importante en los procesos de absorción. Se ha demostrado que especies bacterianas del género *Bacillus* (Gram positivas) tienen mayor capacidad de adsorber cationes que bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*. No solo se ha demostrado la capacidad de absorción de metales por parte de las membranas, sino también en el caso del cadmio, se ha demostrado que existe un sistema de transporte de Mn dependiente de energía el cual transporta cadmio al interior celular. Ello podría explicar los porcentajes tan altos de Cd encontrado en la biomasa de *Brevibacillus* aislado del suelo contaminado por este metal.

## 10. EFECTO DE *Brevibacillus brevis* SOBRE LA GERMINACIÓN "IN VITRO" DE ESPORAS Y DESARROLLO DEL MICELIO DE *G. mosseae* (AUTOCTONO)

### 10.1. Objetivo

Evaluar en medio axénico, el efecto de las concentraciones crecientes de Zn ó Cd y de *Brevibacillus brevis* sobre la germinación y el desarrollo saprofítico del micelio de *G. mosseae* (autóctono y adaptado al Zn ó Cd).

### 10.2. Condiciones experimentales

*Brevibacillus brevis* aislado del suelo contaminado con Cd y *Brevibacillus brevis* aislado del suelo contaminado con Zn, se utilizaron como inoculantes bacterianos ( $10^8$  ufc). Se hicieron diluciones seriadas y se utilizaron, para el ensayo de germinación de *G. mosseae*

la dilución  $10^4$ , depositándose 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana, en el centro de la placa con medio para cultivos "in vitro" de esporas MA suplementados con concentraciones crecientes de Cd ó Zn, como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos.

### 10.3. Resultados

En medio axénico y en ausencia del metal, la germinación de las esporas de cada uno de los dos *G. mosseae* autóctonos (aislados de los suelos contaminados de Nagyhörsök, Hungría), se inicio a los 7 días de incubación. El porcentaje de germinación aumentó por la inoculación con *Brevibacillus brevis* y decreció a medida que incrementaba la concentración del metal en el medio (Tabla 26 y 27).

*Brevibacillus brevis* alteró, de igual forma, el tiempo de germinación. En ambos casos la máxima germinación se observó a los 4 días de incubación en presencia de los respectivos *Brevibacillus*. Ello que suponía tres días de ventaja con respecto a los tratamientos no inoculados con la bacteria.

La presencia de los metales en el medio, retardó el tiempo de germinación y disminuyó el porcentaje de germinación siendo este efecto más marcado a medida que incrementaban las concentraciones de metal. Este efecto fue particularmente relevante a la concentración de 20 mg Cd Kg<sup>-1</sup>, ya que la germinación incrementó en un 233%, y se adelantó cinco días sobre la tasa de germinación del respectivo control..

**Tabla 26.** Efecto de *Brevibacillus brevis* sobre la germinación y desarrollo micelial de *G. mosseae* (autóctono ó de colección) en medio axénico suplementado con dosis crecientes de Cd.

Concentraciones mg de Cd Kg <sup>-1</sup>	Porcentaje de germinación de Gm (días)				
	4	7	10	15	20
0	80				
5	50				
15	38				
20	12				
(Gm+B)					
0	93				
5	74				
15	52				
20	40				
				1	
	Micelio (Gm) (mm espora <sup>-1</sup> )			% de incremento vs control	
0	18,0 b			100	
5	12,1 b			67	
15	7,0 c			38	
20	2,0 c			11	
	Micelio (Gm) (mm espora <sup>-1</sup> )			% de incremento vs control	
0	35,2 a			195	
5	18,0 b			100	
15	12,0 b			66	
20	5,0 c			28	

La eficiencia de *Brevibacillus brevis* sobre la germinación de esporas fue mayor para los tratamientos contaminados con CdSO<sub>4</sub> que con Zn SO<sub>4</sub>.

En ausencia del metal, el desarrollo del micelio emergente de cada espora fue similar para los dos *G. mosseae* y la interacción más positiva fue la observada entre los dos microorganismos aislados del suelo contaminado por Cd (*G. mosseae* y *Brevibacillus brevis*).

Los metales en el medio afectaron negativamente el desarrollo del micelio. Sin embargo, *Brevibacillus* incrementó el desarrollo micelial, siendo mayor el efecto en las placas contaminadas con Cd. El desarrollo del micelio fue más limitado a medida que incrementaba el contenido de Cd ó Zn en el medio, aunque el efecto positivo del inóculo bacteriano se mantuvo a todos los niveles de contaminación.

**Tabla 27.** Efecto de *Brevibacillus brevis* sobre la germinación y desarrollo micelial de *G. mosseae* (autóctono ó de colección) en medio axénico suplementado con dosis crecientes de Zn.

Concentraciones mg de ZnKg <sup>-1</sup>	Porcentaje de germinación de Gm (días)				
	4	7	10	15	20
0		75			
10			70		
50				50	
200					30
	----- (Gm+B) -----				
0	84				
10			75		
50			68		54
200					
	----- Micelio (Gm) (mm espora <sup>-1</sup> ) -----		----- % de incremento vs control -----		
0	16.0 b		100		
10	12.0 b		75		
50	6.0 c		38		
200	3.0 c		19		
	----- Micelio (Gm) (mm espora <sup>-1</sup> ) -----		----- % de incremento vs control -----		
0	25.0 a		156		
10	15.0 b		94		
50	10.0 bc		63		
200	7.0 c		44		

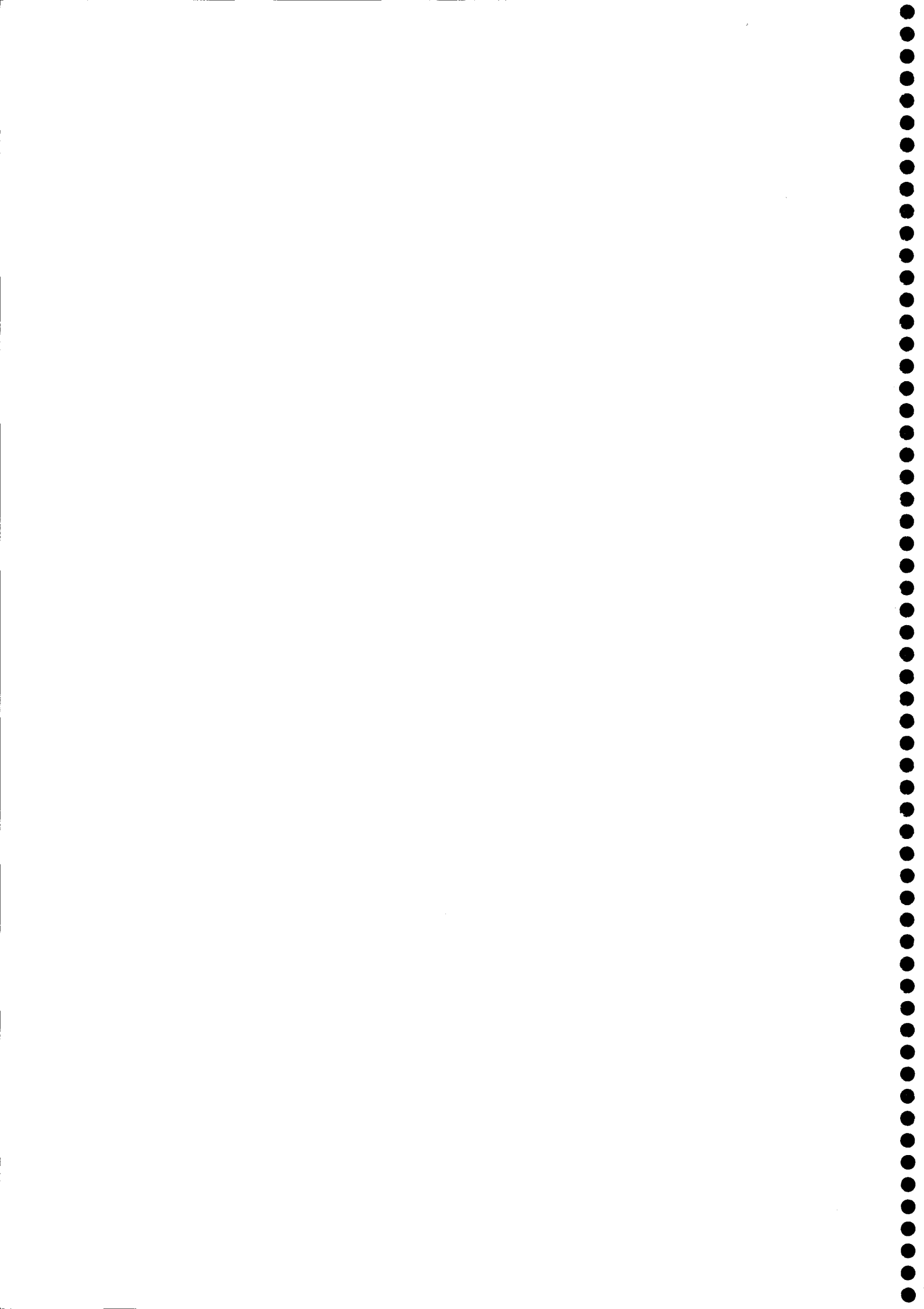
Al nivel de 15 mg Cd Kg<sup>-1</sup>, la inoculación con *Brevibacillus* fue crítica para el desarrollo de la hifa, aquí en presencia del inóculo bacteriano compensó el efecto depresor del metal y el micelio desarrollado fue similar al encontrado a una dosis mas baja de Cd (5 mg Kg<sup>-1</sup>). Igualmente, *Brevibacillus*, incrementó el desarrollo del micelio a los 5 mg Cd Kg<sup>-1</sup>, alcanzando un valor similar al obtenido en ausencia del metal. La inoculación de *Brevibacillus brevis* fue un factor muy importante para la germinación y desarrollo del micelio en las condiciones experimentales ensayadas (presencia y ausencia de metal en el medio), *G. mosseae* autóctonos adaptados al Cd ó al Zn necesitaron este tratamiento biológico para alcanzar un mayor desarrollo saprofítico. *Brevibacillus* estimuló el desarrollo del micelio en un 95% (en ausencia de Cd) y en un 56% (en ausencia de Zn).

En forma general, la bacteria incrementó la germinación y el desarrollo micelial saprofítico de los dos *G. mosseae* autóctonos ensayados. La actividad bacteriana fue mucho más efectiva sobre el desarrollo del micelio que sobre la germinación de esporas de *G. mosseae*.

---

## **VI. Discusión**





Como se ha indicado en el apartado de antecedentes bibliográficos de esta Memoria Doctoral, la degradación de un ecosistema por la limitación hídrica o por contaminación con metales pesados tiene un impacto negativo que incide en la calidad y productividad de las cosechas, en el caso de agrosistemas, y la estabilidad y diversidad de las comunidades vegetales, en el caso de ecosistemas naturales. La alteración de la cubierta vegetal, no es más que una primera señal de los procesos degradativos intensamente asociados al deterioro de las propiedades físico-químicas del suelo, en especial de la microbiota que reside en las interfaces suelo-planta (Skujin & Allen, 1986; López-Bermúdez & Albaladejo, 1990; Pérez-Solís, 2001).

Con estas premisas de partida, el presente estudio pretendió evaluar el uso de microorganismos beneficiosos de los sistemas suelo/planta, en especial hongos MA y rizobacterias PGPRs adaptados a condiciones adversas, como componentes de una estrategia que provoque en la planta beneficios cruciales para su desarrollo. Dadas las actividades reconocidas para esos microorganismos en el sistema-suelo-planta, se parte de la base de que el uso de microorganismos seleccionados podría contribuir a la restauración de los hábitats afectados por sequía o por contaminación con metales pesados (Jeffries *et al*, 2002; Vivas *et al* 2003a, b, c; Marulanda *et al*, 2002; Requena *et al.*, 2001).

Para facilitar el análisis y discusión de los resultados obtenidos la información se sistematiza de la siguiente forma:

- Interacción hongos MA-rizobacterias autóctonos de ecosistemas típicos de la cuenca mediterránea, afectados por estreses de tipo osmótico.
- Interacción hongos MA-rizobacterias autóctonos en procesos de estrés abiótico causado por la contaminación de suelos con Cd ó Zn.

## I. INTERACCIÓN HONGOS MA-RIZOBACTERIAS AUTÓCTONOS DE ECOSISTEMAS TÍPICOS DE LA CUENCA MEDITERRÁNEA

Las condiciones ambientales mediterráneas están caracterizadas por veranos muy secos, con precipitaciones moderadas o escasas y ocasionalmente torrenciales. Los suelos, desarrollados bajo la presión de un relieve accidentado, sufren una marcada tendencia a la erosión y la formación de costras superficiales. La vulnerabilidad de estos ecosistemas se acentúa cuando se producen perturbaciones de la cubierta vegetal, lo cual va normalmente acompañado de la pérdida de las propiedades físico, químicas y biológicas del suelo (estructura del suelo, disponibilidad de nutrientes, contenido de materia orgánica y/o actividad bacteriana) (Requena *et al.*, 2001; Pérez-Solís, 2001).

Dentro de la Unión Europea los países mediterráneos son, por sus características climáticas, por la larga historia de los aprovechamientos agrarios y por los intensos cambios de uso que les afectan, los que se enfrentan a mayores riesgos de desertificación (Vallejo *et al.*, 1999; Requena *et al.*, 2001). Especialmente España, país en el que gran parte se incluye en el World Atlas of Desertification, con riesgos moderados y altos. De hecho, el problema parece afectar ya a buena parte del sureste español, a la Comunidad Valenciana, al valle del Ebro y algo más moderadamente, a algunas comarcas de Castilla La Mancha y Castilla-León.

Diversas son las razones que han justificado el trabajo realizado. Básicamente, el hecho de que la microbiota del suelo resulta afectada cuando se degrada el suelo y que determinadas actividades de ciertos microorganismos sean fundamentales para que las plantas se establezcan y prosperen en condiciones adversas, justifica la investigación desarrollada. Como se ha planteado en la introducción de esta Tesis Doctoral, en los sistemas suelo-planta existen tres grupos principales de microorganismos beneficiosos que son claves en el contexto de la sostenibilidad de tales sistemas: los hongos MA, las bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. En varios estudios se ha demostrado que estos tres grupos son esenciales para propuestas de revegetación (Barea *et al.*, 1997; Requena *et al.*, 2001; Barea, 2002), donde el manejo de microorganismos autóctonos y adaptados a tales condiciones y la reintroducción de los mismos, adecuadamente seleccionados, puede ser clave en un programa de revegetación (Requena *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos confirman la importancia del manejo de microorganismos autóctonos, incluso indican hasta qué nivel la interacción MA-rizobacteria favorece el establecimiento de plantas en condiciones adversas, habiéndose elucidado algunos de los posibles mecanismos involucrados, como ha sido la producción de auxina del tipo ácido indol acético, por parte de las rizobacterias autóctonas. Esto explicaría su papel como PGPRs, e incluso como posibles MHB (Mycorrhizal Helper Bacteria), favoreciendo el desarrollo de la simbiosis MA. Los efectos observados han sido constatados en las diferentes condiciones ensayadas, ya han sido verificados en suelo estéril (sin competición con otros endofitos) y natural (en interacción con endofitos autóctonos), incluso en sustrato libre de suelo, además de reproducirse tales efectos en diferentes tipos de plantas ensayadas (leguminosas pertenecientes a la sucesión natural de la zona).

La actividad microbiana es un índice para predecir la fertilidad del suelo, y considerando los valores de densidad poblacional dados por Kennedy (1998), que sitúa la normalidad en cifras superiores al orden de 10<sup>9</sup> ufc, en suelos mediterráneos se encontró que las unidades formadoras de colonias (ufc) por ml no superaron la cifra de 10<sup>6</sup> ufc, para el caso del suelo de Baza y 10<sup>5</sup> ufc, para los suelos procedentes de Alicante. En

cuanto a diversidad, solo se detectaron 4 morfotipos diferentes en suelo Baza y solo 2 morfotipos diferentes en las tres zonas de Alicante. Debido a las características especiales de las zonas seleccionadas, además de los procesos interactivos que desencadenan la degradación del sistema suelo-planta (Requena *et al.*, 2001) no es de extrañar la escasez en la cantidad, diversidad y actividad de microorganismos. El hecho de que en suelos degradados ocurra un descenso en el número de propágulos de la microbiota rizosférica, se debe a que la planta es la fuerza motriz de la vida microbiana del suelo, lo cual es fundamental para el equilibrio del sistema, dado que los microorganismos, a su vez, van a compensar a la planta mediante acciones importantes para su crecimiento y nutrición (Miller & Lodge, 1997). El deterioro del sistema suelo-planta, desencadena un círculo vicioso de efectos negativos. Si no hay plantas se degrada la vida microbiana y si no hay propágulos microbianos, cualquier proceso natural o inducido de revegetación presenta problemas para prosperar adecuadamente.

Tras identificar las distintas bacterias, aisladas a partir de suelo rizosférico de Baza y las tres parcelas de Alicante, se encontró que todas pertenecen al género *Bacillus*. Muchos microorganismos del suelo, entre ellas especies de este género (*Bacillus*) y *Corynebacterium*, comenzaron a llamar la atención a principios de los años 90, debido a sus comportamientos, en presencia de estrés osmótico. *Bacillus*, es uno de los géneros que con mayor frecuencia se encuentra en el suelo, debido a la capacidad de adaptación que ha desarrollado para sobrevivir en las condiciones adversas que se presentan en estos hábitats (Dover & Padan, 2001; Probanza, 2002; Palomino, 2003). Por tanto, no es sorprendente que sean las bacterias pertenecientes a este género las que hayan predominado en los suelos seleccionados, afectados tanto por la escasa disponibilidad de agua, como por el déficit de nutrientes como también encontró Bai *et al.* (2002). La capacidad de este género para esporular en condiciones adversas y permanecer en estado de latencia, explicaría la persistencia y frecuencia de estos microorganismos en dichos ambientes. La capacidad de resistencia y/o tolerancia se confirmó con los resultados obtenidos "*in vitro*" donde se comprobó la respuesta de estos aislados bacterianos sometidos tanto a estrés hídrico, como al estrés causado por NaCl. De hecho al compararlos con una especie homóloga de colección, utilizada como referencia, presentaron un mayor crecimiento y producción de reguladores osmóticos celulares.

Los ecotipos de bacterias autóctonas de las áreas estudiadas (Aguas Claras, Campello y Ballestera, pertenecientes a la provincia de Alicante y Baza), demostraron comportamientos diferentes, incluso cuando se trataba de aislados de la misma especie. *B. thuringiensis* de colección, soportó los 400mM de NaCl y bajo condiciones de estrés hídrico solo soportó 1% de PEG en el medio. En este aislado bacteriano, la acumulación de prolina aumentaba al inducir el estrés. Los dos *B. thuringiensis* de Aguas Claras,

acumularon prolina (en cantidades muy diferentes a pesar de ser la misma especie), y el AIA producido disminuyó al aumentar el estrés salino. *B. thuringiensis* de Campello mostró un comportamiento similar. *B. macroides* de esta misma zona (Campello) no soportó el estrés, siendo su crecimiento fuertemente afectado a la concentración más baja de NaCl aplicada que a diferencia de *B. macroides* de Ballestera, soportó los 400 mM de NaCl con una importante acumulación de prolina (175  $\mu\text{g}$  / mg de proteína). *B. thuringiensis* aislado a partir de suelo rizosférico de Ballestera (Alicante) resistió los 600 mM de NaCl, los valores de prolina acumulada incrementaron al aumentar el estrés en un rango que osciló entre los 12.14  $\mu\text{g}$  / mg de proteína a los 100mM de NaCl hasta los 151 $\mu\text{g}$  / mg de proteína a 600 mM de la sal. La misma tendencia se observó con el glutamato, (9.2 hasta 51  $\mu\text{g}$  / mg de proteína), encontrándose que la prolina triplicaba los valores de glutamato en la mayoría de los casos en que se pudo detectar. La poca sensibilidad de estos aislados, en relación a la mostrada por *Bacillus macroides* (Campello) al NaCl sugieren la capacidad de osmoadaptación que permite el crecimiento a elevada osmolaridad a partir de la síntesis o captación del medio de solutos compatibles (Kylmä *et al.*, 2000). Los dos *Bacillus endophyticus* (razas 2 y 4), aislados de suelo rizosférico de Baza, también demostraron tolerancia a la mayor concentración de NaCl, donde se detectaron los valores mas altos de prolina (192 y 415  $\mu\text{g}$  / mg de proteína a 600 mM de NaCl) y glutamato (62 y 79  $\mu\text{g}$  / mg de proteína a 600 mM de NaCl). Se comprobó que para varias especies de *Bacillus*, la prolina fue el mayor osmoprotector producido endógenamente, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Belitsky *et al* (2001) con *Bacillus subtilis*.

En condiciones de estrés osmótico inducido por PEG, (“*in vitro*”) tanto *B. thuringiensis* (Ballestera) como los dos *B. endophyticus* de Baza crecieron incluso a la máxima concentración de PEG, sintetizando altas concentraciones de prolina y glutamato. La elevada capacidad de tolerar el estrés de estos aislados, se relaciona con el hecho de que fueron las bacterias más efectivas para beneficiar el crecimiento de la planta en estos suelos. Se confirma que tanto *B. thuringiensis* (aislado de Ballestera) como las dos razas de *B. endophyticus* (aislados de Baza), al utilizar una mezcla de osmoprotectores (prolina y glutamato) incrementan su capacidad para adaptarse de una forma flexible a los diferentes nichos ecológicos y a las condiciones variables de sus hábitats (Nau-Wagner *et al.*, 1999).

La acumulación de glutamato, en respuesta al estrés osmótico, ha sido ampliamente estudiada en *Rhizobium* (Bastford y Lewis 1990; Millar & Word 1996; Suossi *et al.*, 2001). Está relacionada con la estimulación de la actividad de la glutamato deshidrogenasa por influjo de K, neutralizando la acumulación de Na<sup>+</sup> causada por el estrés salino. *B. subtilis*, responde al incremento de la osmolaridad externa, mediante una captación rápida inicial

de K<sup>+</sup>, seguida por una acumulación de elevadas cantidades de prolina como soluto compatible (Kempf & Bremer, 2000), lo que explicaría las altas concentraciones de este osmoprotector en nuestros aislados bacterianos a medida que incrementaba el estrés.

Como es sabido el glutamato es precursor de la prolina, y el hecho de que sus valores fuesen mucho más bajos que los de la prolina, admitiendo que la prolina es el más importante soluto compatible para el género *Bacillus*, sugiere que parte de su maquinaria biosintética estuviese centrada en la síntesis de prolina.

Un ambiente fuertemente osmótico, es una característica física importante que influye en la capacidad de los microorganismos para crecer y competir en un hábitat determinado (Nau-Wagner, 1999). *B. thuringiensis* (Ballester) y los dos *B. endophyticus* (Baza), soportaron los 600 mM de NaCl y el 10% de PEG en el medio de cultivo, sin afectarse sus tasas de crecimiento. *B. macroides* (Campello), no resistió el estrés salino, comportamiento opuesto al observado por *B. macroides* (Ballester), el cual soportó el estrés hasta los 400 mM NaCl. Estos resultados confirman la capacidad de los microorganismos para vivir en un amplio espectro de condiciones ambientales y la amplia variedad de bacterias, no halófilas, que pueden tolerar cambios de osmolaridad gracias a los mecanismos adaptativos que durante la evolución han desarrollado.

En los ensayos realizados en suelo natural procedente de Baza, se observó el efecto positivo de la doble inoculación de *Bacillus endophyticus* (aislado 4) con *G. mosseae*, sobre el desarrollo de *Retama sphaerocarpa*, y de *B. endophyticus* (aislado 2) y *G. intraradices* sobre *Genista umbellata* (sometidas a estrés hídrico). Se seleccionó *G. mosseae* por su elevado nivel de compatibilidad con *Retama sphaerocarpa*, y tal efecto fue observado en estudios previos (Pérez-Solís, 2001). En los resultados aquí presentados se mantuvo esta tendencia e incluso se potenció tal efecto por la inoculación con *B. endophyticus* (aislado 4). La bacteria no solo favoreció el efecto sobre crecimiento y la colonización por *G. mosseae*, sino que además incrementó el desarrollo de la planta cuando fue inoculada de forma aislada.

Los dos aislados de *B. endophyticus* procedentes de suelo de Baza, favorecieron la colonización del hongo MA asociado, y actuaron como PGPRs ya que mejoran el desarrollo de la planta. Estos efectos pueden explicarse a través de la producción de AIA. Según Dubeikovsky *et al.*, (1993) el efecto sobre la planta puede estar limitado por la cantidad de AIA que la bacteria secreta y la respuesta puede variar de una planta a otra. *B. endophyticus* (aislado 4) duplicó la síntesis de esta auxina "in vitro" a la concentración producida por *B. endophyticus* aislado 2. Tal hecho podría explicar el efecto diferencial de las dos razas de *B. endophyticus*, sobre *Retama sphaerocarpa*, cuando se ensayaron en suelo natural. Aunque no se profundizaron sobre posibles mecanismos relacionados con el

efecto de los aislados bacterianos de Baza sobre la simbiosis MA, se comprobó no solo la compatibilidad funcional de los hongos autóctonos con la planta, sino además la compatibilidad entre la bacteria y el hongo MA autóctonos.

En cuanto a la interacción de *G. intraradices*-*B. endophyticus* (aislado 2), el efecto de la doble inoculación fue más significativo sobre *Genista umbellata*, en condiciones de estrés hídrico (75% de la capacidad de campo). *G. intraradices* fue seleccionado por su resistencia y adaptabilidad a condiciones adversas, además de haber demostrado en estudios de erosión simulada ser el menos afectado por tal fenómeno (Pérez-Solís, 2001). De hecho, se trata de una especie ubicua, con un elevado nivel de adaptabilidad (Blaszkowski, 2000). El efecto positivo de la interacción en situación de estrés podría explicarse por varios mecanismos. *B. endophyticus* (aislado 2) al tener capacidad de producir AIA, y estimular el desarrollo de la raíz incrementó la producción de biomasa radicular, lo cual pudo hacer a este tejido más susceptible a la colonización por *G. intraradices*. Otro mecanismo a considerar es la mejora del nivel hídrico de la planta lo que probablemente se deba a una mayor extracción de humedad del suelo, muy importante en condiciones de sequía (Saring *et al.*, 1988; Michiels, 1989).

En suelos de Alicante, el endofito más abundante, que fue seleccionado para la mayoría de los ensayos fue *G. occultum*. De los 6 aislados bacterianos autóctonos, *B. thuringiensis* (aislado de la zona de Ballestera), fue el más efectivo en todas las condiciones ensayadas efecto observado tanto en suelo estéril como en suelo natural, y utilizando como planta hospedadora a dos tipos de leguminosas: *T. repens* y *M. arbórea*. Además resultó mucho más efectivo que *B. pumillus* y *B. licheniformis*, catalogadas como PGPRs por su capacidad de producir AIA. Los resultados obtenidos al ensayar *G. occultum*, *G. mosseae* y *G. constrictum* (autóctonos) en suelo natural, confirmaron el concepto de compatibilidad funcional, ya que la absorción de fósforo por parte del hongo MA es diferente según la especie fúngica implicada, lo que afecta el desarrollo de la planta (Smith *et al.*, 2001). Es curioso observar que los mejores resultados se obtuvieron con *G. occultum*, (el endofito más abundante) y que la disponibilidad de nutrientes esenciales como N, P y K para *M. arbórea*, fue potenciada por la inoculación con *B. thuringiensis* (aislado bacteriano procedente de Ballestera).

En presencia de estrés osmótico inducido por PEG, *B. thuringiensis* (aislado de Ballestera) afectó el desarrollo y actividad de las dos especies de *Glomus* de colección seleccionados para este estudio. No hay información disponible a cerca del papel que ejerce las interacciones bacteria-hongo MA, sobre el estado fisiológico del hongo en la planta en ambientes limitados de agua. En las condiciones experimentales ensayadas (sustrato libre de suelo), *B. thuringiensis* fue tan efectivo como *G. mosseae* favoreciendo la nutrición y el desarrollo foliar de las plantas. La inoculación bacteriana estimuló la

actividad metabólica del micelio intraradical de ambos endofitos (*G. mosseae* y *G. intraradices*), así como el desarrollo extraradical de *G. intraradices*. De hecho, la interacción bacteria-hongo MA favoreció más el desarrollo y metabolismo del hongo, que el crecimiento de la planta. La capacidad de *B. thuringiensis* para inducir actividades metabólicas de la simbiosis, sugiere un efecto directo de la bacteria sobre el estado metabólico de los dos hongos. La producción de metabolitos como vitaminas, aminoácidos y sustancias promotoras del crecimiento (AIA), parecen responsables de la estimulación del crecimiento y la capacidad metabólica de los endofitos MA directamente. Ello sugiere el papel de *B. thuringiensis* como MHB (Garbaye, 1994; Barea, 1997; Vivas *et al.*, 2003).

Otro posible mecanismo a considerar es el incremento de la tasa fotosintética encontrada en las plantas doblemente inoculadas con *B. thuringiensis* y *G. intraradices*. Este incremento podría explicarse por el hecho de que la bacteria afectara la traslocación de azúcares solubles a las raíces de la planta favoreciendo el desarrollo y actividad del hongo MA en la raíz (Amijee *et al.*, 1989; Hetrick, 1989). No obstante, la coinoculación de *B. thuringiensis* con *G. mosseae* no afectó los parámetros de intercambio de gases de la planta, pero favoreció el desarrollo y metabolismo del endofito. Este efecto específico entre la bacteria y cada especie de *Glomus* sobre la fisiología y metabolismo de la planta era independiente de las condiciones del medio (estrés hídrico) y no parece estar relacionado con el crecimiento fúngico intraradical.

El incremento de la tasa fotosintética, el uso eficiente del agua y la conductancia estomática, inducida por la bacteria sobre las plantas colonizadas por *G. intraradices*, y los efectos contrarios sobre las plantas colonizadas por *G. mosseae* no pueden atribuirse al efecto de la bacteria sobre el crecimiento y metabolismo del micelio intraradical. Este efecto parece ser debido a una interacción bacteria-hongo MA más específica, de tal manera que la efectividad de cada hongo MA afecta a la fisiología de la planta, siendo modulada por *B. thuringiensis*. La especificidad y compatibilidad en la interacción bacteria-HMA, no fueron extrapolables al desarrollo de biomasa de parte aérea en las condiciones ensayadas, solo se encontró aumentada la capacidad de la planta para la captación de los nutrientes, quizás debido a una mayor actividad fúngica.

La falta de respuesta de las plantas doblemente inoculadas con *G. mosseae* y *B. thuringiensis* podría explicarse por el hecho de que el hongo MA y la bacteria utilizaron los carbohidratos de la planta durante el desarrollo inicial de la misma, causando un flujo del carbono a la raíz (Johnson *et al.*, 1997). En plantas colonizadas con grupos microbianos particulares, los requerimientos de carbono y una tasa de respiración muy alta (Pang & Paúl, 1980) representa un importante costo de carbohidratos para la planta. Sin embargo en los tratamientos sin PEG, la micorrización estimuló la tasa fotosintética, compensando



el coste de carbono (Tinker *et al.*, 1994). Esta asimilación, translocación y utilización del carbono fijado están integrados en procesos fisiológicos que se presentan con una interpretación mas compleja en las plantas micorrizadas (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1990).

La disminución de la actividad fotosintética como consecuencia del estrés fue mayor en las plantas micorrizadas particularmente aquellas colonizadas por *G. intraradices*. Esta depresión afectó negativamente el desarrollo del micelio extraradical y la actividad SDH intraradical. Wright *et al.*, (1998), estimó que entre el 4 al 20% del total del carbono total fotosintetizado, es usado por el hongo MA, y el consumo de carbohidratos por parte de hongo, puede ser crítico para los procesos fisiológicos de la planta cuando las condiciones medioambientales son limitadas.

Los resultados obtenidos sugieren que bajo condiciones de estrés hídrico bien la tasa respiratoria fúngica incrementó en las raíces colonizadas por *G. intraradices* o bien los elevados requerimientos de C en estas raíces (Olson & Johansen, 2000) disminuyeron en gran medida la cantidad de C fijado en el tejido colonizado por estos hongos (Smith, 1996). Las diferencias en los niveles de colonización intraradical no explican la diferencia en las tasas fotosintéticas determinadas entre los tratamientos micorrizados en las dos condiciones experimentales ensayadas (sin estrés, y estrés inducido por PEG). Sin embargo las plantas respondieron diferentemente a la colonización por los dos hongos MA, con requerimientos diferentes en C (Dodd, 2000; Ruiz-Lozano & Azcón, 1997).

El efecto diferenciado de *B. thuringiensis* en interacción con los dos hongos MA también fue evidente en la acumulación de prolina en las hojas de las plantas. La acumulación de este aminoácido está relacionado con la adaptación celular osmótica, pero aun no está claro la relación que existe entre prolina, colonización MA y estrés ambiental (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995, Ruiz-Lozano 2003). En este estudio el aumento en el contenido de prolina bajo estrés, inducido por PEG, es un indicador del ajuste del potencial osmótico en la hoja, como ocurre en los microorganismos, necesario para un balance osmótico intracelular. Las plantas expuestas a estrés hídrico generalmente reducen la apertura de los estomas para disminuir la pérdida de agua por transpiración (Ruiz-Lozano, 2003). Sin embargo en este estudio, no se encontraron efectos relevantes sobre este parámetro, mientras que las plantas micorrizadas incrementaron la resistencia al estrés inducido por PEG manteniendo valores altos de prolina, actividad fotosintética y uso eficiente de agua (Ruiz-Lozano, 2003).

La cantidad y actividad de los arbusculos aumentó por la inoculación con *B. thuringiensis*. Como resultado, se pudo haber alcanzado un equilibrio en el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo en las plantas doblemente inoculadas. La

captación de nutrientes en plantas MA no fue significativa debido al sustrato utilizado, (sustrato libre de suelo sin limitación de nutrientes). Sin embargo, el comportamiento de *B. thuringiensis* a veces mejoró el crecimiento intra y extraradical causando un mejor contenido de nutrientes en las plantas colonizadas por *G. intraradices*.

El efecto de los hongos MA autóctonos puede mejorarse por la co-inoculación con MHB, que potencian su capacidad colonizadora y efectividad de estos consorcios de microorganismos resistentes y eficaces que pueden jugar un papel importante en áreas degradadas como ya se ha demostrado (Requena *et al.*, 1996 y 2001; Barea, 1997). En el presente estudio no sólo se corrobora la efectividad de las interacciones entre microorganismos autóctonos sino que, además, se demuestran los mecanismos implicados para la mayor compatibilidad entre estos, en ambientes estresados.

La elevada capacidad de *B. thuringiensis* (proveniente de suelo de Ballestera) y de los dos ecotipos de *B. endophyticus* (aislados de suelo Baza), para producir altas concentraciones de osmolitos de tipo prolina y glutamato, les permitió mantener la producción de auxina en condiciones adversas. Este mecanismo de osmoadaptación, justificaría su mayor efectividad y compatibilidad al compararlas con aislados caracterizados como PGPRs de colección. De esta forma no sólo se favoreció la simbiosis MA, sino que además se estimuló el metabolismo del hongo MA.

## II. INTERACCIÓN HONGOS MA-RIZOBACTERIAS AUTÓCTONAS, EN PROCESOS DE ESTRÉS ABIÓTICO CAUSADO POR LA CONTAMINACIÓN EN SUELOS CON Cd Y Zn

La presencia de metales pesados en suelos, a concentraciones elevadas actúa como agente selectivo de la actividad biológica, dando como resultado un ecosistema con una población de microorganismos, menos abundantes diversos y activos, pero muy resistente a estos elementos. Los fenómenos de adaptación de los microorganismos del suelo a elevadas concentraciones de metales, son extensibles lógicamente, a los hongos MA. Los problemas crecientes de contaminación del suelo por metales pesados, hacen pensar que la adecuada utilización de microorganismos puede favorecer el establecimiento de las plantas en suelos potencialmente tóxicos. Los microorganismos, que incrementan la disponibilidad de nutrientes y producen sustancias estimuladoras del crecimiento son también capaces de inmovilizar metales pesados en el suelo reduciendo de esa forma su disponibilidad para las plantas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, en cuanto al efecto sobre el contenido de metales pesados en planta, como respuesta a la inoculación de hongos MA,

son contradictorios. Mientras que en unos estudios se describen incremento de la concentración del metal en la parte aérea, como los obtenidos por Weissenhorn & Leyval, (1995), otros autores como Shüepf *et al.*, (1987) y El-Kerbawy *et al.*, (1989) encontraron concentraciones mas reducidas en la biomasa vegetal de plantas micorrizadas.

No se dispone de información anterior a la aportada con el presente estudio acerca del efecto de la interacción hongo MA-bacteria como agentes capaces de mejorar el crecimiento de las plantas en suelos contaminados con metales pesados.

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman la importancia en el manejo de las interacciones entre los microorganismos adaptados y/o resistentes a la presencia de Cd ó Zn. Y se profundiza en cuanto a establecer el nivel al cual la interacción MA-rizobacteria (a) favorece el crecimiento de plantas en suelos contaminados, (b) afecta a la transferencia de metales del suelo a la planta, (c) modifica el estatus nutricional de la misma, (d) altera el desarrollo simbiótico y las características fisiológicas de la asociación y (e) otros aspectos que contribuyen a entender los mecanismos implicados.

Dentro de los posibles mecanismos involucrados, cabe destacar la capacidad de producción de auxina del tipo ácido indol acético por parte de los dos *Brevibacillus* (ecotipo A aislado del suelo contaminado con Cd y ecotipo I, aislado del suelo contaminado con Zn), lo que puede favorecer el desarrollo radical. Así como también la capacidad del *Brevibacillus* (ecotipo A) para acumular Cd en su biomasa.

Un hecho que se evidenció inequívocamente es la escasa diversidad de los hongos MA y de bacterias en los suelos contaminados durante un largo periodo de tiempo. Es obvio pensar que ello se debe a que experimentaron un fuerte descenso como consecuencia de la adición creciente del Cd y del Zn como ya ha sido reportado por Leyval (2003).

*G. mosseae* (especie aislada en los dos suelos contaminados con Cd ó Zn) resultó ser tolerante a las altas concentraciones de estos metales aplicados artificialmente en los suelos. Tal efecto se vio potenciado por la doble inoculación con los respectivos aislados de *Brevibacillus*. No es la primera vez de que esta especie del género *Glomus* se ha aislado de suelos contaminados con Zn ó Cd y que demuestre tanto tolerancia como gran capacidad colonizadora de esas zonas. Gildon & Tinker (1983) aislaron por primera vez un ecotipo de *G. mosseae* de una zona contaminada que era mucho mas tolerante a altas concentraciones de Zn y Cd que la misma especie aislada de una zona adyacente no contaminada. Leyval *et al* (2002) observaron también una mayor resistencia a Zn y Cd en un hongo MA específico y aislado de un suelo contaminado con metales pesados de origen geoquímico. Resultados semejantes son descritos por diversos autores como

Arnold & Kaputcka (1987); Iestwaart *et al.* (1992); Griffioen (1994); Weissenhorn (1994); Díaz *et al.*, (1996); Leyval & Weissenhorn (1996) y del Val *et al.* (1999).

Las interacciones entre los microorganismos autóctonos conducentes a favorecer el crecimiento, nutrición y desarrollos simbióticos de las plantas, en suelos contaminados, se investigaron a cada una de las tres dosis aplicadas tanto de Cd (13.6; 33.0, y 85.1 mg Kg<sup>-1</sup>) como de Zn (24.0; 68.0 y 215.0 mg Kg<sup>-1</sup>). Los efectos más importantes, en cuanto a desarrollo de la planta, reflejan una mejora del estado nutritivo de la misma, ya que el desarrollo de la colonización MA fue potenciado por la inoculación con *Brevibacillus*. Sin embargo, el efecto inhibitorio ejercido por cada metal fue diferente. En el caso del Cd a la dosis más alta (85 mg Cd Kg<sup>-1</sup>) disminuyó la infección MA y la nodulación fue inhibida totalmente, tanto en los controles como en las plantas inoculadas con los aislados bacterianos. Esta inhibición de la nodulación también fue encontrada por Chaudri *et al.* (1993) y Giller *et al.*, (1996) donde *Rhizobium* llegó a desaparecer con los niveles más elevados de metales en el suelo. Sin embargo, a una concentración de 33.0 mg de Cd Kg<sup>-1</sup>, considerada también altamente contaminante, *Brevibacillus brevis* favoreció la nodulación, lo que confirma el efecto protector de la bacteria, ante la presencia del Cd sin intervención del hongo MA.

Una tendencia similar se encontró en presencia del Zn a las tres dosis aplicadas en el suelo. *Brevibacillus brevis*, favoreció el efecto de la colonización MA, especialmente a las dos concentraciones más altas en el suelo. Tanto el desarrollo de la planta como los contenidos de N y P fueron estimulados en las plantas doblemente inoculadas en presencia de cada uno de los dos metales ensayados. Tales valores nutricionales se correlacionaron positivamente con número de nódulos y la colonización MA, indicando un buen funcionamiento de ambas simbiosis en presencia de la bacteria. Sin embargo, tanto el efecto que los inoculantes ejercieron en las concentraciones como en los contenidos de ambos metales (Cd ó Zn) en las plantas fueron diferentes. En el caso del Cd, en la parte aérea de las plantas micorrizadas se detectaron las concentraciones más bajas de este metal siendo este efecto disminuido por la inoculación con la bacteria. En el caso del Zn no se observó una fuerte reducción del metal, lo que indica diferentes mecanismos de tolerancia para la planta, por la intervención de los respectivos microorganismos autóctonos. Este comportamiento diferente no se podría explicar argumentando el factor dilución en la biomasa producida, puesto que los efectos sobre el desarrollo vegetal fueron los mismos en ambos ensayos.

En el caso del Cd este hecho puede explicarse por la elevada capacidad que mostró *Brevibacillus brevis* para incorporar este metal a su biomasa (76%) y eliminarlo del medio.

En cuanto al efecto de un ecotipo no adaptado al Zn como fue *G. mosseae* de colección, (BEG 119), también fue positivo para el crecimiento de la planta y a su vez fue potenciado por *Brevibacillus*. Sin embargo, el efecto de la interacción de esta bacteria con *G. mosseae* autóctono fue claramente mejor. No obstante, la colonización MA de *G. mosseae* de colección, se benefició más que la del *G. mosseae* autóctono por la presencia de *Brevibacillus*.

En presencia de Cd, *G. mosseae* de colección, incrementó el desarrollo de la planta, tanto como el tratamiento inoculado con *Brevibacillus*. La doble inoculación de la bacteria con el ecotipo no adaptado, incrementó el crecimiento vegetal y la nodulación, pero la micorrización no fue favorecida por la doble inoculación como se observó en el caso del Zn.

El efecto de ambos *Brevibacillus* (aislados del suelo contaminado con Cd o del suelo contaminado con Zn) sobre el metabolismo y funcionamiento de la simbiosis MA, podría explicar parte de las respuestas obtenidas en los diferentes ensayos. Al analizar las actividades SDH (indicadora de vitalidad del hongo) y la ALP (indicadora de la traslocación de P a la planta) ambas incrementaron en las raíces colonizadas por los respectivos inóculos *G. mosseae-Brevibacillus*. Tal efecto se observó en ambos ecotipos de *G. mosseae* (adaptado y de colección). Sin embargo, los valores más altos de estos parámetros simbióticos se encontraron en los ecotipos adaptados, tanto al Cd como al Zn donde una mejor función de la simbiosis fue potenciada en todos los casos por la presencia de la bacteria, y se refleja en una mejora en el estatus nutricional de la planta siempre limitado en los suelos contaminados.

La producción de micelio extraradical (MER), en suelo contaminado con Zn, fue favorecida por la inoculación con *Brevibacillus* como se demostró en el ensayo de compartimentalización, donde el micelio generado mantuvo su capacidad infectiva además de ser potenciado por la presencia de la bacteria, cuyo resultado fue un incremento en el crecimiento de las plantas. No obstante, es importante destacar el efecto de *Brevibacillus* sobre el desarrollo del MER generado por el endofito de colección, superior al encontrado en asociación con el endofito autóctono.

La producción de ácido indol acético en la rizosfera y las actividades enzimáticas rizosféricas tan limitadas por la aplicación de los metales fueron incrementadas por la inoculación de los microorganismos. En presencia de Cd ó Zn, las actividades enzimáticas se encontraron fuertemente reducidas en la rizosfera de las plantas no inoculadas lo que indica el efecto inhibitorio de estos metales causado en el funcionamiento de ecosistemas contaminados (Naseby *et al.*, 1999). El incremento en las actividades fosfatasa, deshidrogenasa y  $\beta$ -glucosidasa en la rizosfera de las plantas

inoculadas podría atribuirse a cambios cualitativos y/o cuantitativos de los exudados radicales (Naseby *et al.*, 1999). Este incremento se debió a la producción de exudados radicales ricos en C, pero en los resultados obtenidos el desarrollo radical no se correlacionó con las actividades enzimáticas encontradas, lo que indica que existen cambios cualitativos en la composición de los exudados que parecen depender del tipo de microorganismo inoculado.

La doble inoculación *Brevibacillus brevis* (aislado de suelo con Cd) con los dos endofitos (autóctono del Cd y referencia) y *Brevibacillus brevis* (aislado de suelo con Zn) con los dos endofitos (autóctono del Zn y referencia) causaron efectos más relevantes en las actividades enzimáticas que en el desarrollo de raíz. Los cambios debido a los tratamientos microbianos en estas actividades sugieren un efecto directo sobre las poblaciones rizosféricas por parte de los microorganismos inoculados (Medina *et al.*, 2003). La  $\beta$ -glucosidasa indicadora de la transformación de carbohidratos, incrementó por la inoculación de los microorganismos lo que indica una mayor actividad hidrolítica, importante como fuente de energía para los microorganismos del suelo. La deshidrogenasa y la fosfatasa (indicadoras de la mineralización del P), fueron incrementadas por la doble inoculación de los microorganismos autóctonos del Cd y del Zn (bacteria-hongo MA), lo que indica una movilización e incremento en el medio de este macronutriente, pudiendo favorecer la traslocación del nutriente liberado (P) por los hongos MA a la planta. Tal hecho podría explicar la mayor actividad ALP del micelio intraradical en los endofitos autóctonos inoculados conjuntamente con *Brevibacillus* y la mejor nutrición (P) de dichas plantas.

La producción de ácido indol acético rizosférico, fue estimulada por el tratamiento bacteriano aplicado en presencia de Cd ó Zn en el suelo. Ello indica el efecto de *Brevibacillus* como productor o estimulador de la traslocación de esta auxina en las plantas inoculadas, y la potenciación de su producción en presencia de los hongos MA.

El efecto directo de ambos *Brevibacillus brevis*, sobre la germinación y desarrollo micelial saprofito de los dos *G. mosseae* autóctonos en condiciones axénicas, permitió aclarar alguno de los posibles mecanismos que justificaran el efecto beneficioso de las interacciones sobre las plantas. Ello completa toda la información obtenida y profundiza en el análisis de las causas implicadas en los efectos encontrados.

En cuanto a la capacidad de bioacumulación, se encontró que *Brevibacillus brevis* (aislado del suelo contaminado con Cd) acumuló un 76% del metal en la biomasa, dejando solo un 24% disponible en la solución. Esta reducción tan fuerte del metal contenido en el medio, por parte de la bacteria, supone una retirada efectiva del metal

tóxico, decreciendo por lo tanto la toxicidad del medio, lo que pudo facilitar la germinación y desarrollo micelial de *G. mosseae* autóctono en medio contaminado.

Aunque *Brevibacillus brevis* (aislado del suelo contaminado con Zn) solo acumuló un 5% del Zn presente en la solución, favoreció igualmente el desarrollo y germinación de *G. mosseae*. En condiciones axénicas se descartan ciertos factores que intervienen en la interacción bacteria-HMA en el suelo.

Los dos *Brevibacillus* además de tolerar concentraciones crecientes de Cd ó Zn "in vitro", también demostraron una alta capacidad productoras de ácido indol acético (3.6 y 3.9 mg l<sup>-1</sup>) cifras que duplican los valores obtenidos de una PGPR (de referencia) caracterizada como productora de esta auxina. Tal compuesto puede estar implicado en la estimulación del crecimiento fúngico tanto en fase saprofitica como simbiótica.

*Brevibacillus brevis* (aislado del Zn), al ejercer de PGPR, como productor de AIA, estimulando la formación de raíces, así como la producción de exudados radicales, podría justificar el efecto de esta bacteria en el sistema suelo-planta en el caso de los suelos contaminados con Zn. También se conoce el papel de los exudados radicales en aspectos tales como la quelación de metales en el suelo (Marschner, 1995). Tal hecho podría también explicar algunos de los efectos encontrados.

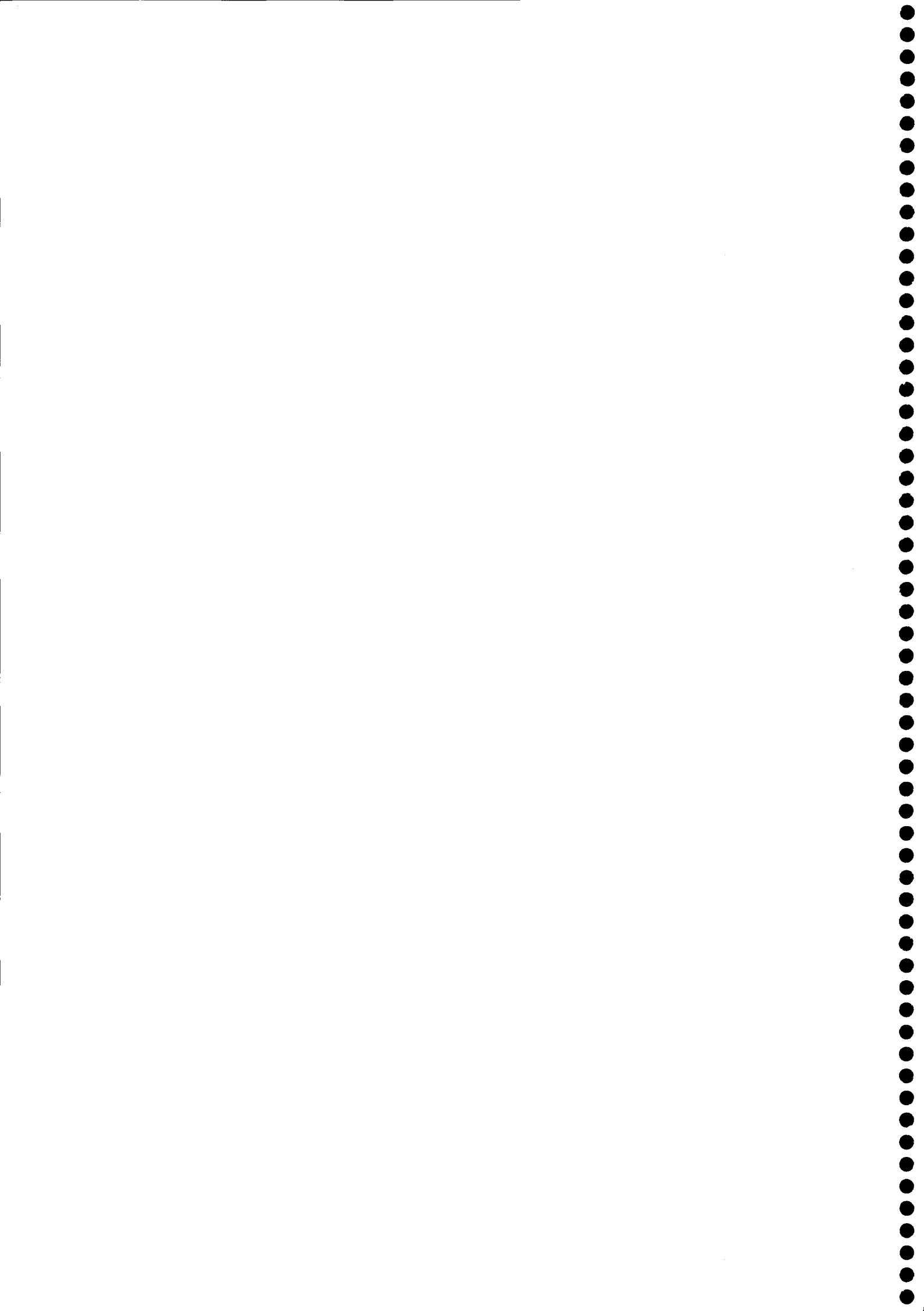
De forma general se podría confirmar que la selección de interacciones entre hongos MA y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, formada por microorganismos adaptados y resistentes a condiciones de estrés, pueden ser una herramienta biológica que favorezca el establecimiento de plantas usadas para la recuperación de estos ambientes degradados y /o contaminados.

Los aislados caracterizados, obtenidos de las áreas de estudio especialmente *Bacillus thuringiensis* (procedente de Ballestera) y los dos *Brevibacillus* (ecotipo aislado del suelo contaminado con Cd y ecotipo aislado del suelo contaminado con Zn), actuaron tanto de PGPRs, como de MHB, (Garbaye, 1994; Marulanda *et al.*, 2002; Vivas *et al.*, 2003; Duponnois & Planchette, 2003), demostrando el efecto de estos aislados bacterianos sobre el desarrollo y metabolismo de los endofitos, favoreciendo tanto su vitalidad como estimulando la actividad ALP, esencial para la simbiosis MA y bastante reducida en condiciones de estrés osmótico o producido por la presencia de metales pesados.

---

## **VII. Conclusiones**



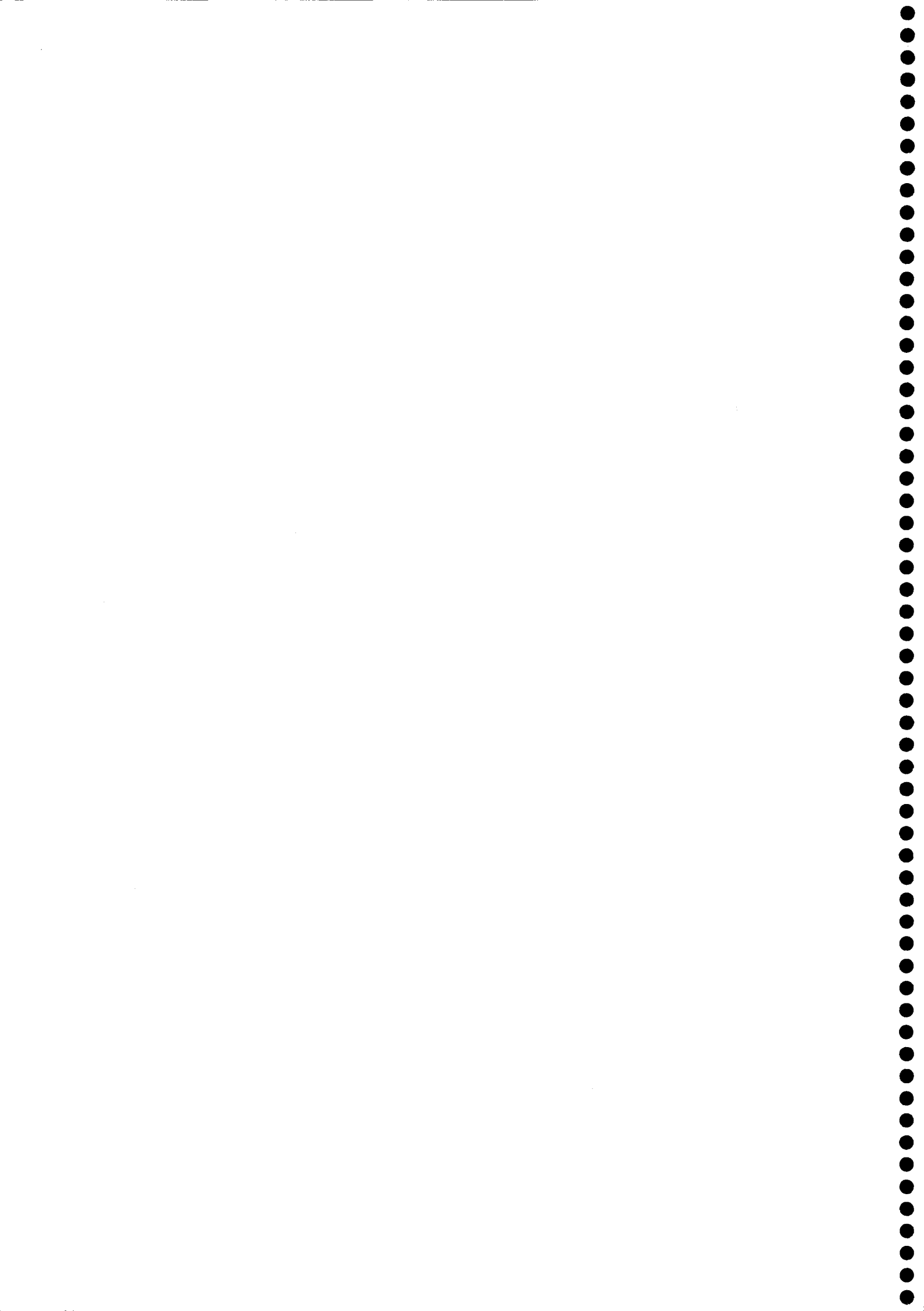


1. Los aislados bacterianos seleccionados, procedentes de áreas mediterráneas (Baza y Alicante) ó de los suelos contaminados por Cd ó Zn (Hungría) produjeron efectos beneficiosos sobre la formación, desarrollo y función de la micorriza arbuscular, principalmente la combinación de aislados autóctonos.
2. La aplicación de inoculantes bacterianos autóctonos (adaptados y resistentes) a una densidad de  $10^6$  ufc interaccionó de forma más positiva con la micorriza arbuscular y ello provocó un beneficio en la nutrición y desarrollo vegetal. El resultado beneficioso de la interacción microbiana se debió tanto a una mejora de la actividad de la micorriza como a un efecto directo del inoculante sobre el desarrollo de la planta, y/o a modificaciones cuantitativas y cualitativas de la microbiota rizosférica.
3. Los aislados autóctonos más eficientes como *B. thuringiensis* procedente de Ballester y *B. endophyticus* procedente de Baza mostraron la mayor capacidad para producir sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal del tipo ácido indol acético, superando incluso a las PGPRs de referencia.
4. La alta capacidad de osmoadaptación de los aislados bacterianos autóctonos más efectivos se correlaciona con una elevada producción de prolina y glutamato frente a estrés inducido por PEG y NaCl en el medio.
5. En este estudio se confirma la importancia de las interacciones entre bacterias y hongos formadores de MA autóctonos para el crecimiento de las plantas en condiciones limitantes, tanto de nutrientes como de agua. Además, se demuestra el efecto directo de las bacterias favoreciendo la vitalidad e incrementando la actividad ALP de los hongos MA y el desarrollo de su micelio externo.
6. La efectividad de las interacciones entre bacterias y hongos MA autóctonos, no es una actividad generalizable, sino selectiva. Especies del mismo género procedentes de la misma zona de aislamiento, no desarrollaron las mismas capacidades de adaptación y tal efecto se reflejó en el crecimiento y nutrición vegetal.

7. Dos razas de *Brevibacillus brevis*, aisladas de los suelos contaminados con Cd ó Zn, respectivamente, fueron las más tolerantes a las altas concentraciones de dichos metales cuando se ensayaron "in vitro". Además, en tales condiciones mostraron una alta capacidad de producir ácido indol acético, lo que explicaría los efectos positivos sobre la colonización MA en plantas crecidas en suelo contaminado.
8. *Brevibacillus brevis* aislado del suelo contaminando con Cd, fue capaz de acumular hasta el 76% del metal en su biomasa. Su efecto beneficioso sobre el hongo MA, se demostró incrementando el crecimiento saprofito y simbiótico del hongo así como las características fisiológicas de la colonización en presencia del metal.
9. Aunque *Brevibacillus brevis* aislado del suelo contaminando con Zn, no acumuló un alto porcentaje del metal en su biomasa. Sin embargo, favoreció tanto la germinación como el desarrollo micelial del hongo MA así como la capacidad infectiva del micelio extrarradical.
10. La adecuada selección de bacterias y hongos MA autóctonos y su interacción facultan a la planta hospedadora, en mayor medida que la de especies no autóctonas para tolerar los estreses abióticos estudiados. Los mecanismos responsables de estos efectos son múltiples dependiendo de las condiciones, pero en general la interacción de estos microorganismos potenciará aquel proceso que esté limitando la supervivencia y el desarrollo vegetal.

---

## **VIII. Bibliografía**



- Abbott, L.K. (1982).** Comparative anatomy of vesicular arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Aust. J. Bot.* 30:785-499.
- Al-Karaki, G.N. (2000)** Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza* 10 51-54.
- Altieri MA. (1994).** Sustainable Agriculture. *Enc. Agriculture. Sci.* 4:239-247.
- Alvarez, JB & Polo A. (1991).** Contribución a la educación ambiental: el tratamiento de los residuos urbanos. En: J. B. Alvarez & A. Polo. Cuadernos del I.C.E. Universidad Autónoma.
- Amijee F, Tinker PB, Stribley DP (1989)** The development of endomycorrhizal root systems.7. A detailed study of effect of soil phosphorus on colonization. *New Phytol.* 111:435-446.
- Anderson, TA & Coats, JR. (1994).** Bioremediation through rhizosphere technology. ACS Symposium series, Washington, DC.
- Andrade G, Linderman RG, Bethlenfalvay GJ. (1998).** Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular Mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Soil* 202: 79-87.
- Andreeva IN, Red'kina TV, Ismailov SF. (1993).** The involvement of indolacetic acid in the stimulation of *Rhizobium*-legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. *Russ. J. Plant Physiol.* 40:901-906.
- Arnold & Kaputcka (1987).** VA Mycorrhizal colonization and spores populations in an abandoned agriculture field after five years of sludge additions. *Ohio J. Sci.* 87: 112-114.
- Arriagada C & Herrera, M (1999).** Restoration of mine soils contaminated by heavy metals through improved forest species. En: Proceeding of the International Congress Mine Water & Environment, Spain. 1: 119-123.
- Augé RM, Schekel, KA & Wample RL (1987).** Leaf water and carbohydrate status of VA Mycorrhizal rose exposed to drought stress. *Plant Soil* 99: 291-302.
- Auge RM. (2001).** Water relations, drought and vesicular-arbuscular Mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3-42.
- Azcón R (1989)** Selective interaction between free-living rhizosphere bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 21:639-644.
- Azcon-Aguilar C & Barea J.M (1992).** Interactions between Mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En *Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungal process*. MF Allen (Ed.). Chapman & Hall, New York. pp. 163-198.

- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J. M. (1995). Saprophytic growth of arbuscular-mycorrhizal fungi. In: *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology* (Eds. A. Varma y B. Hock) Springer-Verlag, Berlin, pp. 391-407. ISBN: 3-540-58525-7.
- Azcon-Aguilar C & Barea J.M (1996). Arbuscular mycorrhizae and biological control of soil-borne plants pathogens. An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464.
- Azcón-Aguilar, C., Jaizme-Vega MC., Calvet, C. (2002). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In: S. Gianinazzi, H. Schüepp, J. M. Barea, K. Haselwandter (Ed.), *Mycorrhiza Technology in Agriculture, from Genes to Bioproducts* (pp. 187-197). Heidelberg, Germany: ALS Birkhäuser Verlag.
- Azcón-Aguilar, C., Palenzuela, J., Roldan, A., Bautista, S., Vallejo, R. y Barea, J. M. (2002). Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Applied Soil Ecology* 21: 1-9.
- Bago, B., Pfeffer, P., Shachar-Hill, Y. (2001). Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis?. *New Phytologist* 149: 4-8.
- Bago B, Vierheilig H, Piché Y, Azcón Aguilar C. (1996). Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular Mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytol.* 133:273-280.
- Bai Y, D'Aoust F, Smith DL, Driscoll BT. (2002). Isolation of plant-growth - promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Can J. Microbiol.* 48:230-238.
- Baker, A.J.M. (1981) Accumulators and excluders strategies in the response of plant to heavy metals. *Journals of Plant Nutrition* 3: 643.
- Baker R (1989). Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. *Tibtech.* 7: 34-38.
- Barea JM (1991) Vesicular arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility, In Stewart BA (ed) *Advances in Soil Science*, vol 15. Springer-Verlag, New York, pp 1-39.
- Barea, J. M. (1997). Mycorrhiza/bacteria interactions on plant growth promotion. In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Present Status and Future Prospects.*

- (Eds. A. Ogoshi, L. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondon y S. Akino) OCDE, Paris. pp. 150-158. ISBN: 4-9900627-0-1.
- Barea JM (2001)** Rhizosphere and mycorrhizal of field crops, In: Toutant P, Balazs E, Galante E, Lynch JM, Shepers JS, Werner D, Werry PA (eds) Biological Resource Managements, Connecting Science and Policy (OECD). INRA Editions and Springer. Heidelberg, pp 110-125
- Barea JM & Azcón-Aguilar C, (1982).** La rizosfera: Interacciones microbio-planta. *Anal. Edafol. Agrobiol.* 41:1517-1532.
- Barea J.M, Azcon R, Azcon-Aguilar C (1993).** Mycorrhiza and Crops. En Advances and Plant Pathology. Vol. 9. Mycorrhiza: A Synthesis. I Tommerup (Ed.). Academic Press, London. pp. 167-189.
- Barea J.M, Azcon-Aguilar C, Azcon R. (1997).** Interactions between Mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of a sustainable soil plant systems. En: Multitrophic interactions in terrestrial systems. AC Gange, VK Brown (Eds.). Blackwell Science, Cambridge. pp 65-77.
- Barea, J.M., Azcón, R., and Azcón-Aguilar, C. (2002a).** Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 343-351.
- Barea JM, Gryndler M, Lemanceau P, Schüepp H, Azcón R (2002)** The rhizosphere of mycorrhizal plants, In: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds) Mycorrhizal Technology in agriculture. From genes to bioproducts. Birkhäuser Verlag. Basel, pp 1-18
- Barea, J. M. y Honrubia, M. (1993).** Micorrizas y revegetación. *Ecosistemas*, 4: 46-47.
- Barea, J. M. y Olivares, J. (1998).** Manejo de las propiedades biológicas del suelo. In: Agricultura Sostenible (Ed. R. M. Jiménez Díaz, J. Lamo de Espinosa). Editorial Mundi Prensa. Madrid. pp. 173-193.
- Bashan, Y. (1999).** Interactions *Azospirillum* spp. In soils: a review. *Boil. Fertil. Soils* 29: 246:256.
- Bashan, Y. (1998).** Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16:729-770.
- Bates LS, Waldren RP, Teare I (1973)** Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205-207.
- Bar T & Okon, (1992).** Induction of indole-3-acetic acid synthesis and possible toxicity of tryptophan in *Azospirillum brasilense* Sp.7. *Symbiosis* 13:191-198.



- Baylis, GTS. (1972). Fungi, phosphorus, and the evolution of root systems. *Search* 3: 257-259.
- Bawja, R. and Naz, J. Z. (1991). Mycorrhiza in sulphuric-rich soils. *Sci. Int (Lahore)*, Monograph: Contemporary studies in mycorrhiza and biomagnetism. pp. 24-27.
- Beard, G & Fortin, J.A. (1988). Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on rDNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Belgrader P, Hansfor D., Kovac G., Raymond M. (1999). A minisonicator to rapidly disrupt bacterial spores for DNA Analysis. *Anal. Chem.* 199, 71: 4231-4236.
- Bialeski, RL (1973). Phosphates pools, phosphates transports and phosphates availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24:225-252.
- Biró, B, Vörös I, Köves-Pechy K, Seguí J. (1993) .Symbiont effect of *Rhizobium* bacteria and VAM fungi on *Pisum sativum* in recultivated mine spoils. *Geomicrobiol. J.* 11: 275-284.
- Bonfante Fasolo P. (2001). At the interface between Mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. *The Mycota IX, Fungal Associations Hock (Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.* 45-61
- Booth, I. R & P. Louis. (1999). Managing Hypoosmotic stress: aquaporins and mechachannels in *Escherichia coli*. *Curr. Opinion. Microbiol.* 2: 166-169.
- Borie F & Rubio, R. (1999). Effects of arbuscular mycorrhizae and liming on growth and mineral acquisition of aluminum-tolerant and aluminium sensitive barley cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 22:121-137.
- Bothe & Hildebrandt (2002). Arbuscular Mycorrhizal fungi nitrate assimilation: Genes and ecophysiological aspects. *Mycorrhizal Technology in Agriculture.* 123-128. Eds: S. Gianinazzi. Birkhäuser- Verlag.
- Bowen GD, Rovira AD (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv Agron* 66:1-102.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Briat, JF. (1992). Iron assimilation and storage in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.* 138:2475-2483.
- Budi, S. W., Van Tuinen, D., Martinotti, G., Gianinazzi, S. ((1999)). Isolation from *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular

- mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5148-5150.
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR. (1998).** A plant growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl. Environm. Microbiol.* 64: 3663-3668.
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR. (2001).** Plant growth promoting bacteria that decreased heavy metal toxicity in plants. *Can. J. Microbiol.* 46: 237-245.
- Burket, B., Robson, A. (1994).** <sup>65</sup>Zn uptake in Subterranean Clover (*Trifolium subterraneum* L) by 3 vesicular-arbuscular Mycorrhizal fungi in root-free sandy soil. *Soil Biology & Biochemistry* 26: 1117-1124.
- Cantrell, I.C & Linderman, R. G. (2001).** Preinoculation of lettuce and onion with VA Mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. *Plant and Soil* 233:269-281.
- Carr GR & Hinkley MA, (1985).** Germination and hyphal growth of *Glomus caledonium* on water-agar containing Benomyl. *Soil Biol. Biochem.* 17: 313-316.
- Ceccanti, B & Garcia, C. (1994).** Coupled chemical and biochemical methodologies to characterize a composting process and the humic substances. In humic substances in the global environmental and the implications on human health. (Eds). N. Senesi & T. M. Miano. Amsterdam: Elsevier. pp. 1279-1284.
- Cervantes & Rodríguez-Barrueco (1992).** Relationships between the Mycorrhizal and Actinorhizal Symbiosis in Non-legumes. Norrrys J.R, Read D.J, Varma A.K. (eds). *Methods in Microbiology*. Vol. 24. Academic Press , London, pp 417-432
- Chao, C.C., & Wang, Y.P. (1990).** Effects of heavy metals on the infection of vesicular arbuscular mycorrhizae and the growth of maize. *J.Agr. Ass C.* 153: 34-45.
- Chaudri, A.M., McGrath, S.P., and Giller, K.E. (1992)** Survival of the indigenous population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in soil spiked with Cd, Zn Cu and Ni salts. *Soil Biol. Biochem.* 24: 625-632.
- Chen, W., Buhlmann, F., Richins, R.D., and Mulchandani, A. (1999).** Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 137-141.
- Chen, B., Peter C., Xiaolin, L. (2001).** A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. *Chemistry of protection of the Enronmental.* 42: 185-192.
- Colpaert & Van Assche (1992).** The effects of cadmium and the cadmium-zinc interactions on the axenic growth of ectomycorrhizal *Pinus silvestrys* L. *Plant Soil.* 145: 237-243.

- Cooper, K.M & Tinker, P.B. (1978). Translocation and transfer of nutrient in vesicular-arbuscular mycorrhizae. Uptake translocation of phosphorus, zinc and sulphur. *New Phytol* 81:43-52.
- Crowley DE & Dungan RS, 2002. Metals: Microbial Process affecting metals. Enc. Of Environmental Microbiology. Vol 4, Gabriel Bitton (Ed). Pp. 1878-1893.
- Csonka, L.N & Epstein, W. (1996). Osmoregulation. In Neidhard F.C. (eds). *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular Biology. ASM Press, Washington, DC, pp 1210-1223.
- da Costa, M., Santos, H & Galinski, E. (1998). An overview on the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archae. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 61: 117-153.
- Darbon, N., Lavagne, F., and Quillon, J.P. (1992). Les phosphates et le cadmium: le sol, la plante, l'home. *APAO, Paris*.
- Datnoff LE, Nemeček S, Pernesky K. (1995). Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biol. Control* 5: 427-431.
- del Val, C., Barea, J.M., and Azcón-Aguilar, C. (1999)a. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 718-723.
- del Val, C., Barea, J.M., and Azcón-Aguilar, C. (1999)b. Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 11: 261-269.
- Díaz, G and Honrubia, M. (1995). Effect of native and introduced arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cystisoides*. *Biol. Plant.* 37: 121-129.
- Díaz, G., Azcón-Aguilar, C., and Honrubia, M. (1996). Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cystisoides*. *Plant Soil* 180: 1201-1205.
- Dick A. V. & Tabatabai, M. A. (1993). Significance and potential uses of soil enzymes. *Soil Microbial Ecology. Ed. Metting F. Blaine* 4: 98-127.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-González, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., Okon, Y. (2001). Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol* 28: 1-9.

- Dodd, J.C. 2000 The role of arbuscular mycorrhizal fungi in agro- and natural ecosystems *Outlook on Agriculture* 29 55-62.
- Dodd JC, Boddington CL, Rodriguez A, Gonzalez-Chavez C, Mansur I (2001) Mycelium of Arbuscular Mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. *Plant Soil* 226:131-151.
- Donnelly, P. K. & Fletcher, J.S. (1994). Potential use of Mycorrhizal fungi as bioremediation agents Bioremediation Through Rhizosphere Technology Series: *ACS Symposium Series* 563: 93-99.
- Dover N & Padan E 2001. Transcription of nhaA the main Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli*, is regulated by Na<sup>+</sup> and Growth Phase. *J. of Bacteriology* 2: 644-653.
- Dubeikovsky AN, Moedukhova EA, Kochetkov VV, Polikarpova FY, Boronin AM. (1993). Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid. *Soil. Biol. Biochem.* 25:1657-1664.
- Dueck TA, Visser P Ernst WH, & Schurts H.(1986). Vesicular mycorrhiza decreased Zn toxicity to grasses growing in Zn polluted soil. *Soil Biol. Biochem.* 18:331-333.
- Duponnois R & Planchette C. (2003). A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of *Australian Acacia* species. Mycorrhiza Springer-Verlang
- El-Kherbawy, M., Angle, J.S., Heggo, A., Chaney, R.L., (1989), Soil pH, rhizobia, and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy-metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L). *Biol. Fertil. Soils* 8:61-65.
- Entry, J.A., Watrud, L.S., Reeves, M. (1999). Accumulation of 137Cs and 90Sr from contaminated soil by three grass species inoculated with mycorrhizal fungi. *Environmental pollution* 104:449-457.
- Ernst, WHO. (1990). Mine vegetation in Europe. Heavy Metals Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. Shaw, A.J. (Ed). pp. 21-37. CRC Press, Boca Raton Florida.
- Faber BA, Zasoski RJ, Munns DN & Chackel. (1991). A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in Mycorrhizal plant. *Cn. J. Bot.* 69:87-94.
- Ferrol, N., Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C. (2002) Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas *Plant and Soil* 244: 231-237.
- Filippi C, Bagnoli G, Citeresi AS & Giovannetti M. (1998). Ultrastructure spatial distribution of bacteria associated with sporocarps of *Glomus mosseae*. *Symbiosis* 24:1-12.

- Fridlender M, Invar. J, Chet I. (1993).** Biological control of soilborne plant pathogens by a b1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* 25:1211-1221.
- Gadd,GM (2001).** Heavy metals pollutants: environmental and biotechnological aspects. *Enc of Microbiology*. Vol 2., Joshua Ledeborg (Ed) pp. 607-617.
- Galinski, E.A. & Trüper, H.G. (1994).** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbial Rev.* 15:95-108.
- Galleguillos, C., Aguirre, C., Barea, J. M. y Azcón, R. 2000.** Growth promoting effect of two *Sinorhizobium meliloti* strains (a wild type and its genetically modified derivative) on a non-legume plant species in specific interaction with two arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Science.* 159:57-63.
- Garbaye J (1994)** Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 128:197-210.
- García C., Hernandez M.T. Costa F. (1997)** Potencial use of dehydrogenase activity as index of microbial activity in degraded soils. *Communications Soil Science and Plant Analysis* 28:123-134.
- Gerdeman JW& Nicolson JH. (1963).** Spores of Mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Br. Mycol. Soc.* 46:235-244.
- Gianinazzi, S. (1991).** Vesicular arbuscular (endo-)mycorrhiza: cellular, biochemical and genetic aspects. *Agriculture Ecosystems and Environment* 35:105-119.
- Gianinazzi-Pearson, V. (1996).** Plant cell responses to arbuscular endomycorrhiza: Getting to roots of the symbiosis. *The Plant Cell* 8:1871-1883.
- Gianinazzi- Pearson V & Azcon-Aguilar C (1991).** Fisiología de las micorrizas versículo-arbusculares. Fijación y Movilización Biológica de nutrientes. Vol II. J. Olivares JM Barea (Eds.) CSIC, Madrid. pp. 175-202
- Gianinazzi, S. Gianinazzi-Pearson, V., Franken, P., Dumas-Gaudot, E., Tuinen van, Diederik, Samra, A., Martin†Laurent, F., Dassi, B. (1995)** Molecules and genes involved in mycorrhiza functioning *Biotechnology of Ectomycorrhizae* (V. Stocchi et al., eds) Plenum Press, New York 67-76
- Gianinazzi S, Gianinazzi - Pearson V & Trouvelot A (1990).** Potentialities and Procedures for the use of endomycorrhizas with special emphasis on high value crops. *En: Biotechnology Fungi for Improving Plant Growth.* Cambridge, UK. pp. 41-54.
- Gildon, A. & Tinker, P.B. (1981).** A heavy metal tolerant strain of Mycorrhizal fungus. *Br. Mycol. Soc.* 77:648-649.

- Gildon, A., & Tinker, P.B. (1983). Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 95:247-261.
- Giller, K., Witter, E. & McGrath, S.P. (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* 30:1389-1414.
- Giovannetti 2000 Effects of mycorrhizas on plant tolerance to diseases In: Arbuscular mycorrhizas: physiology and functions (Eds. Y. Kapulnick, D. D. Douds Jr.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 345-366
- Giovannetti, M. (2001). Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. In: Kapulnik Y, Douds D D (eds). Arbuscular mycorrhizas: hysiology and function. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 47-68.
- Giovannetti, M., Avio, L., Sbrana, C., Citernes, A. S. 1993 Factors affecting appressorium development in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol and Gerd.) Gerd. and Trappe. *New Phytol* 123:115-122.
- Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytol.* 84:489-500.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungal mycelium: from germlings to hyphal networks. Mycorrhizal Technology in Agriculture. Eds Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K. Birkhauser. 49-58.
- Giovannetti L, Ventura, S., Bazzicalupo, M., Fani, R and Materassi, R. (1990). DNA restriction fingerprint analysis of the soil bacterium *Azospirillum*. *J Gen Microbiol* 136:1161-1166.
- Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- Graham, J. H., Duncan, L.W., Eissenstat, D. M. (1997). Carbohydrate allocation patterns in citrus genotypes as affected by phosphorus nutrition, mycorrhizal colonization and mycorrhizal dependency. *New phytologist* 135:335-343.
- Graham, J. H., Timmer, L. W., Fardelmann, D. 1986 Toxicity of fungicidal copper in soil to citrus seedlings and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathol.* 76:66-70.
- Greger, M. (1999). Metal availability and bioconcentrations in plants. Heavy Metals Stress in Plant. From molecules to ecosystem. Prasad and Hagemeyer (Eds, )pp 1-27, Springer Verlag, Berlin.

- Grichko VP, Filby B, Glick BR. (2001).** Increasing ability of transgenic Plants expressing the bacteria enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. *J. Biotechnol.* 81: 45-53.
- Griffioen WAJ, Iestwaart JH, Ernst WHO. (1994).** Mycorrhizal infections of an *Agrostis capillaris* populations on a copper contaminated soil. *Plant and Soil* 158: 83-89.
- Gryndler, M. (2000)** Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms In: *Arbuscular mycorrhizas: physiology and functions* (Eds. Y. Kapulnick, D. D. Douds Jr.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 239-262
- Gryndler, M.(2001).** Interactions of arbuscular Mycorrhizal fungi with other soil organism. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function.* Kapulnik, Y and Douds, D. D. (eds) pp 239-262. Academic Publishers. Netherlands.
- Guillemín JP, Orozco MO, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (1995)** Influence of phosphate fertilization on fungal alkaline phosphatase and succinate dehydrogenase activities in arbuscular mycorrhiza of soybean and pineapple. *Agric Ecosyst Environ* 53:63-69.
- Harley J.L. & Smith, S.E. (1983).** *Mycorrhizal Symbiosis.* Academic Press. London, 483 pp.
- Harrison, M.J., Van Buuren, M.L. (1995).** A phosphate transporter from the Mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378:626-629.
- Haselwandter, K & Berreck , M. (1994).** Accumulation of radionuclides in fungi. *Metals Ions in Fungi.* Winkelmann, G and Winge, D.R. (Eds) pp 259-277. Dekker, New York.
- Hayano & Tubaki (1985).** Origin and properties of b-glucosidase activity of a tomato field. *Soil . Biol. Biochem.* 17:553-557.
- Hepper, C.M & Smith, G.A. (1976).** Observations on the germination of Endogone spores. *Transaction of the British Mycological Society.* 66:189-194.
- Herrera, M. A., Salamanca, C. P. y Barea, J. M. (1993).** Mycorrhizal associations and their functions in nodulating nitrogen-fixing trees. In: *Symbioses in Nitrogen-Fixing Trees* (Eds. N. S. Subba Rao y Rodriguez-Barrueco) Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi, pp. 141-166. ISBN. 81-204-0757-1.
- Hetrick, B.A.D., Wilson, G.W.T. & Figge, D.A.H. (1994)** The influence of Mycorrhizal symbiosis and fertilizer amendments on establishment of vegetation in heavy metals mine spoil. *Environmental Pollution* 86:171-179.

- Hewitt EJ (1952)** Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical Communication 22, Farnham Royal, Commonwealth Agricultural Bureaux, Bucks.
- Hong Y, Pasternak JJ, Glick BR (1991)** Biological consequences of plasmid transformations of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2: *Can. J. Microbiol.* 37:796-799.
- Hooker, J.E., Jaizme-Vega, M., Atkinson, D. (1994).** Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. S. Gianinazzi and H. Schüepp (eds) Switzerland.
- Horst, W. (1995).** The role of the apoplasto in aluminium toxicity and resistance of higher plants: a review. *Zetschrift fur Pflanzenernährung and Bodenkunde* 158:419-428.
- Iestwaart, JH., Griffioen, W.A.J., & Ernst, W.H.O (1992).** Seasonality of VAM infection in three populations of *Agrostis capillaris* (Gramineae) on soil with or without heavy metal enrichment. *Plant and Soil* 39:67-73.
- Inouhe, M., Ninomiya, S., Tohoyama, H., Joho M & Murayama, T.(1994).** Different characteristics of root in the cadmiun-tolerance and Cd-binding complex formation between monocotyledonous and cotiledonous plant. *Journal of Plants Research* 107:201-207.
- Inouhe, M., Tohoyama, H., Joho M & Murayama, T. (1992).** Changes in cell wall and cytoplasmic components in plants in response to heavy metal ions. Plant cell walls as biopolymers whit physiological functions. Yamada Science Fundation, Osaka, pp 407-409.
- Jeffries, P (1995).** Biology and Ecology of mycoparasitism. *Can. J. Bot.* 73:1284-1290.
- Jeffries P & Barea, J.M. (1994).** Biogeochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainability of plant-soil systems. In Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. Edited by S. Gianinazzi and H. Schüepp. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 101-115
- Jeffries, P & Barea, J.M.(2001)** Arbuscular Mycorrhiza – a Key Component of Sustainable Plant-Soil Ecosystems. The Mycota IX Fungal Associations. Hock (Ed.). Springer-Verlang Berlin Heidelberg.
- Jeffries, P., Craven-Griffiths, A., Barea, J. M., Levy, Y., & Dodd, J. C. 2002** Application of arbuscular mycorrhizal fungi in the revegetation of desertified Mediterranean ecosystem. In S. Gianinazzi, H. Schüepp, J. M. Barea, K.



- Haselwandter (Ed.), *Mycorrhiza Technology in Agriculture, from Genes to Bioproducts* (pp. 151-174). Heidelberg, Germany: ALS, Birkh.,user Verlag.
- Jeng, A.S. & Bergseth, H. (1992).** Chemical and mineralogical properties of Norwegian alum shale soils, with special emphasis on heavy metals content and availability. *Act Agricultural Scandinavian B.* 42:88-93.
- Joho, M., Imai, M. & Murayama, T. (1985).** Different distribution of Cd +2 between Cd sensitive and Cd-resistant strains of *Sacharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 131:53-56.
- Joner, E.J., Briones, R., Leyval, C. (2001).** Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226:227-234.
- Joner E.J. & Leyval C. (1997).** Uptake <sup>109</sup> Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae* /*Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil and amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytology* 135:353-360.
- Jones PCT, Mollinson JE (1948)** A technique for the quantitative estimation of soil micro-organisms. *J Gen Microbiol* 2:54-69.
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA (1997)** Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol* 135:575-586.
- Juste, C & Mench, M. (1992)** Long term application of sewage sludge and its effects on metal uptake by crops. *Biogeochemistry of Trace Metals: Advances in Trace Substances Research.* Adriano, D. C. (Ed) pp. 159-193. Lewis, Boca Raton Florida.
- Kádár, I. (1995).** Contamination of the soil-plant-animal-man foodchain by chemical elements in Hungary. (In Hungarian) Ministry of Environmental Protection and Land Management. Budapest.
- Kaldorf, M., Kuhn, A.J., Schröder, W.H, Hildebrandt, U., and Bothe, H. (1999).** Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *J. Plant Physiol.* 154:718-728.
- Kanazawa, S., and Mori, K. (1996).** Isolation of cadmium-resistant bacteria and their resistance mechanisms. Part 1. Isolation of Cd-resistant bacteria from soils contaminated with heavy metals. *Soil Sci. Plant Nutr.* 42:725-730.
- Kempf, B & Bremer, E. (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170:319-330.
- Kempf, B & Bremer, E. (2001).** Water-Deficient Environments. *Enc. Microbiol.* 2<sup>o</sup> Edition. Vol. 4. Academic Press. pp. 884-897.

- Kennedy, A.C. (1998).** The rhizosphere and spermosphere. Principles and applications of soil microbiology. Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (eds). Prentice Hall, UpperSaddle River, New Jersey, pp 389-407.
- Kennedy, A.C & Smith, K.L. (1995).** Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil* 170:75-86.
- Kloepper J.W. (1992).** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. Applications in Agriculture Forestry and Environmental Management. F Blaine, J Jr. Metting (Eds). Marcel Dekker, New York. pp. 255-274.
- Kloepper J.W. (1993).** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. Soil Microbiology Ecology. FBJ Metting (Ed.) Marcel Dekker, New York. pp. 255-274.
- Kloepper J.W. (1994).** Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems) In: Okon Y (ed) *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, Boca Raton, pp 111-118
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R & Zablutowicz, R.M. (1989).** Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7:39-43.
- Kloepper, J.W., Zablutowicz, R.M., Tipping, E.M., Lifshitz R. (1991).** Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Keister D.L. and P.B. Cregan (eds). The rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Koske, I., Gemma, J.N. (1989).** A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research* 92:486-505.
- Köves-Péchy K, Biró B, Vörös I, Takács T, Osztoics E, Strasser RJ. (1999).** Enhanced activity of microsymbiont-host systems probed by the OJIP test. In: Photosynthesis: Mechanism and Effects. (Ed. Garab, G.) Vol. 4: 2765-2770. Kluwer Academic Publishers.
- Krämer U, Smith RD, Wercel WW, Raskin I, Salt DE. (1997).** The role of metals transporter and tolerance in Ni hyperaccumulation by *Thlaspi geosingense*. *Pl. Physiol.* 115:1641-1650.
- Lachica M, Aguilar A, Yañez J (1973)** Análisis foliar, métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín. *Anal Edafol Agrobiol* 32:1033-1047.
- Landberg, T. & Greger, M. (1997).** Use of willow with high cadmium accumulations properties in soil purification. En: Proceeding of the 3rd international conference on the biochemistry of trace elements, 15-20 May, (1995), Paris.

- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, New York, pp 115-147.
- Leyval, C., Joner, E.J., del Val, C., Haselwandter, K. (2002). Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. 175-186. Eds: S.Gianinazi. Birkhäuser-Verlag.
- Leyval, C., Singh, B.R & Joner, E.J. (1995). Occurrence and infectivity of arbuscular Mycorrhizal fungi in some Norwegian soils influenced by heavy metals and soil properties. *Water Air Soil Pollution*. 84:203-216.
- Leyval, C., Turnau, K., and Haselwandter, K. (1997). Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7:139-153.
- Leyval C., & Weissenhorn, I. (1996). Tolerance to metals of arbuscular Mycorrhizal fungi from heavy metals polluted soils. A summary of results, En: *Mycorrhizae in Integrated Systems, from Genes to Plant Development*. (Eds. Azcon -Aguilar C & Barea J.M). European Commission, Luxemburg, pp. 452-454.
- Li, X.L.; Christie, P. (2001) Changes in soil solution Zn and pH and uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal red clover in Zn-contaminated soil *Chemosphere* 42:201-207.
- Li, Y.J.; Kandasamy, M.K.; Meagher, R.B. (2001) Rapid isolation of monoclonal antibodies. Monitoring enzymes in the phytochelatin synthesis pathway *Plant Physiology* 127:711-719.
- Linderman, R.G. (1988). Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78:366-371.
- Linderman, R.G. (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. Edited by G.J. Bethlenfalvay and R.G. Linderman. ASA Special Publication, Madison, pp. 65-77.
- Linderman, R.G. (1994). Role of VAM fungi in biocontrol. In *Mycorrhizae and Plant Health*. Edited by F.L. Pflieger and R.G. Linderman. APS Press, St. Paul, MN. pp. 1-26.
- Linderman RG (2001). Effects of mycorrhiza on plant tolerance to diseases. En: *Arbuscular Mycorrhizal: Physiology and Function*. Y Kalpuncnick (Ed). Kluwer Academic. Pp. 345-365.

- Lim HS, Kim YS, Kim SD (1991).** *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Environm. Microbiol.* 57:510-516.
- Long SP, Hallgren JE (1987)** Measurements of CO<sub>2</sub> assimilation by plants in the field and the laboratory. In: Coombs J, Hall DO, Long SP, Scurlock JMO (eds) *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*, 2nd Ed, Pergamon Press, Oxford, pp 62-94
- López-Bermúdez & Albaladejo (1990).** Factores ambientales de la degradación del suelo en el área Mediterránea. Albaladejo J, Stocking MA, Diaz E (Eds). *Soil degradation and rehabilitation in mediterranean environmental conditions.* CSIC, Murcia, pp 15-45
- Loth, F. G & Hofner, W. (1995).** Influence of VA-mycorrhiza on heavy metal uptake of oat (*Avena sativa* L.) from soils differing in heavy metals contaminations. *Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde.* 158:339-345.
- Lynch, JM (1990).** *The Rhizosphere.* John Wiley (Ed). New York. 258 p
- Maccari G. Cicardi C., Ceccanti B y Masciandaro G (1994)** A biochemical study in a microcosmos of a soil exposed to high levels of SO. *Geomicrobiol J.* 11:317-323.
- Maldonado-Mendoza, I.E., Dewbre. G,R., Harrison, M.J. (2001).** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant –Microbe Interactions.* 1140-1148.
- Markert, B (1994).** Plants as biomonitors. Potential advantages and problems. *Biogeochemistry of trace elements.* Adriano DC, Chen ZS, Yang SS (eds) pp601-613: Science and Technology Letters, Northwood. New York.
- Marulanda A., Vivas A., Vassileva, M & Azcón R. (2002).** Interactive effect of suspension or encapsulated inoculum of *Bacillus thuringiensis* associated with arbuscular Mycorrhizal fungus on plant growth responses and Mycorrhizal inoculum potential. *Symbiosis*, 33:23-38.
- Marsh, B.A.B (1971).** Measurements of length in random arrangements of lines. *Journal of Applied Ecology* 8:265-268.
- Marshner, H (1995).** *Mineral Nutrition of higher plants.* Second edition. Academic Press, London. 889 pp.
- Marschner, H. (1998).** Role of root growth arbuscular mycorrhiza and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. *Field Crops Re.* 56:203-207.

- Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T., and Yamazawa, A. (1999). Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *J. Biotechnol.* 70: 33-38.
- McGee, P.A (1987). Alteration of growth of *Solanum opacum* and *Plantago drumondii* and inhibition of regrowth of hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi from dried root pieces by Mn. *Plant and Soil* 101:227-233.
- McGrath, S.P., Brookes, P.C. & Giller, K. E. (1998). Effects of potentially toxic elements in soil derived from past application of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens*. *Soil Biology and Biochem* 20:415-424.
- McGrath, S.P., Chaudri, A.M., and Giller, K.E. (1995). Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *J. Ind. Microbiol.* 14:94-104.
- Medina, A., Probanza, A., Gutierrez Mañero, F.J., Azcón, R. (2003). Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effects on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). *Appl. Soil Ecol.* 22:15-28.
- Merharg AA & Cairney JWG (2001). Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their host to metal-contaminated environments. *Advances in Ecological research* 30:69-112.
- Meyer, J.R., and Linderman, R.G. (1986). Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungia and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol. Biochem.* 18:185-190.
- Michiels K, VanderLeyden J, Van Gool A.(1989). *Azospirillum*-plant root associations: A review. *Biol. Fert. Soils* 8:356-368.
- Millar, K. J & Wood, J.M. (1996). Osmoadaptation of rhizosphere bacteria. *Annual Review of Microbiology* 50:101-136.
- Miller, M.H. 2000 Arbuscular mycorrhizae and the phosphorus nutrition of maize: A review of Guelph studies *Canadian Journal of Plant Science* 80:47-52.
- Miller, R.M., and Jastrow, J.D. (1992). The application of VA mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation. In *Mycorrhizal Functioning*. Edited by M.A. Allen. Chapman and Hall, New York, pp. 488-517
- Miller RM & Jastrow JD 1994 Vesicular-arbuscular mycorrhizae and biogeochemical cycling. I Pflieger FL, Linderman RG (eds) *Mycorrhizae and plant health*. APS Press, St. Paul, MN, 189-212

- Miller, RM & Jastrow, J. D. (2000) Mycorrhizal fungi influence soil structure In: Arbuscular mycorrhizas: physiology and functions (Eds. Y. Kapulnick, D. D. Douds Jr.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 3-18
- Miller, R.M., Jastrow, J.D. (2001). Mycorrhizal fungi influence soil structure. Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function, Kapulnik & Douds eds. 3-18.
- Miller R. M. & Lodge, D. J. (1997). Fungal responses to disturbance: agriculture and forestry. En The Mycota IV Environmental and Microbial Relationships (Wicklow & Söderström. Eds). Springer-Verlang, Berlin, Heidelberg.
- Morton, J.B., Benny, G.L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae, with an emendation of glomaceae. *Mycotaxon* 37:471-491.
- Mosse (1962). The establishment of vesicular arbuscular mycorrhizae under aseptic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 27:509-520.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Conti, C & Bianchi, C. (1982). Hydrolases extracted from soil: their properties and activities. *Soil biology and Biochem.* 14:257-263.
- Nannipieri, P., Grego S & Ceccanti, B (1990). Ecological significance of the biological activity in soils. *Soil Biochemistry*, Vol 6 (J.M. Bollang and Stotszky Eds). New York: Marcel Dekker, pp. 293-355.
- Naseby DC, Pascual JA, Linch JM (1999). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Phytophthora ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzymes activities. *J. Appl. Microbiol.*
- Nau-Wagner, G., Boch J., Le Good J.A & Bremer E. (1999). High affinity transport of choline  $\alpha$ -sulphate and its use as a compatible solute in *B. subtilis*. *Appl. Environm. Microbiol.*
- Nehl, DB, Allen SJ, Brown JF (1996). Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Appl. Soil. Ecol.* 5:1-20.
- Newman E (1966) A method of estimating the total length of root in a sample. *J App Ecol* 3:139-145.
- Okon Y & Labandera-Gonzalez CA (1994). Agronomic applications of *Azospirillum* Improving Plant productivity with rhizosphere bacteria. MY Ryder, PM Stephens, GD Bowen (Eds). Australia. Pp.267-274

- Olsen, S.R & Dean, L.A. (1965). Phosphorus. In *Methods of Soil Chemical Analysis*, Part 2. Edited by C.A. Black, D.D. Evans, J.L. White, L.E. Ensminger, F.E. Clark, and R.C. Dinauer. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 1035-1049.
- Olsson PA & Johansen A (2001) Lipid and fatty acid composition of hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi at different growth stages. *Mycol Res* 104:429-434.
- Padan E & Krulwich, T.A (2001). Sodium Stress. In: *Bacterial Stress Responses*. Storz, G & Hengge-Aronis (Eds). ASM Press, Washington, D.C.
- Palomino MR, (2003). *Ecología Microbiana en la rizosfera: Estudios de Sucesion, Diversidad, Dinamicas Poblacionales y Perturbaciones en el sistema*. Tesis Doctoral. Universidad San Pablo CEU.
- Pang PC, Paul EA (1980) Effects of vesicular arbuscular mycorrhiza on C14 and N15 distribution in nodulated fababeans. *Can J Soil* 60:241-250.
- Patten CL, Glick BR (1996). Bacterial biosynthesis of indole 3 acid acetic. *Can. J. Microbiol.* 42:207-220.
- Pérez-Solís Estefanía (2001). *Prospección y aplicación de Micorrizas en especies vegetales autoctonas del matorral, para favorecer la revegetacion de ecosistemas mediterraneos degradados*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Brit Mycol Soc* 55:159-161.
- Postgate, J. (1998). *Nitrogen Fixation*. Third Edition Cambridge University Press
- Ponchon, J & Tardieux, P. (1962). *Tecnicas D'analyse En Microbiologie Du Sol*. Editions De La Tourelle. St. Mandé.
- Probanza, A., Lucas, J.A., Acero, N., and Gutierrez Mañero, F.J. (1996). The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* L.) growth. I. Characterization of growth promoting and growth inhibiting bacterial strains. *Plant Soil* 182:59-66.
- Probanza, A., Lucas Garcia, J.A. Ruiz Palomino M., Ramos, B. & Gutierrez Mañero, F.J. (2002) *Pinus pinea* L. Seedling growth and bacterial rhizosphere structure alter inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumillus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology*, 20:75-84.
- Puppi, G., Azcón, R., and Höflich, G. (1994). Management of positive interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with essential groups of soil microorganisms. In *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural*

- Ecosystems. Edited by S. Gianinazzi and H. Schüepp. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 201-215.
- Ravnskov, S.; Larsen, J.; Olsson, P.A.; Jakobsen, I. 1999 Effects of various organic compounds growth and phosphorus uptake of an arbuscular mycorrhizal fungus *New Phytologist* 141:517-524.
- Requena, N., Füllner, P., and Franken, P. (1999). Molecular characterization of GmFOX2, an evolutionarily highly conserved gene from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*, down-regulated during interactions with rhizobacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:934-942.
- Requena N, Jimenez I, Toro M, Barea JM (1997) Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in Mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytol* 136:667-677.
- Requena, N., Perez-Solis, E., Azcón-Aguilar, C., Jeffries, P., Barea, J.M. (2001). Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 67:495-498.
- Ruiz-Lozano JM (2003). Arbuscular Mycorrhiza symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza in Press*
- Ruiz-Lozano JM, Azcón R (1996) Viability and infectivity of mycorrhizal spores after long term storage in soils with different water potentials. *Appl Soil Ecol* 3:183-186.
- Ruiz-Lozano JM, Azcón R (1997) Effect of calcium application on the tolerance of mycorrhizal lettuce plants to polyethylene glycol-induced water stress. *Symbiosis* 23:9-22.
- Ruiz-Lozano, J.M., and Azcón, R. (2001). Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. *Mycorrhiza* 10:137-143.
- Ruiz-Lozano JM, Azcón R, Gómez M (1995)a Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: Physiological and nutritional plant responses. *Appl Environ Microbiol* 61:456-460.
- Safir GR, Boyer JS, Gerderman JW (1971) Mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Science* 172:581-583.
- Salt, D.E., Kato, N., Krämer, U., Smith, R.D. and Raskin, I. (2001). The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance on accumulator and



- nonaccumulator species of *Thlaspi*. In Phytoremediation of contaminated soil and water. Edited by N. Terry, G. Banuelos. CRC Press LLC, pp. 189-200.
- Saring S, Blum A, Okon Y (1988)**. Improvement of the water status and yield of field-grown sorghum by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *J. Agr. Sci. Camb.* 110:271-277.
- Shetty KG, Hetrick B, Figge D, AP Schwab 1994** Effects of Mycorrhizae and Other Soil Microbes on Revegetation of Heavy Metal Contaminated Mine Spoil *Environmental Pollution* 86:181-188.
- Schüßler, A. (2002)**. Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244:75-83.
- Schüßler, A.; Gehrig, H.; Schwarzott, D.; Walker, C. (2001)** Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny *Mycological Research* 105:5-15.
- Schüßler, A.; Schwarzott, D.; Walker, C. (2001)** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution *Mycological Research* 105:1413-1421.
- Sieverding, E. (1991)** Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. GTZ, Eschborn, Germany pp. 371
- Skujin J. & Allen MF. (1986)**. Use of mycorrhizae for land rehabilitation. *Mircen J* 2:161-176.
- Smith, T. F. 1980** The effect of season and crop rotation on the abundance of spores of vesicular arbuscular Va mycorrhizal endophytes. *Plant Soil* 57:475-479.
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V (1990)** Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. Effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Aust J Plant Physiol* 17:177-188.
- Smith, F.A.; Jakobsen, I.; Smith, S.E. (2000)** Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula* *New Phytologist* 147:357-366.
- Smith, F.A, Jackobsen, I, Smith, S.E. (2001)** Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 147:357-366.
- Smith, S.E., and Read, D.J. (1997)**. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. New York.

- Smith, Sbrana, C.; Logi, C. 1988 Microchambers and video-enhanced light microscopy for monitoring cellular events in living hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi *Plant and Soil* 226:153-159.
- Smith FA & Smith SE (1996) Mutualism and parasitism: Diversity in function and structure in the "arbuscular" (VA) mycorrhizal symbiosis. *Adv Bot Res* 22:1-43.
- Suossi M., Santamaria M., Ocaña A & Lluch C. (2001). Effects of salinity on protein and lipopolisaccharide pattern in a salt-tolerant strain of *Mesorhizobium ciceri*. *Journal of Applied microbial.* 90:476-481.
- Takács, T., Biró, B., and Vörös, I. (2001). Arbuscular mycorrhizal effect on heavy metal uptake of ryegrass (*Lolium perenne* L.) in pot culture with polluted soils. In Plant Nutrition - Food Security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research. Edited by W.J. Horst. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 480-481.
- Tang, WH (1994). Yield increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheat blight of rice. Improving Plant productivity with rhizosphere bacteria. MY Ryder, PM Stephens, GD Bowen (Eds). Australia. Pp.267-274
- Tinker, P. B. (1980) Role of rhizosphere microorganisms in phosphorus uptake by plants The role of phosphorus in Agriculture 617-654
- Tinker PB, Durall DM, Jones MD (1994) Carbon use efficiency in mycorrhizas: Theory and sample calculations *New Phytol* 128:115-122.
- Tisserant B, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Golotte A (1993) In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycol Res* 97:245-250.
- Tobar. R., Azcón, R., Barea, J.M. (1994). Improved nitrogen uptake and transport from <sup>15</sup>Nlabellednitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytologist* 126: 119-122.
- Toro, M.; Azcón, R.; Barea, J.M. (1997) Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (P-32) and nutrient cycling *Applied and Environmental Microbiology* 63: 11 (NOV 1997) 4408-4412
- Toro, M.; Azcon, R.; Barea, J.M. 1998 The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of Rhizobium genotype, mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa* *New Phytologist* 138:265-273.

- Toyoda & Utzami, (1991).** Method for the prevention of *Fusarium* diseases and microorganisms used for the same. U.S. patent. No. 4 988 538
- Tsang, A.; Maun, M.A. (1999)** Mycorrhizal fungi increase salt tolerance of *Strophostyles helvola* in coastal foredunes *Plant Ecology* 144:159-166.
- Turnau Berreck, M. (2002)** Accumulation of radionuclides in fungi Metal Ions in Fungi (Eds. G. Winkelman and D.R. Winge) Marcel Dekker, New York. 259-277
- Turnau & Dexheimer (1995)** Acid phosphatase activity in *Pisolithus arrhizus* mycelium treated with cadmium dust. *Mycorrhiza* 5:205-211.
- Turnau, K., Haselwandter, K. (2002)** Arbuscular mycorrhizal fungi, an essential component of soil microflora in ecosystem restoration. In S. Gianinazzi, H. Schöpp, J. M. Barea, K. Haselwandter (Ed.), *Mycorrhiza Technology in Agriculture, from Genes to Bioproducts* (pp. 137-149). Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag.
- Turnau, K., Kottke, I., Oberwinkler, F. (1993)** Element localization in mycorrhizal roots of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn collected from experimental plots treated with cadmium dust. *New Phytol* 123:313-324.
- Turnau, K.; Ryszka, P.; GianinazziPearson, V.; vanTuinen, D. 2001** Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland *Mycorrhiza* 10:169-174.
- Tuzun S & Klopper J (1994).** Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. Improving Plant productivity with rhizosphere bacteria. MY Ryder, PM Stephens, GD Bowen (Eds). Australia. Pp.267-274
- Trouvelot A, Fardeau JC, Plenchedt C, Gianinazzi S (1986)** Nutritional balance and symbiotic expression in mycorrhizal wheat. *Physl Veget* 24:300
- Vallejo, V.R., Bautista, S., Cortina, J., 1999** Restoration for soil protection after disturbances. In: Trabaud, L. (Ed.), *Life and Environment in Mediterranean Ecosystems. Advances in Ecological Sciences.* Wit Press, Wessex, pp. 301-343.
- Vassileva M, Vassileva N, Azcón R (1998).** Rock phosphate solubilization by *Aspergillus Níger* on olive cake-based médium and its further applications. *Word J. Microbiol. Biotechnology.* 14:281-284.
- Vidal, M. T., Azcón-Aguilar, C. y Barea J. M. (1996).** Effect of heavy metals (Zn, Cd and Cu) on arbuscular mycorrhiza formation. In: *Mycorrhizas in Integrated Systems. From Genes to Plant Development* (Eds. C. Azcón-Aguilar y J. M. Barea) COST 821 Bruselas. pp. 487-490. ISBN: 92-827-5676-9.

- Vivas, A., Vörös I, Biró, B., Campos E, J.M., Barea, J.M., Azcón, R. (2003). Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular Mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environmental Pollution* 126:179-189.
- Vivas, A., Vörös I, Biró, B., Barea, J.M, Ruiz-Lozano, J.M., Azcón, R. (2003). Beneficial effects of indigenous Cd-tolerant and Cd-sensitive *Glomus mosseae* associated with a Cd-adapted strain of *Brevibacillus* sp. in improving plant tolerance to Cd contamination. *Applied Soil Ecology* 24:177-186.
- Vivas, A., Marulanda, A., Ruiz-Lozano, J.M., Barea, J.M., Azcón, R. (2003) Influence of a *Bacillus* sp. on the physiological activities (SDH and ALP) of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. *Mycorrhiza* (In press).
- Vosatka, M.; Gryndler, M. 1999 Treatment with culture fractions from *Pseudomonas putida* modifies the development of *Glomus fistulosum* mycorrhiza and the response of potato and maize plants to inoculation *Applied Soil Ecology* 11:245-251.
- Vörös I, Biró, B., Takács, T., Köves-Péchy K, Bujtas K. (2001). Effects of arbuscular Mycorrhizal fungi on heavy metals toxicity to *Trifolium pratense* in soils contaminated with Cd, Zn and Ni salts. *Agrokémia és Talajtan* 47:277-288.
- Weissenhorn, I & Leyval, C. (1994). Cd-tolerant arbuscular, Mycorrhizal fungi from heavy metals polluted soils. *Plant Soil*. 157:247-256.
- Weissenhorn, I., & Leyval, C (1995). Root colonization of maize by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. *Plant Soil* 175:233-238.
- Weissenhorn K, C Leyval, G Belgy, J Berthelin (1995) Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy metal uptake by maize (*zea mays* L) in pot culture with contaminated soil *Mycorrhiza* 5:245-251.
- Weissenhorn M Mench I, C Leyval (1995) Bioavailability of heavy metals and arbuscular mycorrhiza in a sewage-sludge-amended sandy soil *Soil Biology & Biochemistry* 27:287-296.
- Weller, D.M & Thomashow, L.S (1994). Current challenges in introducing beneficial microorganisms in the rhizosphere. In *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs*. Edited by F. O'Gara, D.N. Dowling, and B. Boesten. VCH Verlagsgesellschaft, Winheim, pp. 1-13.

- Wilson, JM (1984)** Comparative development of infection by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 97:413-426.
- Wilkinson DM, NM Dickinson 1995** Metal Resistance in Trees: The Role of Mycorrhizae *Oikos* 72:298-300.
- Wöhler, I. (1997).** Auxin-indole derivatives in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. *Microbiol. Res.* 152:399-405.
- Wright, D.P., Scholes, J.D., Read, D.J. (1998).** Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* 21:209-216.
- Wyss, P., Boller, T., Wiemken, A. (1992)** Testing the effect of biological control agents on the formation of vesicular arbuscular mycorrhiza. *Plant Soil* 147:159-162.
- Zimmer W, Roeben K, Bothe H (1988).** The interaction between the N<sub>2</sub>-fixing bacterium *Azospirillum* and wheat. In Nitrogen fixation: Hundred years after. H. Bothe, FJ de Bruijn, WE Newton (Eds). Proc. Of the 7th Int. Congr. On nitrogen fixation. Fischer, Stuttgart, New York. Pp. 776.