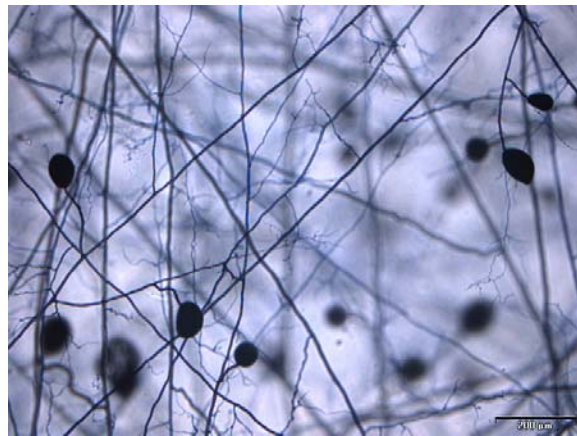




**Estudio de la interacción entre inoculantes
microbianos y residuos agroindustriales
biotransformados para su uso en
estrategias de revegetación y
bioremediación**



Almudena Medina Peñafiel

Granada 2006

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Departamento de Microbiología



**Estudio de la interacción entre inoculantes
microbianos y residuos agroindustriales
biotransformados para su uso en estrategias de
revegetación y bioremediación**

Tesis Doctoral

Almudena Medina Peñafiel

Granada, 2006

**Estudio de la interacción entre inoculantes
microbianos y residuos agroindustriales
biotransformados para su uso en estrategias de
revegetación y bioremediación**

**Memoria que presenta la Licenciada
Almudena Medina Peñafiel
para optar al grado de Doctor.**

Fdo.: Almudena Medina Peñafiel

**Vº Bº
Director del trabajo**

**Fdo.: Dr. Rosario Azcón González de Aguilar
Profesora 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 Junta de Andalucía

INDICE

I. RESUMEN

II. INTRODUCCIÓN

1. INTERÉS Y OBJETIVOS

2. REVISIÓN DE LOS ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. Conceptos generales sobre “calidad del suelo”

2.2. Concepto y significado de la rizosfera

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

2.4. Micorrizas arbusculares

2.4.1. *Conceptos generales sobre micorrizas*

2.4.2. *Formación y morfología*

2.4.3. *Efecto de las MA sobre el desarrollo de las plantas*

2.5. Microorganismos solubilizadores de fosfato

2.5.1. *El ciclo del fósforo en el suelo.*

2.5.2. *Microorganismos solubilizadores de fosfato de roca.*

2.6. Microorganismos solubilizadores de fosfato de roca y micorrizas

3. ENMIENDAS ORGÁNICAS

3.1. Utilización de residuos agroindustriales como enmienda orgánica.

3.2. Componentes y degradación bioquímica de los residuos agrindustriales utilizados (residuo de azúcar de remolacha y alpeorujó).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS RESIDUOS Y FERMENTADOS UTILIZADOS

2. CARACTERÍSTICAS DEL SUELO EMPLEADO EN LOS ENSAYOS

2.1. Características del suelo empleado en los ensayos del capítulo de interacción entre inoculantes microbianos y enmiendas en revegetación.

2.2. Características del suelo empleado en los ensayos del capítulo de interacción entre inoculantes microbianos y enmiendas en bioremediación.

2.3. Características del suelo empleado en el ensayo de sistemas compartimentados en capítulo de interacción entre hongos MA y enmienda en sistemas compartimentados.

3. PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL RESIDUO AGROINDUSTRIAL
4. PREPARACIÓN Y APLICACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA
5. PLANTAS HOSPEDADORAS
 - 5.1 Esterilización de semillas
 - 5.2. Germinación de semillas
6. INOCULACIÓN MICROBIANA
 - 6.1. Inóculo micorrícico
 - 6.1.1. *Características del inóculo MA empleado en los ensayos efectuados*
 - 6.1.1.1. Ensayos de revegetación
 - 6.1.1.2. Ensayos de biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.
 - 6.1.1.3. Ensayo de interacción en sistema compartimentados en suelo.
 - 6.1.2. *Obtención de esporas y esporocarpos de hongos MA mediante la técnica del tamizado húmedo y decantación.*
 - 6.1.3. *Producción de inóculo micorrícico*
 - 6.2. Inoculación de *Yarrowia lipolytica*
 - 6.3. Inoculación de *Rhizobium*
7. CONDICIONES EXPERIMENTALES DE CRECIMIENTO
8. DETERMINACIONES DE CRECIMIENTO, PARÁMETROS SIMBIÓTICOS Y ESTADO NUTRICIONAL DE LA PLANTA
 - 8.1. Tinción de raíces
 - 8.1.1. *Tinción de raíces con Azul tripán*
 - 8.1.2. *Tinción vital de raíces (succinato deshidrogenasa, SDH)*
 - 8.2. Estimación de la colonización micorrícica según el método de Trouvelot
9. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES Y PROLINA EN PARTE AÉREA DE LA PLANTA.
10. DETERMINACIONES EN SUELO
 - 10.1. Determinación de la capacidad de campo y del punto de marchitamiento según el método de la membrana de Richards
 - 10.2. Determinación de pH y conductividad eléctrica
 - 10.3. Determinación de carbono hidrosoluble y carbohidratos hidrosolubles
 - 10.4. Determinación de estabilidad de agregados estables del suelo al impacto de una lluvia artificial de energía conocida.

- 10.5. Determinación de actividades enzimáticas en suelo
- 10.6. Determinación de Ácido Indol Acético (AIA) rizosférico
- 10.7. Determinación de longitud de micelio MA extraradical en suelo
- 10.8. Análisis de ácidos grasos en suelo
- 11. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS MONOXÉNICOS
- 11.1. Composición del medio M para el cultivo monoxénico de los hongos micorrícicos.
- 11.2. Cuantificación de la longitud de micelio MA extraradical, número de BAS y esporas en cultivo monoxénico
- 12. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DEL RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO AL ESPECTRÓMETRO DE MASA (CG/EM)
- 12.1. Preparación de las muestras para inyección en CG/EM

IV. INTERACCIÓN DE INOCULANTES MICROBIANOS Y RESIDUOS AGROINDUSTRIALES BIOTRANSFORMADOS EN REVEGETACIÓN

IV. 1. Introducción

- 1. INTRODUCCIÓN A LA PROBLEMÁTICA DE LOS ECOSISTEMAS MEDITERRÁNEOS. JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES.
- 2. SIGNIFICADO DE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO EN UN PROCESO DE REVEGETACIÓN.
- 2.1. Aplicación de los hongos MA en revegetación.
- 3. SIGNIFICADO DE LAS ENMIENDAS ORGÁNICAS EN UN PROCESO DE REVEGETACIÓN.
- 3.1. Principales funciones de la materia orgánica en el suelo.
- 3.2. Utilización de residuos agroindustriales biotransformados con fines de revegetación.
- 4. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS COMO ÍNDICE DE RECUPERACIÓN DEL SUELO

IV. 2. Parte experimental

- 1. INFLUENCIA DEL RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA (SB) SOBRE CRECIMIENTO DE *TRIFOLIUM REPENS*
- 1.1. Objetivo.
- 1.2. Condiciones experimentales
- 1.3. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

- 1.4. Diseño experimental
- 1.5. Análisis estadístico de los resultados
- 1.6. Resultados.
2. ESTUDIO DIFERENCIAL DE LA APLICACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO O DEL RESIDUO SÓLIDO DE AZÚCAR DE REMOLACHA (FERMENTADO CON *A. niger* O SIN FERMENTAR) SOBRE CRECIMIENTO DE *Trifolium repens* y su interacción con los hongos MA autóctonos
 - 2.1. Objetivo.
 - 2.2. Condiciones experimentales
 - 2.3. Preparación del extracto acuoso y aplicación de los residuos sólidos y acuosos.
 - 2.4. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos
 - 2.5. Diseño experimental
 - 2.6. Análisis estadístico de los resultados
 - 2.7. Resultados
3. EFECTO DE BIOFERMENTADOS, HONGOS MA NATIVOS Y LA LEVADURA *YAROWIA LIPOLYTICA* SOBRE EL DESARROLLO DE *DORYCNIUM PENTAPHYLUM* Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL SUELO.
 - 3.1. Objetivo
 - 3.2. Diseño experimental
 - 3.3. Condiciones experimentales
 - 3.4. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos
 - 3.5. Determinaciones
 - 3.6. Análisis estadístico de los resultados
 - 3.7. Resultados
4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD INFECTIVA y efectividad DE cada uno de los HONGOS AUTÓCTONOS AISLADOS DE MURCIA en *DORYCNIUM PENTAPHYLUM*
 - 4.1. Objetivo
 - 4.2. Condiciones experimentales
 - 4.3. Diseño experimental
 - 4.4. Determinaciones
 - 4.5. Análisis estadístico de los resultados
 - 4.6. Resultados

5. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE HONGOS MA AUTÓCTONOS Y ALPEORUJO, TRATADO MICROBIOLÓGICAMENTE CON *PHANEROCHAETE CRYSPORUM*, SOBRE EL CRECIMIENTO DE *DORYCNIUM PENTAPHYLLUM* EN SUELO NATURAL PROVISTO DE SU MICROBIOTA HABITUAL.
 - 5.1. Objetivo
 - 5.2. Diseño experimental
 - 5.3. Condiciones experimentales
 - 5.4. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos
 - 5.5. Determinaciones
 - 5.6. Resultados
6. INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DEL RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA SOBRE EL AGUA DISPONIBLE DEL SUELO
 - 6.1. Objetivo
 - 6.2. Diseño experimental
 - 6.3. Determinaciones
 - 6.4. Análisis estadístico de los resultados
 - 6.5. Resultados
7. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE HONGOS MA AUTÓCTONOS seleccionados Y RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA TRATADO MICROBIOLÓGICAMENTE CON *ASPERGILLUS NIGER* SOBRE EL CRECIMIENTO DE *TRIFOLIUM REPENS* EN SUELO NATURAL A DIFERENTES NIVELES HÍDRICOS
 - 7.1. Objetivo
 - 7.2. Diseño experimental
 - 7.3. Condiciones experimentales
 - 7.4. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos
 - 7.5. Determinaciones
 - 7.6. Análisis estadístico de los resultados
 - 7.7. Resultados
8. SEGUIMIENTO A LO LARGO DEL TIEMPO DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE HONGOS MA AUTÓCTONOS Y ALPEORUJO (DOC) TRATADO MICROBIOLÓGICAMENTE CON *ASPERGILLUS NIGER* SOBRE EL CRECIMIENTO DE *TRIFOLIUM REPENS*.

- 8.1. Objetivo
- 8.2. Condiciones experimentales
- 8.3. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos
- 8.4. Diseño experimental
- 8.5. Determinaciones
- 8.6. Resultados

IV. 3. Discusión

IV. 4. Conclusiones

V. INTERACCIÓN DE INOCULANTES MICROBIANOS Y RESIDUOS AGROINDUSTRIALES BIOTRANSFORMADOS EN BIOREMEDIACIÓN

V. 1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN A LA PROBLEMÁTICA QUE PRESENTA LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS DE LOS ECOSISTEMAS DEGRADADOS. JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES.

2. METALES PESADOS COMO CONTAMINANTES DEL MEDIO AMBIENTE.

2.1. Técnicas de descontaminación/remediación.

2.1.1. *Fitoextracción.*

2.1.2. *Fitoestabilización*

3. MICORRIZAS EN SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS.

3.1 Tolerancia de los hongos MA a metales pesados.

3.2. Papel de los hongos MA en la protección de la planta a metales pesados y mecanismos involucrados.

4. RESTAURACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS.

4.1. Potencialidad del uso enmiendas orgánicas y hongos MA y en remediación.

V. 2. Parte experimental.

1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE CAPTACIÓN DE Zn Y Cd POR EL RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA (SIN TRATAR O FERMENTADO CON *Aspergillus niger*) y su EFECTO SOBRE los cambios en LA DISPONIBILIDAD DE Cd Y Zn EN SOLUCIÓN ACUOSA Y SUELO.

1.1. Objetivo.

1.2. EXPERIMENTO 1: Evaluación a lo largo del tiempo de la capacidad de retención de Cd por el biotransformado de azúcar de remolacha (a dos concentraciones) en solución acuosa.

1.2.1. *Condiciones experimentales*

1.2.2. *Resultados*

1.3. EXPERIMENTO 2: Estudio de la capacidad de retención de Cd y Zn por Aspergillus niger y por residuo de azúcar de remolacha (fermentado con A. niger y sin fermentar) y en solución acuosa.

1.3.1. *Condiciones experimentales*

1.3.2. *Resultados*

1.4. EXPERIMENTO 3: Estudio de la capacidad de retención de Cd y Zn en suelo por la aplicación residuo de azúcar de remolacha fermentado con Aspergillus niger (5 %).

1.4.1. *Condiciones experimentales*

1.4.2. *Resultados*

2. APLICACIÓN DEL RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA TRATADO CON *ASPERGILLUS NIGER* (SBA) Y *GLOMUS MOSSEAE* PARA MEJORAR EL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN DE *TRIFOLIUM REPENS* EN UN SUELO CONTAMINADO CON CD (5 $\mu\text{G CD G}^{-1}$ SUELO)

2.1. Objetivo

2.2. Proceso de fermentación del residuo agroindustrial

2.3. Condiciones experimentales.

2.4. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

2.5. Diseño experimental

2.6. Determinaciones

2.7. Análisis estadístico de los resultados

2.8. Resultados

3. APLICACIÓN DEL RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA TRATADO CON *ASPERGILLUS NIGER* (SBA) Y *GLOMUS MOSSEAE* PARA MEJORAR EL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN DE *TRIFOLIUM REPENS* EN UN SUELO CONTAMINADO CON Zn (600 $\mu\text{g Zn g}^{-1}$ SUELO)

3.1. Objetivo

3.2. Proceso de fermentación del residuo agroindustrial

3.3. Características del suelo y condiciones experimentales.

3.4. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

3.5. Diseño experimental

3.6. Determinaciones

3.7. Análisis estadístico de los resultados

3.8. Resultados

4. EFECTO DEL ALPEORUJO FERMENTADO CON *ASPERGILLUS NIGER* SOBRE LA DISPONIBILIDAD DE CD EN SUELO.

4.1. Objetivo.

4.2. Diseño experimental.

4.3. Resultados

5. EFECTIVIDAD DE *GLOMUS MOSSEAE* Y ALPEORUJO (TRATADO MICROBIOLÓGICAMENTE CON *ASPERGILLUS NIGER*) PARA MEJORAR EL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN DE *TRIFOLIUM REPENS* EN UN SUELO CONTAMINADOS CON CD.

5.1. Objetivo.

5.2. Proceso de fermentación del residuo agroindustrial

5.2. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

5.3. Características del suelo y condiciones experimentales

5.4. Diseño experimental

5.5. Determinaciones

5.6. Análisis estadístico de los resultados

5.7. Resultados

V. 3. Discusión

V. 4. Conclusiones

VI. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE INOCULANTES MICROBIANOS Y RESIDUOS AGROINDUSTRIALES BIOTRANSFORMADOS EN SISTEMAS COMPARTIMENTADOS

VI. 1. Introducción

1. LA COMUNIDAD MICROBIANA EN EL SUELO

2. EL MICELIO EXTRARADICAL DE LOS HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES.

3. INTERACCIONES ENTRE LOS HONGOS MA Y OTROS MICROORGANISMOS DEL SUELO

4. CULTIVOS MONOXÉNICOS

5. INFLUENCIA DE LA MATERIA ORGÁNICA SOBRE LOS HONGOS MA

VI. 2. Parte experimental

1. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA (FERMENTADO CON *A. NIGER* O SIN FERMENTAR) SOBRE EL DESARROLLO Y ACTIVIDAD DEL MICELIO EXTRARADICAL DEL HONGO

MA Y SOBRE LA BIOMASA DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS EN SUELO DE LA HIFOSFERA.

- 1.1. Objetivo.
 - 1.2. Diseño experimentales
 - 1.3. Características del suelo e inoculación con los hongos MA.
 - 1.4. Planta hospedadora y condiciones de crecimiento.
 - 1.5. Cosecha y análisis.
 - 1.6. Análisis estadístico de los resultados
 - 1.7. Resultados
2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA FERMENTADO CON *A.niger* O SIN FERMENTAR SOBRE EL DESARROLLO EXTRARADICAL DEL HONGO MA EN CULTIVO MONOXÉNICO.
- 2.1. Objetivo.
 - 2.2. Diseño experimentales
 - 2.3. Aplicación del fósforo radiactivo
 - 2.4. Determinaciones
 - 2.5. Análisis estadístico de los resultados
 - 2.6. Resultados
3. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTRÓMETRO DE MASAS (CG/EM) DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE LOS RESIDUOS DE AZÚCAR DE REMOLACHA (SB) Y AZÚCAR DE REMOLACHA FERMENTADO CON A. NIGER.
- 3.1. Objetivo.
 - 3.2. Determinaciones
 - 3.3. Resultados
- [VI. 3. Discusión](#)
- [VI. 4. Conclusiones](#)
- [VI. CONCLUSIONS](#)

I. RESUMEN

The aim of this Doctoral thesis is to provide a sustainable system either for revegetation or biorremediation purposes. This biotechnological approach consists on the inoculation of beneficial micro-organisms (mycorrhizal fungi (AM), P solubilizers,...) and the application to the soil of biotransformed organic wastes (sugar beet waste and dry olive cake).

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi play an essential role in plant phosphorus uptake and in sustaining a vegetation cover in desertification-threatened ecosystems. Besides, in metal polluted soils, mycorrhizal fungi are important for improving plant establishment, promoting plant growth and nutrition and reducing metal translocation to shoots, which alleviate metal toxicity.

The deterioration of biological properties of either degraded or metal contaminated soils is in part due to their progressive decrease in organic matter content. Thus, the application of appropriate levels of organic amendments may be a valid choice to improve soil characteristics.

Large quantities of agrowastes as dry olive cake (DOC) are produced during the extraction of oil from the olive fruit. This product poses serious environmental problems due to the phenolic part of the waste materials; on the other hand, sugar beet waste is a residue produced during sugar processing. Such materials, because of their lignocellulosic composition, can be used after biotransformation processes as organic amendments. One attractive approach is the fermentation of these materials by lignocellulolytic micro-organisms such as *Aspergillus niger* or *Phanerochaete chrysosporium*. In the transformation process, the organic wastes are broken down into simple sugars, which provide energy sources required for the growth and metabolic activity of soil heterotrophic micro-organisms.

In addition, when the wastes are supplemented with rock phosphate (RP), a solubilization of RP by P-solubilizers micro-organisms takes place. During their metabolism, P-solubilizers micro-organisms such as *A. niger* or *Yarrowia lipolytica* excrete organic acids that leads to a decrease of the pH and a solubilization of RP.

No information is available on the use of this biotechnological system for revegetation and biorremediation purposes.

In this Doctoral thesis we studied the influence of the inoculation of beneficial micro-organisms (AM fungi, *Rhizobium*, and *Yarrowia lipolytica*) and the application organic amendments on plant growth and nutrition as well as on soil biological and physico-chemical properties. Moreover, we studied the influence of the addition of treated sugar beet waste on soil microbial community and on AM mycelium growth, either in soil or in monoxenic cultures.

For the revegetation experiments, *Dorycnium pentaphyllum* was chosen as the test plant. *D. pentaphyllum* is a legume plant adapted to stress situations. The results showed that plant growth was enhanced by the addition of the organic amendments, especially, sugar beet waste fermented with *A. niger*. Similarly, nutrient uptake was increased in amended plants. Mycorrhiza was effective in increasing P, and the highest values were reached in mycorrhizal plants growing in treated SB waste amended soil. Indigenous AM fungi or *Rhizobium* were not able to colonize *Dorycnium* plants. For AM root colonization, the extra application of natural AM inoculum was required and infectivity was greatest with fermented DOC or SB. Similarly, the effect of native AM fungi inoculation on nodule formation was strongest in treated SB amended plants.

All enzymatic activities (dehydrogenase, β -glucosidase, phosphatase, urease, protease) increased in rizospheric soil of amended plants. Organic amendments increased water-soluble carbohydrates, water-soluble C and the percentage of stable aggregates, as well. These results indicate a recovery of soil fertility.

All these results show that lignocellulosic agrowastes treated with a selected micro-organism and its further interaction with beneficial microbial groups (native AM fungi and/or *Yarowia lipolytica*) is an useful tool to modify soil physico-chemical, biological and fertility properties that enhance the plant performance probably by making nutrients more available to plants. Thus, these treatments can be used as a valuable strategy in desertified areas.

Concerning the biorremediation experiments, either in Cd or in Zn contaminated soils, the inoculation of a heavy metal adapted AM fungus increased shoot and root biomass and N, P, K shoot content, especially in fermented SB (with or without RP) amended plants, whereas shoot metal concentration was decreased. Moreover, symbiotic developments (nodulation and AM colonization) were stimulated by soil amendments and AM fungus inoculant. Soil enzymatic activities (dehydrogenase, β -glucosidase, phosphatase) as well as aggregates stability and production of acid indol acetic were increased in fermented SB amended plants.

Thus, the success of revegetation in Cd or Zn contaminated soils is highly dependent on the mycorrhizal inoculation using a heavy metal adapted endophyte and on the application of fermented SB waste. The effect of these combined treatments not only increased plant tolerance to heavy metal contamination but also allowed an enhancement of biological and biochemical values in the rhizosphere soil, improving soil quality.

Two experiments, focused on the study of the interaction between the organic amendments and AM fungi, were carried out in compartmental systems, one in soil and the other in monoxenic cultures. The compartmental systems consisted on a root compartment (RC), where roots and AM fungi were growing, and a hyphal compartment (HC), where AM mycelium developed in absence of root influence.

For the soil experiment, plants were grown in compartmentalised grown units, each with a RC and two lateral HC. The amendments were added to one of the HC while the other remained untreated. ^{32}P and ^{33}P were added to the HC and the biomass of the AM fungal mycelium and other soil micro-organisms were measured by whole cell fatty acid (WCFA) signatures. Biomass of saprophytic fungi and Gram-positive and Gram-negative bacteria was higher in SB than in ASB treatments. Whilst ASB increased growth and activity (labelled P uptake) of AM mycelium, SB had the opposite effect. Moreover, shoot P content was increased by the addition of ASB and by inoculation with AM fungi. Modification of soil microbial structure and production of exudates by *A. niger*, as a consequence of fermentation process of sugar beet waste, could possibly explain the increase of AM growth in ASB treatments. On the other hand, the highest P uptake was a result of the solubilization of RP by *A. niger* during the fermentation.

In a monoxenic culture we were able to study the influence of the amendments on AM mycelium growth without the interference of other micro-organisms. The results showed an increased of AM mycelium growth by the addition of ASB to the HC. When unfermented SB was added to the HC, there was an initial inhibition of AM mycelium growth although it wasn't totally inhibited as it happened in soil experiment. In this plates, external AM hyphae lost apical dominance and appeared tangled at some points.

The chromatograms of Gas Chromatography associated to Mass Spectrometry showed different pics for both amendments. SB contained small amounts ($< 100 \text{ mg}^{-1}\text{kg}$) of ferulic acid, a major component of sugar beet roots that have been shown to depress AM hyphal growth from germinated spores. ASB didn't contain that compound.

II. INTRODUCCIÓN

1. INTERÉS DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

Los ecosistemas naturales pueden recibir el impacto negativo de actividades, procesos o productos diversos, que inciden en la estabilidad, diversidad y productividad de los mismos. 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. 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. Por otro lado, 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 estreses causan a los sistemas suelo-planta, ha sido objeto de investigación, pero sigue siendo un tema con muchos aspectos aún por resolver, por lo que son necesarios más estudios. La presente Tesis Doctoral trata de contribuir con sus investigaciones al uso de técnicas sostenibles para paliar algunos de esos efectos negativos ocasionados por la falta de agua y contaminación sobre el desarrollo vegetal.

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.

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 esta 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 del 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 los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas, cuyos efectos beneficiosos en la recuperación de suelos se ha 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.

Los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas desarrollan un amplio espectro de actividades, bien como antagonistas de microorganismos patógenos de plantas o bien como estimuladores de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes; sea como fijadores de N₂ o como solubilizadores de P, o como mineralizadores de la materia orgánica. Los efectos más apreciados 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 y funcionamiento de los ecosistemas naturales. 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 ecosistemas naturales. En efecto, cuando están en exceso dichos metales 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 organo-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, 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. 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 “biorremediación” para referirse a técnicas de remediación de que utilizan seres vivos para paliar los problemas de la contaminación. 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 fitorremediación, pensando como un potencial incrementando la capacidad de tolerancia de la planta a los metales pesados, como una mera mejora de la nutrición de la planta, y en consecuencia de su desarrollo, ya que normalmente los suelos contaminados son muy pobres en nutrientes.

Cuando el estado de degradación del suelo es acusado, como consecuencia de la desertificación o de la contaminación por metales pesados, la inoculación de microorganismos beneficiosos para la planta no es suficiente para lograr una instauración óptima de la cubierta vegetal. En este contexto, se plantea la posibilidad de la adición de enmiendas orgánicas al suelo, las cuales constituyen un aporte de materia orgánica, facilitando la recuperación de las propiedades físico-químicas y biológicas del mismo. La aplicación de enmiendas orgánicas contribuye al incremento de la fertilidad del suelo y por tanto permite la expresión de los microorganismos beneficiosos inoculados y en consecuencia el establecimiento de las plantas.

Una de las características de la sociedad actual de consumo es la generación de grandes cantidades de residuos. Un tercio de la producción de azúcar en el mundo procede de la remolacha; cuyo subproducto principal generado es la pulpa, un producto rico en lignina y celulosa. Por otro lado, la obtención industrial del aceite de oliva, de gran importancia económica en España, genera cantidades enormes de subproductos (alpeorajo) con un gran potencial contaminante.

El aprovechamiento de estos subproductos, previamente estabilizados, para su aplicación al suelo como enmendantes orgánicos contribuiría a incrementar el contenido de materia orgánica del mismo además de favorecer su eliminación del medio ambiente mediante su reutilización.

Hasta el momento no ha sido abordado el uso de hongos MA junto con residuos agroindustriales procedentes de la industria del azúcar de remolacha y de la obtención del aceite de oliva con fines de revegetación y biorremediación de suelos contaminados por metales pesados. La presente Tesis Doctoral propone como objetivo general el estudio del *Efecto de la aplicación de residuos agroindustriales transformados microbiológicamente junto con inoculantes microbianos en estrategias de revegetación y biorremediación.*

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es proponer el desarrollo de nuevas tecnologías con fines de revegetación y/o biorremediación. Estas tecnologías contemplan el uso de componentes microbiológicos como microorganismos rizosféricos (levaduras y

hongos micorrícicos) y la aplicación al suelo de enmendantes orgánicos de nuevo desarrollo.

Los **objetivos específicos** del presente estudio son:

- Evaluar la eficiencia y compatibilidad de los residuos agroindustriales alpeorajo y/o residuo de azúcar de remolacha biotransformados y los inoculantes microbianos sobre el crecimiento, nutrición y fisiología de las plantas y sobre las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo para su uso en revegetación.
- Evaluar la eficiencia y compatibilidad de los residuos agroindustriales biotransformados y los inoculantes microbianos aplicados a un sistema suelo-planta sobre el crecimiento, nutrición y fisiología de las plantas y propiedades físico-químicas y biológicas del suelo para su uso en remediación de suelos contaminados por metales pesados.
- Estudiar los mecanismos involucrados en la interacción de los residuos biotransformados aplicados y los hongos MA.

2. REVISIÓN DE LOS ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

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 del sistema suelo-planta es crítico conocer como funcionan e interactúan los componentes físico-químicos y biológicos del suelo (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 *et al.*, 1997). Las actividades microbianas son particularmente relevantes en las

interfaces que ocurren entre el suelo y las raíces de las plantas, conocidas como rizosfera, donde microorganismos, raíces y componentes del suelo interactúan (Lynch, 1990b; Bowen & Rovira, 1999).

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 actividad 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 & Azcon-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, mucílago, lisados y secreciones.

En la rizosfera existe una considerable densidad poblacional de microorganismos, pudiendo alcanzar valores superiores a 10^9 células por cm^3 . Los valores máximos, por lo general, se encuentran en la rizoplana o superficie radical. Existe 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 está ocupada por microorganismos (Weller & Thomashow, 1994; Kennedy, 1998), que se encuentran agrupados en microcolonias en sitios donde los nutrientes son más abundantes. Esta proporción puede ser modificada por la presencia de asociaciones simbióticas tales como las micorrizas.

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 organismos del suelo se refieren, principalmente, a hongos y bacterias (Lynch, 1990b; 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.

Saprotitos, que viven libremente y 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, que viven asociados a las raíces vegetales y benefician el desarrollo y nutrición vegetal.

En resumen, las acciones que desarrollan los microorganismos en la rizosfera son muy diversas, y los efectos beneficiosos en el sistema suelo-planta pueden concretarse en las siguientes actividades:

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 en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes (biofertilizantes).

Mejora de la estructura del suelo. Consecuencia de la contribución microbiana en la formación de agregados estables (mejoradores edáficos).

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 al agente estresante: salinidad, sequía, metal (mejoradores eco fisiológicos).

Benefician el desarrollo y la productividad vegetal. Efecto que es una consecuencia global o parcial de los descritos anteriormente.

La presente memoria se va a centrar, de forma directa, en el estudio de dos grupos de microorganismos beneficiosos: los microorganismos solubilizadores de fósforo (P) (*Yarrowia lypolytica*) y los hongos que forman micorrizas arbusculares (MA), de los que hablaremos más adelante. De forma indirecta, dado que se van a usar leguminosas, este

estudio también incluye la aplicación de bacterias que colectivamente se conocen como *Rhizobium*. Así mismo, la biotransformación del residuo vegetal para su utilización como enmienda fue llevada a cabo por *Aspergillus niger*: activo como mineralizador de la materia vegetal y concominadamente efectivo solubilizador del fosfato de roca presente en ese medio.

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) y las bacterias fijadoras de N₂ atmosférico son los componentes más destacados entre los simbioses mutualistas. Las bacterias simbióticas fijadoras de N₂ (*Rhizobium*, *Frankia* y cianobacterias) ejercen su relevante función en la rizosfera de las plantas susceptibles de interés tanto en agrosistemas como en ecosistemas naturales perturbados (Cervantes & Rodríguez-Barrueco, 1992; Barea & Olivares, 1998; Jeffries & Barea, 2001). Esta simbiosis en leguminosas es extremadamente importantes tanto en sistemas agrícolas como en ecosistemas naturales y representan una fuente fundamental de N para la biosfera (Vance, 2001). Las bacterias responsables de la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas, en los que se desencadena la actividad nitrogenasa, capaz de reducir N₂ a NH₃ se conocen colectivamente como *Rhizobium*, aunque actualmente se reconoce que pertenecen a diversos géneros, que se han ido escindiendo del primitivo *Rhizobium*, tales son: *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*.

2.4. Micorrizas arbusculares

2.4.1. Conceptos generales sobre micorrizas

Las micorrizas arbusculares son simbioses biotrofos obligados por lo que solo pueden completar su ciclo de vida en presencia de la planta hospedadora. El 80-90% de las familias botánicas forman esta asociación simbiótica. 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 le proporciona al hongo fuentes de carbono procedentes de la fotosíntesis y un nicho ecológico protegido (Smith & Read, 1997a).

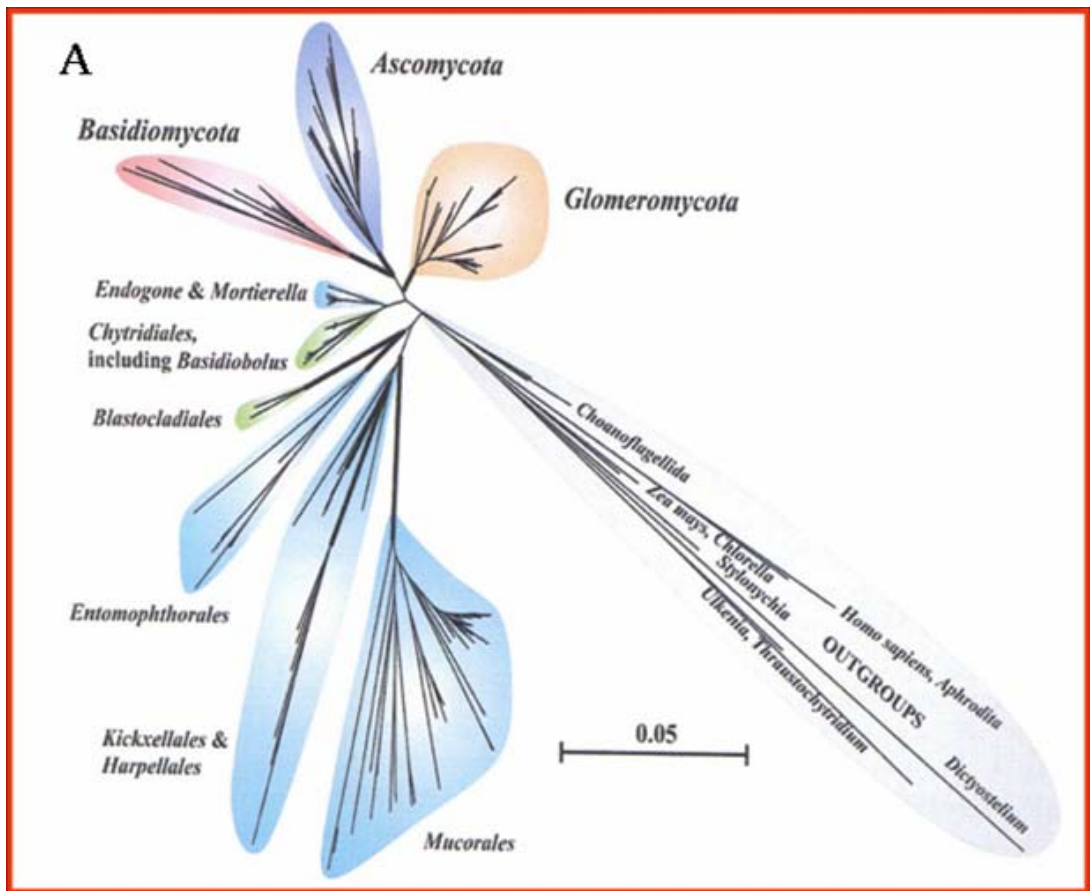
Taxonómicamente, los hongos MA pertenecen al phylum Glomeromycota; este phylum se ha creado recientemente basándose en la secuencia de la subunidad pequeña del ARNr (Schüßler *et al.*, 2001a; Schüßler *et al.*, 2001b). Incluye una sola clase, los Glomeromycetes y cuatro órdenes: Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaesporales (figura 1). Un aspecto clave de esta nueva clasificación es que el género *Glomus*, antes clasificado en base a criterios morfológicos y estructurales, se ha escindido en, al menos, tres grupos distintos: *Glomus* A, B y C. Los dos primeros grupos están

englobados en el orden Glomerales, mientras que Glomus C pertenece a los Diversisporales. Este hecho da idea de que bajo la aparente uniformidad de morfotipos de hongos micorrícicos se esconde una gran diversidad genética y, posiblemente quedan grupos aún por describir.

2.4.2. Formación y morfología

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, 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 radical por el hongo sigue un proceso de desarrollo con distintas etapas que describimos a continuación.



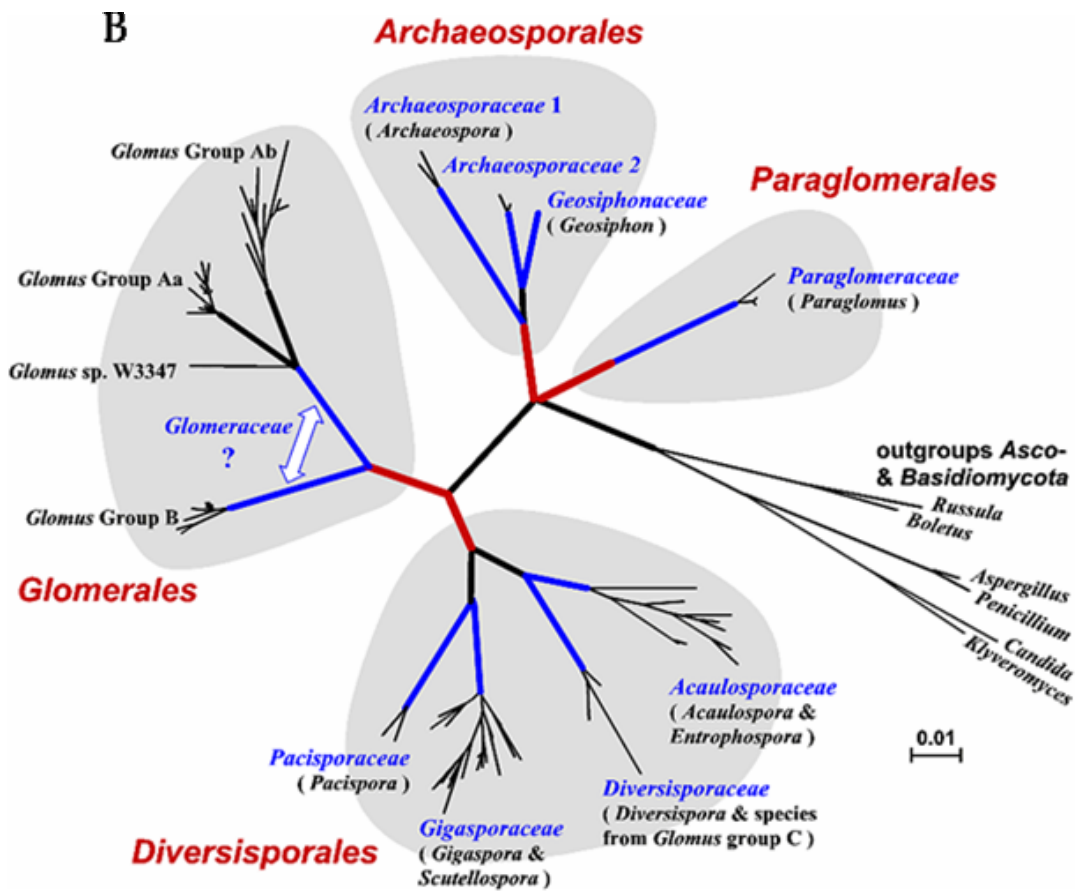


Figura 1: (A) Filogenia propuesta para los hongos formadores de micorrizas arbusculares basadas en las secuencias de la subunidad pequeña (SSU) del ARNr. Tomado de Schüßler et al. (2001). (B) Estructura taxonómica propuesta del phylum Glomeromycota en base a las secuencias de la SSU del ARNr.

Precolonización

Es la etapa previa a la colonización.

A partir de las esporas fúngicas formadas a partir del micelio extraradical, se produce el desarrollo del tubo de germinación, el cual está determinado fundamentalmente por las condiciones físicas, químicas y fisicoquímicas del suelo (CO₂, temperatura, pH, etc.). Cuando las hifas producidas a través del mismo 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, 2001; Giovannetti *et al.*, 1993; Giovannetti *et al.*, 2002). 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 & Fortin, 1998).

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 únicos 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).

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 (Smith & Read, 1997a). A continuación, la hifa colonizadora se ramifica y extiende a través del cortex medio e interno intercelularmente; finalmente las hifas penetran la célula y 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 recuperar su

aparición y su función normal. Al mismo tiempo, o poco después que se forman 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 si producen células auxiliares en el micelio externo.

El conjunto de estructuras 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 rápidamente 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 exponencial. 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 para la planta, especialmente aquellos de lenta difusión en la solución del suelo como son el fósforo, zinc, cobre y amonio (Sieverding, 1991; Bürkett & Robson, 1994).

Diferentes estudios han señalado la importancia del micelio extraradical en la estabilidad y mejora de las características físicas y químicas y biológicas del suelo (Arines *et al.*, 1992). En particular, se encontró una fuerte correlación entre la abundancia de hifas extraradicales de hongos MA y la formación de agregados estables en el suelo (Bethlenfalvay & Schüepp, 1994). Las hifas externas forman una red tridimensional, parece ser idónea para retener las partículas de suelo, formando así los correspondientes agregados. La concurrencia en este proceso de las raíces más finas de la planta, así como de los polisacáridos producidos por los microorganismos del suelo, que cementarían de modo más sólido los agregados, bastan para explicar la mayor agregación del suelo producida por el establecimiento de una red de micelio MA, cuyo componente mayoritario, la glicoproteína glomalina, participa activamente en este proceso.

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, 1991). El micelio extrarradical ha desarrollado mecanismos que le permiten permanecer infectivo en el suelo cuando la estructura de éste se mantiene intacta (Jasper *et al.*, 1989).

El contenido citoplásmico de las hifas externas, a diferencia del de las estructuras ramificadas de absorción (branching absorbing structures, BAS) se mantiene intacto por los largos periodos (por encima de un año). Una hipótesis reciente (Bago *et al.*, 1998b; Bago *et al.*, 1998d; Bago *et al.*, 1999a; Bago *et al.*, 1999b) sugiere que dicha vitalidad prolongada se produciría gracias a la preservación de compartimentos distribuidos al azar en el interior de las hifas externas. En estos compartimentos “celulares”, núcleos y citoplasmas viables quedan retenidos, a la espera de una mejora en las condiciones físico-químicas ambientales y/o del desarrollo de una raíz hospedadora en las proximidades. La reactivación del hongo tendría lugar mediante la colonización de la nueva raíz hospedadora, lo que conllevaría a la reiniciación del ciclo de vida del hongo.

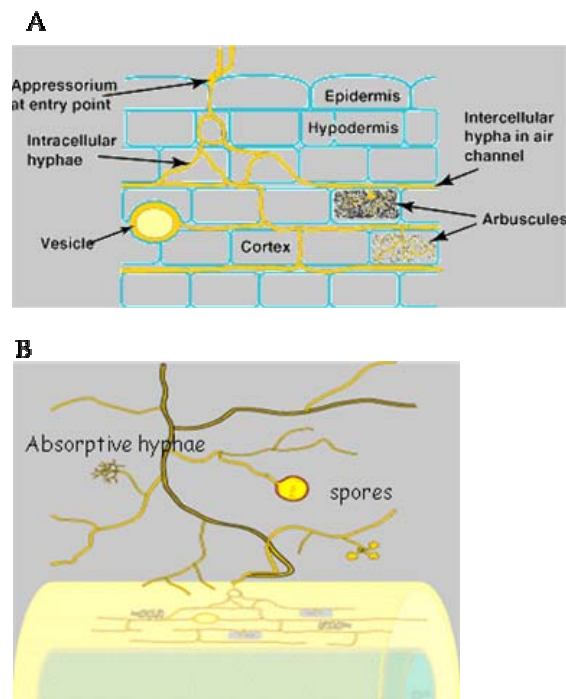


Figura 2: ciclo de vida intracelular (A) y extracelular (B) de los hongos micorrícicos arbusculares. Tomado (Brundett, 2006)

2.4.3. Efecto de las MA sobre el desarrollo de las plantas

Incremento en el aporte de nutrientes

El efecto mejor y más estudiado que ejercen las MA sobre las plantas a las que colonizan, sin duda, es el que conduce a una mejora de su estado nutricional así como del crecimiento. Las MA han demostrado su efectividad contribuyendo a un mejor aprovechamiento y absorción de los nutrientes disponibles en el suelo. Se ha confirmado que el micelio externo de los hongos MA, pueden absorber PO_4^{2-} , NO_3^- y NH_4^+ de microhábitats distantes más de 25 cm de la superficie de la raíz (mucho más allá de la zona de agotamiento que la rodea) y transferírselos a las plantas con las que están asociados (Bürkett & Robson, 1994; Tobar *et al.*, 1994a; Smith *et al.*, 2001; Tobar *et al.*, 1994a). Además, el micelio fúngico presenta una mayor eficiencia en la absorción de estos nutrientes que las raíces de las plantas. Entre los nutrientes, el fósforo “extra” absorbido es el elemento clave para explicar el incremento en el crecimiento de las plantas micorrizadas. Esto se debe al hecho de que el fósforo es, a menudo, uno de los elementos limitantes para el crecimiento de las plantas y al hecho de que las hifas de los hongos MA incrementan el volumen de suelo explorado e incrementan por tanto los sitios de absorción de P, llegando a zonas donde el fósforo no está accesible para ser captado por las raíces de las plantas (Jakobsen, 1994). El P absorbido por la hifa, 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 & Azcon-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 *et al.*, 1995). Hoy día existen evidencias genéticas de la existencia de transportadores de P en hongos MA (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001), así como de la implicación de ATPasas de membrana (Ferrol *et al.*, 2002).

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.*, 1994a; Bago *et al.*, 1996), habiéndose demostrado la expresión genética de transportadores específicos de N (Bothe & Hildebrandt, 2002).

El amonio, ión de muy baja movilidad, puede dar lugar a zonas de agotamiento en la rizosfera 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 las mismas. Con iones de mayor movilidad, como es el caso del nitrato o sulfato, es menos probable que se creen zonas de agotamiento en la proximidad de las raíces y posiblemente estos iones no se muevan más rápidamente a través de las hifas que en la solución del suelo (Gianinazzi-Pearson & Azcon-Aguilar, 1991). Sin embargo, se ha evidenciado la capacidad del micelio externo de absorber

nitrate del medio (Tobar *et al.*, 1994a; Bago *et al.*, 1996), y esta asimilación parece estar facilitada por la enzima nitrato reductasa, cuya actividad se ha detectado en esporas (Ho & Trappe, 1973) y en extractos de raíces micorrizadas (Subramanian & Charest, 1998)

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 limitantes por lo que las plantas micorrizadas responden mejor ante condiciones en las que la limitación de agua es un factor limitante (Auge *et al.*, 1987; Faber *et al.*, 1991; Augé, 2001; Ruiz-Lozano, 2003)

La simbiosis MA mejora el estado nutricional de la planta especialmente bajo condiciones de estrés como pueden ser déficit hídrico o estrés salino (Ruíz-Lozano *et al.*, 2000; Ruiz-Lozano, 2003). Así por ejemplo, el nitrógeno, cuya movilidad en suelo es elevada, aparece poco accesible a las raíces de las plantas en condiciones de déficit hídrico al restringirse su difusión en suelo. En estas circunstancias, la captación y el transporte de nitrógeno por los hongos MA adquiere una mayor importancia en situaciones limitantes que en condiciones óptimas de crecimiento

Dado que en la presente Tesis Doctoral se ha seleccionado el impacto de la sequía sobre el crecimiento vegetal (típico en suelos de la Cuenca Mediterránea) como modelos de estrés abiótico, por ser el habitual en gran parte del crecimiento nacional. Es por ello que más adelante se le dedica un estudio más amplio y detallado.

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, tiene un efecto perjudicial sobre el desarrollo de las mismas y puesto que los hongos micorrícicos los absorben pueden resultar 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 distintos metales y su concentración y en el nivel de adaptación a los mismos (del Val *et al.*, 1999). Por lo tanto, desde el punto de vista práctico, con vistas a mejorar el establecimiento de la cubierta vegetal en zonas contaminadas, es conveniente la utilización de hongos micorrícicos adaptados a los metales presentes en el medio, (Díaz *et al.*, 1996; Leyval *et al.*, 2002; Vivas *et al.*, 2003b).

Dado que en la presente Tesis Doctoral se ha estudiado el papel de los hongos MA como modificadores del impacto sobre el desarrollo vegetal de los metales pesados hemos seleccionado también la presencia de metales pesados como modelo de estrés abiótico y por ello se le dedica más adelante un estudio más amplio a dicho apartado.

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 y contribuyen a la formación de su matriz. Mientras que cada grupo de microorganismos 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, 1990): (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 adecuadas 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 (mucílagos, polisacáridos) o vegetal. Estos agregados, almacén de carbono 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 y de su capacidad retentiva de agua, 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 (Azcon-Aguilar & Barea, 1992). Como resultado se produce una modificación en la composición de los exudados radicales. Ello da lugar a la llamada “micorrizosfera” o zona de la rizosfera bajo la influencia de la micorriza, donde la población microbiana difiere, no solo cuantitativa sino cualitativamente, de la que se desarrolla en la propia rizosfera, (Azcon-Aguilar & Barea, 1992; Linderman, 1988b; Barea *et al.*, 2002a).

De otro lado, y dado que las MA representan un drenaje de los fotosintetizados de la planta, la simbiosis desarrolla la llamada “compensación fotosintética” que se traduce en un incremento de la eficacia de dicho proceso, con lo cual el sistema queda equilibrado (Gianinazzi-Pearson & Azcon-Aguilar, 1991).

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

Se ha demostrado que cada tipo de planta muestra un nivel específico de compatibilidad 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 y viceversa (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, ha despertado 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, su nivel de virulencia y de las condiciones medioambientales (Hooker *et al.*, 1994; Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Azcón-Aguilar *et al.*, 2002b; Azcón-Aguilar *et al.*, 2002a). 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.*, 2002b; Azcón-Aguilar *et al.*, 2002a).

2.5. Microorganismos solubilizadores de fosfato

2.5.1. El ciclo del fósforo en el suelo.

El ciclo de P en el suelo es dinámico e involucra al suelo, plantas y microorganismos. En los ecosistemas naturales existe un ciclo cerrado virtual, con el consumo de P por las plantas y devuelto al suelo en forma de residuos animales o vegetales que son descompuestos por microorganismos. Sin embargo, los suelos degradados, como los pertenecientes a la Cuenca Mediterránea objeto de nuestro estudio, se caracterizan por presentar un bajo contenido de materia orgánica y P.

Las concentraciones de P en las soluciones del suelo son pequeñas, desde 0.01 a 0.3 mg P L⁻¹ (Ozanne, 1980). Aunque el fósforo presente en la solución del suelo es solo una parte pequeña del contenido total de P en el suelo, es de esa parte de donde las plantas toman la mayoría de sus requerimientos en P inmediatos (Bolan, 1991). En ausencia de niveles significativos de P orgánico, el fósforo en solución está en equilibrio con una cantidad de P inorgánico relativamente lábil, de manera que en todos los suelos es constante la razón P inorgánico lábil/ P en solución (Stewart & Sharpley, 1987). La solución del P en suelo solamente es adecuada si el P inorgánico lábil es solubilizado al menos tan rápidamente como las raíces pueden extraerlo del suelo (Russell, 1980). Cuando las plantas toman P de la solución del suelo, el P utilizado, es repuesto a partir de las formas lábiles y moderadamente lábiles de P inorgánico. Cuando estas fuentes están agotadas entonces la fuente de P no lábil es el factor que determina la concentración de P soluble en el suelo (Stewart & Sharpley, 1987). El equilibrio de P inorgánico en suelo, fue descrito por (Larsen, 1967). Cuando el P de la solución del suelo está agotada, hay un

rápido movimiento del P en forma lábil del suelo a la solución del suelo. Sin embargo, cuando el P lábil del suelo se agota, el movimiento a partir del P no lábil del suelo a P lábil es más lenta.

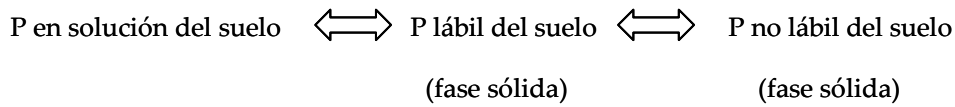


Figura 3: formas de P en suelo (Bolan, 1991)

El suministro total de P a las plantas está representado en la figura 3. El P lábil del suelo, que consiste principalmente en P adsorbido por Fe y óxidos de aluminio y minerales de aluminosilicatos (arcilla), es capaz de reponer en un periodo corto de tiempo, el P consumido de la solución del suelo. Sin embargo, el P inorgánico no lábil del suelo (como el presente en los precipitados de fosfato de hierro, aluminio y calcio y el P orgánico y P "retenido") es más lento para reponer el P de la solución del suelo. (Murrmann & Peech, 1969).

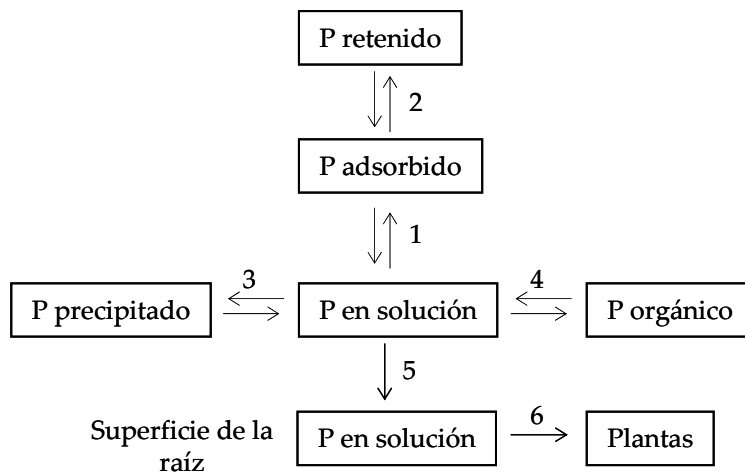


Figura 4. Representación esquemática del suministro de fosfato a las raíces de las plantas en el sistema suelo-planta. (1) Adsorción-desorción, (2) difusión del estado sólido, (3) precipitación-disolución, (4) inmovilización-mineralización, (5) difusión en solución, (6) movimiento a las raíces.

2.5.2. Microorganismos solubilizadores de fosfato de roca.

El fósforo juega un papel importante en la nutrición de la planta, por ello, para asegurar un óptimo desarrollo de estas en suelos con escasa capacidad nutricional, se hace necesario realizar labores que conduzcan a un incremento en suelo de P disponible

para la planta. Una opción atractiva sería la aplicación al suelo del fosfato de roca (RP). El fosfato de roca es una fuente de fósforo natural abundante y económica, y por tanto su utilización como fertilizante aparece como una alternativa al uso de fertilizantes de fósforo solubles en agua; sin embargo, su disponibilidad para la planta es sólo factible en suelos con pH menor de 5.5-6.0, e incluso en estas condiciones, se necesitan hasta 4 años de aplicación anual, para liberar suficientes cantidades de P que satisfagan la nutrición vegetal (Ghani *et al.*, 1994).

Como es sabido, los microorganismos saprófitos habitantes de los sistemas suelo-planta utilizan como fuente de energía compuestos orgánicos procedentes de residuos animales, vegetales o microbianos y esqueletos carbonados, para realizar actividades que puedan beneficiar al sistema suelo-planta. Entre los procesos microbianos involucrados en el ciclo de nutrientes, destacan aquellos procesos responsables de incrementar la disponibilidad de P en suelo (Kucey & Leggett, 1989). Muchas especies de bacterias, hongos, levaduras y actinomicetos, aisladas del suelo fundamentalmente rizosférico, son capaces de solubilizar fuentes de P escasamente solubles. Los mecanismos principales de solubilización de fosfato por estos microorganismos son mediante la bajada de pH y/o reacciones de quelación del catión unido al P; este último mecanismo es considerado el más relevante. Los microorganismos solubilizadores de fosfato lo hacen mediante la secreción de ácidos orgánicos al medio, resultantes del metabolismo glucídico, los cuales, gracias a su capacidad de quelar iones metálicos, son capaces de desplazar al P de los lugares de adsorción en el suelo (Kucey & Leggett, 1989). El nivel de quelación de los ácidos producidos depende no solo de la longitud de la cadena hidrocarbonada sino de la cantidad y posición de los grupos carboxílicos (mono, di o tricarboxílicos). Los hongos filamentosos, con mayor biomasa que las bacterias, son los mejores productores de ácidos orgánicos y se ha comprobado que presentan una mayor capacidad solubilizadora de P que las bacterias y que además retienen su actividad incluso tras subcultivos seriados (Kucey, 1983). (Vassilev & Vassileva, 1992) mostraron que especies de *Aspergillus niger* y *Penicillium* son capaces de solubilizar el fosfato de roca tanto en sistemas de fermentación como inoculados directamente en el suelo.

Por otro lado, a pesar de la reconocida capacidad de las levaduras para producir ácidos orgánicos (Mattey, 1992), no hay apenas referencias sobre su aplicación en suelo como solubilizadoras de fosfato de roca. Tradicionalmente, las levaduras no están consideradas como inoculantes potenciales del suelo, pero recientemente se ha demostrado su papel en la potenciación de la actividad microbiana de este (Larsen & Jakobsen, 1996) y su alta tasa de supervivencia en suelo, incluso bajo condiciones ambientales extremas (sequía, salinidad...) (Munier-Lamy & Berthelin, 1987). *Yarrowia lipolytica* es una levadura capaz de producir ácido cítrico originando una bajada de pH que permite la solubilización del fosfato de roca. Además, estudios de (Vassileva *et al.*, 2000; Vassilev *et al.*, 2001d; Vassilev *et al.*, 2001b) han mostrado la capacidad de esta

levadura para promover el crecimiento de la planta y de ayudar a la formación de la micorrización. Por cada una de estas actividades pudimos considerarla como microorganismo ayudante y seleccionarla para estudios posteriores.

2.6. Microorganismos solubilizadores de fosfato de roca y micorrizas

A pesar de la gran eficiencia de algunos de estos microorganismos para solubilizar RP, su efectividad en sistemas suelo-planta no se manifiesta siempre (Barea *et al.*, 2002b). Ello es debido a que el P liberado por los microorganismos solubilizadores de P pueden ser rápidamente asimilado por otros microorganismos y por otro lado, el fósforo solubilizado puede volver a ser rápidamente precipitado con cationes como Ca^{+2} , Al^{+3} o readsorbido por las partículas del suelo (arcillas). Sin embargo, antes de ser fijado nuevamente, si el fosfato solubilizado es captado por el micelio de las micorrizas, se mejora la adquisición de P por la planta. Como ya sabemos, el efecto principal de las micorrización es la captación de P por las plantas, debido a la capacidad del micelio extraradical de actuar como un puente entre las raíces y el suelo. El fósforo liberado por los microorganismos solubilizadores de P, si no es rizosférico, puede no llegar a la raíz de la planta debido a una previa quelación o difusión limitada de este. Por ello es importante la cooperación sinérgica entre los microorganismos solubilizadores de P y los hongos MA actuando en un mismo microhabitat (Barea & Azcón-Aguilar, 1983).

Estudios realizados con P radiactivo por (Barea *et al.*, 2002b), corroboraron este hecho, y concluyen que las interacciones entre microorganismos solubilizadores de P y los hongos MA juegan un papel fundamental en el ciclo de P, y son de gran interés en su aplicación en agroecosistemas sostenibles.

3. ENMIENDAS ORGÁNICAS

Los suelos degradados, procedentes de zonas sometidas a procesos de desertificación y/o contaminación por metales pesados, se caracterizan por su bajo contenido en materia orgánica y por la escasa actividad microbiana. Ello determina la baja calidad y fertilidad de los mismos. Para proceder a la recuperación de estos suelos degradados, el modo más eficaz demostrado y compatible con la sostenibilidad, es la aplicación de enmiendas orgánicas (Díaz, 1992) ya que su aplicación al suelo mejora las características físico-químicas y microbiológicas del mismo. La materia orgánica, además, favorece la formación y estabilidad de agregados e incrementa la capacidad de retención hídrica del suelo, contribuyendo a una mayor resistencia frente a la erosión (Roldán *et al.*, 1996). Por otro lado, el contenido de materia orgánica de un suelo, así como la dinámica de transformación de dicha materia orgánica, incide sobre el conjunto de poblaciones microbianas que existen en dicho suelo, y por tanto, sobre la fertilidad del mismo (Williamson & Johnson, 1991).

3.1. Utilización de residuos agroindustriales como enmienda orgánica.

Los residuos se pueden definir como aquellas materias generadas en las actividades de producción y consumo que no han alcanzado, en el contexto en que se producen, ningún valor económico. Ello puede deberse tanto a la falta de tecnología adecuada para su aprovechamiento, como a la inexistencia de un mercado para los productos recuperados. En particular, el residuo de azúcar de remolacha y el alpeorujo son subproductos agroindustriales generados en la industria de la obtención del azúcar de remolacha y del aceite de oliva respectivamente.

Residuo de azúcar de remolacha.

Dos tercios de la producción de azúcar en el mundo se derivan de la caña de azúcar mientras que un tercio procede de la remolacha. Los principales subproductos generados en la industria de la producción de azúcar de remolacha son melazas y pulpa del azúcar de remolacha. Las melazas contienen 50% de sacarosa, y pequeñas cantidades de fructosa y glucosa. La pulpa del azúcar de remolacha es un producto rico en lignina y celulosa.

Hay una serie de métodos alternativos en vías de optimización destinados a la reutilización de estos residuos, los más importantes hasta la fecha que se conocen son:

- Alimentación animal: tanto las melazas como la pulpa seca del residuo de azúcar de remolacha pueden ser adecuadas para la alimentación de ovejas, cabras y ganado. Debe utilizarse en combinación con otros productos como heno para que el valor nutritivo alcanzado sea el adecuado y así garantizar la productividad y la calidad de la carne de los animales que se han alimentado con este sustrato.
- Obtención de etanol a partir de la pulpa del azúcar de remolacha para su uso como biocombustible alternativo al petróleo. Esta alternativa está aún lejos de usarse a escala comercial debido a los elevados costes de producción, principalmente en el pretratamiento y obtención de las enzimas necesarias para la hidrólisis de la celulosa (Gregg *et al.*, 1998; Wingren *et al.*, 2003).

Otra alternativa factible y de interés ecológico, que es la que se propone en esta tesis doctoral, consiste en la utilización del residuo de azúcar de remolacha (la pulpa) para su uso como enmendante del suelo, previo tratamiento microbiológico.

Alpeorujo.

Los sistemas de obtención del aceite de oliva han experimentado en las últimas décadas una profunda transformación dirigida fundamentalmente a mejorar los rendimientos y la productividad de la industria oleícola. Consiste en obtener aceites de oliva de gran calidad, reducir los consumos de agua y energía y evitar en lo posible la generación de subproductos o residuos, algunos de los cuales presentan un elevado potencial contaminante. Estos cambios, se han circunscrito fundamentalmente al método

de extracción. Actualmente, en España, el método de extracción que se utiliza, casi en un 90%, es el sistema de centrifugación de 2 fases, en el que se obtiene una fase líquida oleosa (aceite + agua) y una fase semisólida o alpeorujo u orujo dos fases, que es un subproducto constituido por la parte sólida y el agua de vegetación de la aceituna procesada. El alpeorujo tiene un contenido medio de humedad del 65% , pH ligeramente ácido y un contenido de materia orgánica del 88.6% de la que casi el 50% son ligninas y el 2.5% grasas. El alpeorujo se caracteriza por su alta relación C/N, debido a que su contenido en N-Kjeldahl es del 1%, así como por su contenido en P (0.34%) y K (1.94%) (Cabrera *et al.*, 2002). El 50% de la concentración de materia orgánica del alpeorujo corresponde a azúcares reductores (Proietti *et al.*, 1995). El color negro característico del alpeorujo es debido a la polimerización de compuestos fenólicos de bajo peso molecular que están químicamente relacionados con los derivados de la lignina (Pérez *et al.*, 1987)

Estos residuos presentan una elevada carga contaminante, debido principalmente a su alto contenido en polifenoles, por lo que es necesario buscar métodos que permitan su reutilización o valorización. Los usos más importantes que se conocen hasta la fecha son:

- Extracción de aceite de orujo: En los últimos años ha surgido una polémica sobre los efectos perjudiciales del consumo de aceite de orujo, ya que durante el proceso de refinado y probablemente debido a la utilización del hexano y a las temperaturas alcanzadas durante el proceso, se producen benzopirenos, que son compuestos dañinos para la salud.
- Generación térmica y eléctrica: Los combustibles que utilizan las plantas de cogeneración son mayoritariamente gas natural (72%) y petróleo (25%) (Monreal, 2002) En los últimos años, varios programas nacionales e internacionales están apoyando la mejora y desarrollo de formas de producción y usos de la biomasa como recurso para la generación de calor y energía eléctrica. La generación de energía mediante el aprovechamiento de residuos constituye una fuente de energía renovable y limpia que además contribuye a la conservación del medio ambiente gracias al reciclado de productos de desecho como los que origina la industria oleica. Esta aplicación presenta, sin embargo, el inconveniente de generar una gran cantidad de cenizas, las cuales son abandonadas en vertederos adyacentes, sin haberse encontrado vías de reutilización de las mismas.
- Alimentación animal: se están realizando estudios de caracterización físico-química y de evaluación del aprovechamiento de orujos y alpeorujos como fuente de proteínas para alimentación animal.

Pese a los avances conseguidos en los últimos años, la gran generación de alpeorujo y su previsible aumento en los próximos años, exige la búsqueda de otras soluciones que permitan su completa valorización y eviten su abandono. Una posible vía sería su uso en agricultura para lo cual este subproducto debe ser previamente estabilizado y biotransformado con objeto de obtener enmiendas orgánicas estables, que eviten los

efectos nocivos de este producto sobre el suelo y las plantas. En esta tesis doctoral se propone la utilización de alpeorajo como enmienda orgánica con fines de revegetación y/o biorremediación tras la fermentación de este sustrato con hongos lignocelulolíticos, previamente seleccionados.

3.2. Componentes y degradación bioquímica de los residuos agrindustriales utilizados (residuo de azúcar de remolacha y alpeorajo).

Ambos residuos orgánicos [residuo de azúcar de remolacha (SB) y alpeorajo (DOC)] son ricos en lignocelulosa. La lignocelulosa está compuesta por holocelulosa unida a lignina. A su vez, la holocelulosa está compuesta por celulosa (polímero de glucosa) y hemicelulosa (polímero heterogéneo de hexosas y pentosas). La lignina es otro polímero compuesto por tres ácidos fenólicos, alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapylico (Lynch, 1987). La proporción de lignina, celulosa y hemicelulosa varía entre un residuo u otro, como viene indicado en la tabla 1.

Celulosa

Como ya hemos dicho, la celulosa es un polisacárido formado por cadenas lineales de glucosa enlazadas mediante puentes de hidrógenos. Estas cadenas aparecen como agregados fibrilares cristalinos (microfibrillas) que le confieren a la pared la mayor parte de su enorme resistencia. Los espacios existentes entre las microfibrillas de celulosa suelen llenarse con pectina y hemicelulosa y probablemente también con una cierta cantidad de lignina lo que reduce su accesibilidad a los enzimas celulolíticos capaces de degradarlas.

El complejo enzimático de la celulasa se puede resumir en tres componentes principales que se muestran en la figura 5.

Aspergillus niger presenta las tres actividades enzimáticas de este complejo enzimático, y las produce en cantidades sustanciales (Hanif *et al.*, 2004). También se ha comprobado que *A.niger* presenta actividad xilanasa, enzima que es importante al incrementar la accesibilidad de la celulosa a las celulasas (Berlin *et al.*, 2005). De la fracción celulósica, probablemente el 50% p/p no está fuertemente unida a la lignina y está relativamente disponible para su descomposición por los microorganismos.

SUSTRATO	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Ct (%)	Co (%)	Nt (%)
SB	29	23	5	55	16	1.7
DOC	24	8	30	54	5	1.7

Tabla 1: Características del residuo de azúcar de remolacha (SB) y de alpeorajo (DOC).

Los valores son media de tres repeticiones.

Ct carbono total, Co carbono oxidable, Nt nitrógeno total

Hemicelulosa

Las hemicelulosas están formadas por cadenas de azúcares sin organización fibrilar que están unidas a las microfibrillas de celulosa mediante enlaces débiles de hidrógeno. Los polímeros hemicelulósicos son principalmente el xiloglucano, pero también lo forman glucomananos, galactomananos y arabinogalactanos. El xiloglucano es un polisacárido formado por cadenas de glucosa que llevan unidos residuos de xilosa y en menor cantidad de galactosa, arabinosa y mucosa.

Se ha detectado actividad enzimática hemicelulolítica en tratamientos con hongos de la podredumbre blanca, como el hongo *Phanerochaete cryso sporium* cultivado en residuos de caña de azúcar (Khalil, 2002).

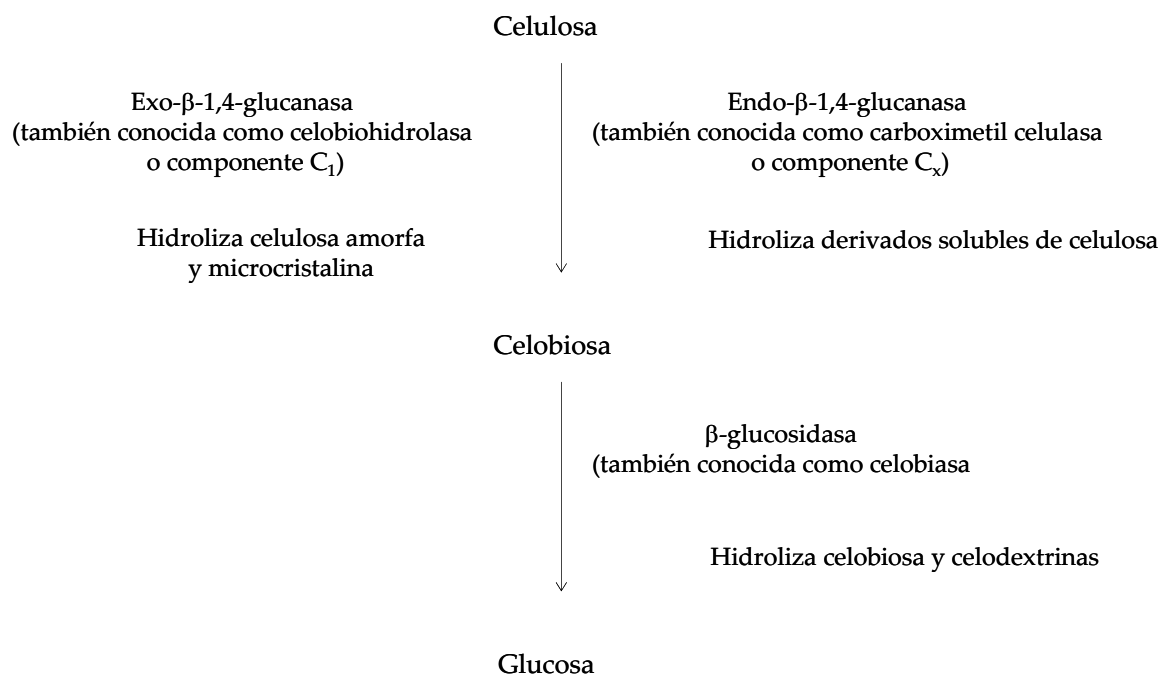


Figura 5: Complejo enzimático de la celulasa.

Lignina

Los polifenoles son un grupo de compuestos, constituyentes de numerosas especies vegetales que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes y se consideran necesarios para el funcionamiento de las células vegetales. Se clasifican según el número de átomos de carbono del esqueleto base como ácidos fenólicos, xantonas, flavonoides, lignina y taninos.

Las ligninas son heteropolímeros de unidades de fenilpropano unidas por diferentes tipos de enlaces que presentan una estructura tridimensional muy compleja con un bajo grado de degradabilidad (Higuchi, 1990; Zabel & Morrell, 1992).

Para alcanzar la máxima descomposición de los sustratos agroindustriales es necesario separar la celulosa de la lignina y para ello se requiere el catabolismo de la lignina. La lignina es una sustancia muy resistente a la degradación enzimática. En el proceso de lisis, la lignina se libera de la unión glucósido con los hidratos de carbono (con la hemicelulosa sobre todo) y se produce la ruptura de las cadenas propílicas y la apertura de los núcleos aromáticos con la formación de compuestos de la serie alifática y su posterior mineralización; si no existe la ruptura, se produce la liberación de

compuestos fenólicos simples, que pueden ser degradados u oxidados directamente produciendo policondensados prehúmicos.

Algunos hongos, basidiomicetos, pueden degradarla al contener el sistema enzimático ligninasa. Los principales enzimas degradadores de lignina aislados de estos hongos son: Manganese peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP) y lacasa. Otros enzimas importantes en la degradación de la lignina son enzimas que producen peróxido de hidrógeno para ayudar a la acción catalítica de las peroxidases (como glucosa oxidasa y glioxal oxidasa). Estas enzimas que pueden participar en la ruptura de los fenoles, aldehidos y otros derivados de la lignina (como quinona oxidoreductasa), o hidrocarburos aromáticos policíclicos. También intervienen en la acumulación excesiva de peróxido de hidrógeno y enzimas pertenecientes a los ciclos redox de las hidroquinonas (como catalasa, superóxido dismutasa, glutathion peroxidasa). Cada uno de los hongos degrada la lignina utilizando una maquinaria bioquímica diferente.

(Tien & Kirk, 1983) en el año 1983, demostraron la existencia de una enzima de aproximadamente 42,000 daltons que requería peróxido de hidrógeno para su actividad, capaz de degradar la lignina en *Phanerochaete chrysosporum*. Posteriormente se han descrito las actividades lignina peroxidasa (LiP) y manganese peroxidasa (MnP) en este hongo (Tien & Kirk, 1988; Paszcynski *et al.*, 1988).

Los hongos causantes de la podredumbre blanda, como los hongos del género *Aspergillus*, llevan a cabo una pudrición a nivel superficial; atraviesan las paredes secundarias de las células ya lignificadas, dando lugar a cavidades cilíndricas, a través de las cuales se introduce la hifa provocando la degradación preferente de los polisacáridos y en menor extensión de la lignina (Buswell & Odier, 1987). Por otra parte, los hongos causantes de la podredumbre blanca, como *Phanerochaete chrysosporum*, tienen un modo de degradación de la madera no selectivo, es decir, degradan celulosa, hemicelulosa y lignina simultáneamente.

(Vassilev *et al.*, 1995) demostraron la capacidad de *A. niger* para crecer y degradar alpeorajo y residuo de azúcar de remolacha. Debido al menor contenido de lignina, la mineralización fue mayor cuando el sustrato fue el residuo de azúcar de remolacha que alpeorajo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS RESIDUOS Y FERMENTADOS UTILIZADOS

SUSTRATO	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Ct (%)	Co (%)	Nt (%)
SB	29	23	5	55	16	1.7
DOC	24	8	30	54	5	1.7

Tabla 1: Características del residuo de azúcar de remolacha (SB) y del alpeorujo (DOC). Los valores son medias de los tres tratamientos. Ct carbono total, Co carbono oxidable, Nt nitrógeno total.

SUSTRATO	Biomasa (g/matraz)	pH (1ª sem/final)	Acidez valorable (mmol/l)	Mineralización (%)
SB (10%)	1	2.7/3.0	53	69
DOC (10%)	0.78	3.5/4.0	10.7	20

Tabla 2: Crecimiento, acidez valorable y mineralización después de 20 días de incubación del residuo de azúcar de remolacha (SB) y alpeorujo (DOC) con *Aspergillus niger*. Los valores son medias de tres tratamientos.

SB	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Sin <i>A. niger</i>	22 ± 1.2	9.1 ± 0.5	5.2 ± 1.2
Con <i>A. niger</i>	11.3 ± 0.8	3.1 ± 0.1	4.1 ± 0.8

Tabla 3: Composición de la suspensión de residuo de azúcar de remolacha (SB) con o sin *Aspergillus niger* tras 20 días de tratamiento. Los valores son medias de tres tratamientos seguidos de la desviación estandar.

SUSTRATO	Día	Biomasa (g/matraz)	Acidez valorable (nmol/l)	fosfato (µg/ml)	P soluble/P total (%)
SB (10%)	3	0.57 ± 0.12	38.2 ± 1.4	47.4 ± 1.6	12
	6	0.68 ± 0.08	60.6 ± 0.7	172.6 ± 0.8	44
	10	0.77 ± 0.05	72.2 ± 0.6	292.2 ± 2.3	76
	15	0.89 ± 0.05	58.8 ± 1.1	276.8 ± 3.1	71
	20	1.2 ± 0.1	48.1 ± 0.2	224 ± 0.9	58
DOC (10%)	3	0.7 ± 0.09	18.3 ± 0.3	89 ± 1.7	23.17
	6	0.79 ± 0.11	25.8 ± 0.5	120.2 ± 0.9	31.25
	10	0.83 ± 0.05	19.8 ± 0.7	164.6 ± 2.2	42.71
	15	0.89 ± 0.02	13.1 ± 0.2	134.6 ± 2.8	34.89
	20	1.1 ± 0.03	12.9 ± 0.3	159.8 ± 0.9	41.41

Tabla 4: Crecimiento miceliar, acidez valorable y solubilización de fosfato de roca por *Aspergillus niger* cultivado en residuo de azúcar de remolacha (SB) y alpeorujó (DOC). Los valores son medias de tres tratamientos seguidos de la desviación estandar.

2. CARACTERÍSTICAS DEL SUELO EMPLEADO EN LOS ENSAYOS

Se utilizaron suelos procedentes de tres localidades, cuyas características se describen a continuación. El suelo se utilizó en la mayoría de los ensayos en condiciones naturales, tamizado a través de una malla de 2 mm. En algunos ensayos se mezcló con arena gruesa, para mejorar su aireación y evitar la compactación en las macetas, la proporción suelo /arena utilizada, será indicada en la descripción de cada ensayo. La arena, en todos los casos, una vez lavada se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

En aquellos ensayos en los que se necesitaba eliminar los propágulos micorrícicos naturales para evaluar la actividad de los introducidos, el suelo se tinalizó a vapor fluente durante una hora cada día durante tres días seguidos.

2.1. Características del suelo empleado en los ensayos del capítulo de interacción entre inoculantes microbianos y enmiendas en revegetación.

Se utilizó un suelo procedente de la zona de Los Cuadros (Fortuna, provincia de Murcia). Este suelo se eligió por provenir de un área perteneciente a la vertiente mediterránea caracterizada por lluvias escasas e irregulares, con veranos secos y calurosos. Es un suelo pobre en materia orgánica y nutrientes. Sus principales características son: pH de 8.90 (agua), conductividad eléctrica de 1.55, 0.94% carbono orgánico, 0.22 % N; 1.36 mg kg⁻¹ P (NaHCO₃- extractable P).

2.2. Características del suelo empleado en los ensayos del capítulo de interacción entre inoculantes microbianos y enmiendas en bioremediación.

Se utilizó un suelo procedente de la provincia de Granada con un pH de 7.2 (agua), 1.6% de materia orgánica, y una concentración de nutrientes: 2.1 mg kg⁻¹ N; 1.7 mg kg⁻¹ P (NaHCO₃- extractable P); 0.8 mg kg⁻¹ K. La textura del suelo es 57.8% de arena, 19% de arcilla, y 23.2% de limo.

El suelo se tamizó a través de una malla de 2 mm y se tinalizó durante una hora a vapor fluente, durante tres días consecutivos. De esta forma el suelo quedó libre de propágulos de micorriza.

2.3. Características del suelo empleado en el ensayo de sistemas compartimentados en capítulo de interacción entre hongos MA y enmienda en sistemas compartimentados.

Se utilizó suelo procedente de la provincia de Roskilde (Dinamarca) irradiado (10kGy, 10 MeV de haz electrónico) para eliminar los hongos MA indígenos

El suelo se mezcló con arena lavada y estéril en una proporción 1:1 (p/p). Esta mezcla tenía un pH de 6.1 y contenía 8 mg kg⁻¹ de suelo de 0.5 M de P NaHCO₃- extractable. Se mezclaron los siguientes nutrientes con el suelo (mg kg⁻¹ de suelo): K₂SO₄ (70), CaCl₂ (70), CuSO₄ 5H₂O (2.2), ZnSO₄ 7H₂O (5), MnSO₄ 7H₂O (10), CoSO₄ H₂O (0.33), NaMoO₄ (0.2) y MgSO₄ 7H₂O (20).

3. PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL RESIDUO AGROINDUSTRIAL

Tanto la cepa NB2 de *Aspergillus niger* como *Phanerochaete cryosporium* utilizadas en este estudio, se mantuvieron en placas de patata-dextrosa agar a 4 °C. Para la preparación del inóculo, se cultivó en placa a 30 °C durante 7 días. Con la ayuda de un asa de platino y de agua destilada estéril se desprendieron las esporas del cultivo del hongo lignocelulolítico (*A. niger* o *Phanerochaete cryosporium*) crecido en placa, formándose una suspensión que se utilizó como inóculo.

Para el proceso de fermentación se utilizaron dos sustratos: Residuo de azúcar de remolacha (SB) y alpeorajo (DOC).

Estos residuos sólidos se secaron a 60 °C en el horno y después se molieron hasta obtener fragmentos de 1mm. Para la preparación del fermentado, a cada matraz Erlenmeyer de 250 ml se le añadió 5 g de cada residuo ó 5 g de una mezcla de ambos 1:1 (w/w), según el ensayo, junto con 50 ml de la solución mineral Czapek-Dox. Esta solución está descrita en el catálogo no. 70185 de Fluka Chemica y contiene (g l⁻¹ de agua destilada). FeSO₄, 0.01; MgSO₄ · 7H₂O, 0.5; KCl, 0.5; NaNO₃, 3.0; sucrose, 30; K₂HPO₄, 1.0 y un pH final de 7.3 + 0.2. A los matraces se le añadió, cuando correspondió, 0.75 g de fosfato de roca (RP) (fluoroapatito procedente de Marruecos, con 12.8% de fósforo soluble, y 1 mm de grosor). Tras autoclavarlos a 120 °C durante 30 min, se inocularon con 3 ml de una suspensión de esporas de *A. niger* (1.2 10⁶ esporas) o con 1 ml de una suspensión de esporas de *P. cryosporum*. (1.5 10⁶ esporas), según el ensayo. La fermentación se llevó a cabo mediante incubación mediante cultivo estático a 30 °C durante 20 días (periodo previamente seleccionado en estudios anteriores (Vassilev *et al.*, 1995; Vassilev *et al.*, 1996).

4. PREPARACIÓN Y APLICACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA.

El extracto acuoso se preparó siguiendo el protocolo descrito por (Calvet *et al.*, 1992). Matraces Erlenmeyers con agua destilada estéril a la que se le añadieron los residuos orgánicos (SB o SBA) al 20%, se agitaron durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a la esterilización de estas soluciones acuosas. Para ello, en la cámara de flujo laminar, se filtraron ambas soluciones a través de un filtro de membrana de 0.22 µm de diámetro de poro.

5. PLANTAS HOSPEDADORAS

Las plantas seleccionadas para la realización de los ensayos de este capítulo fueron trébol (*Trifolium repens*) y *Dorycnium pentaphyllum* Scop, según el objetivo del ensayo.

Dorycnium pentaphyllum

Es una especie autóctona de la Cuenca Mediterránea y por tanto con características morfo-fisiológicas adaptadas a ecosistemas semiáridos. Es un arbusto denso y con un sistema radical muy profundo, de más de 5 m en plantas de 40 cm de altura. Es una planta de crecimiento lento que crece en todo tipo de suelos, con base leñosa y que alcanza una altura de 1.2 m.



Dorycnium pentaphyllum se seleccionó para la realización de los ensayos del capítulo de revegetación, por ser una especie con capacidad reconocida de enraizar profundamente y formar una cubierta densa, por lo que retiene muy bien el terreno y por tanto es de alto valor protector para el suelo (López Gonzalez, 1995; Navarro Cerrillo & MartínezSuárez, 1996) Además, por ser leguminosa, forma simbiosis con *Rhizobium* y hongos micorrícicos arbusculares (HMA), por lo que esta especie tiene la ventaja añadida de ser capaz de fijar nitrógeno.

Las semillas fueron recogidas de la zona de los Cuadros (Fortuna, Murcia) donde *Dorycnium pentaphyllum* aparece en vaguadas con acumulación hídrica.

Trifolium repens (trébol blanco enano)



Es una leguminosa, que forma simbiosis con *Rhizobium* y hongos MA. Es una planta forrajera, que crece en todos tipos de climas y lugares, praderas, bordes de caminos, escombreras...La capacidad de recrecer presenta ventajas adicionales para las evaluaciones realizadas en determinados ensayos.

Trifolium repens se elige como modelo de estudios de invernadero por ser una planta que no requiere grandes cantidades de agua y que tiene una baja necesidad de fertilización debido a su capacidad como fijadora de nitrógeno, característica que la hace muy apropiada para ser sembrada en suelos pobres; además es una planta que tolera bien los cambios de temperatura extremos y otros tipos de estreses.

5.1 Esterilización de semillas

La esterilización de semillas se hizo dependiendo del tipo de semilla a utilizar en cada ensayo.

Las semillas de *Trifolium repens* se esterilizaron durante 15 min con lejía comercial al 10%, tras lo cual se lavaron con abundante agua destilada estéril y se dejaron en imbibición durante 30 min.

Las semillas de *Dorycnium pentaphyllum* se embebieron durante 30 min. en H₂SO₄ 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 (5 veces cada 3 min.)

5.2. Germinación de semillas

Las semillas de *Dorycnium pentaphyllum* una vez esterilizadas y embebidas, se transfirieron a un semillero con vermiculita estéril como sustrato para posteriormente, aquellas plántulas que presentaban semejante crecimiento, ser transferidas a las macetas definitivas.

6. INOCULACIÓN MICROBIANA

6.1. Inóculo micorrícico

6.1.1. Características del inóculo MA empleado en los ensayos efectuados

6.1.1.1. Ensayos de revegetación

Los inóculos utilizados en estos ensayos proceden de la provincia de Murcia y pertenecen a la colección de hongos de la EEZ. Las esporas se obtuvieron mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación (Gerdeman & Nicolson, 1963) Posteriormente fueron identificadas morfológicamente y a partir de ellas se produjeron los inóculos puros utilizando diferentes plantas trampa.

6.1.1.2. Ensayos de biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

En los ensayos de biorremediación de suelo contaminado con Cd, los tratamientos micorrizados recibieron 10 g de inóculo de una cepa de *Glomus mosseae* adaptada y tolerante a Cd. Este hongo fue aislado de suelo rizosférico de plantas crecidas en suelo artificialmente contaminado con Cd (270 mg Cd kg⁻¹ suelo) aplicado como sulfato de Cd CdSO₄ (Kádár, 1995). Esta contaminación se llevó a cabo en 1991 en RISSAC, Nagyhörsök (Hungria). El procedimiento de aislamiento fue el descrito en el apartado anterior.

Para aumentar la población nativa de I(Vivas *et al.*, 2005c)os hongos micorrícicos en este suelo contaminado con Cd y obtener inóculo de ellos, se prepararon cultivos trampa en suelo contaminado por Cd con *Trifolium repens*. Esta planta se encuentra comúnmente en estos suelos de forma natural, y fue elegida por su rápido crecimiento y proliferación de raíces. Dicho inóculo MA, que resultó ser exclusivamente *Glomus mosseae*, según identificación morfológica, se eligió por su mayor eficacia en suelos contaminados con Cd

(Vivas *et al.*, 2005b); Además, en un estudio comparativo frente a *Glomus mosseae* de colección, BEG 119, fue más eficiente en términos de nutrición y crecimiento de *Trifolium repens*

En los ensayos de biorremediación de suelos contaminados con Zn, los tratamientos micorrizados recibieron 10 g de inóculo de una cepa de *Glomus mosseae* adaptada al Zn. De la misma manera que el ecotipo anterior adaptado y tolerante al Cd, este hongo fue aislado de suelo rizosférico de plantas crecidas en suelo contaminado con Zn (270 mg Zn kg⁻¹ suelo), aplicado como ZnSO₄ (Kádár, 1995). Esta contaminación, similar a la del Cd, se llevó a cabo en 1991 en RISSAC, Nagyhörsök (Hungría).

Igualmente, para aumentar la población nativa de los hongos micorrícicos en suelo contaminado con Zn y obtener inóculo MA adaptado y tolerante al Zn, se prepararon cultivos trampa en suelo contaminado con Zn y como planta se utilizó *Trifolium repens* por las razones antes expuestas.

Este inóculo autóctono MA se eligió para la realización de este ensayo, ya que fue previamente probada su mayor eficacia en suelos contaminados por Zn frente a *Glomus mosseae* de colección, BEG 119, en términos de nutrición y crecimiento de *Trifolium repens* en suelos contaminados con Zn (Vivas *et al.*, 2006).

6.1.1.3. Ensayo de interacción en sistema compartimentados en suelo.

Las plantas micorrizadas se obtuvieron mediante inoculación con una mezcla de tres hongos MA aislados de Riotinto (España), *Glomus intraradices* (EEZ-54), *G. mosseae* (EEZ-55) y *Acaulospora trappei* (EEZ-56). Cada hongo MA se propagó independientemente en cultivos de macetas de *Trifolium repens* L. Cada contenedor contenía 10 g de inóculo de hongo MA que consistía en esporas, micelio y fragmentos de raíces micorrizadas.

6.1.2. 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 durante más tiempo que el resto de las partículas del suelo, serán retenidas, según su tamaño, en alguno de los distintos tamices empleados, dependiendo del tamaño de la malla. Específicamente se utilizaron 3 tamices superpuestos de 500, 250 y 50 µm de diámetro de poro. En cada uno de los cuales, se queda retenida una fracción distinta de la suspensión, así en el tamiz superior (500 µm) quedan restos de material vegetal (raíces) y fragmentos grandes del suelo. En el intermedio (250 µm), 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 μm) se retienen las esporas aisladas.

La operación del 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 para su conservación a 4° C hasta su posterior uso.

6.1.3. Producción de inóculo micorrízico

Como plantas hospedadoras se utilizaron *Sorghum bicolor* y *Trifolium repens*. Las semillas se esterilizaron, pregerminaron y plantaron. Como sustrato de crecimiento se empleó 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. Se evaluó el nivel de colonización MA y el número de esporas producidas por g de suelo. A partir de estos cultivos se obtuvieron los inóculos micorrízicos correspondientes, que consistieron en esporas, micelio y fragmentos de raíz micorrizada.

6.2. Inoculación de *Yarrowia lipolytica*

Y. lipolytica se mantuvo en placas de patata-dextrosa agar. A partir de esta placa se tomó una alícuota de clones de levadura y se hizo crecer en medio líquido cuya composición era (g/l de agua destilada): glucosa, 60; NH_4Cl , 3.0; KH_2PO_4 , 0.4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; extracto de levadura 0.5; el pH se estabilizó entre 4.5-5.5 con 7 g/l CaCO_3 . Se incubó a 30° C hasta obtener una concentración de $1.7 \cdot 10^6$ ufc ml^{-1} .

La inoculación se realizó aplicando 1 ml del cultivo líquido ($1.7 \cdot 10^6$ ufc) sobre la radícula de la planta.

6.3. Inoculación de *Rhizobium*

El cultivo de *Rhizobium* se llevó a cabo en el medio Ty durante 24 h a 28 °C hasta alcanzar su fase logarítmica de crecimiento.

La composición del medio Ty es en gl^{-1} de agua destilada: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.9; triptona 5; Extracto de levadura 3; agar 15)

La inoculación se realizó añadiendo 1 ml de cultivo bacteriano de *Rhizobium* sp con una población bacteriana de 10^8 ufc/ml de manera homogénea directamente sobre las semillas de trébol o sobre a la raíz de las plántulas de *Dorycnium pentaphyllum*.

7. CONDICIONES EXPERIMENTALES DE CRECIMIENTO

El tamaño de los contenedores para cultivo de las plantas nunca excedió de 1L. En algunos ensayos, las plantas crecieron en invernadero con temperaturas entre 19-25 °C, fotoperiodo 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, fotoperiodo de 14h. 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 regaron diariamente ajustándose a la cantidad de agua requerida (70 % ó 100% de la capacidad de campo, según tratamientos).

8. DETERMINACIONES DE CRECIMIENTO, PARÁMETROS SIMBIÓTICOS Y ESTADO NUTRICIONAL DE LA PLANTA

Tras la cosecha de cada ensayo se secaron las muestras de parte aérea en un horno a 65 °C durante 48 horas para la determinación de peso seco de parte aérea.

Posteriormente, se procedió a la molienda del material vegetal recolectado en un molinillo Wiley hasta alcanzar un tamaño de 0.5 mm.

La concentración foliar de nutrientes (N, P, K) y de metales pesados (Cd, Zn) se analizó mediante la técnica descrita por (Mingorance, 2002). Previamente se procedió a la digestión del material con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno en microondas abierto de acuerdo con los métodos del Comité Analítico.

El contenido de nitrógeno y fósforo en el material vegetal se determinaron por colorimetría utilizando un analizador automático de aire segmentado de flujo continuo (Bran +Luebbe TRACCS 2000, Bran+Luebbe, GMBH, Norderstedt, Alemania). El potasio se determinó por fotometría de llama (Jenway Ltd. PFP7, Essex, Reino Unido).

Cadmio y Zinc se determinaron por espectrometría de absorción atómica (Parking-Elmer 5000, Connecticut, Estados Unidos).

El recuento de números de nódulos, se hizo en raíces limpias por observación directa usando un microscopio binocular.

8.1. Tinción de raíces

8.1.1. Tinción de raíces con Azul tripán según protocolo de (Phillips & Hayman, 1970)

Este método 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 tripán al 0.05% en ácido láctico y se mantiene nuevamente al baño María durante 10 min. Se

elimina 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.

8.1.2. Tinción vital de raíces (succinato deshidrogenasa, SDH)

La tinción con 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 la 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 lavarán las raíces nuevamente, Las raíces se conservan en ácido láctico durante no más de 2 semanas.

Solución incubadora tinción SDH (50mL)	
Succinato de sodio hexahidratado 2.5 M.....	5 mL
Azul de tetrazolio (4 mg/mL)	12.5 mL
Tris-HCl 0.2M pH 7	12.5 mL
MgCl ₂ 5 mM.....	5 mL
Agua destilada	15 mL

Tabla 5: composición química de la solución incubadora utilizada en la tinción vital SDH.

8.2. Estimación de la colonización micorrícica según el método de (Trouvelot *et al.*, 1986).

Este método valora la biomasa fúngica presente en la raíz vegetal.

Se colocaron en un portaobjetos 30 fragmentos de raíz de 1 cm elegidos al azar.

A cada fragmento se le asignaron dos valores; el primer valor, entre un rango del 0 al 5, se refiere al nivel de colonización MA y el segundo valor que puede estar comprendido entre A0 y A3 se refiere a la riqueza de arbusculos formados en el fragmento micorrizado, según la figura 1.

Nivel de colonización

Hay 6 niveles (del 0 al 5) según el grado de infección del hongo (figura 1).

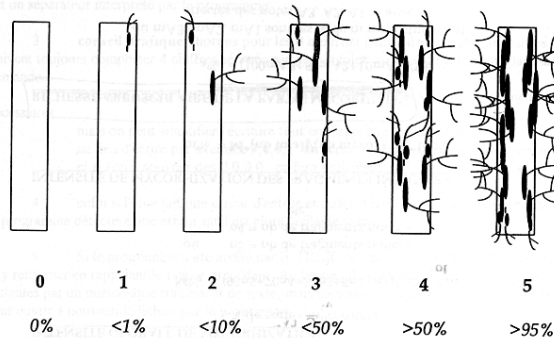


Figura 1: niveles de colonización según método de Trouvelot

Riqueza de arbusculos

Hay 4 niveles (A0 al A3) según la riqueza de arbusculos en el fragmento de raíz. (figura 2)

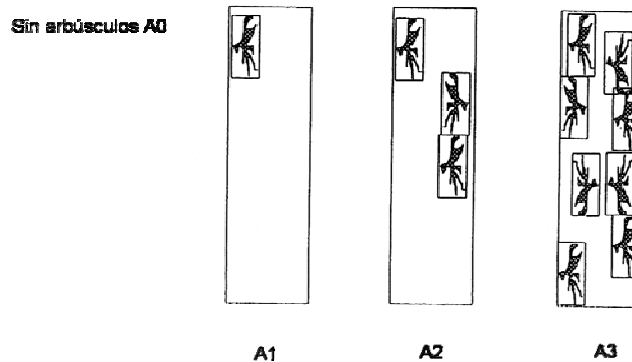


Figura 2: niveles de riqueza de arbusculos según método de Trouvelot.

Con posterioridad un programa informático calcula los siguientes parámetros: %F, %m, %M, %A, %a. La estimación de la longitud de raíz colonizada por el hongo (frecuencia de colonización, %F) viene dada como la proporción entre los fragmentos de raíz micorrizada y el número total de fragmentos observados; %m es una estimación de la intensidad de micorrización relativa sólo a la fracción de raíz micorrizada, mientras que %M es la intensidad de colonización relativa al conjunto total de raíces. La

abundancia de arbusculos (%a y %A), es una estimación de la riqueza de arbusculos en la fracción de raíz micorrizada y en el conjunto total de raíces, respectivamente.

Para más información consultar la siguiente página:

[http:// www.dijon.inra.fr/bbceipm/Mychintec/Mycocalc-prg/](http://www.dijon.inra.fr/bbceipm/Mychintec/Mycocalc-prg/).

9. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES Y PROLINA EN PARTE AÉREA DE LA PLANTA.

La extracción de los azúcares totales y la prolina se hace a partir de 1 g de hoja según el protocolo descrito por (Bligh & Dyer, 1959). Para ello, la muestra se homogeneiza con 3.75 ml de metanol durante 1 min en el vórtex. Este proceso se repite dos veces. Seguidamente esa mezcla se homogeneiza con 7.5 ml de cloroformo durante un minuto. Se añade 3.75 ml de una solución de H₂O salada al 0.88 % (p/v) y se agita. Centrifugamos a 5000 rpm durante 10 min a 0°C en una centrífuga refrigerada. En la capa superior se encuentra la fase metabólica que contiene azúcares totales, prolina, ácidos orgánicos, etc.

Para la determinación de azúcares totales, 0.1 ml de la fase metanólica obtenida en la extracción se hace reaccionar con 3 mL de antrona preparada extemporáneamente (200 mg antrona + 100 ml 72% (p/p) H₂SO₄). Se calienta al baño María durante 10 min según el protocolo descrito por (Irigoyen *et al.*, 1992). Tras enfriar se mide la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603 (Shimadzu, Tokio, Japón). La curva de calibración se hace con glucosa (20-400 µg ml⁻¹) y como blanco se utilizó agua destilada.

El contenido de prolina se determina por colorimetría (Bates *et al.*, 1973). Para ello se toman alícuotas de 1 mL de la fase metanólica del extracto vegetal que se hace 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 detiene 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

10. DETERMINACIONES EN SUELO

10.1. Determinación de la capacidad de campo y del punto de marchitamiento según el método de la membrana (Richards, 1954)

Tanto la capacidad de campo como el punto de marchitamiento se calcularon según el método de la membrana de (Richards, 1954).

La capacidad de campo se define como la cantidad de agua, expresada como unidad gravimétrica, de un suelo que ha sido humedecido abundantemente por riego o por lluvia, y al que después se ha dejado drenar libremente durante 48 horas.

El punto de marchitamiento es el contenido de humedad en la zona de las raíces, para el cual la planta se marchita y no puede recobrar igual turgencia al colocarla en una atmósfera saturada de humedad durante 12 horas.

A partir de los valores de la capacidad de campo y del punto de marchitamiento se calcula el intervalo de agua disponible (IDH), que se define como el agua del suelo que puede ser absorbida a un ritmo adecuado para permitir el crecimiento normal de las plantas que viven sobre dicho suelo. Se calcula restando al valor de la capacidad de campo el valor correspondiente al punto de marchitamiento, expresado en unidad gravimétrica.

El método de la membrana de Richards es un método de presión, que consiste en aplicar a la muestra previamente saturada en agua y colocada sobre una membrana porosa, una presión determinada. De esta forma se extrae de ella toda el agua que está retenida con un potencial matricial más bajo que la presión aplicada. Para el cálculo de la capacidad de campo la presión aplicada es de 1/3 atmósferas, y para la del punto de marchitamiento de 15 atmósferas.

En primer lugar, se colocan las arandelas sobre la membrana porosa y se ponen en su interior una cantidad suficiente de suelo molido y tamizado a 2 mm. Las muestras se saturan a continuación con agua durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se elimina el exceso de agua y se introduce el conjunto (membranas, arandelas y muestras) en la olla de presión (Figura 3). Se regula la presión deseada (1/3 ó 15 atmósferas, según la determinación) y se mantiene 24-48 horas. Al cabo de ese tiempo se determina el porcentaje de humedad de las muestras según el método gravimétrico. Este método se basa en estimar la cantidad de agua presente en el suelo por diferencia de pesada entre el suelo húmedo y el suelo seco. El procedimiento es el siguiente, una vez tarados los pesa-sustancias (tara= P1), se pone en ellos una cantidad de muestra de suelo (húmedo) y se pesa el conjunto (peso=P2). El pesa-sustancias se introduce destapado en la estufa a 105 oC, y se mantiene allí hasta peso constante (24 horas). Cuando la muestra esté seca, se lleva a secador para evitar su rehidratación durante el enfriamiento, y se vuelve a pesar (peso= P3).

Finalmente se aplica esta fórmula:

$$\%H = \frac{P_2 - P_3}{P_3 - P_1} \times 100$$

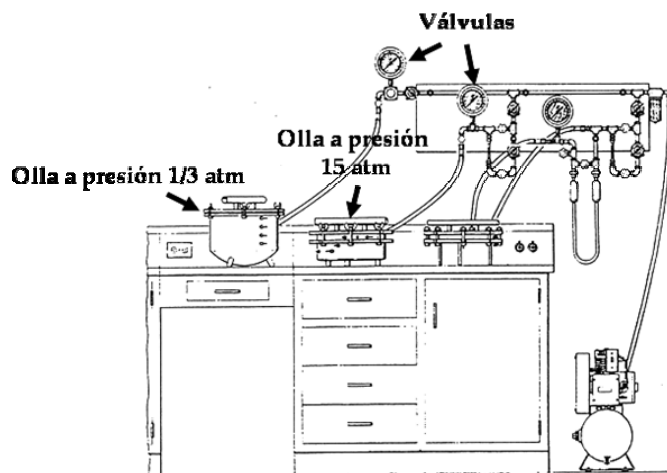


Figura 3: esquema del equipo de laboratorio para la extracción de la humedad del suelo

10.2. Determinación de pH y conductividad eléctrica

A partir de la obtención de un extracto acuoso en la relación 1:5 (sólido:líquido) mediante agitación mecánica durante 2 horas, se midió el pH utilizando un pH-metro Crisol, modelo Basic 20 y la conductividad eléctrica, utilizando un conductímetro Crisón, modelo 522.

10.3. Determinación de carbono hidrosoluble y carbohidratos hidrosolubles

Ambas propiedades químicas se miden a partir de un extracto acuoso en la relación 1:5 (sólido:líquido) obtenido por agitación mecánica.

El carbono hidrosoluble se determina con el analizador de carbono orgánico total modelo TOC-5050 A, dando la medida directamente.

Para la determinación de carbohidratos hidrosolubles se sigue el método descrito por (Brink *et al.*, 1960), para ello, a 1 ml del extracto de suelo se le añade 4 ml del reactivo de antrona, se agita y posteriormente se calienta al baño María durante 10 minutos a 80 °C. Después se enfría en hielo y se mide en espectrofotómetro a 630 nm. Se realiza una recta de calibrado utilizando distintas concentraciones de glucosa.

10.4. Determinación de estabilidad de agregados estables del suelo al impacto de una lluvia artificial de energía conocida, según protocolo de (Kemper & Rosenau, 1986)

El equipo de análisis consta de dos bases circulares de metacrilato, con orificios en la base superior para insertar los vasos de metacrilato (cuyo fondo es un tamiz de 0.25 mm de luz) y en la base inferior los vasos metálicos. Estas dos bases están conectadas a un motor que permite el ascenso y descenso de la base superior sobre la inferior. Fig 4.

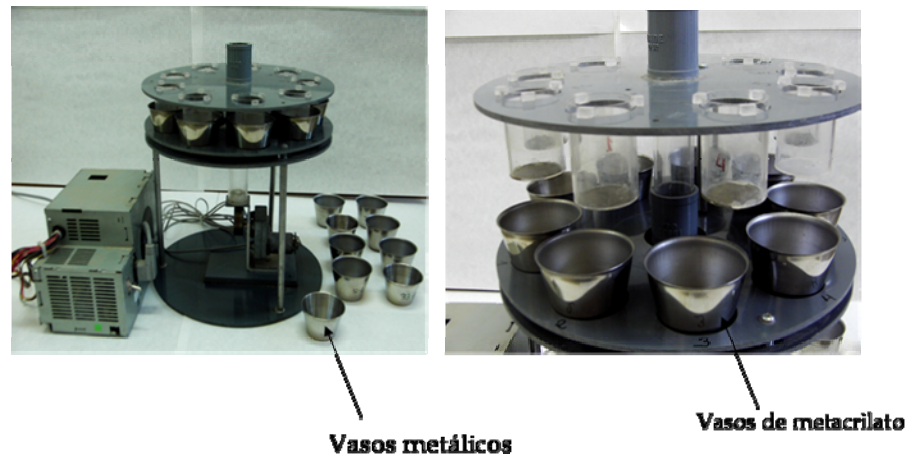


Figura 4: Equipo de análisis para la determinación de agregados estables

Se pesan 4 g de suelo de entre 1 y 2 mm y secados al aire libre. Se depositan en los vasos de metacrilato cuyo peso es P. Se humedece el suelo mediante pulverización durante 10 minutos. A los vasos metálicos numerados (cuyo peso es P) se les añade 25 ml de agua destilada estéril y ambos vasos se colocan en su lugar correspondiente del equipo. Se pone en marcha el motor, durante 3 min (35 ciclos/min) para completar 105 inmersiones de los vasos de metacrilato en los vasos metálicos. Los vasos de acero se cambian por otro set conteniendo esta vez 25 mL de una solución dispersante (2 g de hexametáfosfato sódico/L). Finalmente se procede a la evaporación del agua contenida en los vasos metálicos, y al pesado de estos (P_1 , P_2).

Cálculos

El porcentaje de agregados estables se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ EA} = \frac{\text{Ph}}{\text{Ph} + \text{Pa}} \times 100$$

Donde **Pa** es el peso suelo obtenido tras agitación en agua: P₁-P y

Ph es el peso del suelo obtenido tras agitación en hexametáfosfato sódico: P₂-P-0.05 g (peso del disgregante añadido/recipiente metálico).

10.5. 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 los controles correspondientes, 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, y comparando los resultados con los obtenidos en una curva patrón de concentraciones conocidas.

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 $\lambda = 490 \text{ nm}$. Este método surge como una combinación de dos métodos anteriores (Benefield *et al.*, 1977; Trevors, 1984). Los resultados se expresan como $\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$

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 0.115 M y 2 mL de tampón Maleato 0.1 M 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 CaCl₂ 0.5 M y se mide la

absorbancia en espectrofotómetro a longitud de onda $\lambda = 398$ nm. Los resultados se expresan como $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$

β -glucosidasa (Hayano & Tubaki, 1985)

Para la determinación de la actividad β -glucosidasa, a 0.1 g de suelo rizosférico se le añadió 0.5 mL de sustrato PNG (4-nitrofenil β -D-glucopiranoside) 0.05 M y 2 mL de tampón maleato 0.1 M 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 CaCl₂ 0.5 M.

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 $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Ureasa (Nannipieri et al., 1980)

Para la determinación de la actividad ureasa, a 0.5 g de suelo se le añaden 2 ml de tampón fosfato 0.1 M pH 7 y 0.5 ml de disolución de urea 6.4%. Para cada muestra se prepara un control al que no se añade urea. Se incuba en baño de agua a 30 °C durante una hora y media, llevando a continuación el volumen hasta 10 ml con agua destilada. Se centrifuga a 3400 r.p.m. durante 8 minutos. Luego se coge 1 ml del sobrenadante y se lleva a un volumen de 10 ml con 0.8 ml de citrato sódico, 1.6 ml de mezcla A (15.62 g salicilato sódico + 4 ml nitroprusiato sódico 1% en 200 ml) 0.8 ml de mezcla B (0.5 g dicloroisocianurato de sodio + 4 g de NaOH, en 100 ml) y se completa con agua destilada. A continuación se guarda en oscuridad durante 45 minutos. La lectura se realiza en el espectrofotómetro a 660 nm.

Proteasa- BBA (Nannipieri et al., 1980)

A 0.5 g de suelo se le añaden 2 ml de tampón fosfato 0.1 M pH 7 y 0.5 ml de BAA (N- α -benzoil-L-argininamida) 0.03 M. Para cada muestra se prepara un control al que no se le añade sustrato. Se incuba en baño de agua a 40 °C durante una hora y media, llevando a continuación el volumen hasta 10 ml con agua destilada. Los siguientes pasos coinciden con los descritos en la técnica anterior.

10.6. Determinación de Ácido Indol Acético (AIA) rizosférico según el método colorimétrico desarrollado por (Mitchell & Brustetter, 1939; Gordon & Weber, 1950)

A 2.0 g de suelo seco, colocados en tubos de centrifuga de 50 ml, se les añade 6 ml de un tampón fosfato (pH 7.5) con glucosa, (1 g glucosa/100 ml tampón fosfato) y 4 ml de L-triptófano (1 g triptófano/100 ml H₂O). Como controles se realizaron las mismas mezclas pero sin adición de L-triptófano. Las mezclas se agitaron, y seguidamente se incubaron

en reposo a 37 °C durante 24 h en la oscuridad. Para la extracción, primero se añadió 2 ml de una solución de ácido tricloroacético para inactivar a las enzimas involucradas en la formación de auxinas. Posteriormente, se añadió 1 ml de una solución 0.5 M de CaCl₂. La solución del suelo se centrifugó a 5000g. Se tomaron 3 ml del sobrenadante y se añadieron a un tubo de ensayo, haciéndolas reaccionar con 2 ml de reactivo de Salper (2 mL cloruro férrico 0.5 M y 98 ml de ácido perclórico al 37%), dejándose en incubación en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min, (Wöhler, 1997). Posteriormente se midió la absorbancia de la mezcla de reacción 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.

10.7.Determinación de longitud de micelio MA extraradical en suelo (Jakobsen *et al.*, 1992)

Tras homogeneizar las muestras de suelo de cada tratamiento, se pesaron 2 g (dos repeticiones) y mezclaron con 250 ml de agua en una licuadora durante 30 segundos. Inmediatamente se transfirió a un matraz Erlenmeyer con tapón. Se agitó vigorosamente y se dejó en reposo durante 60 segundos. Se tomaron dos alícuotas de 3 ml cada una y se transfirieron a los filtros (25 mm y 1.2 µm de diámetro) colocados en el aparato de filtración múltiple (Millipore). Tras la filtración a vacío, se añadió 2 ml de azul tripán al 0.1%, y se dejó en tinción durante 5 minutos. Se filtró, y se procedió al lavado del filtro con agua. Los filtros se transfirieron a los portaobjetos y se dejaron secar. Antes de cuantificar se añadieron unas gotas de glicerol y se cubrió con el cubreobjetos. Para la medida de la longitud de la hifa, se contaron en 25 campos de visión, todas las intersecciones entre la hifa y las líneas de un área cuadrículada a 160-200 x de aumento.

Utilizando la fórmula de (Tennant, 1975), se calculó la longitud de hifa en los 25 campos de visión:

Longitud = $11/14 \times N \times$ Unidad de la cuadrícula.

N = número de intersecciones por cuadrícula.

Unidad de cuadrícula = longitud de un lado de la cuadrícula.

Finalmente se extrapolaron los datos a longitud de hifa por g de suelo.

10.8. Análisis de ácidos grasos en suelo

Tras el secado al vacío del suelo, se procedió a la extracción de los ácidos grasos totales a partir de 2.5 g de suelo de ambos compartimentos laterales utilizados en el diseño experimental: La extracción se llevó a cabo mediante un proceso de extracción de cuatro fases: Saponificación, metilación, extracción y lavado básico, de acuerdo con el método de (Sasser, 1990).

Durante la saponificación, se produce la lisis de las células, la escisión de los ácidos grasos de los lípidos celulares y su conversión en sus correspondientes sales sódicas. Cada tubo de ensayo contenía 2.5 g de suelo liofilizado y 150 ml de una base metabólica (150 g $^{-1}$ L de hidróxido sódico 1:1 v/v metanol: agua destilada desionizada). Se les colocaron sus correspondientes tapones a los tubos de ensayo y se colocaron al baño María a 100 °C durante 30 minutos.

En el proceso de metilación las sales sódicas de los ácidos grasos se convierten en esteres metílicos para incrementar la volatilidad de los ácidos grasos para el análisis por cromatografía de gases. Para ello, los tubos se enfriaron a temperatura ambiente en un baño de agua y posteriormente se añadió 2 ml de un reactivo de metilación (54% 6N HCl en metanol v/v). Después de agitar en el vortex durante 10 segundos los tubos de ensayo se colocaron en un baño de agua a 80 °C durante 10 minutos y se enfriaron rápidamente a temperatura ambiente en un baño de hielo.

El paso siguiente es la extracción, en la que los esteres metílicos se transfieren de la fase acuosa ácida a la fase orgánica con la técnica de extracción líquida-líquida. Para ello, se añadió 1.25 ml de solvente de extracción (1:1 v/v hexano: eter metil terbutílico). Se rotaron los tubos durante 5 minutos.

Para permitir la cuantificación de los esteres metílicos de los ácidos grasos, se añadió a cada muestra un estándar interno, una cantidad conocida del ester metílico del ácido graso nonadeconoato 19: 0. Los tubos se volvieron a rotar durante 10 minutos y se centrifugaron durante 2 min (2000 rpm a 20 °C).

En el lavado básico se eliminan los ácidos grasos libres y los agentes residuales. A cada tubo se añadió 3 ml de una solución básica de hidróxido sódico diluido (12 g $^{-1}$ L agua destilada desionizada) y se agitó durante unos cuantos segundos. Posteriormente los tubos se rotaron durante 5 minutos y se centrifugados durante 3 minutos (2000 rpm a 20°C). Para precipitar la capa de materia orgánica de la superficie, se añadieron aproximadamente 6 gotas de NaCl. Posteriormente se agitaron los tubos y se dejaron en reposo durante unos minutos para seguidamente transferir 2/3 de la fase superior a unos tubos limpios. A partir de este paso los tubos se pueden almacenar a 5°C o se puede continuar con el procedimiento. Se añadió gas nitrógeno para acelerar la evaporación y así concentrar los ácidos grasos. El "pellet" obtenido consistía en los esteres metílicos de los ácidos grasos y se resuspendieron en 200 ml de hexano. 40 ml de la solución se

transfirieron a un vial pequeño colocado sobre otro vial de cristal que tenía 200 ml de hexano. Las muestras se taparon con sus tapones correspondientes y se almacenaron a 5°C hasta su inyección en el cromatógrafo de gases.

Los análisis de la cromatografía de gases y la identificación de los ácidos grasos se realizaron de acuerdo a la base de datos TSBA 41 (Parsley, 1996). Los ácidos grasos se identificaron según su tiempo de retención relativo a un estándar conocido y se cuantificaron en relación a los datos de área y anchura de los picos del resto de ácidos grasos en la muestra. Las cantidades relativas del pico de cada ester metílico de ácidos grasos se expresó como porcentaje con respecto al área del pico de todos los esteres metílicos de los ácidos grasos. Los ácidos grasos totales marcadores utilizados en este experimento están resumidos en la tabla 6. El ácido graso 16:1 ω5 se utilizó para los hongos MA (Olsson *et al.*, 1998), 18:2 ω 6,9 para hongos saprofiticos (Frostegård & Bååth, 1996; Larsen *et al.*, 1998), la cadena ramificada localizada en la posición *iso* y *anteiso* (i14:0, i15:0, i16:0, i17:0, i19:0) para bacterias Gram positivas (Ratledge & Wilkinson, 1988; Zelles, 1997), el ácido graso ciclopropílico (cy 17:0, cy 19:0) para las bacterias Gram negativas (Wilkinson, 1988; Zelles, 1997), y 10 Me 17:0 y 10 Me 18:0 para actinomicetos. (Kroppenstedt, 1985; Ravnskov *et al.*, 1999; Frostegård *et al.*, 1992)

Ácido graso	Especificidad		
	Grupo	Dentro del grupo	Marcador
10:0 3OH	Bacteria	Gram negativa	
12:0 2OH	Bacteria	Gram negativa	
12:0 3OH	Bacteria	Gram negativa	
16:0 2OH	Bacteria	Gram negativa	
16:0 3OH	Bacteria	Gram negativa	
17:0 ciclo	Bacteria	Gram negativa	
19:0 ciclo	Bacteria	Gram negativa	
14:0 iso	Bacteria	Gram negativa	
15:0 iso	Bacteria	Gram negativa	
15:0 antiiso	Bacteria	Gram negativa	
16:0 iso	Bacteria	Gram negativa	
17:0 iso	Bacteria	Gram negativa	
17:0 antiiso	Bacteria	Gram negativa	
19:0 iso	Bacteria	Gram negativa	
16:1w 5	Bacteria	Gram negativa	<i>Glomus</i>
	y hongo	Zigomicetos	
18:2w 6,9	hongo		hongos saprófitos
16:0 10 metil	Bacteria	Actinomicetos	
17:0 10 metil	Bacteria	Actinomicetos	
18:0 10 metil	Bacteria	Actinomicetos	

Tabla 6. Ácidos grasos marcadores utilizados en este ensayo.

11. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS MONOXÉNICOS

Para el desarrollo del ensayo en cultivo monoxénico, se han utilizado placas petri bicompartimentadas.

Como material vegetal se utilizaron raíces de zanahoria (*Daucus carota* L) DC1 transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* y como material fúngico se utilizó el hongo micorrícico *Glomus intraradices* Smith & Schenck (DAOM 197198, Biosystematic Research center, Ottawa, Canadá).

El establecimiento de los cultivos se realizó siguiendo la metodología descrita por (St Arnaud. *et al.*, 1996), con algunas modificaciones. En uno de los compartimentos de la placa, denominado de la raíz o CR, se añadió medio M, mientras que en el otro, compartimento de las hifas o CH, se puso medio sin sacarosa (medio M-C). En el compartimento de la raíz se colocó un fragmento de unos 3-4 cm de una raíz joven procedente de un cultivo axénico de raíces en medio M y el inóculo fúngico, consistente

en un cubo de unos 0.5 cm³ de medio que contenía al menos unas 50 esporas de *Glomus intraradices*. Las placas se mantuvieron a temperatura constante de 24°C.

11.1. Composición del medio M (Chabot *et al.*, 1992) para el cultivo monoxénico de los hongos micorrícicos.

1.21 mM	Ca(NO ₃) ₂
21.8 mM	NaFe/EDTA
4.51 μm	KI
10%	Solución de macroelementos
0.10%	Solución de microelementos
1%	Vitaminas
1%	Sacarosa
0.35%	Phytigel

Finalmente se ajustó el pH a 5.5 con NaOH y el medio se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min.

Solución de macroelementos:

30 mM	MgSO ₄
7.9 mM	KNO ₃
8.7 mM	KCl
0.35 mM	KH ₂ PO ₄
1.4 mM	NaH ₂ PO ₄
14 mM	NaSO ₄

Solución de microelementos

30 mM	MnCl ₂
9.3 mM	ZnSO ₄
24.2 mM	H ₃ BO ₃
5 mM	CuSO ₄
10 μM	Na ₂ MoO ₄

Vitaminas (100x)

4mM	glicina
29.6 μ M	hidrocloruro de tiamina
49 μ M	hidrocloruro de piridoxina
0.4 mM	ácido nicotínico
27.7 mM	mio-inositol

11.2. Cuantificación de la longitud de micelio MA extrarradical, número de BAS y esporas en cultivo monoxénico.

La longitud de micelio se calculó en el estereomicroscopio utilizando el método de intersección lineal (Newman, 1966). Sobre un número de puntos seleccionados al azar en el CH de la placa petri, se contaron todas las hifas que cruzaban la línea del ocular, cuya longitud era de 2.2 mm. El número de puntos seleccionados oscilaron de veinte a cuarenta para cada placa, dependiendo de la variabilidad obtenida; es decir, hasta que el coeficiente de varianza se mantuvo constante.

El número total de esporas y de BAS (referidas a un cm^2) también se contabilizaron al estereomicroscopio. Sobre un número de puntos seleccionados al azar según el mismo protocolo seguido para la longitud de hifas, se contaron todas las estructuras (esporas y BAS) presentes en el área de un rectángulo del ocular, que correspondía a 0.0126 cm^2 .

12. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DEL RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO AL ESPECTRÓMETRO DE MASA (CG/EM)

El análisis GC/MS se realizó en un cromatógrafo de gas Varian 3800 acoplado a un espectrómetro de masas secuestrador de iones Saturn II. La separación de los compuestos se realizó utilizando un programa de temperatura de 50 a 270 $^{\circ}\text{C}$ y una columna de sílica gel WCOT cubierta con DP-SIL 8CB de un grosor de $0.25 \mu\text{m}$. Las muestras se introdujeron por inyección (1:50) a 250 $^{\circ}\text{C}$.

12.1. Preparación de las muestras para inyección en CG/EM

Se realizaron dos análisis de CG/EM.

Para el primer análisis, los componentes de la muestra se extrajeron con dietileter 1:1 (v/v) (25ml de muestra: 25 ml de dietileter). La fase etérea se aisló y se secó con Na_2SO_4 , y

posteriormente se evaporó hasta aproximadamente 0.1 ml para su posterior inyección en el aparato.

Para el segundo análisis, de nuevo una alícuota (25 ml) de las muestras se extrajeron con 25 ml de dietileter. La fase etérea se secó con Na_2NO_4 y el eter se evaporó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en metanol que contenía HCl seco (1.25 M). La solución se dejó a temperatura ambiente toda la noche y se evaporó bajo presión reducida. El residuo se redisolvió en 0.5 ml de acetona y se analizó por CG/EM utilizando los mismos parámetros descritos anteriormente.

La identificación confirmada del ácido ferúlico se llevó a cabo mediante la comparación con el tiempo de retención y el espectro de masas del autentico ácido ferúlico. Para el análisis del ácido ferúlico auténtico, se disolvió aproximadamente 1 mg de ácido ferúlico, en 10 ml de metanol que contenía HCl seco (1.25 M). La solución se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche y se evaporó bajo presión reducida. El residuo se suspendió en 10 ml de acetona y se analizó por CG/EM utilizando los mismos parámetros descritos anteriormente.

**IV INTERACCIÓN DE INOCULANTES MICROBIANOS
Y RESIDUOS AGROINDUSTRIALES
BIOTRANSFORMADOS EN REVEGETACIÓN.**

IV. 1. Introducción

1 INTRODUCCIÓN A LA PROBLEMÁTICA DE LOS ECOSISTEMAS MEDITERRÁNEOS. JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES.

Los medios geográficos semiáridos mediterráneos se caracterizan por unas condiciones climáticas severas, con una precipitación anual baja (alrededor de 289.8 mm) y una temperatura media anual relativamente alta (16 °C aproximadamente) existiendo por tanto un déficit anual de agua bastante importante (537.6 mm). Este hecho, unido a la ascendente deforestación de estos ecosistemas, conduce a un proceso de desertificación de los mismos (Francis & Thornes, 1990); (Morgan *et al.*, 1990). La desertificación es, por tanto, el resultado de una progresiva degradación tanto de la calidad del suelo (disponibilidad de nutrientes, actividad microbiana, estructura del suelo, etc) como de la cubierta vegetal (Barea & Jeffries, 1995). Consecuentemente, la desertificación implica una pérdida de la vegetación existente y un incremento en la erosión del suelo, especialmente ante la acción de las aguas de escorrentía superficial (Francis and Thornes, 1990; Morgan *et al.*, 1990).

Uno de los objetivos prioritarios del Acta Única Europea es la conservación y mejora del medio ambiente, dando especial énfasis en la biodiversidad y protección de la naturaleza. En este sentido, España, a través de convenios y acuerdos internacionales resultantes de la Conferencia de Río de 1992, estableció como áreas de acción prioritaria, entre otras, la lucha contra el avance de la desertificación. Para ello, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), a través del Instituto de Conservación de la Naturaleza (ICONA) y en colaboración con las Comunidades Autónomas, determinó la necesidad de reforestar, como estrategia de restauración de ecosistemas degradados, mediante la introducción de especies autóctonas que permitieran mantener y potenciar la biodiversidad. Dentro de este contexto, se incluye el proyecto I+D, CICYT REN 2000-1724-CO3, bajo cuyo amparo se enmarca las investigaciones realizadas en este capítulo de esta tesis doctoral. El objetivo de este proyecto era el incremento de la diversidad biológica en masas de pino carrasco procedentes de repoblación.

A partir de 1900, pero más intensamente, desde 1950, se procedió a la repoblación con carácter protector de la vertiente Mediterránea española con pino carrasco (*Pinus halepensis* Mill). Durante esta repoblación se favoreció las masas monoespecíficas de *P.halepensis*, en detrimento del matorral, que fue parcialmente eliminado bien para evitar competencia o bien como método de prevención frente a incendios forestales. Ello condujo a la implantación en el Mediterráneo semiárido español de grandes masas forestales artificiales de pino carrasco con estructura simple y muy escasa diversidad, provocando suelos compactos y con escaso contenido en materia orgánica. Hoy día, bajo el marco implantado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), en

el que se encuentra este proyecto CICYT, al objetivo principal de corrección de la erosión, mediante la implantación de pinares, se suma otra serie de objetivos basados en la conservación de la biodiversidad y el mantenimiento de los procesos ecológicos esenciales. Debido a que la regeneración natural de la vegetación tiende a ser lenta en este tipo de ecosistemas, donde la escasez de agua limita el establecimiento de plantas y su crecimiento, se hace necesario llevar a cabo estrategias de reclamación/recuperación de estos suelos, mediante la implantación de las comunidades de plantas autóctonas originales, acelerando así la sucesión natural de las especies (Herrera *et al.*, 1993).

De acuerdo con diversos autores, la estrategia de revegetación más apropiada para la Cuenca Mediterránea debe basarse en la implantación de especies arbustivas, subarbustivas y herbáceas más que de arbóreas, ya que son de crecimiento rápido y poseen una alta capacidad de enraizar profundamente y de mejorar la calidad del suelo mediante la formación de agregados estables. Estudios de Herrera *et al.*, (1993) recomiendan la utilización de plantas leñosas leguminosas, debido a su capacidad para fijar N₂, mediante la asociación con especies de *Rhizobium*, y de formar simbiosis micorrícica arbuscular. Entre estas leguminosas, destaca *Dorycnium pentaphyllum*, un arbusto de crecimiento lento, que pertenece a la sucesión natural de las comunidades de plantas de los ecosistemas mediterráneos semiáridos del Sureste de España. Es una planta bien adaptada a las condiciones de limitación hídrica, propia de estas zonas, y por tanto candidata a ser podría utilizada en programas de reforestación.

La restauración vegetal en estas áreas, se enfrenta a un grave problema, consistente en la existencia de suelos degradados con baja tasa biológica y escasa actividad microbiana lo que incluye la pérdida del componente simbiote microbiano. Por tanto, para asegurar el establecimiento de las plantas en dichas condiciones se aconseja tanto la inoculación de hongos micorrícicos arbusculares y otros microorganismos beneficiosos como la realización de labores previas de preparación del suelo, lo que puede conseguirse con la incorporación de una enmienda orgánica (procedente de la transformación biológica de un residuo orgánico).

2. SIGNIFICADO DE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO EN UN PROCESO DE REVEGETACIÓN.

El funcionamiento de un ecosistema edáfico depende en gran medida de la actividad microbiana del suelo, dado que los ciclos biogeoquímicos que ocurren en la naturaleza son propulsados por microorganismos que además, protagonizan otras diversas acciones que también producen beneficios para las plantas a las que se asocian; entre ellas destaca el facilitar la captación de nutrientes, la producción de fitohormonas que estimulan el enraizamiento, la protección de la planta frente patógenos, la descomposición de sustancias tóxicas en el ecosistema y la mejora de la estructura del suelo (Smith & Papendick, 1993; Barea & Jeffries, 1995); En suelos degradados ocurre un descenso en el

número de propágulos de la microbiota del suelo y/o de su actividad. Esto se debe a que las plantas regulan en los procesos microbiológicos que se llevan a cabo en la rizosfera, ya que éstas son las principales suministradoras de sustratos energéticos al suelo. El deterioro de los sistemas suelo-planta afecta a las relaciones planta-microorganismos lo cual representa un factor ecológico crítico en el crecimiento de las plantas en ecosistemas degradados desencadenando un círculo vicioso de efectos negativos (Requena *et al.*, 2001). 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.

La interacción microorganismo-planta presenta otros aspectos decisivos en la recuperación de la cobertura vegetal, ya que la acción microbiana es, también, uno de los factores que más influyen en la formación y mantenimiento de los agregados estables lo que se traduce en una mayor resistencia del suelo frente a los fenómenos erosivos. Los mecanismos de agregación inducidos por los microorganismos pueden ser meramente físicos (Sauerbeck, 1987) o bien fisiológicos, mediante la formación y excreción de polisacáridos que actúan como elementos cementantes (Lynch & Bragg, 1985).

En los sistemas suelo-planta existen una serie de microorganismos beneficiosos que son claves en el contexto de la sostenibilidad de tales sistemas, entre los que se encuentran los hongos formadores de micorrizas y los microorganismos promotores del crecimiento de la planta. Se ha demostrado que ambos grupos son importantes en estudios de revegetación (Barea *et al.*, 1996).

2.1. Aplicación de los hongos MA en revegetación.

Las micorrizas desempeñan un papel crucial en las primeras etapas de la vida de las plantas, sobre todo en suelos degradados por procesos erosivos, incendios forestales, laboreo excesivo, contaminación, y en suelos sometidos a condiciones de estrés (sequía, salinidad, cambios bruscos de temperatura, deficiencia de nutrientes), característicos de los ecosistemas mediterráneos del Sudeste Ibérico. Centrándonos en el estrés hídrico, que es uno de los principales condicionantes del establecimiento de las plantas en la vertiente Mediterránea, diversos estudios a nivel fisiológico han demostrado que la simbiosis MA 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 & Boyer, 1971), se concluía que la simbiosis MA probablemente afectaba las relaciones hídricas de las plantas de manera indirecta, a través de una mejora de la nutrición fosforada de las mismas. Pero evidencias experimentales demostraron que los efectos de las MA sobre las relaciones hídricas e intercambio gaseoso de las plantas podía llevarse a cabo de forma independiente de la nutrición fosforada. Esto supuso un paso decisivo en

el conocimiento de las 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 al efecto producido por el incremento en la captación de P (Augé, 2001; Ruiz-Lozano et al., 2003).

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:

- *Absorción y transferencia de agua a través de las hifas fúngicas.*
- *Ajuste osmótico*
- *Mejora del intercambio gaseoso*
- *Cambios en la capacidad de retención de agua del suelo*
- *Estimulación de actividades asimilativas esenciales para la planta*
- *Cambios hormonales*
- *Protección frente al daño oxidativo generado por la limitación hídrica.*

Los hongos formadores de micorrizas son claves en estrategias destinadas a frenar la erosión y la desertificación. En ecosistemas Mediterráneos, se acepta que la revegetación debe iniciarse con especies arbustivas autóctonas de tales ambientes; de la misma manera, se ha demostrado que el máximo beneficio de la inoculación con hongos formadores de micorrizas arbusculares se alcanza tras una selección controlada de aquellos hongos que muestren un mayor nivel de compatibilidad funcional y ecológica con el área y especie vegetal a restaurar. Puesto que la erosión, especialmente la que sufre el sudeste ibérico, produce una importante disminución, e incluso desaparición, de propágulos microbianos del suelo, la reintroducción de dichos microsimbiontes autóctonos puede ser clave en un programa de revegetación. En este sentido, se ha apuntado la importancia de las llamadas “islas de fertilidad y recursos”, que se generan en las rizosferas de plantas que crecen aisladas en áreas degradadas como fuente de inóculo de microsimbiontes. Requena et al., (2001) estudió, en un ensayo de campo en condiciones naturales, la influencia de distintos hongos micorrícicos (alóctonos y autóctonos) sobre el desarrollo de *Anthyllis cytisoides* con fines de revegetación. Los resultados pusieron de manifiesto que la efectividad inicial de la inoculación con hongos MA de colección fue superada por los efectos de la mezcla de hongos nativos a medida que transcurre el proceso de restauración. Estas conclusiones corroboran la importancia de utilizar hongos propios del ecosistema, confeccionando inóculos mixtos en una proporción que simule la diversidad natural, para incrementar el tamaño de las poblaciones naturalmente existentes y obtener el máximo beneficio de su actividad sobre el desarrollo vegetal.

3. SIGNIFICADO DE LAS ENMIENDAS ORGÁNICAS EN UN PROCESO DE REVEGETACIÓN.

Cuando el estado de degradación es acusado, el suelo no sólo ha perdido la gran parte de su potencial biológico, sino que la mayoría de sus propiedades físicas y de fertilidad están tan mermadas que no permiten la instauración de la cubierta vegetal deseada. En estas condiciones, se plantea la realización de un acondicionamiento previo del suelo que permita o favorezca la implantación del material vegetal, y en su caso, de los microorganismos inoculados. La metodología más utilizada, y que al mismo tiempo se ha mostrado más efectiva, es la aplicación de enmiendas orgánicas (Caravaca *et al.*, 2004). Se ha demostrado que las enmiendas orgánicas mejoran la calidad del suelo (Bastian & Ryan, 1986) e incrementan su fertilidad (Díaz, 1992). La introducción de una enmienda orgánica en el suelo promueve el desarrollo de reacciones químicas, físico-químicas y procesos microbiológicos. Estas reacciones conducen a modificaciones en las características físicas del suelo, que se traducen en aumentos de la capacidad de retención de agua, infiltración, porosidad y estabilidad estructural (Albaladejo *et al.*, 1996)

3.1. Principales funciones de la materia orgánica en el suelo.

a) Estructura

La formación y estabilidad de agregados del suelo se ve favorecida por la materia orgánica, básicamente por la acción promotora que ésta tiene sobre las poblaciones de los microorganismos. Por un lado, los polisacáridos y otras sustancias mucilaginosas procedentes del metabolismo microbiano juegan un papel importante en la agregación de las partículas del suelo (Lax & Garciaorenes, 1993), y por otro, las hifas y micelios de los hongos microscópicos también actúan manteniendo unidas las partículas del suelo (Miller & Jastrow, 1990; Roldan & Albaladejo, 1994);. La formación de agregados y su estabilidad permiten hacer más permeables los suelos pesados y más compactos los ligeros. La adición de enmiendas orgánicas también produce un aumento en la porosidad y una reducción de la densidad del suelo, efectos que se ha comprobado persisten durante años incluso con bajas dosis de aplicación (Wei *et al.*, 1985). Todas estas acciones sobre la estructura del suelo contribuyen a que éste sea más resistente a la erosión y se aleje el peligro de la desertificación.

b) Capacidad de retención hídrica

La materia orgánica, además de contribuir al aumento de la capacidad de retención hídrica del suelo mediante la formación de agregados, tiene la capacidad de embeber y retener grandes cantidades de agua debido a sus propiedades coloidales y a su posibilidad de formar enlaces de hidrógeno con el agua que parcialmente luego ponen a disposición de la planta (Allison, 1973).

c) Aporte de nutrientes

La materia orgánica aporta macro y micronutrientes al suelo mediante su degradación y también mediante la reacción de los compuestos orgánicos recién formados con la fracción mineral del suelo.

d) Acción biológica

Los sistemas semiáridos del mediterráneo español presentan suelos bastante degradados, en los que la actividad de la microbiota es baja. La materia orgánica juega un papel fundamental en el desarrollo de los ecosistemas edáficos y en su funcionamiento (Smith & Papendick, 1993). El contenido de materia orgánica de un suelo, así como la dinámica de dicha materia orgánica, va a incidir sobre el conjunto de poblaciones microbianas que existen en dicho suelo, y por tanto, sobre la fertilidad del mismo. La productividad potencial de un suelo se relaciona directamente con la concentración de materia orgánica y su tasa de renovación. Los microorganismos, mediante reacciones diversas (oxidación, reducción, hidrólisis, etc.) participan activamente en la dinámica de los ciclos biogeoquímicos de los elementos fundamentales (C, N, P, S, etc.). Estos mecanismos están muy deprimidos en zonas semiáridas y ecosistemas como los que nos ocupan por la ausencia de materia orgánica (García *et al.*, 1997).

3.2. Utilización de residuos agroindustriales biotransformados con fines de revegetación.

El vertido al medio de residuos agroindustriales, tales como el producido en la extracción del aceite de oliva (alpeorajo (DOC del inglés dry olive cake)) o el de la obtención del azúcar de remolacha (SB, del inglés sugar beet) [ambas industrias ampliamente extendidas en España] puede constituir un problema medioambiental por su difícil eliminación debido a la estabilidad de sus constituyentes y su toxicidad en algunos casos [DOC] (Vassilev *et al.*, 1996). Sin embargo, estos residuos pueden ser utilizados como fertilizantes si se someten a un proceso biológico previo de degradación. Se ha comprobado que las propiedades lignocelulolíticas de *Aspergillus niger*, le permite crecer en dichos sustratos mineralizándolos, mediante un proceso de fermentación estática. Además, si previamente se le añade al medio fosfato de roca (una fuente de fósforo insoluble abundante y de bajo coste) el fósforo se solubilizará gracias a la capacidad metabólica de *A. niger* de secretar ácidos orgánicos (ácido cítrico en particular) y por tanto de disminuir el pH del medio en el proceso de mineralización del residuo (Vassilev *et al.*, 1995).

La utilización de estos residuos agroindustriales presentan una serie de ventajas frente a otros enmendantes orgánicos: son un material barato y ampliamente disponible.

Además, el uso de fosfato de roca constituye una fuente de fósforo para las plantas al ser solubilizado en el proceso de biotransformación de dichos residuos.

4. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS COMO ÍNDICE DE RECUPERACIÓN DEL SUELO

En los últimos años se ha desarrollado un enorme interés por el papel que desempeñan las enzimas del suelo, afectando la calidad del mismo. En este sentido, el estado microbiológico y bioquímico de un suelo ha sido propuesto como indicador fiable y rápido del estado biológico real de ese suelo, así como de procesos de recuperación de los mismos, tanto en ecosistemas naturales como en agroecosistemas (Dick & Tabatabai, 1993b). La determinación de ciertas actividades enzimáticas, junto con el uso de parámetros agroquímicos tradicionales, parece ser uno de los mejores métodos para evaluar el estado de la 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). 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 reacciones particulares. Por tanto, la medida simultánea de varias actividades enzimáticas en el suelo puede ser mucho más válida e ilustrativa 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, estreses ambientales 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 (ureasa, proteasa, fosfatasa, β -glucosidasa) para evaluar con precisión y rapidez los efectos de diferentes prácticas de cultivo (agricultura intensiva o periodos de barbecho). Los resultados del estudio de estos grupos enzimáticos 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.

Actividad deshidrogenasa

La deshidrogenasa es un cofactor de numerosas enzimas y funciona solo intracelularmente (Nannipieri et al., 1990). Su actividad representa la energía transferida a través de la cadena respiratoria. Por esta razón, la actividad deshidrogenasa en suelo, es un índice de la actividad microbiana global del mismo.

Actividad ureasa

Es una enzima microbiana que hidroliza las uniones peptídicas de amidas lineales de sustratos nitrogenados proporcionando CO_2 y NH_3 (Tabatabai, 1994)

Actividad proteasa

Actúa en la hidrólisis de proteínas hasta amonio, utilizando sustratos peptídicos simples. Junto con la actividad ureasa está involucrada en el ciclo del N.

Actividad fosfatasa

La asimilación del fósforo para las plantas depende en gran parte de la mineralización que experimenten las diferentes fracciones de dicho fósforo unidas a las formas orgánicas. Las enzimas fosfatasas son las encargadas de hidrolizar fósforo en forma orgánica (ésteres de fosfato) hasta formas inorgánicas, haciéndolo por tanto asimilable para las plantas.

Actividad β -glucosidasa

La enzima β -glucosidasa está involucrada en el desarrollo del ciclo del carbono en el suelo, y se encarga de catalizar reacciones de hidrólisis de cadenas no reducibles de β -D-glucósidos para formar β -glucosa. Esta enzima refleja el estado de la materia orgánica en el suelo y todos los procesos que tengan lugar en ella, desde mineralización hasta la humidificación (Hayano & Tubaki, 1985).

IV. 2. Parte experimental

1. INFLUENCIA DEL RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA (SB) SOBRE CRECIMIENTO DE *TRIFOLIUM REPENS*

1.1. Objetivo.

Evaluar la influencia que ejercen el residuo de azúcar de remolacha sin tratar o tras la biotransformación con *A.niger*, en plantas micorrizadas o no sobre el crecimiento de la planta.

1.2. Condiciones experimentales

El sustrato utilizado fue una mezcla suelo natural: arena 5:2 (v:v). La arena se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

Para el proceso de fermentación se utilizó como sustrato residuo de azúcar de remolacha (SB) suplementado con 0.75 g de fosfato de roca. La preparación del sustrato así como la inoculación con *A.niger* y las condiciones de la incubación, se realizaron siguiendo los pasos descritos en el capítulo de materiales y métodos.

Las enmiendas se mezclaron con la mezcla suelo-arena en una proporción de 5% cuando fue requerido, y se dejaron durante tres semanas a temperatura ambiente.

A aquellas macetas cuyos tratamientos no incluían el fermentado se les añadió 0.75 g de RP.

Las plantas crecieron en condiciones de invernadero (descritas en el capítulo de materiales y métodos) durante 6 meses y se regaron todos los días hasta alcanzar el 100% de la capacidad de campo.

1.3. 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 500 cc de capacidad. Cuando correspondió, el sustrato había recibido el residuo de azúcar de remolacha (fermentado o no) y/o el inóculo MA. Los tratamientos micorrizados recibieron 10 g de inóculo de una mezcla de tres hongos micorrícicos arbusculares autóctonos previamente seleccionados: *Glomus mosseae* (EEZ-43), *G.coronatum* (EEZ-44), y *G.claroideum* (EEZ-47).

1.4. Diseño experimental

Los dos factores considerados en el diseño experimental fueron: (1) enmienda agrícola [control (sin enmienda), SB (residuo de azúcar de remolacha) SBA (residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A.niger*)] y (2) inoculación micorrícica (M), resultando un total de 6 tratamientos con 4 repeticiones cada uno.

1.5. Análisis estadístico de los resultados

Los efectos de los distintos tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en este ensayo fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Las barras en las columnas indican el error estándar y los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente distintos según el test LSD $_{0.05}$. Se realizó un análisis de varianza multifactorial ANOVA entre los distintos tratamientos

1.6. Resultados.

Tanto el desarrollo de parte aérea como de la raíz de las plantas de *Trifolium repens* presentaron la misma pauta de crecimiento en respuesta a los distintos tratamientos aplicados. El residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A.niger* (SBA) fue efectivo e incrementó el crecimiento de parte aérea de las plantas de *Trifolium repens* en un 1611 %, y el desarrollo de raíz en un 1193 % con respecto al control sin enmienda y sin micorrizar

(figura 1 y 2). Sin embargo, el mayor crecimiento tanto de raíz como de parte aérea se alcanzó en las plantas micorrizadas que crecieron en presencia de esta enmienda (SBA) (figura 1,2). A nivel de crecimiento de parte aérea se observa una interacción positiva entre la enmienda y la micorriza, como indica los valores de varianza del análisis multifactorial (tabla 1).

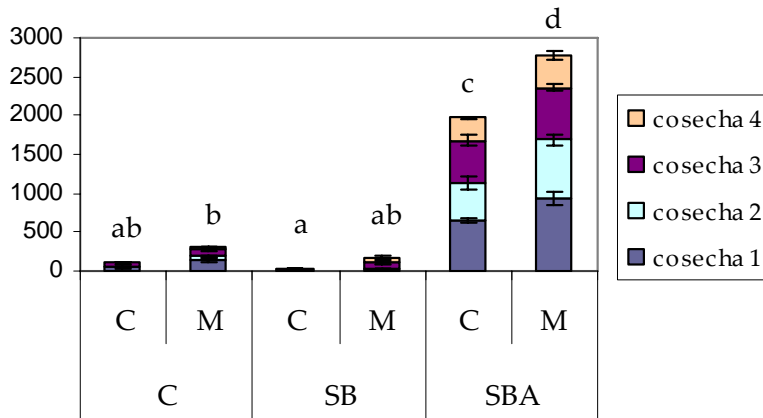


Figura 1: Peso seco parte aérea de plantas de *Trifolium repens* micorrizadas (M) y sin micorrizar (C) adicionadas de residuo de azúcar de remolacha sin fermentar (SB), fermentado con *Aspergillus niger* (SBA) o sin residuo (C). Los valores representan los promedios seguidos del error estándar (n=4).

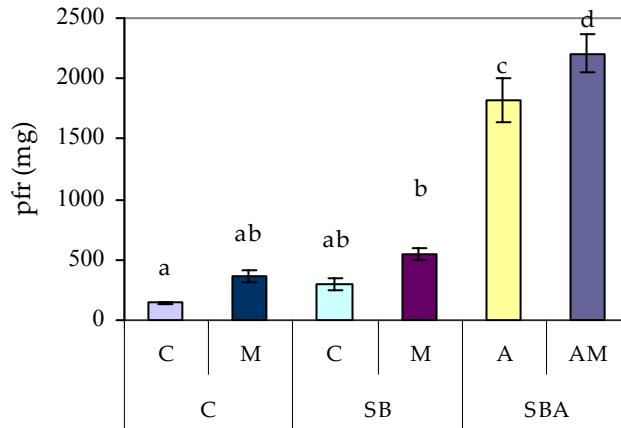


Figura 2: peso fresco raíz de plantas de *Trifolium repens* micorrizadas (M) y sin micorrizar (C), adicionadas de residuo de azúcar de remolacha sin fermentar (SB), fermentado con *Aspergillus niger* (SBA) o sin residuo (C). Los valores representan los promedios seguidos del error estándar (n=4).

	Enmienda(A)	Micorriza(B)	AxB
Peso seco parte aérea	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0002 ***
Peso fresco raíz	0.0000 ***	0.0047 **	0.7288 ns

Tabla 1: Valores del análisis de varianza multifactorial para los parámetros de crecimiento de parte aérea y raíz de plantas de *Trifolium repens* cultivadas en presencia o no de enmienda y micorriza

El porcentaje de colonización MA fue menor en presencia de SB y se mantuvo sin cambios con respecto al control en las plantas que crecieron en suelos adicionados de SBA (figura 3).

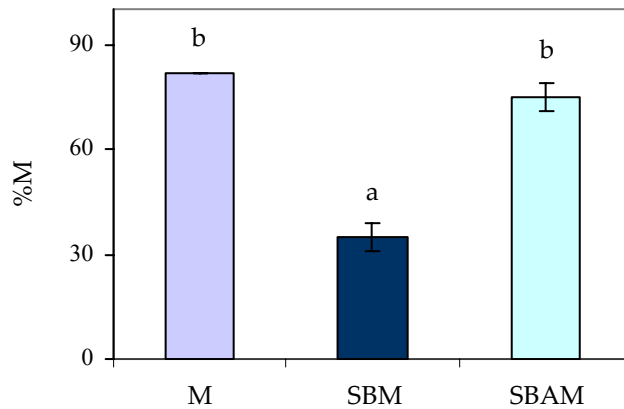


Figura 3: Colonización micorrícica raíz de plantas de *Trifolium repens* micorrizadas (M) y sin micorrizar (C) adicionadas de residuo de azúcar de remolacha sin fermentar (SB), fermentado con *Aspergillus niger* (SBA) o sin residuo (C). Los valores representan los promedios seguidos del error estándar (n=4).

2. ESTUDIO DIFERENCIAL DE LA APLICACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO O DEL RESIDUO SÓLIDO DE AZÚCAR DE REMOLACHA (FERMENTADO CON *A. NIGER* O SIN FERMENTAR) SOBRE CRECIMIENTO DE *TRIFOLIUM REPENS* Y SU INTERACCIÓN CON LOS HONGOS MA AUTÓCTONOS

2.1. Objetivo.

Efecto del extracto acuoso o del residuo sólido de SB y SBA sobre el crecimiento de las plantas de *Trifolium repens* y el nivel de micorrización.

2.2. Condiciones experimentales

El sustrato utilizado fue una mezcla suelo de Murcia natural: arena 5:2 (v:v). La arena se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

Para el proceso de fermentación se utilizó como sustrato residuo de azúcar de remolacha (SB) suplementado con 0.75 g de fosfato de roca. La preparación del sustrato así como la inoculación con *A. niger* y las condiciones de la incubación, se realizaron siguiendo los pasos descritos en el capítulo de materiales y métodos.

Las plantas crecieron en condiciones de invernadero (descritas en el capítulo de materiales y métodos) durante 5 meses y se regaron todos los días hasta alcanzar su capacidad de campo.

2.3. Preparación del extracto acuoso y aplicación de los residuos sólidos y acuosos.

El extracto acuoso se preparó siguiendo el protocolo descrito por (Calvet *et al.*, 1992). Matraces Erlenmeyers con agua destilada estéril a la que se le añadieron los residuos orgánicos (SB o SBA) al 20%, se agitaron durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a la filtración de estas soluciones acuosas (0.45 µm).

Tanto las enmiendas como los extractos acuosos de estas, se mezclaron con la mezcla suelo-arena en una proporción de 5% cuando fue requerido, y se dejaron durante tres semanas a temperatura ambiente.

A aquellas macetas cuyos tratamientos no incluían el fermentado se les añadió 0.75 g de RP.

2.4. 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 330 ml de capacidad, a las que se les añadió el fermentado sólido o el extracto acuoso de este y/o el inóculo MA, cuando correspondió. Los tratamientos micorrizados recibieron 10 g de inóculo de una mezcla de tres hongos micorrícicos arbusculares autóctonos: *Glomus mosseae* (EEZ-43), *G. coronatum* (EEZ-44), y *G. claroideum* (EEZ-47).

2.5. Diseño experimental

Los tres factores considerados en el diseño experimental fueron: (1) enmienda agrícola [SB (residuo de azúcar de remolacha), SBA (residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger*)], (2) naturaleza de la enmienda aplicada [(extracto acuoso (L) o residuo sólido (S)) y (3) inoculación micorrícica (M), resultando un total de 8 tratamientos con 5 repeticiones cada uno. Además se prepararon 10 macetas más como controles (-) a las que no se les añadió ningún tipo de enmienda. De esas 10 macetas 5 estaban micorrizadas y 5 sin micorrizar.

2.6. Análisis estadístico de los resultados

Los efectos de los distintos tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en este ensayo fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Las barras en las

columnas indican el error estándar y los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente distintos según el test LSD_{0.05}.

Se realizó un análisis de varianza multifactorial ANOVA entre los distintos tratamientos a los que se les había aplicado enmienda para las variables determinadas en el ensayo (peso seco parte aérea, peso fresco raíz y número de nódulos).

Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus (Statistical Graphics Corp., Princeton, NJ).

2.7. Resultados

Observamos un efecto diferente en el desarrollo de parte aérea según el tipo de enmienda aplicada.

En las plantas no micorrizadas, la mayor biomasa de parte aérea se alcanzó en las plantas que crecieron en suelo con SBA añadido en forma sólida. No se observaron diferencias significativas en los demás tratamientos no micorrizados. Sin embargo, en las plantas micorrizadas, el mayor desarrollo de parte aérea se alcanzó en las plantas que crecieron en suelo adicionado de SBA, tanto líquido como sólido (figura 4). Mientras que en las plantas sin micorrizar el factor determinante de la diferente biomasa cosechada fue la naturaleza del enmendante (residuo sólido o extracto líquido del mismo), en las plantas micorrizadas fue más importante el tipo de enmienda aplicada (SB o SBA) y no su naturaleza (tablas 2 y 3).). Así, el efecto de la micorrización sobre el crecimiento de parte aérea de la planta solamente se expresó en presencia de la enmienda SBA, tanto en forma sólida como en forma de extracto acuoso. Ambos tratamientos provocaron los máximos desarrollos de biomasa. Sin embargo, en ausencia de micorriza, los tratamientos con enmienda sólida alcanzaron un mayor desarrollo que aquellos a los que se les añadió el extracto acuoso (fig 4).

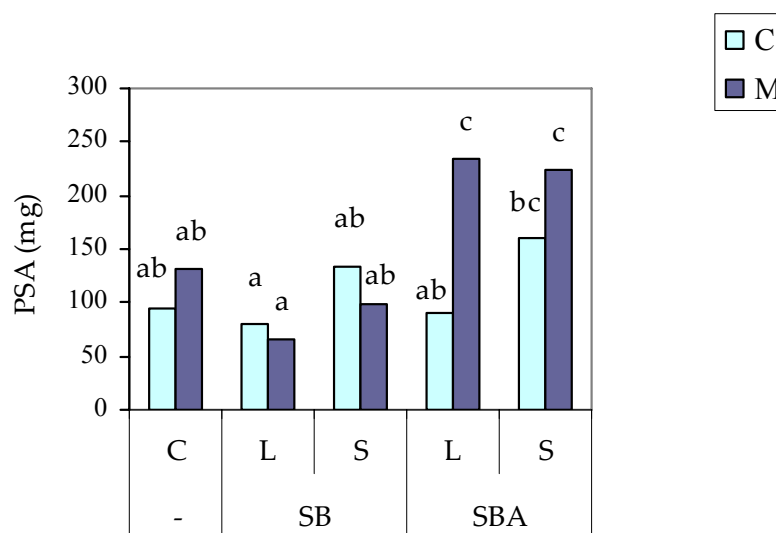


Figura 4: Peso seco de parte aérea de *Trifolium repens* micorrizadas y no micorrizadas crecidas en ausencia de residuo (C) ó en presencia de residuo de azúcar de remolacha sin fermentar (SB) o fermentado (SBA) aplicado como extracto acuoso (L) o como residuo sólido (S). Los valores representan los promedios (n=5).

La presencia del residuo sólido incrementó el desarrollo radical más que el extracto acuoso, especialmente en las plantas no micorrizadas. La mayor biomasa de raíz se alcanzó en las plantas que crecieron en presencia de SBA sólido (fig 5 a).

La micorrización incrementó el número de nódulos y el máximo número de nódulos se alcanzó en presencia de SBA aplicado como extracto acuoso. El SB inhibió la formación de nódulos (fig 5 b). Los valores del análisis multifactorial ANOVA realizado para los parámetros de crecimiento y número de nódulos en las plantas de *T. repens* indican que la enmienda utilizada y en particular la forma en la que se aplica dicha enmienda afecta significativamente el desarrollo de radical de las plantas de *T. repens* (tabla 2). Sin embargo, el análisis ANOVA parcial muestra que dicho efecto no es significativo en las plantas micorrizadas (tabla 4). El número de nódulos se afectó por la enmienda utilizada pero el factor que influyó más significativamente sobre este parámetro fue la micorrización (Tabla 2).

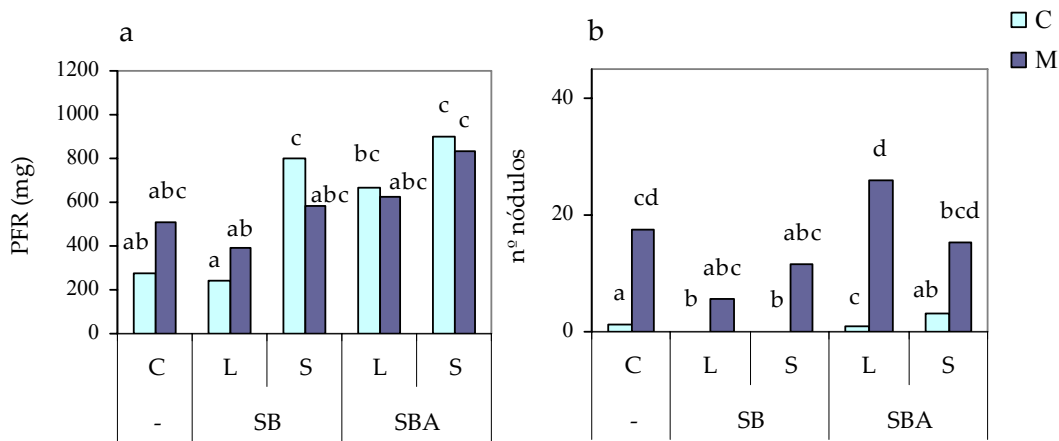


Figura 5: Peso fresco raíz (a) y número de nódulos de *Trifolium repens* micorrizadas y no micorrizadas crecidas en ausencia de residuo (C) o en presencia de residuo de azúcar de remolacha sin fermentar (SB) o fermentado (SBA) aplicado como extracto acuoso (L) o como residuo sólido (S). Los valores representan los promedios (n=5).

	Enmienda (A)	Naturaleza del enmendante (B)	Micorriza (M)	AxB	AxM	BxM	AxBxM
Peso seco parte aérea	0.0002 ***	0.066 ns	0.0485 *	0.7418 ns	0.0025 **	0.2095 ns	0.4574 ns
Peso fresco raíz	0.0282 *	0.0082 **	0.7043 ns	0.4826 ns	0.9153 ns	0.3791 ns	0.431 ns
Nº nódulos	0.0507 *	0.8751 ns	0.0005 ***	0.3142 ns	0.1636 ns	0.6378 ns	0.1899 ns

Tabla 2: Analisis de varianza multifactorial de los parámetros de crecimiento y simbióticos de las plantas de *Trifolium repens*.

	Enmienda (A)	Naturaleza del enmendante (B)	AxB
Peso seco parte aérea	0.372 ns	0.0084 **	0.6971 ns
Peso fresco raíz	0.0779 ns	0.012 **	0.2669 ns
Nº nódulos	0.0879 ns	0.3552 ns	0.3552 ns

Tabla 3: Análisis de varianza multifactorial de los parámetros de crecimiento y simbióticos de las plantas de *Trifolium repens* no micorrizadas.

	Enmienda (A)	Naturaleza del enmendante (B)	AxB
Peso seco parte aérea	0.0005 ***	0.7231 ns	0.5395 ns
Peso fresco raíz	0.1584 ns	0.2233 ns	0.955 ns
Nº nódulos	0.0988 ns	0.7521 ns	0.2485 ns

Tabla 4: Análisis de varianza multifactorial de los parámetros de crecimiento y simbióticos de plantas de *Trifolium repens* micorrizadas.

3. EFECTO DE BIOFERMENTADOS, HONGOS MA NATIVOS Y LA LEVADURA *YAROWIA LIPOLYTICA* SOBRE EL DESARROLLO DE *DORYCNIUM PENTAPHYLLUM* Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL SUELO.

3.1. Objetivo

El objetivo de este estudio es determinar la capacidad como fertilizante de dos residuos agroindustriales biotransformados, residuo de azúcar de remolacha (SB) y alpeorujó (DOC), aplicados por separado o conjuntamente, sobre un suelo natural degradado de la vertiente Mediterránea. Dicho efecto se evalúa en presencia o ausencia

de hongos micorrícicos arbusculares autóctonos seleccionados y una levadura promotora del crecimiento de la planta.

3.2. Diseño experimental

El experimento consistió en un bloque factorial diseñado completamente al azar, con tres factores: (1) inoculación micorrícica (M), (2) inoculación con *Y. lipolytica* (Y) y (3) residuo agroindustrial (SB y/o DOC). De manera que los tratamientos de este experimento fueron los siguientes: suelo sin enmienda: control (i), suelo enmendado con SB (ii); con DOC (iii); o con SB+DOC (iv); inoculados o sin inocular con MA o con *Y. lipolytica*. Todos estos tratamientos tuvieron 5 repeticiones lo que dio lugar a un total de 40 macetas.

3.3. Condiciones experimentales

El sustrato utilizado fue una mezcla de suelo natural (adicionado o no de fermentado correspondiente DOC y/o SB): arena 5:2 (v:v). La arena se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

Para este ensayo se utilizaron biofermentados de alpeorajo (DOC) y residuo de azúcar de remolacha (SB), que se prepararon según el protocolo descrito en materiales y métodos. A cada matraz Erlenmeyer se le añadió 5 g de cada residuo por separado ó 5 g de una mezcla de ambos 1:1 (w/w) junto con 0.75 g de fosfato de roca (RP) y 40 ml de la solución mineral Czapek-Dox. Tras autoclavar los matraces a 120 °C durante 30 min, se inocularon con 3 ml de una suspensión de esporas de *Aspergillus niger* ($1.2 \cdot 10^6$ esporas). La fermentación se llevó a cabo mediante incubación a 30 °C durante 20 días.

Tales enmiendas, separadamente o mezcladas en igual proporción, se mezclaron con la mezcla suelo-arena en una proporción de 5% cuando fue requerido, y se dejaron durante tres semanas a temperatura ambiente para que alcanzaran el equilibrio y estabilización con los componentes del suelo.

A aquellas macetas, cuyos tratamientos no incluían la adición del fermentado, se les añadió la cantidad correspondiente de RP.

Las plantas crecieron en macetas de 500 cc, en condiciones de invernadero (descritas en materiales y métodos) durante 2 meses y se regaron todos los días hasta alcanzar la capacidad de campo.

3.4. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

La planta seleccionada para la realización del ensayo que se describe a continuación, fue *Dorycnium pentaphyllum* Scop. Una plántula de *D. pentaphyllum*, germinada en sustrato

inerte, se traspasó a cada maceta (d= 12.2 cm; 500 ml). Los tratamientos micorrizados recibieron 10 g de inóculo de una mezcla de siete hongos micorrícicos arbusculares autóctonos: *Glomus mosseae* (EEZ-43), *G. constrictum* (EEZ-42), *G. coronatum* (EEZ-44), *G. microagregatum* (EEZ-40), *Glomus* sp (EEZ-41), *G. albidum* (EEZ-39), *G. claroideum* (EEZ-47).

Yarowia lipolytica se inoculó, cuando fue requerido, en forma de suspensión (1ml por maceta, que contenía $1.7 \cdot 10^6$ ufc ml⁻¹)

3.5. Determinaciones

Tras cosechar, a los 60 días de crecimiento, se determinó el peso seco de la parte aérea. La parte aérea se molió en un molinillo Wiley hasta alcanzar un tamaño de 0.5 mm, para proceder a la determinación del contenido de N y P. La concentración de N se midió colorimétricamente con un autoanalizador, siguiendo las instrucciones del manual (Technicon, 1974). El contenido de P se determinó por el método del molibdato-vanadato descrito por (Lachica *et al.*, 1973)

Las raíces fueron cuidadosamente lavadas y se determinó el peso fresco y el número de nódulos formados. Posteriormente se procedió a la tinción y determinación de la extensión de longitud raíz colonizada según el método descrito en Materiales y Métodos.

En suelo rizosférico se determinó si los tratamientos aplicados (enmiendas y/o inoculación microbiana) habían afectado a los siguientes parámetros:

- Propiedades físico-químicas del suelo: pH y conductividad eléctrica.
- Propiedades químicas del suelo: carbono hidrosoluble y carbohidratos hidrosolubles.
- Propiedades físicas del suelo: estabilidad de agregados.
- Propiedades biológicas del suelo: actividades enzimáticas (deshidrogenasa, β -glucosidasa, fosfatasa, proteasa y ureasa).
- Número de esporas de los hongos MA.

3.6. Análisis estadístico de los resultados

Los efectos de los distintos tratamientos, sobre cada una de las variables analizadas en este ensayo, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente distintos según el test LSD_{0.05}.

Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus (Statistical Graphics Corp., Princenton, NJ).

3.7. Resultados

Crecimiento vegetal

La efectividad de la aplicación del residuo de azúcar de remolacha (SB) sobre el crecimiento de la planta fue mayor que la del alpeorajo. El alpeorajo incrementó la biomasa de la parte aérea. La mezcla de ambos residuos no aportó ninguna diferencia significativa en comparación con la aplicación de alpeorajo solo. En suelos sin enmienda agrícola, el crecimiento de la planta estuvo muy limitado, y las inoculaciones microbianas no lo mejoraron (fig 6 a). Sin embargo, el desarrollo radical se estimuló en algunos tratamientos (C y DOC) por la colonización MA. La colonización MA o la inoculación con *Y. lipolytica* incrementó el crecimiento de la raíz en las plantas enmendadas con DOC en un 192% y el inóculo MA en un 184% en comparación con las plantas no inoculadas. Por el contrario ambos tratamientos disminuyeron la biomasa radical en plantas adicionadas de SB ó SB + DOC (fig 6 b). El valor máximo de biomasa radical se alcanzó en las plantas que crecieron en suelo con SB y sin inoculación microbiana.

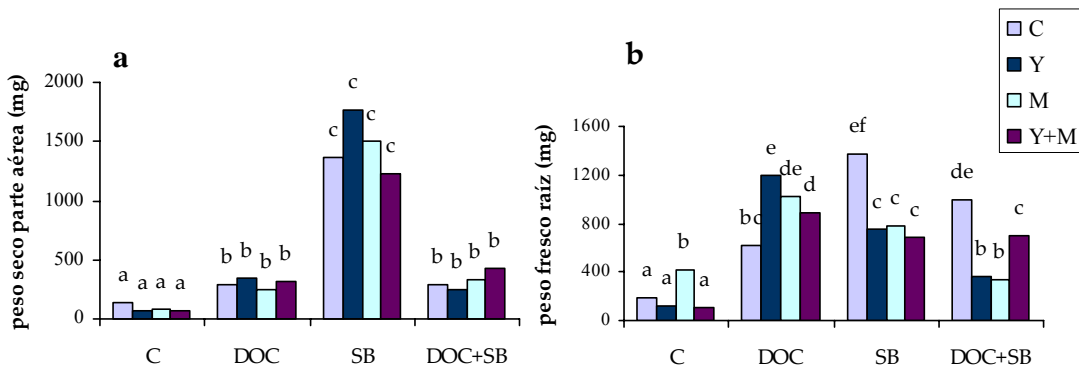


Figura 6: Peso seco de parte aérea y peso fresco de raíz de *Dorycnium pentaphyllum* sin tratar (C) o tratadas con los fermentados de alpeorajo (DOC), residuo de azúcar de remolacha (SB) o ambos (DOC+SB). Efecto de la inoculación con hongos MA (M), y/o *Y. lipolytica* (Y).

Desarrollos simbióticos

En este suelo, la inoculación micorrícica fue un factor crítico para obtener plantas micorrizadas. Se encontraron grandes diferencias a nivel de longitud de raíz colonizada entre plantas crecidas en suelo con enmienda y las crecidas en suelo sin enmienda (Fig 7). En las plantas micorrizadas, el porcentaje de colonización MA en raíz, se incrementó por la adición de DOC, SB y DOC + SB. El máximo valor se alcanzó en suelo con enmienda en las plantas coinoculadas con *Y. lipolytica* y los hongos MA. La inoculación de *Y. lipolytica*

incrementó la infección MA en las plantas con cualquiera de las enmiendas aplicadas (SB, DOC, DOC + SB) (fig 7 a).

No hubo formación de nódulos en las plantas no inoculadas. DOC y SB incrementaron la nodulación, particularmente en plantas coinoculadas con *Y. lipolytica* y hongos MA, pero la mezcla DOC + SB redujo la nodulación hasta cero en todas las plantas (fig 7 b).

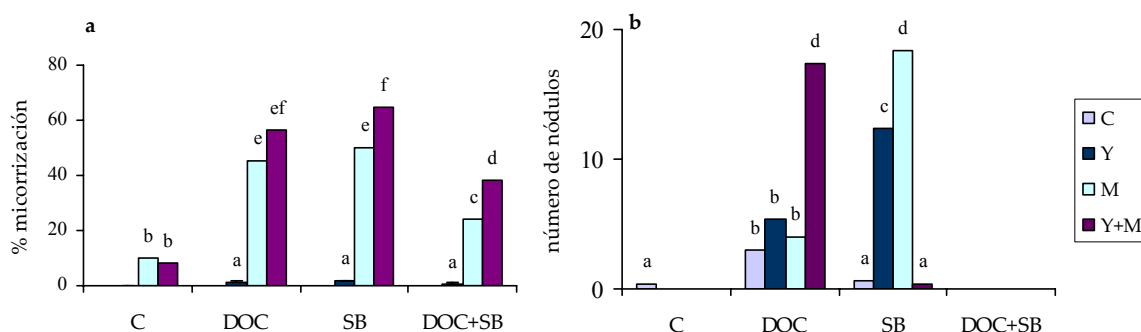


Figura 7: Porcentaje de micorrización (a) y número de nódulos (b) en raíces de *Dorycnium pentaphyllum* sin tratar (C) o tratadas con el fermentado de alpeoruj (DOC), residuo de azúcar de remolacha (SB) o ambos (DOC+SB). Efecto de la inoculación con hongos MA (M), y/o *Y. lipolytica* (Y).

Nutrición

La captación de nitrógeno por la planta se incrementó por la adición de las enmiendas orgánicas. El efecto positivo de las inoculaciones microbianas en la adquisición de N por la planta solo se apreció en las plantas inoculadas con micorriza en suelo con SB (figura 8). Este tratamiento (SB+M) incrementó en un 938 % el contenido de este nutriente respecto a las plantas sin tratar (C).

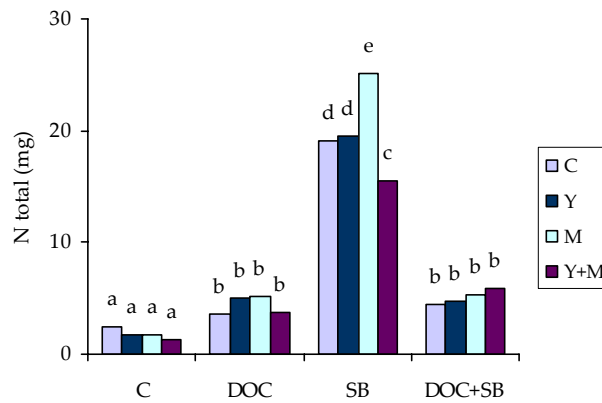


Figura 8: Contenido de N total en parte aérea de *Dorycnium pentaphyllum* sin tratar (C) o tratadas con el fermentado de alpeorajo (DOC), residuo de azúcar de remolacha (SB) o ambos (DOC+SB). Efecto de la inoculación con hongos MA (M), y *Y. lipolytica* (Y).

La aplicación de DOC ó SB ó la mezcla de ambos asociada con los inóculos microbianos compensaron las condiciones limitantes de P en el suelo, y jugaron un papel importante en la captación de P por las plantas de *Dorycnium* (tabla 5).

Las inoculación con *Y. lipolytica* u hongos MA no incrementó la concentración de P en parte aérea en suelos tratados con SB o DOC, pero si en los suelos con SB +DOC (tabla 5). Sin embargo, el contenido de P en parte aérea se incrementó considerablemente por las enmiendas aplicadas, particularmente por SB. La inoculación con *Y. lipolytica* y/o los hongos MA incrementaron en contenido de P, pero este efecto solo se observó en suelos con enmienda. La colonización micorrícica por los endófitos autóctonos afectó positivamente el contenido de P, pero el efecto de la micorriza sobre la adquisición de P por las plantas de *Dorycnium* fue más importante en las plantas que crecieron en suelos con enmienda, y varió de acuerdo con la enmienda aplicada. De hecho, las plantas micorrizadas incrementaron la captación de P en un 120% (en suelo sin enmienda), 209% (en suelo con DOC), 140% (en suelo con SB) o 179% (en suelo con DOC + SB) respectivamente. La compatibilidad de las enmiendas tratadas con *A. niger* y los hongos MA afectó la capacidad colonizadora del inóculo micorrícico. La coinoculación fue más efectiva que las inoculaciones simples incrementando el contenido de P en parte aérea (Tabla 5).

enmendantes	tratamientos microbianos							
	Control		<i>Y. lipolytica</i>		hongos MA		<i>Y. lipolytica</i> + hongos MA	
	% P	P (mg)	% P	P (mg)	% P	P (mg)	% P	P (mg)
Control	0.13 e	0.15 bc	0.09 b	0.10 ab	0.21 g	0.18 cd	0.10 c	0.08 a
(DOC)	0.09 b	0.22 cd	0.10 cd	0.36 ef	0.11 cd	0.46 gh	0.07 a	0.23 d
(SB)	0.22 i	2.38 k	0.21 gh	2.72 l	0.22 hi	3.33 ll	0.14 e	1.86 j
DOC+SB	0.11 d	0.34 e	0.18 f	0.52 h	0.18 f	0.61 i	0.11 d	0.41 fg

Tabla 5: Concentración y contenido total de P en parte aérea de *Dorycnium pentaphyllum* sin tratar (C) o tratadas con el fermentado de alpeorujó (DOC), residuo de azúcar de remolacha (SB) o ambos (DOC+SB). Efecto de la inoculación con hongos MA (M), y/o *Y. lipolytica* (Y).

Actividades enzimáticas en suelo rizosférico

La actividad *deshidrogenasa* se incrementó en los suelos con enmienda, particularmente en los enmendados con SB. Los valores máximos se obtuvieron cuando se inoculó *Y. lipolytica*, que incrementó esta actividad en un 136 % respecto al suelo no tratado (C). Sin embargo en los tratamientos con DOC no se observó ningún efecto por la inoculación microbiana (tabla 6).

La actividad *ureasa* se incrementó en suelo rizosférico de las plantas tratadas con DOC o SB. El máximo valor se obtuvo en el suelo donde crecieron las plantas micorrizadas enmendadas con DOC (tabla 6), en él, el incremento de esta actividad fue del 177 %. La aplicación de las enmiendas orgánicas también incrementó la actividad proteasa y la acción de *Y. lipolytica* supuso un aumento del 251% en los suelos enmendados con DOC (tabla 6)

La actividad *β-glucosidasa*, utilizada como índice de la transformación de carbohidratos, muestra que las enmiendas orgánicas aplicadas incrementaron esta actividad hidrolítica en el suelo rizosférico, particularmente en los tratamientos con SB e inoculados con *Y. lipolytica* (con un aumento del 230 % sobre el suelo sin enmienda). *Y. lipolytica* y la micorrización produjeron el mayor incremento en la actividad *β-glucosidasa* en suelos con DOC (tabla 6).

La actividad *fosfatasa* (Tabla 6), fue incrementada en los suelos rizosféricos con enmienda (230 % mayor en SB que en el control sin enmienda). SB fue el residuo orgánico que incrementó en mayor proporción la actividad fosfatasa. Los tratamientos microbianos no incrementaron esta actividad hidrolítica.

IV. Inoculación y enmiendas en revegetación

tratamiento microbiano	Residuo orgánico			
	C	DOC	SB	DOC+SB
<i>Deshidrogenasa</i>				
Control	38.91 a	75.38 bcd	86.49 de	66.06 bc
Y	40.12 a	69.52 bc	91.83 e	64.58 b
M	42.04 a	76.37 bcd	75.29 bcd	78 cd
Y+M	46.57 a	73.44 bc	90.4 e	71.18 bc
<i>Ureasa</i>				
Control	910 a	2160 ef	2100 def	1550 b
Y	1000 a	2150 ef	1980 cde	1720 bcd
M	790 a	2520 f	1710 bcd	1620 bc
Y+M	1140 a	2290 ef	2140 def	2030 cde
<i>Proteasa</i>				
Control	530 a	1460 c	1440 c	1180 bc
Y	540 a	1860 d	1380 bc	1170 bc
M	570 a	1610 c	1250 bc	1010 b
Y+M	610 a	1390 bc	1500 c	1160 bc
<i>β-glucosidasa</i>				
Control	46.97 a	75.67 cde	111.45 g	74.17 cde
Y	40.5 a	102.62 fg	98.65 fg	67.98 bc
M	49.74 ab	104.64 fg	72.54 cd	68.13 bc
Y+M	57.22 abc	90.74 def	93.85 efg	75.13 cde
<i>Fosfatasa</i>				
Control	21.82 a	40.04 bc	67.97 f	61.24 def
Y	22.11 a	48.44 cd	72.01 f	63.73 ef
M	23.87 a	52.41 cde	39.03 bc	46.92 cd
Y+M	29.81 ab	41.09 bc	60.75 def	58.09 def

Tabla 6: Actividades deshidrogenasa ($\mu\text{g INF g}^{-1} \text{h}^{-1}$), ureasa ($\mu\text{g NH}_3 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$), proteasa ($\mu\text{mol NH}_3 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$), β -glucosidasa ($\mu\text{g PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$) y fosfatasa ($\mu\text{g PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$) en suelo rizosférico de *Dorycnium pentaphyllum* sin tratar (Control) o tratadas con el fermentado de alpeorujo (DOC), residuo de azúcar de remolacha (SB) o ambos (DOC+SB). Efecto de la inoculación hongos MA (M), y/o *Y. lipolytica* (Y).

Características físico-químicas del suelo

Los valores de *pH* en suelo rizosférico disminuyeron con la aplicación de SB. Pero la doble inoculación con hongo MA y *Y. lipolytica*, incrementó los valores de *pH* tanto en los suelos sin enmienda como en los enmendados (tabla 7).

La *conductividad eléctrica* fue mayor por la adición de la enmienda orgánica. *Y. lipolytica* redujo este valor en suelos con enmienda, particularmente cuando se añadió conjuntamente con el inóculo micorrícico. (tabla 7).

tratamiento microbiano	C	Residuo orgánico		
		DOC	SB	DOC+SB
<i>pH</i>				
Control	8.65 f	8.55 de	8.37 a	8.42 ab
Y	8.75 g	8.52 cd	8.39 ab	8.42 ab
M	8.61 ef	8.58 def	8.45 bc	8.45 bc
Y+M	8.88 h	8.73 g	8.58 def	8.55 de
<i>Conductividad eléctrica</i>				
Control	358 ab	644 efg	712 fgh	759 h
Y	259 a	554 de	546 cd	601 ef
M	370 abc	699 fgh	750 gh	802 h
Y+M	299 a	454 bcd	486 d	531 de

Tabla 7: *pH* y conductividad eléctrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) de suelo rizosférico de *Dorycnium pentaphyllum* sin tratar (Control) o tratado con el fermentado de alpeorajo (DOC), residuo de azúcar de remolacha (SB) o ambos (DOC+SB). Efecto de la inoculación con hongos MA (M), y *Y. lipolytica* (Y).

Los *carbohidratos hidrosolubles* (Tabla 8), fueron mayores en los suelos enmendados con DOC, aunque todas las enmiendas orgánicas incrementaron este parámetro, al igual que el C hidrosoluble (tabla 8). Sin embargo, las inoculaciones microbianas no afectaron o incluso disminuyeron, particularmente la doble inoculación, ambos valores en suelo rizosférico (Tabla 8).

La aplicación de los residuos orgánicos incrementó significativamente la estabilidad de agregados en suelo. *Y. lipolytica* no alteró significativamente estos valores. La inoculación micorrícica fue más efectiva en suelo sin enmienda agrícola. (tabla 9).

IV. Inoculación y enmiendas en revegetación

tratamiento microbiano	Residuo orgánico			
	C	DOC	SB	DOC+SB
<i>Carbohidratos hidrosolubles</i>				
Control	69 ab	169 i	137 fgh	155 hi
Y	59 a	161 i	119 def	141 gh
M	77 ab	161 i	107 cd	133 efg
Y+M	79 b	134 fg	99 c	115 cde
<i>C-hidrosolubles</i>				
Control	12 abc	22 defg	25 ghi	26 ghi
Y	11 ab	18 cde	16 bcd	31 i
M	13 abc	23 efg	29 hi	24 fgh
Y+M	11 ab	11 ab	19 def	24 fgh

Tabla 8: Carbohidratos hidrosolubles ($\mu\text{g C g}^{-1}$) y C-hidrosoluble ($\mu\text{g g}^{-1}$) en suelo rizosférico de *Dorycnium pentaphyllum* sin tratar (Control) o tratadas con el fermentado de alpeorujó (DOC), residuo de azúcar de remolacha (SB) o ambos (DOC+SB). Efecto de la inoculación hongos MA (M), y/o *Y. lipolytica* (Y).

tratamiento microbiano	C	residuo orgánico		
		DOC	SB	DOC+SB
Control	7.6 a	13.7 cd	13.8 cd	15.9 def
Y	7.8 a	12 bc	12.2 bc	18.3 f
M	12.1 bc	13.8 cd	10.8 b	17.7 f
Y+M	10.1 ab	14 cd	14.8 de	17.1 ef

Tabla 9. Estabilidad de agregados (%) de suelo rizosférico de *Dorycnium pentaphyllum* sin tratar (C) o tratados con el fermentado de alpeorujó (DOC), residuo de azúcar de remolacha (SB) o ambos (DOC+SB). Efecto de la inoculación con hongos MA (M), y/o *Y. lipolytica* (Y).

Las poblaciones naturales de esporas de hongos MA, se incrementó con la aplicación de la enmienda y todos los tratamientos inoculados con *Y. lipolytica*. Este efecto fue más significativo en los suelos enmendados con DOC. Sin embargo la coinoculación conjunta de *Y. lipolytica* y hongos MA no afectó o incluso disminuyó (comparado con la inoculación simple con DOC ó SB) el número de esporas en suelo rizosférico (Tabla 10).

tratamiento microbiano	C	residuo orgánico		
		DOC	SB	DOC+SB
Control	36 a	223 bcd	274 de	86 abc
Y	114 abcd	553 f	434 ef	148 abcd
M	113 abcd	255 cd	296 de	121 abcd
Y+M	66 ab	115 abcd	54 ab	84 abc

Tabla 10: número de esporas de hongos MA en suelo rizosférico de *Dorycnium pentaphyllum* sin tratar (Control) o tratadas con el fermentado de alpeorajo (DOC), residuo de azúcar de remolacha (SB) o ambos (DOC+SB). Efecto de la inoculación con hongos MA (M), y/o *Y. lipolytica* (Y).

4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD INFECTIVA Y EFECTIVIDAD DE CADA UNO DE LOS HONGOS AUTÓCTONOS AISLADOS DE MURCIA EN *DORYCNIUM PENTAPHYLLUM*

4.1. Objetivo

Evaluar, en microcosmos, el efecto de cada uno de los aislados fúngicos con objeto de seleccionar el inóculo más efectivo para el crecimiento de *Dorycnium pentaphyllum* en los siguientes ensayos.

4.2. Condiciones experimentales

El sustrato utilizado fue una mezcla de suelo de la provincia de Murcia: arena 1:1 (v/v). El suelo y la arena se esterilizaron siguiendo el protocolo descrito en el capítulo de materiales y métodos. Posteriormente, la mezcla suelo: arena se inoculó con 2 ml/maceta del filtrado del suelo natural para reincorporar la microbiota exenta de propágulos de micorriza.

Las plantas crecieron durante 4 meses en macetas de 500 cc en condiciones de invernadero (descritas en el capítulo de materiales y métodos), y se regaron todos los días hasta alcanzar la capacidad de campo.

4.3. Diseño experimental

El experimento consistió en 7 tratamientos correspondientes a cada uno de los aislados micorrícicos: *Glomus mosseae* (mo), *G. sp* (sp), *G. microagregatum* (mi), *G. claroideum* (cl), *G. constrictum* (C), *G. coronatum* (co), y *G. albidum* (al). Se pusieron 8 repeticiones de cada uno obteniéndose un total de 56 macetas.

4.4. Determinaciones

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

- *Peso seco de parte aérea*
- *Peso fresco de raíz.*
- *Extensión de la colonización micorrícica MA (% de micorrización)*

4.5. Análisis estadístico de los resultados

Los efectos de los distintos tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en este ensayo fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Las barras en las columnas indican el error estándar y los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente distintos según el test LSD_{0.05}.

Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus (Statistical Graphics Corp., Princeton, NJ).

4.6. Resultados

La Figura 9 a,b,c muestra el efecto particularmente positivo de *Glomus mosseae*, *G. claroideum* y *G. coronatum*, tanto sobre el desarrollo de parte aérea y de raíz como sobre el porcentaje de micorrización alcanzado.

En base a estos resultados se seleccionaron para los siguientes ensayos, una mezcla de estos tres aislados autóctonos de hongos micorrícicos arbusculares.

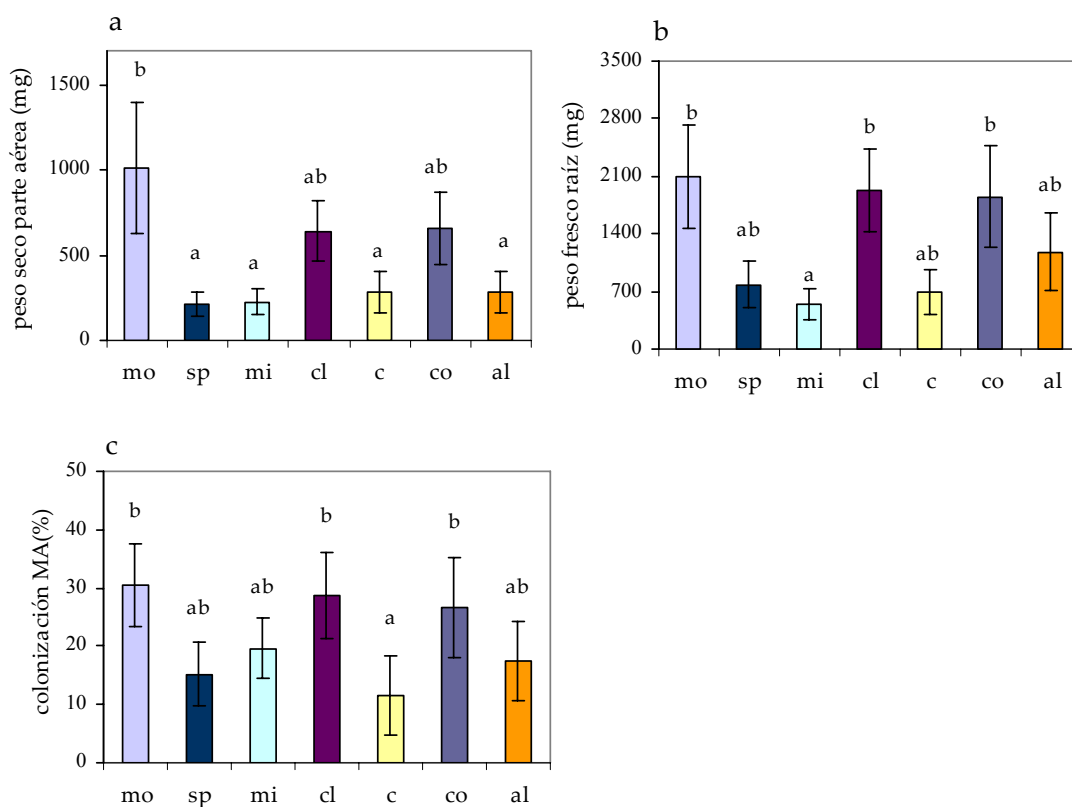


Figura 9: Efecto de los distintos hongos MA autóctonos sobre peso seco parte aérea (a) peso fresco raíz (b), y colonización MA en raíz (c) en *Dorycnium pentaphyllum*.

5. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE HONGOS MA AUTÓCTONOS Y ALPEORUJO, TRATADO MICROBIOLÓGICAMENTE CON PHANEROCHAETE CRYSOSPORUM, SOBRE EL CRECIMIENTO DE DORYCNIUM PENTAPHYLUM EN SUELO NATURAL PROVISTO DE SU MICROBIOTA HABITUAL.

5.1. Objetivo

Los resultados del primer ensayo de este capítulo, demostraron que la transformación del alpeorajo por *A. niger* fue menos efectiva como enmienda que la del residuo de azúcar de remolacha, debido posiblemente a su mayor contenido de lignina. Por ello, en este ensayo se estudia la efectividad de la fermentación del alpeorajo con *Phanerochaete crysospurium*, un hongo con gran capacidad lignocelulolítica (Tien & Kirk,

1983) y su interacción con los microorganismos inoculados (*Yarrowia lipolytica* y hongos MA)

5.2. Diseño experimental

El experimento consistió en cinco tratamientos basados en la adición de alpeorujo fermentado con *P. crysosporium*, inoculación micorrícica, e inoculación con *Y. lipolytica*: C (control sin enmienda ni inóculos microbianos), DOC (alpeorujo fermentado), DOCY (alpeorujo fermentado + *Y. lipolytica*), DOCM (alpeorujo fermentado + inóculo MA), DOCMY (alpeorujo fermentado + inóculo MA + *Y. lipolytica*). Todos los tratamientos tuvieron 5 repeticiones obteniéndose un total de 25 macetas.

5.3. Condiciones experimentales

El sustrato utilizado fue una mezcla suelo natural de la provincia de Murcia: arena natural 5:2 (v:v). La arena se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

Para el proceso de fermentación con *P. crysosporium* se utilizó como sustrato alpeorujo, el cual se preparó según previa descripción

Las enmiendas obtenidas se mezclaron con la mezcla suelo-arena en una proporción de 5% cuando fue requerido, y se dejaron durante tres semanas a temperatura ambiente para su estabilización.

A todas las macetas se les añadió 0.75 g de RP

Las plantas crecieron en condiciones de invernadero (descritas en el capítulo de materiales y métodos) durante 2 meses y se regaron todos los días hasta alcanzar su capacidad de campo.

5.4. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

Una plántula de *D. pentaphyllum*, germinada en semillero, se traspasó a cada maceta (d= 12.2 cm; 500 ml). Los tratamientos micorrizados recibieron 10 g de inóculo compuesto por una mezcla de tres hongos micorrícicos arbusculares autóctonos, previamente seleccionados: *Glomus mosseae* (EEZ-43), *G. coronatum* (EEZ-44), y *G. claroideum* (EEZ-47).

Yarrowia lipolytica se inoculó, cuando fue requerido, en forma de suspensión (1ml por maceta, que contenía $1.7 \cdot 10^6$ ufc ml⁻¹) según protocolo descrito en el capítulo de materiales y métodos. XPreparación de la suspensión de *Y. lip.* (Vassileva et al., 2000).

5.5. Determinaciones

Las plantas se cosecharon a las 16 semanas de cultivo. Una vez cosechadas se determinaron las siguientes variables experimentales:

- *Peso seco de parte aérea y peso fresco de raíz.*
- *Contenido de P en parte aérea*
- *Número de nódulos en raíz*
- *Extensión de la colonización micorrícica (% de micorrización) en raíz.*

5.6. Resultados

El *crecimiento y la nutrición (P)* de las plantas crecidas sin enmienda fue muy limitado, pero la adición del alpeorujó fermentado con *P. cryosporium* incrementó tanto la biomasa de parte aérea como radical de *D. pentaphylum*, especialmente en plantas micorrizadas, donde se alcanzó un incremento del 829% en parte aérea y 527% en raíz con respecto las plantas control (sin alpeorujó ni micorriza).

La inoculación con *Y. lipolytica* no afectó ninguno de los dos parámetros medidos (figura 10 a, 11 a). El contenido de P total en parte aérea se incrementó en un 933 % con la adición de DOC, y el valor máximo se alcanzó en los tratamientos con la enmienda inoculados con micorriza y levadura, pero no diferían significativamente de los inoculados individualmente (figura 10 b)

La *nodulación* se estimuló con la adición de alpeorujó, pasando de ser nula en los controles no tratados a una media de 28 nódulos en los tratamientos con enmienda. Ninguno de los tratamientos microbianos afectó dicho parámetro (figura 11 b).

La *infección MA* en raíz se incrementó por la adición de la enmienda (figura 12).

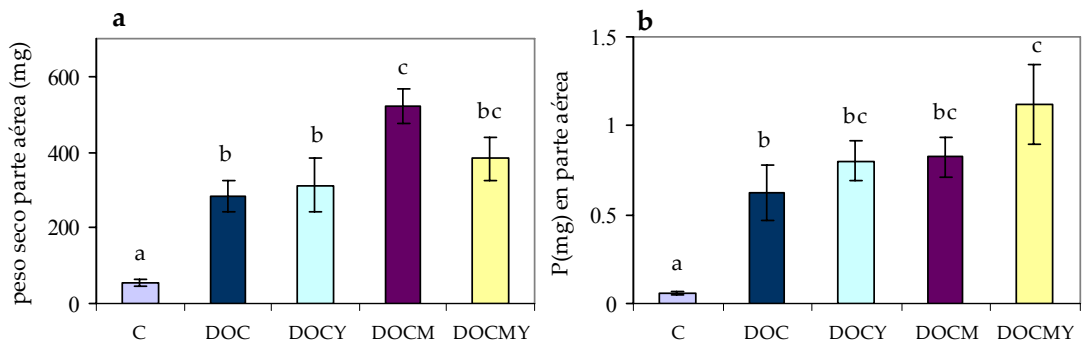


Figura 10: Peso seco parte aérea (mg) (a) y contenido de P en parte aérea (mg) (b) de *Dorycnium pentaphyllum* sin tratar (C) o tratadas con el fermentado de alpeorujó (DOC) sin inocular o inoculadas con hongos MA seleccionados (M), y/o *Y. lipolytica* (Y).

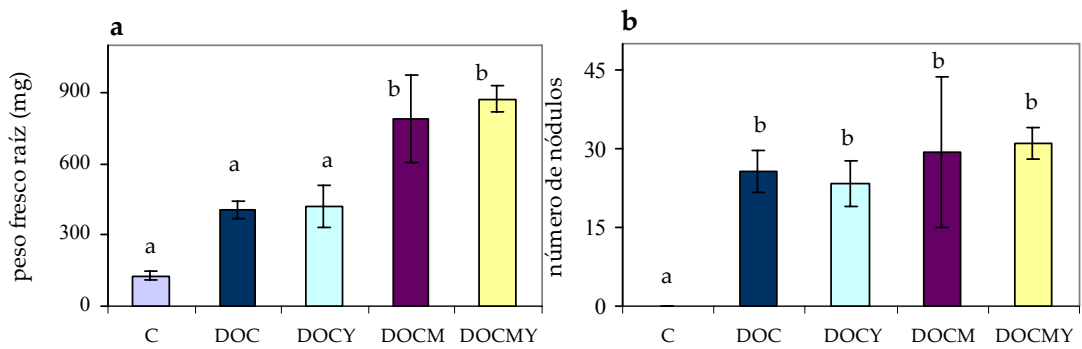


Figura 11: Peso fresco raíz (mg) (a) y número de nódulos en raíz (b) de *Dorycnium pentaphyllum* sin tratar (C) o tratadas con el fermentado de alpeorujó (DOC) y sin inocular o inoculadas con hongos MA seleccionados (M), y *Y. lipolytica* (Y).

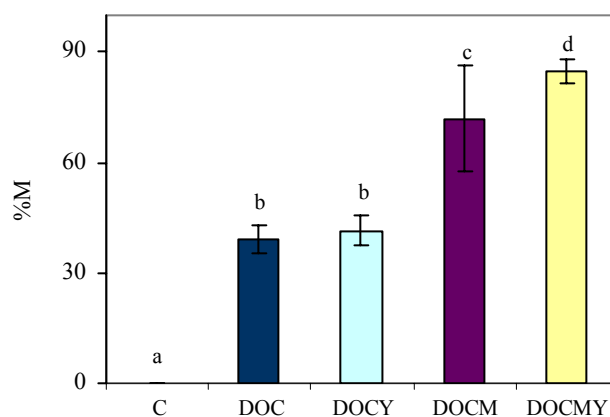


Figura 12: Porcentaje de micorrización en raíz de *Dorycnium pentaphyllum* sin tratar (C) o tratadas con el fermentado de alpeorajo (DOC) y sin inocular o inoculadas con hongos MA seleccionados (M), y *Y. lipolytica* (Y).

6. INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DEL RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA SOBRE EL AGUA DISPONIBLE DEL SUELO

6.1. Objetivo

El objetivo en este experimento es estudiar si la adición del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger* o sin fermentar, puede influir sobre la cantidad de agua que queda retenida en el suelo y por tanto disponible para la planta (agua disponible del suelo o agua utilizable).

6.2. Diseño experimental

Los tratamientos en este ensayo fueron:

- 1) Suelo sin enmienda (control),
- 2) Suelo con residuo de azúcar de remolacha sin fermentar (SB) al 5%,
- 3) Suelo con *A. niger* ($0.5 \cdot 10^6$ ufc ml^{-1}) (A),
- 4) Residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger* (SBA) al 5% (según descripción previa).

La proporción del SB y la concentración de *A. niger* inoculado fue la misma que la utilizada en los ensayos en microcosmos. En el tratamiento con *A. niger*, se inoculó una suspensión de riqueza similar a la añadida para obtener la fermentación del sustrato.

El suelo procedente de la provincia de Murcia, una vez aplicados estos tratamientos, se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 15 días.

6.3. Determinaciones

A los 20 días de aplicados los tratamientos se determinó:

- *Capacidad de campo (CC)*
- *Punto de marchitamiento (PMP)*
- *Intervalo de agua disponible (IHD)*

Tanto la capacidad de campo como el punto de marchitamiento se calcularon por el método de la membrana de Richards (1945).

6.4. Análisis estadístico de los resultados

Los efectos de los distintos tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en este ensayo fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Las barras en las columnas indican el error estándar y los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente distintos según el test LSD_{0.05}.

Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus (Statistical Graphics Corp., Princenton, NJ).

6.5. Resultados

Entre los distintos tratamientos aplicados, pese a los escasos días de tratamiento, se observa una tendencia a incrementar el intervalo de agua disponible en aquellos tratamientos donde se aplicó residuo de azúcar de remolacha, tanto SB como SBA (figura 13). En el caso de SB este incremento fue de un 30 % y en el caso de SBA fue del 13.8 %.

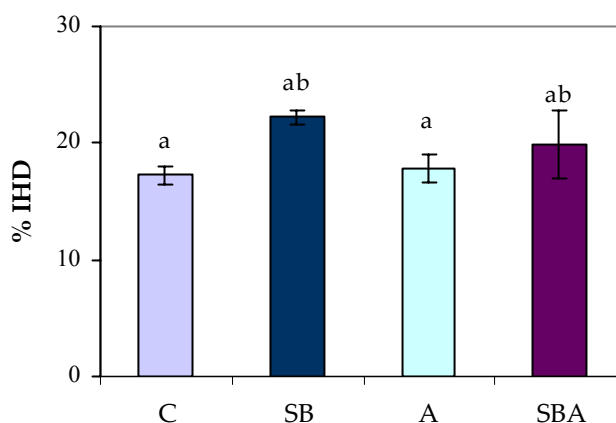


Figura 13: Porcentaje del intervalo de agua disponible (% IHD) en suelo

6. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE HONGOS MA AUTÓCTONOS SELECCIONADOS Y RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA TRATADO MICROBIOLÓGICAMENTE CON *ASPERGILLUS NIGER* SOBRE EL CRECIMIENTO DE *TRIFOLIUM REPENS* EN SUELO NATURAL A DIFERENTES NIVELES HÍDRICOS

6.1. Objetivo

Evaluar en suelo natural, el efecto de la interacción de los hongos MA seleccionados con el residuo de azúcar de remolacha fermentado, en la disponibilidad hídrica de la planta. Para ello, se ensayaron dos niveles hídricos (uno de ellos estresante). En este ensayo se utilizó *Trifolium repens*, ya que al ser forrajera permite cortes sucesivos, y por tanto la evaluación de la efectividad del fermentado y los tratamientos biológicos aplicados a lo largo del tiempo.

6.2. Diseño experimental

Los tres factores considerados en el diseño experimental fueron:

- (1) Nivel hídrico del medio: 75 % y al 100 % de capacidad de campo
- (2) Enmienda agrícola [control (sin enmienda), SB (residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger*)]
- (3) Inoculación micorrícica (M) o no

Resultando un total de 42 unidades experimentales (8 tratamientos con 4 repeticiones 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).

6.3. Condiciones experimentales

El sustrato utilizado fue una mezcla suelo natural: arena 5:2 (v:v). La arena se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

Se utilizó como enmienda el residuo de azúcar de remolacha (SB) para el proceso de fermentación se suplementó con 0.75 g de fosfato de roca y se inoculó con *A. niger*. Las condiciones de la incubación, se realizaron siguiendo los pasos descritos en el capítulo de materiales y métodos.

La enmienda se mezcló con la mezcla suelo-arena en una proporción de 5% cuando fue requerido, y se dejó estabilizar durante tres semanas a temperatura ambiente.

A aquellas macetas cuyos tratamientos no incluían el fermentado se les añadió la cantidad correspondiente de RP (0.75 g de RP/maceta).

Las plantas crecieron durante 6 meses en condiciones de invernadero (descritas en el capítulo de materiales y métodos) y se regaron todos los días hasta alcanzar el 100 % y el 75 % de la capacidad de campo (según el tratamiento).

6.4. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

La planta seleccionada para la realización de este ensayo, fue *Trifolium repens*. Las semillas se sembraron directamente en macetas de 500 ml de capacidad, donde se aplicó el fermentado y/o el inóculo MA (según el tratamiento). Los tratamientos micorrizados recibieron 10 g de inóculo de una mezcla de tres hongos micorrícicos arbusculares autóctonos seleccionados: *Glomus mosseae* (EEZ-43), *G. coronatum* (EEZ-44), y *G. claroideum* (EEZ-47).

6.5. Determinaciones

Las plantas se cosecharon definitivamente a los 6 meses de crecimiento vegetal (tras tres cortes sucesivos de parte aérea), y una vez cosechadas se determinó:

- *Peso seco parte aérea*
- *Peso fresco raíz*
- *Azúcares totales en parte aérea*
- *Prolina en parte aérea*

6.6. Análisis estadístico de los resultados

Los efectos de los distintos tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en este ensayo fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Las barras en las

columnas indican el error estándar y los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente distintos según el test LSD $_{0.05}$.

Se realizó un análisis de varianza multifactorial ANOVA entre los distintos tratamientos para las variables determinadas en el ensayo (peso seco parte aérea, peso fresco raíz y número de nódulos).

Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus (Statistical Graphics Corp., Princenton, NJ).

6.7. Resultados

Crecimiento vegetal

El desarrollo de parte aérea se estimuló por la micorrización pero muy particularmente por la adición de la enmienda a ambos niveles hídricos, alcanzándose los máximos desarrollos en las plantas micorrizadas que crecieron en suelos enmendados con SB. Se observó una interacción positiva entre la enmienda aplicada y la micorrización, que es evidente en cada uno de los cortes (tabla 11). Al final del ensayo, las plantas cultivadas al 100 % cc mostraron mayor desarrollo de parte aérea que las sometidas al 75 % cc, aunque estas diferencias fueron menos acusadas en las plantas que crecieron con enmienda, y especialmente en plantas micorrizadas; así mientras en las plantas micorrizadas sin enmienda al 100% cc fueron 2.4 veces mayores que las cultivadas al 75 % cc, las micorrizadas que crecieron con enmienda al 100 % cc fueron sólo 1.45 veces mayores que las sometidas al 75 % cc, teniendo el mismo tratamiento (CSB+M) (figura 14).

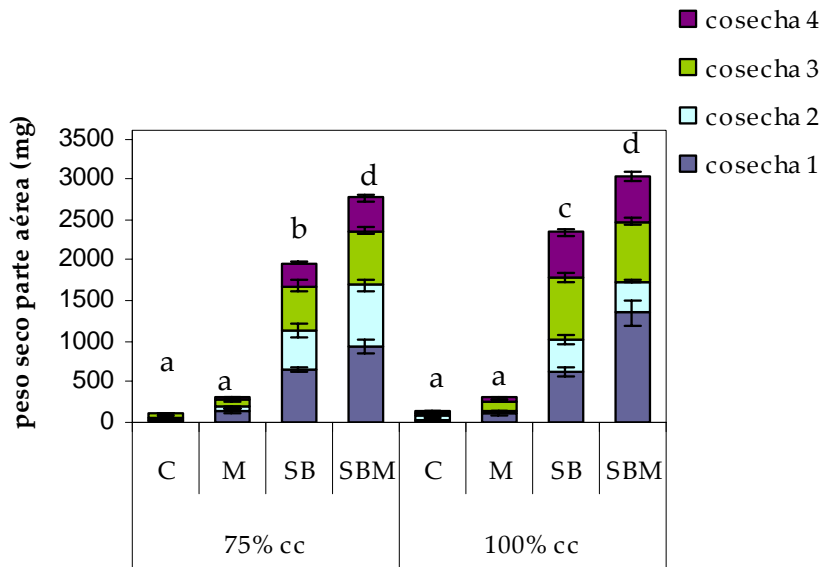


Figura 14: Peso seco de parte aérea (mg) de plantas de *Trifolium repens* cultivadas al 75 % cc (a) y 100 % cc (b) tratadas o no con fermentado de residuo de azúcar de remolacha (SB) e inoculadas o no con hongos MA (M).

La adición de la enmienda también incrementó el desarrollo de la raíz a ambos niveles hídricos. El estrés hídrico afectó, principalmente, al crecimiento de la raíz de las plantas no micorrizadas y enmendadas con SB. La micorrización no afectó la biomasa radical a ninguno de los niveles hídricos en las plantas que crecieron sin enmienda (tabla 117). Sin embargo, en presencia de SB la micorriza incrementó el desarrollo radical en plantas sometidas al 75 % cc. Tanto en el crecimiento de parte aérea como de raíz, el mayor efecto de la micorrización se evidenció en las plantas sometidas al 75 % cc y presencia de SB (figura 15)

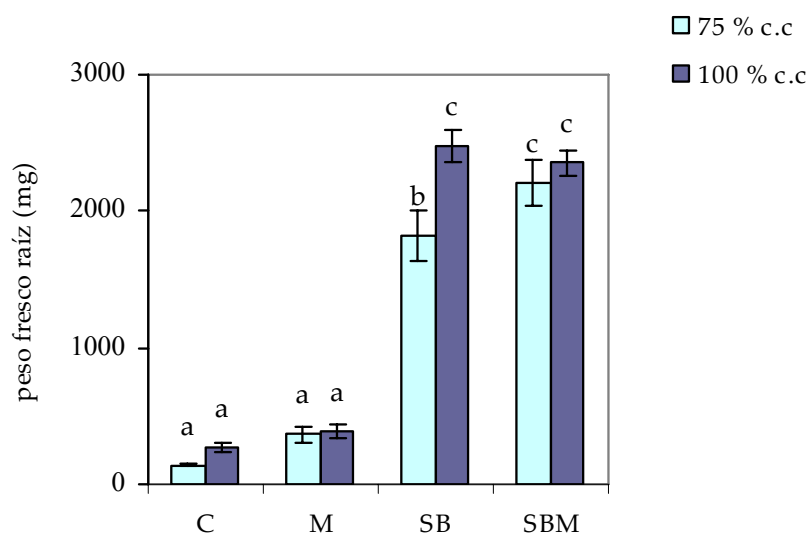


Figura 15. Peso fresco raíz (mg) de *Trifolium repens* cultivadas al 100 % y 75 % cc, tratadas o no con fermentado de residuo de azúcar de remolacha (SB) e inoculadas con hongos MA (M).

Micorrización

Las plantas no inoculadas con los hongos MA permanecieron sin micorrizar pese a haber usado un suelo natural. Todas las plantas micorrizadas presentaron una frecuencia (% F) similar de colonización, excepto las enmiendas con SB al 100 % c.c., que presentaron los valores más bajos. Las plantas sometidas a estrés hídrico presentaron los valores máximos de % M, mientras que las adicionadas de SB al 100 % c.c, alcanzaron el valor más bajo; sin embargo, todas las plantas presentaron valores similares de %m. Los valores relacionados con la presencia de arbusculos (% A y % a) mostraron la misma tendencia. En las plantas micorrizadas sin enmienda no hubo diferencias significativas independientemente del nivel hídrico. Las plantas con enmienda y cultivadas al 100 % presentaron valores mínimos de % A y % a aquellos sometidos al 75 % c.c alcanzaron los valores más altos. (figura 16).

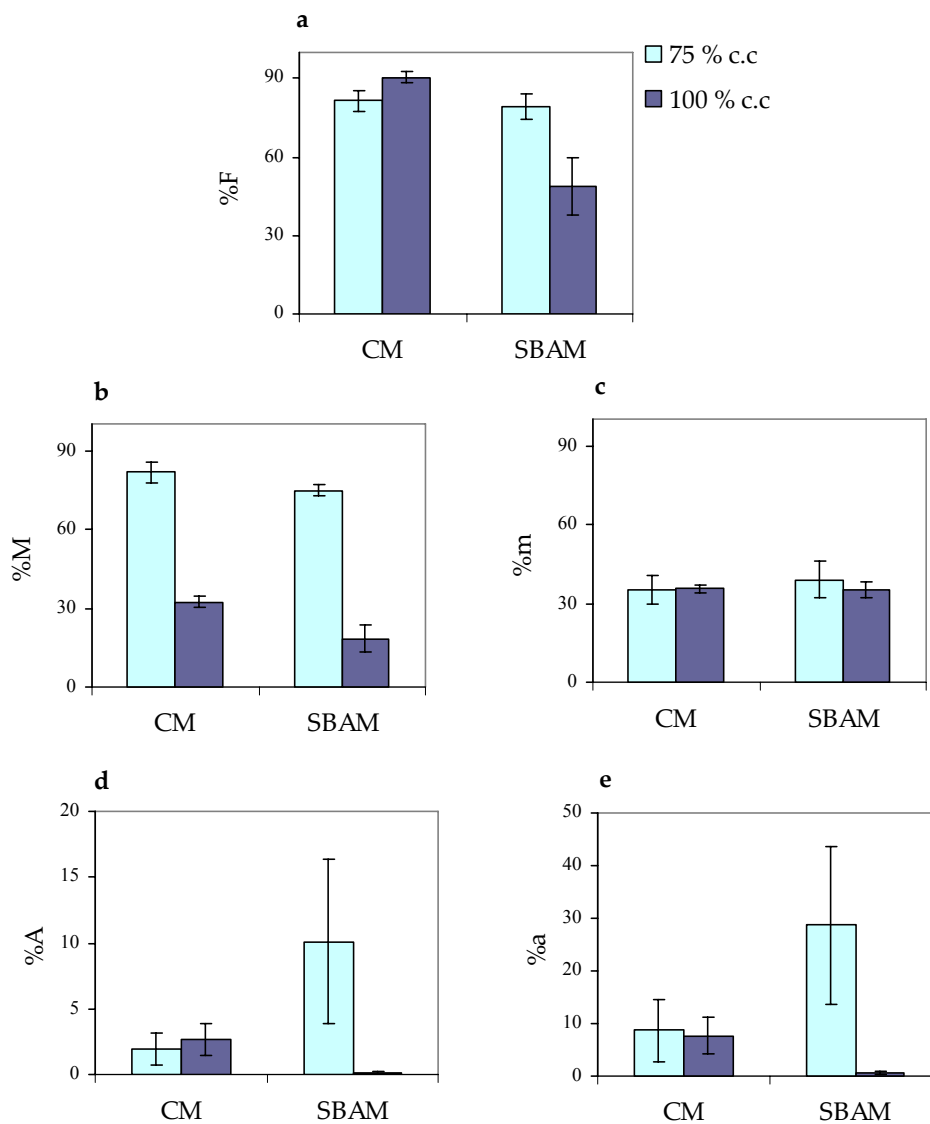


Figura 16: Efecto del fermentado del residuo de azúcar de remolacha (SB) sobre la colonización micorrícica de raíces de plantas de *Trifolium repens* cultivadas al 100 % y 75 % cc. [%F, frecuencia de micorrización (a), % M, intensidad global de micorrización (b), % m, intensidad de micorrización de los fragmentos infectados (c), % a, riqueza de arbusculos de la parte micorrizada (d), % A, riqueza de arbusculos del sistema radical (e)].

Prolina

En las plantas cultivadas al 100 % c.c, los valores máximos de prolina en parte aérea se alcanzaron en los tratamientos con SB, especialmente en las plantas micorrizadas (fig 17 a). Sin embargo, las plantas sometidas al 75 % c.c, presentaron una tendencia distinta. No hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos, excepto en las plantas con SB sin micorriza (M), donde se incrementó este valor en un 210 % (fig 17 a). Hubo una interacción positiva sobre los niveles de prolina en parte aérea entre los tres factores ensayados (estrés hídrico, micorrización y el residuo de azúcar de remolacha fermentado) (tabla 11).

Todos las plantas cultivadas al 100% cc (excepto los controles sin enmienda ni micorriza que presentaron los valores más bajos) presentaron valores estadísticamente similares de azúcares totales en parte aérea. Sin embargo, cuando las plantas se sometieron al 75 % cc el valor máximo de azúcares totales se alcanzó en las plantas tratadas con SB y sin micorriza, y el valor mínimo en las plantas con SB y micorriza (fig 17 b).

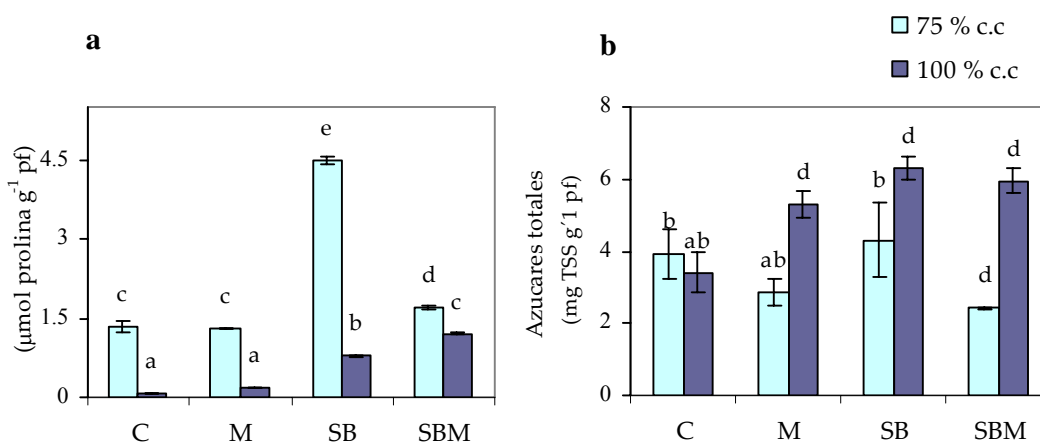


Figura 17: Prolina ($\text{nmol prolina g}^{-1} \text{ pf}$) (a) y azúcares totales ($\text{mg TSS g}^{-1} \text{ pf}$) (b) en parte aérea de *Trifolium repens* cultivadas al 100 % y 75 % cc, inoculadas o no con hongos MA (M) y tratadas o no con el fermentado del residuo de azúcar de remolacha (SB).

IV. Inoculación y enmiendas en revegetación

	Estrés hídrico (E)	Micorriza (M)	SB (S)	E x M	E x S	M x S	E x M x S
Peso seco parte aérea	0.0163 *	0.0000 ***	0.0000 ***	0.5461 ns	0.0295 *	0.0002 ***	0.7336 ns
Peso fresco raíz	0.0420 *	0.0563 ns	0.0000 ***	0.0509 (*)	0.0382 *	0.7834 ns	0.1939 ns
Colonización micorrícica							
% F	0.1209 ns	0.0000 ***	0.0031 **	0.1209 ns	0.0072 **	0.0031 **	0.0072 **
% M	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0456 *	0.0000 ***	0.1267 ns	0.0456 *	0.1267 ns
% m	0.7456 ns	0.0000 ***	0.8983 ns	0.7456 ns	0.6991 ns	0.8983 ns	0.6991 ns
% a	0.1486 ns	0.0189 *	0.6637 ns	0.1486 ns	0.1822 ns	0.6637 ns	0.1822 ns
% A	0.2484 ns	0.0462 *	0.5805 ns	0.2484 ns	0.1684 ns	0.5050 ns	0.1684 ns
prolina	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0000 ***
Azúcares totales	0.0003 ***	0.0004 ***	0.0000 ***	0.0000 ***	0.4049 ns	0.0000 ***	0.3824 ns

Tabla 11: Valores del análisis de varianza multifactorial para los parámetros de simbióticos y bioquímicos de determinados.

7. SEGUIMIENTO A LO LARGO DEL TIEMPO DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE HONGOS MA AUTÓCTONOS Y ALPEORUJO (DOC) TRATADO MICROBIOLÓGICAMENTE CON *ASPERGILLUS NIGER* SOBRE EL CRECIMIENTO DE *TRIFOLIUM REPENS*.

7.1. Objetivo

Evaluar en suelo natural el efecto de la interacción de los hongos MA con el alpeorajo (DOC) fermentado. En este ensayo se eligió como planta modelo a *Trifolium repens*, ya que

al ser forrajera permitió cortes sucesivos, y por tanto el estudio de esta interacción a lo largo del tiempo.

7.2. Condiciones experimentales

El sustrato utilizado fue una mezcla suelo natural: arena natural 5:2 (v:v). La arena se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

Para el proceso de fermentación se utilizó como sustrato alperorujó (DOC) suplementado con 0.75 g de fosfato de roca. La preparación del sustrato así como la inoculación con *A. niger* y las condiciones de la incubación, se realizaron siguiendo los pasos descritos en el capítulo de materiales y métodos.

Las enmiendas se mezclaron con la mezcla suelo-arena en una proporción de 5% cuando fue requerido, y se dejaron durante tres semanas a temperatura ambiente.

A aquellas macetas cuyos tratamientos no incluían el fermentado se les añadió 0.75 g de RP.

Este ensayo sigue actualmente en curso, y se han ido realizando cortes sucesivos de parte aérea a lo largo del tiempo. Las plantas se encuentran creciendo en condiciones de invernadero (descritas en el capítulo de materiales y métodos) y se regaron todos los días según su capacidad de campo. A los 8 meses de crecimiento las plantas se sometieron a estrés hídrico (75% cc) durante un mes. A los 8 meses (antes de aplicar el estrés hídrico) y a los 9 meses de crecimiento se congeló la parte aérea de todos los tratamientos para posteriores análisis.

7.3. 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 500 ml de capacidad, donde cuando correspondió el sustrato había recibido el fermentado y/o el inóculo MA. Los tratamientos micorrizados recibieron 10 g de inóculo de una mezcla de tres hongos micorrícicos arbusculares autóctonos: *Glomus mosseae* (EEZ-43), *G. coronatum* (EEZ-44), y *G. claroideum* (EEZ-47).

7.4. Diseño experimental

Los tres factores considerados en el diseño experimental fueron: (1) aplicación de fósforo al suelo (2) enmienda agrícola [control (sin enmienda), DOC (alperorujó fermentado con *A. niger*)] y (3) inoculación micorrícica (M), resultando un total de 6 tratamientos con 5 repeticiones cada uno.

7.5. Determinaciones

Hasta el momento se han realizado 10 cortes sucesivos de parte aérea y se ha determinado:

- *Peso fresco parte aérea*
- *Azúcares totales en parte aérea (cortes 8º y 9º)*
- *Prolina en parte aérea (cortes 8º y 9º)*

7.6. Resultados

Las plantas de *Trifolium repens* que crecieron en presencia de la enmienda DOC alcanzaron los niveles más bajos de crecimiento de parte aérea; sin embargo, los máximos valores de biomasa se alcanzaron en las plantas micorrizadas con la enmienda DOC, con un incremento del 258 % con respecto al control sin micorriza y sin enmienda (figura 18). Así pues, la micorrización fue especialmente efectiva en presencia de la enmienda DOC, efecto que se potencia a lo largo del tiempo como demuestran los datos de las cosechas sucesivas.

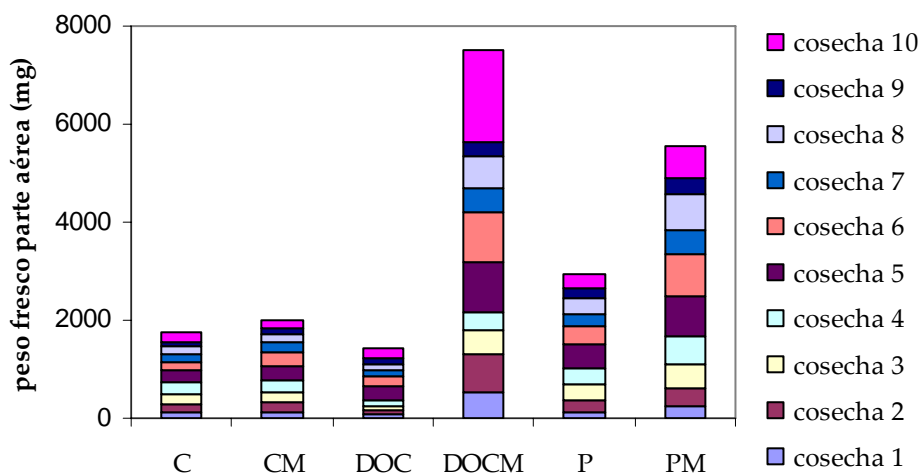


Figura 18 : Peso fresco de parte aérea (mg) de *Trifolium repens* inoculadas o no con hongos MA (M) en presencia o ausencia de alpeorujó fermentado con *A. niger* y suplementadas o no con fósforo.

Tanto la concentración de prolina como de azúcares totales en hoja, se incrementó en las plantas crecidas al 75 % de c.c, tanto en los tratamientos con micorriza y DOC como en los tratamientos con P.

En los tratamientos con DOC no hubo diferencias significativas entre las plantas sometidas a 100 % de c.c y las sometidas al 75 % de c.c, a nivel de biomasa, concentración de prolina y de azúcares totales en parte aérea. Sin embargo, tanto las plantas control y control micorrizadas sometidas al 75 % de c.c y con crecimiento similar a las plantas cultivadas en presencia de DOC, presentaron valores más elevados de azúcares totales en parte aérea. (figura 20).

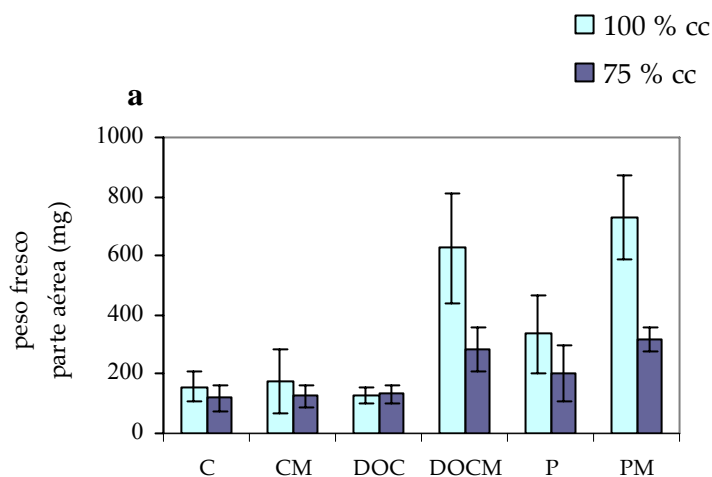


Figura 19: Peso fresco parte aérea (mg) de *Trifolium repens* inoculadas o no con hongos MA (M) en presencia o ausencia de alpeorujó fermentado con *A. niger* y suplementadas o no con fósforo cultivadas a dos niveles hídricos (75 % y 100 %)..

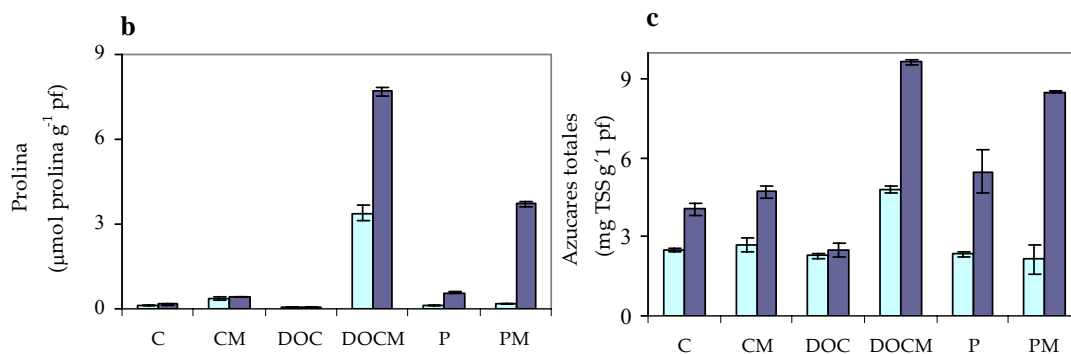


Figura 20: Concentración de prolina y azúcares totales en parte aérea de *Trifolium repens* inoculadas o no con hongos MA (M) en presencia o ausencia de alpeorujó fermentado con *A. niger* y suplementadas o no con fósforo, cultivadas a dos niveles hídricos (75 % y 100 %).

IV. 3. discusión

Como se indicó en el capítulo de introducción de esta memoria, en los ecosistemas mediterráneos las condiciones climáticas severas, caracterizadas por veranos muy secos, con precipitaciones moderadas o escasas y ocasionalmente torrenciales, conducen a una degradación de los mismos que se manifiesta principalmente en la pérdida de las poblaciones que conforman sus comunidades vegetales. La alteración de la cubierta vegetal no es más que el primer signo externo y visible de los procesos degradativos. Pero estos también inciden de forma decisiva en otros aspectos, menos evidentes, de los primeros estadios de la degradación del ecosistema. Concretamente, la pérdida de cobertura vegetal va asociada al deterioro de las propiedades físico-químicas del suelo y de la microbiota que reside en las interfaces suelo-planta. Dado que la degradación de la cubierta vegetal es a su vez consecuencia y causa de la degradación del suelo en los ecosistemas mediterráneos, parece evidente que la restauración de una cubierta vegetal sea el objetivo prioritario de los programas de lucha contra la desertificación (Francis & Thornes, 1990). En este contexto, la reintroducción de especies arbustivas autóctonas aparece como una estrategia clave para la restauración de los ecosistemas degradados, ya que facilita la regeneración de las comunidades de plantas originales (Herrera *et al.*, 1993) contribuyendo así a la conservación de la biodiversidad y al mantenimiento de los procesos ecológicos esenciales.

Existen numerosos antecedentes sobre el efecto beneficioso de hongos micorrícicos arbusculares (MA) en el establecimiento y crecimiento de especies arbustivas tanto en condiciones naturales como en condiciones controladas (Roldán *et al.*, 1992; Azcón & Barea, 1997; Requena *et al.*, 2001) Además, estudios de (McGonigle & Fitter, 1990; Clapp *et al.*, 1995; Jeffries & Barea, 2000) sugieren la utilización de una mezcla de hongos MA como inoculantes, ya que de esta forma la planta seleccionaría el más adecuado según sus necesidades y estados vegetativos. Tomando como base estos estudios, elegimos *Dorycnium pentaphyllum* como planta modelo para nuestras investigaciones, al ser un arbusto autóctono de la Cuenca Mediterránea, que forma simbiosis con *Rhizobium* y hongos MA.

Por otro lado, debido a la escasa actividad microbiana de estos suelos, la introducción en el sistema de microorganismos rizosféricos beneficiosos seleccionados puede resultar clave en un programa de revegetación. Como ya indicamos en el apartado de introducción general estos microorganismos incrementan el crecimiento y la nutrición de la planta mediante distintos mecanismos, que incluyen, entre otros, la solubilización de P. Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación indicaron la capacidad de *Yarrowia lipolytica* para solubilizar fosfato de roca mediante la producción de ácido cítrico (Vassileva *et al.*, 2000; Vassilev *et al.*, 2001d). Además, estos autores demostraron la

capacidad de esta levadura como ayudante de la micorrización, de manera que su aplicación en sistemas suelo-planta resultó en un incremento del contenido de P en parte aérea y, como consecuencia, una mayor biomasa de la planta.

Como ya hemos indicado, en el clima Mediterráneo concurre el deterioro de las propiedades físico-químicas del suelo y su baja actividad microbiana con el fuerte estrés hídrico al que están sometidas las plantas, por lo que el establecimiento exitoso de la simbiosis MA puede resultar fallido. Por ello, se propuso estudiar los efectos del acondicionamiento del suelo mediante la adición de enmiendas orgánicas y microorganismos solubilizadores de P.

Con este objetivo, procedimos al estudio de la compatibilidad del inóculo MA, *Yarrowia lipolytica* y dos residuos agroindustriales transformados microbiológicamente con *Aspergillus niger*, en la mejora de las propiedades del suelo y en el establecimiento de *D. pentaphyllum*. Estudios previos, utilizando suelos de otras localidades, habían demostrado la eficacia de los residuos de azúcar de remolacha (SB) y alpeorajo (DOC) biotransformados con *A. niger* como enmendantes del suelo (Rodríguez *et al.*, 1999). Nuestros resultados han demostrado que tanto la nutrición y desarrollo de la planta autóctona (*Dorycnium*), como las propiedades biológicas y físico-químicas del suelo erosionado objeto de estudio, mejoraron por la aplicación de los inoculantes microbianos y las enmiendas orgánicas (SB y/o DOC) utilizadas. Las diferencias más significativas se debieron principalmente a la adición de las enmiendas orgánicas; no obstante, la actividad microbiana también fue más relevante en presencia de las enmiendas.

Así, el fermentado de SB y/o DOC incrementaron todas las actividades enzimáticas, el carbono y carbohidratos hidrosolubles y también favorecieron el crecimiento de la planta. Por otro lado, las inoculaciones microbianas fueron especialmente efectivas a nivel de nutrición de la planta, y en un mayor grado en presencia de las enmiendas orgánicas, donde se alcanzaron los máximos valores de desarrollo vegetal y P y N asimilados en parte aérea.

En las plantas control, ni *Rhizobium* ni los hongos MA indígenas colonizaron las plantas de *Dorycnium*. Estos resultados corroboran los de (Herrera *et al.*, 1993; Azcón & Barea, 1997) que indicaban que la colonización simbiótica natural en suelos desertificados es extremadamente baja. Es más, en nuestro ensayo, la efectividad de los inoculantes microbianos aplicados, como microorganismos promotores del crecimiento de las plantas, solamente se evidenció en suelo acondicionado por las enmiendas orgánicas.

Por otro lado, tanto los fermentados de SB como DOC incrementaron las poblaciones nativas de esporas de los hongos MA durante los tres meses de crecimiento de la planta. Los valores de este incremento oscilaron entre 319% (DOC) y 761% (SB). Estos resultados coinciden con los de (Douds & Schenck, 1990), que encontraron un incremento en el número de esporas MA debido a la adición de materia orgánica. La inoculación de *Y.*

lipolytica también incrementó el número esporas de hongos MA autóctonos en un 317% (en suelo sin enmienda), 244% (en suelo enmendado con DOC), y en un 158% (en suelo enmendado con SB). Sin embargo, durante el periodo experimental este incremento en el número de esporas no se reflejó en un incremento en la colonización MA de los hongos indígenas presentes en el suelo natural. Ello puede ser debido a que tanto las esporas como los propágulos de los hongos MA tienen un periodo de dormancia y que no son viables como inóculo hasta el siguiente periodo de crecimiento de una raíz próxima. El incremento en el número de esporas de hongos MA originado por la inoculación de *Y. lipolytica*, subraya la importancia de esta levadura como un biofactor que contribuye a potenciar la presencia y el papel de los hongos MA en suelos degradados.

Las inoculaciones microbianas son esenciales para el desarrollo y nutrición de la planta en áreas degradadas, especialmente en la fijación de nitrógeno por *Rhizobium* y en la captación de P por los hongos MA.

En este ensayo, los valores más elevados de P en parte aérea, se alcanzaron en las plantas que crecieron con enmienda, SB y/o DOC, y el mayor incremento se obtuvo con SB. Estos resultados corroboran los obtenidos por (Rodríguez *et al.*, 1999) en los que hubo también un incremento de P en parte aérea de plantas de alfalfa tras la adición al suelo de residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger*. Las inoculaciones microbianas, tanto de *Y. lipolytica* como de los hongos MA, fueron especialmente efectivas en presencia de las enmiendas. La capacidad de *A. niger* para solubilizar RP cuando crece en sustratos agroindustriales ha sido demostrada anteriormente (Vassilev *et al.*, 1995; Vassilev *et al.*, 1996; Vassilev *et al.*, 1997). En nuestros ensayos, los residuos agroindustriales se añadieron al suelo tras el proceso de fermentación con *A. niger*, lo que implicó un aporte de P soluble al sistema. Así, el mayor crecimiento de las plantas en presencia de SB parece deberse en gran parte, a la mayor captación de P por parte de estas como consecuencia de una mayor disponibilidad de este elemento en el suelo. De la misma manera, la menor efectividad de *A. niger* en la mineralización de DOC y consecuentemente en la solubilización de RP, debido al elevado contenido en lignina de DOC, explicaría el menor crecimiento de las plantas con respecto a los tratamientos con SB.

El impacto del producto de la fermentación de estas enmiendas agrícolas sobre la nutrición vegetal de P, fue particularmente evidente cuando se asociaron con inoculantes microbianos beneficiosos, tales como los hongos MA o *Y. lipolytica*, aunque la inoculación conjunta de ambos no incrementó la efectividad de ellos por separado. Cuando se añaden las enmiendas biotransformadas al suelo, parte del fósforo soluble puede quedar de nuevo inmovilizado en forma de fosfato cálcico debido al pH alcalino del suelo (Vassilev *et al.*, 1996). La presencia de *Y. lipolytica* en el sistema, al ser una levadura solubilizadora de RP, garantizaría la biodisponibilidad de P a lo largo del tiempo (Vassilev *et al.*, 2001a).

Cabe destacar que el efecto de *Y. lipolytica* sobre el contenido de P en parte aérea solamente se constató en presencia de las enmiendas agrícolas biotransformadas, lo que indica una vez más la importancia de estas para la expresión de la actividad de los inoculantes microbianos. Por otro lado, el incremento de P en las plantas micorrizadas en presencia de las enmiendas se debió no solo a la solubilización de P por *A. niger* sino también al incremento en la captación de este por el micelio extraradical de los hongos MA. (Barea *et al.*, 1980) también observó que el fósforo obtenido de la solubilización de RP por parte de microorganismos solubilizadores no tuvo el efecto negativo sobre el desarrollo de los hongos MA que tiene el fósforo soluble aplicado al medio, siendo compatible la aplicación de ambos inoculantes, solubilizadores de RP y hongos MA, en un sistema suelo-planta.

La actividad fosfatasa juega un papel importante en la disponibilidad del fósforo en suelo, ya que está involucrada en la hidrólisis de P en forma orgánica hasta formas inorgánicas. En este ensayo, la actividad fosfatasa se incrementó en la rizosfera de las plantas enmendadas con ambos residuos, especialmente con SB. Este incremento se debió probablemente a un aumento de la actividad microbiana del suelo como consecuencia de la adición de los sustratos orgánicos al suelo. (García-Gil *et al.*, 1999) demostró que la inoculación MA disminuía la actividad fosfatasa en un 43% en comparación con los tratamientos no micorrizados, aunque otros autores como (Tarafdar & Marschner, 1994) obtuvieron resultados contrarios. Nuestros resultados corroboran los obtenidos por (García-Gil *et al.*, 1999), ya que la micorriza disminuyó la actividad fosfatasa en presencia de todas las enmiendas agrícolas aplicadas al suelo. El hecho de que en los tratamientos sin enmienda no se manifieste una disminución de esta actividad enzimática en plantas inoculadas con hongos MA se explicaría por el bajo nivel de colonización MA de estas plantas, que se traduciría en una baja presencia del micelio MA en la rizosfera.

En este ensayo, la colonización MA en las plantas que crecieron en suelo con SB biotransformado, incrementaron de forma considerable la captación de nitrógeno, de hecho, el número de nódulos también incrementó con este tratamiento. La capacidad de los hongos MA para incrementar la fijación de nitrógeno es un hecho constatado (Barea *et al.*, 1992; Barea *et al.*, 2002a). Además, estudios con ^{15}N , tanto en ensayos de invernadero como en campo, han mostrado que los hongos MA también incrementan la captación de N del suelo (Tobar *et al.*, 1994b; Azcón & El-Atrash, 1997; Mäder *et al.*, 2000) Por otro lado, tanto la actividad ureasa como la proteasa están directamente implicadas en el ciclo del N en el suelo, y ambas actividades también se incrementaron en presencia de la enmienda SB. Sin embargo, a pesar de que los tratamientos con DOC mostraron valores similares de número de nódulos y de actividad ureasa y proteasa en suelo rizosférico, que los tratamientos con SB, su contenido de N en parte aérea fue menor. El menor desarrollo de parte aérea de las plantas que crecieron en presencia de la enmienda DOC con respecto a

las que crecieron con SB, como consecuencia de la menor captación de P, explicaría este hecho.

La enzima β -glucosidasa está involucrada en el desarrollo del ciclo del carbono en el suelo, (Hayano & Tubaki, 1985). Su actividad se incrementó en todos los tratamientos en los que las enmiendas fueron aplicadas, especialmente SB. Por otro lado, los valores elevados de la actividad deshidrogenasa en la rizosfera de los suelos con enmienda es un reflejo de la elevada actividad oxidativa de los microorganismos del suelo (Skujins, 1976), lo que se traduce en un incremento en la fertilidad y la calidad del mismo.

Los parámetros relacionados con las actividades microbianas de la rizosfera se utilizan como marcadores biológicos de la recuperación de los suelos (Naseby & Lynch, 1997; Caravaca *et al.*, 2002); El incremento de todas las actividades enzimáticas, como consecuencia de la adición de las enmiendas orgánicas, indica su papel clave en la recuperación de las propiedades biológicas del suelo.

La ligera disminución del pH del suelo rizosférico como consecuencia de la adición de los residuos biotransformados, puede ser el resultado de la solubilización de RP por *A. niger* durante el proceso de biotransformación previo al bioensayo. Este efecto ya fue constatado previamente por (Vassilev *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1999)

Los valores de la conductividad eléctrica aumentaron en suelo con enmienda, pero la inoculación con *Y. lipolytica* supuso una disminución de este parámetro. Ello indica el efecto positivo de esta levadura neutralizando el estrés osmótico del medio ya que valores elevados de conductividad eléctrica suelen resultar perjudiciales para el desarrollo vegetal.

La materia orgánica del suelo se puede separar en dos fracciones: una fracción estable y pasiva compuesta principalmente por los ácidos húmicos, y otra fracción más pequeña pero intercambiable y activa, sometida a procesos de mineralización e inmovilización. Dentro de esta última fracción se encuentra el carbono y los carbohidratos hidrosolubles. Autores como (García *et al.*, 1994), consideran esta fracción como índice del potencial de la actividad microbiana del suelo. En este ensayo, la adición de las dos enmiendas incrementaron tanto el carbono como los carbohidratos hidrosolubles; estos sustratos pueden ser utilizados como fuente de energía por los microorganismos lo que implicaría un incremento de la actividad microbiana y por tanto de la fertilidad del suelo.

Ambas enmiendas incrementaron así mismo, el porcentaje de estabilidad de agregados con respecto al control (suelo natural sin enmienda). Aunque en este caso, la micorriza también incrementó este valor en suelo sin enmienda. Muchos estudios han indicado el papel clave que juega la materia orgánica en la formación de agregados estables del suelo al incrementar la población microbiana del mismo (Bartoli *et al.*, 1992; Metzger *et al.*, 1987). Los microorganismos bien por una acción mecánica (unión por las

hifas) o de una forma metabólica (formación de polisacáridos) son los principales responsables de la formación de agregados estables al agua (Metzger *et al.*, 1987). En este sentido, el incremento de la formación de agregados estables en los suelos donde se adicionó cada uno de los residuos agroindustriales biotransformados se debería al incremento en la actividad microbiana, como consecuencia de una mayor disponibilidad de nutrientes (como indican los valores de C y carbohidratos hidrosolubles). Por otro lado, es bien conocida la contribución de los hongos MA en la formación de agregados (Miller & Jastrow, 1990), esta capacidad se puede explicar por la formación de hifas que actúan como una red que aglomera las partículas del suelo, o por la formación de glomalina, una glicoproteína que actuaría como cementante del suelo (Wright & Upadhyaya, 1998). El hecho de que no se observe una influencia de los hongos MA sobre la estabilidad de agregados en el suelo con enmienda, puede deberse a una limitación puramente física, ya que en macetas de 500 cc de capacidad todo el volumen fue ocupado por las raíces de *Dorycnium* al obtenerse un mayor desarrollo vegetal. En tal caso, las plantas micorrizadas no presentan las ventajas derivadas del hecho de que las hifas de los hongos MA incrementen el volumen de suelo explorado. Este hecho también explicaría que el desarrollo de parte aérea y raíz de las plantas micorrizadas que crecieron en presencia de enmienda estuviera frenado por dicha circunstancia.

En resumen, los resultados de este primer ensayo indican que la utilización de residuos agroindustriales biotransformados, como enmendantes de un suelo degradado, es una práctica recomendable, debido al elevado contenido de productos orgánicos e inorgánicos de estos materiales. Su aplicación al suelo supone un incremento de la formación de agregados estables, de C y carbohidratos hidrosolubles y de las actividades enzimáticas rizosféricas, lo que se traduce en una mejora tanto de las propiedades físico-químicas como de las propiedades biológicas del suelo. Además, su aplicación al suelo es esencial para el desarrollo adecuado de las plantas, ya que favorece la formación de estructuras simbióticas como son la formación de nódulos y la colonización MA, y también incrementa el número de esporas de hongos MA en suelo que se consideran los propágulos más resistentes y estables capaces de tolerar situaciones ambientales adversas como son las habituales en sistemas degradados.

Como ya se ha indicado, los hongos MA son simbioses obligados, es decir, necesitan de una planta hospedadora para completar su ciclo de vida. Además, no muestran la especificidad existente en otras asociaciones simbióticas como la que forman bacterias pertenecientes a las *Rizobacterias* fijadoras de nitrógeno y las raíces de las leguminosas. Sin embargo, a pesar de que no ocurra dicha especificidad taxonómica estricta entre el endofito y la planta, sí existe lo que se denomina compatibilidad funcional. La compatibilidad funcional fue definida por (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988; Smith & Gianinazzi-Pearson, 1990) como la expresión fenotípica de los hongos MA como resultado

de las influencias del ambiente sobre la expresión genotípica de ambos simbioses, planta y hongo. Es la “preferencia” de algunas especies vegetales a ser colonizadas por determinados hongos en las comunidades vegetales, hongos de los que se beneficiarán de diversa forma (Jeffries & Barea, 2000). A su vez, las plantas también presentan unos rangos variables de micotrofia, es decir, de susceptibilidad a establecer simbiosis con el hongo. La mayoría de las plantas micotrofas pueden ser colonizadas por cualquier especie de hongo MA, pero no todos los hongos MA colonizan con la misma intensidad y eficiencia las diferentes especies vegetales (Jeffries & Barea, 2000). Tomando como base este hecho, se procedió al estudio de la compatibilidad funcional de *Dorycnium pentaphyllum* con los hongos MA seleccionados para este estudio. Estos hongos MA proceden de una zona de la provincia de Murcia (Los Cuadros, Fortuna), con características climáticas y ecológicas similares a la zona de procedencia de las semillas de *D. pentaphyllum*. Los resultados de este ensayo indicaron que las plantas inoculadas con *Glomus mosseae*, *G. claroideum* y *G. coronatum* mostraron un mayor crecimiento y nivel de colonización micorrícica, lo que sugiere que estos tres hongos presentan una mayor compatibilidad funcional con *D. pentaphyllum*. Basándonos en estos resultados seleccionamos para los ensayos posteriores una mezcla de los tres hongos MA como inoculantes MA autóctonos en dicho suelo.

Los resultados obtenidos en el primer ensayo realizado con *Dorycnium* se evidenció la mayor eficiencia del fermentado del residuo de azúcar de remolacha (SB) frente al alpeorajo (DOC), en términos de crecimiento y nutrición de la planta (*D. pentaphyllum*). Estas diferencias podían deberse a una menor capacidad de *A. niger* para fermentar el alpeorajo (DOC), debido a su alto contenido en lignina. Por ello, se realizó un ensayo en el que se utilizó alpeorajo fermentado con *Phanerochaete cryosporum*. *P. cryosporum* es un hongo blanco que tiene la capacidad de oxidar lignina, al contener una enzima llamada lignina peroxidasa (Tien & Kirk, 1983). Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron la eficiencia de este fermentado tras su aplicación al suelo en términos de crecimiento y nutrición fosforada de la planta. Tanto el desarrollo de parte aérea y raíz se incrementaron por la adición de la enmienda DOC biotransformado, especialmente en plantas micorrizadas, lo cual refleja una interacción positiva entre el fermentado y los hongos MA que afectó, especialmente, el desarrollo de raíz. Así pues, en plantas no micorrizadas, la adición de la enmienda incrementó en un 222 % la biomasa de raíz y en un 410 % la de parte aérea con respecto al control sin enmienda, mientras que en plantas micorrizadas este incremento fue de un 587 % (raíz) y un 572 % (parte aérea) respectivamente. Tanto la levadura *Y. lipolytica* como la inoculación MA incrementaron el contenido de P en parte aérea, alcanzándose los valores máximos cuando ambos inoculantes estaban presentes en el sistema. Es decir, el efecto positivo de la levadura fue más evidente en presencia de la micorriza, lo que podría indicar una interacción positiva

entre ambos microorganismos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por (Vassilev *et al.*, 2001c) en condiciones experimentales diferentes. Estos autores mostraron la capacidad de *Y. lipolytica* para solubilizar el RP, y su papel importante incrementando el crecimiento y nutrición de las plantas cuando se aplica conjuntamente con hongos MA.

Tras los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se planteó el estudio de la influencia de las enmiendas sobre el crecimiento de plantas de trébol, micorrizadas y no micorrizadas, en condiciones de estrés hídrico, simulando así, las condiciones climáticas y de limitación hídrica a las que están sometidas las plantas en condiciones naturales. Para ello, también se investigaron algunos aspectos bioquímicos relacionados con la tolerancia de las plantas a la sequía, centrándonos en los contenidos de azúcares totales y prolina en hoja.

Los resultados obtenidos en el ensayo en el que se aplicó el fermentado de SB, mostraron que las plantas micorrizadas crecidas en presencia de enmienda presentaron una mayor tolerancia al estrés hídrico pese a poseer un mayor desarrollo. Este efecto de mejora del estado hídrico fue motivado tanto por la presencia de materia orgánica como por la micorrización.

La materia orgánica además de contribuir al aumento de la capacidad de retención hídrica del suelo, mediante la formación de agregados, tiene la capacidad de embeber y retener grandes cantidades de agua debido a sus propiedades coloidales y a su posibilidad de formar enlaces de hidrógeno con el agua, que parcialmente pone a disposición de las plantas (Allison, 1973). En el ensayo "in vitro" en el que se estudió la influencia de la enmienda del residuo de azúcar de remolacha sobre el agua disponible del suelo, observamos que si bien no hubo un incremento significativo del agua disponible del suelo por la adición de fermentado sí se observó una tendencia en esta línea. Además, el aporte de nutrientes que implica la adición de la enmienda agrícola al suelo supuso un incremento en el crecimiento y en el estado nutricional de la planta lo que pudo conducir a una mayor tolerancia de estas al estrés hídrico pese a que sus necesidades de agua fueran mayores.

Los datos de micorrización podrían explicar las diferencias encontradas en el crecimiento de las plantas micorrizadas sometidas a distintos tratamientos. Observamos valores similares de % F (frecuencia de micorrización) en las plantas micorrizadas sin enmienda crecidas a ambos niveles hídricos; sin embargo, en presencia de enmienda, las plantas micorrizadas cultivadas al 100 % c.c presentaron valores más bajos de % F que las sometidas al 75 % c.c. Como ya se ha comentado anteriormente, el suelo utilizado en estos ensayos se caracteriza por ser un suelo degradado, pobre en nutrientes y con bajo potencial microbiano. En este contexto, el desarrollo de la simbiosis MA es fundamental para el crecimiento de las plantas, incluso en condiciones hídricas óptimas. Sin embargo, en presencia de SB biotransformado la situación es completamente diferente. La adición

de este enmendante orgánico supone un incremento en el aporte de nutrientes para la planta, además de potenciar la actividad microbiana del suelo. Al 100% c.c las plantas con enmienda crecieron en mejores condiciones, tanto nutricionales como hídricas, lo que pudo conducir a valores menores de micorrización en comparación con las cultivadas al 75 % c.c. En este sentido, cabe destacar el incremento de la intensidad de arbusculos en las plantas micorrizadas con fermentado que crecieron al 75 % c.c. Los arbusculos son las estructuras encargadas del intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo, y por tanto, un incremento en el número de estas estructuras indica una mejora en la funcionalidad de la simbiosis. Se ha comprobado que la simbiosis MA incrementa la tolerancia de la planta frente al déficit hídrico, aunque los mecanismos pueden ser diversos (Augé, 2001; Ruiz-Lozano, 2003). Autores como (Safir & Boyer, 1971; Safir *et al.*, 1972), indicaron inicialmente que el papel que juega los hongos MA para combatir las condiciones de estrés hídrico es básicamente nutricional. Sin embargo, otros autores como (Auge, 1987; Bethlenfalvay *et al.*, 1988) han comprobado que plantas micorrizadas, con tamaño y nutrición fosforada similares a las no micorrizadas, mostraban relaciones hídricas diferentes a estas.

En plantas sometidas a estrés hídrico se acumulan una serie de solutos, como azúcares o aminoácidos, que les permiten regular el desequilibrio osmótico celular. Estas sustancias son importantes para mantener el potencial osmótico y por tanto contribuyen a la tolerancia de la planta en condiciones de déficit hídrico (Schellembaum *et al.*, 1998). Por ello, observamos concentraciones más altas de prolina en las plantas cultivadas al 75 % cc. Se ha comprobado que la micorrización puede cambiar la concentración de estas sustancias acumuladas en hoja (Porcel *et al.*, 2003; Kubikova *et al.*, 2001). En nuestro ensayo, en los tratamientos con enmienda, la micorrización disminuyó los valores de azúcares totales en las hojas de las plantas sometidas a estrés hídrico. (Schellembaum *et al.*, 1998) sugirieron que los hongos MA podían ser fuertes competidores por los fotosintatos sintetizados en condiciones de estrés, de manera que la disponibilidad de dichos fotosintatos en parte aérea disminuiría en las plantas micorrizadas. No obstante, esta disminución de azúcares totales en parte aérea también se podría explicar como un mecanismo de una mayor tolerancia de la planta frente al estrés hídrico. La menor concentración de solutos compatibles en parte aérea podría indicar que las plantas evitan de una manera más eficaz el estrés hídrico y no requiere producir tales reguladores osmóticos (Augé, 2001). De hecho, la prolina, osmoregulador medido en este estudio, también disminuyó en este tratamiento. En contraste con estos resultados, en los tratamientos sin enmienda sometidos a estrés hídrico, no se observaron diferencias en la concentración de prolina ni de azúcares totales entre las plantas micorrizadas y las no micorrizadas. Esto puede deberse probablemente a la baja actividad micorrícica en términos de %A, %a que presentan las raíces de estas plantas micorrizadas. El papel de la

micorriza en las plantas sin enmienda parece ser esencialmente nutricional, y el crecimiento de la planta se ve afectado por el estrés hídrico.

Se puede concluir por tanto que el fermentado producido por la biotransformación de SB "per se", o mediante un incremento en la micorrización, contribuyó a la mayor tolerancia de las plantas frente a condiciones de estrés hídrico aplicadas.

IV. 4. Conclusiones

1. En suelo natural desertificado es necesaria la inoculación de hongos MA para que se desarrolle la micorrización y la nodulación.
2. En suelo natural desertificado es imprescindible la adición de los residuos agroindustriales biotransformados para que se expresen los inoculantes microbianos aplicados
3. La adición de los residuos agroindustriales biotransformados mejoró tanto las propiedades físico-químicas del suelo, como las propiedades biológicas.
4. La aplicación de DOC fermentado con *Phanerochaete chrysosporium* fue efectiva en términos de crecimiento y contenido en P de *Dorycnium pentaphyllum*.
5. En condiciones de estrés hídrico la adición del residuo de azúcar de remolacha tratado con *A. niger* incrementó el porcentaje de arbusculos (% A y % a) en raíces de *Trifolium repens* micorrizadas.
6. Las plantas micorrizadas crecidas en presencia del residuo de azúcar de remolacha tratado con *A. niger* en condiciones de estrés hídrico presentaron valores de crecimientos similares a las crecidas en condiciones hídricas óptimas.

**V. INTERACCIÓN DE INOCULANTES MICROBIANOS
Y RESIDUOS AGROINDUSTRIALES
BIOTRANSFORMADOS EN BIOREMEDIACIÓN**

V. 1. Introducción

1 INTRODUCCIÓN A LA PROBLEMÁTICA QUE PRESENTA LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS DE LOS ECOSISTEMAS DEGRADADOS. JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES.

La contaminación por metales pesados y otros elementos inorgánicos presenta problemas medioambientales a largo plazo por ser especialmente recalcitrante. Ello constituye, en la actualidad, uno de los problemas medioambientales que suscita mayor preocupación. Consecuentemente, lograr la descontaminación metálica es hoy día una actividad ampliamente demandada, tal situación se prevee que incrementará en los próximos años. La presencia de metales pesados en el suelo tiene un origen geológico (Jeng & Bergseth, 1992). Sin embargo, existen diversas fuentes de metales derivadas directamente de actividades antrópicas. Entre ellas, cabe citar la quema de combustibles fósiles, la explotación minera, desechos urbanos, lodos de depuradoras, fertilizantes, pesticidas y liberación al medio de pigmentos y baterías (Darbon *et al.*, 1992; Li & Christie, 2001; Del Río *et al.*, 2002; Bowman *et al.*, 2001).

El incremento general de la contaminación en los últimos años ha afectado a amplias áreas de terreno, convirtiéndolas en peligrosas para humanos, animales y el medioambiente en general. Se estima que solamente en la Unión Europea hay más de un millón de áreas contaminadas (Bowman *et al.*, 2001). Una de las fuentes de contaminación más 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, Huelva, con grave incidencia no solo en los agrosistemas regados por el río Guadiamar, sino también con un elevado riesgo para los acuíferos del Parque Nacional de Doñana, Reserva de la Biosfera.

Los metales contaminantes son conocidos comúnmente como metales pesados, aunque este término se refiere de forma estricta a aquellos elementos metálicos con una masa específica superior a 5 g cm^{-3} y que son capaces de formar sulfuros (Adriano, 1986). Metales traza sería un término más correcto, ya que tal terminología está basada solo en la concentración del elemento ($< 0.1\%$ en suelo ó 10 mg Kg^{-1} en peso seco de muestras biológicas). Sin embargo, el término de metales pesados se usa de forma generalizada y es aceptado en estudios medioambientales.

No todos los elementos que pueden integrarse en el espectro de contaminantes metálicos tienen un mismo significado biológico. Algunos de ellos como cobre, cinc, manganeso, hierro, molibdeno, níquel y cobalto resultan necesarios para los organismos vivos, al participar como componentes estructurales y catalíticos de proteínas y enzimas, mientras que otros, como Cd y Pb, no participan en procesos metabólicos celulares. Sin

embargo, tanto unos como otros, a determinadas concentraciones, pueden llegar a ser extremadamente tóxicos para todo tipo de células a determinadas concentraciones. Así, algunos de estos metales pesados, como arsénico (primer lugar), plomo (segundo lugar), mercurio (tercer lugar) y cadmio (séptimo lugar), se incluyen en la lista de 2005 de principales sustancias peligrosas suministrada anualmente por la "American Agency for Toxic Substances and Disease Registry" (ATSDR).

Los metales pesados están presentes en el suelo como iones libres, complejos metálicos solubles, iones metálicos intercambiables, metales acomplejados por compuestos orgánicos, silicatados y precipitados o compuestos insolubles (óxidos, carbonatos e hidróxidos) (Alloway y Ayres, 1993). Sin embargo, el grado de peligrosidad de los metales pesados va ligado a dos propiedades principales: i) su toxicidad, es decir, la capacidad de producir una respuesta adversa en un sistema biológico, dañando su estructura, función o produciendo la muerte (del Ramo et al., 1993) y ii) su persistencia.

La toxicidad de los metales en el suelo va a depender de su biodisponibilidad, definida como la capacidad de ser transferido desde un compartimento del suelo a un organismo vivo (Juste, 1988). Según (Berthelin *et al.*, 1995), la disponibilidad de un metal no va a depender solo de su concentración total, sino también de factores físico-químicos del suelo (pH, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, etc...) (Nogales *et al.*, 1997) y de factores biológicos (biabsorción, bioacumulación y solubilización).

2. METALES PESADOS COMO CONTAMINANTES DEL MEDIO AMBIENTE.

De acuerdo con sus propiedades físicas y químicas, se pueden distinguir tres mecanismos moleculares de toxicidad metálica, que afectan a organismos superiores y microorganismos. En primer lugar, existen metales con actividad redox que generan especies reactivas de oxígeno por reducción sucesiva de O_2 hasta O_2^- , H_2O_2 y OH^- mediante reacciones de Haer-Weiss y Fenton (Dietz *et al.*, 1999; Elstner *et al.*, 1997; Romero-Puertas *et al.*, 2002). Estas especies reactivas de oxígeno pueden producir la oxidación inespecífica de proteínas y lípidos de membrana o causar daños en el ADN. Otro mecanismo importante de toxicidad de metales pesados, se debe a su capacidad de unión a átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre pertenecientes a grupos funcionales de proteínas como, por ejemplo, el azufre tiólico de residuos de cisteína o el nitrógeno imidazólico de residuos de histidina (Rosen, 2002). Este tipo de uniones inhiben frecuentemente la función catalítica o biológica de las proteínas. Por último, muchas enzimas presentan iones metálicos en posiciones de importancia para su actividad, de manera que el desplazamiento de un metal por otro, produce normalmente la inhibición o pérdida de la actividad enzimática, e.g., cationes divalentes como Co^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} , capaces de desplazar al Mg^{2+} en la ribulosa-1,5-bifosfato-carboxilasa/oxigenasa, o el desplazamiento de Ca^{2+} por Cd^{2+} en la calmodulina, que es importante en la señalización

celular, provocando la inhibición de la actividad fosfodiesterasa calmodulina-dependiente (Schützendübel & Polle, 2002).

Consecuentemente, la creciente acumulación de metales en la biosfera constituye una fuente de problemas tanto ambientales como de salud. Mediante los mecanismos citados, los metales pesados afectan el metabolismo de la plantas, que se manifiesta en síntomas como clorosis, necrosis o perturbaciones en el desarrollo radical (Mc Grath *et al.*, 1995). Además, a través de la cadena trófica, la toxicidad afecta en ultimo término a animales y humanos, provocando carcinogénesis, neurotoxicidad e inmunotoxicidad. (Qian *et al.*, 2003).

Por otro lado, la acumulación de metales pesados en suelo tiene un efecto nocivo sobre las poblaciones microbianas, afectando la diversidad y actividad de la microbiota (Giller *et al.*, 1998) y por tanto desencadenando un círculo vicioso de efectos negativos que hacen peligrar la sostenibilidad de los ecosistemas (Kennedy & Smith, 1995). En este sentido, se ha observado tanto una reducción de la biomasa microbiana en áreas experimentales contaminadas de forma controlada (Witter *et al.*, 1993) como cambios en la estructura microbiana del suelo. (Pennanen *et al.*, 1996), estudiaron la influencia de dos gradientes de contaminación por metales pesados en bosques de coníferas sobre la comunidad microbiana y encontraron que en ambos gradientes, la razón hongos/bacterias disminuyó, concluyendo que la comunidad fúngica es más sensible a los metales pesados. (Frosteegård *et al.*, 1993) observaron cambios graduales en los patrones de ácidos grasos de fosfolípidos en respuesta a diferentes niveles de metales pesados. Otros autores como (Giller *et al.*, 1993; Chaudri *et al.*, 1993) detectaron una reducción del número de rizobios fijadores de nitrógeno en el área experimental contaminada por metales pesados de Woburn; y (Koomen *et al.*, 1990), observaron una disminución del porcentaje de colonización micorrícica.

No obstante, la exposición a metales pesados también puede conducir al desarrollo de poblaciones microbianas tolerantes a ellos (Ellis *et al.*, 2003). Así pues, la manipulación y utilización adecuada de estos microorganismos, sobre todos de aquellos potencialmente efectivos sobre el desarrollo vegetal, puede constituir una herramienta valiosa para la recuperación de los ecosistemas afectados por contaminación, y por tanto, resolver los problemas ambientales y de salud a los que conduce.

Elemento	valores máximos
Cd	1-3
Cu	50-140
Ni	30-75
Pb	50-300
Zn	150-300
Hg	1-1.5

Tabla 1 Valores máximos de metales pesados permitidos en suelo (mg/kg) según la UE.

2.1. Técnicas de descontaminación/remediación.

Los suelos contaminados pueden ser remediados por técnicas químicas, físicas y biológicas (McEldowney *et al.*, 1993).

Las técnicas actuales de remediación se pueden agrupar en dos categorías (Khan *et al.*, 2000).

Técnicas ex situ: consisten en remover el suelo de la zona contaminada y transportarlo a otra zona de depósito para proceder a su lavado y extracción del metal pesado. Las técnicas ex situ son muy eficientes, pero presentan el inconveniente de ser muy costosas y además de tener un impacto negativo sobre el ecosistema.

Técnicas in situ: consisten en la remediación del suelo sin necesidad de excavación.

Dentro de las técnicas in situ se encuentran:

Técnicas físicas y químicas: Tienen como finalidad la inmovilización de los metales pesados en suelo mediante la aplicación de agentes complejantes o por cambios en el pH del suelo. Estas técnicas tienen el inconveniente de destruir todos los organismos vivos del suelo incapacitándolo para el establecimiento de las plantas (Khan *et al.*, 2000).

Biorremediación: es el uso de seres vivos para el tratamiento de suelos contaminados. Dentro de las técnicas de biorremediación se encuentra la fitorremediación, que comprende un conjunto de tecnologías que utilizan a las plantas

como técnicas de contención, destrucción o extracción (EPA, 2000). Estas técnicas han recibido un considerable interés en los últimos años ya que no destruyen el medio ambiente, al mantener las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo, y son menos costosas en comparación con las técnicas convencionales no biológicas.

Los metales pesados no pueden ser degradados, de manera que solamente hay dos opciones para su remediación en suelos contaminados:

fitoextracción: consiste en la concentración del metal pesado en las partes de la planta cosechables.

fitoestabilización: consiste en la inmovilización del metal pesado en una forma no tóxica en suelo.

2.1.1 Fitoextracción:

Como hemos dicho anteriormente, consiste en el uso de plantas para eliminar contaminantes presentes en el suelo. Para ello tiene lugar un transporte del metal del suelo a la planta, y posteriormente una translocación y concentración en parte aérea. Normalmente, una vez que el metal se encuentra en la parte aérea, las plantas son cosechadas, aunque en algunos casos también se pueden cosechar las raíces. Hay dos tipos de fitoextracción:

Fitoextracción continua: se utilizan plantas hiperacumuladoras, en la mayoría de los casos no micotrofas y pertenecientes a la familia *Brassicaceae*. El empleo de estas plantas presentan una serie de inconvenientes; así por ejemplo, incluso los mejores acumuladores metálicos, como *Thlaspi caerulescens* (Baker *et al.*, 1994),(Salt *et al.*, 1995) requieren un tiempo prolongado de cultivo continuo (13-14 años), para eliminar compuestos como Ni o Zn de una determinada zona (Salt *et al.*, 1995). Además, se desconocen plantas hiperacumuladoras para los metales más importantes desde el punto de vista de la contaminación medioambiental, entre los que se encuentran As, Cd y Pb principalmente.

Fitoextracción inducida: se utilizan plantas de cultivo, de buenas características a nivel de crecimiento y formación de biomasa, solventando sus limitaciones respecto a la absorción y acumulación metálica mediante la inducción de tales procesos (Salt *et al.*, 1998). Esta inducción se puede llevar a cabo mediante la utilización de quelantes, que a través de la formación de complejos metal-quelato evita la precipitación y retención de metales en el suelo, incrementando de este modo su disponibilidad; también se puede incrementar la disponibilidad metálica por extrusión de protones, que acidifican el suelo e incrementa la movilidad metálica (Salt *et al.*, 1995). Además, las plantas pueden beneficiarse de organismos rizosféricos (hongos MA o bacterias asociadas a la raíz) para incrementar la disponibilidad de los metales (Raskin *et al.*, 1997). (Ernst, 2000) sugirió el empleo de plantas micotrofas asociadas a hongos MA tolerantes a metales pesados en estrategias de descontaminación de suelos contaminados.

2.1.2. Fitoestabilización

Se basa en la reducción de la biodisponibilidad de los contaminantes presentes en el medioambiente. Las plantas actúan sobre los contaminantes, inmovilizándolos en suelo o raíz y reduciendo así los riesgos de una mayor contaminación por lixiviación o propagación aérea. Para este propósito, se han utilizado comercialmente plantas con la capacidad de inmovilización como *Festuca rubra* y *Agrostis tenuis* (Salt *et al.*, 1995; van Tichelen *et al.*, 1996). La inmovilización física de metales pesados en el suelo se ha llevado a cabo utilizando enmiendas como la beringita junto con plantas tolerantes a metales pesados. Dentro de este contexto, los hongos MA juegan un papel muy importante, ya que facilitan el establecimiento de las plantas, mejorando su crecimiento, y reduciendo la translocación del metal a la parte aérea. (Hetrick *et al.*, 1994) mostró el efecto beneficioso de la simbiosis micorrícica con la planta micotrofa facultativa *Festuca arundinacea* en suelos de una zona minera.

3. MICORRIZAS EN SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS.

3.1 Tolerancia de los hongos MA a metales pesados.

El hecho de que se encuentren colonizaciones micorrícicas espontáneas en la mayoría de las observaciones realizadas "in situ" en zonas contaminadas, sugiere una cierta tolerancia de los hongos MA a los metales pesados. (Gildon & Tinker, 1983a) fueron los primeros en indicar esta posible tolerancia de aislados de hongos MA. Estos autores, encontraron que el 35% de las raíces de trébol, que crecieron de forma natural en suelos contaminados por actividades mineras con Zn y Cd, estaban colonizadas por hongos MA; posteriormente otros autores como (Díaz & Honrubia, 1993) encontraron colonización por hongos MA en plantas de *Medicago sativa* que crecieron en suelos contaminados por Zn y Pb aunque también se observó que el número de esporas de estos hongos decreció en comparación con suelo adyacente no contaminado. (Turnau *et al.*, 1996) observó que *Oxalis acetosella*, mostraba 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 sin contaminar. (Shetty *et al.*, 1994) describe que las plantas micorrizadas se establecen de una forma más eficaz en suelos adyacentes a una zona minera que las plantas no micorrizadas. La principal explicación e implicación ecológica de estas investigaciones es que el hongo simbiote es el que confiere a la planta la tolerancia al metal pesado. El hongo MA tolerante a metales pesados ayuda a las plantas a establecerse en dichos suelos contaminados. De acuerdo con (Wilkinson & Dickinson, 1995), hay más posibilidad de cambios genéticos frente a los factores ambientales en hongos que en plantas; por tanto, una de las funciones ecológicas más importantes de la

micorrización es permitir la adaptación y aclimatación a las condiciones locales del suelo de las plantas que sobre él se desarrollan.

Los hongos MA, al ser biotrofos estrictos, no pueden completar su ciclo de vida en cultivos axénicos; por tanto, una forma de evaluar la tolerancia del hongo MA a distintos metales pesados ha sido estimada mediante la capacidad de las esporas de hongos MA para germinar en un sustrato contaminado (Weissenhorn *et al.*, 1993; Weissenhorn & Leyval, 1996; Leyval *et al.*, 1999). Estos biotests "in vitro" son muy eficientes para detectar la toxicidad de los distintos metales pesados en estos hongos, ya que los estados de preinfección de los hongos MA son muy sensibles a la presencia de metales pesados (Vidal *et al.*, 1996). Utilizando una de estas estrategias, se ha demostrado una mayor tolerancia a Zn, Cd, Cu y/o Pb de hongos autóctonos aislados de suelos contaminados en comparación con aislados fúngicos de suelos no contaminados (Gildon & Tinker, 1983a; Díaz *et al.*, 1996; Weissenhorn *et al.*, 1993)(59-61) Estudios de (Weissenhorn *et al.*, 1993; Weissenhorn *et al.*, 1994) demostraron que Cd reducía la germinación de esporas en mayor medida que el crecimiento de la hifa tras la germinación de estas. Utilizando un sistema bicompartimentado, (Joner & Leyval, 1997) demostraron que el crecimiento de la hifa extraradical de un aislado de *Glomus mosseae* tolerante a Cd, no se afectaba por la alta concentración de Cd en el suelo del compartimento donde se desarrollaba la hifa. El hecho de que la esporulación y la germinación de esporas se afecte más que el desarrollo de la hifa extraradical por la concentración de metal pesado en suelo sugiere que no se debe generalizar sino que se deben hacer distinciones entre los efectos de las concentraciones de metales pesados según el proceso estudiado (Leyval *et al.*, 1997)(11).

Los mecanismos de tolerancia a metales pesados por los hongos MA todavía no han sido elucidados. Como ya hemos dicho anteriormente, este tipo de estudios presentan una serie de dificultades derivadas de la naturaleza de los microorganismos. Al ser biotrofos estrictos, es difícil separar la tolerancia a este tipo de estrés de la planta de los mecanismos de tolerancia o mitigación del hongo (Merharg & Cairney, 2000). Una posible opción sería estudiar la reacción de sensibilidad de hongos MA a metales pesados en cultivo axénico. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los efectos obtenidos en estos sistemas no tienen por qué corresponderse necesariamente con la sensibilidad que presenta el hongo en estado simbiótico (Colpaert & Vanassche, 1992).

3.2. Papel de los hongos MA en la protección de la planta a metales pesados y mecanismos involucrados.

En los últimos años, ha habido un interés creciente por conocer la función del hongo MA en suelos contaminados por metales pesados. Todo ello procede del hecho de que hay evidencias de que las plantas se pueden beneficiar de la colonización de hongos MA en suelos contaminados por metales pesados. Estudios pioneros como los de (Gildon &

Tinker, 1983a) indicaron que los hongos MA aislados de suelos contaminados por metales pesados eran más eficaces en aliviar la toxicidad de estos que los hongos MA no expuestos a altas concentraciones de metales pesados. Sin embargo, todavía no está claro si el hongo MA protege a la planta huésped de la exposición a contaminantes metálicos mediante una disminución de su asimilación o en la transferencia de los metales desde el suelo a la planta huésped (Merharg & Cairney, 2000). Autores como (Gildon & Tinker, 1983b; Leyval *et al.*, 1991; Dueck *et al.*, 1986), observaron una reducción en la concentración de metal pesado en parte aérea de las plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas. Pero en otros estudios se han descrito que la micorrización condujo a concentraciones más elevadas del metal en parte aérea (Weissenhorn *et al.*, 1995a; Griffioen *et al.*, 1994). Estos resultados sobre el papel de la micorrización en suelos contaminados, aparentemente contradictorios, no lo son si se tienen en cuenta los distintos factores que pueden influir sobre el funcionamiento de la simbiosis MA en dichos ambientes estresados. Entre estos factores destacamos el pH del suelo (El-kherbawy *et al.*, 1989), la naturaleza del metal y la concentración inicial en suelo del mismo (Heggo *et al.*, 1990), la posible inhibición de la colonización micorrícica por el metal en cuestión (Koomen *et al.*, 1990), la compatibilidad del hongo MA con la planta huésped (Denny & Wilkins, 1987), las condiciones ambientales de crecimiento de la planta (Weissenhorn *et al.*, 1995b), y la capacidad inherente de la planta de captar y/o tolerar el metal pesado en cuestión (Joner & Leyval, 2001).

La evidencia experimental permite concluir que los hongos MA pueden contribuir tanto en fitoextracción como en fitoestabilización de metales pesados, dependiendo de los patrones de comportamiento de la planta y el hongo MA estudiados.

El uso de los hongos MA con fines de fitoextracción ha sido sugerido por autores como (Huang & Cunningham, 1996) que mostraron que plantas micotrofas como maíz y *Sonchus oleraceus*, podían extraer cantidades considerables de Pb del suelo. (Ebbs & Kochian, 1998) observaron a su vez, que otra especie como la cebada, también micotrofa, era capaz de extraer Zn del medio tan eficientemente como la no micotrofa e hiperacumuladora *Brassica juncea*. En este sentido, estudios de (Pawlowska *et al.*, 2000) en fitoextracción sugirieron el empleo de plantas que formaran asociación con micorrizas en lugar de plantas no micotrofas. Estos autores indicaron que la utilización de plantas no micotrofas, como *Thlaspi caerulescens*, reducía la cantidad natural de propágulos de la comunidad de hongos glomales de una zona contaminada por metales pesados. Además, el uso de hongos MA tolerantes a metales pesados presenta la ventaja adicional de favorecer el establecimiento de plantas micotrofas no tolerantes.

Por otro lado, estudios en sistemas compartimentados han demostrado la capacidad del micelio MA de inmovilizar metales pesados. Estos sistemas experimentales presentan dos compartimentos diferenciados, el compartimento de la raíz (donde se desarrolla la

raíz y el micelio MA) y el compartimento de la hifa (donde solamente se desarrolla el micelio extraradical del hongo). Los estudios con este tipo de sistemas permiten, por tanto, diferenciar el efecto del hongo MA del de la planta huésped. De este modo, se ha demostrado de forma directa que el micelio extraradical del hongo MA puede transportar ^{65}Zn (Bürkett & Robson, 1994)69) y ^{109}Cd (Joner & Leyval, 1997)65) del suelo a la raíz de la planta. (Joner & Leyval, 2001) mostraron que la relación de la concentración de Cd, Zn y Cu en raíz/ parte aérea fue mayor en plantas micorrizadas que en las no micorrizadas. Ello indicaba que el hongo MA restringía la translocación del metal de la raíz a la parte aérea de la planta. Para estimar la capacidad de la hifa para secuestrar metales, (Joner *et al.*, 2000)70) realizaron un experimento en sistemas compartimentados utilizando micelio de diferentes aislados de *Glomus* sp con diferente exposición a Zn y Cd. Estos autores, demostraron que la hifa MA tenía una alta capacidad de adsorber y/o absorber en superficie los metales (hasta 0.5 mg de Cd por mg de biomasa fúngica seca) y que esta capacidad estaba relacionada con la adaptación de cada hongo a niveles elevados de metal pesado.

Otros autores han estudiado la localización subcelular de Cu y As en el micelio extraradical de diferentes aislados de *Glomus* sp utilizando microscopio de transmisión electrónica combinado con microanálisis de rayos X (EDAX) (Gonzalez-Chavez *et al.*, 1999)71). Los resultados demostraron que ambos, Cu y As estaban secuestrados en la pared de la hifa. Por otro lado, (Joner & Leyval, 2001) sugirieron que la inmovilización de Cd por parte del hongo dentro del sistema radical podría deberse a la presencia de polifosfatos en la hifa del hongo MA, ya que en otros microorganismos como cianobacterias y levaduras, ciertos metales pesados como Cd, Pb y Zn son inmovilizados mediante la formación de complejos con polifosfatos. Esta hipótesis se corrobora con los resultados obtenidos por (Turnau *et al.*, 1993) en los que mediante espectroscopia electrónica se observó la acumulación de metales pesados dentro de la hifa intracelular de raíces micorrizadas de plantas de *Pteridium aquilinum*, principalmente en vacuolas ricas en fosfato.

Las plantas micorrizadas son, por tanto, de gran interés en fitoestabilización, ya que son capaces de secuestrar el metal pesado y de impedir su translocación a parte aérea; por dicho mecanismo, lo eliminan del medio edáfico y permiten el desarrollo vegetal (Leyval *et al.*, 1997).

En resumen, se puede concluir que el papel de los hongos MA en biorremediación va a depender de una serie de parámetros cruciales para el establecimiento de las plantas micorrizadas, como pueden ser el pH, el contenido en nutrientes y la concentración del metal pesado en suelo. Además, la interacción entre la planta y el hongo va a determinar la eficiencia de la simbiosis y por tanto, su empleo en fitoextracción y/o en fitoestabilización (Leyval *et al.*, 2002). Así, mediante el empleo de plantas que se

caracterizan por ser de crecimiento rápido y con capacidad de acumulación de metal pesado en parte aérea, podríamos potenciar su empleo en fitoextracción por la inoculación de hongos micorrícicos que incrementan la nutrición de la planta y por tanto su biomasa (Khan *et al.*, 2000). Por el contrario, basándonos en la capacidad del hongo MA de inmovilizar el metal pesado y reducir así su translocación a la parte aérea (los hongos MA serían de gran interés para su uso en fitoestabilización (Leyval *et al.*, 2002).

4. RESTAURACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS.

Los suelos contaminados por metales pesados se caracterizan por la baja capacidad de retención de agua y nutrientes y por el bajo contenido de materia orgánica (Shetty *et al.*, 1994); estas características junto con la elevada concentración de metales pesados conduce a una ausencia de vegetación y alteración de la comunidad microbiana del suelo, que puede causar una compactación del mismo. Por esta razón, el suelo queda desprotegido con el consiguiente riesgo de erosión y contaminación de áreas adyacentes y acuíferos constituyendo un problema ambiental y un riesgo para la salud.

Las raíces de las plantas pueden actuar como una barrera frente a la erosión por viento y agua; por ello, la revegetación de estas zonas se considera como el principal objetivo en estrategias de reclamación de áreas contaminadas para evitar así la transferencia de sustancias tóxicas a áreas adyacentes.

En este contexto, los hongos MA son cruciales para el establecimiento de las plantas en zonas contaminadas por metales pesados (Hetrick *et al.*, 1994; Shetty *et al.*, 1994). Como ya hemos indicado anteriormente, este efecto beneficioso se debe tanto al incremento de la tolerancia de la planta a metales pesados como a la mejora de la nutrición vegetal. Sin embargo, debido al gran deterioro de las características físico-químicas y biológicas del suelo, el proceso de revegetación con plantas micorrizadas, a menudo, resulta fallido en estas áreas. Por ello, la recuperación de la cualidad del suelo se presenta como un paso previo para el establecimiento de la cubierta vegetal.

4.1. Potencialidad del uso enmiendas orgánicas y hongos MA y en remediación.

La remediación de suelos contaminados con metales pesados puede basarse en técnicas de extracción o en técnicas de estabilización, como ya se ha expuesto. Dentro de las técnicas de estabilización, se encuentra la “remediación natural asistida” (Adriano *et al.*, 2004). Esta técnica se basa en el uso de enmiendas para acelerar procesos de adsorción y/o absorción, precipitación y formación de complejos que tienen lugar de forma natural en suelos, y que reducen la movilidad y biodisponibilidad de los metales traza (Bolan & Duraisamy, 2003; Hartley *et al.*, 2004). Además, la aplicación de enmiendas orgánicas al

suelo supone un incremento de la actividad microbiana, favorece el establecimiento y desarrollo de las plantas y por tanto la reactivación del ciclo de nutrientes en suelos contaminados (Martens & Frankenberger, 1992), como ya hemos demostrado en estudios previos sobre recuperación de suelos degradados.

Estudios como el de (Karaca, 2004) han indicado el papel clave que juegan las enmiendas orgánicas en procesos de inmovilización de metales pesados (Cd, Cu, Ni, Zn). Aunque de forma general se han utilizado los valores del contenido total de metales pesados en suelo como índice del grado de contaminación del mismo, la biodisponibilidad de los metales pesados es lo que realmente determina el riesgo medioambiental. Entre los factores que influyen sobre la biodisponibilidad de los metales pesados en suelo, se encuentra el contenido en materia orgánica ya que al formar complejos estables con los metales pesados disminuye su biodisponibilidad (Krogstad, 1983).

En este sentido, autores como (Dronnet *et al.*, 1997; Reddad *et al.*, 2002), han demostrado la capacidad de los residuos de azúcar de remolacha para quelar cationes metálicos divalentes en solución acuosa, debido a las funciones carboxílicas de los ácidos galacturónicos y sustancias pécticas. Los principales mecanismos involucrados en estas reacciones fueron intercambios de iones y adsorción.

Como ya hemos indicado en capítulos anteriores, la introducción en suelo de residuos orgánicos, procedentes de la industria de azúcar de remolacha y de la obtención del aceite de oliva transformados microbiológicamente, es de suma importancia para recuperar las características de este, ya que es una forma de incrementar el contenido de materia orgánica y mejorar las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo. Sin embargo, el estudio de su potencial en programas de remediación aún no ha sido abordado. Por todo lo descrito anteriormente, parece obvio plantear estudios basados en la utilización conjunta de residuos agroindustriales transformados microbiológicamente y hongos MA en fitorremediación con fines de revegetación de suelos contaminados por metales pesados. Para evaluar la eficacia de las medidas de remediación aplicadas estudiaremos tanto las propiedades del suelo, nutrición y desarrollo de las plantas como el contenido de metales pesados en suelo y en planta. De esta manera, podremos predecir el impacto de esta técnica de biorremediación sobre la ecología de los ecosistemas y disminuir el riesgo que constituye el alto contenido de metales traza en el suelo.

V. 1. Parte experimental

1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE CAPTACIÓN DE ZN Y CD POR EL RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA (SIN TRATAR O FERMENTADO CON *ASPERGILLUS NIGER*) Y SU EFECTO SOBRE LOS CAMBIOS EN LA DISPONIBILIDAD DE CD Y ZN EN SOLUCIÓN ACUOSA Y SUELO.

1.1. Objetivo.

Evaluar la capacidad del residuo de azúcar de remolacha (biotransformado o no) para adsorber y/o absorber dos metales pesados (Zn y Cd) presentes en una solución acuosa. Estudio de la influencia de estas enmiendas sobre la extractibilidad de dichos metales en suelo.

1.2. EXPERIMENTO 1

Evaluación a lo largo del tiempo de la capacidad de retención de Cd por el biotransformado de azúcar de remolacha (a dos concentraciones) en solución acuosa.

1.2.1. Condiciones experimentales

A una solución acuosa con 20 mg Cd L⁻¹ se le añadió residuo de azúcar de remolacha fermentado con *Aspergillus niger* (SBA), a dos concentraciones 5% y 10%, ó se mantuvo como control, sin adición de SBA. Todas las soluciones se incubaron en agitación a 170 rpm a 28 °C. A las 2h, 4h, 8h, 24h y 48h de incubación, se tomaron alícuotas (3 ml) de cada repetición (5 por tratamiento), se filtraron (poro 0.2µm) y se procedió a la determinación de Cd en la solución (espectrometría de absorción atómica tras secar y digerir las muestras con H₂SO₄+H₂O₂).

1.2.2. Resultados

Observamos que la concentración de Cd en solución acuosa no varió a partir de las 8h (en ninguna de las dos concentraciones de SBA estudiadas). Ello indica que la saturación por Cd de la enmienda se alcanzó a ese tiempo.

La aplicación de SBA (5 %) provoca una considerable reducción en el contenido de Cd del medio que oscila entre un 72 % (2 h) hasta un 77.2 % (8 h). Cuando se duplica la concentración del biotransformado, la disminución en la concentración de Cd en el medio fue ligeramente mayor, oscilando desde un 77.2 % (2 h) hasta un 81 % (8 h).

Tratamiento	tiempo de incubación				
	2h	4h	8h	24h	48h
C	15.0 ± 0.3	14.7 ± 0.2	14.9 ± 0.3	14.5 ± 0.2	14.9 ± 0.2
SBA (5%)	4.2 ± 0.1	4.0 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.1
SBA (10%)	3.4 ± 0.2	2.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1

Tabla 1: Concentración de Cd (mg l^{-1}) en la solución (con un contenido inicial de 20 mg Cd l^{-1}) tras la incubación a distintos tiempos con las dos proporciones de azúcar de remolacha fermentado (SBA) (5% y 10%). Los valores representan los promedios seguidos del error estándar ($n=5$).

Una vez seleccionadas las condiciones experimentales adecuadas (concentración del fermentado y el tiempo de incubación) se prosiguieron los ensayos usando otras variables experimentales de interés para el estudio abordado.

1.3. EXPERIMENTO 2

Estudio de la capacidad de retención de Cd y Zn por *Aspergillus niger* y por residuo de azúcar de remolacha (fermentado con *A. niger* y sin fermentar) y en solución acuosa.

1.3.1. Condiciones experimentales

Se prepararon dos soluciones acuosas cada una adicionada de un metal distinto: Una de ellas con 136 mg Zn L^{-1} y la otra con 14 mg Cd L^{-1} . Cada una de esas soluciones se ensayó tal cual (C) o adicionado de: (i) residuo de azúcar de remolacha sin fermentar (SB) al 5%, (ii) residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger* (SBA) al 5% ó (iii) una suspensión de *A. niger* (A) que contenía $0.5 \cdot 10^6 \text{ ufc ml}^{-1}$ (dicha concentración de *A. niger* coincidía con la concentración inoculada en el tratamiento con SBA). Todas las soluciones se incubaron en agitación a 170 rpm durante 8 h. Al cabo de este tiempo, se tomaron alícuotas de 3 ml (de cada repetición y tratamientos) y se filtraron ($0.2 \mu\text{m}$). Posteriormente se procedió a la determinación de Cd y Zn (espectrometría de absorción atómica tras secar y digerir las muestras con $\text{H}_2\text{SO}_4+\text{H}_2\text{O}_2$).

1.3.2. Resultados

El residuo de azúcar de remolacha sin fermentar redujo la concentración de Cd en solución en un 80 % y la de Zn en un 43 %, mientras que el fermentado la redujo en un 70

% y 22 % respectivamente. *A. niger* no afectó la concentración de Zn en solución y redujo la de Cd en un 10%.

	Tratamientos			
	C	SB	SBA	A
Zn (mg l ⁻¹)	137 ± 10.3	63.1 ± 3.0	106 ± 1.2	140 ± 2.2
Cd (mg l ⁻¹)	14.4 ± 0.4	2.85 ± 0.1	4.3 ± 1.2	12.9 ± 0.1

Tabla 2: Concentración de Cd y de Zn (mg l⁻¹) en solución (C) y tras la incubación (8 h) con los distintos tratamientos microbiológicos. Los controles indican la concentración inicial de Cd y Zn en la solución acuosa. Los valores representan los promedios seguidos del error estándar (n=5)

1.4. EXPERIMENTO 3

Estudio de la capacidad de retención de Cd y Zn en suelo por la aplicación residuo de azúcar de remolacha fermentado con *Aspergillus niger* (5 %).

1.4.1. Condiciones experimentales

El suelo utilizado en este experimento fue el mismo con el que se realizaron todos los ensayos en microcosmos descritos en este capítulo. Este suelo proviene de la provincia de Granada y sus características están descritas en el capítulo de materiales y métodos. El suelo se secó y se pasó por un tamiz de 2 mm de diámetro. Una parte se contaminó con Cd (10 mg Cd kg⁻¹ suelo) y la otra con Zn (600 mg Zn kg⁻¹ suelo) según el protocolo descrito en el capítulo de materiales y métodos. Tras un mes de incubación del suelo con el metal pesado (Cd o Zn), se añadió el residuo de azúcar de remolacha en una proporción del 5% similar a la utilizada en los ensayos con planta en microcosmos y seleccionada en ensayos previos. Se dejó en incubación en bolsas de plástico a temperatura ambiente durante 1 mes. Tras este tiempo se procedió al análisis de Cd y Zn total y extractable según protocolo descrito por (Mingorance, 2002).

1.4.2. Resultados

En suelo control (sin enmienda) adicionado o no de Zn, la concentración de Zn extractable es menor que la concentración total de Zn. Sin embargo, la adición de la enmienda supone un incremento en la concentración de Zn extractable por EDTA en suelo. En suelos contaminados por Zn, no se observaron diferencias significativas en la

concentración total de Zn en suelo tras la adición de la enmienda con respecto al control sin enmienda (figura 1)

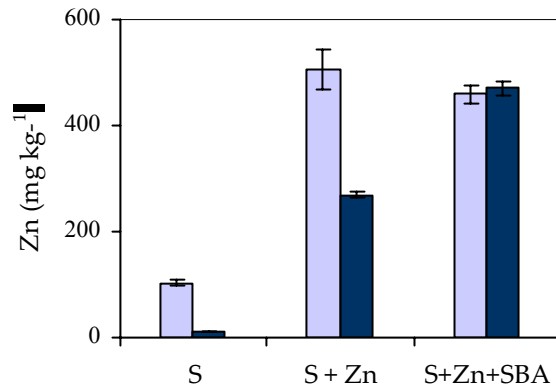


Figura 1: Concentración de Zn (total y extraíble por EDTA) en suelo natural (C) y contaminado (600 mg Zn kg⁻¹suelo). Efecto de la adición al suelo (5 %) del residuo de azúcar de remolacha fermentado (SBA) sobre la misma.

Tanto en los suelos control como en los que se añadieron la enmienda, la concentración de Cd extraíble por EDTA en suelo es menor que la concentración total. En los suelos contaminados por Cd, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos control y los adicionados con enmienda (figura 2).

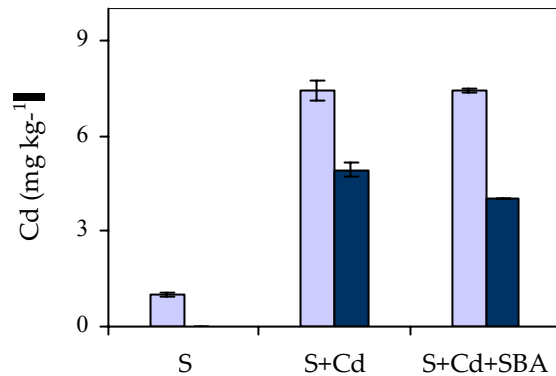


Figura 2: Concentración de Cd (total y extraíble por EDTA) en suelo natural (C) y contaminado (10 mg Zn kg⁻¹suelo). Efecto de la adición al suelo (5 %) del residuo de azúcar de remolacha fermentadp con *A. niger* (SBA) sobre la misma.

2. APLICACIÓN DEL RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA TRATADO CON *ASPERGILLUS NIGER* (SBA) Y *GLOMUS MOSSEAE* PARA MEJORAR EL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN DE *TRIFOLIUM REPENS* EN UN SUELO CONTAMINADO CON CD (5 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ SUELO)

2.1. Objetivo

Evaluar, en microcosmos con suelos contaminados por Cd, la eficiencia del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger*, en presencia o ausencia de fosfato de roca (RP), sobre el contenido de nutrientes y la asimilación de Cd por *Trifolium repens*. Efecto de estos tratamientos sobre las actividades enzimáticas rizosféricas y sobre la vitalidad y el funcionamiento de la simbiosis MA producida por un hongo aislado y adaptado de suelos contaminados con Cd.

2.2. Proceso de fermentación del residuo agroindustrial

La preparación del fermentado de residuo de azúcar de remolacha con *Aspergillus niger* se realizó según el protocolo descrito en materiales y métodos generales. En este ensayo, solamente a la mitad de los matraces se les añadió 0.75 g de fosfato de roca (RP).

2.3. Condiciones experimentales.

El sustrato utilizado fue una mezcla estéril de suelo: arena 2:1(v/v). Esta mezcla se incubó durante seis semanas con Cd, que fue añadido en forma de solución acuosa de CdSO_4 . La concentración final de este elemento fue de 10 mg kg^{-1} (utilizando EDTA como extractante, (Lakane & Erviö, 1971).

Las enmiendas \pm RP se mezclaron, cuando fue requerido, con la mezcla suelo-arena en una proporción de 5%, y se dejaron durante tres semanas a temperatura ambiente para que alcanzaran el equilibrio con los iones del suelo. El fosfato de roca (0.2 %) se aplicó a aquellas macetas que no habían recibido el fermentado suplementado con RP.

Las plantas crecieron durante 4 meses en condiciones de invernadero descritas en materiales y métodos generales y se regaron todos los días hasta alcanzar el 100 % de la capacidad de campo. Se realizó un primer corte de partea aérea a los 60 días de crecimiento y la cosecha final del ensayo tuvo lugar a los 90 días.

2.4. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

La planta seleccionada para la realización del ensayo que se describe a continuación, fue *Trifolium repens*. Se sembraron 10 semillas directamente en macetas de 400 g y tras 2 semanas se dejaron en 4 plántulas por maceta. Los tratamientos micorrizados recibieron 10 g de inóculo de una cepa de *Glomus mosseae* adaptada a Cd y aislada de suelo contaminado con este metal por un periodo de 10 años.

Todas las plantas fueron inoculadas con una suspensión de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* (1ml/ maceta) a una concentración de 10^8 ufc ml⁻¹. Los tratamientos no micorrizados recibieron 2 ml de un filtrado del inóculo para reincorporar la microbiota exenta de propágulos de micorriza.

2.5. Diseño experimental

El ensayo consistió en un bloque factorial diseñado completamente al azar, con dos factores: (1) inoculación micorrícica con un hongo adaptado a Cd o no inoculación, y (2) residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger*, suplementado o no con RP antes del proceso de fermentación y un control al que no se le añadió el fermentado. Todos los tratamientos tuvieron 5 repeticiones obteniéndose un total de 30 macetas.

2.6. Determinaciones

- Peso seco parte aérea.
- Contenido de N, P, K y Cd en parte aérea.
- Determinación del porcentaje de micorrización por el método de Trouvelot en:
 - Raíces teñidas con Azul Tripán
 - Raíces teñidas con actividad succinato deshidrogenasa (SDH).
 - Recuento de números de nódulos.
 - Actividades rizosféricas: deshidrogenasa, fosfatasa y β -glucosidasa.
 - Ácido indol acético en suelo rizosférico (AIA).
- Contenido de Cd en suelo tras el bioensayo.

2.7. Análisis estadístico de los resultados

Los efectos de los distintos tratamientos, sobre cada una de las variables analizadas en este ensayo, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Las barras en las columnas indican el error estándar.

Se realizó un análisis de varianza multifactorial ANOVA entre los distintos tratamientos para las variables determinadas en el ensayo.

Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus (Statistical Graphics Corp., Princeton, NJ).

2.8. Resultados

Las plantas de trébol no inoculadas con el hongo MA y sin enmienda, presentaron un crecimiento muy reducido en suelo contaminado con Cd. (fig. 3).

Tanto la aplicación de la enmienda orgánica como la inoculación con el hongo MA incrementó de una forma significativa la biomasa de parte aérea en todas las cosechas (tabla 5). El tratamiento más efectivo en plantas micorrizadas fue SB+RP, y en plantas no micorrizadas fue SB. (figura 3). Hubo una interacción positiva entre la enmienda aplicada y la micorriza sobre el desarrollo de parte aérea (tabla 5).

En suelo sin enmienda, el crecimiento de la planta estuvo seriamente limitado, aunque la colonización con el hongo MA inoculado lo mejoró notablemente. En la primera cosecha, el tratamiento con SB+RP, afectó el crecimiento de la planta de manera similar que la inoculación con el hongo MA sin enmienda (fig 3 a), pero en la segunda cosecha SB+RP tuvo una efectividad mayor que el inóculo micorrícico (*G.mosseae*) sin enmienda (fig 3 b). En los tratamientos en los que se aplicó la enmienda, la micorrización incrementó el crecimiento total de la parte aérea en 19340% (SB) y 16380% (SB+RP) con respecto al control sin tratar (sin enmienda ni micorriza). Estos resultados muestran, por tanto, que no solo la inoculación con hongos MA sino que también la aplicación de la enmienda fue crítica para el crecimiento de la planta en suelo contaminado con Cd. La micorrización fue especialmente efectiva en mejorar el crecimiento de raíz y parte aérea en aquellas plantas que crecieron en presencia del residuo fermentado. (fig. 3 y 4 a).

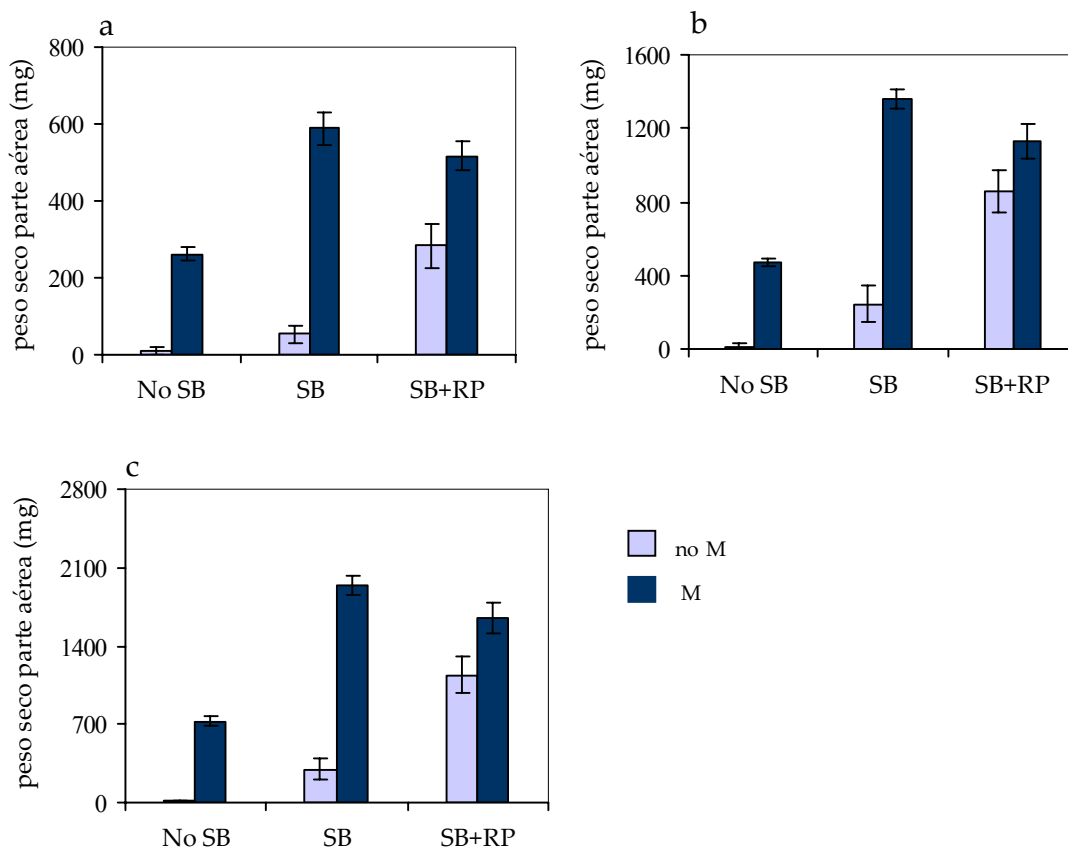


Figura 3: Efecto de las enmiendas (SB ó SB+RP) y la inoculación micorrícica (M) sobre el peso seco de parte aérea [primera cosecha (1a), segunda cosecha (1b) y cosecha total (1c)] de *Trifolium repens* crecidas en suelos contaminados con Cd (10 mg kg^{-1}).

Las barras verticales representan el error estándar.

El efecto del hongo MA sobre el desarrollo radical fue particularmente marcado en las plantas tratadas con SB, en ellas se alcanzaron los valores máximos de biomasa radical (figura 4 a). Además, se observó una interacción positiva entre la enmienda y la micorriza sobre este parámetro (tabla 5). Mientras que el crecimiento de la raíz se incrementó tanto por la adición de las enmiendas como por la inoculación del hongo MA, el número de nódulos no se incrementó con la colonización del hongo MA en plantas tratadas con enmienda (SB ó SB+RP) (fig 4 b). Prácticamente no se formaron nódulos en las plantas control (sin enmienda ni MA) y la máxima nodulación (100 veces mayor que el control) se alcanzó en las plantas que crecieron en suelo con SB+RP (figura 4 b).

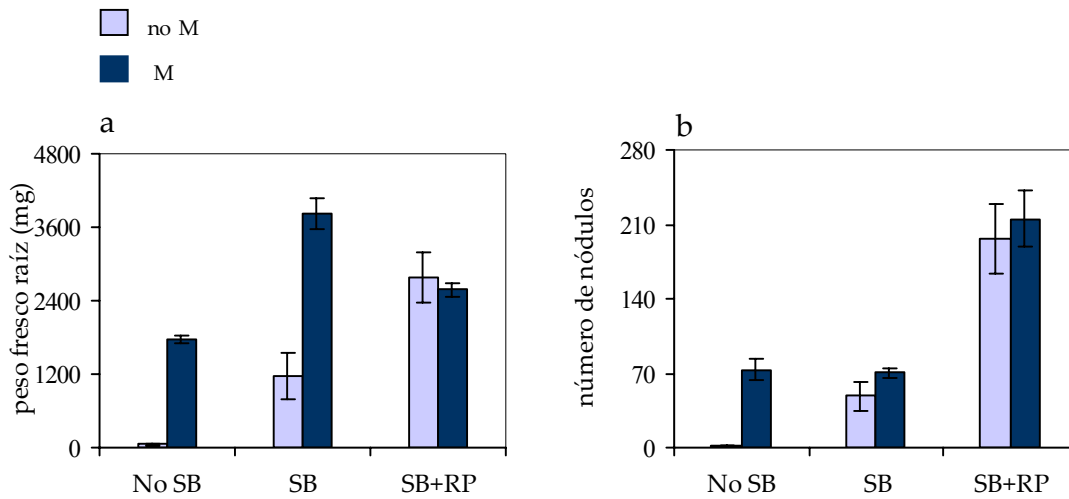


Figura 4: efecto de las enmiendas (SB o SB+RP) y la inoculación micorrícica (M) sobre el peso fresco de raíz (a) y el número de nódulos (b) en *Trifolium repens* crecido en suelos contaminados con Cd (10 mg kg⁻¹).

Las barras verticales representan el error estandar.

En cuanto a la nutrición de la planta, la colonización por el hongo MA y/o la adición de la enmienda incrementó la concentración de P en parte aérea; La colonización micorrícica fue especialmente eficiente en aumentar la concentración de fósforo y disminuir la de Cd en las plantas enmendadas con SB+RP, en ellas se alcanzaron en parte aérea los valores máximos de P y mínimos de Cd respectivamente (fig 5). El Cd transferido del suelo a la parte aérea de la planta varió desde 0.09 mg Cd Kg⁻¹ (en plantas micorrizadas y crecidas en suelos con SB+RP y) hasta 0.7 mg Cd Kg⁻¹ (en plantas no micorrizadas crecidas en suelos sin enmienda). Estos resultados nos confirman la interacción positiva de los tratamientos aplicados (inoculación MA y residuos de azúcar de remolacha fermentados (SB), particularmente con RP) (tabla 5), al mejorar la nutrición (P) de la planta y disminuir la concentración de Cd en parte aérea. Tales efectos resultan en una mayor tolerancia de la planta a la contaminación con Cd.

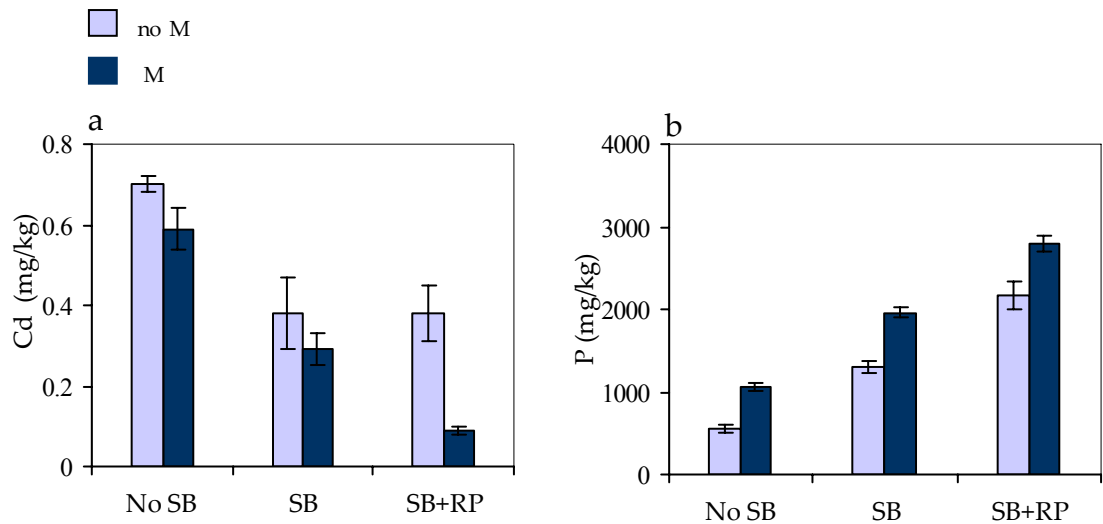


Figura 5: efecto de las enmiendas (SB ó SB+RP) y la inoculación micorrícica (M) sobre la concentración de Cd y P (a y b) en parte aérea de *Trifolium repens* crecido en suelos contaminados con Cd (10 mg Kg⁻¹).

Las barras verticales representan el error estandar.

El contenido de N y K en la parte aérea en las plantas micorrizadas fue muy superior a de las no micorrizadas. Además, se encontró una interacción positiva entre el hongo MA y la enmienda, mayor con SB que con SB+RP, cuyo efecto incrementó notablemente la adquisición de N y K por la planta. Sin embargo, en ausencia de micorrización los valores máximos de K y N absorbidos se alcanzaron en las plantas que crecieron en suelos enmendados con SB+RP (fig 6 a y b).

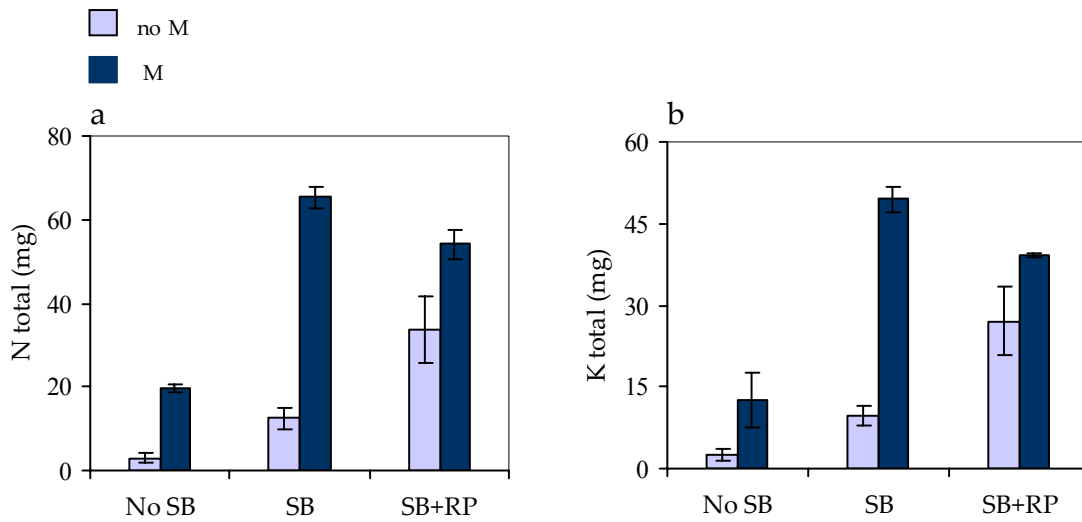


Figura 6: Efecto de las enmiendas (SB ó SB+RP) y la inoculación micorrícica (M) sobre el contenido de N y K (a y b) en parte aérea de *Trifolium repens* crecidos en suelos contaminados con Cd (10 mg Cd kg⁻¹ suelo).

Las barras verticales representan el error estandar.

Las plantas micorrizadas mostraron una frecuencia (%F) elevada de colonización, y prácticamente la totalidad del micelio intraradical permaneció vivo (tinción SDH). La intensidad de la colonización micorrícica (%M y %m) se incrementó por la adición de las enmiendas, especialmente por la adición de SB. Sin embargo, las diferencias más notables, según los tratamientos aplicados, se encontraron en la riqueza de arbusculos (%a y %A). La formación de arbusculos fue muy reducida en ausencia de enmienda y su vitalidad nula. El efecto negativo del Cd sobre la formación de arbusculos, parece ser compensada por la adición de las enmiendas, en particular de SB+RP. La riqueza de arbusculos (% a) con vitalidad (SDH) fue altamente estimulada en plantas crecidas en suelo enmendado con SB+RP, mientras que %A fue similar independientemente de la presencia de RP en la enmienda (tabla 3 y 4).

Tinción Azul Tripán			
	No SB	SB	SB+RP
%F	91 ± 2.90	100 ± 0.00	100 ± 0.00
%M	25 ± 4.94	65 ± 6.44	50 ± 5.34
%m	27 ± 5.38	65 ± 6.44	50 ± 5.35
%a	10 ± 3.40	19 ± 5.07	36 ± 5.35
%A	4 ± 1.25	12 ± 3.98	19 ± 4.28

Tabla 3: efecto de las enmiendas (SB o SB+RP) en la colonización micorrícica (% F frecuencia de micorrización, % M intensidad global de micorrización, % m intensidad de micorrización de los fragmentos infectados, % a riqueza de arbusculos de la parte micorrizada, % A riqueza de arbusculos del sistema radical) tras la tinción con azul tripán de raíces de *Trifolium repens* crecidas en suelos contaminados con Cd (10 mg Cd Kg⁻¹ suelo).

Tinción succinato deshidrogenasa			
	No SB	SB	SB+RP
%F	88 ± 6.72	100 ± 0.00	90 ± 5.22
%M	18 ± 3.39	43 ± 12.70	30 ± 7.19
%m	20 ± 3.80	43 ± 12.70	32 ± 6.96
%a	0 ± 0.03	7 ± 3.98	22 ± 9.71
%A	0 ± 0.00	4 ± 2.82	4 ± 1.63

Tabla 4: efecto de las enmiendas (SB o SB+RP) en la colonización micorrícica (%F frecuencia de micorrización, % M intensidad global de micorrización, % m intensidad de micorrización de los fragmentos infectados, % a riqueza de arbusculos de la parte micorrizada, % A riqueza de arbusculos del sistema radical) tras la tinción vital succinato deshidrogenasa de raíces de *Trifolium repens* crecidas en suelos contaminados con Cd (10 mg Cd Kg⁻¹ suelo).

En general, los suelos enmendados mostraron una mayor actividad enzimática en la rizosfera que los no enmendados (fig 7). Además, la colonización con el hongo MA indujo algunos cambios en dichas actividades. El mayor efecto de la aplicación de la enmienda se observó en la actividad β-glucosidasa que fue muy baja en el suelo rizosférico de los suelos sin enmienda (fig 7 b).

Las actividades deshidrogenasa y fostatasa más altas se detectaron en los suelos inoculados con micorriza y a los que se les añadió el fermentado SB+RP (fig 5a).

La adición de la enmienda incrementó la producción de AIA en suelo rizosférico en mayor cuantía que la colonización con el hongo MA. La colonización MA no cambió este valor en ningún caso (figura 7 d)

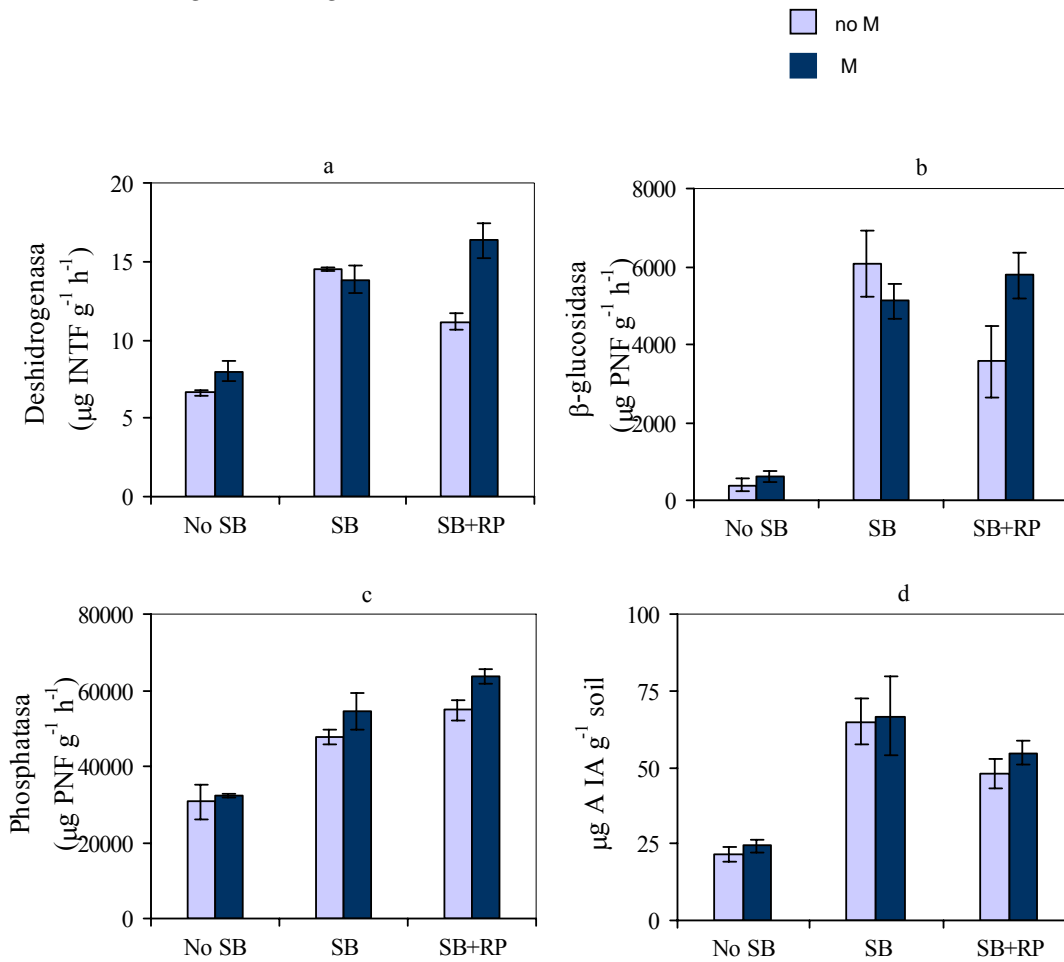


Figura 7: Actividades deshidrogenasa, β -glucosidasa, fosfatasa y concentración de ácido indol acético (AIA) (a, b, c y d respectivamente) en suelo rizosférico de *Trifolium repens* crecido en suelos contaminados con Cd (10 mg Cd kg^{-1} suelo).

En la figura 8 se observa que tanto la adición de la enmienda orgánica como la micorrización produjeron una disminución de la concentración de Cd en suelo, excepto en el tratamiento conjunto de SB+RP y M cuya concentración de Cd en suelo es similar al control.

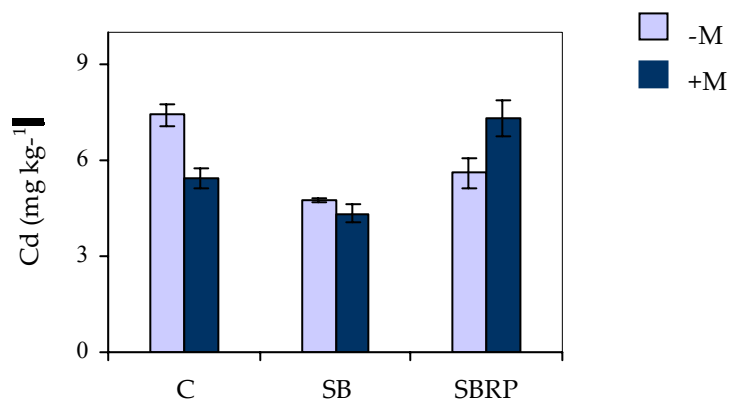


figura 8: Influencia de la micorrización y de la aplicación de residuo de azúcar de remolacha fermentado sin RP (SB) o con RP (SB+RP) sobre la concentración de Cd en suelo rizosférico de *Trifolium repens* crecido en suelos contaminados con Cd (10 mg Cd kg⁻¹ suelo) tras 4 meses de crecimiento.

V. Inoculación y enmiendas en bioremediación

	residuo azúcar de remolacha (RA)	micorriza (MA)	RA x MA
Peso seco parte aérea	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0000 ***
Peso fresco raíz	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0000 ***
número de nódulos	0.0000 ***	0.0257 *	0.3132 ns
contenido total de K	0.0002 ***	0.0000 ***	0.061 ns
contenido total de N	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0065 **
concentración de P	0.0000 ***	0.0000 ***	0.5837 ns
concentración de Cd	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0019 **

Tabla 5: Valores del análisis de varianza multifactorial de los parámetros de crecimiento, nutrición y contenido de metal pesado de *Trifolium repens* crecido en suelo contaminado con Cd (10 mg Cd Kg⁻¹ suelo).

	residuo azúcar de remolacha (RA)	micorriza (MA)	RA x MA
	***	***	**
deshidrogenasa	0.0000 ***	0.0038 **	0.003 **
Glucosidasa	0.0000 ***	0.3299 ns	0.0615 ns
Fosfatasa	0.0000 ***	0.041 *	0.5157 ns
Ácido indol acético	0.0004 ***	0.2084 ns	0.2459 ns

Tabla 6 Valores del análisis de varianza multifactorial de los parámetros enzimáticos en suelo rizosférico de *Trifolium repens* crecido en suelo contaminado con Cd (10 mg Cd Kg⁻¹ suelo).

3. APLICACIÓN DEL RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA TRATADO CON *ASPERGILLUS NIGER* (SBA) Y *GLOMUS MOSSEAE* PARA MEJORAR EL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN DE *TRIFOLIUM REPENS* EN UN SUELO CONTAMINADO CON ZN (600 $\mu\text{G ZN G}^{-1}$ SUELO)

3.1. Objetivo

Evaluar, en microcosmos, la eficiencia sobre el desarrollo de la planta del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger*, en presencia o ausencia de fosfato de roca (RP) como enmendante de suelos contaminados artificialmente con Zn (600 $\mu\text{g Zn g}^{-1}$ de suelo). Además, se estudió el efecto la inoculación con un hongo MA adaptado al Zn, sobre la tolerancia a la contaminación con Zn de *Trifolium repens*, así como su. También se evaluó la influencia de dichos tratamientos sobre la actividad rizosférica del suelo, como índice de la fertilidad del mismo.

3.2. Proceso de fermentación del residuo agroindustrial

La preparación del fermentado del sustrato (SB) suplementado o no de fosfato de roca se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el capítulo de materiales y métodos.

3.3. Características del suelo y condiciones experimentales.

Para la realización de este ensayo se utilizó un suelo de la provincia de Granada (España) cuyas características están descritas en el capítulo de materiales y métodos de esta tesis. El suelo se tamizó y tindalizó durante una hora a vapor fluente, durante tres días consecutivos. De esta forma el suelo queda libre de propágulos de micorriza. El suelo se mezcló con arena en una proporción 3:1(v/v). La arena se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min. Esta mezcla se incubó durante seis semanas con una solución acuosa de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Tras 2 semanas de incubación del suelo (para la estabilización del metal), se determinó la concentración final de Zn, utilizando EDTA como extractante (Lakane & Erviö, 1971) fue de 600 $\mu\text{g Zn g}^{-1}$ suelo.

El fermentado de SB o SB+RP se mezcló en una proporción de 5% cuando fue requerido, con la mezcla suelo-arena y se dejó durante tres semanas a temperatura ambiente para que alcanzara el equilibrio con los componentes del suelo. El fosfato de roca (0.75 g por maceta) se aplicó a aquellas macetas que no habían recibido el fermentado suplementado con RP.

Las plantas crecieron durante 7 meses en las condiciones de invernadero descritas en el capítulo de materiales y métodos, y se regaron todos los días al 100 % de la capacidad

de campo. Se realizaron cortes sucesivos de parte aérea a los 60, 120 y 180 días de crecimiento y la cosecha final del ensayo tuvo lugar a los 240 días de la siembra. Ello permitió ver la dinámica y el comportamiento de los tratamientos aplicados a lo largo del tiempo.

3.4. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

La planta seleccionada para la realización del ensayo que se describe a continuación, fue *Trifolium repens*. Se sembraron 10 semillas directamente en macetas de 400 g y tras su germinación se dejaron en 4 plántulas por maceta. Los tratamientos micorrizados recibieron 10 g de inóculo de una cepa de *Glomus mosseae* aislada de suelos contaminados con Zn. Los tratamientos no micorrizados recibieron 2 ml de un filtrado del inóculo para reincorporar la microbiota exenta de propágulos de micorriza.

Todas las plantas se inocularon con 1 ml de cultivo de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* a una concentración de 10^8 ufc ml⁻¹.

3.5. Diseño experimental

El experimento consistió en un bloque factorial diseñado completamente al azar, con dos factores: (1) inoculación micorrícica con un hongo micorrícico adaptado a Zn, y (2) aplicación residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A.niger*. Los tratamientos fueron: (i) suelo sin enmienda: control; (ii) suelo con residuo de azúcar de remolacha fermentado (SB); (iii) suelo con residuo de azúcar de remolacha suplementado con RP fermentado (SB+RP). Estos tratamientos fueron inoculados o no con *G.mosseae*, aislado autóctono (Zn) (\pm M). Todos los tratamientos tuvieron 5 repeticiones resultando un total de 30 macetas.

3.6. Determinaciones

La parte aérea de la planta fue cosechada a los 60, 120, 180 y 240 días de la siembra. Tras cada cosecha, se determinaron Pesos frescos y secos de parte aérea

En la última cosecha (240 días) se determinó:

- Peso fresco y seco de parte aérea
- Contenido de N, P, K y Zn en parte aérea.
- Peso fresco de raíz
- Número de nódulos
- Porcentaje de raíz micorrizada por el método de (Trouvelot *et al.*, 1986)
- Actividades enzimáticas en suelo rizosférico

- Porcentaje de agregados estables en suelo rizosférico
- Concentración de Zn en suelo

El coeficiente de absorción específica (SAR, del inglés, specific absorption rate) se define como la cantidad de nutrientes o metal que es absorbido por unidad de biomasa de raíz (Gray & Schlesinger, 1983). Se calculó de la siguiente manera:

$$\text{SAR} = \frac{\text{Nutriente o metal en planta } (\mu\text{g})}{\text{Biomasa de raíz (g)}}$$

3.7. Análisis estadístico de los resultados

Los efectos de los distintos tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en este ensayo fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Las barras en las columnas indican el error estándar.

Se realizó un análisis de varianza multifactorial ANOVA entre los distintos tratamientos para las variables determinadas en el ensayo.

Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus (Statistical Graphics Corp., Princeton, NJ).

3.8. Resultados

Crecimiento de la planta

En este suelo contaminado con Zn, en todas las cosechas hubo diferencias significativas en el crecimiento de la parte aérea entre las plantas crecidas en suelo enmendado con cualquiera de los residuos fermentados y los controles sin enmienda. Tras 60 días de crecimiento, la efectividad del hongo MA se observó solamente en las plantas tratadas con SB+RP. Este efecto positivo de la micorrización en este tratamiento desapareció en la tercera y cuarta cosecha. Sin embargo, en las plantas control (sin enmienda) o en las tratadas con SB, la colonización con el hongo MA tuvo una evolución diferente ya que fue efectiva en incrementar la biomasa de la planta en la cuarta cosecha. La biomasa total de parte aérea (suma de las cosechas sucesivas) se incrementó por la colonización con el hongo MA en suelo con o sin enmienda. La adición de SB fermentado incrementó la biomasa de parte aérea con respecto al control (sin enmienda) en un 434% (en las plantas no micorrizadas) y en un 549% (en las plantas micorrizadas). En suelo sin enmienda, el efecto de la micorriza fue de un 232% con respecto al control. Pero el efecto más destacado lo tuvo la adición de SB+RP, que incrementó la biomasa en un 1006% (en ausencia de micorriza) y en un 1192% (en presencia de *G.mosseae*) con respecto al control (fig 9).

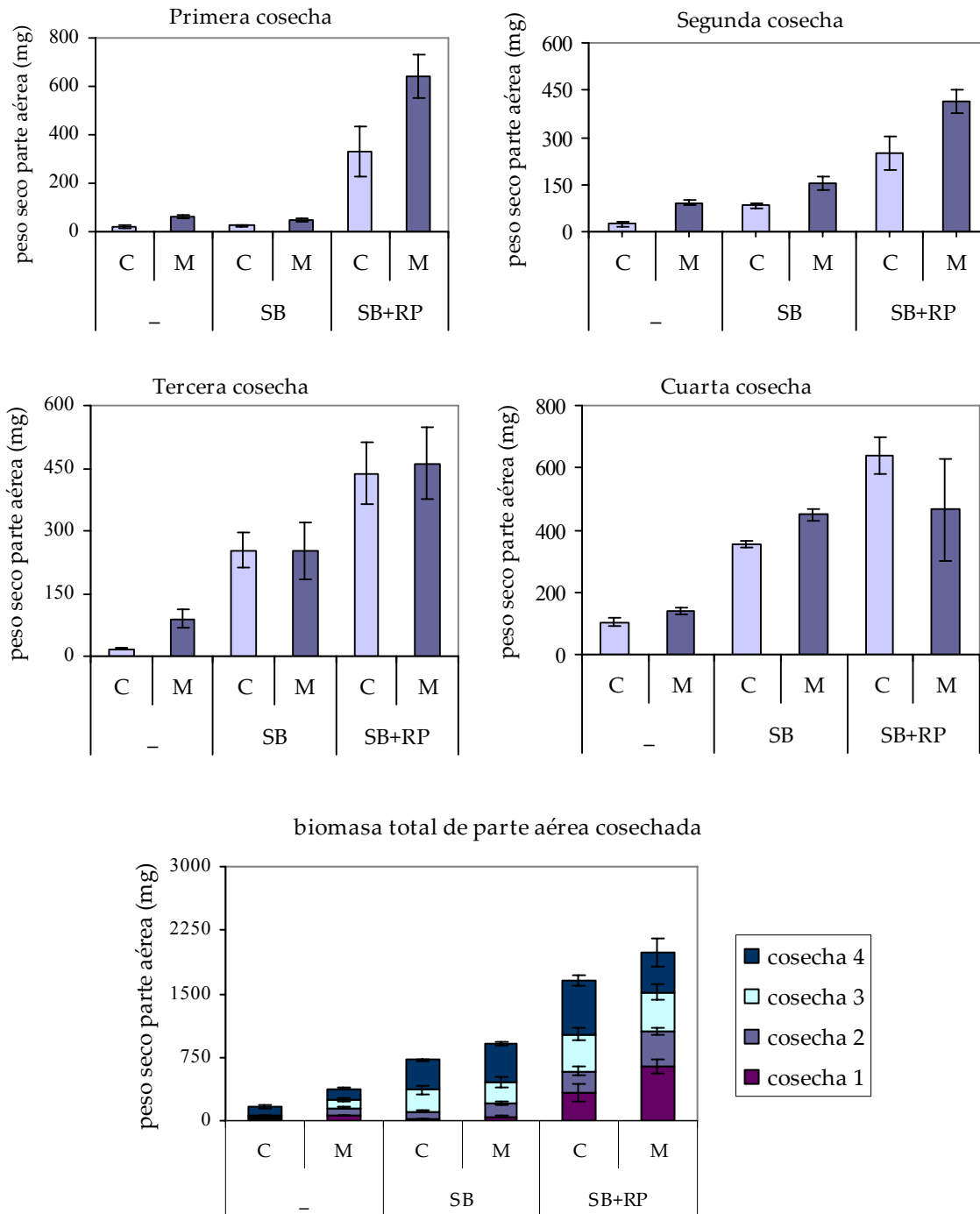


Figura 9: Efecto de las enmiendas (SB o SB+RP) sobre parte aérea de *Trifolium repens* no micorrizadas (C) y micorrizadas (M) crecido en suelos contaminados con Zn (600 mg Zn Kg⁻¹ suelo). Las barras verticales representan el error estándar.

La biomasa de raíz y el número de nódulos en los suelos no enmendados fue mayor en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas. Pero en los suelos con enmienda no hubo efecto de la micorriza (fig 10 a y 10 b). Las enmiendas incrementaron de forma importante el desarrollo radical siendo de destacar el papel estimulante de SB+RP incrementando también el número de nódulos formados. En suelo sin enmienda, la nodulación fue nula en las plantas no micorrizadas, y la formación de nódulos se estimuló por la colonización micorrícica (fig 10 b). El efecto de las enmiendas (SB y en especial SB+RP) sobre la formación de nódulos, fue evidente y más destacado que el producido por MA. Este efecto beneficioso alcanzó su valor máximo (210 nódulos/planta) en el tratamiento SB+RP (fig 10 b).

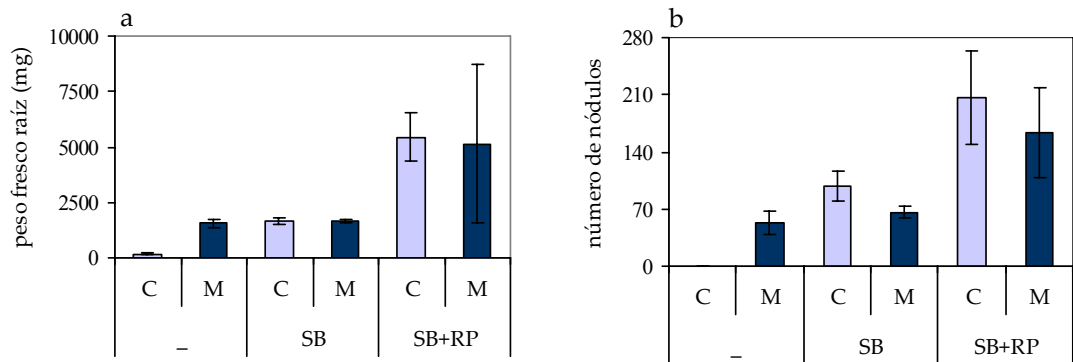


Figura 10: Efecto de las enmiendas (SB o SB+RP) sobre la biomasa de raíz, número de nódulos (fig 2a, 2b) de *Trifolium repens* no micorrizadas (C) y micorrizadas (M) crecido en suelo contaminado con Zn (600 mg Zn kg⁻¹ suelo). Las barras verticales representan el error estandar.

Con respecto al contenido de N y K en parte aérea fueron muy bajos en las plantas no micorrizadas que crecieron en suelo sin enmienda, siendo prácticamente despreciables. Pero la colonización con el hongo MA, incrementó el contenido de N y K en suelos sin enmienda y en los suelos enmendados con SB+RP. En las plantas micorrizadas que crecieron en suelos enmendados con SB+RP el incremento de N y K absorbidos fue de un 1672% (N) y 1832% (K) (fig 11 a, 11 b). En este tratamiento se observó una interacción positiva entre la enmienda y la micorrización. (tabla 8)

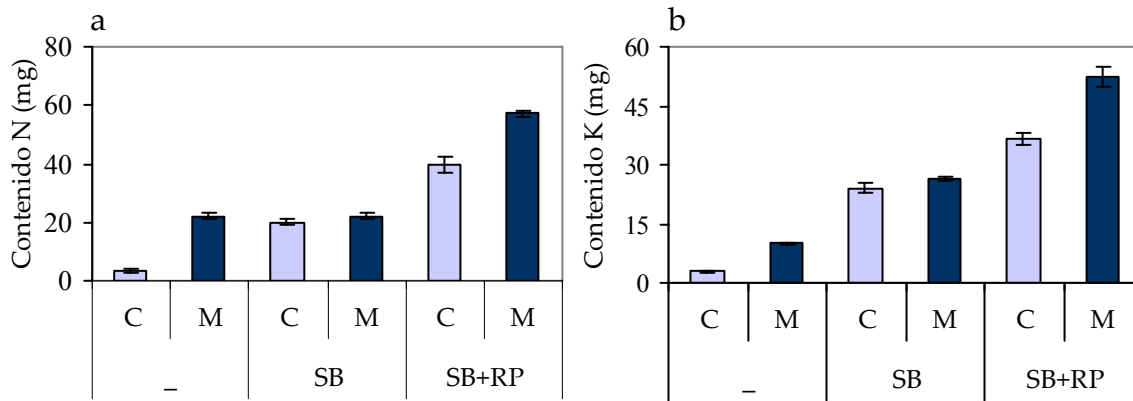


Figura 11: Efecto de las enmiendas (SB o SB+RP) sobre el contenido de N y K (a, b) en parte aérea de *Trifolium repens* no micorrizadas (C) y micorrizadas (M) crecidas en suelo contaminado con Zn (600 mg Zn kg⁻¹ suelo). Las barras verticales representan el error estandar.

La colonización MA en suelos con enmienda afectó de manera opuesta la absorción de P y Zn por la planta (fig 12 a, 12 b). Los valores máximos de P se obtuvieron, especialmente, en plantas micorrizadas cuando SB+RP se añadió al suelo (fig 12 a). Hubo una interacción positiva entre la enmienda y la micorrización (tabla 8) y se determinó un incremento en P del 379 % frente al control (sin enmienda y sin micorriza). De manera contraria, la concentración de Zn disminuyó un 45 % en plantas crecidas con estos tratamientos (fig 12 b). Consecuentemente, la razón P/Zn se incrementó en un 825% por la aplicación de la enmienda y la colonización micorrízica (fig 12 e). Sin embargo, debido a la mayor biomasa cosechada, en las plantas micorrizadas y tratadas con SB+RP se incrementó la adquisición total (contenido) de Zn. (Fig. 12 d).

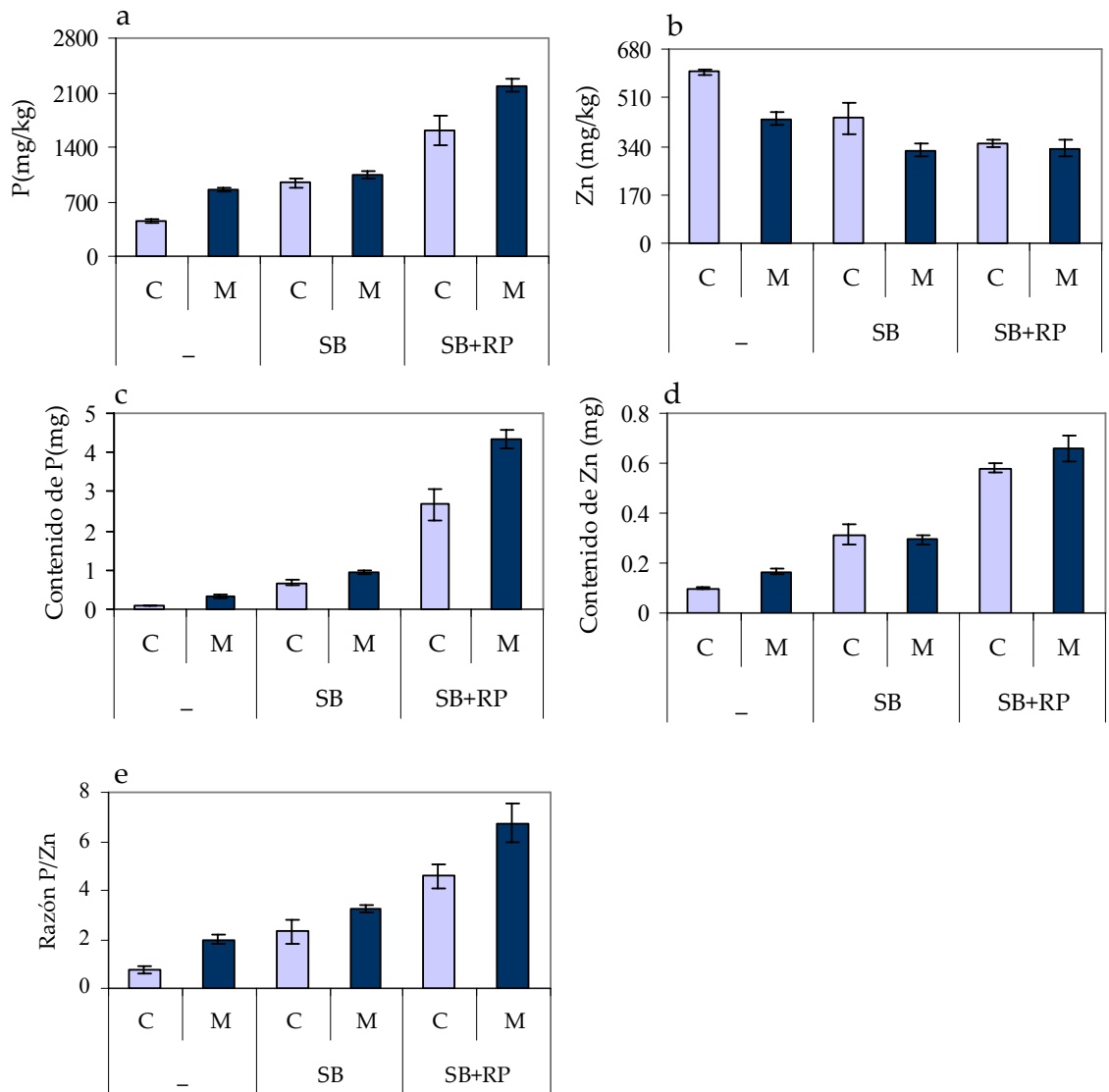


Figura 12: Efecto de las enmiendas (SB o SB+RP) sobre concentración y contenido de P y Zn (a, c, b, d) y razón P/Zn (e) en parte aérea de *Trifolium repens* no micorrizadas (C) y micorrizadas (M) crecidas en suelos contaminados con Zn (600 mg Kg⁻¹). Las barras verticales representan el error estandar.

Curiosamente, el porcentaje de raíz colonizada en términos de frecuencia (%F), intensidad (%M), e intensidad de arbusculos (%a y %A) decreció con la aplicación de SB+RP (fig 13)

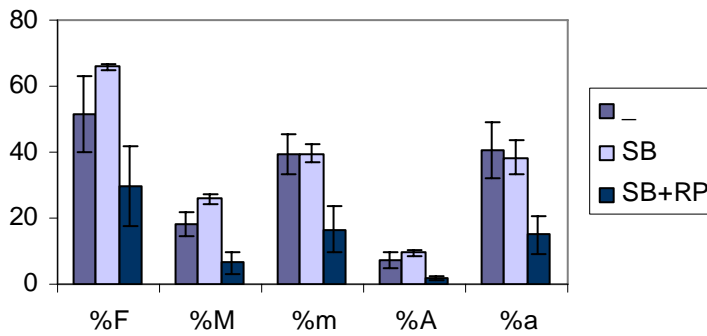


Figura 13: Efecto de las enmiendas (SB o SB+RP) sobre los valores de micorrización intraradical (%F, frecuencia de micorrización, % M, intensidad global de micorrización, % m ,intensidad de micorrización de los fragmentos infectados, % a, riqueza de arbusculos de la parte micorrizada, % A, riqueza de arbusculos del sistema radical) en raíces de *Trifolium repens* crecidas en suelos contaminados con Zn (600 mg kg^{-1} suelo).

En suelo contaminado con $600 \text{ mg Zn Kg}^{-1}$ suelo, la adición de la enmienda (SB o SB+RP) incrementó significativamente todas las actividades enzimáticas determinadas en suelo rizosférico. El mayor incremento, de un 1257 %, se observó en la actividad fosfatasa en respuesta a la aplicación de SB y el hongo MA (fig. 14 c). La colonización micorrícica incrementó la actividad fosfatasa solo en el tratamiento con SB, mientras que disminuyó en el tratamiento con SB+RP (fig 14 c). Siguiendo la misma tendencia, en el suelo tratado con SB y colonizado por el hongo MA, se determinaron las mayores actividades deshidrogenasa y β -glucosidasa (fig 14 a y 14 b) y se observó una interacción positiva entre la enmienda y la micorriza (tabla 9). La inoculación micorrícica fue menos efectiva en incrementar dichas actividades en los tratamientos sin enmienda o con SB+RP (fig. 14 a, b, c).

La colonización micorrícica no afectó la formación de agregados estables en ningún tratamiento, sin embargo, la adición de las enmiendas (SB o SB+RP) los incrementó.(fig 14 d).

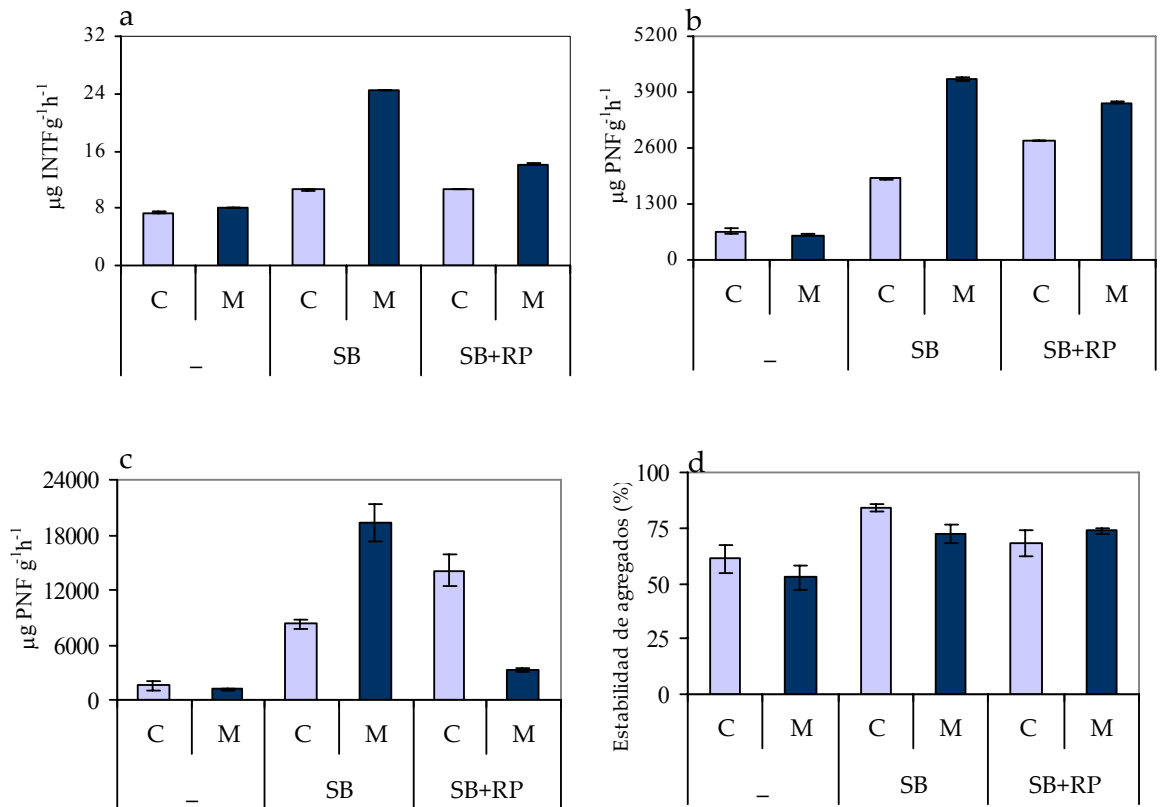


Figura 14: Efecto de las enmiendas (SB o SB+RP) sobre las actividades deshidrogenasa, β -glucosidasa, fosfatasa y sobre el porcentaje de agregados estables (fig 5a, 5b, 5c y 5d respectivamente) en suelo rizosférico de plantas no micorrizadas (C) y micorrizadas (M) de *Trifolium repens* crecidas en suelos contaminados con $600 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ suelo. Las barras verticales representan el error estandar.

Las plantas micorrizadas crecidas en un suelo con enmienda, demostraron una mayor adquisición específica de P. Sin embargo, hubo un efecto negativo de la micorrización en la adquisición específica de Zn, ya que se encontraban en el medio en cantidades supraóptimas. (tabla 7).

SAR	-		SB		SB+RP	
	C	M	C	M	C	M
P	0.4 ± 0	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.04	0.6 ± 0.04	0.5 ± 0.07	0.8 ± 0.04
Zn	0.5 ± 0	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.00	0.1 ± 0.01

Tabla 7: Efecto de las enmiendas (SB o SB+RP) sobre la absorción específica (SAR) (mg g^{-1}) de P y Zn de *Trifolium repens* no micorrizadas (C) y micorrizadas (M) en suelos contaminados con Zn ($600 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ de suelo).

La figura 15 muestra la disminución en la concentración de Zn en suelo contaminado con $600 \text{ mg Zn Kg}^{-1}$ suelo, tanto por la aplicación del fermentado como por la micorrización

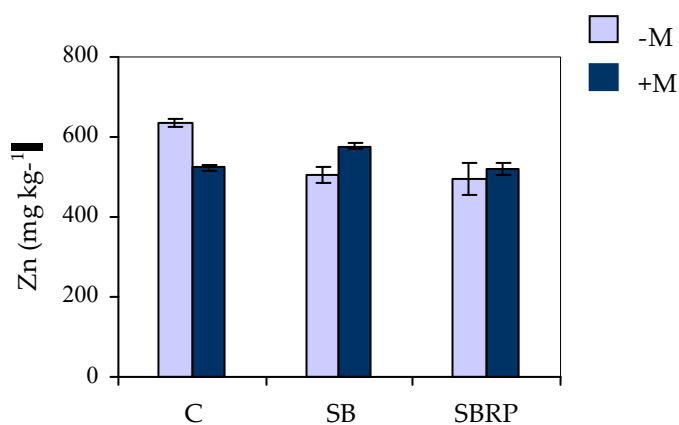


Figura 15: Efecto de las enmiendas (SB o SB+RP) sobre la concentración de Zn en suelo (mg Kg^{-1}) tras 240 días de crecimiento de *Trifolium repens* no micorrizadas (-M) y micorrizadas (+M) en suelos contaminados por Zn ($600 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ de suelo).

	residuo azúcar de remolacha (RA)	micorriza (MA)	RA x MA
Peso seco parte aérea	0.0000 ***	0.1179 ns	0.4455 ns
Peso fresco raíz	0.0024 **	0.4584 ns	0.3969 ns
número de nódulos	0.0001 ***	0.7618 ns	0.2342 ns
contenido total de K	0.0000 ***	0.0001 ***	0.0055 **
contenido total de N	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0001 ***
contenido total de P	0.0000 ***	0.0005 ***	0.0036 **
concentración de P	0.0000 ***	0.0027 **	0.1712 ns
contenido de Zn	0.0010 ***	0.0063 **	0.1622 ns
concentración de Zn	0.0010 ***	0.0063 **	0.1622 ns

Tabla 8: Valores del análisis de varianza multifactorial de los parámetros de crecimiento, nutrición y metal pesado de *Trifolium repens* crecido en suelo contaminado con Zn (600 mg Zn Kg⁻¹ suelo).

	residuo azúcar de remolacha (RA)	micorriza (MA)	RA x MA
deshidrogenasa	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0000 ***
Glucosidasa	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0000 ***
Fosfatasa	0.0000 ***	0.9229 ns	0.0000 ***
estabilidad de agregados	0.0016 **	0.2115 ns	0.174 ns

Tabla 9: Valores del análisis de varianza multifactorial de los parámetros de biológicos y físicos del suelo rizosférico de *Trifolium repens* crecidas en suelo contaminado con Zn(600 mg ZnKg⁻¹ suelo).

4. EFECTO DEL ALPEORUJO FERMENTADO CON *ASPERGILLUS NIGER* SOBRE LA DISPONIBILIDAD DE CD EN SUELO.

4.1. Objetivo.

Evaluar la capacidad de retención de Cd por alpeorujo fermentado con *A.niger* y estudio de su influencia sobre la disponibilidad de dicho metal en suelo.

4.2. Diseño experimental.

El suelo utilizado en este experimento es el mismo con el que se realizó el ensayo en microcosmos descrito en este capítulo. Este suelo proviene de la provincia de Granada y sus características están descritas en el apartado X de este capítulo. El suelo se secó y se pasó por un tamiz de 2 mm de diámetro. Se contaminó con Cd (20 mg Kg⁻¹ suelo) según el protocolo descrito en el capítulo de materiales y métodos. Tras un mes de incubación del suelo con el metal pesado, se añadió el alpeorujo en una proporción del 5% (similar a la utilizada en el ensayo con planta en microcosmos). Se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 1 mes. Tras este tiempo se procedió al análisis de Cd total y extractable.

4.3. Resultados

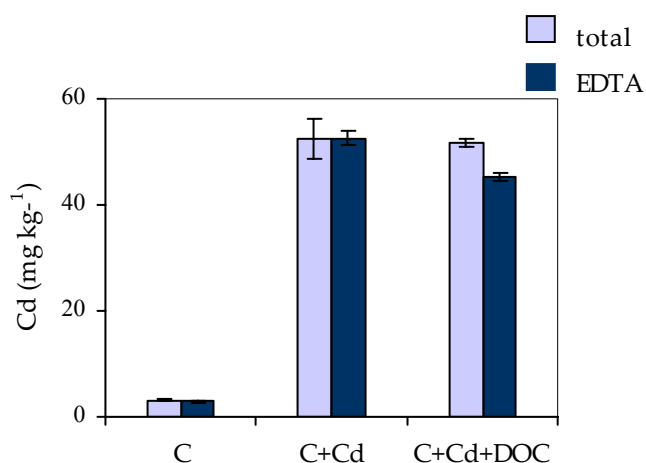


Figura 16: Influencia de la aplicación de alpeorujos (DOC) sobre la concentración de Cd en suelo total y extraíble por EDTA.

5. EFECTIVIDAD DE *GLOMUS MOSSEAE* Y ALPEORUJO (TRATADO MICROBIOLÓGICAMENTE CON *ASPERGILLUS NIGER*) PARA MEJORAR EL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN DE *TRIFOLIUM REPENS* EN UN SUELO CONTAMINADOS CON Cd.

5.1. Objetivo.

Dada la capacidad del biofermentado de DOC de reducir el Cd extraíble del suelo y puesto que en ensayos previos la enmienda añadida había potenciado el desarrollo y la actividad de la colonización intraradical, un siguiente objetivo era verificar si, de forma similar, el desarrollo del micelio extraradical era activado, en suelo contaminado con Cd, mediante la aplicación de esta enmienda. Para ello se utilizó un sistema experimental que permitió evaluar la capacidad infectiva del micelio extraradical en suelo contaminado con Cd y la influencia de la enmienda añadida.

Este ensayo constó de dos partes consecutivas.

5.2. Proceso de fermentación del residuo agroindustrial

La preparación del sustrato (DOC) suplementado con fosfato de roca se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el capítulo de materiales y métodos.

5.2. Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

La planta seleccionada para la realización del ensayo que se describe a continuación, fue *Trifolium repens*. Los tratamientos micorrizados recibieron 10 g de inóculo de la cepa de *Glomus mosseae* (adaptada a Cd y aislada de suelo contaminado con 270 mg Cd Kg⁻¹ suelo). Los tratamientos no micorrizados recibieron 2 ml de un filtrado del inóculo para reincorporar la microbiota exenta de propágulos de micorriza.

Todas las plantas fueron inoculadas con 1 ml de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* a una concentración de 10⁸ ufc ml⁻¹.

5.3. Características del suelo y condiciones experimentales

Para la realización de este ensayo se utilizó un suelo de la provincia de Granada (España) cuyas características están descritas en el capítulo de materiales y métodos de esta tesis. El proceso de contaminación con Cd se realizó siguiendo el protocolo descrito en el capítulo de materiales y métodos.

Las plantas crecieron en condiciones de invernadero (temperatura entre 19-25 °C, fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad y humedad relativa de 70-90%) y se regaron todos los días hasta alcanzar el 100 % de la capacidad de campo. La parte I del ensayo duró 7 meses y se realizaron cortes de partea aérea a los 60, 90, 120, 150 y 180 días de la siembra. La parte II del ensayo, se cosechó a los 45 días de la siembra.

5.4. Diseño experimental

El sistema experimental utilizado se basó en el descrito por (Tobar *et al.*, 1994b; Ruíz-Lozano *et al.*, 2000). Consistía en dos compartimentos, el compartimento de la raíz (CR) separado del resto por una malla 0.45 µm de diámetro de poro y contenía 300 g de mezcla de suelo/ arena (1:1) (v/v) estéril. Este sistema permite el paso de las hifas emergentes de las raíces micorrizadas de las plantas sembradas en el CR al segundo compartimento: compartimento de la hifa (CH). El CR ocupó el centro de un contenedor de 21 cm (longitud) x 10 cm (de ancho), de manera que quedaban dos CH a ambos lados de CR. Todos los compartimentos eran de tamaño similar (300 ml de capacidad).

El ensayo que aquí se describe se desarrolló en dos etapas sucesivas. En la 1^a (Parte I) se utilizó el sistema experimental completo y en la 2^a (Parte II) solo CH para evaluar los efectos deseados.

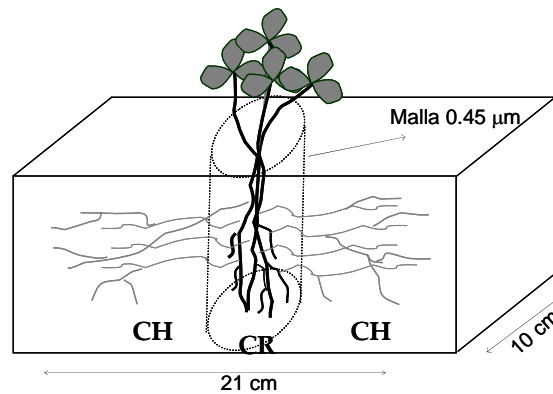


Figura 17: Esquema del sistema bicompartimentado utilizado en este ensayo, donde CR (compartimento de la raíz) estaba rodeado por dos CH (compartimento de desarrollo de las hifas) colindantes.

Parte I

El objetivo de esta primera parte fue evaluar, en microcosmos, la eficiencia del residuo de alpeorujos fermentado con *A. niger* (DOC), y suplementado con fosfato de roca, sobre crecimiento y nutrición de *Trifolium repens* en suelos contaminados por Cd. Además, se evaluó su influencia sobre la infección micorrízica intra y extraradical.

La parte I de este experimento, consistió en un bloque factorial diseñado completamente al azar, con tres factores: (1) inoculación micorrízica con un hongo adaptado a Cd, (2) alpeorujos suplementado con fosfato de roca y fermentado con *A. niger*, y (3) contaminación con Cd del suelo. Todos los tratamientos tuvieron 4 repeticiones.

El residuo de alpeorujos fermentado con *A. niger*, se añadió a la mezcla suelo-arena del CR en una proporción de 5%, cuando fue requerido, y se dejó, durante tres semanas, a temperatura ambiente para que alcanzaran el equilibrio con los componentes del suelo. El fosfato de roca (0.75 g por maceta) se aplicó al CR de aquellos tratamientos que no habían recibido el fermentado suplementado con RP.

Se sembraron 10 semillas directamente en cada CR y tras 2 semanas se dejaron en 4 plántulas por 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 Cd en el sustrato como por la adición de DOC en CR. Tras cosechar las

plantas de la parte I, se sembraron 8 semillas de *T. repens* en el compartimento de la hifa (CH) y finalmente se dejaron en 4 plántulas por cada CH. De manera que las plantas crecidas en CH eran todas micorrizadas. El inóculo estaba formado únicamente por el micelio extraradical procedente de las plantas micorrizadas crecidas en RC durante la parte I del ensayo.

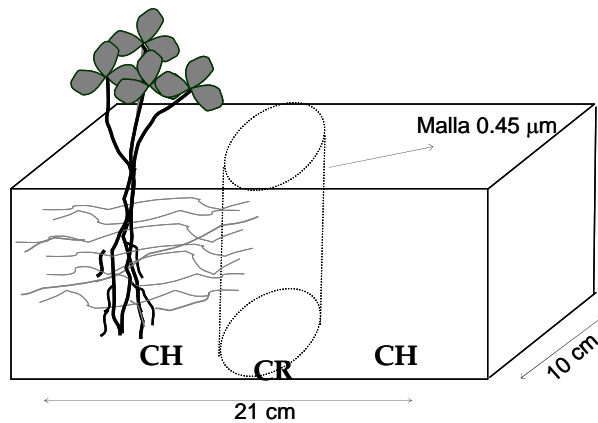


Figura 18: Esquema del sistema bicompartimentado utilizado en la parte II de este ensayo. Las semillas de *Trifolium repens* se sembraron en el CH donde se había desarrollado el micelio MA a partir del CR (compartimento de la raíz) de la parte I del ensayo.

5.5. Determinaciones

Parte I

Las plantas crecidas en CR se cosecharon definitivamente a los 210 días de crecimiento vegetal. Se determinó el peso seco de cada una de las sucesivas cosechas previas (tras secarlas en un horno a 65 °C durante 48 horas). Finalmente se juntaron todas las muestras pertenecientes a la misma repetición de las distintas cosechas y en la mezcla se procedió a la determinación del contenido de N, P, K en parte aérea. Las raíces fueron lavadas y una vez pesadas se tomó una alícuota para la determinación del nivel de colonización micorrícica (descrita en el capítulo de materiales y métodos).

También se procedió a la determinación de la longitud del micelio extraradical generado en el suelo de ambos compartimentos (CR y CH), según el método descrito por (Jakobsen *et al.*, 1992) (capítulo de materiales y métodos).

Parte II

Las plantas crecidas en el compartimento de la hifa (CH), se cosecharon a los 60 días de crecimiento vegetal. La única fuente de inóculo MA para las plantas de esta segunda parte crecidas en el CH, era el micelio generado en CR por las plantas micorrizadas crecidas en parte I. A estas plantas se les determinó crecimiento (peso seco de la parte aérea y peso fresco de raíz) y número de nódulos e infección MA en raíz.

5.6. Análisis estadístico de los resultados

Los efectos de los distintos tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en este ensayo fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Las barras en las columnas indican el error estándar.

Se realizó un análisis de varianza multifactorial ANOVA entre los distintos tratamientos con las variables determinadas en el ensayo.

Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus (Statistical Graphics Corp., Princenton, NJ).

5.7. Resultados

Parte I

Los resultados de crecimiento y nutrición obtenidos siguieron la tendencia previamente observada en el ensayo con residuo de azúcar de remolacha y suelo contaminado con Cd (capítulo de materiales y métodos). La contaminación del suelo con Cd, disminuyó el crecimiento vegetal de todos los tratamientos; no obstante, este efecto se neutralizó en parte por la micorrización y por la adición de DOC. Hubo una interacción positiva entre la micorriza y la enmienda de manera que los valores máximos de crecimiento se alcanzaron en las plantas micorrizadas que crecieron en suelo con DOC tanto en suelos contaminados con Cd como en los no contaminados (tabla 10). La biomasa de la parte aérea cosechada fue 2933% (en suelo contaminado) y 2376% (en suelo no contaminado) mayor que sus respectivos controles (sin micorriza y sin residuo) (figura 19). El desarrollo de la raíz siguió la misma pauta de crecimiento que la parte aérea, aunque en suelos contaminados por Cd, el residuo DOC incrementó en mayor cuantía la

biomasa de raíz en plantas micorrizadas que en suelos no contaminados (17% de incremento en suelos no contaminados y 64% en suelos contaminados (figura 20 a).

La micorrización, particularmente en interacción con la enmienda (DOC), contrarresta el efecto inhibitor del Cd sobre el desarrollo de la raíz.

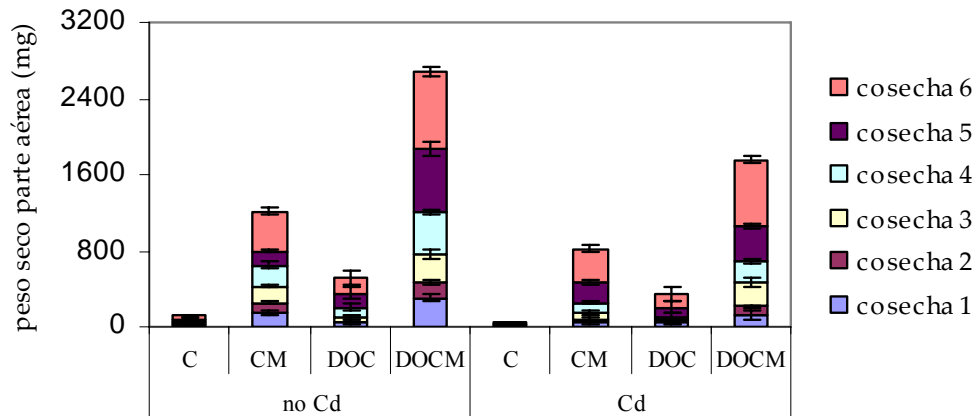


Figura 19: Efecto de la aplicación del fermentado de DOC y de la micorrización (M) sobre la biomasa total cosechada (suma de cosechas sucesivas) de parte aérea de *Trifolium repens* crecido en suelos sin contaminar y en suelos contaminados por Cd (20 mg kg^{-1} suelo)

La micorrización y en menor cuantía la adición de DOC incrementaron el número de nódulos en suelo con o sin Cd. Sin embargo, en los suelos sin Cd, la interacción positiva entre la micorriza y el residuo fue más destacada en el aumento del número de nódulos (figura 20 b).

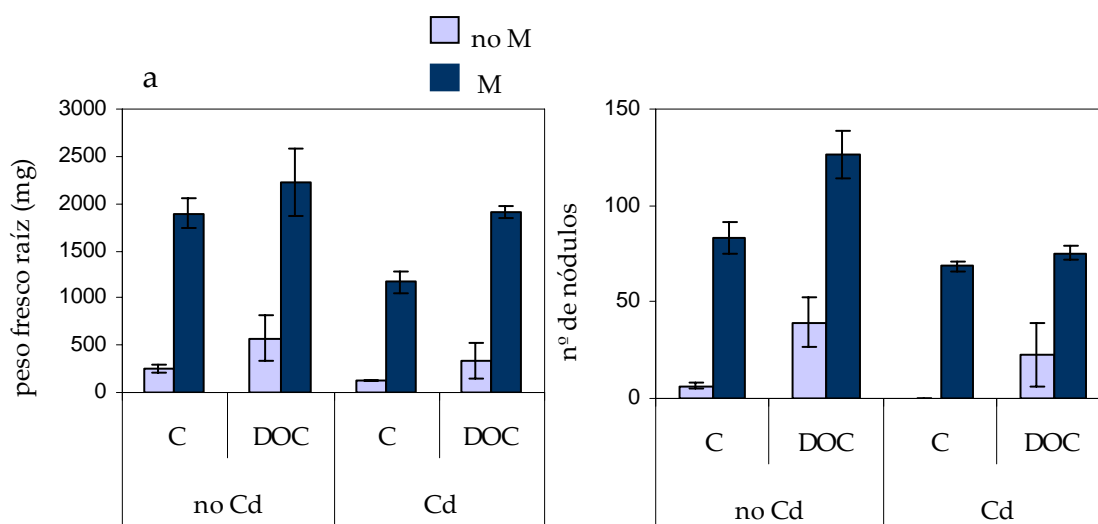


Figura 20: Efecto de la aplicación del fermentado de DOC y la micorrización (M) sobre la biomasa de raíz (a) y el número de nódulos (b) de *Trifolium repens* crecido en suelos sin contaminar y en suelos contaminados con Cd (20 mg Kg^{-1} suelo).

Los contenidos de N, K en parte aérea (figura 21 a y b respectivamente), mantuvieron la tendencia observada sobre el desarrollo vegetal. Los valores más altos se encontraron en las plantas colonizadas por MA y crecidas en suelos con el residuo fermentado, tanto en suelos con Cd como sin él.

En suelos sin Cd el contenido de P fue más estimulado por la enmienda que por la micorrización (figura 21 c). En todos los nutrientes analizados se evidenció una interacción positiva entre la micorriza y la enmienda (tabla 10), tal hecho es de particular relevancia en suelo contaminado con Cd donde la asimilación de estos nutrientes estaba muy restringida. En plantas crecidas en suelo con Cd, la adición de la enmienda y la micorrización provocan un incremento en la adquisición de N, P, K que supera ampliamente al obtenido por plantas micorrizadas crecidas en ausencia de Cd. (figura 21, a,b c)

En ninguno de los parámetros de micorrización medidos, hubo diferencias significativas entre los tratamientos con DOC y sin DOC, tanto en suelos contaminados como en los no contaminados con Cd (tabla 11). Sin embargo, la presencia de Cd en suelo incrementó los valores de %a y %A en todos los tratamientos (figura 22).

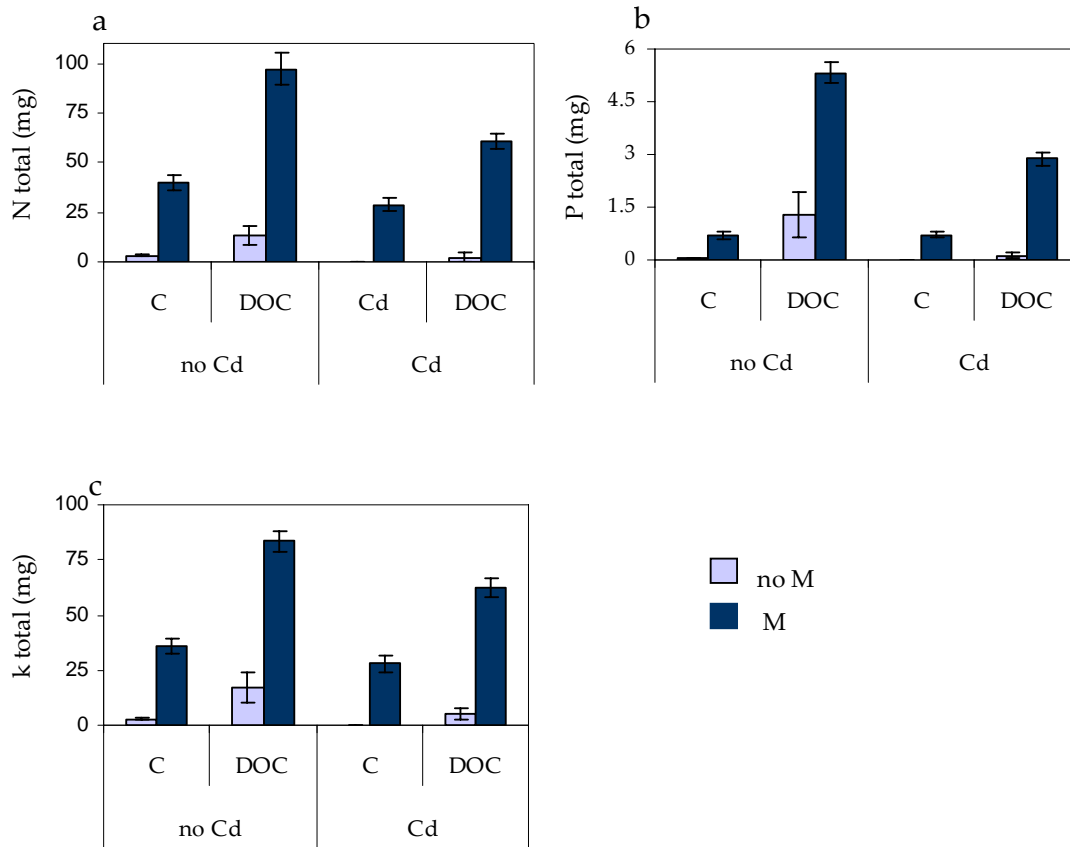


Figura 21: Efecto de la aplicación del fermentado de DOC y de la micorrización sobre el contenido de N, P, K (a, b, c respectivamente) en parte aérea de *Trifolium repens* crecidas en suelos sin contaminar y en suelos contaminados con Cd (20 mg Kg⁻¹)

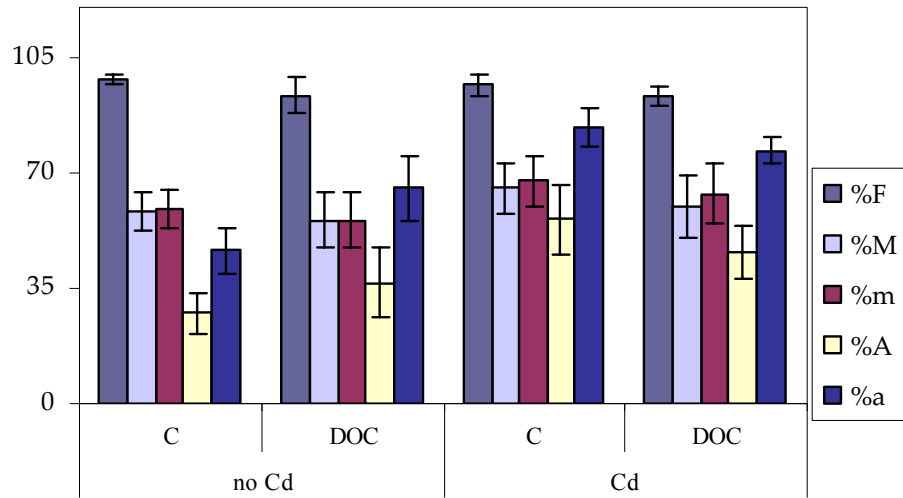


Figura 22: Efecto de la aplicación del fermentado de DOC sobre valores de micorrización intraradical (%F, frecuencia de micorrización, % M, intensidad global de micorrización, % m ,intensidad de micorrización de los fragmentos infectados, % a, riqueza de arbusculos de la parte micorrizada, % A, riqueza de arbusculos del sistema radical) de *Trifolium repens* crecido en suelos sin contaminar y en suelos contaminados con Cd (20 mg Kg⁻¹suelo)

La longitud del micelio extraradical en el CR fue similar tanto en suelo contaminados por Cd como en suelo sin contaminar y ninguno de los tratamientos influyó sobre este valor (fig 23 a). Sin embargo, en el CH se produce una disminución en la longitud del micelio extraradical tanto por la adición de la enmienda como por la contaminación con Cd (figura 23 b)

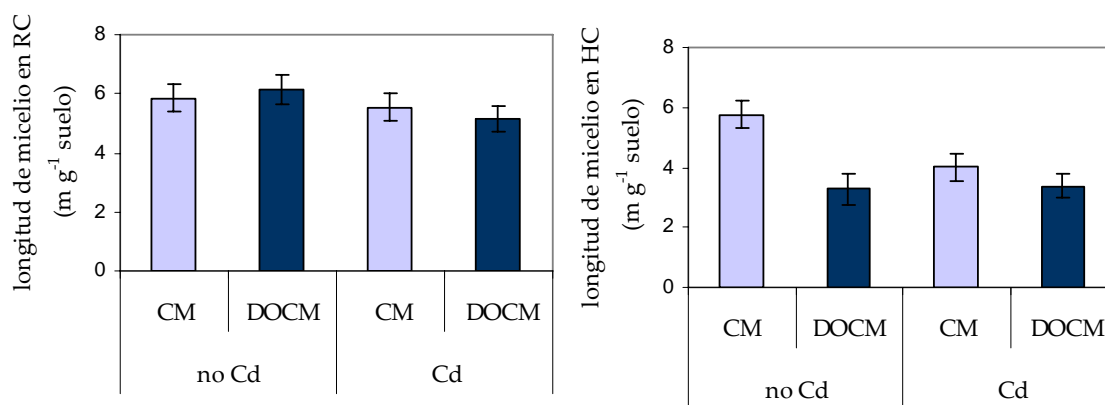


Figura 23: Efecto de la aplicación del fermentado de DOC y de la contaminación por Cd (20 mg Kg⁻¹ suelo) sobre la longitud del micelio extraradical de hongos MA en suelo del CR (a) y en suelo del CH (b).

	micorriza (MA)	Alpeorujó (DOC)	Cd	MAxDOC	MAxCd	DOCxCd	MAxDOC x Cd
Peso seco parte aérea	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0001 ***	0.0000 ***	0.0041 **	0.0899 ns	0.1846 ns
Peso fresco raíz	0.0000 ***	0.0034 **	0.0084 **	0.3993 ns	0.2639 ns	0.4643 ns	0.415 ns
Número de nódulos	0.0000 ***	0.0005 ***	0.0025 **	0.8252 ns	0.112 ns	0.0926 ns	0.3269 ns
Contenido total de K	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0011 ***	0.0000 ***	0.2428 ns	0.0719 ns	0.7298 ns
Contenido total de N	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0001 ***	0.0000 ***	0.0092 **	0.0227 *	0.1309 ns
Contenido total de P	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0003 ***	0.0000 ***	0.1454 ns	0.0003 ***	0.1135 ns

Tabla 10: Valores del análisis de varianza multifactorial para los parámetros de crecimiento y nutrición de *Trifolium repens*.

	Alpeorajo (DOC)	Cd	DOCxCd
%F	0.2783 ns	0.7813 ns	0.8313 ns
%M	0.6263 ns	0.5051 ns	0.8551 ns
%m	0.6625 ns	0.3123 ns	1.0000 ns
%a	0.4383 ns	0.0046 **	0.0914 ns
%A	0.9677 ns	0.0626 ns	0.3098 ns
longitud de micelio (CR)	0.9299 ns	0.1627 ns	0.4916 ns
longitud de micelio (CH)	0.0000 ***	0.0045 **	0.0016 **

Tabla 11: Valores del análisis de varianza multifactorial para los parámetros de crecimiento y nutrición de *Trifolium repens*.

Parte II

Tanto el crecimiento de parte aérea y de raíz como el número de nódulos disminuyó en todas las plantas crecidas en suelo con Cd en comparación con los tratamientos sin Cd (figura 24 a,b,c respectivamente). En ninguno de los parámetros de micorrización medidos hubo diferencias significativas influenciadas por los distintos tratamientos (figura 25).

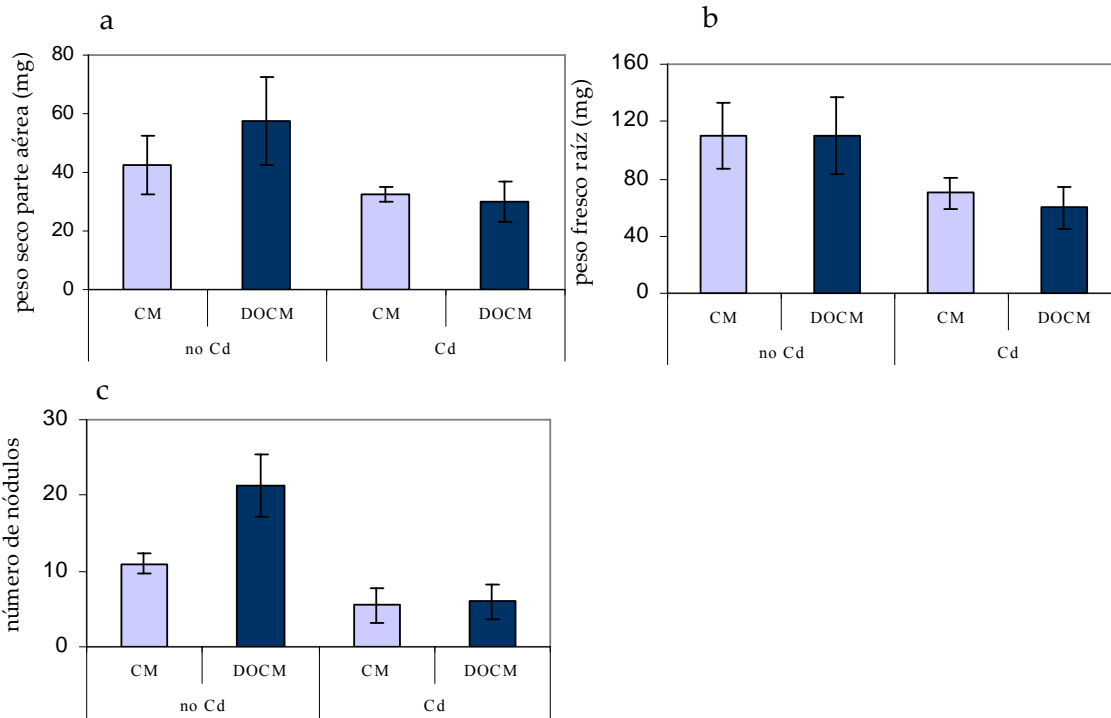


Figura 24: Biomasa de parte aérea, raíz y número de nódulos (a, b, c respectivamente) de plantas de *Trifolium repens* crecido en suelos no contaminados o contaminados con Cd (20 mg Cd kg⁻¹ suelo).

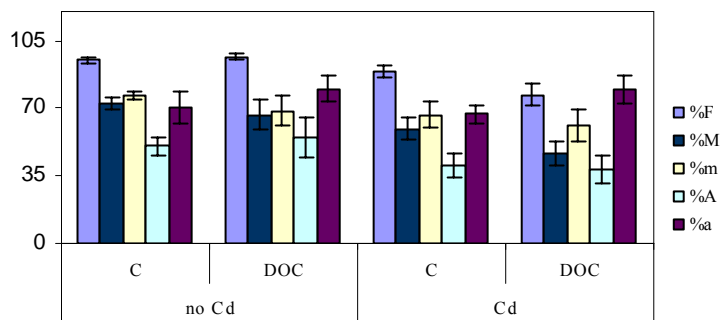


Figura 25: Valores de colonización MA en raíces de plantas de *Trifolium repens* crecido en el CH.

	Alpeorajo (DOC)	Cd	DOCxCd
Peso seco parte aérea	0.5363	0.0803	0.3902
	ns	ns	ns
Peso fresco raíz	0.8068	0.0440	0.8068
	ns	*	ns
número de nódulos	0.0669	0.0022	0.0927
	ns	**	ns
%F	0.2783	0.7813	0.835
	ns	ns	ns
%M	0.6263	0.5051	0.8545
	ns	ns	ns
%m	0.6625	0.3123	1.0000
	ns	ns	ns
%a	0.4383	0.0046	0.0914
	ns	*	ns
%A	0.9677	0.0626	0.3098
	ns	ns	ns

Tabla 12 Valores del análisis de varianza multifactorial para los parámetros de crecimiento y simbióticos de *Trifolium repens* crecido en suelo contaminado con Cd (20 mg Zn Kg⁻¹ suelo)

V. 3. Discusión

El hecho de que en zonas contaminadas por metales pesados se haya encontrado colonización por hongos MA, apoya la idea de que dichos hongos pueden contribuir a una mayor tolerancia de las plantas a estos metales. Estudios de (Kaldorf *et al.*, 1999; Hildebrandt *et al.*, 1999; Tonin *et al.*, 2001)(libro mycorrhizal fungi), refuerzan esta hipótesis. Además,(Vivas *et al.*, 2003a; Vivas *et al.*, 2005a) encontró que las especies de hongos MA aislados de áreas contaminadas eran exclusivamente las del género *Glomus* que parecen ser particularmente capaces de tolerar altas concentraciones de metales pesados en suelos neutro-alcálinos muestreados.

En los dos ensayos realizados con metales pesados cabe destacar el efecto beneficioso de la inoculación de *Glomus mosseae* sobre el crecimiento de la planta, especialmente de aquellas que crecieron en suelos adicionados del fermentado del residuo de azúcar de remolacha. Además, la cepa de *G.mosseae* utilizada en estos ensayos es tolerante a metales pesados y su inoculación alivia la toxicidad que excesos de Zn y Cd en el medio ejercen sobre el desarrollo de la planta. A su vez, incrementan la captación de nutrientes, N y P principalmente, a través del micelio extraradical. (Joner & Leyval, 1997)encontraron que en suelos contaminados con Cd, tanto el desarrollo de la hifa como la captación de nutrientes se mantuvieron a pesar de que el desarrollo radical de la planta se afectó. Ellos atribuyeron esos resultados al hecho de que los hongos MA son menos sensibles que las raíces a la toxicidad provocada por estos metales.

Por otro lado, la adición de la enmienda orgánica fermentada, también contribuyó al incremento del crecimiento de la planta, especialmente en plantas micorrizadas. Como se ha explicado en capítulos anteriores, durante el proceso de fermentación tiene lugar la mineralización de los residuos agrícolas y como consecuencia hay un incremento de nutrientes disponibles para la planta. Ello explica el incremento de N, P, K en la parte aérea de las plantas cuando la enmienda fue añadida al suelo. Además, la solubilización del fosfato de roca (RP), durante el proceso de fermentación, se reflejó en una mayor concentración de P en parte aérea de las plantas tratadas con SB+RP. Los resultados de crecimiento indican que existe una interacción positiva entre la micorriza inoculada y la enmienda aplicada, de manera que aquellas plantas micorrizadas y aplicadas con enmienda alcanzaron los valores máximos de biomasa de parte aérea y raíz.

Centrándonos en los valores de micorrización, cabe destacar, en suelo contaminado con Cd, el efecto positivo de la adición del fermentado suplementado o no con fosfato de roca sobre la colonización de la raíz por el hongo MA. A pesar de que las plantas

micorrizadas en suelos sin enmienda mostraron altos porcentajes de frecuencia de colonización (tinción con azul tripán y tinción vital), la intensidad de micelio intraradical y arbusculos es significativamente mayor en las plantas micorrizadas en suelos con enmienda. La adición de la enmienda parece ser crucial para el establecimiento de la simbiosis micorrícica y ello explicaría el mayor crecimiento de estas plantas. Similarmente, en el ensayo del suelo contaminado con Zn, tanto la frecuencia, como la intensidad de colonización y de arbusculos se incrementó por la adición de SB al suelo. Otros autores como (Muthukumar & Udaiyan, 2000) artículo Zn) también encontraron que plantas que crecieron en suelos con enmiendas orgánicas mostraron mayores porcentajes de colonización que las plantas que crecieron en sistemas de cultivo convencionales con aplicación de fertilizantes. Sin embargo, en este mismo ensayo, la adición de SB suplementado con fosfato de roca (SB+RP) al suelo disminuyó todos los parámetros de colonización MA en raíz. Este hecho se debió probablemente a la alta concentración de P en suelo, derivada de la solubilización de RP durante el proceso de fermentación, ya que altos niveles de fósforo soluble pueden tener un efecto negativo sobre la colonización de los hongos MA (Schwab *et al.*, 1991). No obstante, a pesar del menor nivel de colonización con respecto a los otros tratamientos micorrizados, tanto el crecimiento como la concentración de P en parte aérea de las plantas micorrizadas en suelo con SB+RP fue mayor que el de las no micorrizadas; esto pudo deberse a una mayor eficiencia de la colonización, o a un posible mayor desarrollo del micelio extraradical.

Así, tanto la colonización de las plantas por el hongo MA y/o la adición de la enmienda agrícola fermentada se traduce en un incremento en la nutrición de la planta, una mejora del crecimiento de esta y consecuentemente una mayor tolerancia frente a los excesos de metales pesados. Ello posiblemente originado al disminuir la concentración de estos en parte aérea, especialmente cuando ambos inoculantes están presentes en el sistema. Diferentes autores como (Schüepp *et al.*, 1987; Heggo *et al.*, 1990) han demostrado la capacidad de la micorriza para reducir la captación por la planta de elementos traza en exceso como Zn, Cd y Mn. Autores como (Brown & Wilkins, 1985; Dehn & Schuepp, 1989) artículo de Shetty *et al.*, 1993 en environmental pollution) sugirieron que el metal pesado era retenido en la pared celular de la hifa conectadas a raíces evitándose, por tanto, su translocación a la parte aérea. Más recientemente, (Joner & Leyval, 2001) sugirieron que esta disminución en la transferencia de metales pesados, como Zn y Cd, desde la hifa extraradical de los hongos micorrícicos arbusculares a la planta podía ser debida a la formación de complejos de polifosfatos con los metales. Los polifosfatos son sustancias altamente abundantes en las hifas de estos hongos. Contrariamente, otros autores como (Killham & Firestone, 1983; Weissenhorn *et al.*, 1995a) en Joner y Leyval Biol Fertil Soils 2001)) han demostrado un incremento en el contenido de metales pesados en plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas. Aparentemente factores

como el pH (El-kherbawy *et al.*, 1989), la concentración inicial en suelo del metal pesado (Heggo *et al.*, 1990) y la compatibilidad entre los dos simbiontes (Denny & Wilkins, 1987) (artículo de Shetty *et al.*, 1993 en *environmental pollution* pueden influir en la capacidad del hongo MA para disminuir la toxicidad del metal pesado en planta.

Así mismo, estudios realizados con enmiendas orgánicas con fines de biorremediación han demostrado la capacidad de estas para inmovilizar metales pesados (Karaca, 2004) (Aksu & İsoğlu, İ, 2005)). Los datos de los ensayos realizados "in vitro" en los que se incubaron las enmiendas, tanto fermentadas como no fermentadas, en soluciones acuosas que contenían metales pesados, muestran la capacidad de retención de Cd y Zn por parte de dichas enmiendas, especialmente del residuo de azúcar de remolacha sin fermentar. El fermentado, disminuyó la concentración de Zn en solución en un 20% y la de Cd en un 50%. La materia orgánica afecta la capacidad de cambio cationico y también es capaz de formar complejos estables con los metales pesados (Krosgtad, 1983); estudios de (Dronnet *et al.*, 1997; Gerente *et al.*, 2000), demostraron que la capacidad de la pulpa del residuo de azúcar de remolacha para secuestrar metales se debía a los grupos carboxílicos del ácido galacturónico y de las sustancias pépticas presentes en su composición. Esto podría explicar la mayor capacidad del SB sin fermentar para inmovilizar Cd y Zn, ya que tras la fermentación hay una biotransformación parcial del material de partida.

Sin embargo, a pesar de la capacidad de inmovilizar los metales pesados tanto de la enmienda como del hongo micorrízico arbuscular y de que la concentración de estos en parte aérea fue menor, la captación total de ambos metales se incrementó tanto por la inoculación con los hongos MA como por la adición de la enmienda agrícola concomitantemente con la biomasa vegetal. (Joner & Leyval, 2001), indicaron que la captación de metal pesado en plantas micorrizadas depende de la densidad de la raíz. Si esta es baja, la captación del metal por parte de la planta será menor, ya que la planta será más dependiente de la simbiosis micorrízica. En ambos ensayos (Cd y Zn), el incremento en el crecimiento de la planta (como consecuencia de la micorrización y de la adición de la enmienda) conllevó a un incremento en la captación por parte de la raíz del metal pesado (Cd, Zn); los datos de concentración de ambos metales pesados en suelo, corroboran este hecho. Es obvio que las interacciones planta/hongo a nivel de nutrición de P y otros aspectos fisiológicos deben tenerse en cuenta en los estudios de biorremediación. Como consecuencia de una mejora en la nutrición y el crecimiento de las plantas hay una dilución del metal pesado en los tejidos de la planta, incluso en situaciones donde la captación del metal pesado se incrementa substancialmente (El-kherbawy *et al.*, 1989).

La determinación de las actividades enzimáticas en suelo cobra especial importancia como índice de calidad en estrategias de biorremediación, ya que confieren información

sobre de las propiedades biológicas del suelo, y sirven como indicadores de recuperación/remediación de estos (Dick & Tabatabai, 1993a). En ambos ensayos (Zn y Cd), hubo un incremento de las actividades deshidrogenasa, β -glucosidasa y fosfatasa por la adición de la enmienda. La micorrización también incrementó los valores de las actividades enzimáticas pero no de una forma tan pronunciada ni en todos los tratamientos. El incremento de las actividades enzimáticas implica un incremento en la disponibilidad de nutrientes para la planta lo que se traduce en una mejora de la fertilidad del suelo (García *et al.*, 1997). La deshidrogenasa es un cofactor enzimático (Nannipieri *et al.*, 1990) y su actividad representa la transferencia de energía en la cadena respiratoria. Por ello, el incremento de la actividad deshidrogenasa en suelo por la adición de la enmienda es un índice del incremento de la actividad microbiana del mismo (Nannipieri, 1994). La actividad de la enzima hidrolítica β -glucosidasa, implicada en la transformación de los carbohidratos, es prácticamente nula en los tratamientos en donde no se había aplicado enmienda. La adición de SB (suplementado o no con RP) incrementó esta actividad, lo que supone una mayor fuente de energía para los microorganismos rizosféricos. Del mismo modo, la actividad fosfatasa, implicada en el ciclo del P en el suelo, también se incrementó por la adición de la enmienda. Estos resultados coinciden con lo obtenidos por (Speir & Ross, 1978) y (Joner & Jakobsen, 1995) que encontraron que la actividad fosfatasa se incrementa por la presencia de materia orgánica y de compuestos de P en forma orgánica; además, (Speir & Ross, 1978) mostraron que la materia orgánica incrementa la persistencia de las fosfatasas extracelulares. En el ensayo de biorremediación de suelos contaminados por Zn, existe una correlación entre los valores más bajos de micorrización y los valores más bajos de actividad fosfatasa. Como ya indicamos, en este tratamiento (SB+RP+M), la captación de P por la planta fue muy elevada, debido a la solubilización de RP. Estos resultados sugieren que la actividad fosfatasa funciona como un mecanismo alternativo para incrementar el contenido de fósforo en las plantas (Azcón & Barea, 1997). En la literatura se han encontrado resultados contradictorios sobre la influencia de los hongos MA sobre la actividad fosfatasa (Azcón *et al.*, 1982; Dodd *et al.*, 1987; Rao & Tarafdar, 1993). (Joner & Jakobsen, 1995) sugirieron que estas variaciones se podían deber a las diferentes combinaciones entre huésped y endofito. En el ensayo del suelo contaminado con Cd, la actividad fosfatasa se incrementó tanto por la adición de la enmienda como por la micorrización. Se sabe que el micelio extraradical de los hongos MA produce fosfatasa (Tarafdar & Marschner, 1994). Aunque en este ensayo no estimó la longitud del micelio extraradical, la materia orgánica pudo incrementar el desarrollo del micelio extraradical (St John *et al.*, 1983) y ello se puede traducir en un incremento de la actividad fosfatasa del hongo. Otra explicación podría ser que la modificación de los exudados de la raíz por la micorrización conlleve un incremento en la producción de fosfatasas por parte de esta (Dodd *et al.*, 1987; Joner & Jakobsen, 1995).

La auxina, ácido indol acético (AIA), es un regulador del crecimiento de las plantas. Hay distintos factores que pueden influir sobre el crecimiento de microorganismos productores de AIA y por tanto sobre la concentración de esta auxina en suelo. Por ello, la determinación de AIA en suelo puede utilizarse como índice de la actividad biológica de este (Wöhler, 1997). La adición de SB biotransformado al suelo contaminado con Cd, incrementó este valor aunque no hubo diferencias significativas entre los tratamientos micorrizados. Además, en plantas micorrizadas no hubo una relación directa entre el incremento de la producción de AIA y el mayor desarrollo de las plantas micorrizadas. AIA es importante para el crecimiento de las plantas, pero los resultados obtenidos en este ensayo demuestran que otros factores como la nutrición y/o la tolerancia a metales pesados (mediada por los hongos MA) juegan un papel decisivo para el crecimiento de la planta en condiciones de estrés abiótico.

La calidad y productividad del suelo se puede mejorar por la adición de las enmiendas orgánicas (Roldán *et al.*, 1996). Muchos estudios, tanto en campo como en invernadero, han mostrado el papel importante que juega la materia orgánica en la formación y estabilización de los agregados del suelo. (Bearden & Petersen, 2000), sugirieron que los polisacáridos son los principales responsables en mejorar la estructura del suelo y (Lynch & Bragg, 1985) constataron la importancia de los microorganismos en la mejora de las propiedades físicas del suelo. Los microorganismos participan de una forma mecánica (mediante la unión por las hifas) o a través de la secreción de polisacáridos al medio en la formación de agregados (Reinersten *et al.*, 1984). Por otro lado, la simbiosis MA también influye sobre esta propiedad física del suelo (Bearden & Petersen, 2000). Los resultados del ensayo de biorremediación de suelos contaminados con Zn, han demostrado el incremento en la estabilidad de agregados en los tratamientos en los que la enmienda se añadió al suelo, sin embargo no se apreció ningún efecto adicional de la micorrización. (Barea *et al.*, 2005), encontró que el efecto de los hongos MA sobre la estabilidad de agregados, no se evidenció hasta los tres años del establecimiento de las plantas. La duración de este ensayo de biorremediación fue de 4 meses por lo que probablemente el efecto de la micorriza en la estabilidad de agregados no se llegó a evidenciar. No obstante, la población microbiana que se desarrolló tras la aplicación de la enmienda, pudo ser la responsable del incremento en la formación de agregados en esos tratamientos.

La adición del alpeorujó (DOC) al suelo contaminado por Cd implicó una disminución del Cd disponible en suelo. Esta disminución de Cd extraíble por EDTA se reflejó en el ensayo realizado con trébol. En el suelo en donde se añadió la enmienda el contenido de Cd fue mayor. Esto indica que a pesar del mayor crecimiento de las plantas en suelo con DOC la captación de Cd por parte de estas fue menor, debido, probablemente a una inmovilización de este metal pesado por parte de la enmienda. El

mayor crecimiento de la planta tanto en suelos contaminados por Cd como en suelos no contaminados se alcanzó cuando la enmienda se añadió junto con la micorriza. En ensayos anteriores, ya hemos comprobado el papel esencial que juega la micorrización para proporcionar tolerancia a la planta frente a la contaminación por Cd; además, los datos de micorrización no reflejaron una disminución de la colonización debida a la presencia de Cd en suelo. Por otro lado, los datos de nutrición indican un incremento de N, P, K en planta tanto por la micorrización como por la aplicación de la enmienda. Todos estos factores parecen contribuir al mayor crecimiento de las plantas micorrizadas en presencia de DOC. Sin embargo, al contrario de los resultados obtenidos con SB, el alperujo no parece incrementar el desarrollo del micelio intra o extraradical del hongo MA, según reflejan los datos de micorrización y de micelio extraradical en suelo rizosférico. No obstante, los máximos valores de crecimiento y nutrición, tanto en suelos contaminados por Cd como en suelos no contaminados, se alcanzaron cuando ambos, micorriza y DOC estuvieron presentes en el sistema. Como ya hemos indicado, la mineralización de DOC por *A.niger* en el proceso de fermentación es menor que en el caso de SB, debido a su composición más elevada en lignina. Por ello, su incorporación al sistema suelo-planta supone un incremento en la disponibilidad de nutrientes en suelo, pero no tan pronunciado como en el caso del SB. En este sentido, la presencia de la micorriza sigue siendo importante para la nutrición de la planta, y su papel se potencia en presencia de DOC, al constituir un aporte de materia orgánica.

V. 4. Conclusiones

1. Los hongos MA adaptados a metales pesados (Cd y Zn) mejoraron el crecimiento de *Trifolium repens*. Este efecto se potenció cuando estas plantas crecieron en suelos adicionados de la enmienda del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger*.
2. La concentración de metales pesados (Cd, Zn) en parte aérea de *Trifolium repens* disminuyó por la micorrización y por la aplicación de la enmienda del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger*.
3. La concentración de P en parte aérea de *Trifolium repens* incrementó con la micorrización, especialmente en presencia de la enmienda del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger* y suplementado con fosfato de roca.
4. La micorrización incrementó el contenido de N y K en parte aérea de *Trifolium repens*, especialmente en plantas que crecieron en suelos con la enmienda del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger* y suplementado con fosfato de roca.
5. La adición de la enmienda del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger*, incrementó las actividades enzimáticas de suelos contaminados con metales pesados (Cd y Zn).
6. El porcentaje de agregados estables en suelo contaminado con Zn se incrementó por la adición de la enmienda.
7. La adición de la enmienda a un suelo contaminado con Cd incrementó la capacidad de producción de ácido indol acético por parte de los microorganismos del suelo.

**VI. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE
INOCULANTES MICROBIANOS Y RESIDUOS
AGROINDUSTRIALES BIOTRANSFORMADOS EN
SISTEMAS COMPARTIMENTADOS**

VI. 1. Introducción

1. LA COMUNIDAD MICROBIANA EN EL SUELO

La comunidad microbiana en el suelo está compuestas por bacterias, actinomicetos, hongos, microalgas y protozoos. Funcionalmente, los microorganismos se clasifican según la forma en que la que obtienen carbono y energía para mantener su metabolismo y para el crecimiento y reproducción (Meeting, 1992)

En relación con el desarrollo de la planta, algunos microorganismos son patógenos de plantas y le causan daño y otros son beneficiosos contribuyendo al suministro nutrientes para la planta o siendo antagonistas de microorganismos patógenos para las mismas. Un grupo mayoritario de microorganismos son capaces de descomponer la materia orgánica dejando disponibles nutrientes inorgánicos para las plantas.

La comunidad microbiana en el suelo se puede dividir en grupos según ocupen una zona determinada, como por ejemplo la rizosfera. La definición más simple de rizosfera es el “volumen de suelo influenciado por la raíz” (Lynch, 1990a). El efecto rizosférico consiste en el incremento del crecimiento microbiano y la densidad de poblaciones motivado por un aumento del carbono soluble y de nutrientes en esta zona en comparación con el existetnte en el suelo no afectado por las raíces (Bolton, 1992). La rizosfera se puede dividir en fracciones como : endorizosfera, que es la zona ocupada por las células corticales y epidérmicas de la raíz, la rizoplana (superficie de la raíz) y ectorizosfera que es el suelo adherido a la raíz y que está influenciado por ella. Un término relacionado es “micorrizosfera” que se refiere a la rizosfera de las plantas colonizadas por las micorrizas (Linderman, 1988a).

En esta tesis el término rizosfera se referirá al volumen de suelo influenciado por la raíz tanto de plantas micorrizadas como no micorrizadas y el término “hifosfera” al volumen de suelo afectado por la presencia del micelio externo de los hongos MA, pero no por las raíces.

2. EL MICELIO EXTRARADICAL DE LOS HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES

Mientras que las diferentes estructuras fúngicas intrarradicales se han estudiado ampliamente, y hay numerosos trabajos que las han descrito en detalle (Bonfante-Fasolo, 1984; Smith & Smith, 1997; Bonfante & Bianciotto, 1995), hasta hace unos años se conocía muy poco sobre el desarrollo, morfogénesis y arquitectura de las hifas extraradicales de las MA. Sin embargo, estas constituyen una parte fundamental de la simbiosis MA, tanto en lo que respecta a los procesos nutricionales como ecológicos en cuanto a su relación con el entorno.

Hay diferentes estudios que se han centrado en la descripción de las características morfológicas y fisiológicas más relevantes del micelio extraradical. Estos estudios, realizados por lo general en condiciones controladas de invernadero, han puesto de manifiesto que por cada metro de raíz colonizada se producen entre 7 y 250 m de hifas externas de hongos MA, dependiendo de la especie de hongo implicada y de las condiciones de crecimiento (Smith & Read, 1997b). De igual manera, el micelio extraradical ha demostrado ser capaz de captar muy eficazmente nutrientes (Gianinazzi-Pearson & Azcon-Aguilar, 1991; Smith & Read, 1997b; George *et al.*, 1995) en especial el fósforo (Jakobsen, 1995), nitrógeno (Tobar *et al.*, 1994a) y algunos micronutrientes esenciales para la planta (George *et al.*, 1995). Asimismo, la morfología y arquitectura de las hifas externas han sido objeto de diversos estudios, entre los cuales el de (Friese & Allen, 1991) es el más completo y detallado.

3. INTERACCIONES ENTRE LOS HONGOS MA Y OTROS MICROORGANISMOS DEL SUELO

Cambios abióticos en el medio ambiente, causados por la micorriza al ser captadora de nutrientes y agua y un agente agregante de suelo, pueden ser factores que afecten la comunidad microbiana circundante. El efecto de los hongos MA sobre los microorganismos del suelo, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, varía tanto en función de las especies micorrícicas como del aislado involucrado (Azcón-Aguilar & Barea, 1996). Los hongos MA consumen algunos de los compuestos secretados por las raíces de las plantas y secretan otros que pueden servir como fuente de nutrientes para los microorganismos circundantes (Linderman, 1994). Por ello hay evidencias de que la colonización micorrícica afecta las poblaciones microbianas en la zona de la raíz (Secilia & Bagyaraj, 1987). Por otro lado, algunas rizobacterias pueden tener un impacto positivo sobre los hongos MA y ser beneficiosas para su desarrollo, como por ejemplo las rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta, incluyendo las bacterias fijadoras de nitrógeno, mientras que otras pueden ser antagonistas o patógenas resultando perjudiciales para los hongos MA.

Los hongos MA pueden regular la microbiota del microhabitat circundante por una serie de mecanismos:

Los hongos MA cambian los exudados de la raíz de la planta. Este cambio altera la comunidad microbiana en la rizosfera.

Los hongos MA pueden alterar la morfología y/o arquitectura de las raíces de las plantas colonizadas. Esto influencia las condiciones ambientales para otros microorganismos.

Los hongos MA mejoran el estado nutricional de la planta y esto influye en las interacciones entre la planta y la comunidad microbiana del entorno.

Los hongos MA pueden activar o inducir mecanismos de defensa de la planta lo que la hace más resistente frente a patógenos del suelo.

Los hongos MA pueden influir sobre otros microorganismos directamente mediante competición por nutrientes inorgánicos o por antibiosis o incluso alterando las propiedades físico-químicas del microhabitat.

El efecto de los hongos MA sobre otros microorganismos rizosféricos puede ser una combinación de los mecanismos descritos anteriormente.

El efecto de los microorganismos nativos sobre las estructuras de los hongos MA varía dependiendo de las comunidades microbianas examinadas. El crecimiento de las hifas germinantes de las esporas pueden también ser estimuladas (Azcon-Aguilar *et al.*, 1986) o inhibidas (Mc Allister *et al.*, 1994) por la presencia de otros microorganismos rizosféricos. Bacterias rizosféricas como *Enterobacter* pueden estimular el desarrollo saprofitico de *Glomus mosseae*, provocando un mayor crecimiento del micelio. Similarmente, se han descrito estimulación (Azcon-Aguilar & Barea, 1985) o inhibición (Hetrick *et al.*, 1988) de la colonización de las raíces de las plantas por los hongos MA por microorganismos rizosféricos.

Estos resultados muestran que las comunidades nativas de los microorganismos del suelo pueden tener efectos marcados en el desarrollo funcional de los hongos MA en suelo, y pese a la constancia de esta clara tendencia en los resultados se requieren más estudios sobre los mecanismos involucrados en estos efectos. El progreso metodológico del cultivo "in vitro" podrá dar respuesta a este y otros aspectos transcendentales.

4. CULTIVOS MONOXÉNICOS

Aunque definitivamente el suelo es el sustrato más natural y adecuado para llevar a cabo los ensayos acerca de las actividades de los hongos MA, la dificultad y complejidad de controlar sus cualidades físicas y químicas y su actividad biológica dificulta, en ocasiones, la interpretación de los resultados obtenidos. De igual manera, el estudio de la morfología y arquitectura de las hifas extraradicales se complica en este medio ya que las partículas de suelo dificultan la visualización de las estructuras fúngicas más finas. El desarrollo en la última década de un sistema de cultivo que permite el crecimiento *in vitro* en medios gelificados del hongo MA en simbiosis con una raíz hospedadora, ha contribuido de manera importante al estudio de la fisiología y la arquitectura del micelio extraradical de los Glomales y al conocimiento de factores que actúan, de forma directa, inhibiendo o potenciando su desarrollo.

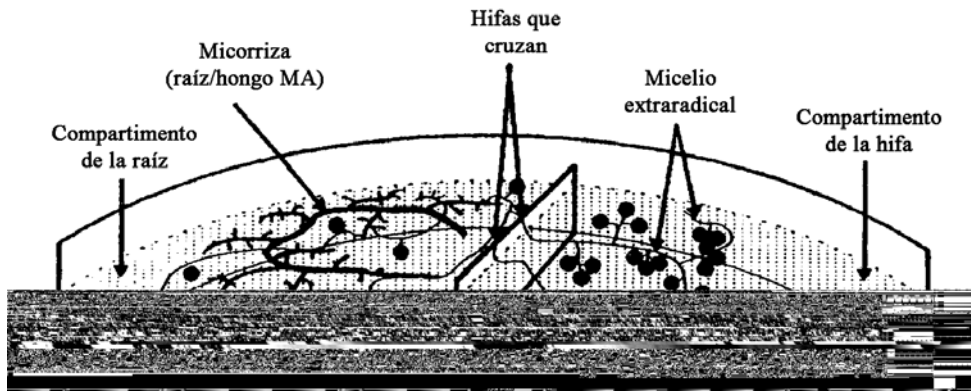


Figura 1: esquema de las placas bicompartimentadas que permiten el cultivo monoxénicos de los hongos MA (Bago *et al.*, 1996).

Uno de los hechos limitantes que condicionan el estudio de los hongos MA es que estos organismos no son capaces de completar su ciclo de vida en ausencia de una raíz hospedadora, es decir en condiciones axénicas (Azcon-Aguilar *et al.*, 1991; Azcon-Aguilar *et al.*, 1998). Ninguno de los medios de cultivo comúnmente utilizados en el laboratorio para el crecimiento de microorganismos parece cubrir las necesidades básicas de los hongos MA, que permitan su desarrollo y reproducción. Ello ha llevado a considerarlos como simbiontes obligados (Azcon-Aguilar *et al.*, 1991; Azcon-Aguilar *et al.*, 1998). Tras esta constatación, los siguientes pasos consistieron en intentos para llevar a cabo cultivos duales en medios gelificados, es decir, cultivos en los que, además del hongo, esté presente la raíz de una planta hospedadora: es lo que se denomina cultivos monoxénicos (dos organismos en cultivo puro) (Williams, 1992; Azcon-Aguilar *et al.*, 1998). Los primeros intentos de cultivar monoxénicamente hongos MA y raíces hospedadoras se llevaron a cabo por (Mosse & Hepper, 1975) con éxito desigual. Ello llevó, algunos años después, a la conclusión de que sólo en presencia de bacterias coadyuvantes del suelo (*Pseudomonas* spp) dicho cultivo sería posible (i.e., sería un cultivo dixénico, con tres organismos implicados) (Mosse, 1962).

Tras estos resultados, la obtención de cultivos monoxénicos de MA cayó en el olvido hasta 1988, año en el que Guillaume Becard y André Fortin retomaron el reto. Estos autores, formularon un medio de cultivo (el llamado "medio mínimo" o "M") en condiciones axénicas en el que el hongo MA *Gigaspora margarita* era capaz de completar su ciclo vital estableciendo simbiosis con raíces de zanahorias (*Daucus carota* L) transformadas con el plásmido Ri T de *Agrobacterium rhizogenes* (Becard & Fortin, 1998). A partir de este informe se han establecido, con éxito, cultivos monoxénicos entre distintos hongos MA y raíces hospedadoras. Más recientemente, se dio un avance cuando Marc St. Arnaud y colaboradores (St Arnaud. *et al.*, 1996) establecieron un cultivo monoxénico en

placas petri de dos compartimentos. En uno de los compartimentos se establecía el cultivo monoxénico propiamente dicho (compartimento de la raíz, CR, donde crecían ambos organismos (hongo raíz) mientras que en el otro (el compartimento exclusivo del crecimiento de las hifas, CH) sólo se añadía el medio de cultivo. Tras cuatro o seis semanas, el hongo MA había establecido la simbiosis y crecido profusamente dentro y fuera de las raíces desarrolladas en el CR, y sus hifas eran capaces de saltar sobre la barrera de plástico que separa el CR del CH, para desarrollarse extensamente en el medio de cultivo del CH (Figura 1). Con ello se conseguía la separación física de la planta y el hongo (aunque éste siempre permanece “conectado” a la raíz hospedadora), lo que ha permitido el estudio de la morfología y metabolismo del hongo MA en un medio no influenciado directamente por la raíz hospedadora.

3. 5. INFLUENCIA DE LA MATERIA ORGÁNICA SOBRE LOS HONGOS MA

Se ha comprobado que en suelos sometidos a sistemas de cultivo convencionales se reduce el grado de micorrización de las raíces de las plantas lo que no ocurre en suelos sin cultivar. (Kabir *et al.*, 1998), sugirió que el efecto favorable de los suelos naturales sin cultivar sobre la proliferación de los hongos MA podría deberse a su mayor contenido en materia orgánica, un 48% mayor que en el suelo cultivado convencionalmente. Así mismo, se han observado efectos negativos de la manipulación del suelo sobre la esporulación de los hongos MA (Douds *et al.*, 1993) y sobre la densidad de las hifas (McGonigle & Miller, 1996).

La aplicación de materia orgánica a los cultivos en suelos tropicales estimuló la colonización MA y el número de clamidiosporas además de incrementar el crecimiento de las plantas (Muthukumar & Udaiyan, 2000). Sin embargo, la calidad y el tipo de enmiendas orgánicas, incluidos residuos vegetales y animales tiene un efecto variable sobre el desarrollo de los hongos MA (Baby & Manibhushanrao, 1996) (Borie *et al.*, 2002). El suministro de carbono por la planta huésped es la fuerza primaria que desencadena el crecimiento intra y extraradical del hongo MA (Jakobsen & Rosendahl, 1990). Sin embargo la presencia de materia orgánica se han relacionado con los estimulantes de la germinación de clamidiesporas y del crecimiento de la hifa externa en la micosfera (Kabir *et al.*, 1998), aunque con resultados diferentes dependiendo de la calidad y tipo de la materia orgánica (Joner & Jakobsen, 1995; Ravnskov *et al.*, 1999; Hodge *et al.*, 2001). Pero, todavía no está claro si el efecto estimulante de la materia orgánica sobre el hongo MA es directo o indirecto (Green *et al.*, 1999). Un mecanismo directo contradiría la aceptación de que el hongo MA es un simbiote obligado, ya que ello supondría que el micelio externo del hongo sería capaz de mineralizar la materia orgánica para utilizarla como una fuente de carbono secundaria. (St John *et al.*, 1983) logró la proliferación de la hifa MA en materia orgánica esterilizada, sin embargo, cuando se aplicó un filtrado de la

misma que contenía microorganismos, se observó una inhibición del micelio. (Hepper & Warner, 1983), demostraron que el hongo MA posee potencialidad para crecer saprofitamente en materia orgánica. El mecanismo indirecto por el que la materia orgánica provoca la estimulación del micelio MA podría ser debido a la activación de microorganismos que descomponen la materia orgánica y que producen productos de mineralización secundaria que pueden estimular el crecimiento de las hifas externas. (Ravnskov *et al.*, 1999), observaron que podría haber un efecto diferente sobre el crecimiento de las hifas externas dependiendo de los microorganismos que podría llegar incluso a un nivel de cepa).

Todavía no está claro cuales son los mecanismos mediante los cuales la materia orgánica afecta el desarrollo del micelio externo de los hongos MA. No obstante, la interacción de los hongos MA con microorganismos del suelo podría estar implicada en tal efecto. Otro posible mecanismo indirecto de la materia orgánica sobre el desarrollo del micelio MA podría ser mediante la estimulación de otros microorganismos del suelo. Por ello, es interesante profundizar sobre el papel que juegan los microorganismos saprófitos en esta interacción.

Por otro lado, en 1979 Hepper(Hepper, 1979) observó que el crecimiento de la hifa a partir de esporas germinadas en agar se incrementó en respuesta a levadura o peptona; más tarde, en 1983, (Hepper & Jakobsen, 1983) demostraron el efecto estimulante de aminoácidos específicos. El requerimiento de compuestos nitrogenados de la hifa del hongo MA en simbiosis con la raíz de la planta puede ser bastante diferente del de la hifa creciendo saprofitamente a partir de esporas. Pero posteriormente se ha comprobado que la hifa externa puede tomar amonio y nitrato (Johansen *et al.*, 1994; Bago *et al.*, 1996) y también aminoácidos (Johansen *et al.*, xxx)

VI. 2. Parte experimental

1. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA (FERMENTADO CON *A. NIGER* O SIN FERMENTAR) SOBRE EL DESARROLLO Y ACTIVIDAD DEL MICELIO EXTRARADICAL DEL HONGO MA Y SOBRE LA BIOMASA DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS EN SUELO DE LA HIFOSFERA.

1.1. Objetivo.

Examinar la influencia del residuo de azúcar de remolacha sin fermentar o fermentado con *A. niger* en medio suplementado con RP, sobre:

1. El crecimiento y actividad del micelio extraradical del hongo MA
2. Las poblaciones microbianas del suelo

1.2. Diseño experimentales

Para desarrollar los objetivos planeados fue necesario utilizar un sistema experimental con un diseño tal que permitiera el crecimiento del micelio extraradical separadamente del de la raíz micorrizada. Para ello, las plantas micorrizadas y no micorrizadas se cultivaron en contenedores compartimentadas de PVC (4.5 cm de diámetro interno). Cada contenedor estaba dividido en varios compartimentos separados por mallas adecuadas pero con interconexión. El contenedor estaba compuesto de un compartimento central (RC) de 32.5 cm de largo donde crece la planta (con o sin micorriza) y se desarrolla su raíz y dos compartimentos laterales, denominados compartimentos de la hifa (CH-A [Izquierda] y CH-B [derecha]) de 7 cm de largo, separados del RC por una malla de 37 μm que impide la penetración de la raíz pero que permite el crecimiento del micelio (figura 1). El compartimento donde se desarrollaba la raíz se selló en el fondo con una malla gruesa de nylon, para permitir el drenaje del agua. El suelo de uno de los compartimentos laterales (CH-B) de cada contenedor se mezcló con residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger* (SBA) o sin fermentar (SB) en una proporción de 50 mg g⁻¹ de suelo, y se añadió, como marcador isotópico, H₃³²PO₄ (2.44 kBq g⁻¹ de suelo). El suelo del otro compartimento de la hifa (CH-A) se mezcló con H₃³³PO₄ (3.37 kBq g⁻¹ de suelo) y no recibió ninguna enmienda. Los isotopos (³²P al CH-B y ³³P CH-A) se añadieron como solución y sin transportador.

Los principales tratamientos [-/+ AM (en RC) x 2 tipos de enmiendas (SBA y SB) en CH-B] tenían 5 repeticiones lo que supuso un total de 20 unidades experimentales (figura 1 a). Además, se incluyeron 5 macetas micorrizadas sin enmienda en ninguno de los dos compartimentos laterales como controles del transporte de P (figura 1 b).

La preparación del residuo de azúcar de remolacha fermentado, se realizó siguiendo la metodología descrita en el capítulo de materiales y métodos.

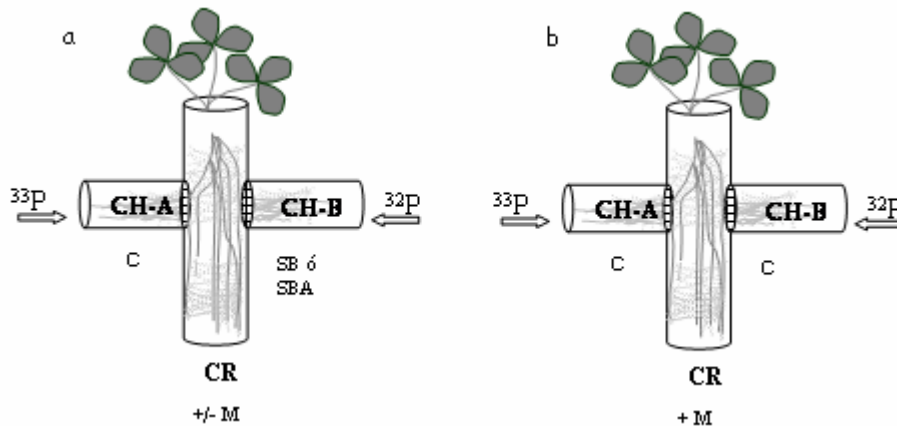


Figura 1: esquema del contenedor compartimentado, con el compartimento de desarrollo de la raíz (CR) y dos compartimentos laterales de desarrollo de las hifas (CH-A y CH-B) separados por una malla de $37\ \mu\text{m}$ del RC. El compartimento CH-B estaba enmendado con SB ó SBA y el CH-A permaneció sin enmienda. La micorriza se añadió al CR cuando correspondió (a). Adicionalmente se prepararon cinco contenedores micorrizados en los que ambos compartimentos laterales no llevaban enmienda (b). Las flechas indican la aplicación de los isótopos radiactivos (^{32}P ó ^{33}P).

1.3. Características del suelo e inoculación con los hongos MA.

Se utilizó una mezcla 1:1 (p/p) de arena: suelo, que había sido irradiada (10kGy, 10 MeV de haz electrónico) para eliminar los hongos MA indígenas. Esta mezcla tenía un pH de 6.1 y contenía $8\ \text{mg kg}^{-1}$ de suelo de $0.5\ \text{M}$ de P NaHCO_3^- extractable. Se enriqueció con los siguientes nutrientes con el suelo (mg kg^{-1} de suelo): K_2SO_4 (70), CaCl_2 (70), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.2), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10), $\text{CoSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.33), NaMoO_4 (0.2) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20).

Las plantas micorrizadas se obtuvieron mediante inoculación con una mezcla de tres hongos MA (España), *Glomus intraradices* (EEZ-54), *G. mosseae* (EEZ-55) y *Acaulospora trappei* (EEZ-56).

El compartimento central (CR) se rellenó de 730 g de suelo que se distribuyó en: una capa de 130 g de suelo en el fondo, una capa intermedia de 220 g de suelo y 30 g de inóculo en los tratamientos micorrizados ó 250 g en los tratamientos no micorrizados, y una capa superior de 130 g de suelo. Con el objeto de introducir todos los microorganismos presentes en el suelo excepto los hongos MA, todos los compartimentos

recibieron 10 ml de un filtrado de suelo, obtenido de una suspensión de 30 g de inóculo en 500 ml de H₂O, que había sido previamente filtrado (20 µm de diámetro de poro).

1.4. Planta hospedadora y condiciones de crecimiento.

Se plantaron cinco semillas de *Trifolium repens* L. en cada contenedor (RC) y una vez germinadas se dejaron a 2 plántulas por contenedor. Las plantas crecieron en los contenedores que se mantuvieron en cámaras de cultivo con un fotoperiodo 16/8 horas de luz/oscuridad, con una temperatura de 21/16 °C respectivamente. Las lámparas de luz Osram (HQ1-T 250 W/D), suministraron una radiación activa fotosintéticamente de 500-550 mmol m⁻² s⁻¹. Las plantas se rotaron para minimizar una posible variación y se regaron todos los días por peso, para mantener el 60% de la capacidad de campo.

1.5. Cosecha y análisis.

Las plantas se cosecharon a las 6 semanas de crecimiento. Las raíces se lavaron y se pesaron dos alícuotas, una para la determinación del peso seco de raíz, y la otra para la tinción con azul tripán según el protocolo descrito en el capítulo de materiales y métodos. El porcentaje de raíz colonizada se calculó por medio del método de intersección lineal (Newman, 1966). El resto de las partes de la planta se secaron, pesaron y se procedió a la digestión ácida. El contenido total de N, P, K en parte aérea se determinó según la metodología descrita en el capítulo de materiales y métodos.

3 ml del extracto digerido se mezclaron con 10 ml de líquido de centelleo y ³²P y ³³P se midió utilizando un analizador de líquido de centelleo (Packard Instrument Co., Meriden, CT, USA) por análisis de espectro duales.

Los dos compartimentos laterales (CH) de cada unidad de crecimiento se desmontaron y el suelo se almacenó en el congelador a -18 °C para posteriores análisis de longitud de micelio extraradical y del contenido de ácidos grasos en suelo según los protocolos descritos en el capítulo de materiales y métodos.

1.6. Análisis estadístico de los resultados

Los efectos de los distintos tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en este ensayo fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Las barras en las columnas indican el error estándar.

Se realizó un análisis de varianza multifactorial ANOVA entre los distintos tratamientos a los que se les había aplicado enmienda para las variables determinadas en el ensayo.

Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus (Statistical Graphics Corp., Princenton, NJ).

1.7. Resultados

Los resultados del análisis factorial ANOVA para los parámetros de planta y microorganismos se muestran en las tablas 4 y 5 respectivamente.

Crecimiento y nutrición de la planta y formación micorrícica

La micorrización no influyó en el desarrollo de la parte aérea y raíz de las plantas. En los tratamientos sin micorriza y sin SB el peso seco de parte aérea se redujo en un 35% comparado con el correspondiente tratamiento micorrizado (tabla 1)

En plantas micorrizadas, en el tratamiento con SBA ó SB el porcentaje de la colonización micorrícica se incrementó en un 35% (Tabla 1). Hubo una interacción positiva entre la enmienda aplicada y la micorriza (tabla 5). Las raíces de las plantas que no recibieron inóculo permanecieron sin micorrizar.

La enmienda ASB incrementó el contenido total de N y K en parte aérea independientemente de la inoculación micorrícica (tabla 2). Sin embargo, en la adquisición de P hubo una interacción positiva entre la aplicación de la enmienda y la micorrización (tabla 4). La captación de P incrementó en las plantas MA que alcanzaron el valor máximo con la aplicación de la enmienda SBA en CH-B (tabla 2). El contenido de P en parte aérea fue 272% mayor en las plantas micorrizadas con SBA que en las no micorrizadas con SB (Tabla 2)

Compartimento de raíz (CR)	Compartimento de la hifa					
	CH-A	CH-B	CH-A	CH-B	CH-A	CH-B
	-	-	-	SB	-	SBA
<i>Peso seco parte aérea (mg)</i>						
- AM			334 ± 63		566 ± 23	
+ AM	510 ± 40		428 ± 91		578 ± 74	
<i>Peso seco raíz (mg)</i>						
- AM			133 ± 25		268 ± 10	
+ AM	164 ± 30		149 ± 37		218 ± 26	
<i>Colonización micorrícica (%)</i>						
- AM						
+ AM	49 ± 4		62 ± 2		66 ± 4	

Tabla 1: Peso seco de parte aérea, peso fresco raíz y porcentaje de raíz colonizada por MA de plantas micorrizadas y no micorrizadas influenciada por la aplicación de las enmiendas orgánicas compartimento de la hifa (CH-B) [- (control sin enmienda), SB (residuo de azúcar de remolacha) y SBA (residuo de azúcar de remolacha fermentado con *Aspergillus niger*) al. Los valores representan las medias ($n=5 \pm$ Error estándar).

Compartimento de raíz (CR)	Compartimento de la hifa					
	CH-A	CH-B	CH-A	CH-B	CH-A	CH-B
	-	-	-	SB	-	SBA
<i>Contenido de N (mg)</i>						
- AM			3.06 ± 0.02		5.82 ± 0.28	
+ AM	4.15 ± 1.09		3.82 ± 1.15		5.34 ± 0.29	
<i>Contenido de P (mg)</i>						
- AM			0.72 ± 0.14		1.14 ± 0.04	
+ AM	1.83 ± 0.07		1.37 ± 0.23		2.68 ± 0.21	
<i>Contenido de K (mg)</i>						
- AM			0.67 ± 0.30		1.21 ± 0.07	
+ AM	0.80 ± 0.16		0.82 ± 0.23		1.21 ± 0.05	

Tabla 2: Contenido total (mg) de N, P, K en parte aérea plantas micorrizadas y no micorrizadas influenciada por la aplicación de las enmiendas orgánicas al compartimento de la hifa (CH-B) [C, (control sin enmienda), SB (residuo de azúcar de remolacha) y SBA (residuo de azúcar de remolacha fermentado con *Aspergillus niger*)]. Los valores representan las medias ($n=5 \pm$ Error estándar).

Longitud de hifa MA y el transporte de P

La longitud de la hifa en el CH-A en los contenedores no micorrizados alcanzó una media de 0.58 m g^{-1} de suelo. Este valor se consideró como residual y se restó a los valores obtenidos en los demás tratamientos. Mientras que en los tratamientos micorrizados los valores de la longitud de la hifa en suelo del CH-A eran similares, con una media de 4.3 m g^{-1} de suelo, en el suelo de CH-B la longitud de las hifas extraradicales fue diferente según la enmienda aplicada (SB ó SBA) (figura 2 a). En los tratamientos donde se añadió SB al CH-B no se detectó micelio extraradical de hongo MA. Sin embargo, en los tratamientos micorrizados, la longitud del micelio MA en suelo del CH-B con SBA, fue un 70% mayor que en el suelo de CH-A de los mismos tratamientos. Ello evidencia una interacción positiva entre la enmienda SBA y la micorriza (figure 2 a, tabla 4).

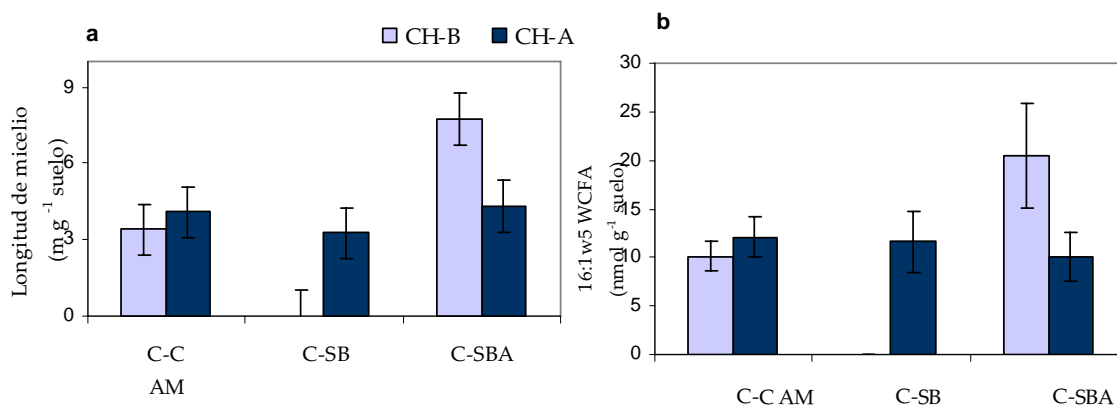


Figura 2: Longitud de micelio (a) y concentración del marcador biológico de WCFA de los hongos MA (16:1w5) (b) en suelo de los compartimentos de la hifa (CH-A y CH-B) influenciados por la inoculación con hongos MA en el compartimento de la raíz y por la aplicación de las enmiendas orgánicas al compartimento de la hifa (CH-B) [C, (control sin enmienda), SB (residuo de azúcar de remolacha) y SBA (residuo de azúcar de remolacha fermentado con *Aspergillus niger*)]. Los valores representan las medias ($n=5 \pm$ Error estándar).

La captación de ^{32}P y ^{33}P aplicados en CH por las plantas no micorrizadas oscilaba entre 0-6.2 kBq. En las plantas micorrizadas, no hubo captación de ^{32}P cuando SB se añadió al suelo de CH-B, mientras que el contenido de ^{32}P en plantas donde el micelio se desarrolló en suelo suplementado con SBA en CH-B, fue de 35 kBq (tabla 3). Se observó una interacción positiva entre la aplicación de la enmienda y la micorriza (tabla 5). El contenido medio de ^{33}P en parte aérea de plantas micorrizadas fue de 25 kBq y no difirió, entre los tratamientos aplicados (SB ó SBA y sin enmiendas) (tabla 3). La captación específica de ^{32}P del micelio desarrollado en CH-B, fue significativamente menor que la captación de ^{33}P del micelio desarrollado en CH-A en los tratamientos con SB y similar en los tratamientos con SBA (Figure 3).

Compartimento de raíz (CR)	Compartimento de la hifa					
	CH-A	CH-B	CH-A	CH-B	CH-A	CH-B
	-	-	-	SB	-	SBA
<i>Contenido de ³³P (kBq)</i>						
- AM			1.44 ± 0.27		2.13 ± 0.73	
+ AM	29.15 ± 1.91		24.38 ± 6.16		28.02 ± 2.44	
<i>Contenido de ³²P (kBq)</i>						
- AM			0.15 ± 0.05		1.38 ± 0.22	
+ AM	30.40 ± 1.43		0.03 ± 0.03		35.18 ± 2.67	

Tabla 3: Contenido de ³³P y ³²P (kBq) en parte aérea influenciados por la inoculación con hongos MA en el compartimento de la raíz y por la aplicación de las enmiendas orgánicas al compartimento de la hifa (CH-B) [C, (control sin enmienda), SB (residuo de azúcar de remolacha) y SBA (residuo de azúcar de remolacha fermentado con *Aspergillus niger*)]. Los valores representan las medias (n=5 ± Error estándar).

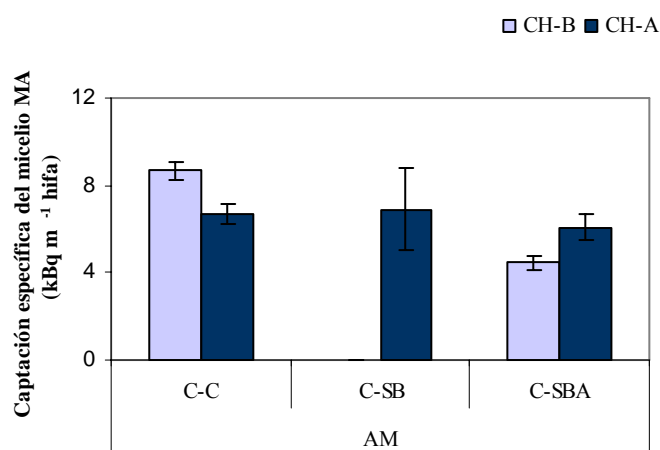


Figura 3: Captación específica de P marcado del micelio MA de *Trifolium repens* influenciados por la aplicación de las enmiendas orgánicas al compartimento de la hifa (CH-B) [C, (control sin enmienda), SB (residuo de azúcar de remolacha) y SBA (residuo de azúcar de remolacha fermentado con *Aspergillus niger*)]. Los valores representan las medias (n=5 ± Error estándar).

Contenido de ácidos grasos totales (WCFA) en los compartimentos laterales (CH-A y CH-B)

La concentración de WCFA 16:1 ω 5 en los tratamientos no micorrizados fue baja (0.018 nmol g⁻¹ de suelo) y no se afectó por ninguno de los tratamientos. Este valor residual se restó a los valores obtenidos en los demás tratamientos. La cantidad de WCFA 16:1 ω 5 en el suelo de CH-A no se afectó por los tratamientos aplicados en el CH-B (figura 2 b). Por el contrario, el valor del marcador biológico WCFA 16:1 ω 5 en CH-B con micorriza, estuvo marcadamente afectado por las dos enmiendas aplicadas. En el CH-B con SB, no se detectó presencia de WCFA 16:1 ω 5, mientras que con SBA la cantidad de WCFA 16:1 ω 5 fue 119% mayor que en el correspondiente CH-A (figure 2 b).

Los marcadores biológicos WCFA de bacterias Gram negativa en el suelo de CH-A, fueron mayores en los tratamientos micorrizados con enmienda en CH-B que en los correspondientes tratamientos sin enmienda (figura 4 a). Los marcadores biológicos WCFA de bacterias Gram negativa fueron un 125% mayor en los suelos con micorriza sin enmienda que en los correspondientes tratamientos sin micorriza (figura 4 a). En el compartimento CH-B, la cantidad de los marcadores biológicos WCFA de las bacterias Gram negativa en suelo con SB fue un 456% mayor que en el suelo con SBA, tanto en los tratamientos micorrizados como en los no micorrizados (figura 4 a). Se observa una interacción significativa entre la enmienda y la micorriza (tabla 4). Los marcadores biológicos WCFA de bacterias Gram negativa en suelo de CH-B con SB fue un 37% menor en los tratamientos con micorriza que en los tratamientos sin micorriza (figura 4 a).

Los valores de los marcadores biológicos WCFA de bacterias Gram positivas en suelo del CH-B se incrementaron por la adición de las enmiendas, hasta un 400% (SB) y un 145% (SBA), en comparación con los controles sin enmienda, con o sin micorriza (figura 4 b).

Los valores del marcador biológico de hongos saprofitos, WCFA 18:2 ω 6,9, en suelo del CH-A fue similar en todos los tratamientos, excepto en los tratamientos sin micorriza a los que se añadió SB al CH-B, que fue 507% mayor que en el resto de los tratamientos de CH-A (figura 4 c). La adición de las enmiendas al CH-B incrementó la cantidad de WCFA 18:2 ω 6,9 en el suelo de CH-A. La colonización micorrícica no tuvo ningún efecto en la cantidad de WCFA 18:2 ω 6,9 en suelo de los CH-B independientemente de las enmiendas (figura 4 c).

El valor del marcador biológico WCFA de *Actinomicetos* (ácidos grasos metilados) en suelo de CH-A fue similar en todos los tratamientos (figura 4 d). La adición de las enmiendas al suelo de CH-B, incrementó el valor de este marcador biológico tanto en los tratamientos micorrizados como en los no micorrizados. (figura 4d). El valor de WCFA de *Actinomicetos* en suelo de CH-B fue similar con la aplicación de SB ó SBA, en ausencia de micorriza figura 4 d). Sin embargo, en el suelo del CH-B de los tratamientos

micorrizados el valor de WCFA de *Actinomicetos* con SB fue un 55% menor que en el del SBA (figura 4 d).

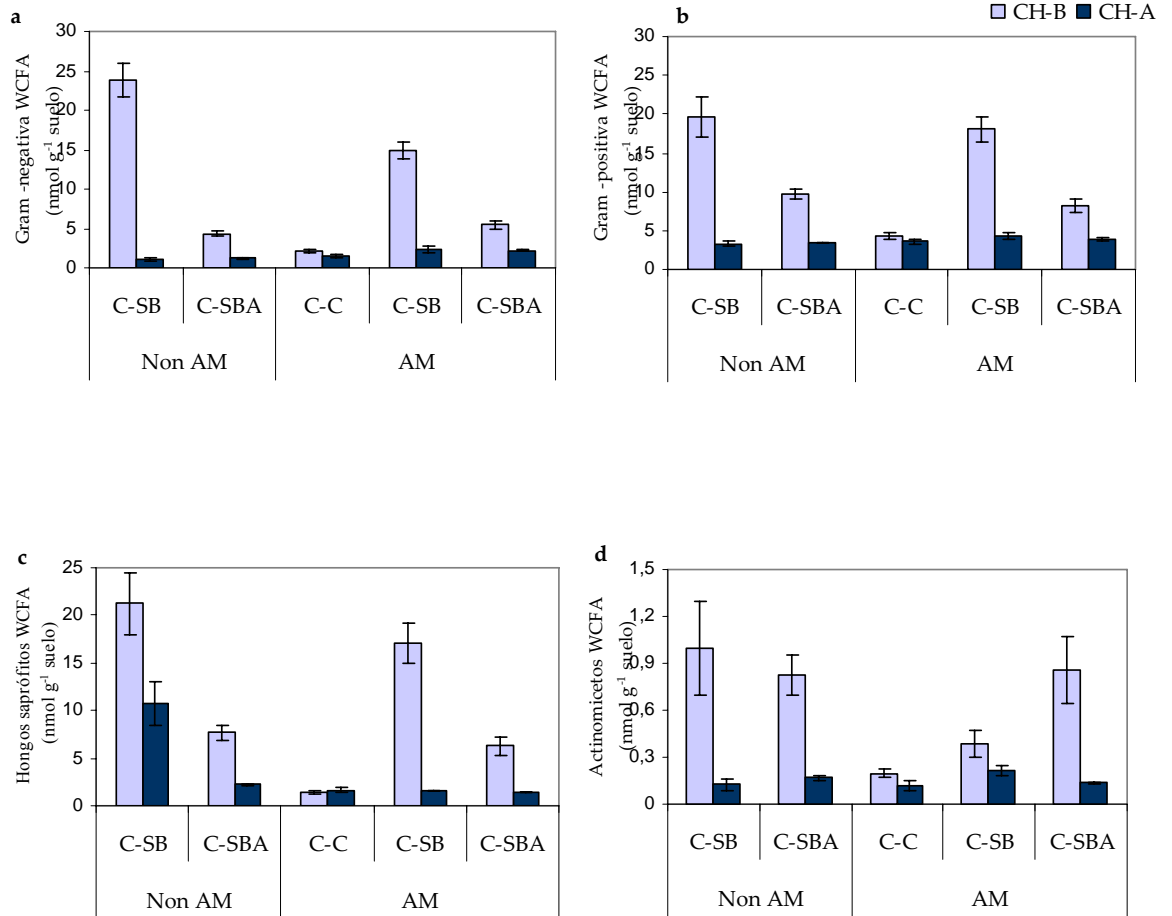


Figura 4: Concentración de los marcadores biológicos WCFA de bacterias Gram negativas (a), Gram positivas (b), hongos saprófitos (c) y actinomicetos (d) influenciados por la inoculación con hongos MA en el compartimento de la raíz y por la aplicación de las enmiendas orgánicas [C, (control sin enmienda), SB (residuo de azúcar de remolacha) y SBA (residuo de azúcar de remolacha fermentado con *Aspergillus niger*)] al compartimento de la hifa (CH). Los valores representan las medias ($n=5 \pm$ Error estándar).

Parametros microbianos		Enmienda(E)	Micorriza (M)	ExM
Gram negativa	CH-B	0.0000 ***	0.0710 (*)	0.0129 *
	CH-A	0.5982 ns	0.0000 ***	0.2405 ns
Gram positiva	CH-B	0.0000 ***	0.6773 ns	0.5757 ns
	CH-A	0.8917 ns	0.0433 *	0.2395 ns
Actinomicetos	CH-B	0.3256 ns	0.0928 (*)	0.0372 *
	CH-A	0.8881 ns	0.9424 ns	0.2925 ns
Hongos saprófitos	CH-B	0.0000 ***	0.1035 (*)	0.3329 ns
	CH-A	0.0013 **	0.0003 ***	0.0005 ***
Hongo MA	CH-B	0.0030 **	0.0000 ***	0.0000 ***
	CH-A	0.4791 ns	0.0000 ***	0.6385 ns
Longitud de hifa	CH-B	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0000 ***
	CH-A	0.8964 ns	0.0000 ***	0.3178 ns
Actividad específica de micelio MA (kBq m ⁻¹ hyphae)	CH-B	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0000 ***
	CH-A	0.6835 ns	0.0000 ***	0.6835 ns

Tabla 4: Analisis de varianza multifactorial de los parámetros microorganismos medidos en los compartimentos de la hifas (CH-A y CH-B), para tres niveles de enmienda (sin nada, residuo de azúcar de remolacha y residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger*) y dos niveles de micorriza (con o sin micorriza).

Parámetros de la planta			
	Enmienda(E)	Micorriza (M)	ExM
Contenido total de P	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0027 ***
³³ P (kBq)	0.7106 ns	0.0000 ***	0.8782 ns
³² P (kBq)	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0000 ***
Contenido total de K	0.0037 ***	0.1115 ns	0.8948 ns
Contenido total de N	0.0083 ***	0.3769 ns	0.3733 ns
Peso seco parte aérea	0.001 ***	0.0473 *	0.3033 ns
Peso seco raíz	0.0015 ***	0.8435 ns	0.3501 ns
Colonización MA	0.0168 *	0.0000 ***	0.0168 *

Tabla 5: Analisis de varianza multifactorial de los parámetros de la planta medidos en los compartimentos de la hifas (CH-A y CH-B), para tres niveles de enmienda (sin nada, residuo de azúcar de remolacha y residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger*) y dos niveles de micorriza (con o sin micorriza).

2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE RESIDUO DE AZÚCAR DE REMOLACHA FERMENTADO CON *A.NIGER* O SIN FERMENTAR SOBRE EL DESARROLLO EXTRARADICAL DEL HONGO MA EN CULTIVO MONOXÉNICO.

2.1. Objetivo.

Estudiar, en condiciones axénicas y por tanto sin la interferencia de factores externos (exudados radicales, microorganismos, propiedades físico-químicas del suelo), la influencia de los extractos acuosos de SB y SBA sobre el desarrollo, actividad, morfología y estructura del micelio extraradical del hongo MA.

2.2. Diseño experimentales

A partir de placas de cultivo monoxénico de tres meses, se transfirieron trozos de medio sólido que contenía raíces de zanahoria, micelio y esporas de *G. intraradices* a placas petri bicompartimentadas (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001). Se transfirió un trozo

de medio sólido por placa y se insertó en un hueco del medio M del compartimento de la raíz (CR).

Tras un mes de crecimiento de las raíces en el CR, se eliminó el medio M del compartimento de la hifa (CH), y se añadieron 20 ml del medio M mezclado con los correspondientes extractos acuosos de los residuos (SB ó SBA) o con agua destilada estéril según el tratamiento, de manera que la proporción final en placa de los extractos fue del 9 %.

El factor a estudiar era el efecto del extracto acuoso de la enmienda agrícola que se añadió al compartimento de la hifa [SB (residuo de azúcar de remolacha), SBA (residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A.niger*), C (control que recibió agua destilada estéril en lugar del extracto acuoso de la enmienda)]. Además, se introdujeron 4 placas como controles negativos [C (-)] que contenían raíz de zanahoria sin micorrizar en el CR.

Las placas se incubaron a 24 °C en oscuridad durante 11 Días.

2.3. Aplicación del fósforo radiactivo

Cinco días antes de la cosecha, se añadió al compartimento de la hifa 0.5 ml/placa de una solución estéril 10 mM KH_2PO_4 que contenía 50 KBq de $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$. Ambas soluciones se esterilizaron por filtración (0.22 μm) antes de ser añadidas.

2.4. Determinaciones

Seis días después de aplicar los extractos acuosos de los residuos, se determinó el crecimiento de las hifas en el CH. Para ello, se midió, en intervalos de 1 cm, a lo largo del tabique de separación de ambos compartimentos, el avance del micelio MA desde el tabique hasta el borde de la placa.

A los 11 días de cultivo de monoxénico, tras la adición de los extractos acuosos, se extrajeron del medio sólido las raíces y las estructuras fúngicas del compartimento de la raíz y se valoró la concentración de ^{33}P y ^{32}P en raíz. utilizando un tampón citrato. Se secaron en un horno a 60 °C, se pesaron y se digirieron en 5 ml de HClO_4 : HNO_3 (1:5; v/v). La concentración de P se midió utilizando el método del molibdato azul (Murphy & Riley, 1962) con un autoanalizador II de Technicon (Technicon Autoanalyzers, Analytical Instrument Recycle, Inc., Golden, CO, USA). La radiactividad se midió en el mismo extracto utilizando un analizador de líquido de centelleo (Packard Instrument Co., Meriden, CT, USA).

Al mismo tiempo, se procedió a la tinción del compartimento de la hifa (CH) con azul tripán, para la posterior observación de las estructuras fúngicas. En el CH se midió longitud total de micelio, número de esporas y número de BAS del hongo MA.

2.5. Análisis estadístico de los resultados

Los efectos de los distintos tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en este ensayo fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente distintos según el test LSD_{0.05}.

Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus (Statistical Graphics Corp., Princeton, NJ).

2.6. Resultados

A los 6 días de crecimiento tras la aplicación del extracto acuoso de cada uno de los residuos al medio M del CH, tanto en las placas controles como las placas con el extracto acuoso SBA se observó un patrón de desarrollo del micelio MA bien organizado, con las estructuras descritas anteriormente por (Bago *et al.*, 1998a; Bago *et al.*, 2004; Bago & Cano, 2005). Una “hifa exploradora primaria” que se ramificaba (con ángulo aproximadamente de 45°) para dar lugar a hifas exploradoras de órdenes superiores (secundarias, terciarias, etc) que extienden el crecimiento fúngico de manera radial (figura 5 a). Las hifas exploradoras de orden secundario y superior, poco después del ápice, formaban unas ramificaciones cortas que a su vez se ramificaban de manera dicotómica para dar lugar a estructuras con apariencia de árbol; denominadas “estructuras ramificadas de absorción” (branched absorbing structures, BAS) (Bago *et al.*, 1998c) (figura 5 b). Los BAS aparecieron a veces solos y otras veces asociados a esporas (BAS-espora, BAS-s, figure 5 c).

a

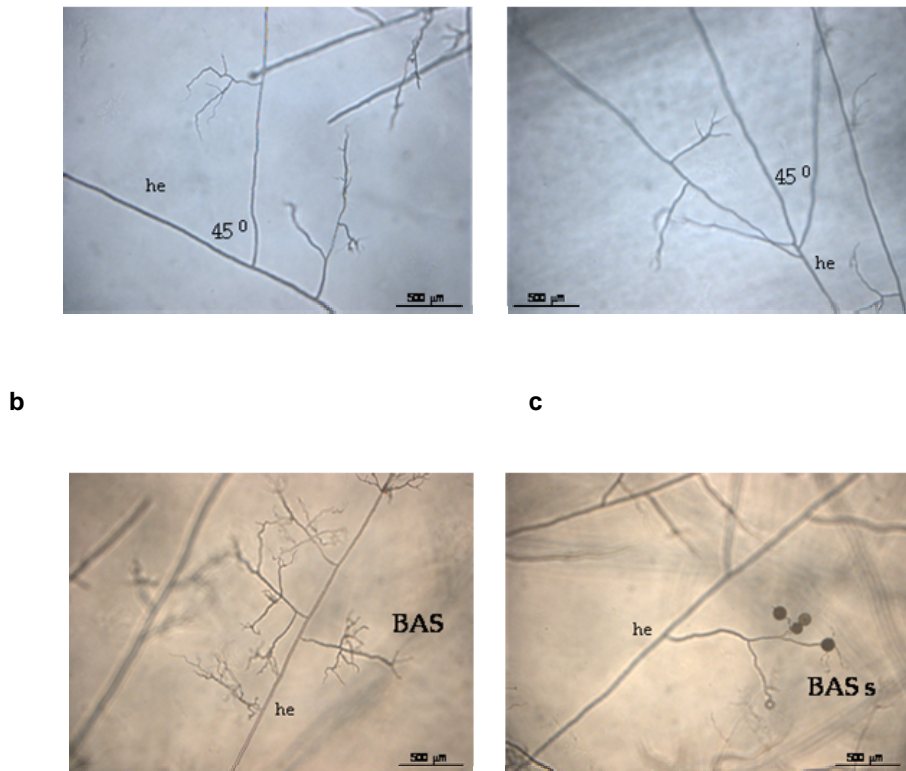


Figura 5: Características morfológicas del desarrollo extraradical del micelio de *Glomus intraradices* crecido monoxénicamente en compartimento de la hifa que contenía Medio M. Se observa una hifa exploradora (he) que se ramifica formando ángulos de 45° dando lugar a hifas de mayor orden (a). A lo largo de la hifa exploradora aparecen BAS y BAS s en intervalos regulares (b y c respectivamente).

La principal diferencia encontrada en el desarrollo del micelio tras la aplicación de ambos extractos (SB ó SBA) fue que este era mucho más denso cuando se aplicó el extracto de SBA que en los controles (figura 6 a, b). Así, mientras que en las placas control, el micelio ocupó casi la mitad del espacio del CH, en las placas con SBA el micelio ocupó prácticamente la totalidad del espacio del CH (figura 7 a y c).

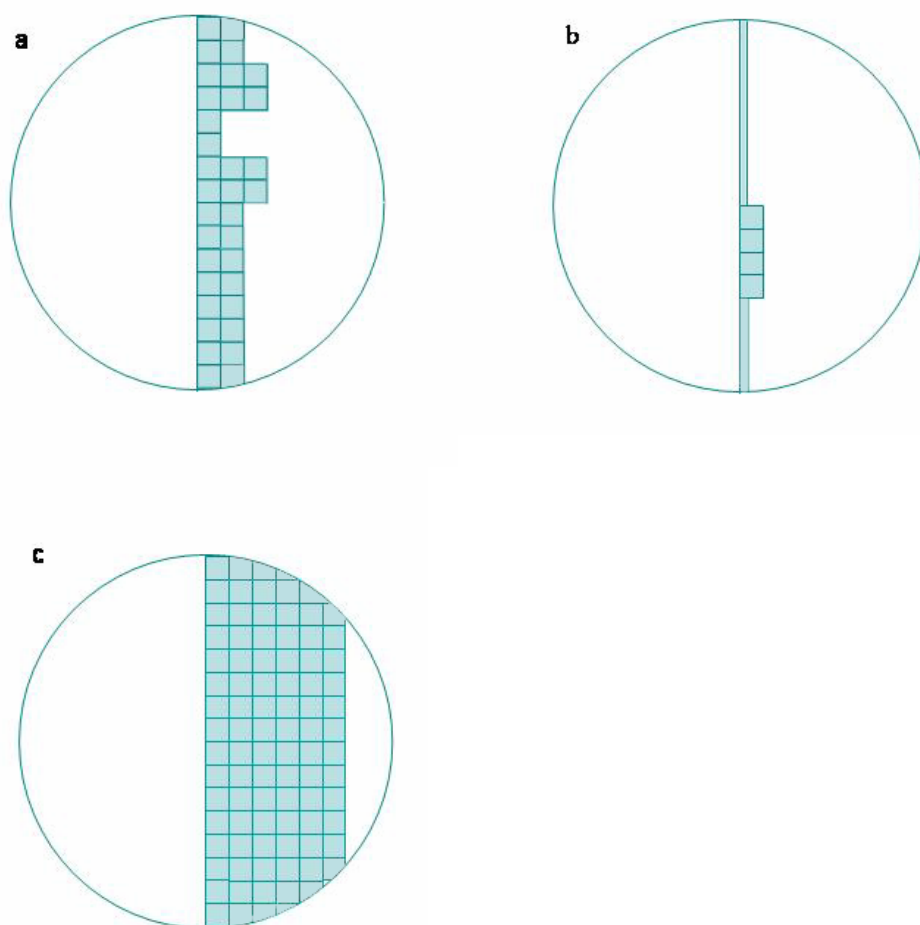


Figura 7: Diagramas de cuantificación del crecimiento del micelio extraradical de *G. intraradices* en el compartimento de la hifa (CH) de placas de cultivo monoxénico tras 6 días de crecimiento desde la aplicación de los extractos. Cada figura representa la media de 5 placas por tratamiento aplicado al CH [(a) placas control con medio M + agua destilada, (b) medio M + extracto acuoso de SB, (c) medio M + extracto acuoso de SBA)]. Cada cuadrado coloreado indica la presencia del micelio MA en un volumen de 0.5 cm³.

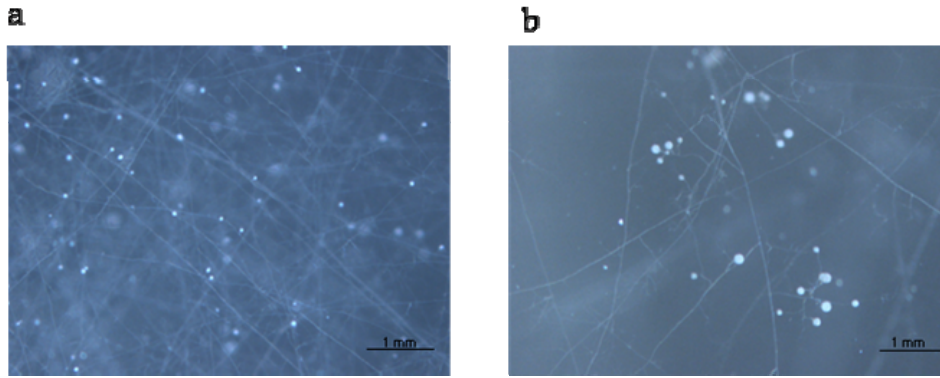


Figura 6: Visión general del desarrollo extraradical del micelio de *Glomus intraradices* crecido monoxénicamente en compartimento de la hifa que contenía Medio M + extracto acuoso de SBA (a) y medio M + agua destilada (b) tras 6 días de crecimiento desde la aplicación de los extractos.

Sin embargo, en el CH con SB, se observó un crecimiento muy restringido del micelio que apenas logró el salto al compartimento de la hifa (figura 7 b). Además, en este tratamiento, el micelio MA presentó un patrón de crecimiento difuso, donde la dominancia apical se perdió y no era posible distinguir la hifa exploradora primaria. Las hifas crecieron de forma desordenada y enmarañada (figura 8)

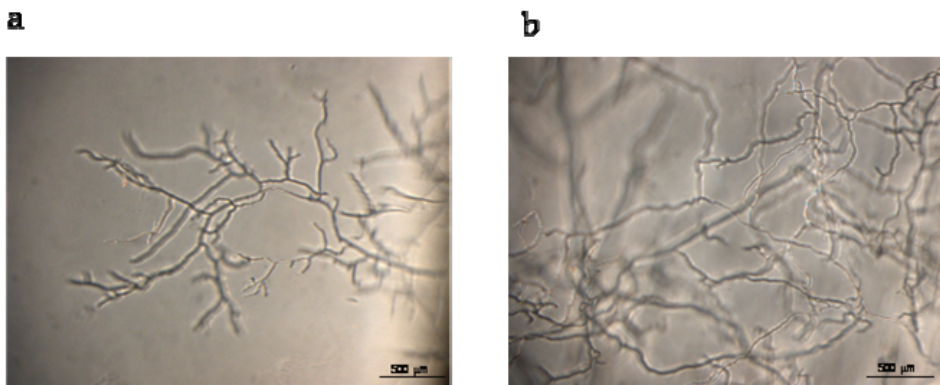


Figura 8 Visión general del desarrollo extraradical del micelio de *Glomus intraradices* crecido monoxénicamente en compartimento de la hifa (CH) que contenía Medio M + extracto acuoso de SB, tras 6 días de crecimiento desde la aplicación del extracto. Se observa que la hifa pierda la dominancia apical al saltar al CH desde el CR (a) y un crecimiento desordenado del micelio en el CH (b).

Al final del ensayo, a los 11 días de crecimiento del micelio desde la aplicación de los extractos acuosos de los residuos orgánicos (SB ó SBA), tanto la longitud total de hifas, como el número de esporas y BAS se incrementó significativamente cuando se añadió el extracto acuoso de SBA (fig 9, a, b, c). Así, los valores de longitud de hifa se incrementaron en un 123% con respecto al control, y los del número de esporas y BAS en un 669% y 128% respectivamente.

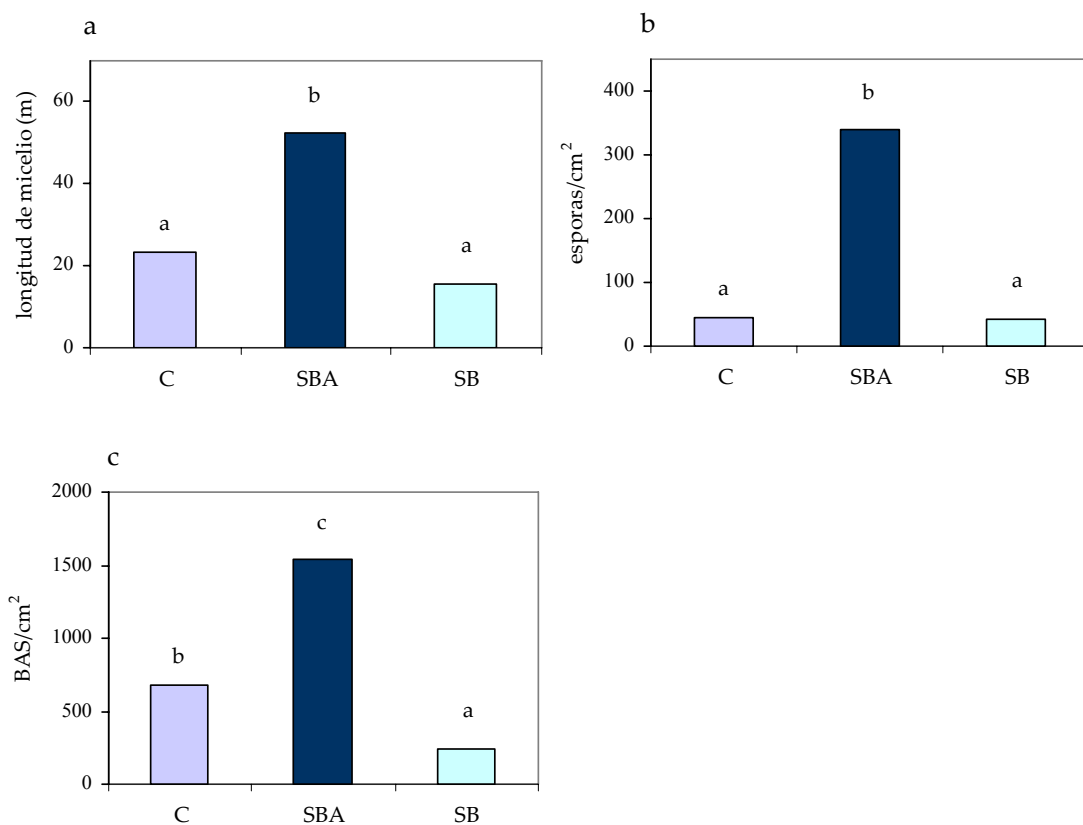


Figura 9: Longitud de hifa (a), número de esporas cm⁻² (b) y número de BAS cm⁻² (c) en el compartimento de la hifa de placas de cultivo monoxénico tras 11 días de crecimiento desde la aplicación de los extractos [agua destilada (C), extracto acuoso de SBA (SBA), extracto acuoso de SB (SB)].

A los 11 días de crecimiento desde la aplicación del extracto acuoso de SB el micelio en el tratamiento con SB recuperó, aunque sólo parcialmente, una pauta de crecimiento más ordenado, aunque la arquitectura de la colonia aparecía interrumpida en algunos puntos, apareciendo, por ejemplo, dobleces en la hifa exploradora o enrollamientos de la hifa sobre sí misma formando una especie de ovillo (figura 10 (a,b)). Además, como muestran los datos de la figura 9 c, la formación de BAS en las placas con SB fue un 64% menor que en los controles, y 84% menor que en las placas con SBA.

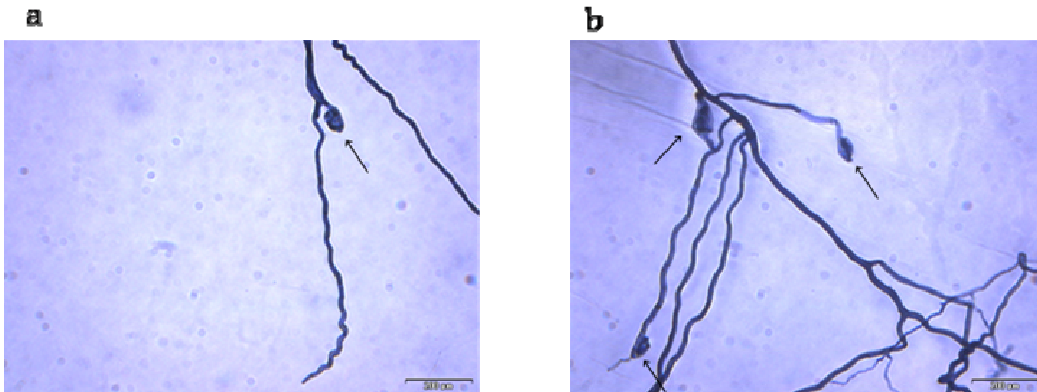


Figure 10: Características morfológicas del desarrollo extraradical del micelio de *Glomus intraradices* crecido monoxénicamente en compartimento de la hifa tras 11 días de crecimiento desde la aplicación del extracto de SB.

La concentración de ^{32}P en raíz desarrollada en RC disminuyó en las placas donde se aplicó el extracto acuoso de SBA, mientras que en las placas donde se aplicó el extracto de SB hubo un incremento de este valor respecto a las placas control, aunque este no fue significativo. En Las placas controles negativos (C (-)), donde no hubo crecimiento del micelio MA en CH, no se observó captación de ^{32}P por parte de la raíz (figura 11 a).

Los valores de concentración de P en raíz fueron similares independientemente del tratamiento aplicado en CH figura 11 b).

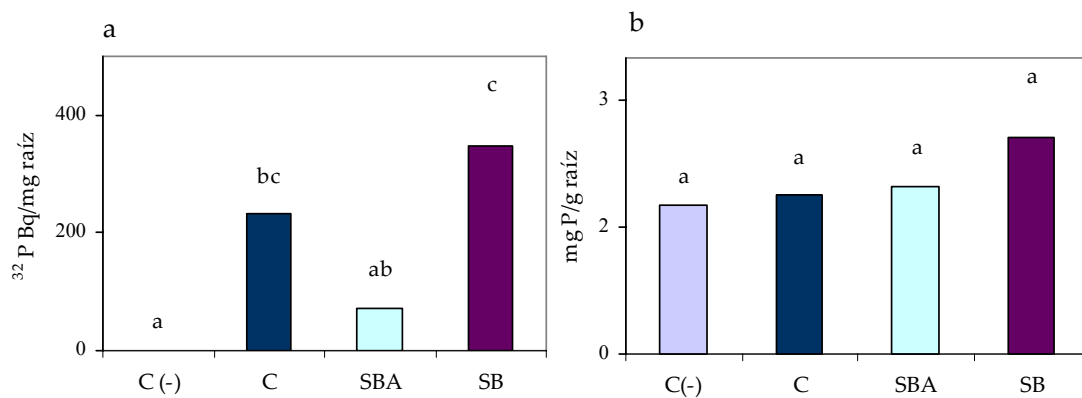


Figura 11: Concentración de ^{32}P (Bq mg^{-1} raíz) y concentración de P (mg g^{-1} raíz) en raíz del CR de placas de cultivo monoxénico tras 11 días de crecimiento desde la aplicación de los extractos [agua destilada (C), extracto acuoso de SBA (SBA), extracto acuoso de SB (SB)].

4.3. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTRÓMETRO DE MASAS (CG/EM) DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE LOS RESIDUOS DE AZÚCAR DE REMOLACHA (SB) Y AZÚCAR DE REMOLACHA FERMENTADO CON *A. NIGER*.

3.1. Objetivo.

Composición de los residuos utilizados e identificación de posibles compuestos responsables del efecto negativo de SB sobre el crecimiento del micelio MA.

3.2. Determinaciones

Los extractos acuosos de SB y SBA se analizaron por espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (CG/EM) según el protocolo descrito en el capítulo de materiales y métodos.

3.3. Resultados

En el cromatograma de ión total (TIC) del residuo de azúcar de remolacha (SB) extraído con dietileter (figura 12, parte superior) observamos dos picos a distintos tiempos de retención (t_R): 5 y 12.9 min. Cuando analizamos el cromatograma de ión único con una relación m/z de 60, aparecieron una serie de ácidos grasos de bajo peso molecular (figura 12, parte inferior), el espectro de masas de ese pico (t_R 5) indicó que la especie dominante más importante fue el ácido hexanoico (figuras 13, 14). A una temperatura mayor (t_R 12.9) eluyeron una serie de especies relacionadas con la lignina. El espectro de masas de ese pico (t_R 12.9) indicó que la especie dominante más importante fue el ácido vinílico (figuras 15 y 16).

Sin embargo, la muestra procedente del extracto acuoso del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger* (SBA) no presentó ninguno de estos compuestos en una cantidad significativa. (Fig 17).

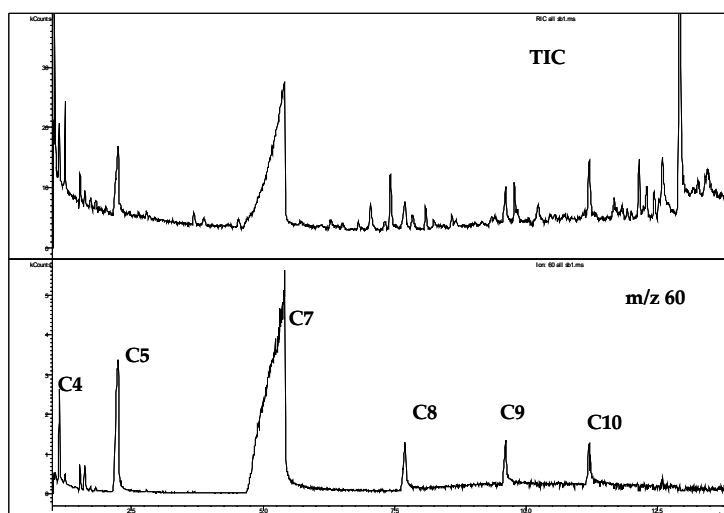


Figura 12: Cromatograma del extracto acuoso del residuo de azúcar de remolacha (SB) extraído con dietileter. En la parte superior aparece el cromatograma de ión total (TIC) y en la inferior el cromatograma de ión único (“single ion”) al valor de m/z de 60.

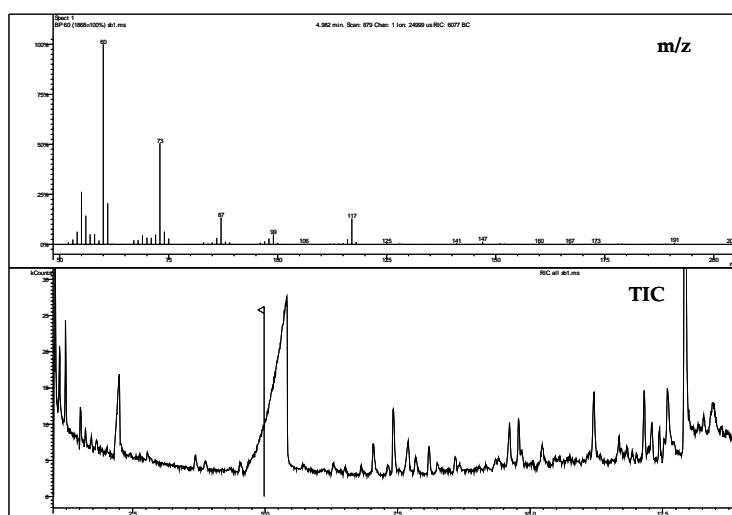


Figura 13: Cromatograma de ión total (TIC) del extracto acuoso de SB extraído con dietileter. (parte inferior) y espectro de masas del primer pico (t_R 5 min) obtenido en el TIC (parte superior).

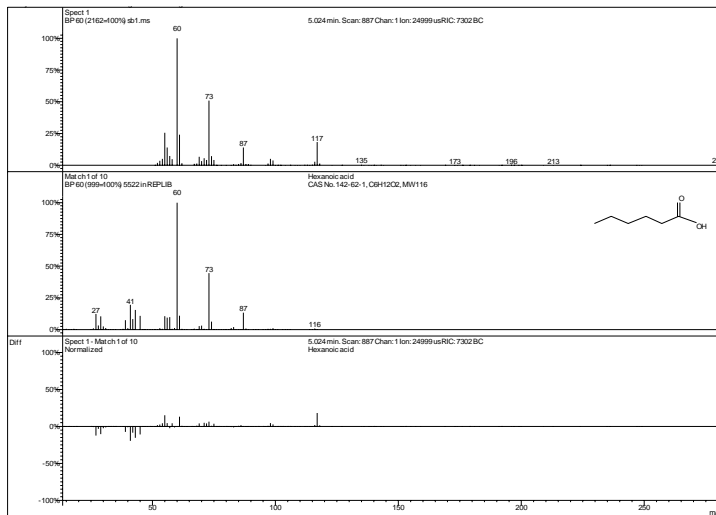


Figura 14: Espectro de masas del pico obtenido a los 5 min del extracto acuoso de SB extraído con dietileter (a) y del ácido hexanoico procedente de la base de datos (b).

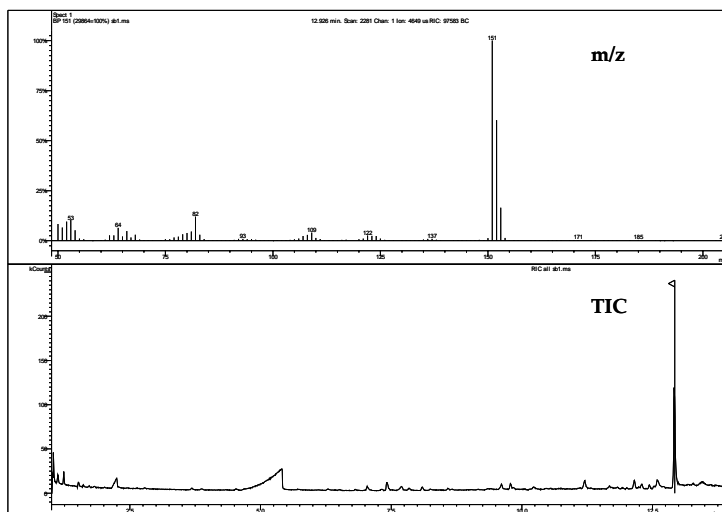


Figura 15: Cromatograma de ión total (TIC) del extracto acuoso de SB extraído con dietileter. (parte inferior) y espectro de masas del segundo pico (t_R 12.9 min) obtenido en el TIC (parte superior).

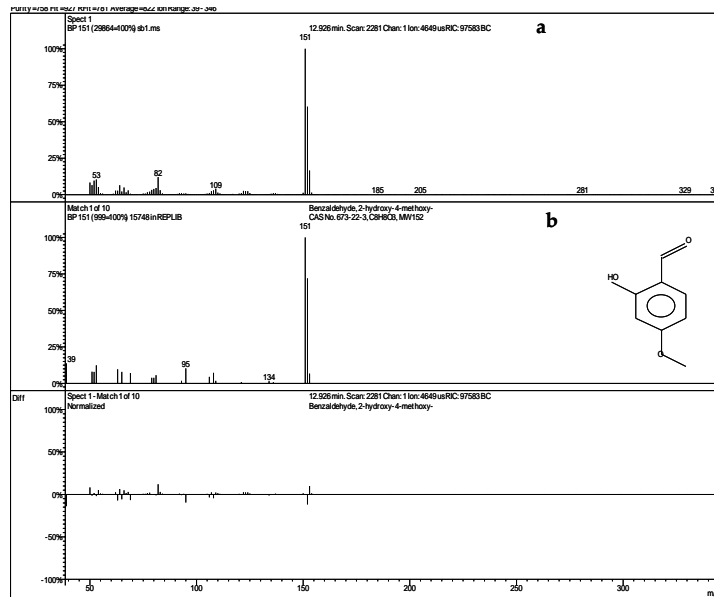


Figura 16: Espectro de masas del pico obtenido a los 12.9 min del extracto acuoso deSB extraído con dietileter (a) y del ácido vanílico procedente de la base de datos (b)

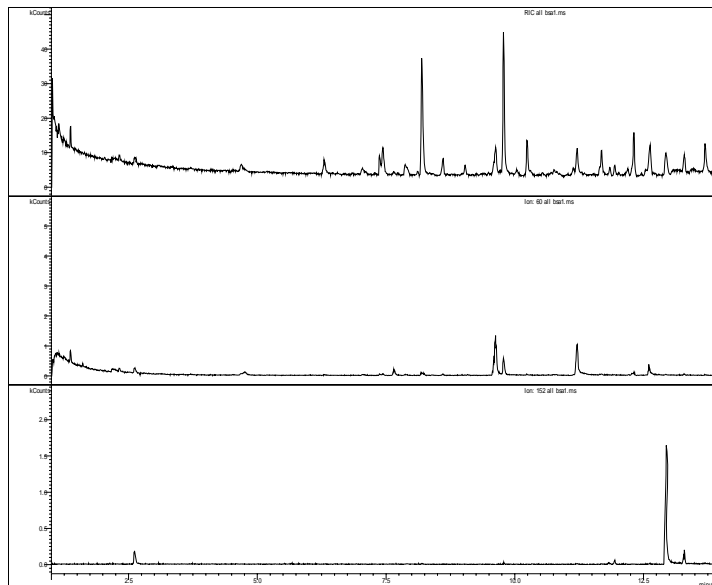


Figura 17: Cromatograma de ión total (TIC) del azúcar de residuo de azúcar de remolacha fermentado con *Aspergillus niger* (SBA) extraído con dietileter.

En un segundo análisis de las muestras de ambos extractos acuosos (SB y SBA), obtenidas tras la extracción con dietileter y posterior tratamiento con metanol y acetona, obtuvimos de nuevo dos cromatogramas. A partir del extracto acuoso de SB, obtuvimos el cromatograma de iones totales (total ion chromatogram, TIC) y dos cromatogramas de ion único con una relación m/z de 177 y 208, (ambos iones dominantes en el ácido ferúlico) (figura 18); los dos picos de los cromatogramas de ion único presentaron el mismo tiempo de retención que coincidió con un pico del TIC, lo que indicaba que se referían al mismo compuesto (figura 18). Posteriormente, obtuvimos el espectro de masas correspondiente a ese pico obtenido en el cromatograma (figura 8). Dicho espectro coincidió con el espectro del ester metil ferúlico obtenido de la base de datos (figura 9). Para comprobar que dicho espectro de masas correspondía realmente al del ácido ferúlico, se realizó el análisis por CG/EM de una muestra pura de ácido ferúlico. El espectro coincidió con el obtenido en nuestra muestra (figura 10). En el cromatograma de iones totales del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger* (SBA) no aparece este pico correspondiente al ácido ferúlico, lo que indica que este compuesto no estaba presente en SBA, al menos en una cantidad considerable (figura 11).

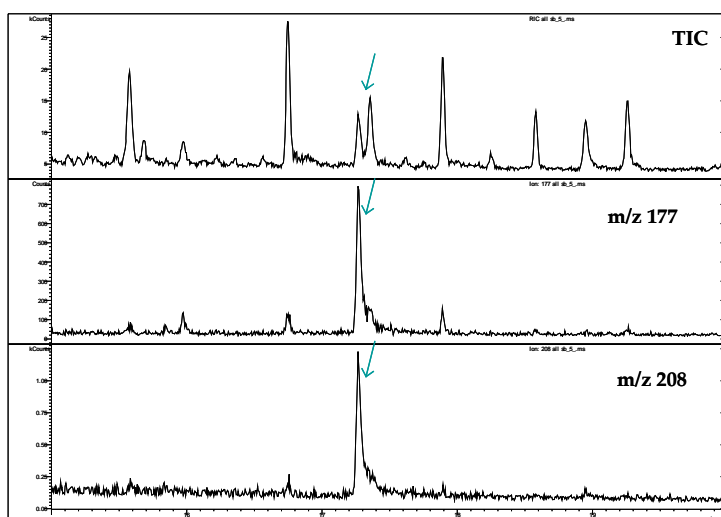


Figura 18: Cromatograma del extracto acuoso de SB extraído con dietileter y tratado posteriormente con metanol y acetona. En la parte superior aparece el cromatograma de ión total (TIC) y en las inferiores los cromatogramas de ion único con valores de m/z de 177 y 208.

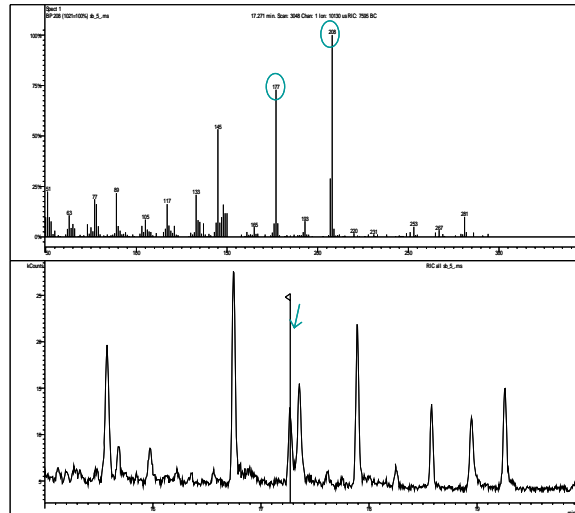


Figura 19: Espectro de masas del pico con t_R 17.2 obtenido en el cromatograma de ión total (TIC) del extracto acuoso de SB extraído con dietileter y tratado posteriormente con metanol y acetona.

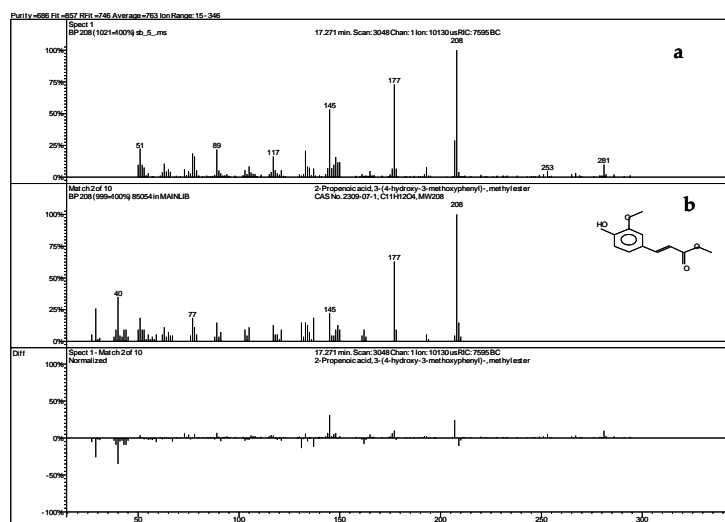


Figura 20: Espectro de masas del pico con t_R 17.2 de la muestra del extracto acuoso de SB extraído con dietileter y tratado posteriormente con metanol y acetona (a) y del ácido ferúlico obtenido en la base de datos (b).

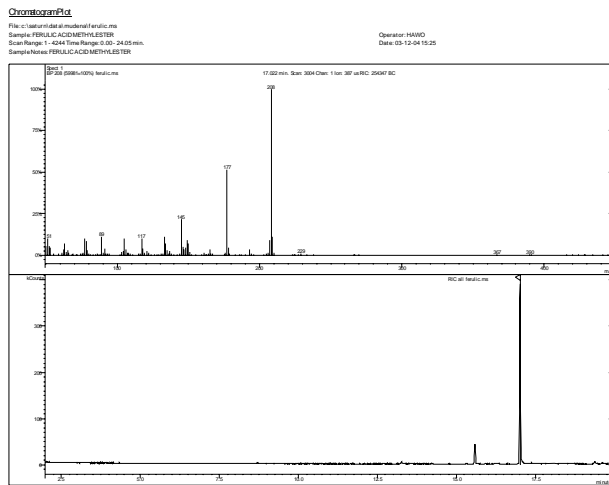


Figura 21: Espectro de masas del auténtico ácido ferúlico tratado con metanol y acetona.

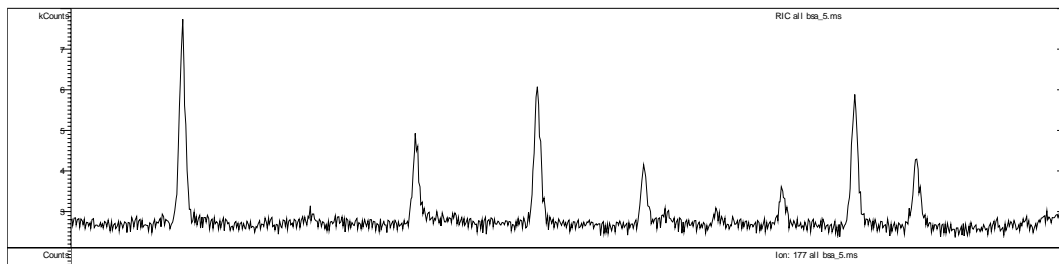


Figura 22: Cromatograma de ión total del extracto acuoso del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *Aspergillus niger* (SBA), extraído con dietileter y tratado posteriormente con metanol y acetona.

V. 3. Discusión

En el ensayo en sistemas compartimentados con suelo como sustrato, se observó que la enmienda SBA incrementó el crecimiento extraradical del hongo MA y la captación de nutrientes, mientras que SB tuvo los efectos contrarios. Además, los valores más altos y más bajos de la razón $P/^{32}P$ en parte aérea se alcanzaron en las plantas donde se había adicionado al suelo SBA y SB respectivamente. Ambas enmiendas (SBA y SB) modificaron la estructura de la comunidad microbiana aunque cada una lo hizo en una proporción diferente; la biomasa de los hongos saprófitos y de las bacterias Gram-positiva y Gram-negativa fue mayor en los suelos tratados con SB que en los tratados con SBA. A continuación se describe, de forma más detallada, la influencia de la adición de cada enmienda y de la micorrización sobre los parámetros estudiados.

Crecimiento de la planta y nutrición

Los contenidos más elevados de N, P y K en la parte aérea de las plantas tratadas con SBA, se explican por la mineralización del residuo y la solubilización del fosfato de roca que tiene lugar durante la fermentación del residuo de azúcar de remolacha (SB) por *A. niger* ((Vassilev *et al.*, 1995; Vassilev *et al.*, 1996). La posible difusión de K y N del compartimento lateral con enmienda (CH-B) al compartimento de la raíz (RC), podría explicar el similar contenido de estos dos nutrientes en las plantas micorrizadas y no micorrizadas aplicadas con SBA en CH-B. Los valores bajos del peso seco de parte aérea en las plantas sin micorriza y tratadas con SB se podría deber a una posible difusión desde CH-B hasta el RC de los componentes tóxicos para la planta procedentes del compartimento adicionado de SB. (Vassilev *et al.*, 1996) también encontraron una influencia negativa en el crecimiento de *T. repens* cuando el residuo de azúcar de remolacha sin previo tratamiento se añadía al suelo.

Crecimiento del micelio extraradical MA

Así mismo, el residuo de azúcar de remolacha sin fermentar (SB) claramente inhibió el crecimiento y actividad del micelio extraradical MA como indican las medidas de longitud de micelio, el marcador biológico WCFA 16:105 y la captación de ^{32}P . Estos valores fueron similares a aquellos determinados en los tratamientos sin micorriza. Por el contrario, la biomasa de hongos saprófitos, medida por WCFA específicos, fue mayor en el suelo con SB.

Para interpretar estos resultados hay que recordar que la hemicelulosa y la celulosa son los principales constituyentes de SB, y en menor cantidad la lignina. (Ravnskov *et al.*, 1999) encontró que la celulosa incrementó la biomasa de los hongos saprófitos y sugirió que estos hongos podrían tener efectos adversos en el crecimiento del hongo MA mediante antibiosis o por competición por nutrientes inorgánicos. (Mc Allister *et al.*, 1994)

también sugirió que la acumulación de sustancias tóxicas producidas por microorganismos saprofitos podría inhibir el crecimiento del hongo MA. Por el contrario, estudios designados para estudiar interacciones entre el hongo MA y hongos saprofitos en el CH mostraron que el hongo *G. intraradices* no se afectaba por la presencia del hongo saprofito, *Trichoderma harzanium* (Green *et al.*, 1999) o *Fusarium culmorum* (Larsen *et al.*, 1998). Sin embargo, estos dos estudios solo incluyeron un hongo saprofito específico y no una comunidad de ellos.

El incremento en el crecimiento extraradical de los hongos MA con la aplicación de la enmienda SBA es coincidente con lo encontrado por varios autores que han demostrado un incremento del crecimiento del hongo MA similar con materia orgánica (Hepper & Warner, 1983; St John *et al.*, 1983; Jøner & Jakobsen, 1995), pero también hay autores que han observado efectos inhibitorios (Calvet *et al.*, 1992; Avio & Giovannetti, 1988). (Ravnskov *et al.*, 1999) concluyó que los efectos de los compuestos orgánicos sobre el crecimiento del hongo MA variaba de acuerdo con la composición química del sustrato. Por otro lado, se ha comprobado que los exudados secretados por *A. niger* incrementa la germinación de esporas del hongo MA y el subsecuente crecimiento presimbótico del micelio (Fracchia *et al.*, 2004). Así pues, el incremento del crecimiento del hongo MA en suelo adicionado con SBA podría explicarse por la presencia de los diferentes compuestos liberados durante el proceso de fermentación, Y ausentes en el caso de aplicar la enmienda SB sin previo tratamiento.

Transporte de fósforo por el micelio MA

Como ya se ha mencionado anteriormente, la aplicación de SBA incrementó el crecimiento del micelio MA, pero este incremento en el crecimiento del hongo no condujo a un incremento similar en la captación de P por el micelio MA, como muestran los resultados de captación de ^{32}P . El hecho de que el P total adquirido por las plantas crecidas con la enmienda SBA sea un 46% mayor en las plantas control micorrizadas, mientras que la captación de ^{32}P es similar en ambas, sugiere que los altos valores de $\text{P}/^{32}\text{P}$ en parte aérea de las plantas con SBA no fue causado por un incremento en la longitud de micelio extraradical MA. (Vassilev *et al.*, 1996) demostraron la capacidad de *A. niger* para solubilizar el RP cuando crecía en un medio cuyo sustrato era SB, y observaron un incremento en el contenido total de P en parte aérea cuando esta enmienda se añadió al sistema suelo-planta. Estos autores sugirieron que los ácidos secretados por *A. niger* pueden ser absorbidos en el suelo junto con los iones fosfato y consecuentemente, al liberar los iones fosfato progresivamente, mantenían la disponibilidad de ^{31}P . En nuestro ensayo, SBA aplicado en el CH-B puede constituir una fuente de fósforo disponible, como consecuencia de la previa solubilización de RP por *A. niger* en el proceso de fermentación. Este P solubilizado se capta y transloca por el micelio MA a la planta huésped lo que provoca una razón $\text{P}/^{32}\text{P}$ mayor en las plantas micorrizadas adicionadas con SBA. Por

otro lado, un consumo parcial del P soluble por *A. niger*, constatado por (Vassilev *et al.*, 1995), podría explicar que la captación de ^{32}P específica del micelio no era más eficiente que la de ^{33}P en los tratamientos con SBA, lo que indica que la captación de ^{32}P no incrementa proporcionalmente al hacerlo la longitud de la hifa MA en CH-B con SBA. (Green *et al.*, 1999), también atribuyó la ausencia de correspondencia entre el crecimiento de micelio externo de *G. intraradices* en respuesta a la enmienda de salvado de trigo y la captación de P mediada por el hongo MA, a la inmovilización por hongos saprofitos, que también incrementaron su crecimiento con la enmienda orgánica. Nuestros resultados sugieren que aunque hubo un pequeño consumo de P, su biodisponibilidad en suelo fue todavía suficientemente incrementada por SBA para asegurar la alta captación de P por el hongo MA.

Biomasa de los microorganismos del suelo

La aplicación de materia orgánica al suelo puede alterar la estructura y función comunidad microbiana del suelo (Zhao *et al.*, 2005). En nuestro ensayo, tanto SB como SBA incrementaron la biomasa de todos los grupos de microorganismos analizados al adicionarles estas fuentes de carbono. Ya que el residuo SB es un material natural sin tratar, los valores de los marcadores biológicos de WCFA fueron mayores en los suelos con SB que aquellos con SBA, que es un material parcialmente biotransformado. Se han descrito interacciones tanto positivas como negativas entre los hongos MA y la microbiota circundante (Secilia & Bagyaraj, 1987; Christensen & Jakobsen, 1993; Azcon-Aguilar & Barea, 1992). La actividad microbiana es de gran importancia en el ciclo de nutrientes y en el flujo de energía (Díaz Raviña *et al.*, 1992), y también en producir sustancias beneficiosas para el crecimiento de la hifa. Pero por otro lado, la competición por metabolitos entre los microorganismos del suelo y el hongo MA puede disminuir la efectividad del último (García-Romera *et al.*, 1998). Por tanto, la interacción entre los hongos MA y la microbiota circundante depende del balance entre los factores beneficiosos y antagonistas. En nuestro ensayo, el incremento de los marcadores biológicos de WCFA de los hongos saprofitos, bacterias Gram positivas y Gram negativas fue mayor en los tratamientos con SB que con SBA. La diferente estructura microbiana en suelo adicionado de cada una de las enmiendas (SB y SBA), podría explicar los efectos opuestos sobre el crecimiento del hongo MA y de la planta por la aplicación de dichas enmiendas. La comunidad microbiana en CH-B con SBA no se afectó por la presencia del hongo MA, pero parece que esta estructura microbiana creó un ambiente favorable para el crecimiento del hongo MA. Por otro lado, muchos estudios han mostrado que las bacterias rizosféricas se afectan por la presencia del hongo MA, y también se han descrito efectos tanto positivos como negativos de los hongos MA sobre las bacterias. Nosotros encontramos que el hongo MA no influyó sobre la población microbiana en CH-B adicionado de SBA, pero afectó la extensión de microorganismos del UARFC

incrementando las bacterias Gram positiva y Gram negativa y disminuyendo los hongos saprofitos.

De este ensayo en suelo en sistemas compartimentados, podemos concluir que la fermentación del residuo SB por *A. niger* (SBA) es crucial para su uso como fertilizante del suelo: la fermentación es beneficiosa para el crecimiento del hongo MA, incrementa la cantidad de fósforo disponible y elimina los efectos fitotóxicos del residuo SB. La razón que explique el incremento en el crecimiento del hongo MA inducido por SBA es compleja y difícil de ser determinada, pero nuestros resultados sugieren que la modificación de la estructura de la comunidad microbiana del suelo, la producción de exudados por *A. niger* y cambios en los niveles de nutrientes disponibles en el medio podrían ser las causas responsables de este efecto.

Por todo lo expuesto y para poder elucidar qué papel juega la adición de los residuos SB y SBA "per sé" sobre el desarrollo del micelio extraradical, sin la influencia de otros factores como pueden ser la comunidad microbiana del suelo, se realizó un ensayo adicional utilizando el cultivo monoxénico, en placas bicompartimentadas, donde al compartimento de la hifa (CH), se le añadió un extracto acuoso de ambos enmendantes. El cultivo monoxénico presenta, además, la ventaja de permitir el estudio de la morfología y la arquitectura de las hifas externas y la modificación que cualquier factor provoca en ellas. En este ensayo se estudió no solo la influencia de los enmendantes sobre el crecimiento de las hifas (longitud de micelio desarrollado) sino también la influencia que ejercen sobre su estructura.

En 1992, (Calvet *et al.*, 1992), estudiaron la influencia de varios sustratos orgánicos sobre el establecimiento de la simbiosis MA por *Glomus mosseae* en plantas de cebolla, y encontraron que el efecto inhibitor de estos sustratos se suprimía cuando los sustratos se esterilizaban previamente. Ello sugería el carácter biológico de ese efecto inhibitor. Los resultados obtenidos, tanto en el ensayo de suelo como en el del cultivo axénico, relacionados con el efecto del residuo de azúcar de remolacha sin fermentar (SB) sobre el desarrollo del micelio MA, corroboran los obtenidos por estos autores. El efecto inhibitor de SB sobre el crecimiento del micelio extraradical del hongo MA es mayor en suelo impidió su desarrollo. Ello indica el papel importante que juegan los microorganismos del suelo presentes en el sistema. Sin embargo, la estructura de la comunidad microbiana del suelo no fue el único factor responsable del efecto inhibitor de SB sobre la biomasa de los hongos MA.

En el ensayo en cultivo monoxénico encontramos, tras la adición del medio M con los extractos de los enmendantes, un crecimiento de las hifas retardado en el tratamiento con SB, tanto a los 6 como a los 11 días de crecimiento. A los 6 días de crecimiento, mientras que en el tratamiento aplicado de SBA el micelio MA se desarrolló ocupando prácticamente todo el espacio del compartimento de la hifa, con la aplicación de SB las

hifas apenas saltaron al CH. A los 11 días, el número de BAS formados en presencia de SB fue un 64% y un 84% menor que en las placas control y que con la aplicación con SBA respectivamente. Las estructuras ramificadas de absorción (branching absorbing structures, BAS) se forman en la hifa extraradical solamente cuando la simbiosis con la raíz huésped se establece con éxito (Bago *et al.*, 1998d; Bago *et al.*, 1998b); El hecho de que en las placas en las que se aplicó SB la formación de BAS esté tan disminuida junto con un desarrollo micelizar desordenado y con aparición de pequeños ovillos en el ápice de la hifa nos sugiere la presencia de algún componente, en el extracto acuoso de SB, que influye negativamente y altera el crecimiento del micelio MA.

El hecho de que los cromatogramas de ambos sustratos presenten un perfil tan diferente corrobora los distintos comportamientos de ambas enmiendas (SB y SBA). En el segundo cromatograma de SB (obtenido tras el tratamiento de los esterres con metanol y HCl) apareció un pico que correspondía al ácido ferúlico. Este pico no apareció en el cromatograma de SBA. El ácido ferúlico es un derivado fenólico y está relacionado con el metabolismo de la lignina. El ácido ferúlico y sus dehidrodímeros son importantes para dar firmeza a las paredes celulares de los tejidos de las plantas y se sabe que este ácido es un componente mayoritario de las paredes celulares de las raíces de la remolacha de azúcar (Nagahashi *et al.*, 1996). Los derivados fenólicos son fungitóxicos para una gran variedad de hongos (Christie, 1965; Haars *et al.*, 1981; Wacker *et al.*, 1990). (Douds *et al.*, 1996) demostraron que el ácido ferúlico inhibía el crecimiento de *Gigaspora margarita* y *G. gigantea* en medio M (10 ppm). Por otro lado, se ha comprobado que el ácido ferúlico disminuye la colonización del espárrago por hongos MA (Wacker *et al.*, 1990; Wacker *et al.*, 1990; Pedersen *et al.*, 1991) y disminuye la elongación de la hifa de *Glomus fasciculatum* (Wacker *et al.*, 1990). (Gadkar *et al.*, 2003) mostraron que un exudado de raíz (antes de la infección por hongos MA) del mutante de tomate M161 mostraba una actividad inhibitoria sobre el crecimiento apical de la hifa de *Gigaspora gigantea* y *Glomus intraradices*; La caracterización preliminar de ese exudado indicaba que podrían ser compuestos fenólicos los responsables. Aunque aún no hemos comprobado el efecto que produce el ácido ferúlico autentico (producto químico) sobre el crecimiento del hongo MA en cultivo monoxénico, los datos obtenidos en este ensayo junto con los mostrados por otros autores indican que el ácido ferúlico podría ser uno de los componentes causantes de esta inhibición. Sin embargo, aunque el crecimiento de las hifas se afectó marcadamente por los componentes del extracto acuoso de SB, la presencia de estos no inhibió totalmente su crecimiento en cultivo monoxénico. (Douds *et al.*, 1996), también observaron que los compuestos fenólicos asociados a las raíces de azúcar de remolacha inhibían el desarrollo del hongo MA pero no hasta tal punto que impidiera totalmente el contacto de la hifa con la raíz. En la misma línea (Nagahashi & Douds, 2000) encontraron que cuando cesaba el crecimiento de una rama de la hifa, otra hifa lateral la suplantaba.

Contrariamente al efecto causado por SB, el fermentado (SBA) estimuló el desarrollo del micelio MA en cultivo monoxénico. (Calvet *et al.*, 1992) también encontraron un efecto positivo sobre la germinación y el desarrollo de *G.mosseae* causado por extractos acuosos de varios sustratos orgánicos. Como ya indicamos en la discusión de los datos del ensayo en suelo utilizando un sistema compartimentado, el efecto positivo de SBA sobre el hongo MA puede tener su origen en la estructura de la comunidad microbiana presente en el suelo tras la adición de SBA y/o en la naturaleza química del extracto de SBA. Los datos obtenidos en cultivo monoxénico, en ausencia por tanto de otros microorganismos, indican que hay una causa de naturaleza química, bien debida a un aporte de nutrientes que incrementan el desarrollo del micelio MA o a la producción de metabolitos presentes en el extracto acuoso esterilizado por filtración que fueron producidos por *Aspergillus niger*, el hongo utilizado en la fermentación del residuo de azúcar de remolacha.

(Fracchia *et al.*, 2004), encontraron que *A. niger* estimuló la germinación de esporas y la longitud de hifas de *Glomus mosseae* y *G. rosea* y la colonización micorrícica en plantas de soja. Además, estos mismos autores encontraron efectos positivos de los exudados de este hongo saprobio sobre la longitud de la hifa a partir de esporas germinadas de ambos hongos MA.

VI. 4. Conclusiones

1. La enmienda del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger* (SBA) incrementó el crecimiento extraradical del micelio MA en suelo.

El hongo MA no creció en suelo enmendado con residuo de azúcar de remolacha sin previo tratamiento (SB).

2. La adición de ambas enmiendas orgánicas (SB y SBA) al suelo modificó la estructura de la comunidad microbiana del mismo aunque cada una en una proporción diferente.

3. El incremento en el contenido de fósforo en las plantas micorrizadas que crecieron en presencia de la enmienda SBA se debió a la solubilización de P durante el proceso de fermentación con *A. niger* y no al mayor desarrollo del micelio extraradical.

4. La enmienda del residuo de azúcar de remolacha fermentado con *A. niger* (SBA) incrementó el crecimiento extraradical del micelio MA en cultivo monoxénico.

5. La enmienda del residuo de azúcar de remolacha sin previo tratamiento microbiológico (SB) inhibió el crecimiento extraradical del micelio MA en cultivo monoxénico.

6. El crecimiento del micelio del hongo MA en presencia del extracto acuoso de SB en cultivo monoxénico fue inicialmente desordenado aunque recuperó parcialmente su estructura a lo largo del tiempo.

7. Los cromatogramas de cromatografía de gases asociado al espectrómetro de masas obtenidos de los extractos acuosos de ambos residuos mostraron un perfil diferente.

8. El extracto acuoso de SB contiene ácido ferúlico, sin embargo este compuesto, posible responsable del efecto inhibitor del crecimiento extraradical del hongo MA, no aparece en el extracto acuoso de SBA.

VII. CONCLUSIONS

1. In desertified soil, the inoculation of autoctonous AM fungi was necessary to achieve AM colonization and nodule formation.
2. The addition to the soil of treated Sugar Beet waste and Dry Olive Cake increased these symbiotic parameters.
3. All enzymatic activities and physico-chemical characteristic measured in the experiments increased by the addition of the amendments.
4. The addition of treated Sugar Beet waste and Dry Olive Cake and the microbial inoculants increased plant nutrition and growth.
5. Plants amended with *A. niger*-treated Sugar Beet waste that were subjected to drought stress had similar growth to that of well watered plants.
6. Heavy metal (Cd and Zn) adapted AM fungi increased plant nutrition and growth. This effect was promoted by the addition of *A. niger*-treated Sugar Beet waste.
7. Mycorrhiza and *A. niger* treated Sugar Beet waste decreased shoot heavy metal (Cd and Zn) concentration in plants growing in Cd or Zn contaminated soil.
8. *A. niger*-treated Sugar Beet waste increased AM hyphal growth in soil and in monoxenic cultures.
9. Untreated Sugar Beet waste decreased AM hyphal growth in soil and in monoxenic cultures.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott LK. 1982.** Comparative anatomy of vesicular arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Aust.J.Bot.* **30**: 785-499.
- Adriano DC. 1986.** Trace elements in terrestrial environment. In: *D.C.Adriano.Springer, Berlin Heidelberg, New york.*
- Adriano DC, Wenzel WW, Vangronsveld J, Bolan NS. 2004.** Role of assisted natural remediation on environmental cleanup. *Geoderma* **122**: 121-142.
- Aksu Z, İšoğlu, İ . 2005.** Removal of copper (II) ions from aqueous solution by biosorption onto agricultural waste sugar beet pulp. *Process Biochemistry* **40**: 3031-3044.
- Albaladejo J, Castillo V, Roldán A. 1996.** Rehabilitation of degraded soils by water erosion in semiarid environments. In: Rubio JL, Calvo A, eds. *Soil Degradation and Desertification in Mediterranean Environment.* Geoforma , 265-278.
- Allison FE. 1973.** Soil organic matter and its role in crop production. *Elsevier Scientific Publishing Co., New York.*
- Altieri MA. 1994.** Sustainable Agriculture. *Enc.Agriculture.Sci.* **4**: 239-247.
- Arines J, Porto A, Vilariño A.** Effect of manganese on vesicular-arbuscular mycorrhizal development in red clover plants and on soil Mn-oxidizing bacteria. *Mycorrhiza* , 127-131. 1992.
- Auge R. 1987.** Transpiration Rates in VA Mycorrhizal and Nonmycorrhizal Rose Plants as a function of Soil-Water Potential, Leaf Phosphorus-Content, and Degree of Colonization. *Hortscience* **22**: 1115.
- Augé RM. 2001.** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3-42.
- Auge RM, Schekel KA, Wample RL. 1987.** Rose Leaf Elasticity Changes in Response to Mycorrhizal Colonization and Drought Acclimation. *Physiologia Plantarum* **70**: 175-182.
- Avio L, Giovannetti M. 1988.** Vesicular-arbuscular mycorrhizal colonisation of lucerne roots in a cellulose amended soil. *Plant and Soil* **112**: 99-104.
- Azcón R, Barea JM. 1997.** Mycorrhizal dependency of a representative plant species in a Mediterranean shrublands (*Lavandula spica* L.) as key factor to its use for revegetation strategies in a desertification-threatened areas. *Applied Soil Ecology* **7**: 83-92.
- Azcón R, Borie F, Barea JM. 1982.** Exocellular phosphatase activity of lavender and wheat roots as affected by phytate and mycorrhizal inoculation. In: *Les Mycorrhizes: Biologie et Utilization* (S. Gianinazzi, V. Gianinazzi-Pearson and A, Trouvelot, Eds). *INRA, Dijon pp. 83- 85.*
- Azcón R, El-Atrash F. 1997.** Influence of arbuscular mycorrhizal and phosphorus fertilization on growth, nodulation and N₂ fixation (¹⁵N) in *Medicago sativa* at four salinity levels. *Biol.Fert.Soil* **24**: 81-86.

- Azcon-Aguilar C, Bago B, Barea JM. 1998.** *Saprophytic growth of AMF.* In: A.Varma & B. Hock (eds) *Mycorrhiza: structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology.* 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin.
- Azcon-Aguilar C, Barea JM. 1985.** Effect of Soil micro-organisms on formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Transactions of the British Mycological Society* **84**: 536-540.
- Azcon-Aguilar C, Barea JM. 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, Barea JM. 1996.** Arbuscular mycorrhizae and biological control of soil-borne plants pathogens. An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* **6**: 457-464.
- Azcon-Aguilar C, Diaz-Rodriguez RM, Barea JM. 1986.** Effect of Soil micro-organisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Transactions of the British Mycological Society* **86**: 337-340.
- Azcon-Aguilar C, García-García F, Barea JM. 1991.** *Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares.* In: J. Olivares & J.M. Barea, (eds). *Fijación y movilización Biológica de nutrientes, Vol. II. Nuevas tendencias,* CSIC: Madrid.
- Azcón-Aguilar C, Jaizme-Vega MC, Calvet C. 2002a.** *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, Barea JM. 2002b.** Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Applied Soil Ecology* **21**: 1-9.
- Baby UI, Manibhushanrao K. 1996.** Influence of organic amendments on arbuscular mycorrhizal in relation to rice sheath blight disease. *Mycorrhiza* **6**: 201-206.
- Bago B, Azcon-Aguilar C, Goulet A, Piché Y. 1998a.** Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **139**: 375-388.
- Bago B, Azcón-Aguilar C, Goulet A, Piche Y. 1998b.** Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **139**: 375-388.
- Bago B, Azcón-Aguilar C, Goulet A, Piché Y. 1998c.** Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **139**: 375-388.
- Bago B, Azcón-Aguilar C, Piche Y. 1998d.** Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* **90**: 52-62.

- Bago B, Cano C. 2005.** Breaking Myths on Arbuscular Mycorrhizas in Vitro Biology. *Soil Biology* **4**: 111-138.
- Bago B, Cano C, Azcón-Aguilar C, Samson J, Coughlan AP, Piché Y. 2004.** Differential morphogenesis of the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus grown monoxenically on spatially heterogeneous culture media. *Mycologia* **96**: 452-462.
- Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Brouillette J, Becard G, Shacharhill Y. 1999a.** Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology* **121**: 263-271.
- 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.
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Piché Y. 1999b.** Nuclei of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by in vivo two-photon microscopy. *Protoplasma* **209**: 77-89.
- Baker AJM, Reeves RD, Hajar ASN. 1994.** Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* **127**: 61-68.
- 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 JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C. 1992.** Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems. In: Norris JR, Read D, Varma A, eds. *Techniques for the study of Mycorrhizae*. In: *Methods in Microbiology*. Vol.24. Academic press, London. 391-416.
- Barea JM, Escudero JL, Azcón-Aguilar C. 1980.** Effects of introduced and indigenous VA mycorrhizal fungi on nodulation, growth and nutrition of *Medicago sativa* in phosphate-fixing soils as affected by P-fertilizers. *Plant soil* **54**: 283-296.
- Barea JM, Pozo MJ, Azcon-Aguilar C. 2005.** Microbial cooperation in the rhizosphere. *J.Exp: Bot* **56**: 1778-1784.
- 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, Azcon-Aguilar C. 1982.** La rizosfera: Interacciones microbio-planta. *Anal.Edafol.Agrobiol.* **41**: 1517-1532.
- Barea JM, Azcón-Aguilar C. 1983.** Interactions between phosphate solubilizing bacteria and VA mycorrhiza to improve plant utilization of rock phosphate in non-acidic soils. 3rd international congress on phosphorus compounds, Brussels, 4-6 Oct. pp 127-144.
- Barea JM, Azcon-Aguilar C, Azcón R. 1997.** Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere micro-organisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: Gange, A.C., Brown, V.K. (eds) *Multitrophic interactions in terrestrial systems*. Backwell, Cambridge pp: 65-77.

- Barea JM, Gryndler M, Lemanceau Ph, Schüepp H, Azcón R. 2002a.** The rhizosphere of mycorrhizal plants. In: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K, eds. *Mycorrhiza Technology in Agriculture: from Genes to Bioproducts*. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag, 1-18.
- Barea JM, Honrubia M. 1993.** Micorrizas y revegetación. *Ecosistemas* **4**: 46-47.
- Barea JM, Jeffries P. 1995.** Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems . In: Varma A, Hock B, eds. *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Heidelberg: Springer-Verlag, 521-559.
- Barea JM, Olivares J. 1998.** Manejo de las propiedades biológicas del suelo. In: Agricultura Sostenible (Ed. R. M. Jiménez Díaz, J. Lamo de Espinosa) pp. 173-193. *Editorial Mundi Prensa.Madrid*. pp: 173-193.
- Barea JM, Requena N, Jiménez I. 1996.** A revegetation strategy based on the management of arbuscular mycorrhizas, *Rhizobium* and rhizobacteria for the reclamation of desertified mediterranean shrubland ecosystems. In: Lasram M, ed. *Cahier options méditerranéennes. vol 20. Mycorrhization of forest plants under arid and semi-arid conditions and desertification control in the mediterranean basin*. Zaragoza: CIHEAM, IAMZ, 75-86.
- Barea JM, Toro M, Orozco MO, Campos E, Azcón R. 2002b.** The application of isotopic (P-32 and N-15) dilution techniques to evaluate the interactive effect of phosphate-solubilizing rhizobacteria, mycorrhizal fungi and *Rhizobium* to improve the agronomic efficiency of rock phosphate for legume crops. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **63**: 35-42.
- Bartoli F, Burtin G, Guerif J. 1992.** Influence of organic matter on aggregation in Oxisols rich gibbsite or in goethite. II. Clay dispersion, aggregate strength and water stability. *Geoderma* **54**: 259-274.
- Bastian RK, Ryan JA. 1986.** Design and management of successful land application systems. In: *In Proceedings, utilization, treatment, and disposal of waste on land*. Madison, Wisconsin.: Soil Science Society of America, 217-234.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973.** Rapid determination of free polyene for water stress studies. *Plant and Soil* **39**: 205-207.
- Bearden BN, Petersen L. 2000.** Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of vertisols. *Plant soil* **218**: 173-183.
- Becard G, Fortin JA. 1998.** Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on *ri T* DNA transformed roots. *New Phytol.* **108**: 211-218.
- Benfield CB, Howard PJA, Howard DM. 1977.** The estimation of dehydrogenase activity in soil. *Soil Biol.Biochem.* **9**: 67-70.
- Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, Bura R, Markov A, Skomarovsky A, Okunev O, Gusakov A, Maximenko V, Gregg D, Sinitsyn A, Saddler J. 2005.** Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates - evidence for the role of accessory enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* **37**: 175-184.

- Berthelin J, Munier-Lamy C, Layval C. 1995.** Effect of microorganisms on mobility of heavy metals in soils. In: P.M. Huang, J.Berthelin, J.M.; Bollag, J.M.; McGill, W.B.; Page, A.L. Metals, other inorganics and microbial activities (Environmental impacts of soil component interactions, vol 2). *Lewis, Boca Raton, Fla* pp: 3-17.
- Bethlenfalvay GJ, Brown MS, Ames RN, Thomas RS. 1988.** Effects of Drought on Host and Endophyte Development in Mycorrhizal Soybeans in Relation to Water-Use and Phosphate-Uptake. *Physiologia Plantarum* **72**: 565-571.
- Bethlenfalvay GJ, Schüepp H. 1994.** *Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems* (S. Gianinazzi, H. Schüepp eds.) Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland 117-131.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**: 911-917.
- Bolan NS. 1991.** A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant soil* **134**: 189-207.
- Bolan NS, Duraisamy VP. 2003.** Role of inorganic and organic soil amendments on immobilization and phytoavailability of heavy metals: a review involving specific case studies. *Australian Journal of Soil Research* **41**: 533-555.
- Bolton H. 1992.** *Microbial Ecology of the rhizosphere. In: Soil Microbial Ecology, Applications in Agricultural and Environmental management. Meeting FB ed. New York: Marcel Dekker, inc.*
- 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.*
- Bonfante P, Bianciotto V. 1995.** *Presymbiotic versus symbiotic phase in arbuscular endomycorrhizal fungi: morphology and cytology. In: A. Varma and B. Hock (eds) Mycorrhiza: structures, function, molecular biology and biotechnology. Springer-Verlag. Berlin.*
- Bonfante-Fasolo P. 1984.** *Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: Powell C.L. & D.J. Bagyaraj (eds) VA Mycorrhiza. CRC Press, Boca Raton.*
- Borie F, Redel Y, Rubio R, Rouanet JL, Barea JM. 2002.** Interactions between crop residues application and mycorrhizal developments and some soil-root interface properties and mineral acquisition by plants in an acidic soil. *Biology and Fertility of Soils* **36**: 151-160.
- Bothe H, Hildebrandt U. 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. **66**: 1-102.
- Bowman LA, Bloem J, Römkens P, Boon GT, Vangronsveld J. 2001.** Beneficial effects of the growth of metal tolerant grass on biological and chemical parameters in copper and zinc contaminated sandy soils. *Minerva Biotechnology* **13**: 19-26.

- Brink RH, Dubar P, Lynch DL. 1960.** Measurements of carbohydrates in soil hidrolysates with anthrone.
- Brown MT, Wilkins DA. 1985.** Zinc tolerance of mycorrhizal *Betula*. *Nature, Lond* **292**: 335-337.
- Brundett M. <http://mycorrhiza.ag.utk.edu/>. <http://mycorrhiza.ag.utk.edu/> . 2006.
Ref Type: Electronic Citation
- Bürkett B, Robson A. 1994.** ⁶⁵ Zn uptake in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a root-free sandy soil. *Soil Biol.Biochem* **26**: 1117-1124.
- Buswell JA, Odier E. 1987.** Lignin Biodegradation. *Crit.Rev.Biotechnol* **6**: 1-60.
- Cabrera F, Madejón E, Romero AS, López R. 2002.** Diagnóstico y estudio de alpechines, orujos y alperujos. In: *Jornadas de Investigación y transferencia de tecnología al sector oleícola*. Córdoba, Spain: 195-199.
- Calvet C, Barea JM, Pera J. 1992.** *In vitro* interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and some saprophytic fungi isolated from organic substrates. *Soil Biol.Biochem* **24**: 775-780.
- Caravaca F, Alguacil MM, Vassileva M, Diaz G, Roldan A. 2004.** AM fungi inoculation and addition of microbially-treated dry olive cake-enhanced afforestation of a desertified Mediterranean site. *Land Degradation & Development* **15**: 153-161.
- Caravaca F, Barea JM, Figueroa D, Roldán A. 2002.** Assesing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for reafforestation with through changes in soil biologicval and physical parameters. *Appl Soil Ecol* **20**: 107-118.
- Cervantes E, Rodríguez-Barrueco C. 1992.** Relationships between the Mycorrhizal and Actinorhizal Symbiosis in Non-legumes. Norriss J.R, Read D.J, Varma A.K. (eds) *Methods in Microbiology*. *Academic Press , London*, **Vol 24 pp**: 417-432.
- Chabot S, Bécard G, Piché Y. 1992.** Life cycle of *Glomus intraradices* in root organ culture. *Mycologia* **84**: 315-321.
- Chaudri AM, Mc Grath SP, Giller KE, Rietz E, Sauerbeck D. 1993.** Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soils previosly treated with metal sewage sludge. *Soil Biol.Biochem* **25**: 301-309.
- Christensen H, Jakobsen I. 1993.** Reduction of bacterial growth by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Biol.Fertil.Soils* **15**: 253-258.
- Christie T. 1965.** The effects of some phenolic compounds upon the growth of two species of *Phytophthora*. *N.Z.J.Agric Res* **8**: 630-635.
- Clapp JP, Young JPW, Merryweather JW, Fitter AH. 1995.** Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist* **130**: 259-265.

- Colpaert JV, Vanassche JA. 1992.** Zinc toxicity in ectomycorrhizal Pinus-Sylvestris. *Plant and Soil* **143**: 201-211.
- Darbon N, Lavagne F, Quillon JP. 1992.** Les phosphates et le cadmiun: le soil, la plante, l'home. *APAO, Paris*.
- Dehn B, Schuepp H. 1989.** Influence of VA mycorrhizae on the uptake and distribution of heavy metals in plants. *Agric.Ecosyst.& Environ.* **29**: 79-83.
- Del Río M, Font R, Almela C, Vélez D, Montoro R, De Haro A. 2002.** Heavy metals and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadiamar river area after the toxic spill of the Aznalcollar mine. *Journal of Biotechnology* **98**: 125-137.
- del Val C, Barea JM, Azon-Aguilar C. 1999.** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 718-723.
- Denny HJ, Wilkins DA. 1987.** Zinc Tolerance in Betula Spp .4. the Mechanism of Ectomycorrhizal Amelioration of Zinc Toxicity. *New Phytologist* **106**: 545-553.
- Díaz Raviña M, Acea MJ, Carballas T. 1992.** Microbial biomass and C and N mineralization in forest soils. *Bioresour.Technol.* **43**: 125-132.
- Díaz D, Honrubia M. 1993.** Notes on *Glomales* from Spanish semiarid lands. *Nova Hedwigia* 57-111.
- Díaz E. 1992.** Efecto de la adición de residuos urbanos en la regeneración de suelos degradados como medio de control de la desertificación. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Díaz G, Azcón-Aguilar C, Honrubia M. 1996.** Influence of arbuscular mycorrhiza on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant soil* **180**: 141-249.
- Dick AV, Tabatabai MA. 1993a.** Significance and potencial uses of soil enzymes. *Soil Microbial Ecology.Ed.Metting F.Blaine* **4**: 98-127.
- Dick AV, Tabatabai MA. 1993b.** Significance and potencial uses of soil enzymes. *Soil Microbial Ecology.Ed.Metting F.Blaine. Vol 4 pp* 98-127.
- Dietz KJ, Baier M, Krämer U. 1999.** Free radical and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Heavy Metals Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems. N.M.V.Prasad, J.Hagemeyer, eds.Springer-Verlag, Berlin **pp**: 73-97.
- Dodd JC, Burton CC, Burns RG, Jeffries P. 1987.** Phosphatase activity associated with the root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* **107**: 163-172.
- Douds DD, Schenck NC. 1990.** Relationship of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. *New Phytologist* **116**: 621-627.

- Douds DD, Nagahashi G, Abney GD. 1996.** The differential effects of cell wall-associated phenolics, cell walls, and cytosolic phenolics of host and non-host roots on the growth of two species of Am fungi. *New Phytol* **133**: 289-294.
- Dronnet VM, Renard C, Axelos M, Thibault J-F. 1997.** Binding of divalent metal cations by sugar-beet pulp. *Carbohydr Polym* **34**: 73-82.
- Dueck TA, Visser P, Ernst WHO, Schat H. 1986.** Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae Decrease Zinc-Toxicity to Grasses Growing in Zinc-Polluted Soil. *Soil Biology & Biochemistry* **18**: 331-333.
- Ebbs S, Kochian LV. 1998.** Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*) and indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ Sci Technol* **32**: 802-806.
- El-kherbawy M, Angle JS, Heggo A, Chaney RL. 1989.** Soil pH, rhizobia and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biol.Fert.Soil* **8**: 61-65.
- Ellis RJ, Morgan P, Weightman AJ. 2003.** Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3223-3230.
- Elstner EF, Wagner GA, Schutz W. 1997.** Activated oxygen in green plants in relation to stress situations. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* **7**: 159-187.
- Entry JA, Watrud LS, Reeves M. 1999.** Accumulation of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr from contaminated soil by three grass species inoculated with mycorrhizal fungi. *Environmental Pollution* **104**: 449-457.
- EPA. 2000.** *Introduction to phytoremediation*. Cincinnati, Ohio.
- Ernst WHO. 2000.** Evolution of metal hyperaccumulation and phytoremediation hype. *New Phytologist* **146**: 357-358.
- Faber BA, Zasoski RJ, Munns DN, Shackel K. 1991.** A method for measuring hyphal nutrient and water-uptake in mycorrhizal plants. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **69**: 87-94.
- Ferrol N, Barea JM, Azcón-Aguilar C. 2002.** Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* **244**: 231-237.
- Fracchia S, Sampedro I, Scervino JM, Garcia-Romera I, Ocampo JA, Godeas A. 2004.** Influence of saprobe fungi and their exudates on arbuscular mycorrhizal symbioses. *Symbiosis* **36**: 182.
- Francis CF, Thornes JB. 1990.** Matorral: erosion and reclamation. In: Albaladejo JSMADE, ed. *Soil Degradation and Rehabilitation in Mediterranean Environmental Conditions*. CSIC, Murcia, Spain. 87-115.
- Friese CF, Allen MF. 1991.** The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia* **83**: 409-418.

- Frostegeård Å, Tunlid A, Bååth E. 1993.** Phospholipid Fatty-Acid Composition, Biomass, and Activity of Microbial Communities from 2 Soil Types Experimentally Exposed to Different Heavy-Metals. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3605-3617.
- Frostegeård A, Bååth E. 1996.** The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol Fert Soils* **22**: 59-65.
- Frostegeård A, Bååth E, Tunlid A. 1992.** Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol Biochem* **25**: 723-730.
- Gadkar V, David-Schwartz R, Nagahashi G, Douds DD, Winingar S, Kapulnik Y. 2003.** Root exudate of *pmi* tomato mutant M161 reduces AM fungal proliferation in vitro. *FEMS Microbiology Letters* **223**: 193-198.
- García C, Hernandez MT, 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.
- Garcia C, Hernandez T, Costa F, Ceccanti B. 1994.** Biochemical Parameters in Soils Regenerated by the Addition of Organic Wastes. *Waste Management & Research* **12**: 457-466.
- Garcia C, Roldan A, Hernandez T. 1997.** Changes in microbial activity after abandonment of cultivation in a semiarid Mediterranean environment. *Journal of Environmental Quality* **26**: 285-291.
- García-Gil JC, Plaza C, Soler P, Polo A. 1999.** Effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activity and microbial biomass. In: R.P.Dick, ed. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Congress; Granada, Spain, July 12-15, 1999 pp.18.
- Garcia-Romera I, Garcia-Garrido JM, Martin J, Fracchia S, Mujica MT, Godeas A, Ocampo JA. 1998.** Interactions between Saprotrophic *Fusarium* Strains and Arbuscular Mycorrhizas of Soybean Plants. *Symbiosis* **24**: 235-246.
- George E, Marschner H, Jakobsen I. 1995.** Role of arbuscular-mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Crit.Rev.Biotechnol.* **15**: 257-270.
- Gerdeman JW, Nicolson JH. 1963.** Spores of Mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Br.Mycol.Soc.* **46**: 235-244.
- Gerente C, Couspel Du Mesnil P, Andres Y, Thibault JF. 2000.** Removal of metal ions from aqueous solution on low cost natural polysaccharides: sorption mechanism approach. *React Func Polym* **46**: 135-144.
- Ghani A, Rajan SSS, Lee A. 1994.** Enhancement of Phosphate Rock Solubility Through Biological Processes. *Soil Biology & Biochemistry* **26**: 127-136.
- Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Franken P, Dumas-Gaudot E, Van Tuinen D, 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-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.*
- Gildon A, Tinker PB. 1983a.** Interactions of vesicular arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. 1. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* **95**: 247-261.
- Gildon A, Tinker PB. 1983b.** Interactions of vesicular arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. 2. The effects of infection on uptake of copper. *New Phytologist* **95**: 263-286.
- Giller K, Nussbaaum R, Chaudri AM, McGrath SP. 1993.** *Rhizobium meliloti* is less sensitive to heavy metal contamination in soil than *R. leguminosarum* bv. *trifolii* or *R. loti*. *Soil Biol. Biochem* **30**: 1389-1414.
- Giller KE, Witter E, McGrath SP. 1998.** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil. Biol. Biochem.* **30**: 1389-1414.
- Giovannetti M, Avio L, Sbrana C, Citernesi AS. 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, 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 pp 49-58.*
- Gonzalez-Chavez C, D'Haen J, Vangronsveld J, Dodd J. 1999.** Copper adsorption and accumulation by external mycelium of three arbuscular mycorrhizal fungi from polluted soils. COST 838 Meeting, Arbuscular Mycorrhizas and Plant Health under Abiotic Stress. Centre de Biologie Biologique, CNRS, Nancy **10-11 December, Abstract book, p.4.**
- Gordon SA, Weber RP. 1950.** Colorimetric estimation of indole acetic. *Plant Physiol.* **26**: 192-195.
- Gray JT, Schlesinger WH. 1983.** Nutrient use by evergreen and deciduous shrubs in southern California. *J. Ecol.* **71**: 43-56.
- Green H, Larsen J, Olsson PA, Jensen DF, Jakobsen I. 1999.** Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in root-free soil. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1428-1434.
- Gregg DJ, Boussaid A, Saddler JN. 1998.** Techno-economic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: Effect of increased cellulose yields and enzyme recycle. *Bioresource Technology* **63**: 7-12.
- Griffioen WAJ, Ietswaart JH, Ernst WHO. 1994.** Mycorrhizal Infection of An *Agrostis-Capillaris* Population on A Copper Contaminated Soil. *Plant and Soil* **158**: 83-89.
- Haars A, Chet J, Hüttermann A. 1981.** Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus*. *Eur J. For Pathol* **11**: 6-76.

- Hanif A, Yasmeen A, Rajoka MI. 2004.** Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* **94**: 311-319.
- Hartley W, Eduards R, Lepp WN. 2004.** Arsenic and heavy metal mobility in iron oxide-amended contaminated soils as evaluated by short and long term leaching tests. *Environmental Pollution* **131**: 495-504.
- Hayano K, Tubaki K. 1985.** Origin and properties of β -glucosidase activity of tomato-field soil. *Soil Biol. Biochem* **17**: 553-557.
- Heggo A, Angle JS, Chaney RL. 1990.** Effects of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Heavy-Metal Uptake by Soybeans. *Soil Biology & Biochemistry* **22**: 865-869.
- Hepper C, Warner A. 1983.** Role of organic matter in growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil. *Transaction of the British Mycological Society*. **81**: 155-156.
- Hepper CM. 1979.** Germination and growth of *Glomus caledonius* spores: The effects of inhibitors and nutrients. *Soil Biol Biochem* **11**: 269-277.
- Hepper CM, Jakobsen I. 1983.** Hyphal growth from spores of the mucorhizal fungus *Glomus caledonius*: effect of amino acids. *Soil Biol Biochem* **13**: 55-58.
- Herrera MA, Salamanca CP, Barea JM. 1993.** Inoculation of Woody Legumes with Selected Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobia to Recover Desertified Mediterranean Ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 129-133.
- Hetrick BAD, Wilson GT, Kitt DG, Schwab AP. 1988.** Effect of Soil micro-organisms on mycorrhizal contribution to growth of big Bluestem Grass in non-sterile soil. *Soil Biol Biochem* **20**: 501-507.
- Hetrick BAD, Wilson GWT, Figge DAH. 1994.** The influence of mycorrhizal symbiosis and fertilizer amendments on establishment of vegetation in heavy-metal mine spoil. *Environmental Pollution* **86**: 171-179.
- Higuchi T. 1990.** Lignin biochemistry, biosynthesis and biodegradation. *Wood.Sci.Technol.* **24**: 23-63.
- Hildebrandt U, Kaldorf M, Bothe H. 1999.** The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *J.Plant Physiol* **154**: 709-717.
- Ho I, Trappe JM. 1973.** Translocation of ^{14}C from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* **244**: 30-31.
- Hodge A, Campbell CD, Fitter AH. 2001.** An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* **413**: 297-299.
- Hooker JE, 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.

- Huang JW, Cunningham SD. 1996.** Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist* **134**: 75-84.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M. 1992.** Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* **84**: 67-72.
- Jakobsen I. Research Approaches to Study the Functioning of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizas in the Field. *Plant and Soil* **159**, 141-147. 1994.
Ref Type: Journal (Full)
- Jakobsen I, Abbott LK, Robson A. 1992.** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum*. 1: Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist* **120**: 371-380.
- Jakobsen I, Rosendahl L. 1990.** Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol.* **115**: 77-83.
- Jasper DA, Abbott LK, Robson AD.** Soil disturbance reduces the infectivity of external hyphae of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **112**, 93-99. 1989.
- Jeffries P, Barea JM. 2000.** *Arbuscular mycorrhiza, a key component of sustainable plant soil ecosystems. The Mycota IX. Fungal associations* Hock Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.
- Jeffries P, Barea JM. 2001.** *Arbuscular mycorrhiza, a key component of sustainable plant soil ecosystems. The Mycota IX. Fungal associations.* Hock Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Jeng AS, Bergseth H. 1992.** Chemical and mineralogical properties of Norwegian alum shale soils, with special emphasis on heavy metals content and availability. *Acta Agricultural Scandinavica B* **42**: 88-93.
- Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES. 1994.** Hyphal N transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels. *Plant and Soil* **160**: 1-9.
- Joner E, Jakobsen I. 1995.** Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Biol. Biochem* **27**: 1153-1159.
- Joner EJ, Briones R, Leyval C. 2000.** Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant and Soil* **226**: 227-234.
- Joner EJ, Leyval C. 1997.** Uptake of ¹⁰⁹Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae*/*Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytologist* **134**: 353-360.
- Joner EJ, Leyval C. 2001.** Time-course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes. *Biology and Fertility of Soils* **33**: 351-357.
- Juste C. 1988.** Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol. *Sci.Sol.* **26**: 103-112.

- Kabir Z, O'Halloran IP, Fyles JW, Hamel C. 1998.** Dynamics of the mycorrhizal symbiosis of corn (*Zen mays* L.): effects of host physiology, tillage practice and fertilization on spatial distribution of extra-radical mycorrhizal hyphae in the field. *Agriculture Ecosystems & Environment* **68**: 151-163.
- 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 AJ, Schöder WH, Hildebrandt U, Bothe H. 1999.** Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *J.Plant Physiol* **154**: 718-728.
- Karaca A. 2004.** Effect of organic wastes on the extractability of cadmium, copper, nickel, and zinc in soil. *Geoderma* **122**: 297-303.
- Kemper WD, Rosenau C. 1986.** *Agregate Stability and Size distribution. In: Methods of Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods (second edition). Arnold Klute (Ed). American Society of Agronomy, Inc. SOil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.*
- Kennedy AC. 1998.** The rhizosphere and spermosphere. Principles and applications of soilmicrobiology. Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (eds). *Prentice Hall, UpperSaddle River, New Jersey* pp: 389-407.
- Kennedy AC, Smith KL. 1995.** Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant soil* **170**: 75-86.
- Khalil AI. 2002.** Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete crysosporium*. Effect of solid manganese (IV) oxide. *World J.Microbiol.Biotechnol* **18**: 753-759.
- Khan AG, Kuek C, Chaudhry TM, Khoo CS, Hayes WJ. 2000.** Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* **41**: 197-207.
- Killham K, Firestone MK. 1983.** Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal deposition. *Plant soil* **72**: 39-48.
- Koomen I, McGrath SP, Giller KE. 1990.** Mycorrhizal Infection of Clover Is Delayed in Soils Contaminated with Heavy-Metals from Past Sewage-Sludge Applications. *Soil Biology & Biochemistry* **22**: 871-873.
- Koske RW, Gemma JN. 1990.** *Fungal reactions to plants prior to mycorrhizal formation. En: Mycorrhizal functioning, an integrative plant fungal process. (Ed. MJ Allen). Chapman & Hall, New York. pp 3-36.*
- Krogstad T. 1983.** Effect of liming and decomposition on chemical composition, ion exchange and heavy metal ion selectivity in sphagnum peat. *Scientific reports of the Agricultural University of Norway AAS, Norway, p. 79.*

- Kroppenstedt RM. 1985.** *Fatty acids and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. Chemical Methods in bacterial Systematics (M. Good-fellow and DE Minnikin, Eds), pp 173-199 Academic press, London.*
- Krosgtad T. 1983.** Effect of liming and decomposition on chemical composition, ion exchange and heavy metal ion selectivity in sphagnum peat. *Scientific of the Agricultural University of Norway ASS, Norway, p.79.*
- Kubikova E, Moore JL, Ownley BH, Mullen MD, Auge RM. 2001.** Mycorrhizal impact on osmotic adjustment in *Ocimum basilicum* during a lethal drying episode. *Journal of Plant Physiology* **158**: 1227-1230.
- Kucey RMN. 1983.** Phosphate-solubilising bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can.J.Soil.Sci* **63**: 671-678.
- Kucey RMN, Leggett ME. 1989.** Increased yields and phosphorus uptake by Westar canola (*Brassica napus*, L.) inoculated by a phosphate-solubilizing isolate of *Penicillium bilaji*. *Can.J.Soil.Sci* **69**: 425-432.
- Lachica M, Aguilar A, Yanez J. 1973.** Métodos analíticos en la Estación Experimental del Zaidín. *Anal.Edad.Agrobiol* **32**: 1033-1047.
- Lakane E, Erviö R. 1971.** A comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients on soil. *Acta Agr.Fenn.* **123**: 223-232.
- Larsen J, Jakobsen I. 1996.** Interactions between a mycophagous Collembola, dry yeast and the external mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* **6**: 259-264.
- Larsen J, Olsson PA, Jakobsen I. 1998.** The use of fatty acid signatures to study mycelial interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the saprotrophic fungus *Fusarium culmorum* in root-free soil. *Mycol.Res* **102**: 1491-1496.
- Larsen S. 1967.** Soil phosphorus. *Adv.Agron.* **19**: 151-210.
- Lax A, Garciaorenes F. 1993.** Carbohydrates of municipal solid-wastes as aggregation factor of soils. *Soil Technology* **6**: 157-162.
- Leyval C, Berthelin J, Schontz D, Weissenhorn I, Morel JL. 1991.** Influence of endomycorrhizas on maize uptake of Pb, Cu, Zn and Cd applied as mineral salts or sewage sludges. In: Farmer JG, ed. *Heavy metals in the environment*. Edinburgh: CEP Consultants, 204-207.
- Leyval C, Joner EJ, del Val C, Haselwandter K. 2002.** Potential or arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. In: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K, eds. *Mycorrhiza Technology in Agriculture, from Genes to Bioproducts*. London, Basel, Switzerland: Birkäuser Verlag, 175-186.
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K. 1997.** Interactions between heavy metals and mycorrhizal fungi in polluted soils: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **7**: 139-153.

- Leyval P, Binet P, Vandenkoornhuysen P, Joner E, Tonin C. 1999.** Use of AM fungi as a bioassay for soil toxicity. COST meeting, Arbuscular Mycorrhizas and Plant Health under Abiotic Stress. *Centre de Biologie Biologique, CNRS, Nancy Abstract book*, p.9.
- Li XL, 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.
- Linderman RG. 1988a.** Mycorrhizal Interactions with the Rhizosphere Microflora - the Mycorrhizosphere Effect. *Phytopathology* **78**: 366-371.
- Linderman RG. 1988b.** Mycorrhizal Interactions with the Rhizosphere Microflora - the Mycorrhizosphere Effect. *Phytopathology* **78**: 366-371.
- Linderman RG. 1994.** *Role of VAM fungi in biocontrol Mycorrhizae and plant health* (Ed. F. L. Pfleger, R. G. Linderman) APS Press, St Paul pp 1-26 1-25.
- López Gonzalez G. 1995.** *Guía Incafo de los árboles y arbustos de la península*. 5ª edición. INCAFO, Madrid.
- Lynch JM. 1987.** Utilization of lignocellulosic wastes. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 71S-83S.
- Lynch JM. 1990a.** *Some consequences of microbial rhizosphere competences for planta and soil.* In: *The Rhizosphere*. Lynch J.M. Ed West Sussex: John Willey & Sons Ltd .
- Lynch JM. 1990b.** *The Rhizosphere*. John Wiley (Ed) . *New York* p. 258.
- Lynch JM, Bragg E. 1985.** Microorganisms and soil aggregate stability. *Advance in Soil Science* 133-171.
- Mäder P, Vierheilig H, Streitwolf-Engel R, Boller T, Frey B, Christie P, Wiemken A. 2000.** Transport of ¹⁵N from a soil compartment separated by a polytetrafluoroethylene membrane to plant roots via the hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **146**: 155-161.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ. 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* **14**: 1140-1148.
- Martens DA, Frankenberger Jr. 1992.** Modification of infiltration rates in an organic-amended irrigated soil. *Agronomy Journal* **84**: 707-717.
- Mattey M. 1992.** The Production of Organic-Acids. *Critical Reviews in Biotechnology* **12**: 87-132.
- Mc Allister CB, García-Romera I, Godeas A, Ocampo JA. 1994.** In vitro interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*. *Soil Biol Biochem* **26**: 1369-1374.
- Mc Grath SP, Chaudri AM, Giller KE. 1995.** Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganism and plants. *J.Ind.Microbiol.* **14**: 94-104.

- McEldowney S, Hardman DJ, Waite S. 1993.** Treatment Technologies. In: McEldowney, S., Hardman, J., Waite, S. (Eds). *Pollution Ecology and Biotreatment Technologies*. Longman, Singapore Publishers, Singapore.
- McGonigle TP, Fitter AH. 1990.** Ecological specificity of vesicular arbuscular mycorrhizal associations. *Mycol.Res.* **94 (2)**: 120-122.
- McGonigle TP, Miller MH. 1996.** Development of fungi below ground in association with plants growing in disturbed and undisturbed soils. *Soil Biology & Biochemistry* **28**: 263-269.
- Meeting FB. 1992.** *Structure and physiological ecology of soil microbial communities*. In: *Soil Microbial Ecology, Applications in Agricultural and Environmental Management*. Ed. Metting FB. New York: Marcel Dekker, inc.pp. 3-27.
- Merharg AA, Cairney JWG. 2000.** Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their host to metal-contaminated environments. *Advances in Ecological research* **30**: 69-112.
- Metzger L, Levanon D, Mingelgrin U. 1987.** Effect of sludge on soil structural stability: microbiological aspects. *Soil Sci.Soc.Am.J.*, **51**: 346-351.
- Miller RM, Jastrow JD. 1990.** Hierarchy of root and mycorrhizal fungi interactions with soil aggregation. *Soil Biology & Biochemistry* **22**: 579-584.
- Mingorance MD. 2002.** Focused microwave-assisted digestion of vegetal materials for the determination of essential mineral nutrients. *Anal.Bioanal.Chem* **373**: 153-158.
- Mitchell JW, Brustetter BC. 1939.** Colorimetric methods for the quantitative estimation of indole-3 acetic acid. *Bot.Gaz.* **100**: 802-816.
- Monreal I. 2002.** *La cogeneración en España. Consejo Mundial de la Energía, foro regional , Mexico, pp. 25.*
- Morgan RPC, Rickson RJ, Wright W. 1990.** Regeneration of degraded soils. In: Albaladejo J, Stocking MA, Díaz E, eds. *Soil Degradation and Rehabilitation in Mediterranean Environmental Conditions*. Murcia, Spain: CSIC, 69-85.
- Mosse B. 1962.** The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *J.Gen.Microbiol.* **27**: 509-520.
- Mosse B, Hepper C. 1975.** Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiol.Plant Pathol* **5**: 215-223.
- Munier-Lamy C, Berthelin J. 1987.** Formation of polyelectrolyte complexes with the major elements Fe and Al and the trace elements U and Cu during heterotrophic microbial leaching of rocks. *Geomicrobiol* **5**: 119-147.
- Murrmann RP, Peech M. 1969.** Relative significance of labile and crystalline phosphates in soils. *Soil Science* **107**: 249-255.
- Muthukumar T, Udaiyan K. 2000.** Influence of organic manures on arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Vigna unguiculata* (L.) Walp. in relation to tissue

- nutrients and soluble carbohydrate in roots under field conditions. *Biol.Fertil.Soils* **31**: 114-120.
- Nagahashi G, Abney GD, Doner LW. 1996.** A comparative study if phenolic acids associated with cell walls and cytoplasmic extracts if host and non-host roots for AM fungi. *New Phytol* **133**: 281-288.
- Nagahashi G, Douuds DD. 2000.** Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinates spores of AM fungi. *Mycol.Res* **104**: 1453-1464.
- Nannipieri P. 1994.** The potencial use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: C.E. Pankhurst et al. (ed.) Soil biota. Management in sustainable farming systems. *CSIRO, Victoria, Australia* p **238-244**.
- Nannipieri P, Ceccanti B, Cevelli S, Matarese E. 1980.** Extraction of phosphatase, urease, protease, organic carbon and nitrogen from soil. *Soil Sci.Soc.Am.J.*, **44**: 1011-1016.
- 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, Lynch JM. 1997.** Rhizosphere soil enzymes as indicators of perturbations caused by enzyme substrate addition and inoculation of a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* on wheat seed. *Soil Biology & Biochemistry* **29**: 1353-1362.
- Navarro Cerrillo R, MartínezSuárez A. 1996.** Régimen de ayudas para fomentar inversiones forestales en explotaciones agrarias. *Junta de Andalucía, Consejería de agricultura y pesca*.
- Newman EI. 1966.** A method of estimating the total length of root in a sample. *J Appl Ecol.* **3**: 139-145.
- Nogales R, Gallardo-Lar F, Benítez E, Soto J, Hervas D, Polo A. 1997.** Metal extractability in a soil after heavy applications of either nickel, or lead in different forms. *Water.Air.SOil.Poll.* **94**: 33-44.
- Olsson PA, Francis R, Read DJ, Söderström B. 1998.** *Growth of arbuscular mycorrhizal mycelium in calcareous dune sand and its interaction with other soil microorganisms as estimated by measurement of specific fatty acids.*
- Ozanne PG. 1980.** *Phosphate nutrition of plants- A general treatise. In: The role of phosphorus in agriculture. F.E. Khasawneh, E.C.Sample, E.J. Kamprath, Eds. pp 559-589. ASA-CSSA-SSSA, Madison, W.I.*
- Parsley L. 1996.** *Operation manual, version 6. Microbial identification system, MIDI Inc., Newark, Delaware, USA, p. 219.*
- Paszczynski A, Crawford RL, Huynh V-B. 1988.** Manganese peroxidase of *Phanerochaete crysosporium*: purification. *Methods Enzymol. Meth.Enzymol.* **161**: 264-270.

- Pawlowska TE, Chaney RL, Chin L, Charvat I. 2000.** Effects of metal phytoextraction practices on the indigenous community of arbuscular mycorrhizal fungi at a metal-contaminated landfill. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2526-2530.
- Pedersen CT, Safir GR, Siqueira JO, Parent S. 1991.** Effect of phenolic compounds on asparagus micorrhiza. *Soil Biol Biochem* **23**: 491-494.
- Pennanen T, Frostegard A, Fritze H, Baath E. 1996.** Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 420-428.
- Pérez J, Hernández MT, Ramos-cormenzana A, Martínez J. 1987.** Caracterización de fenoles del pigmento del alpechín y transformación por *Phanerochaete chrysosporium*. *Grasas y Aceites* **38**: 371.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970.** Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesiculararbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**, 159161.
- Porcel R, Barea JM, Ruiz-Lozano JM. 2003.** Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytologist* **157**: 135-143.
- Proietti P, Palliotti A, Tombesi A, Cenci G. 1995.** Chemical and microbiological dosifications of two different cultivated soils induced by olive oil waste water administration. *Agricoltura Mediterranea* **125**: 160-171.
- Qian Y, Castranova V, Shi X. 2003.** New perspectives in arsenic-induced cell signal transduction. *Journal of Inorganic Biochemistry* **96**: 271-278.
- Rao AV, Tarafdar JC. 1993.** Role of VAM fungi in nutrient uptake and growth of clusterbean in an arid soil. *Arid Soil Research and Rehabilitation* **7**: 275-280.
- Raskin I, Smith RD, Salt DE. 1997.** Phytoremediation if metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* **5**: 285-290.
- Ratledge C, Wilkinson SG. 1988.** *Microbial lipids Volume 1, Academic Press, New York.*
- Ravnskov S, Larsen J, Olsson PA, Jakobsen I. 1999.** Effects of various compounds on growth and phosphorus uptake if an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **141**: 517-524.
- Reddad Z, Gerente C, Andres Y, Ralet M-C, Thibault J-F, Le Cloirec P. 2002.** Ni (II) and Cu (II) binding properties of native and modified sugar beet pulp. *Carbohydr Polym* **49**: 23-31.
- Reinersten SA, Elliot LF, Cochran VL, Campbell GS. 1984.** Role of available carbon and nitrogen in determining the role of what straw decomposition. *Soil Biol.Biochem* **16**: 459-464.

- Requena N, Perez-Solis E, Azcon-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM. 2001.** Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 495-498.
- Richards LA. 1954.** *Diagnosis and improvements of saline and alkaline soils.* Agriculture handbook, N° 60. U.S. Dept. Agric. Washington.
- Rodriguez R, Vassilev N, Azcón R. 1999.** Increases in growth and nutrient uptake of Alfalfa grown in soil amended with microbially-treated sugar beet waste. *Applied Soil Ecology* **11**: 9-15.
- Roldan A, Albaladejo J. 1994.** Effect of mycorrhizal inoculation and soil restoration on the growth of *Pinus-Halepensis* seedlings in a semiarid soil. *Biology and Fertility of Soils* **18**: 143-149.
- Roldán A, Albaladejo J, Thornes JB. 1996.** Aggregate stability changes in a semiarid soil after treatment with different organic amendments. *Arid Soil Res.Rehabil.* **10**: 139-148.
- Roldán A, Díaz G, Albaladejo J. 1992.** Effect of VAM-fungal inoculation on growth and phosphorus uptake of two *Hedysarum* species in a Xeric Torriorthent soil from southeast Spain. *Arid Soil Research and Rehabilitation* **6**: 33-39.
- Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM. 2002.** Cadmium induces the oxidate modification of proteins in pea plants. *Plant Cell and Environment* **25**: 677-686.
- Rosen PB. 2002.** Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comparative Biochemistry and Physiology* **133**: 689-693.
- Ruíz-Lozano, J.M., Azcón R. 2000.** 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. 2003.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* **13**: 309-317.
- Russell EW. 1980.** *Soil conditions & plant growth 10th ed.* Longman, London.
- Safir GR, Boyer JS. 1971.** Mycorrhizal Enhancement of Water Transport in Soybean. *Science* **172**: 581-&.
- Safir GR, Boyer JS, GERDEMAN.JW. 1972.** Nutrient Status and Mycorrhizal Enhancement of Water Transport in Soybean. *Plant Physiology* **49**: 700-&.
- Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I. 1995.** Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* **13**: 468-474.
- Salt DE, Smith RD, Raskin I. 1998.** Phytoremediation. *Annual Review of Plant physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 643-668.

- Sasser M. 1990.** Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: *Methods in phytobacteriology* (Klement Z, Rudolph K and Sands DC, Eds), pp. 199-203 Akademiai Kiado, Budapest.
- Sauerbeck D. 1987.** Effects of agricultural practices on the physical, chemical and biological properties of soils : Part II - Use of sewage sludge and agricultural wastes. In: Banth H, L'Hermite P, eds. *Scientific basis for soil protection in the European Community*. Elsevier: London, 181-210.
- Schellembaum L, Müller J, Boller T, Wienken A, Schüepp H. 1998.** Effects of drought on non-mycorrhizal and mycorrhizal maize: changes in the pools of non-structural carbohydrates, in the activities of invertase and trehalase, and in the pools of amino acids and imino acids. *New Phytologist* **138**: 59-66.
- Schüepp H, Dehn B, Sticher H. 1987.** Interaktionen zwischen VA-Mycorrhizen und Schwermetallbelastungen. *Angew.Bot.* **61**: 85-95.
- Schützendübel A, Polle A. 2002.** Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1351-1365.
- Schüßler A, Schwarzott D, Gehrigh H, Walker C. 2001a.** 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. 2001b.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution . *Mycological Research* **105**: 1413-1421.
- Schwab SM, Menge JA, Tinker PB. 1991.** Regulation of nutrient transfer between host and fungus in vesicular arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* **117**: 387-398.
- Secilia J, Bagyaraj DJ. 1987.** Bacteria and actinomyces associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Can.J.Microbiol.* **33**: 1069-1073.
- Shetty KG, Hetrick BAD, Figge DAH, Schwab AP. 1994.** Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mine spoil. *Environ Pollut* **86**: 181-188.
- Sieverding E. 1991.** *Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems*. GTZ, Eschborn, Germany pp. 371.
- Skujins J. 1976.** Extracellular enzymes in soil. *Crit.Rev.Biotechnol* **4**: 383-421.
- Slezack S, Dumas-Gaudot E, Paynot M, Gianinazzi S. 2000.** Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*? *Mol.Plant Microb.Interact.* **13**: 238-241.
- Smith FA, Jakobsen I, Smith SE. 2001.** Spatial differences in acquisition of soilphosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytol.* **147**: 357-366.

- Smith FA, Smith SE. 1997.** Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytol* **137**: 373-388.
- Smith L, Papendick R. 1993.** Soil organic matter dynamics and crop residue management. In: Baline Meeting, ed. *Soil Microbial Ecology*. New York: Marcer Dekker, 65-94.
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V. 1988.** Physiological interactions between symbiosis in vesicular arbuscular mycorrhizal plants. *Ann.R.Plant.Physiol.Plant Mol.Biol.* **39**: 221-244.
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V. 1990.** Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. Effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Aus J Plant Physiol* **17**: 177-188.
- Smith SE, Read DJ. 1997a.** *Mycorrhizal Symbiosis*. San Diego: Academic Press.
- Smith SE, Read DJ. 1997b.** *Smith SE & Read DJ (Eds.) Mycorrhizas symbiosis*. Academic Press, London UK.
- Speir TW, Ross DJ. 1978.** Soil phosphatase and sulphatase. In: Soil Enzymes (Burns, RG, Ed.). *Academic Press, London* pp. 176-250.
- St Arnaud., Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA. 1996.** Enhanced hyphal growth and spore productoon of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycol.Res* **3**: 328-332.
- St John TV, Coleman DC, Reid CPP. 1983.** Association of vesicular-arbuscular mycorrhizal hyphae with organic particles. *Ecology* **64**: 957-959.
- Stewart JWB, Sharpley AN. 1987.** Controls on dynamics of soil and fertilizer phosphorus and sulfur. In: *Soil Fertility and Organic matter as critical componenst on production systems*. Soil Science Society of America, St. Paul, MN.
- Subramanian KS, Charest C. 1998.** Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. *Physiologia Plantarum* **120**: 285-296.
- Tabatabai A. 1994.** Soil Enzymes. In: S.H.Mickelson and J.M., ed. *Microbiological and Biochemical Properties*.
- Tarafdar JC, Marschner H. 1994.** Phosphatase-Activity in the Rhizosphere and Hyphosphere of Va Mycorrhizal Wheat Supplied with Inorganic and Organic Phosphorus. *Soil Biology & Biochemistry* **26**: 387-395.
- Technicon. 1974.** Autoanalyzer II. Continuous-flow analytical instrument. *Technical publication UA, 010A00, Technicon, New York*.
- Tennant D. 1975.** A test of a modified line intersect method of estimatinf root length. *J.Ecol.* **63**: 995-1001.
- Tien M, Kirk TK. 1983.** Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete Phanerochaete-Chryso sporium Burds. *Science* **221**: 661-662.

- Tien M, Kirk TK. 1988.** Lignin peroxidase of *Phanerochaete cryosporium*. *Meth.Enzymol.* **161:** 238-249.
- Tobar R, Azcón R, Barea JM. 1994a.** Improved nitrogen uptake and transport from ¹⁵N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytologist* **126:** 119-122.
- Tobar RM, Azcón R, Barea JM. 1994b.** Improved nitrogen uptake and transport from N¹⁵-labeled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytologist* **126:** 119-122.
- Tonin C, Vandenkoornhuyse P, Joner E, Straczek J, Leyval C. 2001.** Diversity of AM fungi in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza* **10:** 161-168.
- Trevors JT. 1984.** Dehydrogenase activity in soil. A comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biol.Biochem.* **16:** 673-674.
- Trouvelot A, Fardeau JC, Plenchett C, Gianinazzi S. 1986.** Nutritional balance and symbiotic expression in mycorrhizal wheat. *Physl. Veget.* **24,** 300. *Physl.Veget* **24:** 300.
- Turnau K, Kottke I, Oberwinkler F. 1993.** Element localisation in mycorrhizal roots of *Pteridium aquilinum* (L.) Kunh collected from experimental plots treated with cadmium dust. *New Phytologist* **123:** 465-472.
- Turnau K, Miszalski Z, Trouvelot A, Bofante P, Gianinazzi S. 1996.** *Oxalis acetosella* as a monitoring plant on highly polluted soils. In: Mycorrhizae in Integrated Systems. From genes to Plant development. (Eds. C. Azcón-Aguilar & J.M. Barea). *European Commission, Luxemburg pp:* 483-486.
- van Tichelen KK, Colpaert JV, van Assche JA. 1996.** Development of arbuscular mycorrhizal in a heavy metal contaminated soil amended with a metal immobilizing substance. In: Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M. (eds) Mycorrhizae in integrated systems, from genes to plant development. *European Commission, Luxemburg pp:* 479-482.
- Vance CP. 2001.** Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol.* **127:** 390-397.
- Vassilev N, Baca MT, Vassileva M, Franco I, Azcón R. 1995.** Rock-phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium. *Applied Microbiology Biotechnology* **44:** 546-549.
- Vassilev N, Franco I, Vassileva M, Azcón R. 1996.** Improved plant growth with rock phosphate solubilized by *Aspergillus niger* grown on sugarbeet waste. *Bioresource Technology* **55:** 237-241.
- Vassilev N, Toro M, Vassileva M, Azcón R, Barea JM. 1997.** Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions. *Bioresource Technology* **61:** 29-32.
- Vassilev N, Vassileva M. 1992.** Production of organic-acids by immobilized filamentous fungi. *Mycological Research* **96:** 563-570.

- Vassilev N, Vassileva M, Azcon R, Medina A. 2001a. Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarowia lipolytica* in a soil-plant system. *Journal of Biotechnology* **91**: 237-242.
- Vassilev N, Vassileva M, Azcon R, Medina A. 2001c. Interactions of an arbuscular mycorrhizal fungus with free or co-encapsulated cells of *Rhizobium trifoli* and *Yarowia lipolytica* inoculated into a soil-plant system. *Biotechnology Letters* **23**: 149-151.
- Vassilev N, Vassileva M, Azcon R, Medina A. 2001b. Interactions of an arbuscular mycorrhizal fungus with free or co-encapsulated cells of *Rhizobium trifoli* and *Yarowia lipolytica* inoculated into a soil-plant system. *Biotechnology Letters* **23**: 149-151.
- Vassilev N, Vassileva M, Azcon R, Medina A. 2001d. Preparation of gel-entrapped mycorrhizal inoculum in the presence or absence of *Yarowia lipolytica*. *Biotechnology Letters* **23**: 907-909.
- Vassileva M, Azcón R, Barea JM, Vassilev N. 2000. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarowia lipolytica*. *Process Biochemistry* **35**: 693-697.
- Vidal MT, Azcón-Aguilar C, Barea JM. 1996. Effect of heavy metals (Zn, Cd and Cu) on arbuscular mycorrhiza formation. C. Azcón-Aguilar, J.M. Barea, eds. Mycorrhizas in Integrated Systems: from genes to Plant development. Luxembourg: European Commission, EUR 16728 pp: 487-490.
- Vivas A, Azcon R, Biro B, Barea JM, Ruiz-Lozano JM. 2003a. Influence of bacterial strains isolated from lead-polluted soil and their interactions with arbuscular mycorrhizae on the growth of *Trifolium pratense* L. under lead toxicity. *Canadian Journal of Microbiology* **49**: 577-588.
- Vivas A, Barea JM, Azcon R. 2005b. Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae*, both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil. *Environmental Pollution* **134**: 257-266.
- Vivas A, Barea JM, Azcon R. 2005c. Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae*, both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil. *Environmental Pollution* **134**: 257-266.
- Vivas A, Barea JM, Azcon R. 2005a. Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae*, both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil. *Environmental Pollution* **134**: 257-266.
- Vivas A, Barea JM, Biro B, Azcon R. 2006. Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 587-598.
- Vivas A, Vörös A, Biró B, Barea JM, Ruiz-Lozano JM, Azcón R. 2003b. 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.

- Wacker TL, Safir GR, Stephens CT. 1990.** Effects of ferulic acid on *Glomus fasciculatum* and associated effects on phosphorus uptake and growth of asparagus (*Asparagus officinalis*, L.). *J.Chem.Ecol.* **16**: 901-909.
- Wei QF, Lowery B, Peterson AE. 1985.** Effect of Sludge Application on Physical-Properties of A Silty Clay Loam Soil. *Journal of Environmental Quality* **14**: 178-180.
- Weissenhorn I, Glashoff A, Leyval C, Berthelin J. 1994.** Differential Tolerance to Cd and Zn of Arbuscular Mycorrhizal (Am) Fungal Spores Isolated from Heavy Metal-Polluted and Unpolluted Soils. *Plant and Soil* **167**: 189-196.
- Weissenhorn I, Leyval C. 1996.** Spore germination of arbuscular mycorrhizal fungi in soils differing in heavy metal content and other parameters. *European Journal of Soil Biology* **32**: 165-172.
- Weissenhorn I, Leyval C, Belgy G, Berthelin J. 1995a.** Arbuscular Mycorrhizal Contribution to Heavy-Metal Uptake by Maize (*Zea-Mays* L) in Pot Culture with Contaminated Soil. *Mycorrhiza* **5**: 245-251.
- Weissenhorn I, Leyval C, Berthelin J. 1993.** Cd-Tolerant Arbuscular Mycorrhizal (Am) Fungi from Heavy-Metal Polluted Soils. *Plant and Soil* **157**: 247-256.
- Weissenhorn I, Leyval C, Berthelin J. 1995b.** Bioavailability of heavy-metals and abundance of arbuscular mycorrhiza in a soil polluted by atmospheric deposition from a smelter. *Biology and Fertility of Soils* **19**: 22-28.
- Weller DM, Thomashow LS. 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, Weinheim* pp: 1-13.
- Wilkinson DM, Dickinson NM. 1995.** Metal resistance un trees: the role of mycorrhizae. *Oikos* **72**: 298-300.
- Wilkinson SG. 1988.** *Gram-negative bacteria In: Microbial lipids Volume 1 (eds C. Ratledge, SG Wilkinson), Academic Press, New York pp 299-488.*
- Williams PG. 1992.** Axenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi. *Methods Microbiol* **24**: 203-220.
- Williamson JC, Johnson DB. 1991.** Microbiology of soils at opencast coal sites. II Population transformations occurring following land restoration and the influence of ryegrass/fertilizer amendments. *J Soil Sci.* **42**: 9-15.
- Wilson JM. 1984.** Comparative development of infection by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* **97**: 413-426.
- Wingren A, Galbe M, Zacchi G. 2003.** Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress* **19**: 1109-1117.

- Witter E, Martensson AM, Garcia FV. 1993.** Size of the soil microbial biomass in a long-term field experiment as affected by different N-fertilizers and organic manures. *Soil.Biol.Biochem* **25**: 659-669.
- Wöhler I. 1997.** Auxin-indole derivates in soils determined by colorimetric method and by high performance liquid chromatography. *Microbiol.Res* **152**: 399-405.
- Wright SF, Upadhyaya A. 1998.** A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant soil* **198**: 97-107.
- Zabel RA, Morrell JJ. 1992.** *Wood microbiology: decay and its prevention*. Academic Press, London and New York.
- Zelles L. 1997.** Phospholipid fatty acid profiles in selected member of soil microbial communities. *Chemosphere* **35**: 275-294.
- Zhao Y, Li W, Zhou Z, Wang L, Pan Y, Zhao L. 2005.** Dynamics of microbial community structure and cellulolytic activity in agricultural soil amended with two biofertilizers. *European Journal of Soil Biology* **41**: 21-29.