



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE QUÍMICA

***Obtención de bioestimulantes orgánicos
edafológicos mediante procesos enzimáticos.
Estudios de funcionalidad ambiental.***

TESIS DOCTORAL

Ana María García Martínez

Sevilla, 2009



**DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFÍA, MINERALOGÍA Y
QUÍMICA AGRÍCOLA**

FACULTAD DE QUÍMICA

***Obtención de bioestimulantes orgánicos edafológicos
mediante procesos enzimáticos.
Estudios de funcionalidad ambiental.***

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

Ana María García Martínez

Para optar al grado de Doctor.

Tesis realizada bajo la dirección de:

Dr. Juan Parrado Rubio

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla

Dr. Manuel Tejada Moral

Dpto. Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola, Universidad de Sevilla

Universidad de Sevilla

Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola

Facultad de Química

C/Profesor García González, 1

41.012 Sevilla (España)

Tlf. 954557141 Fax: 954557140



Sevilla, 27 de Octubre de 2009

Dr. Juan Parrado Rubio, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Sevilla, y

Dr. Manuel Tejada Moral, Profesor Titular del Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Facultad de Química, de la Universidad de Sevilla,

Certifican que:

Dña. Ana María García Martínez, Licenciada en Ciencias Biológicas y en Bioquímica por la Facultad de Biología, de la Universidad de Sevilla, ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación **“Obtención de bioestimulantes orgánicos edafológicos mediante procesos enzimáticos. Estudios de funcionalidad ambiental”**, y que reúne las condiciones necesarias para ser presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo.: Dr. Juan Parrado Rubio

Fdo.: Dr. Manuel Tejada Moral

A mis padres

"Para escribir sólo hay que tener algo que decir".

Camilo José Cela

"Ayudadme a comprender lo que os digo y os lo explicaré mejor".

Antonio Machado

"Todo aquel que tiene una razón para vivir puede soportar cualquier forma de hacerlo".

Friedrich Nietzsche

"En tiempos de crisis la imaginación es más efectiva que el intelecto".

Albert Einstein

"Camino sin ver el final y el paso que aún no he dado ya está atrás...

...estoy llegando...

¿O he llegado ya?".

Antonio Vega

"No hay deber más necesario que el de dar las gracias".

Cicerón

La realización de una Tesis Doctoral es una experiencia intensa, llena de momentos y vivencias, a veces, de gran dificultad, que compartes con un gran número de personas, que, directa o indirectamente, han participado en el trabajo realizado. Es justo reconocer que sin su participación y su ayuda hubiera sido imposible realizarlo.

En primer lugar, quiero dar las gracias al Dr. Juan Parrado Rubio, por aceptarme en su grupo y por invitarme a realizar esta Tesis Doctoral. Su enorme "dosis" de optimismo, espíritu científico y creatividad son, sin duda alguna, el motor del grupo y el impulsor de este trabajo. Sin él, no se habría desarrollado. Muchas gracias.

También, quiero agradecer al Dr. Manuel Tejada Moral el apoyo y el interés mostrado durante estos años. Esa energía "desbocada" que le caracteriza suele ser contagiosa. Muchas gracias.

No quiero tardar más en nombrar y en agradecer todo el apoyo, el cariño y la formación recibida (aunque aprobé en Septiembre, tuve la oportunidad de aprender mucho más durante estos años en el laboratorio) al Dr. Juan D. Bautista Palomas, nuestro "Excelentísimo" Catedrático. Creo que es una suerte para mí haberle conocido más allá de sus clases de Enzimología, porque he podido conocer y apreciar su gran calidad humana. Muchas gracias Juan.

Y, ahora,... ¿por dónde empiezo?

Me viene a la cabeza mi compañero Seba. Para empezar, porque fue el que me hizo la llamada telefónica más importante que he recibido en los últimos años. Gracias por acordarte de mí. Sin embargo, mi gratitud no se limita a esto, claro, ni tampoco a los momentos de risas que provoca en todo el laboratorio con su millón de ocurrencias. Mi gratitud va más allá, por estar siempre dispuesto a prestarme ayuda y a transmitirme sus conocimientos, que, en la mayoría de los casos, me han sacado de un aprieto. Gracias por ser un gran amigo y compañero.

A mis amigas, Mari Paz (Dra.) y Cristina (Dra.), que, para mí, van siempre juntas. Sin ellas, esta Tesis no habría sido posible. Ellas, años antes, también, se acordaron de mí y abrieron el camino... Son muchas cosas las que debo agradecerles, tantas...pero ellas ya saben lo que las quiero y lo mucho que las echo de menos. Muchas gracias a las dos.

El día a día se lo debo agradecer (o pedir daños y perjuicios) a mi compañero de fatigas...Bruno. Creo que, en mi vida, le he regañado tanto a nadie. Supongo que porque no tengo hermanos menores que yo. He pasado con él más tiempo que con nadie y, al final de todo, creo que se ha convertido en mi confesor y psicoanalista...Tiene el don de solucionarlo todo en el bar con una, dos, tres...cervezas...y suele funcionar. Muchas gracias Bruno, por tu apoyo y ayuda, especialmente, en la finalización de la Tesis. A veces no te lo puse fácil...pero es que... Bruno... ¡¡¡ te corre horchata por la venas !!! Mucho ánimo para tí, que estas en los inicios. Espero servirte de ayuda, tanto o más de lo que tú me has ayudado. Eres el alma del grupo. Todos en el laboratorio, béticos y sevillistas, tenemos que agradecerte que nos recuerdes que el Betis, este año, ganó el Carranza... ¿o era el Colombino? Por cierto, ¡¡¡ "musho" Betis !!!

También, en el día a día, he tenido la suerte de trabajar con Kike. Trabajar con música es más fácil, trabajar con buena música es como no trabajar. Gracias por todo. A Mamen (Dra.), dispuesta a ayudarme y escucharme en todo momento. Mil gracias.

Con el Campus de por medio, siempre he contado con el apoyo de mis compañeras, las niñas de Bautista: María del Mar, Pili, Bea y la "Ilma." Dra. Olga, la Cremades. Siempre tan trabajadoras y, aún así, siempre tan atentas para ayudarme. Muchísimas gracias. No cambiéis nunca.

Por otro lado, a pesar de que una de las cualidades de Juan Bautista es que siempre se rodea de chicas y siempre guapas, todo sea dicho de paso, un día le abrió las puertas del laboratorio a JuanFran (un mal día lo tiene cualquiera). Ya llevo años conociendo a JuanFran (Dr.) y siempre ha sido un ejemplo de esfuerzo y trabajo para mí. Tengo que agradecerle todo su apoyo constante y sus buenos consejos. Somos la pareja más conocida los viernes en la cafetería de Farmacia y eso da tiempo a dar muchos "consejos" ¡je! Graciassssssssss.

Aunque ya no disfrutamos de su presencia diaria en el laboratorio, otros compañeros, también, han sido parte importante de este trabajo y debo agradecerles su aportación: Eduardo, Vicente (mi señor "esposo"), María Jover (Dra.) y Laura Collantes (Dra.).

Al otro lado de la pared, tras la FPLC, donde he pasado tantos ratos, se encuentran el Dr. Javier Vitorica y las Dras. Elisa Revilla y Consuelo Santamaría. Tuve el placer de trabajar con ellos bajo la dirección de Javier. Aprendí, sobre todo, lo que significaba trabajar en un laboratorio y la necesidad de dar lo mejor de uno día tras día, aunque no siempre eso signifique obtener resultados. Gracias Javier por la oportunidad (y el termociclador) y, sobre todo, por estar siempre disponible. A Elisa y Consuelo es ahora cuando las estoy conociendo más, ahora cuando necesito más apoyo y ánimo. Gracias a las dos.

Y tras los despachos...vosotros: Manuel, Cristina, María Luisa, Elena e Irene (Dra.). Manuel, guapo por fuera y por dentro. Gracias por el apoyo, gracias por los ánimos, gracias por echarme una mano siempre,... Cris, morena. Ya quisieran muchos tenerte de compañera...Muchas gracias, también, por todo, especialmente, por abrirte y dejarnos verte por dentro. María Luisa, gracias por la ayuda prestada y por escucharme en los momentos de mayor estrés. Elena, la 2ª de los Gavilanes que tengo el placer de conocer. Eres única y eso es de agradecer. Irene, gracias por los consejos que vienen de la experiencia.

En un despachito, pequeñito, están los cuñados, Angélica (Dra.) y Diego (Dr.). A Angélica no tengo más remedio que estarle, eternamente, agradecida. Siempre pendiente de los demás y siempre con buenos consejos que dar. Muchas, muchas gracias. A Diego por compartir tantas horas en el laboratorio y siempre con buenos ánimos.

Un poco más atrás, Marisa (Dra.), por compartir horas de laboratorio y transmitirnos a todos que no tengamos hijos. Nadie te cree...tienes tres. Muchas gracias por el interés y los ánimos.

Y más allá: gracias a los compañeros por una cosa tan simple como los buenos días o las buenas tardes. Gracias, especialmente, a Miguel Ángel, Ruth, María José y Manolo, porque son más que un saludo.

A los alumnos internos: Ana Cañete, Jose, Pablo (para mí, Pedro Antonio), Carmen y Santi. Porque me han ayudado mucho, desinteresadamente. Gracias. Suerte.

A los peritos: Javi, Dani "Marqués", Carmen y Juanma. Ha sido un placer trabajar con vosotros y ayudaros en lo que pude. Muchas gracias.

A Mohammed Dary y a sus compañeros del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Farmacia, por su constante colaboración y, en especial, por su ayuda en el mundo de las técnicas moleculares y, en especial, del DGGE.

A Belén Gordillo, Félix Moreno, las Dras. Lourdes González-Miret y M^a Luisa Escudero y el Dr. Francisco Heredia, por su amabilidad, generosidad y simpatía desde el principio. ¡¡¡ Dais color y calidad !!!

A Dani Pérez "Melendi", que llegó al final de este trabajo, pero se ha quedado con nosotros. Muchas gracias por tus ánimos constantes. Espero verte en Burgos un día de estos.

A Ana Díaz, de la Fundación Gaiker, por su infinita colaboración en este trabajo. Sin su aportación, esta Tesis no se habría realizado. Gracias por todo.

También, fuera del ámbito de la investigación, existen personas cuya ayuda ha sido, sumamente, importante para mí:

Muchas gracias a Loli y Miguel, por hacerme ver que la vida está para disfrutarla, sobre todo, con un buen vino y un buen queso, y, siempre, rodeado de amigos. Esas fiestas en el laboratorio... eso, eso sí es vida.

A mis amigas del instituto: Silvia, Paqui y Vanessa. Me siento unida a ellas y este trabajo es, en parte, suyo. Muchas gracias por estar ahí, siempre, pase el tiempo que pase.

Gracias a todos los amigos que encontré en el camino, que mostraron tanto interés (bioestimulantes orgánicos...¿¿qué es eso??). Gracias, especialmente, a Ana Bru, por su continuo aliento en la distancia y su enorme afecto y a Cristina Velis, de Guatemala, porque ha sido un gusto conocerla y trabajar con ella recogiendo

piedrecitas... A todos los amigos que vía internet (vamos... los "facebookadictos") os habéis levantado conmigo... pero os habéis acostado antes que yo... gracias por los mensajes de ánimo. Sobre todo a Elena, por su comprensión y consuelo en los momentos más duros. Dame agua, que yo te doy pan... Siento no nombraros a todos. A pesar de eso... miles y miles de gracias, porque si he acabado... es por vosotros.

A la familia Hansen, porque son mi otra familia. Por estar siempre pendientes. Por nunca olvidarme, después de tanto tiempo. Por demostrar, día a día, que el cariño, la amistad y el amor no entiende de distancia ni de idiomas (menos mal, porque a ver quién aprende danés). Especialmente, quiero agradecerle a Michelle su amistad, su ayuda, su amabilidad,... Eres mi hermana, bueno, alta y rubia, pero mi hermana en el corazón, ya los sabes. Gracias. Ánimo. Suerte.

A la familia Isidro-Sánchez, por acogerme en su bonita familia y hacerme sentir una más, por el cariño y la comprensión. Espero que sientan esta Tesis como parte suya.

A Antolín, el que comparte el camino conmigo. Siempre agradecida estoy por la mano que me tiendes al caminar, por tu abrazo reparador y por los besos en mi frente. Porque uno y uno no son siempre dos.

A mi hermana Aurora, ejemplo de esfuerzo, disciplina y empeño. Por demostrar, día a día, que trabajar duro sí merece la pena y por hacer el mundo un poco más justo. Gracias por los ánimos que siempre me has dado, gracias por ser mi hermana mayor.

A mis padres, Paco y Ana María. Por la lucha y el esfuerzo. Por apoyarme en mis decisiones, por facilitarme, constantemente, el camino. Y, sobre todo, por su amor incondicional, qué es verdad que existe. Y es enorme. Por todo. Muchas gracias.

Y ahora... "Ya pueden agitarse las ramas del árbol donde vivo y susurrarme que todo es nada..."

Gracias a todos.

Índice

ÍNDICE

PRÓLOGO	1
1. ANTECEDENTES.....	3
2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	7

CAPÍTULO I:

Producción de bioestimulantes edafológicos mediante un proceso enzimático a partir de distintos subproductos orgánicos agroindustriales

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Subproductos orgánicos agroindustriales.....	15
1.2. Industrias productoras de subproductos orgánicos agroindustriales	16
1.2.1. Industria de producción de bioetanol	16
1.2.1.1. Proceso de producción de bioetanol	18
1.2.1.2. Tipos de subproductos orgánicos y aplicaciones comerciales	21
1.2.2. Industria alimentaria: producción de harinas de algarroba.....	23
1.2.2.1. Proceso de producción de harinas de algarroba	24
1.2.2.2. Tipos de subproductos orgánicos y aplicaciones comerciales	25
1.2.2.2.a. Harina de germen de algarroba.....	27
1.3. Hidrólisis de proteínas	27
1.3.1. El enlace peptídico.....	28
1.3.1.1. Propiedades del enlace peptídico	29
1.3.2. Química de la ruptura del enlace peptídico.....	30
1.3.3. Hidrólisis enzimática	31
1.3.3.1. Etapas de la hidrólisis enzimática.....	31
1.3.4. Enzimas hidrolíticas	32
1.3.4.1. Tipos de proteasas comerciales	35
1.3.4.2. Producción de proteasas mediante fermentación microbiana	36
1.4. Hidrolizados enzimáticos: Biofertilizantes/Bioestimulantes.....	38
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1. SOA seleccionados	47
3.2. Caracterización química de los SOA y los BSE.....	48

3.2.1. Determinación de MO	48
3.2.2. Determinación de carbohidratos totales.....	48
3.2.3. Determinación de nitrógeno total y proteínas totales	49
3.2.4. Determinación de grasas totales	49
3.2.5. Determinación de cenizas.....	50
3.2.6. Determinación de micronutrientes	50
3.3. Determinación de la solubilidad de las proteínas de los SOA y los BSE	50
3.4. Caracterización proteica de los SOA y los BSE.....	51
3.4.1. Composición aminoacídica	51
3.4.1.1. Hidrólisis ácida	51
3.4.1.2. Derivatización	52
3.4.2. Caracterización por pesos moleculares mediante cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular.....	53
3.5. Producción de proteasas	58
3.5.1. Microorganismos y medios de fermentación	58
3.5.1.1. Microorganismos y preparación del inóculo	58
3.5.1.2. Medios fermentativos	58
3.5.2. Sistemas de fermentación	59
3.5.3. Condiciones operacionales.....	59
3.5.4. Determinación de la actividad proteásica.....	60
3.5.5. Morfología celular.....	61
3.5.5.1. Microscopía óptica	61
3.5.5.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)	61
3.5.6. Estudios proteómicos: huella proteica de las fermentaciones	62
3.5.6.1. Precipitación de proteínas.....	62
3.5.6.2. Identificación de proteínas.....	62
3.6. Hidrólisis enzimática controlada	64
3.6.1. Técnica pH-stat.....	64
3.6.2. Biorreactor	65
3.6.3. Condiciones operacionales.....	66
3.7. Tratamiento estadístico.....	67
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
4.1. Selección y caracterización de los SOA.....	71
4.1.1. Caracterización química de los SOA	72
4.1.2. Caracterización proteica de los SOA.....	75
4.1.2.1. Composición aminoacídica de WCDS y CG	75

4.1.2.2. Caracterización por pesos moleculares de las proteínas solubles de WCDS y CG.....	77
4.1.3. Discusión	81
4.2. Producción de proteasas, obtención de BSE mediante hidrólisis enzimática	
A partir de los SOA seleccionados y caracterización de los BSE	84
4.2.1. Producción de proteasas.....	85
4.2.1.1. Substrato fermentativo	85
4.2.1.2. Caracterización química de PA.....	85
4.2.1.3. Elaboración de los medios de fermentación a partir de PA.....	86
4.2.1.4. Estudio de producción de proteasas	86
4.2.1.5. Estudio microscópico de los caldos de fermentación	90
4.2.1.6. Estudio proteómico de los caldos de fermentación	92
4.2.2. Producción de BSE mediante hidrólisis enzimática	95
4.2.2.1. Proceso de hidrólisis enzimática.....	95
4.2.3. Caracterización de los BSE	100
4.2.3.1. Caracterización química de los BSE.....	100
4.2.3.2. Caracterización proteica de los BSE.....	103
4.2.3.2.a. Composición aminoacídica de WCDS-HE y CGHE.....	103
4.2.3.2.b. Caracterización por pesos moleculares de WCDS-HE y CGHE.....	104
4.2.4. Discusión	108
5. CONCLUSIONES	117

CAPÍTULO II:

Evaluación del potencial bioestimulante de los hidrolizados enzimáticos WCDS-HE y CGHE

1. INTRODUCCIÓN.....	123
1.1. El suelo.....	123
1.1.1. Funciones del suelo	123
1.2. Concepto de calidad del suelo.....	124
1.2.1. Parámetros de calidad del suelo	126
1.2.1.1. Textura y estructura del suelo.....	126
1.2.1.2. Fertilidad y MO del suelo (MOS).....	129
1.2.1.2.a. Características de la MOS.....	130
1.2.1.2.b. Funciones de la MOS	130
1.2.1.3. Actividad biológica: poblaciones microbianas del suelo	131

1.3. Procesos de bioestimulación edafológica	133
1.3.1. Aspectos generales.....	133
1.3.2. Concepto de bioestimulación edafológica (BE).....	133
1.3.3. Bioestimulantes Edafológicos (BSE)	134
1.3.3.1. Tipos de Bioestimulantes Edafológicos (BSE).....	134
1.4. Modelo de monitorización y evaluación de un proceso de bioestimulación....	137
1.4.1. Bioindicadores generales.....	139
1.4.1.1. Diversidad de las comunidades microbianas: cuantificación de microorganismos del suelo.....	139
1.4.1.2. Diversidad de las comunidades microbianas: determinación de la biodiversidad genética	142
1.4.1.2.a. Electroforesis en gel de gradiente químico desnaturalizante (DGGE).....	144
1.4.1.3. Determinación del contenido de ergosterol del suelo	147
1.4.2. Bioindicadores específicos	149
1.4.2.1. Actividades enzimáticas del suelo	149
1.4.2.1.a. Actividad deshidrogenasa (ADH)	150
1.4.2.1.b. Actividad fosfatasa (APH).....	152
1.4.2.1.c. Actividad β -glucosidasa (AG)	154
1.4.2.2. Estimación de la producción y el contenido de ATP en suelo	155
2.OBJETIVOS	161
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	165
3.1. Suelo experimental	165
3.2. Caracterización físico-química del suelo experimental	165
3.2.1. Determinación del pH	165
3.2.2. Determinación de carbonatos totales	166
3.2.3. Determinación de carbono orgánico total (COT)	166
3.2.4. Determinación de MO	166
3.2.5. Determinación de la textura del suelo	167
3.2.6. Determinación de nitrógeno total	167
3.2.7. Determinación de fósforo	167
3.2.8. Determinación de potasio asimilable	168
3.2.9. Determinación de metales	168
3.3. Diseño experimental.....	169
3.4. Ensayos de ecotoxicidad: Ensayo Microtox®.....	170

3.5. Cuantificación de aerobios totales, hongos y levaduras	171
3.5.1. Cultivo de aerobios totales	171
3.5.2. Cultivo de hongos y levaduras	172
3.6. Estudio de la biodiversidad genética microbiana	172
3.6.1. Extracción de DNA.....	172
3.6.2. Cuantificación de DNA extraído	174
3.6.3. Amplificación de genes 16S rRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	175
3.6.4. Visualización de productos de PCR.....	176
3.6.5. Electroforesis en geles de gradiente químico desnaturizante (DGGE)	176
3.6.6. Tinción y visualización de geles de DGGE	178
3.6.7. Escisión y análisis de bandas de DGGE.....	178
3.7. Determinación del contenido de ergosterol en el suelo	179
3.7.1. Extracción de ergosterol del suelo	179
3.7.2. Medida del contenido de ergosterol del suelo	180
3.7.3. Cálculos	181
3.8. Determinación de actividades enzimáticas del suelo	182
3.8.1. Actividad deshidrogenasa (ADH)	182
3.8.1.1. Cálculos	184
3.8.2. Actividad fosfatasa ácida (APHA)	185
3.8.2.1. Cálculos	186
3.8.3. Actividad β -glucosidasa (AG)	187
3.8.3.1. Cálculos	189
3.9. Determinación del contenido de ATP del suelo	190
3.9.1. Extracción de ATP del suelo	190
3.9.2. Medida de ATP.....	191
3.10. Tratamiento estadístico.....	192
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	195
4.1. Fase preliminar del estudio de bioestimulación.....	196
4.1.1. Caracterización físico-química del suelo experimental	196
4.1.2. Ecotoxicidad aguda de los BSE: Ensayo Microtox®	197
4.1.3. Estudio de bioestimulación: efecto de la dosis de BSE.....	198
4.1.3.1. Determinación de la actividad deshidrogenasa del suelo (ADH).....	200
4.1.3.2. Determinación del contenido de ATP del suelo	202
4.1.4. Discusión	205
4.2. Estudio de bioestimulación: efecto del tamaño molecular proteico	208

4.2.1. Estudio de la influencia de los BSE sobre el crecimiento microbiológico	209
4.2.1.1. Determinación de aerobios totales y hongos	210
4.2.1.1.a. Cuantificación de aerobios totales	210
4.2.1.1.b. Cuantificación de hongos y levaduras	213
4.2.1.2. Cuantificación del contenido de ergosterol del suelo	215
4.2.2. Estudio de la biodiversidad de las comunidades microbianas del suelo	218
4.2.3. Determinación de actividades enzimáticas del suelo.....	221
4.2.3.1. Actividad deshidrogenasa (ADH).....	221
4.2.3.2. Actividad fosfatasa ácida (APHA)	225
4.2.3.3. Actividad β -glucosidasa (AG).....	228
4.2.4. Determinación del contenido de ATP del suelo.....	230
4.2.5. Discusión	234
5. CONCLUSIONES	245

CAPÍTULO III:

Estudio de la influencia de la aplicación de BSE sobre el proceso de biorremediación de suelos contaminados con distintos xenobióticos

1. INTRODUCCIÓN.....	251
1.1. Legislación ambiental española sobre suelos contaminados	251
1.1.1. Ley 10/1998, de Residuos	251
1.1.2. Real Decreto 9/2005, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados	252
1.1.3. II Plan Nacional de recuperación de suelos contaminados.....	253
1.2. Biorremediación de suelos contaminados	253
1.2.1. Biodegradación microbiana de xenobióticos	255
1.2.2. Bioestimulación microbiana	258
1.2.2.1. La ecología microbiana	259
1.2.2.1.a. Bacterias	259
1.2.2.1.b. Hongos.....	260
1.2.2.1.c. Protozoos.....	260
1.2.2.1.d. Asociaciones microbianas.....	261
1.2.2.2. Tipos de bioestimulantes empleados en tratamientos de biorremediación de suelos contaminados	261
1.3. Xenobióticos contaminantes de los suelos	264

1.3.1. Crudo del petróleo y sus derivados: composición general	264
1.3.2. Biodegradación de hidrocarburos.....	266
1.3.3. Herbicidas organoclorados: atrazina	268
1.3.4. Biodegradación de atrazina.....	271
2. OBJETIVOS	277
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	281
3.1. Diseño experimental CASO 1: Estudio de los efectos de los BSE en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos (gasoil)	281
3.2. Diseño experimental CASO 2: Estudio de los efectos de BSE en el tratamiento de suelos contaminados con atrazina	282
3.3. Suelo experimental	283
3.4. Materias orgánicas empleadas y dosis de trabajo	283
3.5. Determinación de la actividad metabólica global del suelo: actividad deshidrogenasa (ADH)	284
3.6. Determinación del contenido de hidrocarburos totales del gasoil	284
3.7. Determinación del contenido de atrazina en suelo	285
3.8. Estudio de la diversidad genética microbiana	286
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	289
4.1. Caso 1: Estudio de los efectos de los BSE en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos (gasoil).....	289
4.1.1. Determinación de la actividad metabólica global del suelo: actividad deshidrogenasa (ADH).....	289
4.1.2. Evolución de la biodegradación de hidrocarburos (gasoil)	291
4.1.3. Caracterización por DGGE de las poblaciones microbianas del suelo modelo contaminado con hidrocarburos (gasoil)	293
4.1.4. Discusión	296
4.2. Caso 2: Estudio de los efectos de los BSE en el tratamiento de suelos contaminados con atrazina.....	300
4.2.1. Determinación de la actividad metabólica global del suelo: actividad deshidrogenasa (ADH).....	300
4.2.2. Evolución de la biodegradación de la atrazina	302

4.2.3. Caracterización por DGGE de las poblaciones microbianas del suelo <i>modelo contaminado con atrazina</i>	303
4.2.4. <i>Discusión</i>	306
5. CONCLUSIONES	313
BIBLIOGRAFÍA	317
PUBLICACIONES	355

Abreviaturas

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ADH	Actividad deshidrogenasa
ADP	Adenosínfosfato
AE	Actividad enzimática
AEMA	Agencia Europea de Medio Ambiente
AG	Actividad β -glucosidasa
Ala	Alanina
AMP	Adenosínmonofosfato
APH	Actividad fosfatasa
APHA	Actividad fosfatasa ácida
APS	Persulfato amónico
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>
Arg	Arginina
Asn	Asparragina
Asp	Aspártico
ATP	Adenosíntrifosfato
AQC	6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato
BE	Bioestimulación edafológica
BrEt	Bromuro de etidio
BSE	Bioestimulante/s edafológico/s
BSEI	Bioestimulante/s edafológico/s inorgánico/s
BSEO	Bioestimulante/s edafológico/s orgánico/s
C	Carbono
Ca	Calcio
CDS	Solubles condensados de destilería / <i>Condensed distillers' solubles</i>
CG	Germen de algarroba / <i>Carob germ</i>
CGHE	Hidrolizado enzimático de <i>Carob Germ</i>
COT	Carbono orgánico total
Cys	Cisteína
Da	Dalton
DDG	Granos Secos de Destilería o <i>Dried Distillers' Grains</i>
DDGS	Granos de Destilería Secos con Solubles / <i>Distillers' Dried Grains with Solubles</i>

DG	Granos de Destilería o <i>Distillers' Grains</i>
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMS	Dimetil sulfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
EC₅₀	Concentración efectiva
ERG	Ergosterol
FAD/FADH	Flavínadenínucleótido
Fe	Hierro
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridation</i>
FM	<i>Feather media</i>
FMN	Flavínmononucleótido
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GC	Cromatografía de gases / <i>Gas chromatography</i>
GH	Grado de hidrólisis
Gln	Glutamina
Glu	Glutámico
Gly	Glicina
H	Hidrógeno
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HC	Hidrocarburos
His	Histidina
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ICP-AES	<i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry</i>
Ile	Isoleucina
INT	2-4-Iodofenil-3-4-nitrofenil-5-feniltetrazolio cloruro
INTF	<i>p</i> -iodonitrotretazolio formazano
IRS	<i>Inhibitor removal solution</i>
K	Potasio
kb	Kilobase
LB	Caldo de cultivo Luria / <i>Luria Broth</i>
LBG	Galactomanana /Goma de garrofín
LC	Cromatografía líquida / <i>Liquid chromatography</i>
Leu	Leucina

Lys	Lisina
Met	Metionina
Mg	Magnesio
mAU	Miliunidades de absorbancia
MI	Mililitro
MO	Materia orgánica
MOS	Materia orgánica del suelo
MS	Espectrometría de masas / <i>Mass spectrometry</i>
MUB	<i>Modified Universal Buffer</i>
N	Nitrógeno
Na	Sodio
NAD/NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADP/NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
N.d.	No determinado
nm	Nanómetro
NMP	Número más probable
O	Oxígeno
p	Peso
P	Fósforo
PA	Plumas de ave
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
p.h.	Peso húmedo
Phe	Fenilalanina
P_i	Pirofosfato
PLFA	<i>Phospholipid Fatty Acids Analysis</i>
PM	Peso molecular
p-NF	<i>p</i> -Nitrofenol
Pro	Prolina
p.s.	Peso seco
RODAC-PCA	<i>Replicate Organism Direct Agar Contact-Plate Count Agar</i>
S	Azufre
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>

Ser	Serina
SOA	Subproductos orgánicos agroindustriales
SPT	<i>Solid Phase Test</i>
SSSA	Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina
TGGE	<i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i>
Thr	Treonina
T_m	<i>Melting temperature</i>
Tm	Tonelada métrica
TMA	Trimetilamina
TMAO	Óxido de trimetilamina
T-RFLP	<i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
U	Unidades
UA	Unidades de absorbancia
UE	Unión Europea
ufc	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
v	Volumen
Val	Valina
Ve	Volumen de elución
WCDS	<i>Wheat Condensed Distillers' Solubles</i>
WCDS-HE	Hidrolizado Enzimático de <i>Wheat Condensed Distillers' Solubles</i>
WDG	Granos húmedos de destilería / <i>Wet distillers' grains</i>
WHC	<i>Water holding capacity</i>

Prólogo

PRÓLOGO

1. ANTECEDENTES

Desde los años 90, el grupo de Investigación AGR-212: "Tecnología y Aplicación de Enzimas", del que es responsable, actualmente, el Dr. Juan Parrado Rubio, ha venido desarrollando y aplicando la tecnología bioquímica y enzimática para la extracción de compuestos con actividad funcional a partir de distintos recursos naturales, así como su caracterización en el ámbito de la nutrición vegetal y humana, para un, posterior, aprovechamiento.

Este grupo de investigación utiliza las herramientas bioquímicas que la Tecnología Enzimática le proporciona, para extraer estos compuestos. Las enzimas empleadas intervienen en las reacciones de ruptura e hidrólisis, que producen la solubilización de los compuestos, lo que posibilita su uso en distintas áreas, tales como la industria alimentaria, la cosmética, la agroquímica,...

Tradicionalmente, la obtención de extractos con compuestos con actividad funcional a partir de fuentes naturales se ha realizado, mediante el uso de tecnologías convencionales físico-químicas, las cuales emplean solventes orgánicos como es el caso del hexano; extracción asistida con ultrasonido; extracción asistida con microondas; extracción con solvente acelerado o extracción con fluidos supercríticos.

Los procesos de extracción bioquímica mediada por enzimas presentan numerosas ventajas frente a los tratamientos químicos u otros procedimientos, debido a que los principios activos mantienen su estabilidad, ya que se trabaja a temperaturas y presiones bajas, de forma que, a nivel medioambiental, es muy favorable, ya que no se emplean productos o reactivos xenobióticos, ni tóxicos,... siempre trabajando en condiciones suaves.

En los últimos años, este grupo ha buscado nuevas fuentes de compuestos biofuncionales, y una línea de investigación se ha centrado en los numerosos subproductos, ricos en materia orgánica, que se producen como consecuencia de la gran actividad agroindustrial. Estos subproductos, de bajo valor añadido, se producen en gran cantidad en todo el mundo y se caracterizan por presentar en su

composición una mezcla de lípidos, proteínas, pigmentos, vitaminas, metales y otros compuestos orgánicos minoritarios, que los convierte en ideales fuentes nutritivas y un reservorio de compuestos biofuncionales.

Los distintos subproductos agroindustriales tienen propiedades que les dotan de un gran potencial de aplicación en la industria biotecnológica, alimentaria, farmacéutica,... pero, tal y como se presentan en estos materiales no son, fácilmente, utilizables, al no encontrarse de una forma accesible, ni disponible. Por ejemplo, su alta insolubilidad, principalmente, hace que se dificulte su uso.

Es, en este punto, donde la Tecnología Enzimática, con procesos de extracción y/o modificación, puede convertir estos materiales orgánicos en nuevos productos con una mayor funcionalidad, debido a la concentración de principios activos, y unas mejores propiedades tecnológicas de aplicación (incremento de la solubilidad, disminución del tamaño molecular de sus componentes,...).

El grupo de "Tecnología y Aplicación de Enzimas" ha centrado su actividad investigadora en el desarrollo de la tecnología de extracción enzimática en diferentes residuos agroindustriales, obtención de extractos, caracterización funcional y su formulación, a continuación se muestran parte de estos estudios en forma de publicaciones y patentes.

- Parrado, J., Bautista, J., Machado, A., 1991.
Production of soluble enzymatic protein hydrolyzate from industrially deffated unhulled sunflower meal.
Journal of Agricultural and Food Chemistry (39):447-450.
- Parrado, J., Millan, F., Hernandez-Pinzón, Y., Bautista, J., Machado, A., 1993.
Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolysates.
Journal of Agricultural and Food Chemistry (41):1821-1825
- Parrado Rubio, J., Jover Cobos, M., Collantes de Teran Escribano, L., Bautista Palomas, J.D., 2003.
Prevention of brain protein and lipid oxidation elicited by a water-soluble oryzanol enzymatic extract derived from rice bran.
European Journal of Nutrition (42):307-314.

- Parrado Rubio, J., Miramontes, E., Jover Cobos, M., Gutiérrez Gil, J.F., Collantes de Terán Escribano, L., Dionisio Bautista Palomas, J., 2006.
Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food.
Food Chemistry (98):742-748.
- Parrado Rubio, J., Escudero Gilete, M.L., Friaiza Patiño, V., González-Miret Martín, M.L., García-Martínez, A.M., Bautista Palomas, J.D., Heredia Mira, F.J., 2007
Enzymatic vegetable extract with bio-active components: influence of fertiliser on the colour and anthocyanins of red grapes.
Journal of the Science of Food and Agriculture (87):2310-2318.
- Romero Ramírez, E.J., Bautista Palomas, J.D., García-Martínez, A.M., Cremades, O., Parrado Rubio, J., 2007.
Bioconversion of corn distiller's dried grains with solubles (CDDGS) to extracellular proteases and peptones.
Process Biochemistry (42):1492-1497.
- Parrado Rubio J., Bautista Palomas, J.D., Romero Ramírez, E.J., García-Martínez, A.M., Friaiza Patiño, V., Tejada M., 2008.
Production of a carob enzymatic extract: potential use as a biofertilizer.
Bioresource Technology (99):2312-2318.
- Patente: Procedimiento para la obtención de bioestimulantes a partir de residuos agroindustriales (ES 2 259542A1)
Inventores: Juan Parrado, Eduardo Romero, Juan D. Bautista Palomas

Con la presente Tesis Doctoral, se inicia una nueva línea de investigación de tipo aplicado, en el ámbito de la biorremediación. Se ha llevado a cabo en colaboración con el Dr. Manuel Tejada Moral, responsable del grupo de Investigación RMN-365: "Edafología Ambiental" y profesor titular del Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola, de la Facultad de Química, de la Universidad de Sevilla.

Esta nueva línea de trabajo se ha basado en la aplicación la Tecnología Enzimática para la obtención de productos orgánicos, de alto valor añadido, ricos en materia orgánica, a partir de determinados subproductos agroindustriales. Estos nuevos productos, con un elevado potencial nutricional, pueden ser empleados, como una herramienta fundamental, para el mantenimiento y recuperación de la calidad y la fertilidad de los suelos y, en especial, de suelos contaminados con distintos xenobióticos, constituyendo un tratamiento de biorremediación.

Cabe destacar que hasta la actualidad, los suelos contaminados por hidrocarburos han constituido los mejores candidatos para aplicar la tecnología de biorremediación, basada, entre otros procesos, en la activación de poblaciones autóctonas del suelo (Viñas, 2005a), pero esta metodología debe ser evaluada en otras situaciones de contaminación, puesto que existen numerosos contaminantes edafológicos, ante los que hay que actuar, para solucionar y remediar la situación de contaminación.

Esta Tesis Doctoral es el resultado directo de las distintas actividades desarrolladas bajo el marco de diversos proyectos y ayudas a la investigación:

- *"Diseño de extractos enzimáticos vegetales con actividad bioestimulante de degradación de xenobióticos: estudio de la degradación de PAHs, estimulación microbiana en suelo y rizosfera"*. Proyecto N° 284/2005/3-B, del Programa Nacional de Ciencias y Tecnologías Medioambientales del Plan Nacional de I+D+i. Ministerio de Medio Ambiente.
- *"Diseño de extractos enzimáticos vegetales con actividad bioestimulante de degradación de xenobióticos: estudio de la degradación de hidrocarburos, estimulación bioquímica y microbiana en suelo"*. Proyecto N° 262/2006/2-1.2, del Programa Nacional de Ciencias y Tecnologías Medioambientales del Plan Nacional de I+D+i. Ministerio de Medio Ambiente.
- *"Diseño de extractos enzimáticos vegetales con actividad bioestimulante de degradación de xenobióticos: estudio de la degradación de hidrocarburos, estimulación bioquímica y microbiana en suelo"*. Proyecto N° A211/2007/1-01.2, del Programa Nacional de Ciencias y Tecnologías Medioambientales del Plan Nacional de I+D+i. Ministerio de Medio Ambiente.

- *"Producción y conversión de residuos orgánicos mediante procesos bioquímicos bifásicos en bioestimulantes microbiológicos: estudios de su aplicación ambiental en la regeneración de suelos contaminados"*. Proyecto Nº CTM2007-60210, del Programa del Plan Nacional de I+D+i. Ministerio de Ciencia y Educación.
- *"Estudio de viabilidad de diversos residuos inertes como sustratos forestales"*. Nº 0545/0048. 2009. EGMASA-Universidad de Sevilla.
- *"Uso de enzimas de residuos agroindustriales"*. Contrato 68/83 Nº OG-048/06. Pevesa, S.L.-Universidad de Sevilla.
- *"Transferencia de tecnología en descontaminación de suelos mediante sistemas de bioestimulación"*. Ayudas a proyectos OTRI Nº OTRI/06-PC06. Universidad de Sevilla.

2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Como se ha mencionado en el apartado anterior, el presente trabajo, de contenido multidisciplinar, representa una nueva línea de trabajo del grupo de investigación "Tecnología y Aplicación de Enzimas", en colaboración con el grupo "Edafología Medioambiental": *la obtención de productos, hidrolizados enzimáticamente, de alta absorción, y su aplicación a un suelo modelo, para llevar a cabo estudios de bioestimulación y biorremediación de suelos contaminados con distintos xenobióticos.*

El desarrollo de este trabajo ha tenido lugar en dos centros de educación e investigación distintos: en la Facultad de Farmacia, en el área de Bioquímica y Biología Molecular (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular) y en la Escuela Universitaria de Ingenieros Técnicos Agrícolas, en el área de Edafología y Química Agrícola (Departamento Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola).

La memoria de Tesis se ha estructurado en tres capítulos, y cada uno lleva incluidos una introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y discusión, y unas conclusiones finales. Las referencias bibliográficas empleadas en cada uno de los capítulos han sido agrupadas en un solo bloque, al final del manuscrito.

En el primer capítulo: **"Producción de bioestimulantes edafológicos mediante un proceso enzimático a partir de distintos subproductos orgánicos agroindustriales"**, se ha planteado la producción de productos de alta absorción y elevado potencial biofertilizante/bioestimulante edafológico (denominados BSE). Se ha llevado a cabo la conversión hidrolítica, mediada por enzimas, de distintos subproductos orgánicos resultantes de la actividad del sector agroalimentario, como son los Solubles Condensados de la Destilería, resultantes de la producción de bioetanol como biocombustible; y la harina de germen de algarroba, subproducto obtenido del procesamiento del fruto de la algarroba para su uso en la industria alimentaria.

Estos subproductos se han seleccionado en virtud de su elevado contenido en MO, principalmente, proteínas y han sido caracterizados para llevar a cabo los procesos de hidrólisis enzimática, obteniéndose dichos productos bioestimulantes. Mediante estos procesos hidrolíticos la propiedades funcionales del la MO que contienen los subproductos orgánicos agroindustriales ha sido modificada, lo que les ha proporcionado una mayor capacidad de aplicación agrícola, al incrementar su biodisponibilidad.

En el segundo capítulo, **"Evaluación del potencial bioestimulante de los hidrolizados enzimáticos WCDS-HE y CGHE"**, se ha realizado un estudio de la capacidad bioestimulante de los productos obtenidos en la fase anterior (BSE) y se ha analizado si esta capacidad se ve incrementada por el proceso hidrolítico que han sufrido, debido a que la modificación de las propiedades físico-químicas de la MO ha mejorado su biodisponibilidad, ya que ha logrado incrementar su solubilidad y disminuir el tamaño proteico.

Para llevar a acabo este estudio se ha diseñado un modelo de monitorización, basado en la selección y determinación de distintos parámetros o bioindicadores, que han permitido evaluar el efecto de la aplicación de los distintos BSE sobre la actividad metabólica del suelo y sobre la diversidad de las poblaciones microbianas.

Finalmente, en el tercer y último capítulo, **"Estudio de la influencia de la aplicación de BSE sobre el proceso de biorremediación de suelos contaminados con distintos xenobióticos"**, se ha evaluado la influencia de la aplicación de los distintos BSE obtenidos en la fase anterior, en un proceso de biorremediación, mediado por biodegradación. Estos ensayos se han realizado a

escala de laboratorio y constituyen una serie de experimentos que implican la contaminación de un suelo modelo. Se ha estudiado el papel de estos BSE en el proceso biodegradativo de distintos contaminantes, como son el gasoil, derivado del petróleo, y la atrazina, un herbicida ampliamente utilizado.

Este capítulo revela los efectos que producen los bioestimulantes sobre un suelo contaminado con xenobióticos de distinta naturaleza: hidrocarburos (fuente de C) y un herbicida (fuente de N), y evalúa el papel de la bioestimulación edafológica como instrumento eficaz para la biodegradación de contaminantes.

Este estudio final, comprende la evaluación de la bioestimulación, centrándose en el efecto que produce sobre el metabolismo microbiano, y, también, en la determinación de la degradación del contaminante, analizando si existe relación entre ambos fenómenos. A su vez, también se analiza si las poblaciones microbiológicas presentes en el suelo sufren cambios debido a la contaminación y si estos cambios pueden relacionarse con la biodegradación del contaminante orgánico.

CAPÍTULO I:

***"Producción de bioestimulantes edafológicos
mediante un proceso enzimático
a partir de distintos subproductos orgánicos
agroindustriales"***

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Subproductos orgánicos agroindustriales

Tradicionalmente, la agricultura y la industria han sido consideradas como sectores separados, tanto por sus características como por su función en el crecimiento económico de un país. Sin embargo, actualmente, el papel de la agricultura en el proceso de desarrollo se ha revalorizado y se considera un elemento fundamental que contribuye, directamente, a la industrialización.

Pese a la importante contribución de este sector al desarrollo económico, la agricultura conlleva ciertos efectos negativos para el medio ambiente, creando ciertas perturbaciones y procesos de contaminación ambiental. Por ejemplo, como consecuencia de la actividad agroindustrial, en todos los países, incluida España, se produce una gran cantidad, del orden de millones de Tm/año, de subproductos orgánicos agroindustriales (SOA) resultantes de actividades tan diversas del sector como la actividad vitivinícola, la producción cárnica, harinera, arroceras, láctea,... La generación de grandes cantidades de subproductos es uno de los principales problemas que se crean, debido a su acumulación en el medio.

A pesar de su diverso origen, todos estos subproductos agroindustriales se caracterizan por su elevado contenido en MO, siendo, especialmente, muy ricos en proteínas. Su alto contenido proteico determina que sean considerados los reservorios de proteínas con mayor potencial de aplicación, no sólo en la industria alimentaria o en la farmacéutica (empleados como fuentes nitrogenadas para las fermentaciones), que, habitualmente, vienen empleándolos, sino, también, en la industria agroquímica (orgánica), que los utiliza para la obtención de productos nutricionales destinados a las plantas, así como, también, al suelo (fuente de nitrógeno).

A pesar de sus cualidades, estos SOA son eliminados o, en la mayor parte de los casos, están siendo infrutilizados como productos de bajo valor añadido. Esto es debido, fundamentalmente, a las propiedades funcionales de sus proteínas. Estas propiedades están ligadas a la composición y la secuencia aminoacídica, así como, a la unión con otras biomoléculas como carbohidratos o lípidos. Entre las

propiedades más limitantes de las proteínas que forman parte de los SOA y que más dificulta su uso se destaca la escasa solubilidad que presentan.

Ya que estos SOA suponen un almacén de nutrientes de un gran valor se están empleando, en los últimos años, como nuevas materias de partida para su conversión en nuevos productos, de alto valor añadido. Se han desarrollado diversas técnicas mediante las cuales se puede lograr modificar las propiedades físicas de estos materiales y, así, mejorar el aprovechamiento de los recursos y satisfacer, por ejemplo, la elevada demanda existente de proteínas en el mercado.

De esta forma, mediante la revalorización y/o reutilización de estos subproductos se cumple con uno de los preceptos básicos del desarrollo sostenible, además de generar múltiples beneficios, tanto a nivel económico como medioambiental.

1.2. Industrias productoras de subproductos orgánicos agroindustriales

La industria de producción de biocombustibles, como el bioetanol, así como la industria alimentaria son dos ejemplos de grandes actividades productoras de subproductos orgánicos, que son infrutilizados, desde el punto de vista económico.

Como ya se ha comentado, la principal característica de estos subproductos producidos es su alto contenido proteico, pero su uso está muy limitado debido a sus características funcionales (Romero y *col.*, 2007).

1.2.1. Industria de producción de bioetanol

Hoy en día, existe la necesidad de crear y desarrollar nuevos combustibles independientes del petróleo, que tengan un menor impacto ambiental y cuyo consumo no reduzca su disponibilidad (renovables). La tendencia actual es crear biocombustibles, como el bioetanol, a partir de materias vegetales y, como resultado de este proceso productivo, se generan diversos subproductos, en cantidades significativas.

El bioetanol es un biocombustible que se produce, principalmente, a partir de materias primas dulces, directamente, fermentables, como la caña de azúcar y la remolacha azucarera, o bien, materias primas amiláceas, como el maíz y el trigo,

cuyo almidón debe ser convertido en azúcares (sacarificado) antes de la fermentación. Existe un tercer material de partida que es la biomasa disponible en materiales como el bagazo y la paja, en el que la hidrólisis de las cadenas celulósicas produce una solución fermentable de azúcares, de gran interés debido al bajo costo de la materia prima.

En España, la producción industrial emplea, principalmente, cereal (maíz, trigo, cebada y sorgo) como materia prima básica, con unos índices de conversión elevados, del orden del 90%-95% (Ortiz y col., 2003).

Imagen.1: Planta BIOETANOL GALICIA (Abengoa Bioenergy).

Texeiro. La Coruña. España.



Brevemente, la producción de bioetanol consiste en convertir los almidones y azúcares de la materia prima inicial en etanol. De esta forma, en el producto final se reduce, drásticamente, el contenido en hidratos de carbono no estructurales y se concentra, proporcionalmente, el porcentaje del resto de nutrientes, entre los que destacan, las proteínas.

Como resultado final del proceso de producción de este biocombustible se obtiene un etanol hidratado (5%, v/v, de agua), que tras ser deshidratado se puede usar como combustible. Este bioetanol deshidratado, mezclado en parte con gasolina, produce un biocombustible de alto poder energético, con características

muy similares a la gasolina, pero con una importante reducción de las emisiones contaminantes en los motores tradicionales de combustión.

1.2.1.1. Proceso de producción de bioetanol

En la actualidad, existen dos tipos de procedimientos para obtener bioetanol a partir de cereales: la Vía Seca o *Dry Milling* (Figura.1) y la Vía Húmeda o *Wet Milling* (Figura.2).

A) Vía Seca (Dry Milling): en este proceso se diferencian las siguientes etapas:

1. Trituración: este proceso se caracteriza por la trituración del grano del cereal seleccionado, generándose una pasta/harina.
2. Licuefacción/Cocción: en esta fase tiene lugar la *sacarificación* (conversión del almidón en azúcares fermentables, produciéndose un mosto azucarado), mediante la adición de enzimas, como la α -amilasa, o bien, mediante la adición de ácidos.
3. Fermentación alcohólica: este proceso, anaeróbico, es realizado por levaduras, básicamente.



4. Destilación del etanol mediante evaporación: mediante la aplicación de calor se separa el etanol y la mezcla resultante de la fermentación, enriqueciendo, de esta forma, el contenido alcohólico. Por un lado, se obtiene el etanol y por otro los restos de materia prima vegetal no fermentados, las *vinazas*.
5. Deshidratación del etanol: el etanol generado se encuentra aún hidratado, con un contenido en agua que suele oscilar entre el 4% y el 5% (v/v). En esta fase, se elimina el resto de contenido hídrico.

6. Separación de vinazas: mediante centrifugación se recuperan 2 productos básicos: los granos no fermentados, que se denominan Granos de Destilerías o *Distillers' Grains* (DG), y, por el otro lado, se obtiene una fracción soluble, denominada *Stillage*. Así, un tercio de la materia seca tras la fermentación se recupera en forma de subproductos (Schroeder, 2003).

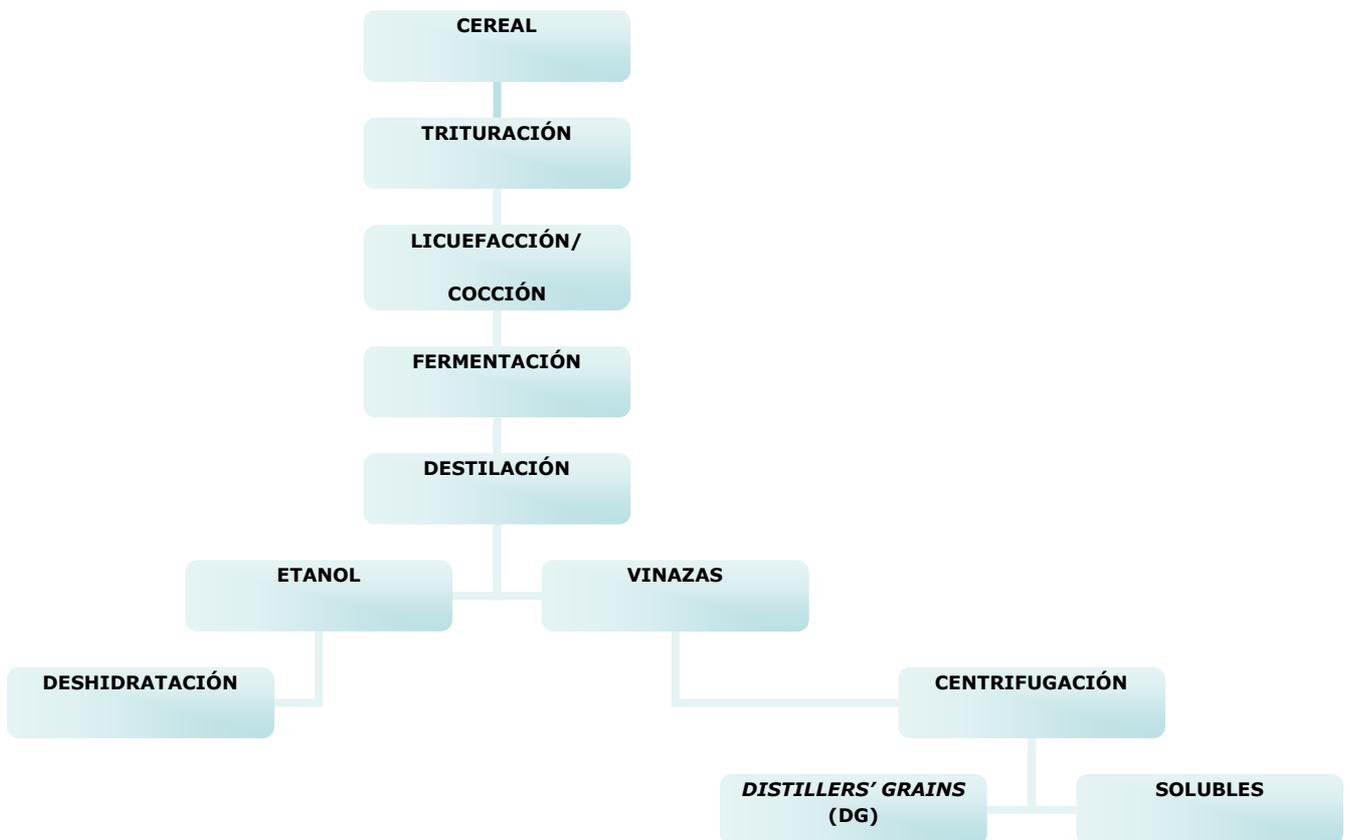


Figura.1: Descripción general del proceso de producción de bioetanol mediante el procedimiento de Vía Seca/*Dry Milling*.

B) Vía húmeda (Wet Milling): esta vía representa un camino algo más complejo, mediante el cual el procesado del cereal produce diversos subproductos a partir de la separación de las distintas partes del grano de cereal. Las fases que comprende este proceso son las siguientes:

1. Remojado del grano: los granos de cereal no son triturados directamente, como ocurre en la vía seca, sino que son tratados, previamente, en medio acuoso con dióxido de azufre y ácido láctico, durante 24-48 horas, a 50°C con el fin de ablandar los granos (Watson y Ramstad, 1987). Este paso facilita, notablemente, la molienda posterior.
2. Molienda, separación y extracción del germen: tras una suave molienda, se puede separar el germen del resto del grano mediante separación por flotación.
3. Molienda y cribado: mediante una criba, el material fibroso es separado del resto de subproductos.
4. Separación del gluten: el almidón es separado del gluten y del resto de proteínas por su distinta densidad, mediante una serie de centrifugaciones.

El resto de etapas son comunes con la Vía Seca.

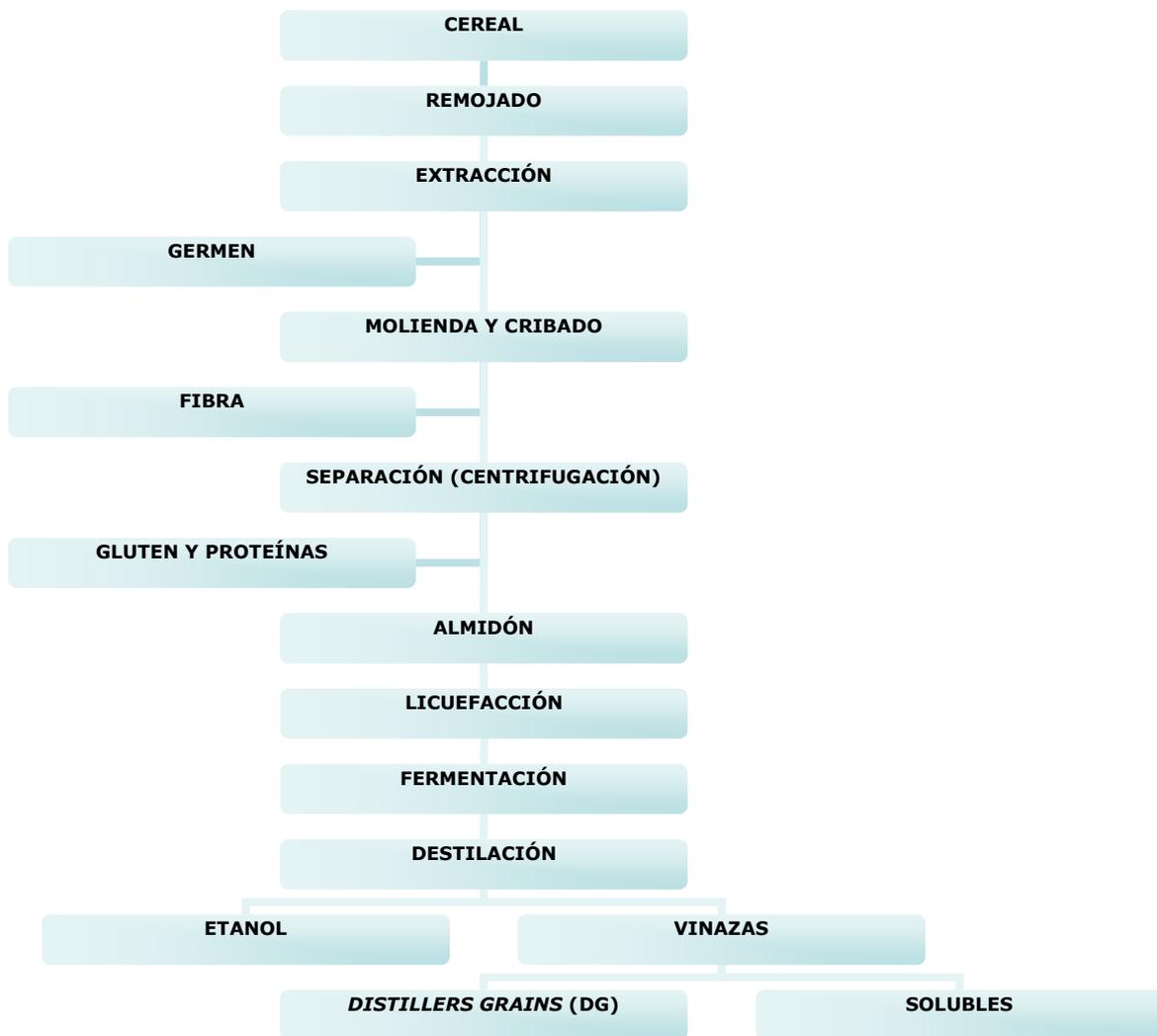


Figura.2: Descripción general del proceso de producción de bioetanol mediante el procedimiento de Vía Húmeda/*Wet Milling*.

1.2.1.2. Tipos de subproductos orgánicos y aplicaciones comerciales

Como se ha mencionado, anteriormente, tras el proceso de destilación, se obtienen, por un lado, el etanol y, por otro lado, las vinazas o restos de la fermentación. Estas vinazas están formadas por distintas fracciones, que mediante varias centrifugaciones, son separadas, generándose una serie de subproductos orgánicos.

A) Fracción sólida:

- 1) Granos de Destilería o *Distillers' Grains* (DG): son los granos de cereal no fermentados, que contienen los nutrientes restantes que permanecen después de que el almidón haya fermentado.
 - Granos Húmedos de Destilería (Wet Distillers' Grains-WDG): presentan, aproximadamente, un 30% de materia seca. El contenido en proteína es elevado. Se suelen vender como alimento para el ganado.
 - Granos Secos de Destilerías (Dried Distillers Grains-DDG): presentan, aproximadamente, un 90% de materia seca. Se obtienen por secado de la fracción sólida. Sin embargo, la calidad de las proteínas no parece verse afectadas por el secado. Los granos de destilería desecados se comercializan, ampliamente, en todo el mundo como un producto alimenticio.

B) Fracción soluble:

- 1) Solubles o *Thin Stillage*: esta fracción soluble líquida resultante (5% de materia seca) suele evaporarse, disminuyendo su proporción de agua. Como resultado, se genera un producto denso, similar a un sirope (25% - 45% de materia seca). Son los denominados Solubles Condensados de Destilería o *Condensed Distillers' Solubles* (CDS). Pueden contener entre un 20% y un 30% de proteína, respecto a su materia seca. Es posible usar como alimento para el ganado, tanto los Solubles como los CDS, pero, por regla general, se añaden a los Granos de Destilería (Belyea y col., 1998).

Comercialmente, se suelen mezclar una parte de los solubles con la fracción de WDG. Esta mezcla es secada, obteniéndose, así, los Granos de Destilería Secos con Solubles o *Distillers' Dried Grains with Solubles* (DDGS), un producto comercial usado, básicamente, en la alimentación animal.

En general, todos estos subproductos orgánicos concentran más de 2 veces el contenido en fibras, proteínas, grasas y cenizas, en relación con el producto original. El contenido proteico es muy alto en todos ellos, en torno al 25% de materia seca.

En su procesado, el calor aplicado durante los procesos de fermentación, destilación y secado reduce la solubilidad de la proteína y aumentan su indegradabilidad.

1.2.2. Industria alimentaria: producción de harinas de algarroba

Las harinas son un producto alimenticio resultante de la molienda, generalmente, de cereales, aunque, también, de otros productos ricos en almidón. De hecho, el denominador común que presentan las distintas materias primas, de origen vegetal, empleadas para producir harinas es su alto contenido en almidón.

Estas harinas se obtienen, principalmente, del trigo (*Triticum sp.*) (Europa), aunque se emplean, también, otros cereales como es el caso del centeno (*Secale cereale*), la cebada (*Hordeum vulgare*), la avena (*Avena sativa*), el maíz (*Zea mays*) (de origen americano) o el arroz (*Oryza sativa*) (Asia). Además, existen otras harinas obtenidas a partir de leguminosas, como garbanzos (*Cicer arietinum*), judías (*Phaseolus vulgaris*) y algarrobas (*Ceratonia siliqua*).

Imagen.2: *Ceratonia siliqua* (Algarrobo). Mallorca (2008).

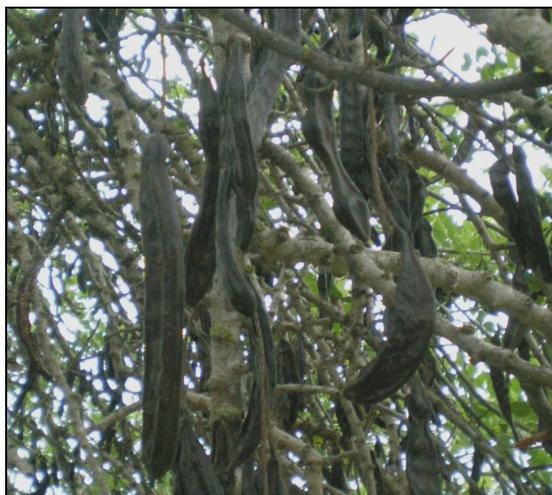


La algarroba es el fruto del árbol *Ceratonia siliqua* (Imagen.2), llamado, de forma común, algarrobo. Esta leguminosa es un árbol perennifolio, que puede llegar a presentar un porte de hasta unos 10 m de altura. Presenta hojas lustrosas, de

color verde oscuro, bipinnadas, con folíolos casi redondos, de 2 a 5 cm de largo, de corteza lisa color gris, con flores verdes dispuestas en panículas cortas sobre ramas leñosas. Es una especie triecia y, aunque es un árbol propio de países mediterráneos, actualmente, se ha propagado a muchas zonas áridas de los subtrópicos.

La algarroba (Imagen.3), como fruto, es una legumbre indehisciente, parda y, generalmente, de unos 10-20 cm de largo. Está constituida por la vaina (Imagen.3), cubierta exterior del fruto, que representa, aproximadamente, el 10% de toda la legumbre; la pulpa, espesa y carnosa, rica en carbohidratos y azúcares, y las semillas, también denominadas garrofines, inmersas en la pulpa azucarada.

Imagen.3: Vainas de algarroba. Mallorca (2008).



1.2.2.1. Proceso de producción de harinas de algarroba

Las harinas de algarroba se obtienen de la molienda de las vainas y su pulpa, secadas previamente.

La elaboración de harina de algarroba consta de una serie de etapas, que, brevemente, se describen, a continuación:

- 1) Secado del fruto: en lugar seco y aireado.
- 2) Molienda gruesa: usando un molino de martillo, se muelen las vainas secas, cribándose con una maya de 12 mm de diámetro.
- 3) Segundo secado: si hay humedad ambiente, esta harina gruesa (primer producto) tiende a absorber humedad tras la molienda.
- 4) Molienda fina: se realiza una segunda molienda con el mismo molino de martillo, pero con una malla de 2mm.
- 5) Tercer secado: el efecto de secado se logra a través del paso de una corriente de aire.
- 6) Tamizado mecánico: con una herramienta propulsada manualmente, se separa la harina del salvado.

Esta harina, rica en azúcares (30% - 50%, p/p), fundamentalmente, fructosa, glucosa y sacarosa, también, presenta un 5% de proteínas y muchos minerales como hierro, calcio, magnesio, zinc, silicio, fósforo y potasio.

Como resultado de este proceso de producción, se generan diversos subproductos orgánicos que, a su vez, presentan una amplia utilidad y aplicación comercial, como, por ejemplo, ingredientes y/o aditivos alimentarios.

1.2.2.2. Tipos de subproductos orgánicos y aplicaciones comerciales

Como se ha comentado, la algarroba se emplea, principalmente, para la obtención de harinas y, como resultado de su procesamiento, se generan diversos subproductos orgánicos, altamente empleados de forma comercial:

- A. Las vainas de algarroba, además de para producir harinas, se emplean para la obtención de *algarrobina*, producto alimenticio de gran valor debido a sus propiedades vitamínicas y proteicas, muy aplicado en gastronomía. Se obtiene al hervir las vainas y prensarlas. El extracto que resulta es filtrado y sometido, después, a un proceso de evaporación para producir este subproducto de carácter viscoso.

B. Por otro lado, con las semillas o *garrofines*, separadas de las vainas, se pueden obtener, también, distintos subproductos, a partir de cada una de las partes que la componen, que, básicamente, son tres:

I. Cutícula o epispermo: es el tegumento que rodea a la semilla y está constituido, principalmente, por celulosa, lignina y taninos, y se obtiene mediante eliminación física o química.

De ella se obtienen colorantes, carbón activo, extractos tánicos, etc., productos que tienen aplicaciones no sólo en la industria alimentaria, sino también en la textil.

II. Endospermo: se obtiene por separación mecánica del germen; es el tejido de reserva de la semilla y es, desde el punto de vista económico, la parte más importante del fruto. De él se obtiene, por molienda, la galatomanana o goma de garrofín (LBG). Este subproducto es un polisacárido formado por moléculas de manosa y galactosa en una proporción 1:4. El endospermo presenta cerca de un 90% (p.s.) de galactomanana. Este producto posee importantes propiedades como agente espesante, estabilizante, emulsionante y gelificante. Se disuelve bien en agua y es insoluble en la mayoría de disolventes orgánicos. Es capaz de absorber hasta 40 veces su peso seco y es estable entre pH 4 y pH 10.

El principal sector donde se emplea es el de la alimentación humana, usado como aditivo en la elaboración de helados, sorbetes, mayonesas, salsas, productos lácteos,... También, se emplea en la industria farmacéutica (laxantes, pastas de dientes, etc.), en cosmética, en la industria textil, química y en la preparación de alimentos de animales de compañía.

III. Germen o embrión: este elemento queda como subproducto al separar el endospermo. De la molienda del germen, se obtiene, también, una harina. Esta harina de germen de algarroba se emplea tanto en la alimentación humana, principalmente, en preparados dietéticos, como en alimentación animal.

1.2.2.2.a. Harina de germen de algarroba

Este subproducto obtenido viene siendo usado, actualmente, en alimentación por su alto contenido en proteínas. Su contenido proteico es superior al 40% (p.s.) y contiene, además, pequeñas cantidades de fósforo, potasio, fitina y algunas vitaminas (B1, B2, D, E, PP), lo que le confiere un alto valor nutritivo, comparable a la harina de soja, sobre la que se presenta como una clara alternativa.

La harina de germen de garrofín se utiliza tanto en alimentación humana, principalmente, en forma de preparados dietéticos y de régimen, así, como en alimentación animal, reemplazando al grano en la ración de los rumiantes. Se considera inocua para el consumo humano y en el código alimentario de la UE tiene asignada la clave E-410, autorizándose su adición a todo tipo de alimentos. Otras aplicaciones corrientes son llevadas a cabo en la industria farmacéutica como laxantes, cápsulas, pastas de dientes, cremas,... También, es empleada en la industria textil en los aprestos y estampados; y en la industria química, en pinturas, betunes y colas, etc.

1.3. Hidrólisis de proteínas

En los últimos años, se ha incrementado, notablemente, la demanda de proteínas vegetales para su consumo. Por este motivo, cada vez más, se buscan nuevas fuentes proteicas no convencionales y alternativas, como es el caso de los SOA.

Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, el elevado potencial de aplicación de estos SOA se encuentra limitado debido a las propiedades físicas de las proteínas que están presentes en estos materiales (insolubilidad, elevado tamaño proteico, carácter alergénico,...).

Con el objetivo de mejorar las propiedades de las proteínas y lograr así un mayor aprovechamiento, en los últimos años, se han desarrollado y optimizado los procesos de extracción de proteínas, como es el caso de los procesos de hidrólisis, que emplean como substrato estas fuentes proteicas alternativas, y logran, así, mejorar su calidad funcional.

La hidrólisis proteica es un proceso de ruptura de los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos que constituyen las proteínas, produciéndose péptidos y, eventualmente, aminoácidos libres.

Generalmente, los mecanismos por los que se produce este fenómeno de degradación se basan en el empleo de agentes químicos como catalizadores de la reacción (Prendergast, 1974). Sin embargo, actualmente, estos procesos hidrolíticos son catalizados por enzimas, concretamente, proteasas (Adler-Nissen, 1977; 1986).

Esta hidrólisis enzimática, mediada por enzimas proteolíticas, es un proceso muy eficiente, que tiene lugar bajo condiciones de operación suaves (temperatura, pH y presión). Es un procedimiento muy beneficioso para la industria, especialmente, la alimentaria, ya que al trabajar en condiciones suaves, la calidad nutricional de la proteína no se ve afectada por la destrucción o modificación de aminoácidos (Fox, 1982), que sí ocurre mediante hidrólisis química.

Como resultado del proceso hidrolítico, se generan los denominados hidrolizados proteicos, en los que se da una modificación de las propiedades físicas de las proteínas constituyentes de los distintos subproductos empleados, con lo que se logra aumentar, por ejemplo, la solubilidad de la proteína original, que, en principio, se caracterizaba por su gran insolubilidad, y, además, se consigue disminuir su tamaño molecular. Con todo esto, se mejoran las propiedades funcionales de las proteínas.

1.3.1. El enlace peptídico

El enlace peptídico es un enlace covalente que se establece entre el grupo carboxilo (-COOH) de un aminoácido y el grupo amino (-NH₂) del aminoácido contiguo inmediato, con el consiguiente desprendimiento de una molécula de agua.

La característica principal de este enlace radica en que no permite el giro de los elementos unidos por él, por lo que es un enlace rígido. La rigidez se debe a que los electrones del doble enlace que establece el carbono del grupo carboxilo con el oxígeno, se movilizan hacia la unión entre el carbono carboxilo y el nitrógeno del grupo amino.

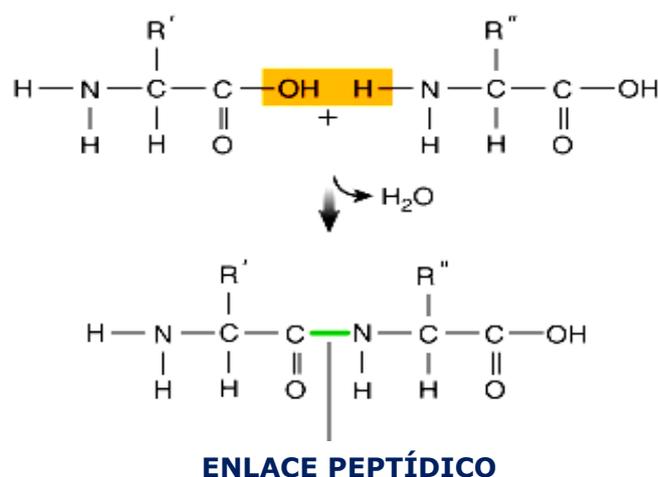


Figura.3: Esquema de la formación de un enlace peptídico.

Los aminoácidos se van enlazando entre sí formando cadenas de longitud y secuencia variable. La incorporación de un mayor número de nuevos aminoácidos da lugar a una cadena de proteína, que posee decenas o centenas de aminoácidos unidos entre sí.

1.3.1.1. Propiedades del enlace peptídico

Las principales propiedades del enlace peptídico son:

1. Posee un carácter de doble enlace, lo que significa que es más corto que un enlace sencillo y, por tanto, es rígido y plano. Esta característica previene la libre rotación alrededor del enlace entre el carbono y el nitrógeno. Aun así, los enlaces entre los carbonos y los aminos y los carbonos y los carboxilo, no implicados en el enlace, pueden rotar, libremente, siendo su única limitación el tamaño del grupo radical que posean. Es, precisamente, esta capacidad de rotación la que permite a las proteínas adoptar una inmensa gama de configuraciones.
2. Generalmente, se encuentra en posición *trans* en lugar de *cis* y esto se debe en gran parte a la interferencia estérica de los grupos radicales cuando se encuentran en posición *cis*.

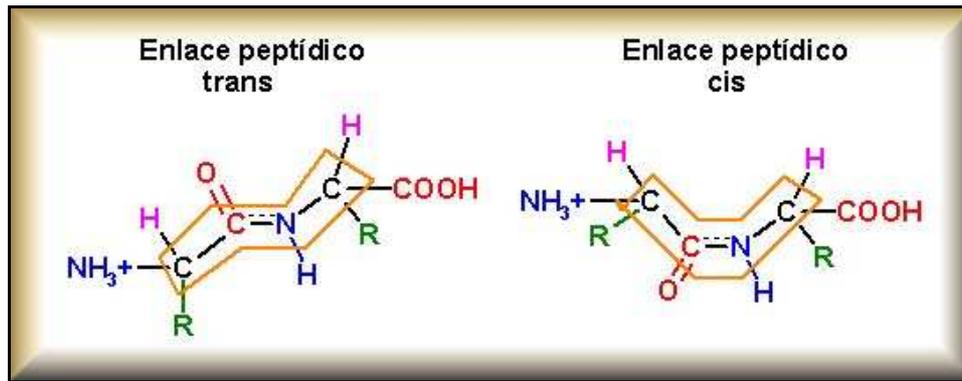


Figura.4: Disposiciones del enlace peptídico en el espacio. Disposición trans y cis.

- No presenta carga, pero si es polar. Los grupos $-C=O$ (carbonilo) y $-NH$ (amino) de los enlaces peptídicos son incapaces de recibir o donar protones (entre pH 2 y pH 12).

En las proteínas, los únicos grupos cargados son el N- y C- terminales y cualquier grupo ionizable presente en la cadena lateral de los residuos. Aún así, los grupos $-C=O$ y $-NH$ del enlace peptídico participan en la formación de puentes de hidrógeno para dar origen a la estructura secundaria, particularmente, α -hélices y hojas β y terciaria.

1.3.2. Química de la ruptura del enlace peptídico

La reacción de ruptura o hidrólisis proteica es un proceso que, tradicionalmente, ha estado catalizado por ácidos (Prendergast, 1974), pero, actualmente, está catalizado por enzimas proteolíticas, las proteasas (Adler-Nissen, 1977; 1986).

En cualquier caso, la reacción implica la acción sobre los enlaces peptídicos, que se rompen, liberándose grupos amino y carboxilo, según la siguiente reacción:



La hidrólisis proteica no tiene lugar a través de una única reacción, sino que se trata de un conjunto de reacciones simultáneas, que implican la ruptura de enlaces, obteniéndose distintas especies cargadas en el equilibrio, aumentando la complejidad de este proceso (Guadix y *col.*, 2000; Benítez y *col.*, 2008).

Como resultado de este conjunto de etapas, se producen distintas especies proteicas:



Estas especies intermedias se diferencian básicamente en la solubilidad y en el tamaño molecular que presenta su contenido proteico (Knights, 1985).

Tabla.1: Tamaño molecular de distintas especies proteicas.

	TAMAÑO MOLECULAR (Dalton)
Proteínas	>10000
Peptonas	7000-10000
Péptidos	200-7000
Aminoácidos	<200

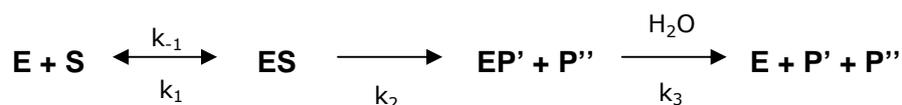
1.3.3. Hidrólisis enzimática

1.3.3.1. Etapas de la hidrólisis enzimática

Está determinado que un proceso de hidrólisis está constituido por tres reacciones consecutivas (Adlesr-Nissen, 1986; Benítez y col., 2008):

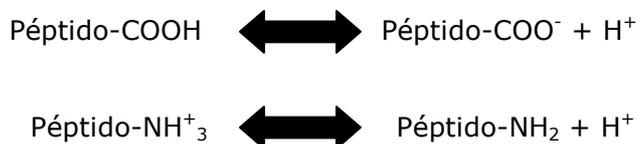
- Formación del complejo enzima-sustrato (proteína).
- Ruptura del enlace peptídico y liberación de péptidos y/o aminoácidos.
- Separación del péptido restante de la enzima tras un ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua.

Esquemáticamente, el proceso es el siguiente:



S: sustrato (proteína); *E*: Enzima; *ES*: complejo enzima-sustrato; *P'* y *P''*: péptidos resultantes;
k_i: constantes de la reacción

Los grupos amino y carboxilo formados tras la hidrólisis pueden estar, parcialmente, ionizados, dependiendo del pH del proceso de hidrólisis, según los siguientes equilibrios (Guadix y *col.*, 2000):



Se estima que los valores de pK a 25°C para los grupos -COOH y NH₃⁺, en proteínas, están comprendidos entre 3.1-3.6 y 7.5-7.8, respectivamente. (Steinhardt y Beychok, 1964; Rupley, 1967). De esta forma, a pH<3.1-3.6, los grupos carboxilo estarán, parcialmente, disociados y los amino, protonados. Trabajando a estos pH, el pH de la reacción de hidrólisis irá aumentando rápidamente. Si, por el contrario, se trabaja a pH>7.5-7.8, los grupos carboxilo estarán, totalmente, disociados y los grupos amino, parcialmente, protonados, lo que conlleva a una bajada continua del pH.

El desarrollo de la reacción de hidrólisis puede explicarse debido a la contribución de energía libre procedente de la ionización de los grupos carboxilo y amino formados, por lo que, si la ionización se suprime, se favorecerá la formación de enlaces peptídicos (You-Shang, 1983).

1.3.4. Enzimas hidrolíticas

Las proteasas son enzimas esenciales para todos los organismos vivos (procariotas, hongos, plantas y animales) (Gupta y *col.*, 2002a), y juegan un papel crucial como agentes catalíticos en la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas (Kumar y Takagi, 1999).

Representan uno de los tres mayores grupos de enzimas industriales y suponen entre el 40% y el 60% del total del mercado de enzimas empleadas por sectores tan diversos como la producción de detergentes, alimentación, farmacéuticas, piel, diagnóstico, manipulación de residuos, recuperación de plata,... (Rao y *col.*, 1998; Gupta y *col.*, 2002b).

Tabla.2: Proteasas alcalinas comerciales de origen bacteriano. (Gupta y col, 2002b).

FUENTE	NOMBRE COMERCIAL	APLICACIÓN
<i>Bacillus licheniformis</i>	Alcalasa	Detergentes Desengomado de la seda
	Biofeed pro	Alimentación
	Novozyme 243	Limpiador dental
	Optimasa	Detergentes
	Proteasa	Alimentación Residuos
	Enzeco alcalina proteasa	Industrial
	Enzeco alcalina proteasa-L FG	Alimentación
<i>Bacillus sp.</i>	Savinasa	Detergentes Textil
	Durazym	Detergentes
	Nue	Piel
	Maxacal	Detergentes
	Maxatase	Detergentes
	Protosol	Detergentes
<i>Bacillus subtilis</i>	HT-proteolítica	Alcohol Pan Alimentación
	Bioprasa concentrada	Cosmética
	Bioprasa SP-10	Alimentación
	Corolasa 7089	Alimentación

Tabla.3: Proteasas más empleadas en la hidrólisis de proteínas

FUENTE	CLASE DE PROTEASA	NOMBRE	RANGO DE pH
ANIMAL			
<i>Buey/Cerdo</i>	Aspártico-proteasa	Pepsina; Pepsina A	1-4
	Serín-proteasa	Tripsina	7-9
	Serín-proteasa	Quimiotripsina	8-9
<i>Ternero</i>	Aspártico-proteasa	Quimosina; Renina	3-6
VEGETAL			
<i>Papaya</i>	Tiol-proteasa	Papaína pura	5-7
<i>Piña</i>	Tiol-proteasa	Bromelaína	5-8
BACTERIAS			
<i>Bacillus subtilis</i>	Metallo-proteasa	Neutrasa	6-8
	Serín-proteasa	Subtilisina Novo (BPN)	6-8
<i>Bacillus lichiniiformis</i>	Serín-proteasa	Alcalasa	6-10
HONGOS			
<i>Aspergillus niger</i>	Mezcla de aspártico, metalo y serín-proteasa	Prozyme, Panazyme, Biozyme A, Sanzyme,...	4-8

De todas las enzimas hidrolíticas, las microbianas son las más relevantes y las más estudiadas. Los microorganismos producen un amplia variedad de proteasas, *extracelulares* y/o *intracelulares*. Las *intracelulares* están implicadas en procesos celulares como la esporulación, la diferenciación celular, la maduración de enzimas y hormonas, el mantenimiento del *pool* de proteínas celulares,... Por otro lado, las *extracelulares* son las enzimas responsables de la hidrólisis de proteínas extracelulares, logrando hacer accesibles los productos hidrolizados para su absorción celular y, posterior, uso (Kalisz, 1988). Concretamente, las proteasas extracelulares han sido las empleadas, industrialmente, para intervenir en los procesos que implican degradación de proteínas (Kumar y Takagi, 1999; Outtrup y Boyce, 1990).

1.3.4.1. Tipos de proteasas comerciales

Las proteasas pueden ser clasificadas de muy diversas formas:

1. Por su origen :

- a. Animales
- b. Vegetales
- c. Bacterianas
- d. Fúngicas

2. Por su pH óptimo de actividad:

- a. **Alcalinas**: constituyen un amplio y complejo grupo de enzimas que cumplen funciones nutricionales y reguladoras en la naturaleza. Son enzimas activas en un rango de pH entre 8 y 12 y un rango de temperaturas entre 50°C y 70°C.
- b. **Neutras**: su pH óptimo de trabajo está próximo a 7.
- c. **Ácidas**: son enzimas activas en un rango de pH entre 2.5 y 5.5.

3. Por su acción catalítica:

- a. **Endoproteasas**: hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína.
- b. **Exoproteasas**: eliminan aminoácidos terminales de las proteínas y/o péptidos.

4. Por su centro catalítico: existen diferencias de acuerdo a los ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato.

- a. Su centro activo presenta aminoácidos: las principales son las siguientes.

- i. **Serín-proteasas (EC.3.4.21)**: son de gran importancia debido a su actividad y estabilidad a pH alcalinos. En su centro activo presenta un residuo nucleofílico de serina, junto con residuos de histidina y aspartato. Estos son, generalmente, activos a pH neutro y

alcalino, siendo el rango de pH óptimo de 7-11, aunque se han descrito serín-proteasas cuyo pH de trabajo óptimo es superior, 10-12.5 (*Bacillus sp.* YaB, Shimogaki y col., 1991).

ii. **Cisteín-proteasas (EC.3.4.22):** En su centro activo se encuentra un residuo de cisteína. Son similares a las serín-proteasas, pero presentan un grupo -SH en el sitio catalítico, en vez de un grupo -OH, como ocurre en el caso de la serina. Presentan un máximo de actividad en regiones de pH más neutros que las serín-proteasas (Gould, 1975; Ward, 1983).

iii. **Aspartato-proteasas (EC.3.4.23):** son proteasas ácidas, con un residuo de ácido aspártico en su centro catalítico, que aporta un grupo -COOH (Fruton, 1982). Son enzimas cuya actividad máxima se da en condiciones ácidas.

b. Su centro activo presenta cationes metálicos que promueven la catálisis:

i. **Metalo-proteasas (EC.3.4.24):** contienen un catión metálico en su sitio activo, generalmente, zinc (Adler-Nissen, 1993). Su pH óptimo se encuentra en la zona neutra.

1.3.4.2. Producción de proteasas mediante fermentación microbiana

La producción de proteasas es una propiedad inherente de todos los organismos vivos y, generalmente, estas enzimas son constitutivas (Gupta y col., 2002a).

Sin embargo, básicamente, son las bacterias los organismos que constituyen la principal fuente de producción de proteasas, debido a una serie de factores:

- Los microorganismos pueden ser cultivados y, así, generar grandes poblaciones productoras.

- Se generan en un corto período de tiempo grandes cantidades del producto deseado (proteasas) mediante métodos de fermentación estándar, y de forma regular (Gupta y col., 2002a).
- Además, las proteasas microbianas tienen un período de vida medio largo y pueden ser almacenadas bajo condiciones ideales durante semanas, sin que haya pérdida de actividad enzimática.

La producción de proteasas extracelulares es una característica de muchas especies bacterianas (Priest, 1977). Se sabe que la producción de estas enzimas proteolíticas está asociada con el comienzo de la fase estacionaria, que marca la transición desde la etapa del crecimiento vegetativo microbiano a una etapa de latencia y, en muchos casos, de esporulación, en el caso de aquellos microorganismos formadores de esporas (Gupta y col., 2002a). Además, se conoce que es un proceso regulado, principalmente, por la existencia de fuentes de C y N en el medio (Gupta y col., 2002a).

Existe la tendencia a relacionar la producción de proteasas con el proceso de esporulación, como ocurre en el caso de muchas bacterias del género *Bacillus* (*B. licheniformis* (Hanlon y Hodges, 1981); *B. subtilis* (O'Hara y Hageman, 1990)), pero, sin embargo, está establecido que la producción de proteasas y la esporulación son fenómenos independientes, que tienen lugar en la fase estacionaria (Khan, 2000). En cualquier caso, la producción de enzimas proteolíticas extracelulares tiene lugar cuando se da una situación de limitación de nutrientes, situación que provoca la transición hacia la fase estacionaria.

Bajo las condiciones adecuadas, el rango de producción va a depender, específicamente, del microorganismo en cuestión. Existen diversas fuentes de interés, pero el grupo dominante de productores de proteasas, desde el punto de vista comercial, pertenece al género *Bacillus*, debido a su reconocida capacidad para producir proteasas de forma abundante, lo que las hace, realmente, interesantes para su explotación comercial.

Una gran variedad de especies de este género, procedentes de muy distintos ambientes, han sido estudiadas y analizadas como productoras de proteasas alcalinas, pero los *bacilli* con un mayor potencial productor son cepas de *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* y *B. mojavensis* (Gupta y col., 2002b;

Kalisz, 1988; Kumar y Takagi, 1999; Rao y col, 1998). Todos estos *bacilli* presentan la habilidad de secretar grandes cantidades de proteasas, directamente, al medio de fermentación.

A nivel industrial, uno de los principales problemas limitantes en la producción de proteasas es el elevado coste dedicado a los medios fermentativos (Romero y col., 2007). De forma genérica, se estima que entre un 30% y un 40% de ese coste se dedica a los medios de cultivo microbiano (Genesse, 1997). Por tanto, resulta muy importante dedicar grandes esfuerzos en la búsqueda y desarrollo de nuevos substratos de bajo coste para la producción de proteasas a nivel industrial, lo que reduciría, notablemente, los costes de producción (Romero y col., 2007). Así, pequeñas mejoras logradas mediante la optimización del proceso de producción pueden llegar a ser decisivas para el éxito comercial (Reddy y col., 2007).

Frecuentemente, la industria emplea como medios de cultivo distintos hidrolizados proteicos o peptonas de variado origen (peptonas de colágeno-Vasileva-Tonkova y col., 2007; peptonas de girasol-Parrado y col., 1993), debido a que constituyen una fuente rica en aminoácidos y péptidos (Romero y col., 2007). Sin embargo, los SOA se presentan, también, como una alternativa, realmente, beneficiosa. El empleo de estos subproductos, tales como los derivados del maíz empleado para la producción de bioetanol como combustible, constituyen un medio de fermentación adecuado, y supone un beneficio medioambiental, ya que de esta forma se contribuye a transformar, de forma sostenible, los recursos (Coello y col., 2003).

1.4. Hidrolizados enzimáticos: Biofertilizantes/Bioestimulantes

Los procesos de hidrólisis proteica mediada por enzimas dan como resultado los denominados hidrolizados proteicos, constituidos, principalmente, por péptidos y aminoácidos libres. Estos hidrolizados, mayoritariamente, se emplean en la industria alimentaria. De hecho, los primeros hidrolizados, obtenidos mediante procedimientos químicos, fueron empleados como agentes saborizantes en el año 1.886 (Olsman, 1979).

Estos nuevos productos aportan nuevas propiedades funcionales a los alimentos como solubilidad, poder emulsionante, capacidad espumante,... y su utilización como ingredientes alimenticios está muy extendida en los últimos años (Jost y col., 1987; Turgeon y Gauthier, 1990; Parrado y col., 1991; Parrado y col., 1993).

Sin embargo, el interés que existe por estos productos hidrolizados no se limita a la industria alimentaria. Todos ellos presentan una amplia gama de aplicaciones potenciales, entre las que se incluyen las que desarrolla la industria agroquímica, empleándolos como fuentes nutricionales para plantas y cultivos.

Cuando se realiza la hidrólisis enzimática controlada de las proteínas, se obtiene un equilibrio entre aminoácidos en forma libre y péptidos, que confiere al hidrolizado un significativo papel nutritivo como biofertilizante/bioestimulante, por su capacidad de estimular el crecimiento y el desarrollo de plantas y cultivos, así como de incrementar y potenciar la actividad microbiológica del suelo. Los aminoácidos y los péptidos de bajo peso molecular que los constituyen son sustancias nutritivas de fácil absorción y asimilación para las plantas, tanto por vía foliar como radicular, transportándose a los órganos del vegetal, como brotes, flores, frutos,... (Ueda y col., 1985; Parrado y col., 2008). Allí, pueden ser empleados para que la planta elabore sus propias proteínas, ahorrándose una serie de procesos metabólicos consumidores de energía (Franco, 1990). Y no sólo pueden ser absorbidos y empleados por las plantas, la microfauna existente en el medio edafológico es capaz de usarlos como fuente nitrogenada, fundamental para su crecimiento y actividad. Este nitrógeno es un elemento fundamental, ya que es un constituyente básico de las proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas, etc. Este N permite el desarrollo de la actividad metabólica de plantas y microorganismos.

Por otro lado, la necesidad de disminuir la dependencia de productos químicos artificiales para ser empleados en el suelo está obligando a la búsqueda de alternativas fiables y sostenibles. Por ejemplo, en la agricultura ecológica se le da gran importancia a los abonos orgánicos y, cada vez más, se están empleando en cultivos intensivos.

Además, no se puede olvidar la importancia que tiene mejorar diversas propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, y en este sentido, los nutrientes orgánicos juegan un papel fundamental.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Se plantean los siguientes objetivos en esta fase del trabajo:

1. La selección y caracterización físico-química y proteica de distintos subproductos procedentes de la industria agroalimentaria, que se caractericen por su elevado contenido en MO, susceptibles de ser convertidos en biofertilizantes/bioestimulantes.
2. La mejora de las propiedades físicas de las proteínas que constituyen los subproductos orgánicos agroindustriales (SOA) seleccionados, mediante procesos bioquímicos mediados por proteasas (hidrólisis enzimática): solubilización y disminución del tamaño molecular de las proteínas.
3. La producción de proteasas a partir de residuos orgánicos.
4. El desarrollo y la optimización del proceso bioquímico de hidrólisis enzimática.
5. La obtención de hidrolizados proteicos a escala de laboratorio y su caracterización físico-química y proteica.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. SOA seleccionados

Se han empleado los siguientes subproductos orgánicos, de origen agroindustrial:

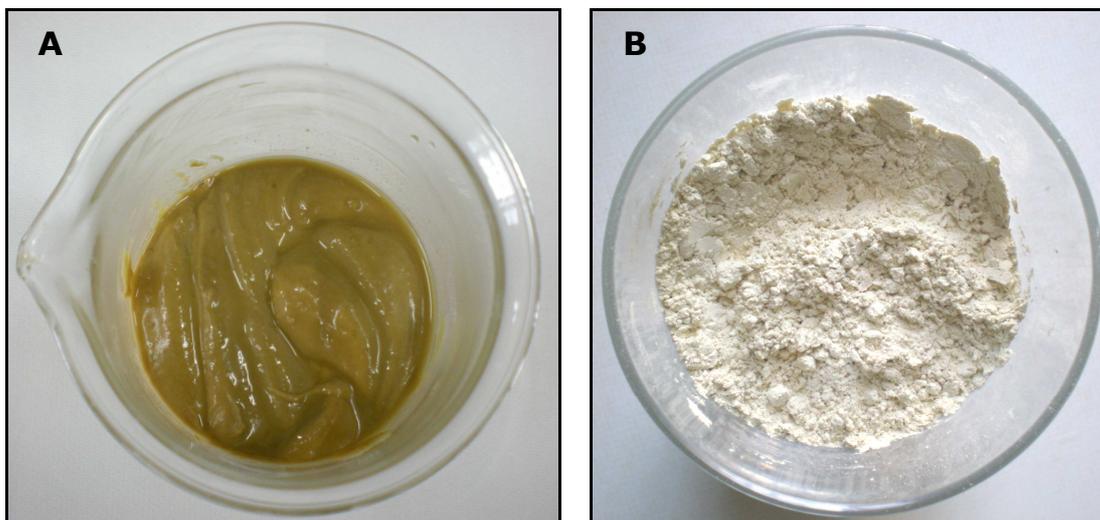
- **WCDS** (*Wheat Condensed Distillers' Solubles*) (Imagen.4A): que se obtienen tras la fermentación del almidón de los granos de trigo para obtener etanol. Una vez finalizada la fermentación, el etanol es destilado. Como resultado de la destilación, se obtienen las denominadas vinazas o material no alcohólico resultante de la fermentación. Los componentes de las vinazas son separados por centrifugación, dando como resultado una fracción sólida, y una fracción soluble, los *Distillers' Solubles*. Estos solubles son secados, generándose una pasta o sirope, donde, debido a la pérdida de agua, se han concentrado sus componentes orgánicos, pasando de, aproximadamente, un 5% a un 30% de materia seca.

Estos WCDS han sido elaborados y suministrados por Bioetanol Galicia (Texeiro, La Coruña, España), planta de producción de bioetanol de la compañía Abengoa Bioenergy.

- **CG** (Carob Germ) (Imagen.4B): se corresponde con la harina de germen de algarroba (embrión de la semilla de este fruto). Este germen de algarroba es un subproducto resultante del procesamiento de la algarroba para la obtención de harinas y otros productos de aplicación alimentaria que se obtienen a partir de la vaina y pulpa del fruto. Es procesado para su uso como pienso animal (Drouliscos y Malekafi, 1980). Es un material que se caracteriza por su elevado contenido en proteínas insolubles (Wang y col., 2001). CG, empleado en este trabajo, se ha obtenido por molienda del germen, una vez que ha sido separado del resto de la semilla.

Esta harina ha sido fabricada por AlimCarat, S.L. (Consell, Mallorca, España).

Imagen.4: WCDS (A) y CG (B).



3.2. Caracterización química de los SOA y los BSE

3.2.1. Determinación de MO

La determinación del contenido de MO se ha realizado mediante el método de combustión seca, basado en la diferencia en peso de las muestras antes y después de ser quemadas en un horno mufla a 500 °C durante, al menos 4 horas.

Las muestras secadas en estufa a 50°C durante 24 horas fueron sometidas a combustión a una temperatura elevada (500°C) hasta quemar toda la MO presente en la muestra original. El peso del material remanente después de la combustión da el contenido en cenizas en la muestra original y el contenido en MO se calculó como la diferencia entre el peso seco inicial y el peso en cenizas.

3.2.2. Determinación de carbohidratos totales

La determinación de carbohidratos totales se ha realizado según la metodología descrita por Dubois y *col.*, 1956.

La cantidad de carbohidratos totales solubles se llevó a cabo mediante extracción en etanol:agua (2:3), a partir de 10 g de muestra, durante 2 horas. Tras

este período de tiempo, se centrifugó la muestra y el sobrenadante se filtró a través de un filtro nº 1 Whatman.

El total de carbohidratos solubles se determinó mediante colorimetría, empleando el método fenol-ácido sulfúrico. Para ello, se tomaron 50 µl del filtrado y se le añadieron 100 µl de agua destilada. A continuación, se añadieron 50 µl de una solución de fenol al 80% (v/v) y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se incubaron las muestras durante 10 minutos a 22°C y la concentración de carbohidratos se determinó a 490 nm en espectrofotómetro (GeneQuant, GE Healthcare). Se realizó una curva estándar de glucosa para determinar la concentración de las muestras.

3.2.3. Determinación de nitrógeno total y proteínas totales

La determinación del nitrógeno total se ha realizado mediante el método Kjeldahl, establecido por la A.O.A.C. (1990).

Según este método, 0.5 gramos de muestra se digirieron con 10 ml H₂SO₄ concentrado y 10 ml de H₂O₂ al 33% (v/v) durante 30 minutos a 420°C. Tras esta digestión, se añadió agua desionizada (50 ml). De esta forma, el nitrógeno de cada muestra se convierte en amonio sulfato. En presencia de un exceso de NaOH 10M (50 ml), los iones amonio se liberan en forma de amoníaco, destilado y recogido sobre solución en ácido bórico. Este amoníaco se determinó con una solución valorada de H₂SO₄ 0.05N hasta el viraje de color (a rosa).

El contenido en proteína se ha determinado multiplicando el nitrógeno total por un factor de conversión de nitrógeno a proteína 6.25, factor aplicable a la mayoría de las proteínas vegetales.

3.2.4. Determinación de grasas totales

El contenido en grasa total se ha determinado por gravimetría, tras la extracción de la muestra con hexano durante 12 horas en un extractor Soxhlet. Una vez terminada la extracción, el solvente se destiló y el residuo graso se pesó (Clemente y col., 1997).

3.2.5. Determinación de cenizas

El contenido de cenizas se ha determinado según el método de la A.O.A.C. (1990), basado en la gravimetría.

Las muestras se incineraron a 550°C en un horno mufla durante un período de tiempo comprendido entre 36 y 48 horas hasta obtener un peso constante.

3.2.6. Determinación de microelementos

El contenido en macro y microelementos se ha determinado mediante espectrometría de emisión atómica y de plasma ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry), empleando, para ello, un equipo multielemento secuencial Fisons-ARL 3410, provisto de un sistema de control y adquisición de datos.

Las condiciones de operación estándar de este equipo que se han empleado son las siguientes:

- El gas de transporte, el gas refrigerante y el gas plasma es argón a 80 psi de presión.
- La velocidad de flujo del gas de transporte es 0.8 l/min, la del gas refrigerante, 7.5 l/min y la del gas plasma, 0.8 l/min.
- El tiempo de integración es 1 segundo. Una miniantorcha consume gas argón a una potencia de radiofrecuencia de 650 W.

3.3. Determinación de la solubilidad de las proteínas de los SOA y los BSE

La solubilidad de las proteínas constituyentes de SOA y BSE se ha determinado por el método descrito por Adler-Nissen, 1977.

Brevemente, a 10 ml de muestra (1% p/v) se le añadieron 5 ml de una solución de ácido tricloroacético 2.4 M para lograr la precipitación de las proteínas insolubles. El precipitado obtenido se recogió mediante centrifugación a 8.000 rpm durante 10 minutos.

Finalmente, se determinó el contenido en N total del sobrenadante recogido mediante el método Kjeldahl (A.O.A.C, 1990).

3.4. Caracterización proteica de los SOA y los BSE

3.4.1. Composición aminoacídica

Para el estudio de la composición aminoacídica de los SOA de partida y de los BSE obtenidos se procedió a su hidrólisis ácida, con lo que se logró liberar los distintos aminoácidos constituyentes.

Los aminoácidos presentes obtenidos se han cuantificado por cromatografía de HPLC, previa derivatización con 6-aminoquinolil-N-hidroxi-succinilmidil carbamato (AQC), sustancia cromófora por fluorescencia (λ_{ex} 250 nm λ_{em} 295 nm).

3.4.1.1. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida se ha realizado siguiendo, básicamente, el método descrito por Bidlingmeyer y *col.*, 1984.

Para esta hidrólisis se empleó una cantidad de muestra equivalente a unos 20 mg de proteína y se digirió por HCl 6N (12 ml) en tubo cristal. A continuación, se añadió fenol al 5% en HCl (1.6 ml) y α -aminobutírico 2.5 mM, como patrón interno (4 ml). Las muestras se sometieron a ultrasonidos durante 2 minutos y se les burbujeó con nitrógeno (para eliminar oxígeno), durante dos series de 20 segundos cada una. El proceso de hidrólisis se mantuvo en condiciones de vacío a 110°C durante 24 horas.

Tras este período de tiempo, las muestras se enfriaron y se llevaron a sequedad en rotavapor (sin superar los 40°C en el baño). Al residuo seco resultante de cada muestra, lavado con agua milli-Q, se le añadió una solución de citrato de litio (pH 2.2) hasta un volumen final de 20 ml. Finalmente, se filtraron las muestras en 0.2 μm y se conservaron a -80°C hasta la derivatización.

3.4.1.2. Derivatización

La derivatización se llevó a cabo utilizando el reactivo de aminas 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC), que es un derivado heterocíclico del N-hidroxisuccinimidil carbamato, que reacciona tanto con aminas primarias como secundarias, convirtiéndolas en derivados de urea estables, fácilmente, detectables por fluorescencia a 395 nm y liberando 6-aminoquinolina (AMQ), que no interfiere en la detección.

El método empleado para la derivatización es el recomendado por el manual de Waters AccQ-Tag, que es el siguiente:

- Pre calentamiento en bloque térmico a 55°C.
- En tubo de reacción, adición de 10 µl de muestra o del estándar y adición de 70 µl de tampón borato-AccQ flúor reconstituido.
- Agitación y reposo durante unos minutos.
- Calentamiento en bloque a 55°C durante 10 minutos.
- Inyección de 5 µl de muestra en el cromatógrafo (previamente filtrada en filtro de 0.2 µm).
- Cromatografía:
 - a. Flujo: 1ml/min
 - b. Columna: Fase reversa C-18 Pak^k (3.9 x 1150 mm) (Waters)
 - c. Temperatura de horno: 37°C
 - d. Elución en gradiente:
 - i. Canal A: eluyente A AccQ-Tag
 - ii. Canal B: acetonitrilo
 - iii. Canal C: agua milli-Q
 - e. Detección por fluorescencia:
 - i. λ_{ex} : 250 nm
 - ii. λ_{em} : 295 nm

Para la identificación y cuantificación de aminoácidos se empleó un estándar de aminoácidos de Pierce y el contenido aminoacídico de las distintas muestras (mg de aminoácido/gramo proteína) se llevó a cabo mediante el software Millennium-2000.

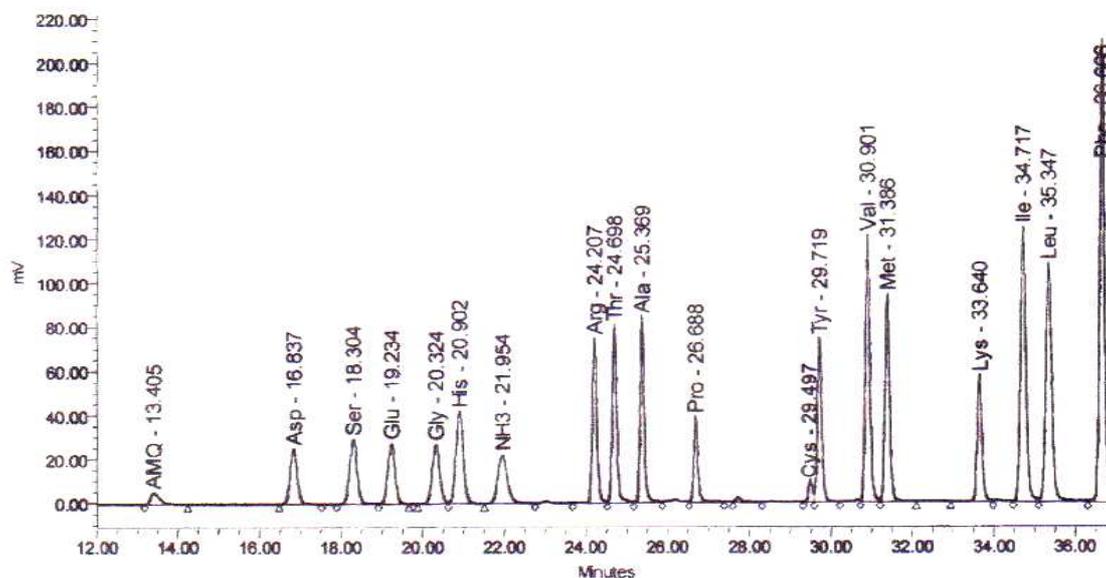


Figura.5: Cromatograma de una solución estándar de aminoácidos.

1.25 μ moles/ml de cisteína y 2.5 μ moles/ml del resto de aminoácidos.

3.4.2. Caracterización por pesos moleculares mediante cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular

Para conocer el peso molecular del componente proteico de los SOA y de los BSE se ha empleado la cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular, empleando un sistema de cromatografía FPLC Äkta-Purifier (Amersham Biotech, GE Healthcare).

Se han empleado dos columnas de exclusión molecular, la **Superdex™ 200 10/300GL** y la **Superdex™ Peptide 10/300GL** (GE Healthcare), que presentan un rango óptimo de separación comprendido entre los 10.000 y los 600.000 Da, y los 100 y 7.000 Da, respectivamente.

Imagen.5: Equipo de Cromatografía FPLC.

(Akta-Purifier, Amersham Biotech, GE Healthcare)

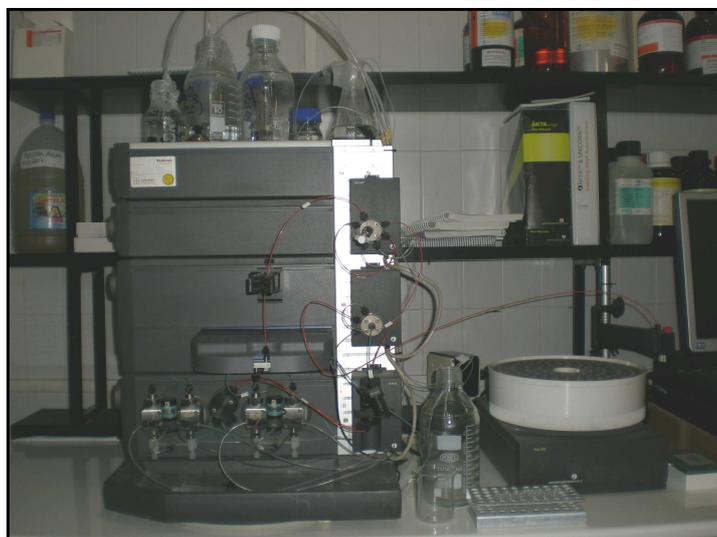


Tabla.4: Características físico-químicas de las columnas de exclusión molecular. Superdex™ 200 10/300GL y Superdex™ Peptide 10/300GL.

DATOS DE COLUMNA	Superdex™ 200 10/300GL	Superdex™ Peptide 10/300GL
Matriz	Enlaces cruzados agarosa y dextrano	Enlaces cruzados agarosa y dextrano
Volumen	± 24 ml	± 24 ml
Promedio tamaño partícula	13 µm	13 µm
Límite de exclusión	1.3 x 10 ⁶	20000 Da
Rango se separación óptimo	10000-600000 Da	100-7000 Da
pH óptimo	3-12	1-14
Tª almacenaje	4 °C a 30 °C	4 °C a 30 °C
Tª operación	4 °C a 40 °C	4 °C a 40 °C
Rango de flujo	0.25-0.75 ml/min	0.2-1.2 ml/min
Presión máxima	1.5 MPa	1.8 MPa

Las condiciones de la cromatografía han sido:

- Tampón de elución: Fosfato Sódico (Na_2HPO_4) 50 mM, pH 7.5
- Flujo: 0.5 ml/min
- Longitud de onda de absorción: 214 nm y 280 nm
- Volumen de inyección: 50 μl
- Volumen de elución: 2 volúmenes de columna
- Filtración de muestras: filtros Minisart RC4 de 0.2 μm de diámetro de poro (Sartorius AG, Alemania) para eliminar el material insoluble de las muestras

Para la determinación de los pesos moleculares del material proteico de las muestras, se han empleado distintos patrones de tamaño molecular conocido (Tabla.5 y Tabla.6).

Tabla.5: Patrones de peso molecular para la columna Superdex™ 200 10/300GL.

<i>Patrón</i>	<i>Peso molecular (Daltons)</i>	<i>[Patrón] (mg/ml)</i>
Tioglobulina	669000	0.5
Ferritina	440000	4
Aldolasa	150000	3
Conalbúmina	75000	0.5
Ovoalbúmina	43000	0.5
Ribonucleasa A	13700	0.5
Aprotinina	6500	2.5

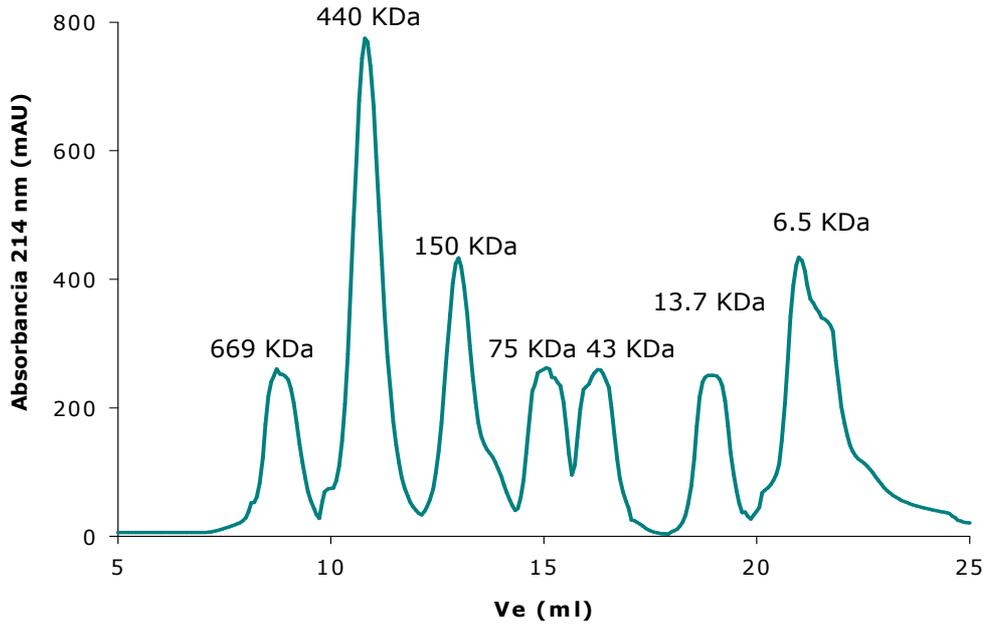


Figura.6: Perfil de elución de patrones para calibración. Columna Superdex™ 200 10/300GL.

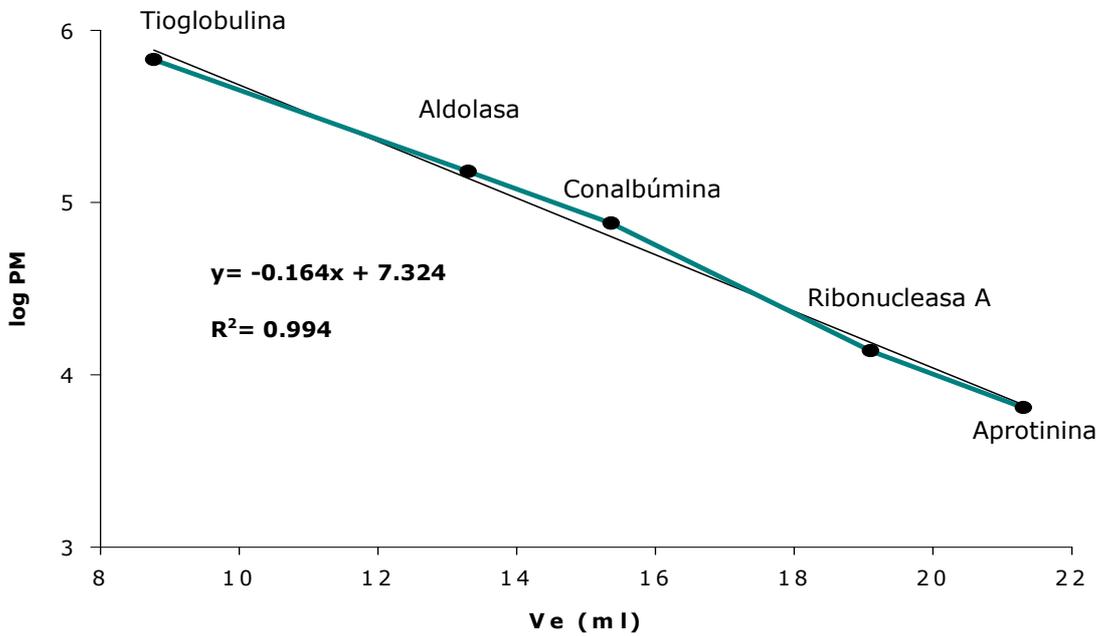


Figura.7: Recta de calibración. Columna Superdex™ 200 10/300GL.

Tabla.6: Patrones de peso molecular para la columna Superdex™ Peptide 10/300GL

<i>Patrón</i>	<i>Peso molecular (Daltons)</i>	<i>[Patrón] (mg/ml)</i>
Citocromo C	12387	0.5
Aprotinina	6500	2
Vitamina B ₁₂	1855	0.1
Glicina-3	189	0.1
Glicina	75	10

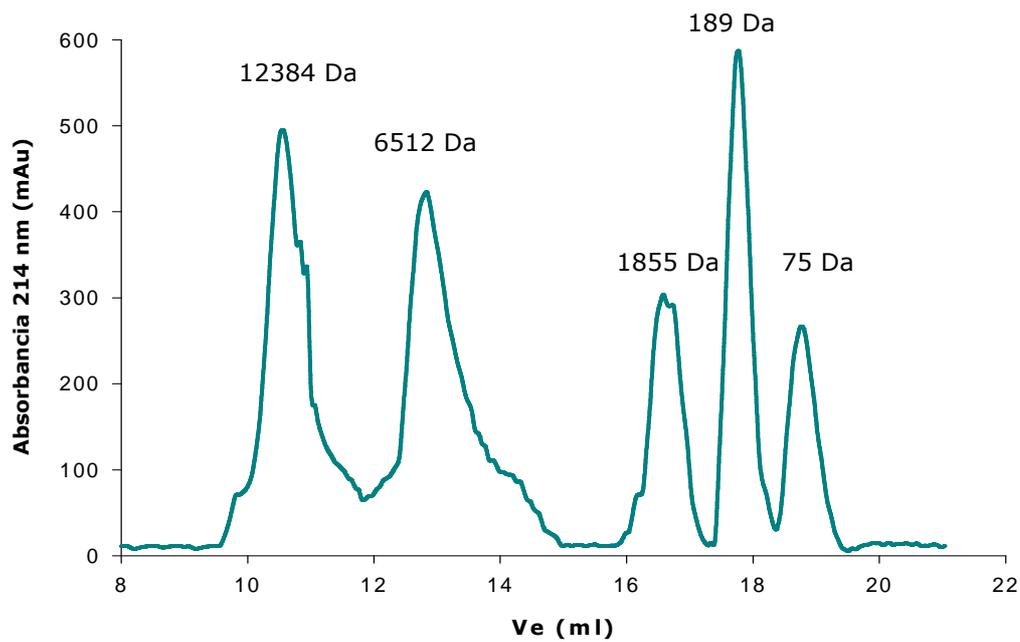


Figura.8: Perfil de elución de patrones para calibración. Columna Superdex™ Peptide 10/300GL.

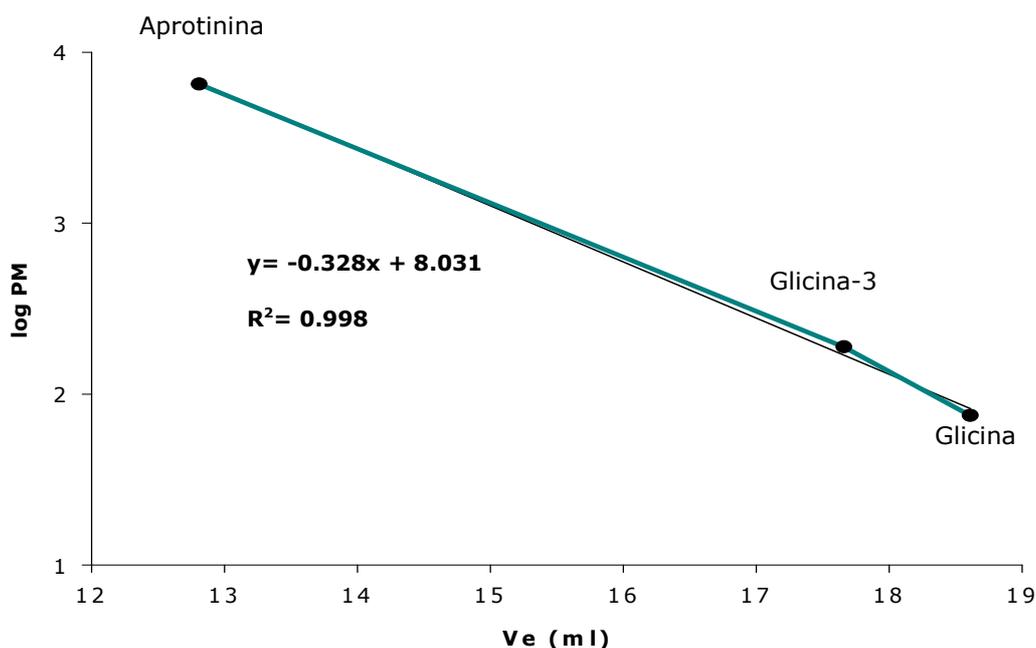


Figura.9: Recta de calibración. Columna Superdex™ Peptide 10/300GL.

3.5. Producción de proteasas

3.5.1. Microorganismos y medios de fermentación

3.5.1.1 Microorganismos y preparación del inóculo

Como microorganismo productor de proteasas se ha usado *Bacillus lichiniformis* cepa ATCC 21415. Esta cepa bacteriana se corresponde con una Gram (-) excretora de gran cantidad de proteasas al medio en el que crece.

B.lichiniformis se cultivó a 37°C bajo condiciones de agitación en medio rico LB. Los cultivos se mantuvieron en medio LB a 4°C y se refrescaban cada 15 días.

3.5.1.2. Medios fermentativos

Los medios empleados para las fermentaciones has sido:

- LB: compuesto por 10 g de triptona, 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 1l de agua. Este medio se fue autoclavado a 121°C durante 30 minutos.

- FM (*Feather Media*): el substrato base de este medio son las plumas de ave, suministradas por la empresa Tomás Guerrero, S.L. (Morón de la Frontera).

Estos medios se han preparado con distintas concentraciones de plumas de ave (Tabla.7). A la hora de preparar los medios FM, previamente a la adición del Cl_2Ca , se autoclavaron durante 30 minutos a 121°C .

Tabla.7: Medios de fermentación formulados a partir de PA.

Medio	[Plumas] (% p/v)	Cantidad Plumas (g)	Tampón Fosfato pH 7.0 (mM)	Cl_2Ca (mM)
FM-0.05	0.05	0.15	50	5
FM-0.1	0.1	0.30	50	5
FM-0.2	0.2	0.60	50	5
FM-1	1	3	50	5
FM-5	5	15	50	5
FM-10	10	30	50	5
FM-20	20	60	50	5

3.5.2. Sistemas de fermentación

Las fermentaciones han tenido lugar en distintos matraces Erlenmeyer (500 ml) en agitación continua (200 rpm), mediante agitadores orbitales con control de la temperatura.

3.5.3. Condiciones operacionales

Se han llevado a cabo ensayos de fermentación para evaluar los efectos de la concentración de substrato y de la temperatura para establecer las condiciones óptimas de trabajo y, así, obtener adecuados rendimientos de producción.

El inóculo microbiano (al 2%, v/v) fue añadido a 300 ml de los siguientes medios: LB, FM-0.2, FM-1, FM-5, FM-10 y FM-20. Las fermentaciones se llevaron a cabo, en paralelo, a unas temperaturas de 45°C y 50°C , en agitación continua (200 rpm).

Imagen.6: Incubador-Agitador orbital. CITIUS.



3.5.4. Determinación de la actividad proteásica

La determinación de la actividad proteásica total se realizó mediante el método descrito por Beynon y Bond, 1989.

Según este método, 0.5 ml de una solución al 1% (p/v) de azocaseína en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0) se añadió a 0.5 ml de muestra, procedente de cada uno de los caldos de fermentación. La mezcla se incubó a 40°C durante 10 minutos. Tras este período de tiempo, la reacción se paralizó añadiendo 2.5 ml de TCA al 5% (p/v). Posteriormente, se determinó la actividad enzimática, colorimétricamente, a 440 nm de longitud de onda, en un espectrofotómetro (GE Healthcare).

Este método exige la obtención de una recta de calibración a partir de una solución de proteasa comercial (Bioproteasa L-450, Biocon). Se entiende por unidad de actividad proteolítica la cantidad de enzima requerida para producir un incremento en la densidad óptica de 0.001 (Romero y *col.*, 2007).

Tabla.8: Actividad proteásica de soluciones de L-450 para curva de calibración.

Dilución L-450	Act. 16 h (U/ml)	Act. 24 h (U/ml)	Act. 40 h (U/ml)	Act. 65 h (U/ml)	Act. 112 h (U/ml)
1:2500	0.250	0.255	0.255	0.254	0.254
1:5000	0.145	0.156	0.156	0.175	0.175
1:7500	0.097	0.102	0.102	0.142	0.142
1:10000	0.088	0.074	0.074	0.120	0.120

3.5.5. Morfología celular

Para determinar la morfología microbiana durante la fermentación se emplearon métodos estándar establecidos.

3.5.5.1. Microscopía óptica

Brevemente, los caldos de fermentación se observaron en un microscopio óptico Leica HC PH2 (Imagen.7) con lentes PL FL FLUOTAR 40X/0.7 mediante la técnica de campo claro, usando, para ello, luz azul.

3.5.5.2. Scannig Electron Microscopy (SEM)

Las muestras anteriores se resuspendieron en una solución de glutaraldehído, para fijar las muestras. Estas suspensiones formadas se volvieron a centrifugar y los *pellets* restantes fueron deshidratados mediante resuspensión secuencial en soluciones de concentración creciente de etanol, desde el 10% al 96% (v/v), alternando entre cada solución distintas centrifugaciones. Al final, las muestras fueron secadas en cámara de vacío y se recubrieron con partículas de oro mediante pulverización.

Las observaciones se realizaron mediante un microscopio Phillips XL-30 ESEM (Imagen.8, CITIUS, Sevilla).

Imagen.7: Microscopio Óptico Leica HC PH2

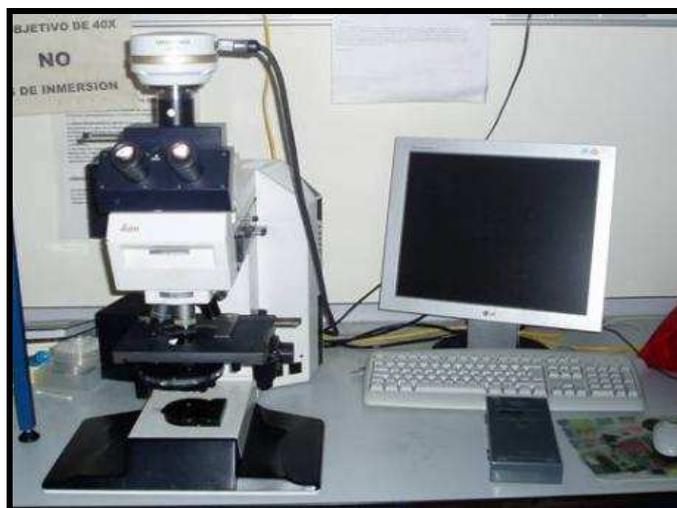


Imagen.8: Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).



3.5.6. Estudios proteómicos: huella proteica de las fermentaciones

3.5.6.1. Precipitación de proteínas

Las muestras procedentes de los distintos caldos de fermentación se centrifugaron durante 20 minutos a 14.000 rpm. Se emplearon 10 ml del sobrenadante obtenido (fracción soluble) y se le añadieron 40 ml de metanol, 10 ml de cloroformo y 30 ml de agua Milli-Q, sometiendo a las muestras a agitación durante, al menos, 1 minuto.

La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm y al sobrenadante se le añadieron 30 ml de metanol, volviéndose a centrifugar, en este caso, a 16.000 rpm durante 5 minutos, para la precipitación de las proteínas solubles. Los *pellets* obtenidos fueron llevados a sequedad en estufa a 37°C. Las proteínas fueron resuspendidas en agua Milli-Q.

3.5.6.2. Identificación de proteínas

Para la identificación de las proteínas extracelulares expresadas durante las fermentaciones, se hizo un análisis LC-MS.

Para ello, 30 µg de proteína de cada muestra se resuspendieron en 30 µl de una solución 6M de urea, 200 mM de bicarbonato sódico y 10 mM de DTT, para su reducción, durante 30 minutos. A continuación, se añadió 10 µl de una solución 10

mM de iodoacetamida, para la alquilación de las proteínas, durante 30 minutos en oscuridad. Tras este tiempo, las muestras se diluyeron con agua Milli-Q, para disminuir la concentración de urea hasta 1M.

A continuación, las muestras fueron digeridas con tripsina (ratio proteína:enzima de 50:1). La digestión se produjo durante toda la noche a una temperatura de 37°C. Tras este tiempo, se acidificaron las muestras con TFA y se concentraron usando columnas Speed C18/C18 (Applied Separations, USA).

Los péptidos generados se eluyeron con 400 µl de una solución al 70% (v/v) de acetonitrilo y 0.1% (v/v) de TFA. Las muestras se secaron, completamente y, finalmente, se resuspendieron en 15 µl una solución de acetonitrilo al 5% (v/v) y ácido fórmico al 0.1% (v/v), listas así para ser analizadas mediante LC/MS.

El análisis LC/MS se realizó en un sistema HPLC Surveyor en tandém con un espectrómetro de masas Finnigan LTQ (ThermoFisher Scientific, USA). 5 µl de la muestra, preparada como se ha indicado anteriormente, se inyectaron en una pre-columna C18 PepMap100 µPrecolum Cartridge (Dionex) para pre-concentrar la muestra y lavarla. Posteriormente, se inyectó en una columna C18 Biobasic (75 µm x 10 cm) (ThermoFisher Scientific).

Las condiciones de la cromatografía han sido:

- Tampón de elución: acetonitrilo en 0.5% (v/v) de ácido fórmico.
- Gradiente: del 5% al 40% de acetonitrilo.
- Flujo: 250 nl/min.
- Voltaje: 2 kV.
- Temperatura capilar: 170°C.

Los datos obtenidos en formato SEQUEST (DTA) fueron buscados sobre la base de datos del NCI, mediante MASCOT.

3.6. Hidrólisis enzimática controlada

3.6.1. Técnica pH-stat

La producción de hidrolizados proteicos, mediante hidrólisis enzimática, se ha llevado a cabo mediante la técnica denominada pH-stat, descrita, previamente, por Adler-Nissen, 1977.

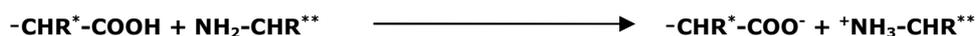
Esta técnica implica el control de pH, temperatura y agitación durante el proceso hidrolítico, llevado a cabo, en este caso, en reactores con control automático de dichos parámetros.

El fundamento químico de la técnica se muestra en el siguiente esquema:

- Ruptura del enlace peptídico:



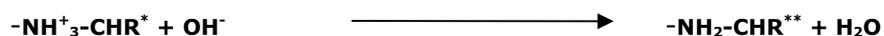
- Intercambio de protón: tras la ruptura del enlace se forman grupos amino y carboxilo y pueden estar, parcialmente, ionizados, dependiendo del pH del proceso de hidrólisis.



A un pH bajo, todos los grupos amino están protonados y sólo parte de los carboxilo están desprotonados, dando lugar a una captación neta de protones por cada enlace peptídico roto, causando un incremento del pH.

Sin embargo, a pH neutro y alcalino, la hidrólisis resulta en una disminución de pH, pues todos los carboxilos se encuentran desprotonados y, solamente, una parte de los grupos amino están protonados (Benítez y col., 2008).

- Titulación del grupo amino:



Esta técnica establece que el control del proceso se hace en base al grado de hidrólisis (GH) o porcentaje de enlaces peptídicos rotos (Adler-Nissen, 1977).

$$\text{GH (\%)} = [(\text{N}^\circ \text{ de uniones peptídicas rotas}) / (\text{N}^\circ \text{ total de uniones peptídicas})] \times 100$$

El número de uniones peptídicas rotas por unidad de peso se calcula a partir de la composición de aminoácidos, se calcula el número de aminoácidos que componen la proteína por unidad de peso, con lo que se conoce, entonces, el número de enlaces peptídicos.

La relación entre el GH y el consumo de base (NaOH 10M), que se adiciona para mantener el pH de la reacción constante, se expresa según la siguiente ecuación:

$$\text{GH (\%)} = [(B \times N_B) / MP] \times (1/\alpha) \times (1/h_t) \times 100$$

Donde,

B: consumo de base (l)

N_B: normalidad de la base (N)

MP: masa proteica (Factor Kjeldahl x N, kg)

α : grado de disociación, siendo $\alpha = (10^{\text{pH}-\text{pK}}) / (1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}})$. El pK es la medida de los valores de los pK de los grupos α -amino liberados durante la hidrólisis, los valores de pK varían, significativamente, con la temperatura, pero con respecto al substrato son muy independientes (Adler-Nissen, 1981).

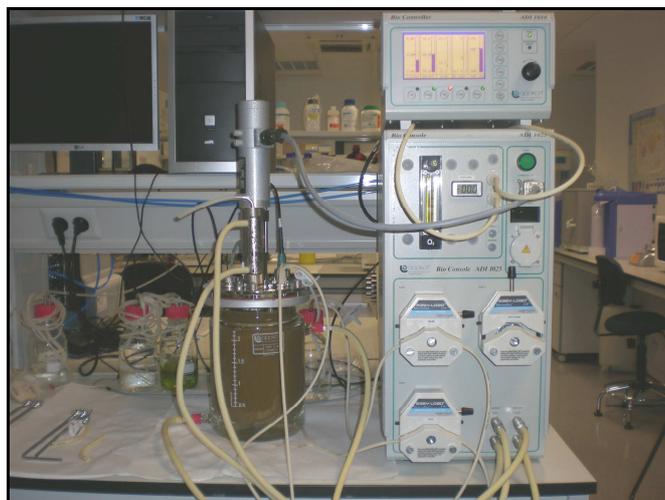
h_t: número total de uniones peptídicas en las proteínas (equivalentes gramo/kg).

3.6.2. Biorreactor

Se ha empleado un biorreactor con control automático de pH, temperatura y agitación (Imagen.9).

El sistema empleado pertenece al Servicio General de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

Imagen.9: Biorreactor enzimático. (CITIUS).



3.6.3. Condiciones operacionales

Las condiciones bajo las que han tenido lugar las reacciones de hidrólisis enzimática, para obtener los distintos BSE son las siguientes:

- Solvente: agua.
- Agente catalizador:
 - Proteasas comerciales: Bioproteasa LA-450 (Biocon Española, S.A., España).
 - Proteasas producidas mediante fermentación por *B.licheniformis* cepa ATCC 214115.
- Temperatura: 55°C-60°C.
- pH: 8.5. Se mantuvo controlado mediante la adición de NaOH 10M.

Tabla.9: Características y condiciones óptimas de uso de las proteasas L-450 y LA-450.

Bioproteasa LA-450	
Color	Claro
Olor	Inodoro
Cepa	<i>Bacillus sp.</i>
Actividad	450000 U Delft/ g
Condiciones Óptimas	pH _{máx. actividad} : 9
	T ^a máx: 60°C

3.7. Tratamiento estadístico

Los datos fueron comparados usando el programa SigmaPlot 2000, usando como método de análisis estadístico la prueba *t*-Student.

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo, se ha llevado a cabo el estudio de distintos subproductos orgánicos procedentes de diversas actividades agroindustriales (SOA), con el objetivo de producir, mediante un proceso biológico de hidrólisis enzimática, diversos productos con capacidad bioestimulante.

Las actividades desarrolladas en esta fase del trabajo comprenden dos etapas, que se desarrollaron, consecutivamente, en el tiempo.

Brevemente, se describen estas etapas de trabajo:

1. En una primera etapa, *se seleccionaron y se caracterizaron* distintos SOA, para su posterior conversión en Bioestimulantes Edafológicos (BSE).
2. La segunda etapa comprende, a su vez, distintas fases de trabajo. En una fase inicial, *se obtuvieron las enzimas proteolíticas (proteasas)* como agentes catalíticos de las reacciones de hidrólisis. A continuación, *se realizaron las hidrólisis enzimáticas para la producción de BSE*, y, como fase final, *se caracterizaron* estos BSE, una vez obtenidos.

Los resultados generados en las distintas etapas se detallan y se discuten a continuación:

4.1. Selección y caracterización de los SOA

Como se ha comentado, para la realización de todos los estudios llevados a cabo en esta fase del presente trabajo, se seleccionaron y se caracterizaron diversos SOA, cuya principal propiedad en común era su alto contenido en MO, y cuyo exponente, más relevante, era su elevado componente proteico.

Por todo esto, no sólo se ha planteado, a continuación, una caracterización química convencional de estos SOA seleccionados, sino, también, se ha realizado una caracterización proteica, de forma más profunda.

Los subproductos orgánicos seleccionados, que se han empleado en este trabajo son:

- **WCDS** (*Wheat Condensed Distillers' Solubles*): elaborados por Bioetanol Galicia (Texeiro, La Coruña, España), planta de producción de bioetanol de la compañía Abengoa Bioenergy.

Imagen.10: Planta BIOETANOL GALICIA. Texeiro. La Coruña.



- **CG** (Carob Germ): harina de germen de algarroba fabricado por AlimCarat, S.L. (Consell, Mallorca, España).

4.1.1. Caracterización química de los SOA

Con el fin de conocer dichas materias primas, se han analizado los siguientes parámetros químicos: **MO, carbohidratos totales, proteínas totales, grasas totales**, así como, el contenido en **cenizas**. Además, se realizó el análisis de **micronutrientes**, presentes en los SOA seleccionados.

En la Tabla.10 se recogen los resultados obtenidos de la composición química de WCDS.

Tabla.10: Composición química básica de WCDS. Los resultados expresados en tanto por ciento (p/p) son valores medios de tres análisis. Datos referidos a materia seca.

WCDS	(%)
Materia Orgánica	23.16 ± 1.13
Carbohidratos Totales	50.48 ± 6.67
Proteínas Totales	39.17 ± 4.89
Grasas Totales	4.27 ± 0.45
Cenizas	6.08 ± 0.79

A la vista de los resultados, el componente orgánico mayoritario está representado por los carbohidratos, presentes en un 50.48±6.67% (p/p). Principalmente, estos carbohidratos se presentan en forma de fibra, tal como celulosa y hemicelulosa. El segundo componente principal se encuentra representado por las proteínas, con un valor próximo al 40% (p/p). Finalmente, el tercer componente orgánico determinado, en este caso, minoritario, son las grasas, que, con un 4.27±0.45% (p/p), se presentan en muy baja concentración en este subproducto.

Hay que señalar, también, el alto valor de humedad de WCDS, algo superior al 70% (p/p).

Junto con el análisis de la composición química, se determinó, también, la concentración de macro y micronutrientes, que se muestra en la Tabla.11.

Tabla.11: Contenido de microelementos de WCDS. Los resultados expresados son valores medios de tres análisis. Datos referidos a materia seca.

Elemento	Concentración (g/Kg)	Elemento	Concentración (g/Kg)
Fósforo	3.48 ± 0.23	Cobre	≤ 0.005
Potasio	6.88 ± 0.45	Magnesio	1.01 ± 0.23
Sodio	0.89 ± 0.06	Cobalto	-
Azufre	1.49 ± 0.09	Manganeso	≤0.05
Calcio	≤0.5	Molibdeno	-
Hierro	≤0.1	Zinc	≤0.02

Como se aprecia en la tabla, los elementos que se presentan en mayor cantidad son el potasio (K), el fósforo (P) y el azufre (S), así como el magnesio (Mg). Este contenido mineral resulta de gran importancia, desde el punto de vista nutricional, ya que WCDS, debido a su alto contenido en proteínas y aminoácidos esenciales, se ha venido empleando, habitualmente, como alimento animal.

Por otro lado, al igual que en el caso de los WCDS, se determinó la composición química de CG, que se ha generado a partir de la molienda del germen de algarroba. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla.12.

Tabla.12: Composición química de CG. Los resultados expresados en tanto por ciento (p/p) son valores medios de tres análisis. Datos referidos a materia seca.

CG	(%)
Materia Orgánica	49.20 ± 2.0
Carbohidratos Totales	38.00 ± 1.6
Proteínas Totales	46.50 ± 1.2
Grasas Totales	6.50 ± 0.2
Cenizas	5.70 ± 0.04

Como se comprueba, una de las diferencias que existen entre los dos SOA seleccionados se encuentra en su contenido de MO (p.h.). Así, WCDS, de la forma en la que se presenta, es un subproducto con, aproximadamente, un 23% (p/p) de MO, mientras que CG, que es una harina en polvo, muestra valores superiores, alcanzando su contenido en MO un valor próximo al 50% (p/p).

Sin embargo, la diferencia principal entre WCDS y CG, que se aprecia al ver la tabla de resultados, es que, el componente principal de CG son las proteínas, con un 46.50±1.2% (p/p), seguido de los carbohidratos, con menos del 40% (p/p), a diferencia de lo obtenido para WCDS.

En cuanto al contenido en cenizas, éste es muy similar entre ambos SOA, con un valor del 6.08% en WCDS frente al 5.70% de CG.

Para completar el análisis químico de CG, también se ha analizado la concentración de macro y micronutrientes, que se muestra en la Tabla.13.

Tabla.13: Contenido de microelementos de CG. Los resultados expresados son valores medios de tres análisis. Datos referidos a materia seca.

Elemento	Concentración (g/Kg)	Elemento	Concentración (g/Kg)
Fósforo	3.5 ± 0.26	Cobre	≤0.05
Potasio	5.6 ± 0.3	Boro	-
Sodio	1.2 ± 0.1	Cobalto	-
Azufre	2.5 ± 0.1	Manganeso	N.d.
Calcio	5.6 ± 0.4	Molibdeno	-
Hierro	≤0.1	Zinc	≤0.05
Magnesio	2.8 ± 0.1		

N.d.: no determinado

Según estos resultados, no existen grandes diferencias entre WCDS y CG. Por tanto, los elementos que se presentan en mayor cantidad, también, son el potasio (K), el fósforo (P), el azufre (S), así como el sodio (Na). Sin embargo, hay que destacar que el contenido en Ca es muy superior al que se presenta en WCDS (10.8 veces superior en CG que en WCDS), así como el valor de Mg, también, superior en CG (1.01 ± 0.23 , en WCDS frente al 2.8 ± 0.1 , en CG).

De igual forma que WCDS, este aporte de minerales que proporciona CG, junto con su elevado contenido en MO (destacando su elevado contenido proteico) convierten a estos SOA en potenciales productos biofertilizantes/bioestimulantes.

4.1.2. Caracterización proteica de los SOA

Por su elevado contenido en proteínas, uno de los elementos claves en los procesos de biofertilización/bioestimulación, se ha considerado adecuado realizar un análisis, más detallado, de este componente proteico. Este estudio se ha basado en la determinación del contenido de aminoácidos totales de las proteínas que forman parte de ambos SOA, así como, en una caracterización por tamaño molecular de dicho componente proteico.

4.1.2.1. Composición aminoacídica de WCDS y CG

Se ha llevado a cabo la determinación de aminoácidos totales de las proteínas presentes en los SOA seleccionados y empleados en este trabajo:

Tabla.14: Composición aminoacídica de WCDS y CG. Los resultados, expresados como gramos por 100 gramos de proteína, son valores medios de 3 análisis.

COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA (g/100g proteína)					
	WCDS	CG		WCDS	CG
Ala	3.51 ± 0.16*	3.95 ± 0.15*	Arg	3.78 ± 0.13*	11.37 ± 0.31*
Asp + Asn	5.68 ± 0.31*	8.86 ± 0.24*	His	2.94 ± 0.09	2.93 ± 0.06
Cys	0.90 ± 0.03	0.96 ± 0.01	Ile	4.17 ± 0.10*	3.42 ± 0.12*
Glu + Gln	30.37 ± 0.45*	28.09 ± 0.76*	Leu	7.17 ± 0.17*	5.34 ± 0.29*
Gly	2.08 ± 0.11*	4.55 ± 0.12*	Val	5.42 ± 0.10*	4.06 ± 0.15*
Pro	8.81 ± 0.16*	3.73 ± 0.15*	Lys	2.70 ± 0.09*	6.40 ± 0.29*
Ser	4.78 ± 0.13	4.98 ± 0.13	Met	2.22 ± 0.11*	0.71 ± 0.02*
Phe	5.46 ± 0.12*	3.15 ± 0.10*	Thr	5.12 ± 0.14*	3.95 ± 0.13*
Tyr	4.11 ± 0.13*	3.62 ± 0.12*	Trp	N.d.	N.d.

N.d. No determinado.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001. *: diferencia significativa entre WCDS y CG.

Lo que se puede apreciar, al analizar estos resultados, es que, aunque ambos subproductos comparten su origen vegetal, existen diferencias, significativas, en cuanto a su composición aminoacídica.

En el caso de CG, que procede de una leguminosa como la algarroba, su contenido aminoacídico, aunque pueda variar según las especies y las condiciones del cultivo, destaca por ser una fuente rica en ácido aspártico (asp+asn: 8.86±0.24 g/100g proteína), glutámico (glu+gln: 28.09±0.76 g/100g proteína), lisina (6.40±0.29 g/100g proteína), y leucina 5.34±0.29 g/100g proteína), aunque es deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), como es característico de las leguminosas (Olvera-Novoa y Olivera-Castillo, 2000). Hay que destacar de CG, sobre todo, el elevado contenido de arginina (11.37±0.31 g/100g proteína) y de glutamina (18.23±0.24 g/100g proteína).

En cambio, WCDS, procedente de un cereal como es el trigo, presenta un perfil aminoacídico distinto a CG. En este caso, se presentan valores bajos de lisina (2.70±0.9 g/100g proteína) frente a los encontrados en CG (6.40±0.29 g/100g proteína). Por regla general, esto es habitual en los cereales. El nivel más bajo para un aminoácido en WCDS se da para la cisteína (0.90±0.01 g/100g proteína), que,

también, es característico de los cereales, que suelen ser pobres en aminoácidos esenciales.

4.1.2.2. Caracterización por pesos moleculares de las proteínas solubles de WCDS y CG

Los SOA estudiados (WCDS y CG) son subproductos que se caracterizan por su elevado contenido proteico (entre el 40% y el 46%, p/p, respectivamente). Sin embargo, sus propiedades físicas son bien distintas. En el caso de CG, las proteínas son, principalmente, insolubles (Figura.10), mientras que las proteínas de WCDS son, mayoritariamente, solubles.

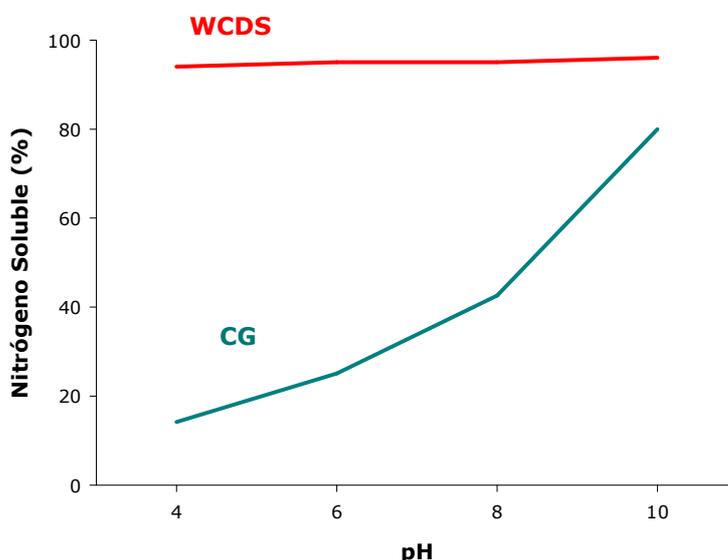


Figura.10: Solubilidad del nitrógeno de WCDS y CG a diferentes pH.

La solubilidad de las proteínas es una propiedad física que determina su funcionalidad. Conocer la solubilidad proteica proporciona información valiosa sobre el potencial de aplicación de éstas (Zayas, 1997). Por este motivo, se ha estudiado el tamaño molecular de la fracción proteica soluble, por ser la fracción biodisponibles.

El componente proteico – soluble - de ambos subproductos se ha estudiado mediante cromatografía de exclusión o filtración molecular, usando un sistema de FPLC, con dos columnas de filtración distintas.

Para caracterizar por tamaño molecular el contenido de proteínas solubles de elevado peso molecular, presentes en ambos SOA se ha empleado la columna de alto rango, la Superdex™ 200 10/300GL, cuyo rango de exclusión es de 10.000 a 600.000 Da.

Por otro lado, para analizar la distribución por pesos moleculares de las proteínas de menor tamaño, en ambos SOA se ha empleado una columna de menor rango, la Superdex™ Peptide 10/300GL, cuyo rango de exclusión comprende pesos moleculares entre 700 y 10.000 Da, que discrimina péptidos y aminoácidos libres.

Como se puede apreciar en la Figura.11, existe una clara diferencia en la distribución por pesos moleculares del componente proteico soluble de ambos SOA. Los pesos moleculares de las proteínas solubles de WCDS se concentran, mayoritariamente, en el intervalo entre 25 KDa y 200 KDa (85%) (Tabla.15).

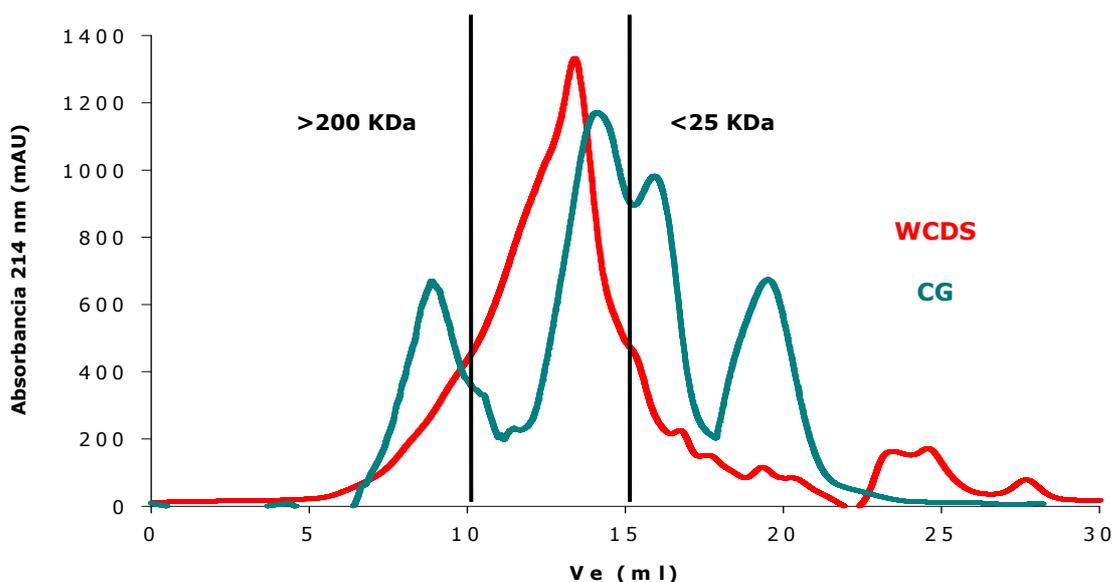


Figura.11: Cromatografía exclusión molecular de WCDS y CG.

Columna Superdex™ 200 10/300GL. El perfil de elución corresponde a una dilución 1:10 de WCDS y CG.

Sin embargo, la distribución se dispersa en el caso de CG, de forma que las proteínas solubles cuyos tamaños se encuentran en los intervalos entre 25 y 200 KDa representan un 42.60% del total de proteínas solubles, y las proteínas cuyos tamaños son inferiores a 25 KDa suponen un 41.40% del total de proteínas

(Tabla.15). Las proteínas solubles de gran peso molecular (> 200.000 Da) constituyen un 16% del total.

Tabla.15: Distribución por peso molecular del componente proteico de WCDS y CG. Columna Superdex™ 200 10/300GL.

TAMAÑO MOLECULAR (Daltons)	WCDS (%)	CG (%)
> 200.000	8	16
200.000-25.000	85	42.60
< 25.000	7	41.40

Como se ha mencionado anteriormente, también, se ha analizado el contenido proteico de menor tamaño molecular de ambos SOA, y, para ello, se ha empleado la columna, ya indicada, Superdex™ Peptide 10/300GL.

El cromatograma muestra (Figura.12), confirmando los resultados obtenidos anteriormente, que WCDS presenta, de forma mayoritaria, un 80% de proteínas solubles con un tamaño molecular por encima de los 10 KDa. Por consiguiente, un 20% del contenido proteico se corresponde con péptidos e, incluso, aminoácidos libres, menores de 10 KDa.

En el caso de CG, la cromatografía (Figura.12), resultante del empleo de esta segunda columna, ha revelado un perfil de pesos moleculares del componente proteico soluble en el que el porcentaje de proteínas de tamaño superior a los 10.000 Da alcanza valores del 95%. A diferencia de WCDS, CG no presenta aminoácidos libres y tan sólo un 5% son proteínas pequeñas y péptidos.

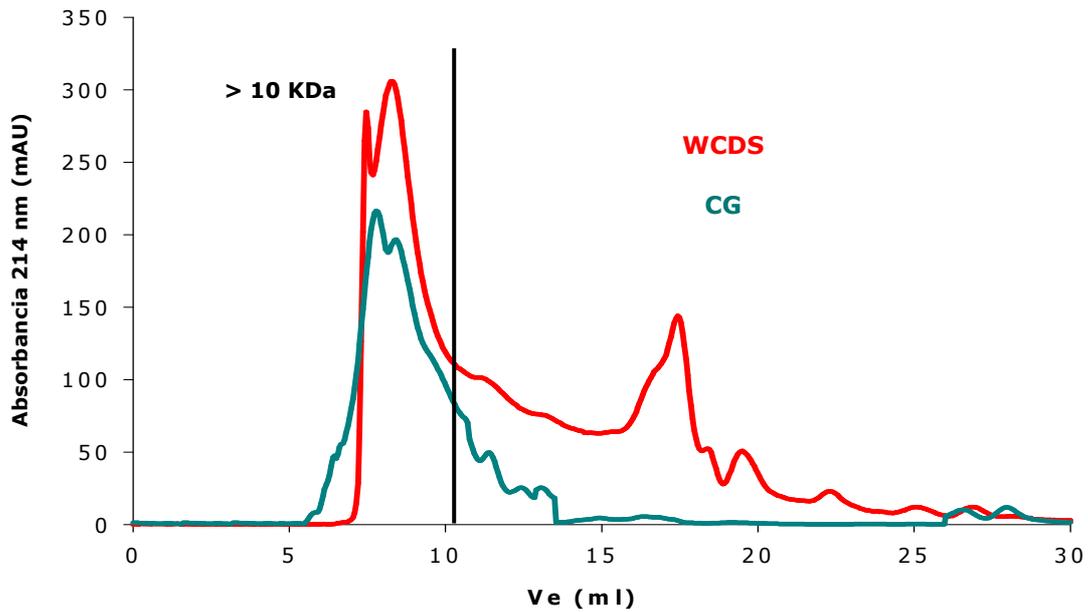


Figura.12: Cromatografía exclusión molecular de WCDS y CG.

Columna Superdex™ Peptide 10/300GL. El perfil de elución corresponde a una dilución 1:10 de WCDS y CG.

La Tabla.16 resume la distribución por tamaño molecular de las proteínas solubles de ambos SOA (WCDS junto a CG).

Tabla.16: Distribución por peso molecular del componente proteico de WCDS y CG. Columna Superdex™ Peptide 10/300GL.

TAMAÑO MOLECULAR (Daltons)	WCDS (%)	CG (%)
> 10.000	80	95
10.000-5.000	10	5
5.000-1.000	5	-
1.000-300	3	-
< 300	2	-

4.1.3. Discusión

Como consecuencia de la expansión y el desarrollo de la industria agraria se produce la descarga al entorno de numerosos subproductos orgánicos, que, en el mejor de los casos, son empleados en la industria alimentaria, por su elevado contenido en nutrientes. De esta forma, estos materiales orgánicos constituyen un almacén de nutrientes de un gran valor, pero de los que no se aprovecha todo su potencial como materiales ricos en MO.

Como alternativa al empleo alimentario de estos subproductos, tanto animal, como humano, se presenta su uso agrícola. Estos subproductos orgánicos, con un alto contenido en MO, vienen siendo empleados, habitualmente, para el mantenimiento del contenido de MO de los suelos, así como nutrientes para plantas y cultivos, además de tener una clara utilidad para la recuperación de suelos degradados. De hecho, este aprovechamiento agrícola de distintos subproductos orgánicos, tales como el estiércol (Haynes y Naidu, 1998), los lodos de depuradoras (Albiach y *col.*, 2001), los desechos urbanos (Eriksen, 1995), el compost (Sikora y Enkiri, 1999; Tejada y González, 2003a), los residuos de las cosechas agrícolas (De Neve y Hofman, 2000; Trinsoutrot y *col.*, 2000) o los subproductos agroindustriales generados a partir de las distintas actividades industriales (Tejada y González, 2003b; 2004), es, hoy en día, una actividad, ampliamente, extendida.

Este empleo agrícola de estos subproductos y/o residuos es tan habitual, en gran parte, debido a las elevadas cantidades que se generan de estos materiales, de forma anual y a nivel mundial, pero, también, debido al intento de buscar la manera más económica de gestionarlos y a las actuales tendencias legislativas europeas (Soliva y Paulet, 2001). Aunque la elección de un subproducto y/o residuo orgánico para un determinado uso está influenciada, en la mayor parte de los casos, por la abundancia del mismo o la facilidad con la que se oferta, debe tenerse en cuenta, sobre todo, sus características físico-químicas (Soliva y Paulet, 2001), para darle el uso más adecuado a las necesidades generadas.

WCDS y CG son subproductos orgánicos de origen agroindustrial, que presentan un elevado porcentaje de MO y, además, se dispone de una elevada cantidad de ellos, debido a la gran actividad agroindustrial. Por su alto contenido en MO se han venido empleando por parte de la industria alimentaria, tanto animal como humana, principalmente, debido, sobre todo, a su elevado contenido en

proteínas, tan, altamente, demandadas por esta industria. Además, también, se han venido empleando en alimentación por el aporte mineral que proporcionan a la dieta de animales, ya que este aporte supone una disminución de los suplementos nutricionales y, por consiguiente, de los costos (Belyea y col., 1998).

Es, precisamente, su contenido proteico el que les hace un subproducto tan valioso. Sin embargo, las proteínas que los constituyen presentan propiedades funcionales que limitan su uso, como, por ejemplo, su insolubilidad (CG). El hecho de que las proteínas presentes en los SOA manifiesten una alta insolubilidad hace que estos materiales sean poco biodisponibles por distintos organismos, como animales, plantas y microorganismos.

Así, en el caso de CG, como se ha dicho, su componente proteico es, realmente, insoluble. De hecho, se ha comprobado que es, altamente, insoluble a pH ácidos y algo más soluble a pH básicos (Parrado y col., 2008). Sin embargo, esto no ocurre con WCDS, en el que sus proteínas sí son solubles, debido a que se corresponde con el material soluble resultante de la fermentación de los granos de trigo, para la obtención de bioetanol, una vez que ha sido destilado el etanol producido. No obstante, su biodisponibilidad, también, se encuentra limitada, por el elevado tamaño molecular de sus proteínas solubles. En ambos casos, en CG y WCDS, el peso molecular de sus proteínas solubles resulta muy elevado, muy por encima de los 10 KDa. Así, WCDS presenta el 85% de sus proteínas solubles entre los 75 KDa y los 200 KDa, mientras que CG muestra un 42.60% de sus proteínas dentro de estos límites. Este elevado tamaño molecular, al igual que la insolubilidad, limita sus aplicaciones y utilidades, debido a que dificulta su biodisponibilidad y absorción por parte de diversos organismos.

Sin embargo, estas propiedades físicas de las proteínas son susceptibles de ser modificadas, y de hecho, lo son, mediante procesos de hidrólisis. Mediante la hidrólisis, ya sea química o enzimática (Feeney y Whitaker, 1977), se altera su estructura química, aumentando, de esta forma, su solubilidad en medios acuosos y rompiendo las proteínas en fragmentos más pequeños, péptidos, e, incluso, aminoácidos libres.

En este trabajo, se han seleccionado, precisamente, estos SOA como substratos idóneos de hidrólisis, principalmente, por su elevado contenido, no sólo

en proteínas, sino también en MO, puesto que se plantea su conversión en nuevos productos, de uso agrícola, para ser empleados como nutrientes edafológicos.

Este elevado contenido en MO que presentan WCDS y CG es de gran importancia a distintos niveles. En primer lugar, numerosos estudios han indicado que ésta tiene un efecto muy positivo cuando se aplica al suelo; de forma que, se mejora, notablemente, el consumo o absorción de nutrientes tales como el N (Gamiz y col., 1998) y distintos micronutrientes (Gamiz y col., 1998; Mackowiak y col., 2001) por parte de plantas y cultivos.

Por otro lado, además, esta MO es uno de los principales factores responsables del mantenimiento de la fertilidad del suelo, evidencia científica tan aceptada, que todos los sistemas de cultivo, desde las técnicas agrícolas más tradicionales hasta los más modernos sistemas de producción agraria, utilizan los abonos orgánicos en mayor o menor proporción, no sólo por el aporte de nutrientes que conlleva su aplicación a los suelos, sino, seguramente, se debe más a los efectos beneficiosos que la adición de MO induce, especialmente, en lo que se refiere a la mejora de las propiedades físicas y al incremento de la actividad biológica y la dinámica de nutrientes en los mismos.

En cualquier caso, ambos SOA han sido seleccionados por constituir substratos ideales de hidrólisis (por su elevado porcentaje de proteínas), con el objetivo de producir la ruptura del material proteico, y, de esta forma, incrementar la biodisponibilidad del material orgánico. En este proceso de hidrólisis de las proteínas constituyentes, se incrementa, también, la solubilidad, no sólo de las proteínas, sino que se produce un enriquecimiento del material orgánico (carbohidratos, grasas,...), de forma que los nuevos productos resultantes están enriquecidos para su posterior uso como nutrientes con capacidad biofertilizante/bioestimulante.

4.2. Producción de proteasas, obtención de BSE mediante hidrólisis enzimática a partir de los SOA seleccionados y caracterización de los BSE

En la fase previa, desarrollada en el apartado 4.1., se han seleccionado y caracterizado distintos subproductos orgánicos de origen agroindustrial (SOA) para ser empleados como sustratos ideales para llevar a cabo el proceso biológico de conversión de estos productos en otros, de alto valor añadido, los denominados BSE.

El proceso biológico al que van a ser sometidos estos SOA, como ya se ha comentado, es una reacción de hidrólisis enzimática, que se lleva a cabo mediante reacciones proteolíticas mediadas por enzimas, concretamente, las proteasas.

En este apartado 4.2. se describe el proceso, previo a la hidrólisis, de producción de estas enzimas proteolíticas, mediante un proceso fermentativo, mediado por bacterias del género *Bacillus*. Esta tarea de producción de enzimas ha sido viable gracias a una selección de los medios fermentativos adecuados. Por esto, esta fase de producción de proteasas implica, también, la *selección* y la *caracterización del substrato fermentativo* adecuado para obtener un alto rendimiento en la producción de proteasas.

Las proteasas, empleadas en el presente trabajo, se corresponden o bien con las proteasas producidas en el laboratorio mediante fermentación, empleando, para ello, cepas bacterianas propias de *Bacillus licheniformis*, concretamente, la cepa ATCC 21415, que son cepas superproductoras de proteasas, o bien, con enzimas comerciales, como las L-450/LA-450 (Biocon), de las que hay una gran disponibilidad y son utilizadas de forma masiva en la industria de producción de detergentes, la industria alimentaria, en la textil,...

Una vez producidas las enzimas catalizadoras de la reacción, en una siguiente fase, se ha llevado a cabo el proceso de hidrólisis enzimática, que convierte los SOA en nuevos productos hidrolizados. Estos nuevos productos, totalmente solubles, presentan como principal componente las proteínas hidrolizadas. Así, el N, en forma de péptidos y, también, aminoácidos libres, se hace, altamente, bioaccesible.

En la fase final de esta etapa del trabajo, se realizó, de igual forma que los SOA, el análisis químico y proteico de los nuevos productos generados, BSE, con una alta potencialidad nutricional y estimulante.

4.2.1. Producción de proteasas

4.2.1.1. Substrato fermentativo

Se ha seleccionado como substrato fermentativo y fuente de N y energía, para la obtención de enzimas proteolíticas, las plumas de ave (PA), subproducto resultante de la actividad de la industria avícola.

PA ha sido suministrado por la empresa avícola local, Tomás Guerrero, S.L., localizada en Morón de la Frontera (Sevilla).

4.2.1.2. Caracterización química de PA

Los resultados encontrados de muestran en la siguiente tabla:

Tabla.17: Composición química de PA. Los resultados expresados en tanto por ciento (p/p) son valores medios de tres análisis. Datos referidos a materia seca.

PA	(%)
Materia Orgánica	54.09 ± 9.43
Carbohidratos Totales	6.48 ± 3.89
Proteínas Totales	83.0 ± 8.34
Grasas Totales	2.01 ± 0.56
Cenizas	0.91 ± 0.23

La caracterización química fundamental muestra que el principal componente de las plumas son las proteínas, que alcanzan valores entre el 80% y el 90% (p/p). Principalmente, estas proteínas son queratinas y se caracterizan por su alta insolubilidad. Se han seleccionado, precisamente, porque estas características pueden inducir la excreción de proteasas al medio, en el caso del género *Bacillus*, además de servirle a *Bacillus* como medio sólido de soporte.

La relación C/N de este sustrato resulta muy baja al existir un bajo nivel de carbohidratos frente a una elevada concentración de proteínas, resultando un medio nutritivo deficiente para ser empleado como medio de cultivo, pero idóneo para la producción y excreción extracelular de proteasas.

4.2.1.3. Elaboración de los medios de fermentación a partir de PA

Una vez seleccionadas y caracterizadas las plumas de ave para ser empleadas como base de los medios fermentativos para la producción de proteasas, la siguiente fase del trabajo ha consistido en formular distintos medios fermentativos, empleando para ello, distintas concentraciones de plumas.

Las concentraciones que se han establecido son: 0.2%, 1.0%, 5%, 10% y 20%, (p/v). Las plumas pesadas (p.h.) se añadieron a un tampón fosfato 50 mM (pH 7.0) y se autoclavaron durante 30 minutos a 121°C. Posteriormente, se adicionó Cl_2Ca , a una concentración de 5 mM.

Tabla.18: Medios fermentativos (FM) formulados.

Medio	[Plumas] (%, p/v)	Tampón Fosfato pH 7.0 (mM)	Cl_2Ca (mM)
FM-0.2	0.2	50	5
FM-1	1	50	5
FM-5	5	50	5
FM-10	10	50	5
FM-20	20	50	5

4.2.1.4. Estudio de la producción de proteasas

Las variables que gobiernan el proceso de producción de proteasas son muy numerosas, tales como la aireación, la temperatura, el pH del medio, la fuerza iónica, etc., pero de todas ellas, las que se estudian en este trabajo son la *concentración de sustrato* de los medios fermentativos empleados, así como la *temperatura*.

En este estudio de producción de proteasas, se ha seleccionado PA como única fuente de nitrógeno, en forma de proteínas insolubles, para comprobar su capacidad como fuente nutritiva para la producción de proteasas. Así, a partir de PA se han formulado los medios FM, sin aporte externo de C, N o fuente de minerales, con distintas concentraciones de pluma, en tampón fosfato (50 mM). El estudio, también, se han llevado a cabo en un medio rico y equilibrado como es el medio LB, que es un medio empleado de forma general para el crecimiento de la biomasa microbiana.

Las concentraciones de PA de trabajo comprenden un rango desde 0.2% al 20% (p/v) y la fermentación ha tenido lugar a dos temperaturas: 45°C y 50°C. Las fermentaciones se realizaron empleando la cepa de *B. lichiniformis* ATCC 21415, habitualmente, empleada a nivel industrial.

La realización de este estudio se ha desarrollado midiendo la actividad proteásica mediante el método de la azocaseína, descrito por Beynon y Bond, 1989.

El sistema de fermentación empleado se ha basado en una serie de matraces de Erlenmeyer, que contenían los distintos medios FM, previamente autoclavados, a los que se les ha añadido, posteriormente, Cl_2Ca 5mM y se han inoculado con un 2% (v/v) de un cultivo de *Bacillus lichiniformis*. Los matraces se han dispuesto en sendos agitadores orbitales incubadores, a 45°C y a 50°C, respectivamente, durante 64 horas. Se han tomado muestras a distintos tiempos: 20 horas, 40 horas y 64 horas.

Una vez finalizado el ensayo, en primer lugar, se ha analizado el efecto de la concentración de substrato sobre el progreso de la producción de proteasas, cuyos resultados se exponen en la Figura.13.

A primera vista de los resultados, se observa un claro efecto de la concentración de PA sobre la producción de proteasas excretadas al caldo de fermentación. Así, existe una relación, inversamente proporcional, entre la concentración de substrato y la actividad proteásica.

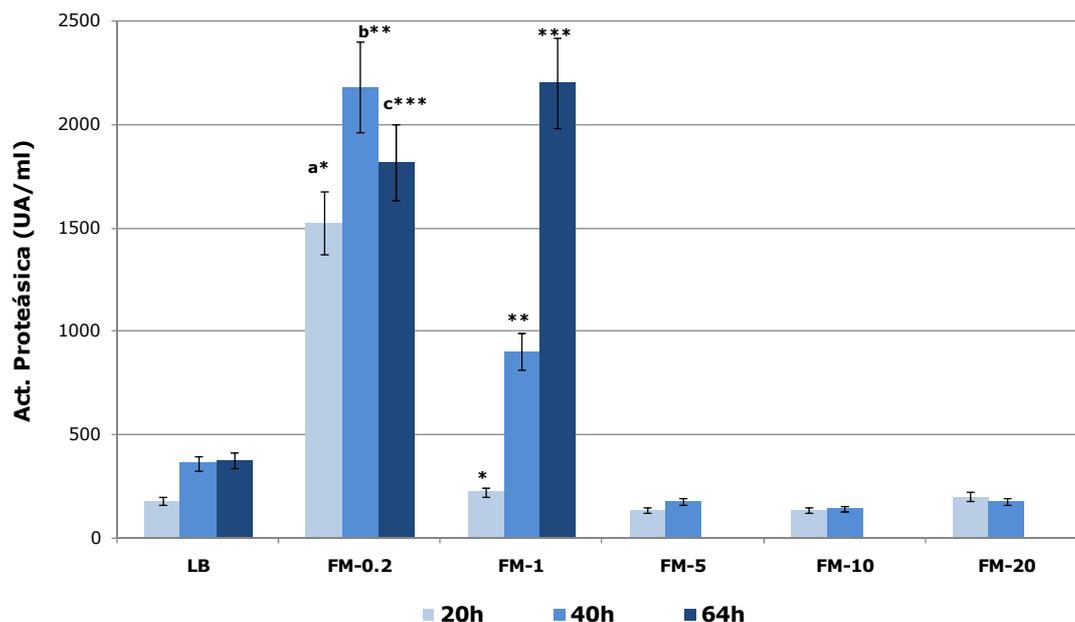


Figura.13: Efecto de la concentración de PA en la producción de proteasas por *B.lichiniiformis* ATCC21415 (45°C). Los resultados expuestos son valores medios de tres análisis.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001

a: FM-0.2 frente a FM-1 (20 horas); **b:** FM-0.2 frente a FM-1 (40 horas); **c:** FM-0.2 frente a FM-1 (64 horas); *****: diferencia significativa frente a LB (20 horas); ******: diferencia significativa frente a LB (40 horas); *******: diferencia significativa frente a LB (64 horas);

A 45°C de temperatura de incubación, los medios FM-0.2 y FM-1, de menor concentración de sustrato, son los medios en los que se ha determinado una mayor actividad enzimática, existiendo diferencias entre ellos. De forma que, a las 40 horas de fermentación, la producción es, significativamente, superior en FM-0.2, con menor concentración de sustrato, alcanzando su máxima actividad, 2.180 UA/ml, frente a las 900 UA/ml que se han medido en FM-1. El valor máximo de actividad medido en FM-1 (2.200 UA/ml), sin embargo, se ha alcanzado más tarde, concretamente, a las 64 horas. La actividad en FM-0.2 cae hasta las 1.816 UA/ml a las 64 horas. A concentraciones superiores al 1% (p/v), como FM-5, FM-10 y FM-20, la actividad enzimática observada es insuficiente, casi nula.

En segundo lugar, también, se ve el efecto de la naturaleza del sustrato de fermentación. Así, un medio rico y equilibrado, como es el medio LB, resulta un medio adecuado como medio de cultivo para generar biomasa, pero no es un medio adecuado para producir proteasas. Los valores enzimáticos determinados están muy por debajo de las 500 UA/ml, valores muy bajos, con respecto a los medios FM-0.2 y FM-1. Sin embargo, el medio FM formulado, medio mínimo, de difícil

biodisponibilidad, ha proporcionado las condiciones adecuadas para que *Bacillus* produzca y excrete proteasas al caldo de fermentación, siempre condicionado a la concentración de PA empleada.

Por otro lado, en paralelo con las fermentaciones anteriormente descritas, a 45°C, se realizó el mismo ensayo, pero a 50°C, para evaluar el efecto de la temperatura en el proceso de producción de enzimas.

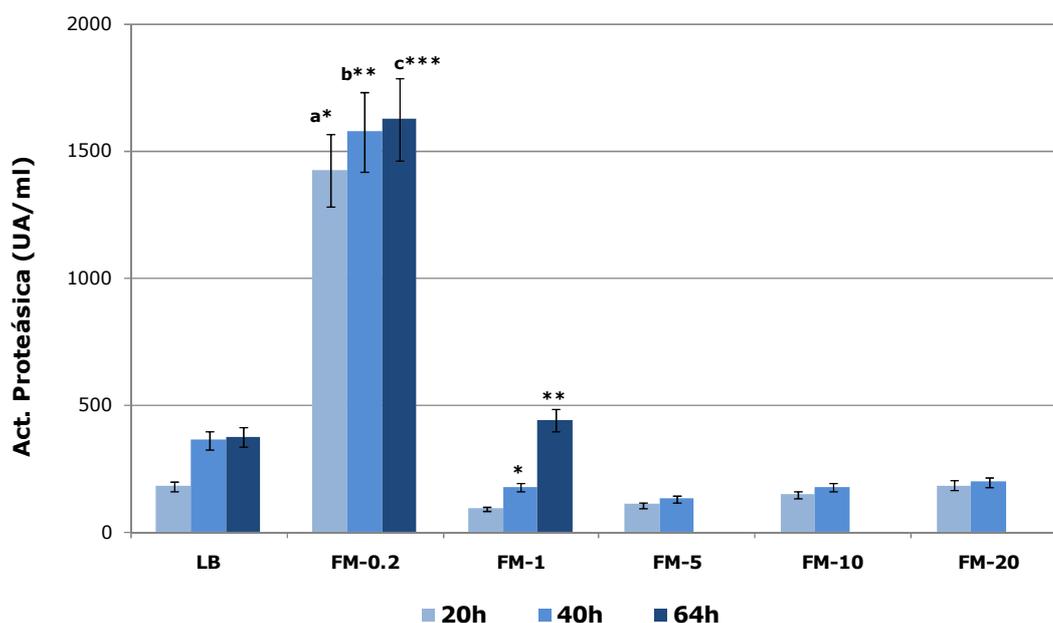


Figura.14. Efecto de la concentración de PA en la producción de proteasas por *B.licheniformis* ATCC21415 (50°C). Los resultados expuestos son valores medios de tres análisis.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> $P < 0.001$

a: FM-0.2 frente a FM-1 (20 horas); **b:** FM-0.2 frente a FM-1 (40 horas); **c:** FM-0.2 frente a FM-1 (64 horas); *: diferencia significativa frente a LB (20 horas); **: diferencia significativa frente a LB (40 horas);

Los resultados obtenidos, en la Figura.14, reflejan un efecto negativo del incremento de la temperatura. Así, una subida de 5°C ha supuesto la caída en la producción de proteasas en FM-1. Se observa que, en este medio, de 2.200 UA/ml (64 horas, 45°C) se ha pasado a 440 UA/ml, es decir, un valor 5 veces inferior. En el caso del medio FM-0.2, también, se aprecia el efecto negativo del incremento de la temperatura. Así, la actividad proteásica máxima disminuye desde 2.180 UA/ml (45°C, 40 horas) hasta 1.576 UA/ml, (50°C, 40 horas).

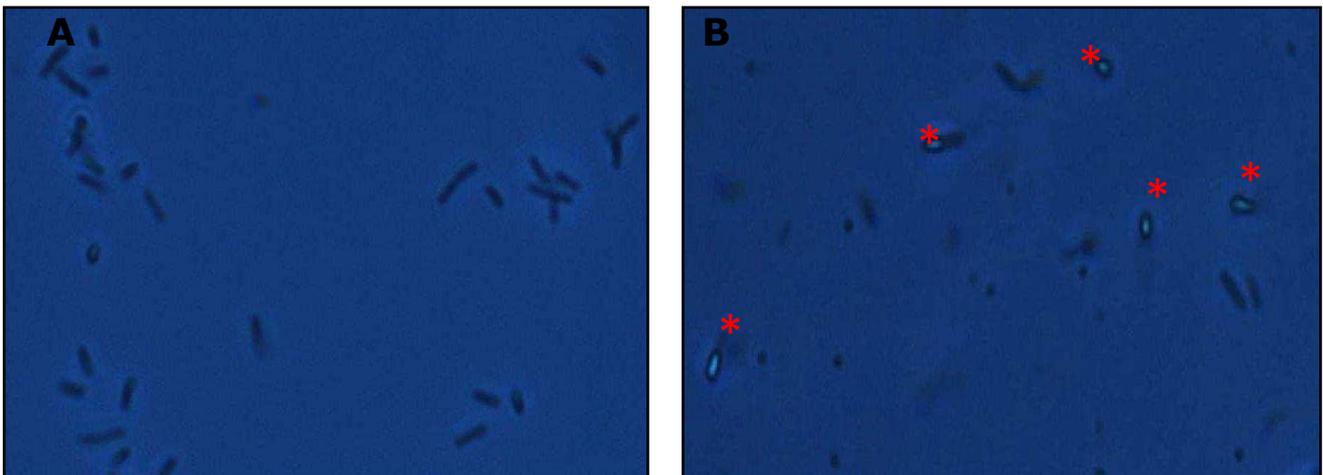
4.2.1.5. Estudio microscópico de los caldos de fermentación

Los caldos de fermentación que se han obtenido, también, han sido analizados mediante microscopía, para estudiar el comportamiento morfológico de *B. lichiniformis* durante la fermentación.

Mediante microscopía óptica, se han obtenido las siguientes imágenes procedentes de los medios LB (Imagen.12A) y FM-0.2 (Imagen.12B), a las 48 horas del inicio de la fermentación.

Imagen.11: Morfología de *Bacillus lichiniformis* mediante microscopía óptica.

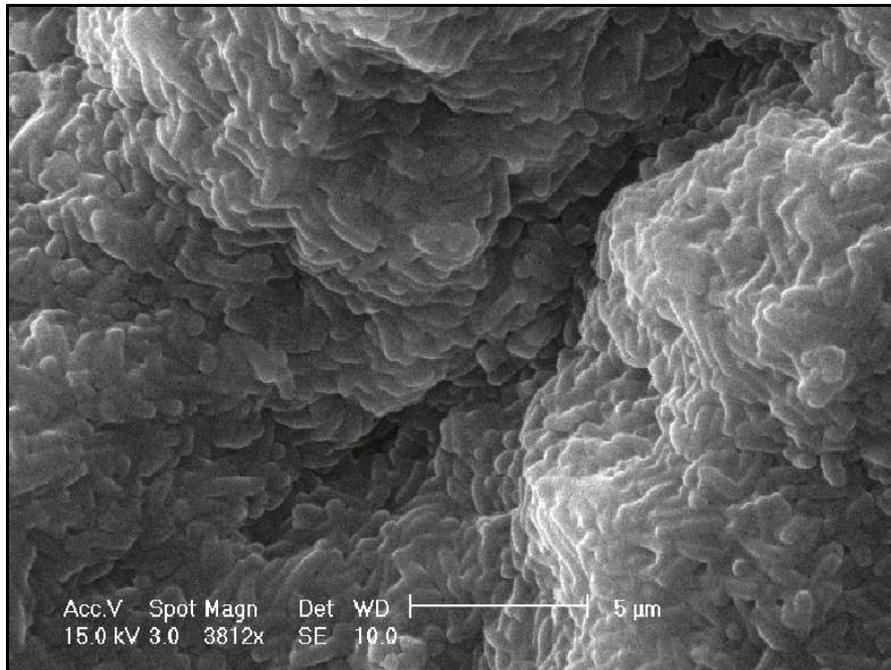
(A) Medio LB; (B) Medio FM-0.2. * Esporas de *Bacillus lichiniformis*.



La microscopía óptica ha permitido comprobar que la morfología de *Bacillus* durante el proceso fermentativo está, fuertemente, unida a la fisiología nutricional. Se ha observado que en los medios FM de bajas concentraciones (0.2% y 1%), *Bacillus* esporulaba rápido, de forma que la esporulación y la producción y excreción de proteasas parecían estar asociadas en el tiempo.

Por otro lado, debido a las observaciones hechas al microscopio óptico, se consideró oportuno estudiar la morfología externa bacteriana, para examinar el crecimiento bacteriano en un medio limitante como FM. Para ello, se ha usado la microscopía electrónica de barrido (SEM).

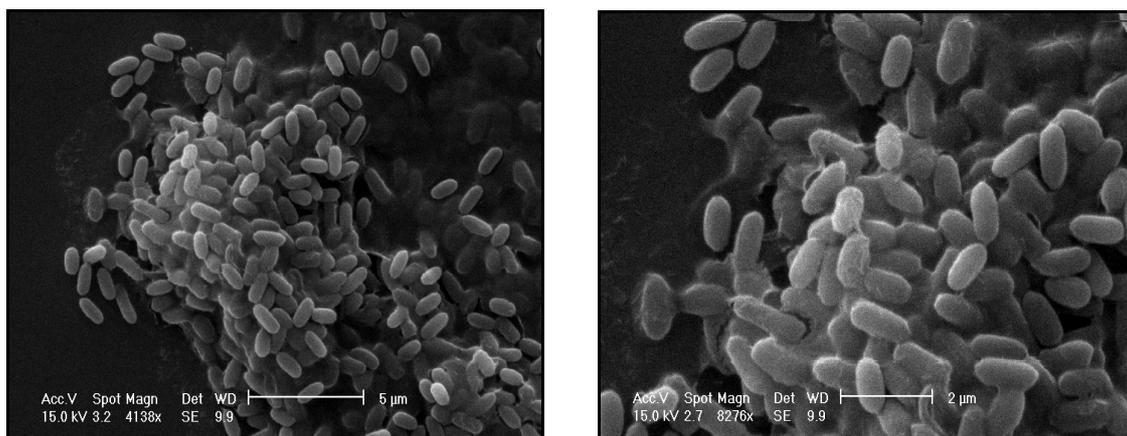
Imagen.12: Microscopía electrónica de barrido de *B. lichiniiformis* en un medio FM-0.2.



Mediante estas imágenes (Imagen.12) se ha observado que en presencia de un medio sólido, como son las plumas de ave, las células de *Bacillus* se encuentran formando agregados: puede apreciarse que las células crecen formando agregados compactos.

Bajo microscopía óptica, no se observaba una formación tan compacta. Es posible que la cápsula de mucopolisacáridos que rodea a las bacterias sea responsable de esta aglutinación.

Además, se hicieron observaciones de las esporas mediante SEM (Imagen.14) y se observó que, también, éstas suelen asociarse, entre sí, por una débil película.

Imagen.13: Microscopía electrónica de barrido de *B. lichiniformis* en un medio FM: Esporas.

4.2.1.6. Estudio proteómico de los caldos de fermentación

Los caldos de fermentación resultantes de la fase de producción de proteasas han sido estudiados para analizar su contenido proteico y, así, identificar cada una de las proteínas que se expresan y se excretan durante la fermentación en los distintos medios LB y FM. Se ha realizado lo que se viene denominando la huella proteómica, que constituye una herramienta, altamente, eficaz que ha permitido dilucidar los componentes funcionales de dichos caldos fermentativos y ha permitido caracterizar las enzimas que se excretan durante la fermentación.

LB, tradicionalmente, es un medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos, al ser un medio rico y nutritivo. *Bacillus* es un género que en este medio da lugar a altas tasas de crecimiento, en contraste con una baja tasa de excreción de proteasas al medio (Romero y col., 2007). Los datos, anteriormente obtenidos, de actividad proteásica de los caldos LB, también, confirman la baja excreción de proteasas en un medio rico y nutritivo como es LB.

Como se puede apreciar en los resultados de la Tabla.19, la presencia de proteasas en el medio LB tras 64 horas de incubación de *Bacillus* es insignificante, en contraste con la abundancia de proteínas que se han aislado e identificado que, principalmente, presentan funciones metabólicas, tales como *fosfopiruvato hidratasa*, *piruvato deshidrogenasa*, *fosfoglicerato kinasa*,...; y de desarrollo y crecimiento, como son *flagelinas*, *chaperonas*,... Esto da una idea de la activación metabólica de los microorganismos en estos medios nutritivos. Esta presencia de

enzimas metabólicas en los caldos de cultivo es debida a la ruptura o lisis celular de la gran cantidad de biomasa existente, que se produce durante la fermentación.

Tabla.19: Proteínas de *B.lichiniformis* excretadas en medios LB. Resultados obtenidos para los caldos de fermentación LB tras 64 horas.

LB	
1.Phosphopyruvate Hydratase	18.Phosphoglycerate Kinase
2.Flagellin Protein Hag	19.Major cold-shock Protein Iron-containing alcohol Dehydrogenase
3.Flagellar hook-associated Protein	20.Phosphotransferase System (PTS) Enzyme I
4.Enolase	21.Pyruvate Dehydrogenase (E1 α subunit)
5.Elongation Factor EF-2	22.Oligopeptide ABC Transporter (Binding protein)
6.Pyruvate Hydrogenase (E1 β subunit)	23.HSP60
7.Chaperonin GroEL	24.Aminopeptidase
8.Chaperone GroEL	25.Tetracycline Resistance Protein (TetB(P))
9.Pyruvate Dehydrogenase (E1 β subunit)	26.DNA-directed RNA Polymerase α Subunit
10.Flagellin Protein	27.Linear Gramicidin Synthetase Subunit C [Includes: ATP-dependent valine adenylase (ValA)]
11.Translocation-dependent Antimicrobial Spore Component	28.Two-component Sensor Histidine Kinase
12.Putative Aminopeptidase	29.Putative Carboxypeptidase
13.Single-strand DNA-binding Protein	30.Elongation Factor G (EF-G)
14.Triosephosphate Isomerase	31.Dihydrolipoamide Acetyltransferase
15.Elongation Factor Tu	32.Valyl-tRNA Synthetase
16.Glycerol Dehydrogenase	33.FAD-dependent Pyridine Nucleotide-Disulphide Oxidoreductase YumC
17.Alkyl Hydroperoxide Reductase	

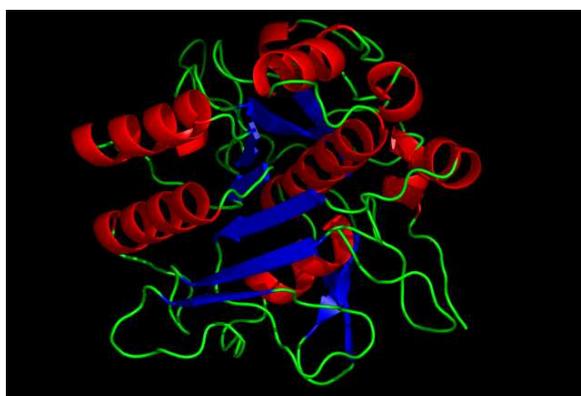
Tabla.20: Proteínas extracelulares de *B.lichiniformis* excretadas en medios FM. Resultados obtenidos para los caldos de fermentación FM-0.2 tras 64 horas.

FM-0.2
1.Subtilisin Carlsberg Precursor
2.Bacillopeptidase F
3.γ-glutamyltranspeptidase
4.α-Amylase Precursor
5.Glutamic Acid Specific Endopeptidase
6.Carbohydrate Esterase
7.Cell Surface Elastin binding Protein EbpS
8.Putative extracellular solute-binding Protein (family 3)

En cambio, los resultados encontrados en los caldos fermentativos FM-0.2 son bien diferentes (Tabla.20). Lo primero que se observa es que la cantidad de proteínas aisladas e identificadas se reduce, notablemente, pasando de 33 a, tan sólo, 8 proteínas aisladas. Esto ya refleja el estado estacionario o latente del microorganismo, que en ausencia de nutrientes reduce su metabolismo. Este medio FM, muy limitante, induce a las bacterias a excretar enzimas hidrolíticas, específicamente, proteasas extracelulares, hecho que no ocurre en los medios ricos.

Entre este listado de proteínas, se destaca que la mayoría son enzimas como es el caso de peptidasas, transpeptidasas y endopeptidasas, así como, proteasas como la enzima subtilisina (*subtilisine Carlsberg precursor*), que resulta la enzima mayoritaria (>90%).

Imagen.14. Enzima subtilisina (E.C. 3.4.21.62). Enzima mayoritaria en los caldos de fermentación.



La atención se centra en esta enzima *subtilisina* (Imagen.14): es una proteasa de vital importancia. Es una serín-proteasa de acción endoproteasa y alcalina. Originalmente, esta proteasa se aisló de *B. subtilis* (de ahí su nombre). Industrialmente, es una de la proteasas que más, ampliamente, se utilizan, como, por ejemplo, en detergentes de uso doméstico, cosméticos, alimentos,...

Así, se ha logrado obtener en estos caldos fermentativos, elaborados a partir de PA, proteasas alcalinas activas para su empleo en los procesos hidrolíticos.

4.2.2. Producción de BSE mediante hidrólisis enzimática

En esta fase del trabajo, se ha llevado a cabo el proceso de hidrólisis enzimática, que convierte a los SOA en nuevos productos hidrolizados. Estos nuevos productos resultan ser, totalmente solubles, cuyo principal componente son las proteínas hidrolizadas. Así, han de aportar el nitrógeno en forma de péptidos y, también, aminoácidos libres, lo que conlleva un incremento en la biodisponibilidad de las proteínas.

A continuación, se detalla el proceso de hidrólisis enzimática realizado y se presenta un esquema de producción de BSE a escala de laboratorio.

4.2.2.1. Proceso de hidrólisis enzimática

Brevemente, los hidrolizados se obtienen mediante la ruptura de los enlaces peptídicos de unión de aminoácidos que forman las proteínas, produciendo péptidos y, eventualmente, aminoácidos libres.

En el proceso de hidrólisis llevada a cabo en este trabajo, el proceso enzimático resulta ser muy eficiente, realizado bajo condiciones suaves de temperatura, pH y presión, por lo que no tiene lugar la destrucción o modificación de ciertos restos aminoacídicos.

La producción de BSE a partir de WCDS y CG mediante este procedimiento se ha realizado en un biorreactor con control automático de pH, temperatura y agitación, perteneciente al Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla-CITIUS (Imagen.17).

Se han empleado, como medio activo de la reacción, las proteasa comerciales, LA-450, de Biocon Española, S.A. Estas proteasas comerciales son subtilisinas, clasificadas como serín proteasas, producidas, industrialmente, a partir de distintas especies del género *Bacillus*, como *B. subtilis* (originalmente), *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*,... Estas proteasas son las mismas que se han producido y excretado a los caldos fermentativos FM anteriormente, en la fase descrita en el apartado **4.2.1.6. Estudio proteómico de los caldos de fermentación.**

Los parámetros de la reacción que han sido controlados, según el método pH-stat son los siguientes: *concentración de substrato y de enzima, temperatura y pH de reacción*, así como, la *velocidad de agitación*.

A la hora de decidir la *concentración de substrato* para llevar a cabo la hidrólisis, se tuvo en cuenta la distinta naturaleza de ambos SOA. La concentración de substrato óptima de referencia está establecida entre el 10% y el 15% (p/v). En el presente estudio, para CG, con un contenido en materia seca del 55%, se estableció como concentración de trabajo el 15% (p/v). Para ello, a 300 gr de CG se les añadió agua hasta un volumen final de 1 litro. Esta concentración seleccionada supone un contenido proteico del 18% (p/v). Sin embargo, en el caso de WCDS, se ha trabajado a una concentración del 12% (v/v). La humedad del producto es mucho mayor en este subproducto, próxima al 75% (v/v). Por ello, se pesaron 500 ml de WCDS y se llevó el volumen hasta 1 litro añadiendo agua de red. En este caso, el contenido de proteína supone el 12% (p/v).

En cuanto a la concentración de enzima, para la reacción se ha seleccionado una concentración de trabajo del 0.15% (v/v).

La temperatura de trabajo a la que se realizaron las hidrólisis fue de 55°C, ya que esta es la temperatura recomendada para operar con esta enzima, en tiempos superiores a 10 minutos, aunque la temperatura máxima que pueda soportar sea 60°C (Biocon Española, S.A.).

El pH de la reacción ha venido determinado por el pH óptimo de actividad proteásica de LA-450. Esta enzima actúa, adecuadamente, a pH entre 7 y 11, siendo su máximo de actividad a pH 9. En las hidrólisis realizadas en este trabajo, el pH de trabajo se estableció en 8.5. El pH durante la reacción se mantuvo

constante mediante la adición de NaOH concentrada (10M), para no incrementar en exceso el volumen de la reacción.

En lo referente a la velocidad de agitación, esta no fue constante a lo largo de todo el proceso. Se debe a que a medida que transcurre la reacción, el medio cambia su textura, al ir solubilizándose el material insoluble, por lo que las necesidades de agitación variaban en función del cambio de textura de los hidrolizados.

Una vez establecidos los parámetros de operación óptimos, se describe, a continuación, el proceso de hidrólisis, que ha sido equivalente para los dos SOA. Hay que señalar que, previo al inicio de la reacción, fue necesaria una etapa de disolución del substrato y homogenización de éste. Esta fase duró hasta que el pH óptimo y la temperatura se alcanzaron y se equilibraron.

Después de esta etapa de estabilización, se inició la hidrólisis en sí. Para ello, inicialmente, se añadió la enzima. Como consecuencia, el pH bajó, debido a la liberación de restos amino terminales. Al detectarse esta bajada de pH, automáticamente, las bombas asociadas al biorreactor añadían NaOH (10M) para seguir manteniendo el pH óptimo de actuación de la enzima.

El tiempo de hidrólisis se estableció en 120 minutos, tiempo en alcanzar un grado de hidrólisis del 15%.

Finalizada la hidrólisis, el medio de reacción fue procesado en varias etapas: *inactivación enzimática*, consistente en una subida de temperatura hasta 80°C durante 10 minutos; *centrifugación*, a 10.500 rpm durante 1 hora, *filtración y concentración* en rotavapor, a 60°C, tal y como ha sido descrito para productos similares por autores como Parrado y col., 1993. La conversión en polvo, mediante atomización en spray-dryer, es un paso opcional estudiado y llevado a cabo.

Imagen.15: WCDS (A) y CG (B)

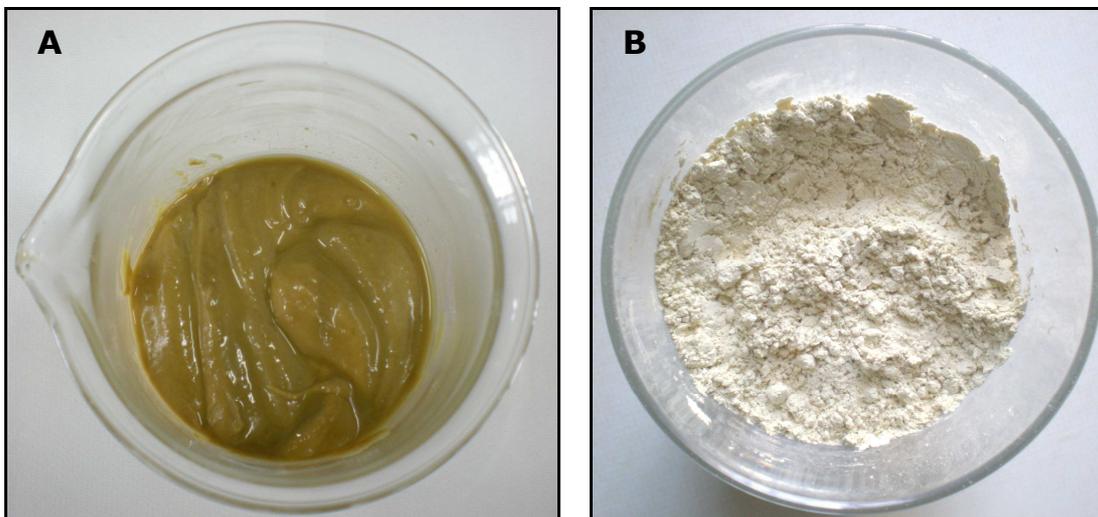
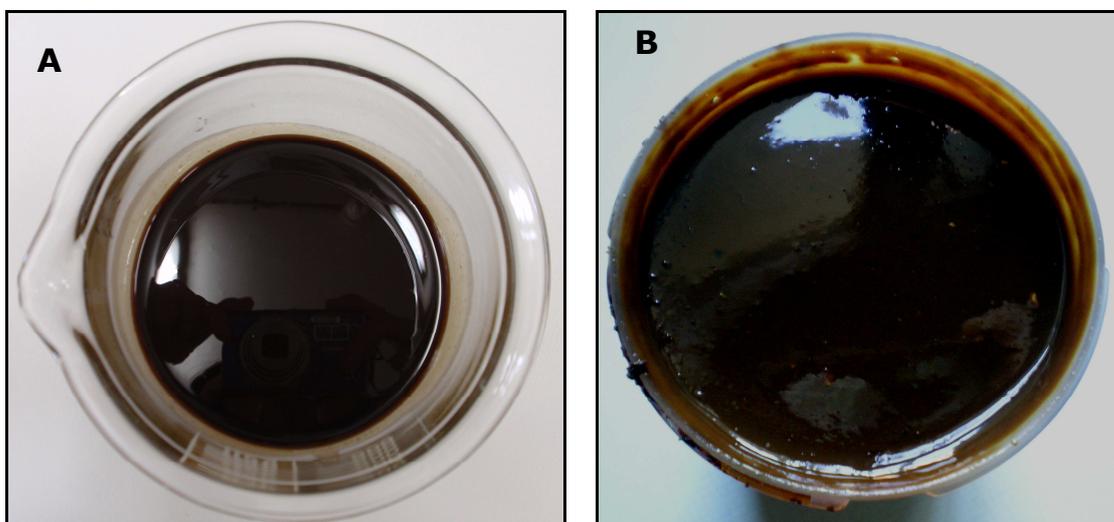


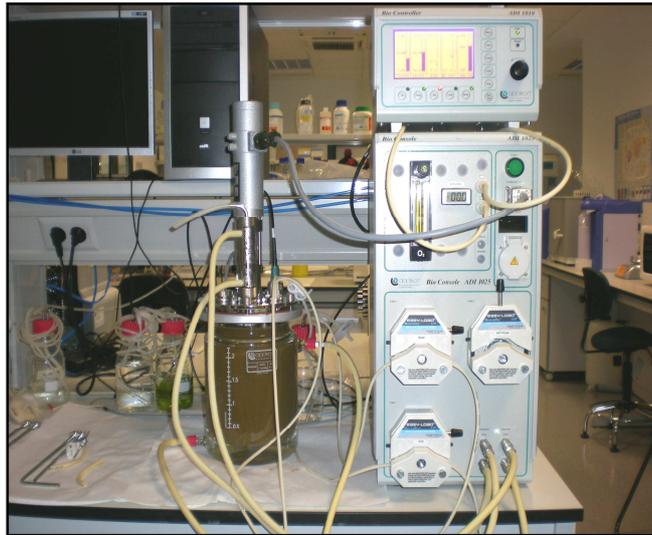
Imagen.16: WCDS-HE (A) y CGHE (B)



SOA

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: Sustrato: 10-15% T^a: 55°C pH 8.5
Proteasa (0.2 U/gr) Tiempo: 120 min**

Imagen.17: Biorreactor (CITIUS, Universidad de Sevilla)



CENTRIFUGACIÓN, CONCENTRACIÓN Y ATOMIZACIÓN



Imagen.18: Centrifuga



Imagen.19: Rotavapor



Imagen.20: Atomizador

BSE

4.2.3. Caracterización de los BSE

Tras la hidrólisis de WCDS y CG, se han obtenido dos nuevos productos en los que el componente proteico que los constituye ha sufrido una ruptura, generando moléculas de menor tamaño molecular (péptido y aminoácidos libres).

Estos productos generados han sido denominados de la siguiente forma:

- **WCDS-HE:** hidrolizado enzimático obtenido mediante la hidrólisis enzimática de WCDS.
- **CGHE:** hidrolizado enzimático obtenido mediante la hidrólisis enzimática de CG.

A estos productos se les ha realizado un análisis químico convencional, así como, un análisis proteico, para evaluar los efectos y los resultados del proceso hidrolítico.

4.2.3.1. Caracterización química de los BSE

Al igual que en el caso de los SOA, con el fin de conocer la naturaleza de estos nuevos productos generados, se han determinado los parámetros químicos considerados con anterioridad (en el caso de WCDS y CG): **MO, carbohidratos totales, proteínas totales, grasas totales**, así como, el contenido en **cenizas**. También, se ha determinado el contenido de **macro y microelementos**.

Según estos resultados (Tabla.21), junto con los datos de macro y microelementos (Tabla.22), ambos productos, WCDS y WCDS-HE, son muy similares, casi idénticos. En este caso, el proceso de hidrólisis enzimática no ha conllevado un enriquecimiento significativo del producto final. El componente orgánico mayoritario siguen siendo los carbohidratos ($49.78 \pm 5.24\%$), seguido por las proteínas ($40.22 \pm 3.78\%$).

Tabla.21: Composición química de WCDS y WCDS-HE. Los resultados, expresados en tanto por ciento (p/p), son valores medios de tres análisis. Datos referidos a materia seca.

	WCDS (%)	WCDS-HE (%)
Materia Orgánica	23.16 ± 1.13	23.35 ± 1.25
Carbohidratos Totales	50.48 ± 6.67	49.78 ± 5.24
Proteínas Totales	39.17 ± 4.89	40.22 ± 3.78
Grasas Totales	4.27 ± 0.45	4.25 ± 0.36
Cenizas	6.08 ± 0.79	5.75 ± 0.68

Tabla.22: Contenido de microelementos de WCDS y WCDS-HE. Los resultados expresados son valores medios de tres análisis.

Elemento	Concentración (g/Kg)		Elemento	Concentración (g/Kg)	
	WCDS	WCDS-HE		WCDS	WCDS-HE
Fósforo	3.48 ± 0.23	3.35 ± 0.21	Cobre	≤0.005	-
Potasio	6.88 ± 0.45	6.78 ± 0.58	Magnesio	1.01 ± 0.23	1.02 ± 0.21
Sodio	0.89 ± 0.06	0.82 ± 0.08	Cobalto	-	-
Azufre	1.49 ± 0.09	0.99 ± 0.25	Manganeso	≤0.05	≤0.05
Calcio	≤0.5	≤0.5	Molibdeno	-	-
Hierro	≤0.1	≤0.2	Zinc	≤0.02	≤0.05

El hidrolizado WCDS-HE muestra valores similares de macro y microelementos, siendo los elementos principales el P y el F. No existen diferencias significativas en la composición de ambos productos.

A diferencia de WCDS-HE, CGHE (Tabla.23) es un producto enriquecido en cuanto a proteínas. De un contenido inicial de proteínas en CG de 46.50±1.2%, se ha obtenido, tras la hidrólisis, un contenido del 64.20±3.2%. Se aprecia, así, que las proteínas destacan como componente principal frente al resto de macromoléculas. Este incremento del contenido en proteínas solubles es debido al uso de las proteasas, que las solubilizan las proteínas insolubles de CG al hidrolizarlas, modificando su estructura físico-química.

Tabla.23: Composición química de CG y CGHE. Los resultados expresados en tanto por ciento (p/p) son valores medios de tres análisis. Datos referidos a materia seca.

	CG (%)	CGHE (%)
Materia Orgánica	49.20 ± 2.0	49.40 ± 2.1
Carbohidratos Totales	38.00 ± 1.6*	26.00 ± 0.8*
Proteínas Totales	46.50 ± 1.2*	64.20 ± 3.2*
Grasas Totales	6.50 ± 0.2*	3.0 ± 0.15*
Cenizas	5.70 ± 0.04	6.5 ± 0.03

DIFERENCIA SIGNIFICATIVA>>> P<0.001. *: diferencia significativa entre CG y CGHE.

Tabla.24: Contenido de microelementos de CGHE. Los resultados expresados son valores medios de tres análisis. Datos referidos a materia seca.

Elemento	Concentración (g/Kg)		Elemento	Concentración (g/Kg)	
	CG	CGHE		CG	CGHE
Fósforo	3.5 ± 0.26*	7.7 ± 0.6*	Cobre	≤0.05	≤0.05
Potasio	5.6 ± 0.3*	22.8 ± 1.2*	Magnesio	2.8 ± 0.1*	3.5 ± 0.2*
Sodio	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1	Cobalto	N.d.	8 ± 0.5
Azufre	2.5 ± 0.1*	4.3 ± 0.1*	Manganeso	N.d.	N.d.
Calcio	5.6 ± 0.4*	3.1 ± 0.2*	Molibdeno	-	14 ± 0.8
Hierro	≤0.1	≤0.1	Zinc	≤0.05	≤0.05

N.d.: no determinado

DIFERENCIA SIGNIFICATIVA>>> P<0.001. *: diferencia significativa entre CG y CGHE

Del análisis de la Tabla.24, también, se aprecia que la hidrólisis enzimática produce efectos en el contenido de macro y microelementos. Se han dado incrementos de las concentraciones de algunos elementos, que en algunos casos resultan, realmente, llamativas. La concentración de P aumenta, más allá, del doble que en CG; el contenido en azufre es 1.72 veces superior y el Mg, unas 1.25 veces. El incremento más significativo se ha obtenido en el caso del K, cuya concentración en CGHE es 4 veces superior a la concentración en CG. Sin embargo, también, se producen descensos en las concentraciones, tal y como ocurre en el caso del Ca.

4.2.3.2. Caracterización proteica de los BSE

4.2.3.2.a. Composición aminoacídica de WCDS-HE y CGHE

Se ha llevado a cabo la determinación de aminoácidos totales de las proteínas presentes en los BSE. En primer lugar, se muestran los resultados en cuanto a la composición aminoacídica de WCDS-HE en la Tabla.25, en comparación con los datos obtenidos para WCDS.

Tabla.25: Composición aminoacídica de WCDS y WCDS-HE. Resultados expresados como gramos por 100 gramos de proteína. Datos referidos a materia seca.

COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA (g/100g proteína)					
	WCDS	WCDS-HE		WCDS	WCDS-HE
Ala	3.51 ± 0.16	3.78 ± 0.16	Arg	3.78 ± 0.13	3.23 ± 0.13
Asp + Asn	5.68 ± 0.31	5.02 ± 0.31	His	2.94 ± 0.09	2.85 ± 0.09
Cys	0.90 ± 0.03	1.03 ± 0.03	Ile	4.17 ± 0.10	4.23 ± 0.10
Glu + Gln	30.37 ± 0.45	29.25 ± 0.45	Leu	7.17 ± 0.17	6.78 ± 0.17
Gly	2.08 ± 0.11	1.98 ± 0.11	Val	5.42 ± 0.10	5.01 ± 0.10
Pro	8.81 ± 0.16	8.09 ± 0.16	Lys	2.70 ± 0.09	3.12 ± 0.09
Ser	4.78 ± 0.13	5.12 ± 0.13	Met	2.22 ± 0.11	1.98 ± 0.11
Phe	5.46 ± 0.12	5.01 ± 0.12	Thr	5.12 ± 0.14	5.01 ± 0.14
Tyr	4.11 ± 0.13	3.89 ± 0.13	Trp	N.d.	N.d.

Como se aprecia en la Tabla.25, el contenido de aminoácidos no sufre modificaciones significativas ($P < 0.001$) al hidrolizar WCDS.

Sin embargo, con respecto al contenido de aminoácidos totales de CGHE, se han producido algunas modificaciones tras la hidrólisis (Tabla.26). Concretamente, se ha incrementado la concentración de arginina y leucina, y, también, ha disminuido la concentración de asparragina, cisteína, glicina y lisina.

Tabla.26: Composición aminoacídica de CG y CGHE. Los resultados, expresados como gramos por 100 gramos de proteína, son valores medios de tres análisis.

COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA (g/100g proteína)					
	CG	CGHE		CG	CGHE
Ala	3.95 ± 0.15	3.58 ± 0.12	Tyr	3.62 ± 0.12	3.85 ± 0.13
Asp	8.86 ± 0.24*	7.14 ± 0.21*	Arg	11.37 ± 0.31*	13.82 ± 0.29*
Asn	N.d.	N.d.	His	2.93 ± 0.06	2.91 ± 0.07
Cys	0.96 ± 0.01*	0.20 ± 0.01*	Ile	3.42 ± 0.12	3.64 ± 0.16
Glu	9.86 ± 0.25	9.8 ± 0.21	Leu	5.34 ± 0.29*	7.07 ± 0.32*
Gln	18.23 ± 0.51	18.72 ± 0.61	Val	4.06 ± 0.15	4.18 ± 0.14
Gly	4.55 ± 0.12*	3.57 ± 0.09*	Lys	6.40 ± 0.29*	5.49 ± 0.25*
Pro	3.73 ± 0.15	3.75 ± 0.09	Met	0.71 ± 0.02*	1.22 ± 0.03*
Ser	4.98 ± 0.13	4.23 ± 0.16	Thr	3.95 ± 0.13*	3.54 ± 0.12*
Phe	3.15 ± 0.10	3.28 ± 0.11	Trp	N.d.	N.d.

DIFERENCIA SIGNIFICATIVA>>> P<0.001. *: diferencia significativa entre CG y CGHE

4.2.3.2.b. Caracterización por pesos moleculares de WCDS-HE y CGHE

La composición proteica de ambos productos BSE se ha estudiado con la misma metodología que los SOA, es decir, mediante cromatografía de exclusión o filtración molecular, usando el sistema de FPLC con una columna de filtración Superdex™ Peptide 10/300GL.

Mediante esta técnica cromatográfica, se ha podido comprobar la ruptura de los enlaces peptídicos de las proteínas y la generación de péptidos y aminoácidos libres, a partir de las proteínas constituyentes de los SOA. De hecho, en la Figura.15 se muestran los cromatogramas obtenidos por cromatografía de exclusión molecular (columna Superdex™ Peptide 10/300GL) para WCDS y WCDS-HE, que permite comparar, visualmente, los resultados obtenidos.

Como se observa (Figura.15), la distribución por peso molecular de los componentes proteicos de WCDS y el hidrolizado proteico, WCDS-HE, resulta muy diferente.

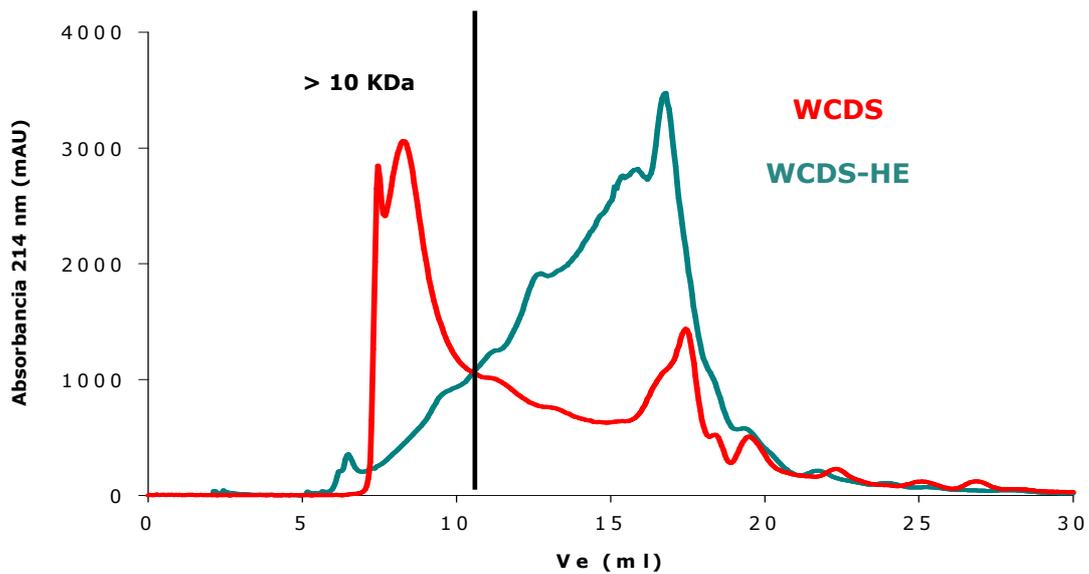


Figura.15: Cromatografía de exclusión molecular de WCDS y WCDS-HE.

Superdex™ Peptide 10/300GL. El perfil de elución corresponde a una dilución 1:10 de WCDS/WCDS-HE.

Se comprueba que el cromatograma de WCDS-HE se ha desplazado hacia la derecha con respecto al de WCDS, es decir, hacia tamaños moleculares más pequeños, que se corresponden con péptidos e, incluso, aminoácidos libres. Mientras que WCDS revela que la gran mayoría (80%) de su material proteico son proteínas de medio-bajo peso molecular (>10.000 Da), el hidrolizado, WCDS-HE, presenta más de un 80% (87%) de estos componentes por debajo de 10.000 Da (Tabla.27).

Tabla.27: Distribución por tamaño molecular del material proteico de WCDS y WCDS-HE.

TAMAÑO MOLECULAR (Daltons)	WCDS (%)	WCDS-HE (%)
> 10.000	80	12.21
10.000-5.000	10	5.67
5.000-1.000	5	14.24
1.000-300	3	27.10
< 300	2	40.78

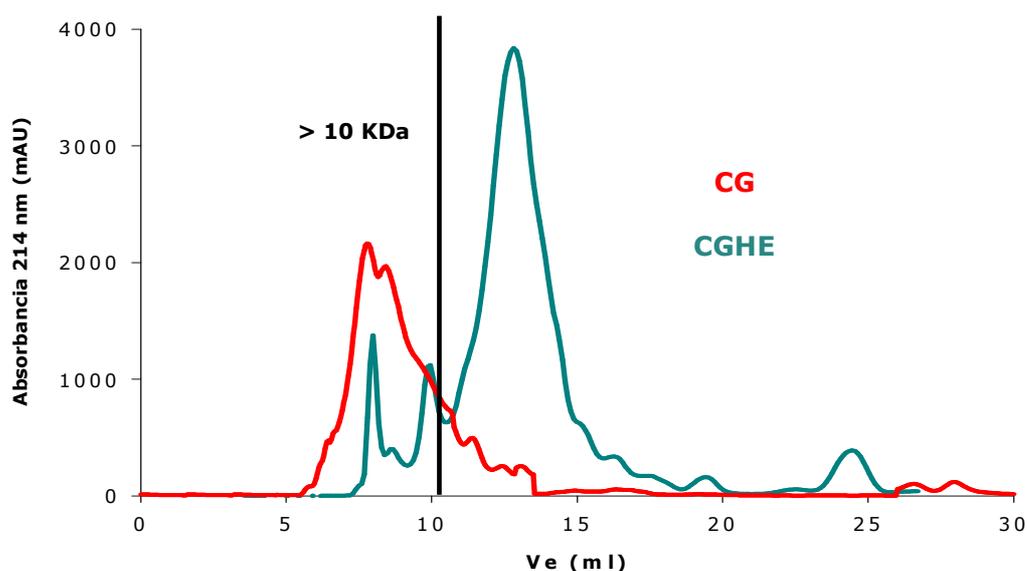


Figura.16: Cromatografía de exclusión molecular de CG y CGHE.

Superdex™ Peptide 10/300GL. El perfil de elución se corresponde con una dilución 1:10 de CG/CGHE.

En el caso de CGHE, se produce un cambio en la estructura de las proteínas. En CGHE las proteínas son solubles (Figura.17), y, como se comprueba en el cromatograma (Figura.16), esta fracción proteica soluble, principalmente, se encuentra en forma de péptidos y aminoácidos libres (cromatograma desplazado a la derecha con respecto a CG). La Tabla.28 muestra que la proteína en CGHE por debajo de los 10.000 Da supone el 80% del total

Tabla.28: Distribución por tamaño molecular del material proteico de CG y CGHE.

TAMAÑO MOLECULAR (Daltons)	CG (%)	CGHE (%)
> 10.000	95	6.09
10.000-5.000	5	4.83
5.000-1.000	-	9.14
1.000-300	-	20.80
< 300	-	59.11

Como consecuencia de esta drástica modificación de la estructura proteica de CG, se ha modificado su solubilidad en medios acuosos. Como se ha mencionado en numerosas ocasiones, las proteínas de CGHE son, totalmente, solubles, independientemente del pH, mientras que la solubilidad de las proteínas de CG es bastante limitada, siendo, prácticamente, insolubles a pH muy ácidos (Figura.17).

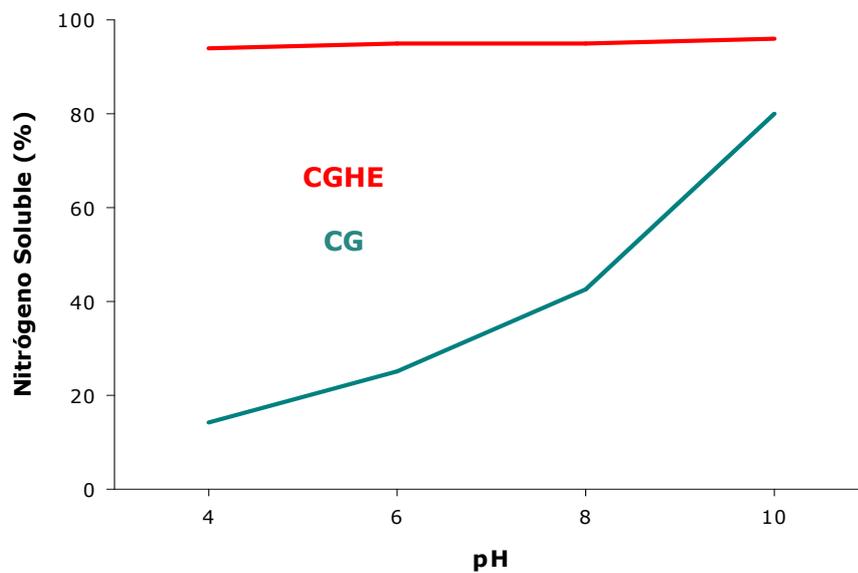


Figura.17: Solubilidad del nitrógeno de CG y CGHE a diferentes pH.

4.2.4. Discusión

Actualmente, se ha incrementado, notablemente, la demanda de proteínas vegetales para el consumo por parte de la industria, especialmente, la alimentaria, y, como consecuencia, la industria ha respondido desarrollando y obteniendo nuevos productos proteicos de gran calidad, a partir de diversas fuentes, tales como son los distintos subproductos orgánicos procedentes de las muy diversas actividades industriales.

Estos nuevos productos que se generan a partir de estas fuentes presentan, sin embargo, un uso muy limitado como consecuencia de las distintas propiedades de sus proteínas, como son su baja digestibilidad y el carácter, potencialmente, alergénico de los mismos, así como su baja solubilidad. Por tanto, estas nuevas fuentes proteicas están siendo empleadas con muchas limitaciones (Metcalf y *col.*, 1996).

Con el fin de realizar un mejor aprovechamiento de estas fuentes proteicas, en muchos casos de origen vegetal, se han desarrollado y optimizado los procesos de extracción de proteínas y se ha mejorado, con ello, su calidad funcional. Entre estos procesos, se encuentran los procesos de hidrólisis, tanto química como enzimática, los cuales modifican, profundamente, las propiedades físicas de las proteínas y, por tanto, también, las funcionales.

La producción de hidrolizados proteicos a partir de subproductos ricos en proteínas es un proceso bien establecido en la industria (Kilara, 1985; Liaset y *col.*, 2003). De hecho, se ha venido empleando, de forma generalizada, estos procesos hidrolíticos para el aprovechamiento proteico de distintos subproductos, como son los SOA.

Los mecanismos por los que se llevaba a cabo este fenómeno de hidrólisis se basaban, tradicionalmente, en el empleo de agentes químicos como catalizadores de la reacción (Prendergast, 1974). Sin embargo, actualmente, estos procesos hidrolíticos son catalizados por proteasas (Adler-Nissen, 1977; 1986). Las hidrólisis ácidas son procesos que presentan rendimientos, relativamente, bajos y que generan una alta cantidad de subproductos, por lo que se produce un elevado consumo de energía. En cambio, la hidrólisis enzimática es un proceso que consume menor energía al operar bajo condiciones suaves de temperatura, presión

y pH. Los rendimientos son superiores y, además se generan productos puros (Lázaro Belanche y Arauzo Pérez, 1994). Esto hace que sea un proceso, altamente, beneficioso, puesto que, de esta forma, las proteínas no se ven modificadas, negativamente, y su calidad no se ve afectada (Fox, 1982), lo que sí ocurre con la hidrólisis química.

Las proteasas son enzimas esenciales para todos los organismos vivos (procariotas, hongos, plantas y animales) (Gupta y col., 2002a). Son enzimas, realmente, importantes, no sólo desde el punto de vista fisiológico, ya que son esenciales en numerosos procesos celulares y metabólicos, sino, también, desde el punto de vista comercial, debido a sus múltiples aplicaciones en el sector industrial (Gupta y col., 2002b).

El interés que se muestra por estas enzimas radica en que intervienen en los procesos de hidrólisis enzimática de los enlaces peptídicos de las proteínas, desempeñando un papel crucial como agentes catalíticos (Kumar y Takagi, 1999). En este trabajo, por este motivo, se ha planteado la producción de estas proteasas, con el fin de emplearlas en las posteriores reacciones hidrolíticas a las que se someten los SOA seleccionados en la etapa anterior.

Como se ha comentado, la producción de proteasas extracelulares es una característica de muchas especies bacterianas (Priest, 1977), dependiendo el rango de producción del microorganismo en cuestión empleado para este fin. Existen diversas fuentes de interés, pero el grupo dominante de productores de proteasas, desde el punto de vista comercial, pertenece al grupo *Bacillus*. Por ello, como fuente productora de proteasas, en este trabajo, se ha seleccionado a este género, debido a su reconocida capacidad para producir proteasas de forma abundante.

Una gran variedad de especies de *Bacillus*, procedentes de muy diversas fuentes, han sido estudiadas y analizadas como productoras de proteasas alcalinas (*B. lichiniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* y *B. mojavensis* (Gupta y col., 2002b; Kalisz, 1988; Kumar y Takagi, 1999; Rao y col., 1998). Todas estas especies presentan la habilidad de secretar grandes cantidades de proteasas, directamente al medio de fermentación. Concretamente, se ha empleado la cepa de *B. lichiniformis* ATCC 21415, debido a su capacidad *superproductora* de proteasas mediante fermentación en distintos medios estudiados (Romero y col., 2007).

La producción de proteasas por *Bacillus* empleando subproductos agroindustriales es un proceso, ampliamente, estudiado (Yanga y col., 2000; Ellouz y col., 2001; Romero y col., 2007). Se conoce que esta producción es una manifestación de la escasez de nutrientes en el medio, que produce la entrada en la fase estacionaria del ciclo celular microbiano (Gupta y col., 2002a). Parece evidente que la optimización del medio fermentativo, junto con otra serie de factores o parámetros, es vital para maximizar los rendimientos de producción de proteasas (Gupta y col., 2002a).

En este estudio, se ha seleccionado PA, plumas de ave residuales del procesamiento del ave para su aprovechamiento cárnico, como única fuente de carbono y nitrógeno, para usarse como medio de fermentación y, así, evaluar la capacidad de este residuo para la producción de proteasas. Se ha seleccionado PA como sustrato de fermentación porque, mayoritariamente, está constituido por proteínas (80-90%, p/p), concretamente queratinas, de forma que, como medio nutritivo, presenta elevadas deficiencias debido a la composición y a la configuración molecular de los aminoácidos constituyentes, que confieren a la pluma su elevada rigidez estructural (Sangali y Brandelli, 2000a, 2000b). Así, es un medio idóneo para ser empleado como medio fermentativo en la producción de proteasas por parte de *Bacillus*.

Así, se han empleado distintos medios FM, sin aporte externo de C, N y suplementos minerales, con distintas concentraciones de PA (0.2, 1, 5, 10 y 20%, p/v). La elección de trabajar con concentraciones bajas de PA ha respondido al hecho de que estudios relevantes indicaban que las bacterias del género *Bacillus*, en deficiencia de nutrientes son capaces de excretar mayor cantidad de proteasas (Shaeffer y col., 1965; Grossman, 1995).

Los resultados obtenidos han mostrado que, esta misma especie en un medio nutritivo, tal como es el medio LB, da lugar a altas tasas de crecimiento celular, y, sin embargo, en esas condiciones nutritivas, la excreción de proteasas al medio es baja, insignificante, por lo que la producción de enzimas no resulta asociada a la producción de biomasa, como se ha reflejado en anteriores estudios (Romero y col., 2007).

En contraste con la nula producción de proteasas en medio LB, cuando se ha procedido a emplear los medios mínimos, formulados a partir de PA, se ha

comprobado que a concentraciones bajas de sustrato empleadas, se obtienen los mayores valores de producción (FM-0.2 y FM-1). La concentración de PA óptima de trabajo resulta ser 0.2% (p/v), puesto que es la que mayores valores de actividad proteásica ha mostrado, en menor tiempo de incubación (2.180 UA/ml a las 40 horas, a 45°C). A concentraciones superiores de PA (5, 10 y 20%, p/v), la producción de proteasas ha resultado similar a la observada en medio LB, mostrando valores despreciables de actividad enzimática.

Así, se confirma que la limitación de nutrientes y una baja relación C/N son las condiciones óptimas para se obtengan los mayores rangos de producción y excreción de proteasas.

Estos resultados se reflejan, también, en el estudio proteómico de los caldos de fermentación. Así, es en el medio FM donde se expresan subtilisinas, proteasas alcalinas muy empleadas y comercializadas. Sin embargo, en los medios LB, la expresión de proteasas es insuficiente como para ser empleado como medio productor de proteasas. Por tanto, es un medio deficitario y limitante, como el caso de los medios FM, el adecuado para la producción de estas enzimas proteolíticas, y no sólo eso, sino que a menor concentración de sustrato, mayores rangos de actividad proteásica se manifiestan.

Estos resultados son los esperados ya que es sabido que la producción de estas proteasas por parte de *Bacillus* responde a una falta de nutrientes en el medio. *Bacillus* es un género que en esta situación de escasez marca el inicio de la fase estacionaria en el ciclo celular bacteriano, y que, en muchos casos, es en esta fase, se da lugar a la formación de esporas (Shaeffer y col., 1965; Grossman, 1995). En este caso, la esporulación y la producción de proteasas están correlacionadas en esta fase estacionaria, por falta de nutrientes, y, aunque son fenómenos independientes, coinciden en el tiempo (Khan, 2000). Así, en el medio LB empleado, *Bacillus* no ha generado en ningún caso esporas, como se ha comprobado por microscopía óptica. Sin embargo, en el caso de los medios FM, sí se ha observado que la morfología de *Bacillus* está relacionada con la situación nutricional y su fisiología. Por esto, se observan esporas en los medios FM, a bajas concentraciones de PA. Todo esto sugiere que la escasez nutricional determina la entrada en una fase de latencia o fase estacionaria, en la que se pueden observar, en el caso de *Bacillus*, la formación de esporas. En el medio FM-0.2 son coincidentes la formación de esporas y la producción y excreción proteásica.

Por otro lado, en este trabajo, los SOA seleccionados en la etapa inicial han sido sometidos al proceso de hidrólisis enzimática y el resultado ha sido la obtención de dos nuevos productos, WCDS-HE y CGHE, que presentan importantes características para un posterior uso agrícola, especialmente, debido a su elevado contenido en MO (Romero y *col.*, 2007; Parrado y *col.*, 2008).

La MO es esencial para la fertilidad de un suelo, de forma que, suelos sin MO son suelos pobres y presentan características físicas inadecuadas para el crecimiento de plantas y cultivos. Existen numerosos estudios en los que se indica que la MO es fuente importante de nutrientes, a través de los procesos de descomposición, mediante la participación de bacterias y hongos, especialmente; Además, esta MO absorbe nutrientes disponibles, los fija y los pone a disposición de las plantas (Gamiz y *col.*, 1998); fija especialmente nitrógeno (NO_3^- y NH_4^+), así como otros micronutrientes (Gamiz y *col.*, 1998; Mackowiak y *col.*, 2001), tales como P, Ca, Mg, K, Na y otros. De ahí, la importancia del mantenimiento y enriquecimiento del contenido en MO del suelo.

WCDS-HE y CGHE, ricos en MO, mayoritariamente en nitrógeno en forma de péptidos y aminoácidos libres, polisacáridos, fitohormonas,... son compuestos, que, además de aportar elevadas cantidades de MO, ésta se presenta de tal forma que puede ser, inmediatamente, usada por las plantas para su crecimiento y desarrollo. De hecho, el nitrógeno orgánico soluble que aportan, en forma de péptidos, es de gran importancia en la nutrición vegetal, debido a su rápida absorción y distribución por el transporte individual de aminoácidos (Higgings y *col.*, 1982). Sin embargo, no sólo presentan una capacidad potencial de estimular el crecimiento de las plantas, sino que estos productos hidrolizados pueden estimular, también, a la gran diversidad de microorganismos del suelo, incrementando su tasa de crecimiento y su actividad metabólica.

Los hidrolizados proteicos son usados, comúnmente, en el ámbito agrícola tanto en aplicaciones foliares como en fertirriego, en el campo de la nutrición vegetal, promoviendo el crecimiento de la planta en muchas formas. De forma directa, aportan nitrógeno utilizable por las plantas, ahorrando el gasto energético que implica la asimilación de los fertilizantes inorgánicos. Por otro lado, de forma indirecta, estos productos actúan sobre el crecimiento de múltiples organismos, favoreciendo la metabolización de la MO ya existente en la tierra, al activar la actividad metabólica de los microorganismos edafológicos, que la convierten en

humus, siendo este proceso de gran importancia al favorecer y mantener la fertilidad de la tierra. Son el instrumento adecuado para aumentar el rendimiento del cultivo al mejorar el crecimiento y proporcionar protección.

Por todas estas propiedades estimulantes del crecimiento y desarrollo de los diversos organismos del suelo se considera a estos productos como bioestimulantes/biofertilizantes. En el mercado, ya existen numerosos productos agronómicos que se encuadran en esta categoría de bioestimulantes edafológicos (Miller, 1990), pero la novedad que estos nuevos productos hidrolizados aportan es, precisamente, la disminución del tamaño molecular del componente proteico, lo que produce un aumento de la biodisponibilidad del N, además de un aumento de la solubilidad del material orgánico.

Las proteínas de WCDS y el hidrolizado correspondiente, WCDS-HE, así como las de CGHE son completamente solubles, a diferencia de las de CG. En el caso de los productos hidrolizados, en ambos casos, su tamaño molecular se ha visto reducido por el ataque enzimático de las proteasas, como se ha comprobado mediante los estudios cromatográficos. Estos cambios en la estructura (tamaño) de las proteínas provocan que mejoren sus propiedades funcionales.

El incremento de la biodisponibilidad de las proteínas de WCDS-HE y CGHE se ha debido, fundamentalmente, a dos parámetros: la *solubilidad* y el *tamaño molecular*. En el caso de WCDS, las proteínas constituyentes ya son solubles, pero la ruptura proteica les ha proporcionado una mayor biodisponibilidad, al disminuir su tamaño. Sin embargo, en el caso de CG, estas proteínas se encuentran, mayoritariamente, en forma insoluble. La ruptura en forma de péptidos y aminoácidos solubiliza las proteínas, incrementando su biodisponibilidad.

Estos cambios funcionales de las proteínas convierten a WCDS-HE y CGHE en ideales bioestimulantes edafológicos, de forma que, los péptidos que aportan son una herramienta fundamental e idónea para el transporte y distribución del nitrógeno en el suelo, mejor que el transporte de aminoácidos libres (Higgins y Payne, 1982). Además, el transporte de péptidos, realmente, protege a los aminoácidos de ser degradados por enzimas presentes en el medio o en el floema durante el transporte al interior de la planta (Higgins y Payne, 1982).

El contenido de aminoácidos libres que aportan estos BSE es, también, un importante parámetro para analizar su calidad agronómica. Procedimientos de hidrólisis química, que emplean altas temperaturas y pH ácidos, producen una significativa recemización de los aminoácidos libres (Barret y Elmore, 1985) y se ha descrito en numerosos estudios que los de D-aminoácidos tienen efectos negativos y tóxicos sobre los organismos vivos (Friedman, 1999). Por lo que, la presencia de estos D-aminoácidos se considera un indicador negativo de la calidad de un biofertilizante/bioestimulante. Sin embargo, en WCDS-HE y CGHE, producidos por hidrólisis enzimática, bajo condiciones suaves de temperatura y pH, se evita la presencia de estos aminoácidos tóxicos. La hidrólisis enzimática es el único proceso de hidrólisis en el que se obtiene un elevadísimo grado de aminoácidos libres y en forma L, es decir, biológicamente activos.

Por otro lado, respecto a la concentración de macro y micronutrientes, en los BSE elaborados se incrementa la concentración de P y K, aspecto de gran importancia para la nutrición de las plantas y microorganismos del suelo. La concentración de Na en ambos BSE resulta baja, e incluso disminuye en CGHE con respecto a CG, lo cual es una ventaja agronómica para ellos, debido a que altas concentraciones de Na pueden afectar, negativamente, a las propiedades físico-químicas del suelo, además de las biológicas, así como, a la producción de cultivos y su calidad (Haynes y Naidu, 1998).

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. WCDS y CG son subproductos orgánicos generados por la industria agraria y la biotecnológica, que resultan materias primas idóneas para la obtención de bioestimulantes edafológicos.
2. La MO que presentan WCDS y CG tiene propiedades físico-químicas (elevada insolubilidad, gran tamaño molecular) que dificultan su accesibilidad y aprovechamiento biológico.
3. Se ha desarrollado un proceso bioquímico óptimo, basado en reacciones de hidrólisis enzimática, catalizadas por proteasas, para la modificación de las propiedades físico-químicas de las proteínas.
4. La consecuencia directa de este proceso es el aumento de la solubilidad de la MO y la disminución del tamaño molecular del componente proteico.
5. Para la realización de las hidrólisis enzimáticas en el laboratorio, a escala de laboratorio, se ha desarrollado un proceso de obtención de proteasas hidrolíticas mediante fermentaciones.
6. Las enzimas obtenidas, mayoritariamente, son subtilisinas, las proteasas comerciales más, ampliamente, utilizadas a nivel industrial.
7. Las cepas del género *Bacillus* (*Bacillus lichiniformis*) empleadas en el proceso fermentativo son superproductoras de proteasas en condiciones nutricionales limitantes.
8. Esta capacidad productora de proteasas es dependiente de la concentración de substrato y de la temperatura de operación.
9. Las reacciones de hidrólisis enzimática se han realizado bajo condiciones suaves de operación. Las condiciones óptimas de trabajo, en las que la calidad del material orgánico no se ve alterado, son: temperatura 55°C y pH 8.5.

10. Los productos resultantes de la hidrólisis enzimática, WCDS-HE y CGHE, se caracterizan por estar constituidos, principalmente, por péptidos y aminoácidos libres (<10.000 Da), lo que les proporciona de forma potencial una alta accesibilidad y biodisponibilidad para plantas y demás organismos del suelo.

CAPÍTULO II:

"Evaluación del potencial bioestimulante de los hidrolizados enzimáticos WCDS-HE y CGHE"

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El suelo

El suelo es un sistema vivo y dinámico complejo, que sirve de soporte a las plantas, además de servir de despensa de agua y de otros elementos necesarios para el desarrollo de los vegetales y otros organismos que en él crecen y se desarrollan, como son los diversos animales pequeños y los microorganismos (hongos y bacterias), que, a su vez, influyen en la vida y desarrollo, también, de las plantas (Viñas, 2005a).

El suelo está constituido por tres fases:

- *Fase sólida*: formada por componentes inorgánicos (procedentes de la meteorización de las rocas) y por componentes orgánicos (humus, biomasa viva y muerta).
- *Fase líquida*: formada por el agua que envuelve las partículas de suelo y cubre el espacio libre formado por poros, galerías, grietas,... Este agua contenida en los poros contiene sales minerales y nutrientes y es el medio en el cual se puede desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que lo colonizan.
- *Fase gaseosa*: aire (oxígeno y dióxido de carbono, principalmente), en el espacio existente en los poros.

1.1.1. Funciones del suelo

Las principales funciones del suelo son:

1. Sostenimiento del crecimiento y la diversidad de plantas y animales, aportando el medio físico, químico y biológico para el intercambio de agua, aire, nutrientes y energía.
2. Regulación de la distribución del agua entre la infiltración y escorrentía y el flujo de agua y solutos, incluyendo nitrógeno, fósforo,

pesticidas y otros nutrientes y compuestos disueltos en agua (Karlen y col., 1997).

3. Almacenamiento y moderación de la liberación de los nutrientes de los ciclos elementales de las plantas y otros elementos (Karlen y col., 1997).
4. Filtración como protección de la calidad del aire, agua y otros recursos.
5. Filtración, amortiguación, degradación, inmovilización y detoxificación de sustancias orgánicas e inorgánicas (Karlen y col., 1997).

1.2. Concepto de calidad del suelo

Dada la importancia del recurso natural edafológico, en una época, relativamente, reciente, se ha producido un impulso de los estudios de suelo, con la aparición de una nueva terminología, entre la que se destaca el término de *calidad del suelo*.

Hay quién considera el término calidad equivalente a salud, de forma que, distintos autores usan ambos conceptos, indistintamente (Roming y col., 1995). Por regla general, no hay consenso a la hora de definir qué es *calidad del suelo*, debido a la subjetividad del término y a la dependencia de factores externos a él mismo, como el uso del suelo, las interacciones con el ecosistema, las prioridades políticas y socioeconómicas, que dificultan la tarea de lograr un consenso y, así, establecer una definición clara y objetiva.

Se puede decir que la *calidad del suelo* comprende 2 aspectos generales fundamentales (Karlen y col., 1997), que son:

- *Las propiedades inherentes del suelo*: resultan de la integración de los factores de formación del suelo, como son el clima, la topografía, la vegetación presente, los materiales de formación y el tiempo (Jenny, 1941). De esta forma, cada suelo tiene sus propias propiedades y capacidades de uso.

- *La dinámica del suelo, influenciada por la acción humana* (Larson and Pierce, 1991; Pierce y Larson, 1993): resulta de la integración del tipo de suelo, su habilidad natural para funcionar y su uso y manejo. Este punto de vista, generalmente, es referido como "salud del suelo" y suele ser el punto de partida para la evaluación de la calidad del suelo (Doran y Parkin, 1994; Larson y Pierce, 1991; Harris y Bezdicek, 1994; Acton y Gregorich, 1995; Karlen y col., 1997).

Tradicionalmente, el término *calidad del suelo* se ha asociado a sostenibilidad y productividad (Sojka y Upchurch, 1999), pero, en los últimos años del siglo XX, diversos autores han establecido distintas definiciones con el objetivo de clarificar el concepto:

- Larson y Pierce, 1991: definen la calidad del suelo como la capacidad de éste para funcionar dentro de los límites de los ecosistemas e interactuar, positivamente, con el medio ambiente externo a ese ecosistema.
- Arshad y Coen, 1992: consideran que la calidad del suelo es su capacidad para aceptar, almacenar y reciclar agua, minerales y energía para la producción de cultivos, preservando un ambiente sano.
- Pierce y Larson, 1993: replantean el concepto y lo hacen equivalente a la capacidad de uso del suelo.
- Doran y Parkin, 1994: definen la calidad de un suelo como la capacidad de éste para funcionar dentro de los límites de los ecosistemas, para sostener la productividad biológica, mantener la calidad medioambiental y promover la salud de animales y plantas.

Finalmente, la definición más aceptada es la establecida por la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo (SSSA), que establece que la *calidad de un suelo* es la capacidad de éste para funcionar, dentro de los límites de los ecosistemas, para sostener la productividad de plantas y animales y manejar o mejorar la calidad del agua y aire, y apoyar la salud humana y del hábitat (Karlen y col., 1997).

De esta forma, resulta evidente, del análisis de las definiciones establecidas, es que la calidad del suelo es uno de los factores fundamentales y más importantes que influyen en el uso del suelo y en su aplicación agrícola (Wang y Gong, 1998).

1.2.1. Parámetros de calidad del suelo

La calidad del suelo puede ser evaluada a través de diferentes parámetros, tanto físico-químicos, como biológicos (Tabla.30).

1.2.1.1. Textura y estructura del suelo

Los distintos componentes del suelo determinan sus propiedades físico-químicas y biológicas, y, por lo tanto, le confieren la capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso antropogénico (Viñas, 2005a).

La *textura* y la *estructura* son dos parámetros físicos fundamentales que determinan las propiedades físicas del suelo. De estos parámetros depende el comportamiento del aire y el agua en el medio edáfico, de forma que, condicionan los fenómenos de aireación, de permeabilidad,... (Viñas, 2005a).

Por un lado, la *textura* determina la cantidad de arena, limo y arcilla que existe en el suelo (Tabla.29) y, por tanto, la cantidad y el tamaño de los espacios que existen entre las partículas que lo constituyen. Estos espacios determinan la facilidad que tiene el agua para circular a través del suelo y la cantidad de agua que éste puede retener.

Tabla.29: Tamaño de partículas del suelo.

Tamaño de las partículas del suelo	
Componente	Diámetro(mm)
Arenas	2-0.05
Limos	<0,05-0.002
Arcilla	< 0.002

Por otro lado, la *estructura* es otra propiedad física del suelo, que está basada en el modo que tienen de unirse entre sí sus elementos constituyentes, de tal forma, que le confieren una arquitectura característica.

Estos parámetros físicos son más difíciles de corregir que las propiedades químicas, de ahí su interés desde el punto de vista de la calidad del suelo. La *textura*, difícilmente, puede ser alterada o modificada, pero sí se puede influir, beneficiosamente, sobre la *estructura*, mediante el suministro de MO (MO), para aumentar su contenido; evitando el empleo de abonos ricos en sodio, que favorece la dispersión de coloides; evitando regar con mayor cantidad de agua de la necesaria, que puede destruir la estructura; etc.

Tabla.30: Parámetros de Calidad de Suelo.

Fuente: Generalitat de Catalunya, 1999.

Parámetros de Calidad del Suelo	
Altitud de la zona	Régimen de humedad del suelo
Régimen hídrico del suelo	Duración de las características del régimen hídrico
Causas de las condiciones de humedad excesiva	Clases de drenaje
Conductividad hidráulica	Clases de permeabilidad
Velocidad de infiltración	Nivel freático
Calidad del agua freática	Régimen de temperatura del suelo
Forma de relleno	Dinámica de la forma (proceso de erosión)
Intensidad de los procesos de superficie	Pendiente general
Pendiente local	Longitud de pendiente
Morfología local de pendiente	Situación de pérdida de pendiente
Orientación	Pedregosidad superficial
Afloramiento rocosos	Tipos de roca subyacente
Macroestructura de la roca	Dureza de la roca
Grado de alteración de la roca subyacente	Profundidad del suelo
Profundidad efectiva del suelo	Profundidad de arrendamiento
Textura	Estructura
Estado de oxido reducción	Proporción de elementos gruesos
Consistencia	Cimentaciones
MO	Actividad biológica
Contacto lítico	Materiales esqueléticos
Capa de grava	Substrato salino
Reacción del suelo	Porosidad
Tipos de arcillas	Fertilidad

1.2.1.2. Fertilidad y MO del suelo (MOS)

Un suelo fértil es aquel que puede suministrar las condiciones óptimas para el crecimiento y el desarrollo de las plantas y otros organismos propios del suelo. Así, una de las propiedades del suelo más importantes para las plantas y los cultivos agrícolas es su fertilidad, que resulta de la interacción entre las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo.

Una de las propiedades biológicas más relacionadas con la fertilidad es la *cantidad de MO (MO)*. La MO es un parámetro esencial y determinante de la fertilidad y, por tanto, para la calidad del suelo. Así, los suelos con bajos niveles de MO son pobres y de características físicas inadecuadas para el crecimiento de las plantas y el desarrollo de cultivos.

La MO es importante porque está unida a la cantidad, tipo y actividad de los microorganismos del suelo, de forma que, será imprescindible para el mantenimiento de la fertilidad, que los microorganismos que en él habitan dispongan de los componentes esenciales para su crecimiento y desarrollo, puesto que ellos son los encargados de los procesos de mineralización de la MO.

En biología, se considera que la MO es toda sustancia que compone a los seres vivos o procede de ellos, y está, fundamentalmente, formada por C, O, H y N, y otros elementos como son el Na, Ca, K, Fe,..., interviniendo, también, otros elementos, pero en bajas proporciones (<0,5%).

La parte orgánica del suelo está formada por restos vegetales y restos animales frescos o en estado de descomposición, que forman un manto superficial o mantillo; los artrópodos (abejas, hormigas, mariposas, escarabajos, ciempiés, etc.) fragmentan los restos orgánicos en sustancias finas que luego son mezcladas con el material mineral (por las lombrices en sus desplazamientos). La acción de los distintos organismos descompone, parcialmente la MO, de forma que da lugar a que una microfauna asociada, compuesta, principalmente, por hongos y bacterias, actúe sobre ella, la degraden y, así, se liberen elementos minerales solubles y gaseosos (CO₂, NH₃, nitratos, fosfatos,...), que pueden ser asimilados, fundamentalmente, por plantas y otros organismos.

1.2.1.2.a. Características de la MOS

La MO de suelo tiene, esencialmente, las siguientes características:

- Es insoluble en agua y evita el lavado de los suelos y la pérdida de nutrientes.
- Tiene una alta capacidad de absorción y retención de agua, de forma que, absorbe varias veces su propio peso en agua y la retiene, evitando la desecación del suelo.
- Mejora las condiciones físicas, químicas y biológicas de los suelos: los suaviza, permite una aireación adecuada, aumenta la porosidad y la infiltración de agua,...
- Es una fuente importante de nutrientes, a través de los procesos de descomposición, con la participación de bacterias y hongos.
- Absorbe nutrientes disponibles, los fija y los pone a disposición de las plantas. Fija, especialmente, nitrógeno (NO_3 , NH_4), fósforo (PO_4) calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K), sodio (Na) y otros elementos.
- Mantiene la vida de los organismos del suelo, esenciales para los procesos de renovación del recurso.

1.2.1.2.b. Funciones de la MOS

Se puede decir que, la MOS cumple con numerosas funciones que la hacen imprescindible para que un suelo sea fértil. Entre las funciones más importantes de la MO destacan:

- Función nutricional: es fuente de C, N, P,...imprescindibles para el desarrollo vegetal y su crecimiento, así como el del resto de organismos que viven en el suelo.

- Función biológica: es el nutriente básico de la microfauna del suelo (bacterias y hongos), responsable de la mineralización de la MO.
- Función físico-química: promueve la estructura del suelo.

1.2.1.3. Actividad biológica: poblaciones microbianas del suelo

La estructura de poros, resultante de la asociación de las partículas minerales del suelo (arena, limo y arcilla) y la MOS, determina una gran variedad de tamaños y espacios, permitiendo la existencia y el mantenimiento de poblaciones microbianas en el suelo. Son estas propiedades del suelo, entre otras, las que, principalmente, condicionan el tipo y la diversidad de las poblaciones microbianas existentes (Sessitsch y col., 2001).

Las poblaciones microbianas cumplen funciones fundamentales para la sostenibilidad del ecosistema terrestre (Tabla.31), entre las más destacadas:

- Son el principal agente del ciclo de nutrientes.
- Regulan la dinámica de la MO.
- Retienen C y controlan la emisión de gases (de vital importancia para el control del efecto invernadero).
- Modifican la estructura material del suelo y los regímenes del agua.
- Mejoran la cantidad y eficacia de la adquisición de nutrientes por parte de la vegetación, y por tanto, la salud de las plantas.

Está determinado que se pueden encontrar del orden de 10^6 - 10^9 bacterias por gramo de suelo, mientras que de hongos se puede encontrar hasta dos órdenes de magnitud menos, pero, aún así, representan una parte muy importante de la biomasa edafológica (Alexander, 1977; Atlas y Bartha, 1997).

La organización estructural del suelo confiere una heterogeneidad espacial para los microorganismos, que se caracteriza por la presencia de diferentes sustratos, nutrientes, concentraciones de oxígeno, contenido en agua líquida, así como de un pH variable (Ladd y col., 1996). Esto determina que en un suelo se puedan encontrar una gran variedad de poblaciones microbianas, con capacidades metabólicas distintas, condicionadas por la biodisponibilidad de las distintas fuentes

de C y energía, y que, a su vez, está determinada por las características físico-químicas propias de cada suelo (Kästner, 2000).

Tabla.31: Funciones esenciales que desempeñan los diferentes tipos de organismos del suelo.

<i>Funciones en el suelo</i>	<i>Organismos Implicados</i>
Mantenimiento de la estructura	Bioturbación por invertebrados y sistemas radiculares de las plantas, micorrizas y algunos tipos de microorganismos
Regulación de la hidrología del suelo	Invertebrados con mayor potencial de bioturbación y sistemas radiculares
Intercambio de gases con la atmósfera y secuestro de carbono	La mayor parte de los microorganismos y sistemas radiculares y carbono retenido en agregados compactos de origen biogénico (como las pelotas fecales de lumbrídeos)
Eliminación de compuestos tóxicos	La mayor parte de los microorganismos del suelo
Ciclo de Nutrientes	La mayoría de microorganismos y raíces, así como algunos invertebrados que se alimentan del mantillo (horizontes orgánicos)
Descomposición de la material orgánica	Varios invertebrados saprofitos y/o que se alimentan del mantillo (detritívoros), hongos, bacterias, actinomicetos y otros micro-organismos
Supresión de pestes, enfermedades y parásitos	Plantas, micorrizas y otros hongos, nematodos, otros invertebrados y bacterias que parasitan o causan enfermedades a patógenos, colémbolos, invertebrados, protozoos y hongos depredadores
Fuente de alimentos y medicinas	Raíces de algunas plantas, algunos insectos (grillos, larvas de escarabajos, hormigas, termites), lumbrídeos, vertebrados que habitan en el suelo, microorganismos y sus productos (p. ej. la penicilina)
Relaciones simbióticas y asimbióticas con las raíces de las plantas	Rizobios, micorrizas, actinomicetos, bacterias diazotrópicas, varias especies de microorganismos rizosféricos y hormigas
Control del crecimiento de las plantas	Efectos Directos: Sistemas radiculares, rizobios, micorrizas, actinomicetos, patógenos, nematodos fitoparásitos, insectos rizofagos, microorganismos de la rizosfera, agentes que ejercen biocontrol; Efectos Indirectos: la mayor parte de la biota

1.3. Procesos de bioestimulación edafológica

1.3.1. Aspectos generales

El empleo de materias orgánicas en la agricultura como método de mantenimiento y recuperación de la fertilidad de los suelos es un procedimiento conocido y aplicado desde tiempos pasados.

Hoy en día, no hay discusión sobre la importancia de mantener un nivel adecuado de MO en el suelo, en función del tipo de suelo y de cultivo, especialmente. Está establecido que la MO ejerce efectos físicos, químicos y biológicos sobre el suelo y, todos ellos, combinados, incrementan su fertilidad y, por tanto, su calidad.

1.3.2. Concepto de bioestimulación edafológica (BE)

Existen múltiples definiciones de *bioestimulación edafológica* dadas en numerosos estudios. Así, diversos autores definen, de forma básica, el proceso de BE como la aplicación o bien de nutrientes, en forma orgánica o inorgánica (Gruiz y Kriston, 1995; Pankrantz, 2001; Baheri y Meysami, 2002; Núñez, 2003), o bien de sustratos o tensioactivos (Gruiz y Kriston, 1995; Baheri y Meysami, 2002; Núñez, 2003) a un suelo, con el objetivo de incrementar las poblaciones microbianas y estimular su actividad.

Otros autores concretan un poco más esta definición, considerando que la BE incluye la adición de N, P y diversos minerales al suelo, ajustando todo al pH adecuado para la proliferación de microorganismos autóctonos (Venosa y col., 1996).

Una definición más completa y que engloba a todas las demás sería la dada por Chen y col., 2002: la BE es el proceso mediante el cual se ven incrementadas las tasas de crecimiento y desarrollo de plantas y cultivos y/o de los distintos microorganismos que habitan en el suelo, existiendo un amplio espectro de mecanismos mediante los cuales ocurre este proceso de estimulación.

Algunos de los mecanismos mediante los que se produce la estimulación de plantas y microorganismos del suelo son (Chen y col., 2002; Chen y col., 2003):

- Inoculación de microorganismos.
- Activación de la actividad microbiana.
- Activación de actividades enzimáticas críticas.
- Activación de la producción de hormonas del crecimiento de las plantas.
- Adición de nutrientes.

De cualquier forma, un proceso de bioestimulación tiene por objetivo el incremento de la diversidad, número y, sobre todo, de la actividad metabólica del suelo, siendo este último aspecto clave para el éxito de un proceso de bioestimulación.

1.3.3. Bioestimulantes Edafológicos (BSE)

De forma general, los BSE son productos con capacidad de estimular el crecimiento y desarrollo de plantas y cultivos, así como las tasas de crecimiento microbiológico y su actividad metabólica, constituyendo este aspecto la clave fundamental para el mantenimiento de la fertilidad del suelo.

Existen una gran cantidad de productos, actualmente, disponibles de uso agrícola que, perfectamente, pueden clasificarse dentro de esta categoría de BSE (Miller, 1990) y todos ellos, ejercen su capacidad bioestimulante a través de numerosos mecanismos.

1.3.3.1. Tipos de Bioestimulantes Edafológicos (BSE)

Se puede considerar que existen 2 categorías de BSE:

- Bioestimulantes edafológicos inorgánicos o BSEI: que aportan N, P y otros nutrientes tales como K, en forma inorgánica, a base de mezclas tales como NaNO_3 y Na_2HPO_4 (Ruberto y col., 2003); NH_4NO_3 y P aportado en forma de productos comerciales como el Hi-Yield[®] Triple Superphosphate (TSP) (Sarkar y col., 2005); otras fuentes como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y K_2HPO_4 (Pérez-Armendáriz y col., 2004, Bento y col., 2005),...

Estos productos presentan numerosos inconvenientes, de forma que, en muchas situaciones, realmente, no se les debería considerar

bioestimulantes, ya que la adición de mezclas de NPK inorgánicos causa, en ocasiones, un efecto inhibitor, tanto de la cantidad como de la diversidad de las poblaciones microbianas del suelo. Concretamente, se ha visto, en diversos estudios, como la aplicación de N y P inorgánicos produce una disminución de las poblaciones microbianas endógenas (Ruberto y col., 2003), existiendo, además, una alta probabilidad de contaminación por parte de los componentes de los fertilizantes.

➤ Bioestimulantes edafológicos orgánicos o BSEO: dentro de este grupo existe una gran variedad de productos. En general, todos tienen en común su elevado contenido en MO. Los elementos químicos que los componen se encuentran formando biomoléculas como son las proteínas, los azúcares, los lípidos, etc.

A su vez, se puede hacer distinción entre los *BSEO no hidrolizados* y los *hidrolizados*. Los *BSEO no hidrolizados* suelen ser productos, normalmente, sólidos que proceden de procesos de compostaje, residuos sólidos de plantas de depuración de aguas residuales, estiércoles, purines, etc. Se está trabajando con ellos y estudiando su aplicación en fase experimental (Walworth y col., 1995; Namkoong y col., 2002).

Sin embargo, presentan una serie de problemas relacionados con el potencial bioestimulante, debido a la biodisponibilidad de los elementos para las plantas y demás organismos edafológicos. Así, el nitrógeno orgánico (fundamentalmente, en forma de proteínas) debe ser procesado (mineralizado *in situ*) para su absorción microbiológica, existiendo problemas de transporte a zonas profundas del suelo (McBride, 2003). Por último, otras desventajas que manifiestan es que tienen composiciones menos controlables y definidas, debido al origen y a su proceso de obtención, teniendo una composición final muy diversa, con bajos contenidos en N y P.

Por otro lado, se encuentran los *BSEO hidrolizados*, que son productos obtenidos mediante un proceso de hidrólisis a partir de distintas materias orgánicas (Patente ES 2 259542A1 - Parrado y col., 2005; Parrado y col., 2008, Romero y col., 2008). Por tanto, este proceso de hidrólisis los convierte en materiales ricos en nitrógeno, en forma de péptidos y

aminoácidos libres, polisacáridos, ácidos húmicos, fitohormonas,..., es decir, compuestos que pueden ser, inmediatamente, usados por las plantas y los microorganismos, siendo productos, totalmente, solubles.

El empleo de diversas materias orgánicas, ricas en N en forma de proteínas y otras biomoléculas, para su conversión en estos productos solubles, de rápida absorción para plantas y microorganismos, ha sido, ampliamente, estudiado (Gjalakshimi *y col.*, 2004; Ordoñez *y col.*, 2001), debido a que las plantas son capaces de absorber y asimilar, directa y conjuntamente, carbono, en forma de azúcares, y nitrógeno, en forma de péptidos y aminoácidos.

Entre las materias orgánicas de partida para la obtención de BSEO mediante reacciones de hidrólisis se emplean diversos materiales como es el caso de los SOA, que constituyen una MO idónea por su elevada concentración de proteínas, así como, de carbohidratos y otras biomoléculas.

Los BSEO hidrolizados, una vez aplicados al suelo, como se ha comentado, aportan N orgánico en forma de péptidos, que resultan de gran importancia en la nutrición vegetal, debido a su rápida absorción y distribución mediante transporte individual de aminoácidos (Higgings *y col.*, 1982). De hecho, estos hidrolizados son usados, comúnmente, en el ámbito agrícola, tanto en aplicaciones foliares como en fertirriego, en el campo de la nutrición funcional vegetal, ya que promueven el crecimiento de la planta en muchas formas:

Directamente:

- Aportan nitrógeno utilizable por las plantas, ahorrando el gasto energético que implica la asimilación de los fertilizantes inorgánicos.
- Provocan un aumento de la resistencia al estrés hídrico, salinidad, heladas, etc.
- Son precursores de hormonas del crecimiento. Así, el triptófano es el precursor de ácido indolacético, el cual potencia el desarrollo del sistema radicular.

Indirectamente:

- Favorecen la metabolización de la MO ya existente en la tierra, convirtiéndola en humus.
- Favorecen los procesos de biorremediación y biodegradación natural, degradando los químicos orgánicos tóxicos.
- Estimulan la actividad microbiana alrededor del sistema de raíces, aumentando, significativamente, la masa de raíces y mejorando la salud de la planta.
- Aumentan el nitrógeno disponible para las plantas al estimular el crecimiento de microorganismos endógenos.
- Aumentan el rendimiento del cultivo al mejorar el crecimiento y al proporcionar protección porque la mejora del crecimiento de la planta viene acompañado por una reducción del estrés y mejor resistencia a la enfermedad.
- Mejoran la porosidad de la tierra, el drenaje y la ventilación, reducen la compactación y mejoran la capacidad de retención de agua de la tierra, ayudando así a las plantas a resistir la sequía y producen mejores cultivos en condiciones de humedad reducida.
- Estimulan la germinación de las semillas y la formación de raíces y el crecimiento, produciendo plantas más fuertes y saludables y más capaces de resistir plagas y condiciones de sequía.
- Aumentan las poblaciones de microorganismos de la tierra, lo que a la vez aumenta la toma de nutrientes de la tierra a las plantas.
- Mejoran la asimilación de oxígeno en las plantas.
- Ayudan a balancear el pH de la tierra.
- Ayudan a reducir la erosión de la tierra.

1.4. Modelo de monitorización y evaluación de un proceso de bioestimulación

El proceso de bioestimulación comprende la aplicación de MO con el fin de incrementar las poblaciones microbianas y activar o estimular su actividad metabólica, logrando que se mejore la fertilidad del suelo y, por tanto, se incremente la calidad de éste.

Para evaluar un proceso de bioestimulación basado en la aplicación de MO es preciso seleccionar una serie de parámetros o *bioindicadores*, que cumplan una serie de requisitos, que implican el suministro de información sobre el desarrollo del proceso.

Los requisitos principales que deben cumplir los *bioindicadores* son los siguientes:

- Deben proporcionar información de la dirección del proceso, es decir, si es un proceso positivo o negativo.
- Deben informar sobre la magnitud del proceso, es decir, el % del cambio experimentado sobre unos valores control o de referencia básicos.
- Deben aportar información sobre la permanencia del cambio, es decir, la duración de los cambios experimentados.

Para analizar la situación de un suelo hay seleccionar parámetros que cumplan con los siguientes criterios básicos, que deben tenerse en cuenta a la hora de seleccionarlo como *bioindicador*:

- Validez científica.
- Disponibilidad y fiabilidad de los datos.
- Representatividad.
- Sensibilidad a los cambios.
- Sencillez.
- Relevancia y utilidad.
- Comparabilidad.
- Racionalidad de la relación coste/beneficio.

En el caso de la monitorización y evaluación de un proceso de bioestimulación, es necesario seleccionar parámetros que estén relacionados con la calidad del suelo, puesto que el resultado final de este proceso es el aumento de la fertilidad y, por tanto, la calidad de éste.

Algunos autores, como Arshad (2002), consideran que los indicadores de calidad del suelo se refieren, exclusivamente, a las propiedades edáficas, que influyen en la capacidad de realizar funciones de producción agrícola o

medioambiental. Sin embargo, otros autores establecen como buenos indicadores de la situación de un suelo cualquiera de las propiedades físico-químicas y biológicas de éste (Kennedy y Papendick, 1995; Pankhurst y col., 1995; SQI, 1996; Alvear y col., 2006), que resultan idóneas para su empleo como *bioindicadores*, para monitorizar los procesos físico-químicos y biológicos que ocurren en el suelo.

Es evidente, en todos los casos, que es necesario determinar la mayor cantidad posible de propiedades para conocer el estado global del suelo (Zoneveld, 1982; Doran y Parkin, 1996).

Nannipieri y col., 1995, dada la gran cantidad de parámetros biológicos que se describen en la literatura, los agrupan en 2 categorías:

- *Bioindicadores generales*: incluyen a todas las variables, directamente, relacionadas con las actividades microbianas, tales como la biomasa global, el carbono, el nitrógeno, el contenido de ergosterol,...
- *Bioindicadores específicos*: incluyen una serie de actividades enzimáticas hidrolíticas extracelulares involucradas en los ciclos del C, N y P, como las enzimas β -glucosidasa, fosfatasa, ureasa,...

1.4.1. Bioindicadores generales

1.4.1.1. Diversidad de las comunidades microbianas: cuantificación de microorganismos del suelo

Durante el siglo XX y, especialmente, en los últimos 20 años, se han incrementado, significativamente, las metodologías para el estudio de la diversidad microbiana existente en la Biosfera (Viñas, 2005a).

A pesar de que está estimado que pueden existir en el suelo hasta unos 4.000 equivalentes genómicos distintos por gramo de suelo, lo que supone que, quizás, existen más de 10.000 especies microbianas diferentes por gramo de suelo (Torsvik y col., 1990 y 1998), hay que señalar que tan sólo entre un 0.001% y un 1% de los microorganismos viables del suelo, resultan cultivables (Torsvik y col., 2003).

Esta gran diversidad encontrada por Torsvik (1990), también, fue encontrada por otros autores como Truper (1992), que estimó que pueden existir un total de 30.000 especies bacterianas diferentes en la Bioesfera (Tabla.32).

Es, por esto, por lo que los estudios clásicos de diversidad microbiana, basados, únicamente, en el aislamiento de microorganismos, representan tan sólo una parte minoritaria de la diversidad real existente (Amann y col., 1995)

Tabla.32: Proporción de organismos cultivables (%) en distintos ambientes.

<i>Hábitat</i>	<i>Cultivables (%)</i>	<i>Referencias</i>
Ecosistema marino	0.001-1	Kogure y col., 1980 Ferguson y col., 1984
Ecosistema aguas continentales	0.25	Jones, 1977
Lagos mesotróficos	0.1-1	Staley y Konopka, 1985
Estuarios	0.1-3	Ferguson y col., 1984
Lodos activados	1-15	Wagner y col., 1993 Wagner y col., 1994
Sedimentos	0.25	Jones 1977
Suelos	0.3	Torsvik y col., 1990

Sin embargo, estas metodologías clásicas tienen otra utilidad para la monitorización del proceso de bioestimulación: la cuantificación del crecimiento microbiano en presencia de nutrientes.

Es sabido que cuando se siembran microorganismos en un medio nutritivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse, activamente, empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para producir nuevos microorganismos. Este proceso ocurre de igual forma en la naturaleza, así que, los microorganismos en presencia de nutrientes asimilables responden empleando dichos materiales para su crecimiento y división. Este proceso siempre continúa hasta que algún nutriente del medio se agota (substrato limitante) y, por tanto, el crecimiento se detiene. También puede ocurrir que el crecimiento se detenga por otras circunstancias

como, por ejemplo, la acumulación de alguna sustancia inhibidora, formada por los propios microorganismos.

Este crecimiento de las poblaciones microbianas en respuesta a la existencia de nutrientes en el medio puede ser empleado como un bioindicador de la calidad del suelo, pero, evidentemente, también, puede ser empleado para la monitorización del proceso de bioestimulación, basado en el aporte de nutrientes para estimular la actividad microbiana del suelo.

Un aumento de las poblaciones microbianas tras la aplicación de nutrientes orgánicos es una evidencia de que este aporte de material nutritivo contribuye a la mejora de la fertilidad del suelo, porque al incrementar el número de individuos microbiológicos, se incrementa la población degradadora de la MO.

Las metodologías clásicas que requieren el cultivo de microorganismos permiten de forma fácil, sencilla y barata el recuento de microorganismos y, así, evaluar las tasas de crecimiento en el tiempo, en respuesta a la adición de MO (Tabla.33). Entre estas técnicas se encuentra las técnicas tradicionales de cultivo en placa y el número más probable (NMP). Dentro de las técnicas de cultivo en placa destaca el uso de de placas RODAC (*Replicate Organisms Direct Agar Contact*). El empleo de estas placas se basa en el contacto directo del agar de la placa con la muestra con microorganismos, ya sea una muestra ambiental o cualquier otro tipo de superficie.

El principal inconveniente es que sólo se aísla una pequeña proporción de los componentes existentes en la comunidad microbiana, ya que los medios sintéticos de laboratorio y el soporte (sólido o líquido) limitan la proporción de microorganismos aislados (Torsvik y *col.*, 2003) (Tabla.33)

Tabla.33: Ventajas y limitaciones de los métodos dependientes de cultivo. (Viñas, 2005a).

Método	Ventajas	Limitaciones
Aislamiento en placa	Cultivos puros útiles para estudios posteriores	Sólo una pequeña proporción de la comunidad es detectable. Los aislados no necesariamente reflejan la función metabólica.
Aislamiento en placa RODAC	Técnica rápida y eficaz	Ineficacia en superficies muy contaminadas
Número más probable (NMP)	Función metabólica de interés detectada	Ausencia de aislados para posteriores estudios. El medio selectivo puede limitar la proporción detectada de la comunidad

1.4.1.2. Diversidad de las comunidades microbianas: determinación de la biodiversidad genética

Debido a las limitaciones de las metodologías tradicionales para determinar la diversidad de las poblaciones microbianas, en los últimos años, se han desarrollado una serie de metodologías, con el fin de representar la mayor proporción posible de la diversidad microbiana existente en una muestra ambiental (Amann y col., 1995; Head y col., 1998).

La gran ventaja de estas metodologías es que no precisan pasos previos de cultivo de la muestra ambiental y se basan en el estudio directo de la muestra a diferentes niveles.

Brevemente, existen métodos que analizan los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana de la comunidad bacteriana (PLFA) (Macnaughton y col., 1999; Clegg y col., 2003; Ritz y col., 2004); también, existen métodos basados en la microscopía por epifluorescencia, y mayoritariamente, se encuentran métodos que analizan ácidos nucleicos existentes en la comunidad: restricción de productos de PCR clonados (ARDRA) (Amann y col., 1995; Hugenholtz y Pace, 1996; Torsvik y col., 1998); PCR acoplada a electroforesis en geles con gradiente desnaturizante químico o térmico (DGGE o TGGE, respectivamente) (Fisher y Lerman, 1979); Muyzer y col., 1993; Fromin y col., 2002); polimorfismos de la longitud del fragmento terminal de restricción (T-RFLP) (Liu y col., 1997); y técnicas de

hibridación *in situ* (FISH) (DeLonge y col., 1989; Amann y col., 1995; Hicks y col., 1992).

Aunque estas técnicas han contribuido, notablemente, al conocimiento de la diversidad microbiana, aún existen importantes limitaciones intrínsecas de estas metodologías, como se recoge en la Tabla.34 (Viñas, 2005a). Fundamentalmente, se encuentran limitaciones en la extracción de ácidos nucleicos de las muestras ambientales, en alteraciones y artefactos asociados a la amplificación enzimática de los ácidos nucleicos, en la sensibilidad y accesibilidad de las zonas diana en las técnicas de hibridación celular,...

Tabla.34: Ventajas y limitaciones de los métodos independientes de cultivo. (Viñas, 2005a).

Método	Ventajas	Limitaciones
PLFA	Cambios en el perfil de lípidos pueden indicar cambios en la estructura de la comunidad.	No se obtienen aislamientos para estudios posteriores.
FISH	Visualización espacial de microorganismos específicos de interés. No hay alteraciones debidas al medio de cultivo	No siempre se detectan microorganismos activos. Técnica laboriosa. No se obtienen aislados para estudios posteriores.
Epifluorescencia	Enumeración de organismos vivos. No existe alteración debido al medio de cultivo.	No diferencia microorganismos con actividad catabólica de interés. No se obtienen aislados para estudios posteriores.
DGGE, TGGE, T-RFLP	Se puede identificar microorganismos por secuenciación de bandas resueltas. No hay alteración del medio de cultivo.	Extracción diferencial de DNA y RNA en diferentes microorganismos. No da información de la actividad. No se obtienen aislados para posteriores estudios.
ARDRA	Identificación de microorganismos por secuenciación de clones recombinantes. No hay alteración del medio de cultivo	Extracción diferencial de DNA y RNA en diferentes microorganismos. No da información de la actividad. No se obtienen aislados para posteriores estudios. Técnica muy laboriosa.

1.4.1.2.a. Electroforesis en gel de gradiente químico desnaturizante (DGGE):

Las electroforesis en geles con gradiente desnaturizante químico (DGGE) son técnicas que emplean fragmentos de DNA de igual longitud, pero con secuencia distinta, amplificados mediante PCR, para separarlos electroforéticamente (Fisher y col., 1979). En los últimos años, los fragmentos de DNA amplificados y empleados para el análisis mediante DGGE codifican para el fragmento 16S rRNA y 18S rRNA de muestras ambientales.

La técnica consiste, principalmente, en una electroforesis en gel de poliacrilamida con un gradiente químico desnaturizante, en la que el DNA, de doble cadena, al migrar por el gel está sujeto a un ambiente desnaturizante creciente, que determina que sus cadenas se separen hasta formar los denominados *melting domains*. Estos dominios y la temperatura a la que se forman estos dominios, T_m , es específica de la secuencia. Cuando un fragmento de DNA de un determinado tamaño y secuencia se encuentra en las condiciones que producen su desnaturización, se separa la doble hélice y la migración de dichas cadenas a lo largo del gel es, considerablemente, más lenta o se detiene. Por esto, esta técnica utiliza un gradiente de desnaturización durante la migración de fragmentos de DNA en el gel de electroforesis, con rangos en los cuales sea posible tener estados de cadena doble iniciales y estados de cadena sencillas desnaturizadas en algún punto de la migración, para un fragmento de un tamaño y una secuencia específica.

El ambiente desnaturizante está creado por una combinación de temperatura uniforme, entre 55° y 65°C y un gradiente lineal formado por urea y formamida (una solución desnaturizante al 100% está formada por 7M de urea y un 40% de formamida). El gradiente puede formarse en paralelo o en perpendicular con respecto a la dirección de la electroforesis. Un gel con gradiente perpendicular, en el cual el gradiente es perpendicular al campo eléctrico, típicamente, usa un rango de gradiente bastante amplio, tal como 0-100% o 20-80%. El DGGE en paralelo usa rangos más estrechos para permitir una mejor separación de los fragmentos.

Una buena resolución del gel dependerá de que los fragmentos no se hayan desnaturalizado completamente y de que la región que estamos amplificando sea la de menor T_m .

Empleando esta técnica, se pueden estudiar moléculas de DNA de una longitud de hasta 700 pares de bases (pb), con la característica de llevar acoplada una cola artificial muy rica en GC, añadida a uno de los cebadores de la PCR en posición 5', en uno de los extremos, para evitar la completa desnaturalización del DNA. Esta cola GC (entre 30 y 40 bases) se añade a uno de los cebadores empleados en la PCR para asegurarnos de que la secuencia analizada es la de menor T_m y que el DNA permanecerá, parcialmente, unido. El tamaño de los fragmentos que se pueden cargar en un gel desnaturalizante puede ser tan grande como 1 kb, pero sólo el de menor T_m será disponible para el análisis.

Las bandas individuales que se obtienen representan aquellos DNAs que han frenado su migración por el gel, al desnaturalizarse por completo (excepto la cola de GC).

Para identificar los microorganismos, estas bandas individuales se pueden recortar, hacer una reamplificación y secuenciar, pasos seguidos en este trabajo. Otro procedimiento que se puede llevar a cabo es el uso de sondas específicas que identifican bandas de interés o bien, realizar un estudio estadístico de la estructura de la comunidad según la posición e intensidad de las bandas.

Además, este DGGE es una técnica, relativamente, rápida y se puede analizar bastantes muestras de una sola vez, por lo que resulta muy útil para analizar muestras temporales y comprobar la dinámica de una población bacteriana.

La principal limitación que presenta el DGGE es la dificultad a la hora de la optimización del gradiente químico. En ocasiones, incluso con el gradiente optimizado, puede darse el caso en el que aparezcan bandas únicas que representen varios organismos distintos, o puede aparecer un microorganismo que genere más de una banda, debido a la existencia de copias de diferentes genes de rRNA en el mismo organismo (Head y *col.*, 1998). Por tanto, la técnica DGGE debe tomarse como una técnica semi-cuantitativa y cualitativa.

La importancia de esta técnica está en que permite la separación de una mezcla heterogénea de genes amplificados por PCR, en un gel de poliacrilamida con un gradiente químico de formamida y urea en concentraciones crecientes en el sentido de la migración electroforética (Muyzer y *col.*, 1993). Las bandas electroforéticas individuales que se resuelven representan aquellos DNAs que han frenado su migración por el gel.

Para conseguir una visión completa de la composición y diversidad de la comunidad microbiana, esta técnica permite recortar las bandas aisladas, reamplificarlas y secuenciarlas. También se puede estudiar el gel completo con el uso de sondas específicas, para identificar bandas de interés (Muyzer y *col.*, 1993), o realizar un estudio estadístico de la estructura de la comunidad según la posición e intensidad de las bandas (Fromin y *col.*, 2002).

Una vez se ha establecido la relación de un cierto organismo con una banda en particular, se puede hacer un buen seguimiento de las fluctuaciones existentes en una población microbiana. Las fluctuaciones poblacionales deben analizarse de forma semi-cuantitativa (cantidades relativas dentro de una misma muestra) debido a las propias limitaciones de la técnica (Head y *col.*, 1998).

Junto con las limitaciones descritas, la técnica encuentra otros inconvenientes tales como la extracción de ácidos nucleicos de las muestras ambientales, como es el caso del DNA del suelo, y, además, en la reacción enzimática de amplificación de los ácidos nucleicos.

En cuanto a la extracción de los ácidos nucleicos, la principal dificultad reside en la extracción, en sí misma. Numerosos estudios no hacen referencia al problema de la eficiencia de extracción (Fuhram y *col.*, 1988; Holben y *col.*, 1988; Tsai y Olson, 1991; Bruce y *col.*, 1992). Para tener una extracción más eficiente se debe recurrir a tratamientos físicos y químicos simultáneos, como la congelación y descongelación, conjuntamente, con el uso de detergentes y enzimas líticos, o la rotura celular por agitación violenta con microesferas de cristal (*bead-beating*), conjuntamente, con un tampón de lisis celular con detergentes (Moré y *col.*, 1994).

Por otro lado, existen limitaciones propias de la reacción enzimática de amplificación del DNA (PCR- *Polimerase Chain Reaction*), que condicionan la interpretación final de los resultados de la diversidad de una comunidad microbiana

(Viñas, 2005a). En determinadas condiciones, se puede producir la amplificación preferente de ciertas moléculas de DNA, aunque se estén usando cebadores universales para los genes de rRNA (Viñas, 2005a). Además, como el número de copias de los genes rRNA en distintos organismos puede oscilar entre 1 a 14 (Young y Cole, 1993; Cole y Girons, 1994), se condiciona la interpretación cuantitativa de librerías de clones y de la electroforesis. También, es posible que se produzca una amplificación preferente de las secuencias más abundantes y pobres en GC, debido a fenómenos de inhibición competitiva de las secuencias menos frecuentes (Ward y col., 1990; Viñas, 2005a) y a una mala separación de las cadenas de DNA de las secuencias ricas en GC durante el paso de desnaturalización (Reysenbach y col., 1992). Hay que destacar, también, que la fidelidad de la Taq Polimerasa empleada en la PCR es variable según la casa comercial y según ésta se pueden incorporar tasas de error que oscilen entre 0.0002 y 1.3% (incorporación errónea de nucleótidos). Esto podría determinar la existencia de un determinado taxón resultante de la baja fidelidad de la enzima (Head y col., 1998). Finalmente, otro de los problemas que pueden surgir en la PCR es la generación de secuencias quiméricas debido a fusiones entre fragmentos con distintas secuencias durante el proceso de amplificación (Liesack y col., 1991). Se estima que hasta un 30% de los productos de PCR pueden ser quiméricos (Wang y Wang, 1996). Para solucionar esto existen programas informáticos online como el *Check Chimera* ubicado en el portal de *Ribosomal Data Project* (Maidak y col., 2000), que permite la identificación de estas quimeras.

1.4.1.3. Determinación del contenido de ergosterol del suelo

El ergosterol es una molécula que juega un papel fundamental en el crecimiento de los hongos (Lees y col., 1995) y, también, de determinadas microalgas (Grant y West, 1986; Newell y col., 1988). De hecho, es un componente de naturaleza lipídica que se encuentra, principalmente, en su estado libre, formando parte de las membranas celulares de los hongos, y, en menor medida, esterificado con ácidos grasos (Martin y col., 1990).

Así, el ergosterol (Figura.18) es el esteroide que predomina en las membranas celulares fúngicas, permitiendo la función adecuada de muchas enzimas unidas a ella, como la quitina sintetasa, responsable de la síntesis de quitina; es por esto, por lo que la molécula de ergosterol favorece el crecimiento y división de los hongos.

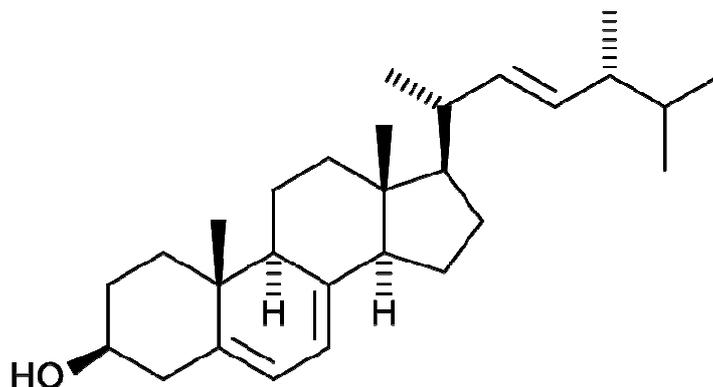


Figura.18: Estructura de la molécula de ergosterol.

La cuantificación de la concentración de ergosterol en el suelo suele emplearse como *bioindicador* de la biomasa fúngica viva (Grant y West, 1986; Frostegard y Baath, 1996). La cantidad de biomasa fúngica se determina mediante un factor de conversión ergosterol-biomasa, obtenido mediante cultivo puro (Antibus y Sinsabaugh, 1993; Gessner y Chauvet, 1993). Estos factores de conversión se han descrito para diferentes tipos de hongos procedentes de distintos ambientes, como son los acuáticos y las ectomicorrizas (Antibus y Sinsabaugh, 1993; Newell, 1994). Sin embargo, este factor aún no se ha estimado para los hongos del suelo. La heterogeneidad de la matriz del suelo, pero, sobre todo, el análisis de la recuperación del ergosterol del suelo determinan que la estimación de este factor sea más problemática.

Generalmente, debido a que la molécula de ergosterol es, rápidamente, degradada tras la muerte celular y porque se asume que el área de la membrana está correlacionada con el volumen de células (Tunlid y White, 1992), los componentes de las membranas celulares, como es el caso del ergosterol, se consideran atractivos indicadores de la biomasa de hongos en muestras ambientales. Además, los esteroides representan un componente bastante estable de la biomasa fúngica (entre 5 y 15 mg/g) en la mayoría de hongos (Weete y Gandhi, 1996).

Sin embargo, hay autores que consideran que la determinación de ergosterol para cuantificar la biomasa fúngica del suelo no es un método adecuado (Olsson y col., 2002). Se basan en el hecho de que la aparición de ergosterol en las

membranas celulares de los hongos se limita a los taxones de hongos más avanzados, mientras que otros esteroides aparecen en grupos de hongos más primitivos (Weete y Gandhi, 1996). Así, es el ergosterol predominante en Ascomycetos y Basidiomycetos, pero en, por ejemplo, otros grupos, como los Glomeromycetos, contienen otros esteroides de forma mayoritaria (Schiessler y *col.*, 2001). Así, del análisis del contenido de diversos grupos de hongos diversos autores, como Olsson y *col.* (2002), concluyeron que el ergosterol no debía emplearse como un bioindicador de la biomasa fúngica, y, que en el caso de ser empleado como indicador, no se puede comparar los resultados entre especies diferentes porque existen diferencias taxonómicas en el contenido de ergosterol.

De cualquier forma, la determinación del contenido total de ergosterol en el suelo suministra información sobre el contenido de hongos en el suelo y puede permitir monitorizar un proceso de bioestimulación, debido al hecho de que este esteroide sólo se presenta en células vivas y, por tanto, activas. La presencia de nutrientes aportados como bioestimulantes microbianos influye sobre el crecimiento de los hongos que emplean estos materiales para su propio crecimiento y desarrollo. Un incremento o, incluso, una disminución del contenido de ergosterol en un suelo bioestimulado es un indicador de la actividad metabólica del suelo.

1.4.2. Bioindicadores específicos

1.4.2.1. Actividades enzimáticas del suelo

La importancia fundamental de la actividad de las enzimas del suelo radica en que el funcionamiento de los ecosistemas terrestres no se puede entender, correctamente, sin la participación de los procesos enzimáticos (Overbeck, 1991), ya que las enzimas determinan la pauta de gran parte de las transformaciones químicas que se producen en el suelo (Stryer, 1995).

En lo referente a la MOS, la mayoría de las transformaciones que afectan al material orgánico en los ecosistemas terrestres son catalizadas por enzimas microbianas producidas por los distintos organismos habitantes del suelo (bacterias, hongos, animales del suelo y el sistema radicular de los vegetales superiores). No obstante, la aportación de cada uno de éstos respecto del contenido enzimático total varía, considerablemente. Globalmente, son las bacterias las que contribuyen de forma mayoritaria, ya que se estima que son responsables de los

procesos de degradación de la MO, aunque los demás organismos y/o exudados radiculares participan, significativamente, en determinadas transformaciones.

Las enzimas del suelo pueden considerarse útiles para monitorizar cambios en la actividad microbiana (Sinsabaugh, 1994), ya que ofrecen información sobre la capacidad potencial del suelo para llevar a cabo reacciones específicas de transformación, importantes en el ciclo de los nutrientes (García y Hernández, 2000; Ros, 2000; Leirós y col., 2000; Trasar-Cepeda y col., 1999).

De entre todas las actividades enzimáticas, son las que están implicadas en el reciclaje de elementos como el C, el N, el P, y el S las que proporcionan mayor información sobre el estado metabólico del suelo y de sus propiedades físico-químicas, y, por tanto, de su calidad (Aon y Colaneri, 2001).

Por otra parte, son indicadores tempranos de cambios en el suelo, que manifiestan una alta capacidad de responder, rápidamente, a las perturbaciones ambientales debido a su alta capacidad de adaptación a las condiciones ambientales y son, relativamente, fáciles y baratas de medir, lo que facilita su aplicación en el laboratorio.

Según su función, las enzimas del suelo más estudiadas son las oxidorreductasas, como son las deshidrogenasas, las catalasas y peroxidasas; y las hidrolasas, como las fosfatasas, las proteasas y las ureasas (Ochoa y col., 2007).

1.4.2.1.a. Actividad deshidrogenasa (ADH):

Las enzimas deshidrogenasas son enzimas oxidorreductasas, implicadas en las reacciones de oxidación, cumpliendo un papel fundamental en las etapas iniciales de la oxidación de la materia orgánica (Tabla.35) (Ross y col, 1971). Son enzimas implicadas en los procesos de fosforilación oxidativa (Figura.19), en los que se producen reacciones de oxido-reducción de sustancias orgánicas, reacciones acopladas a una cadena de transporte de electrones, ligada a su vez, a la producción de ATP y que tiene como aceptor final de estos electrones al oxígeno (en condiciones aeróbicas) (Leningher, 1978).

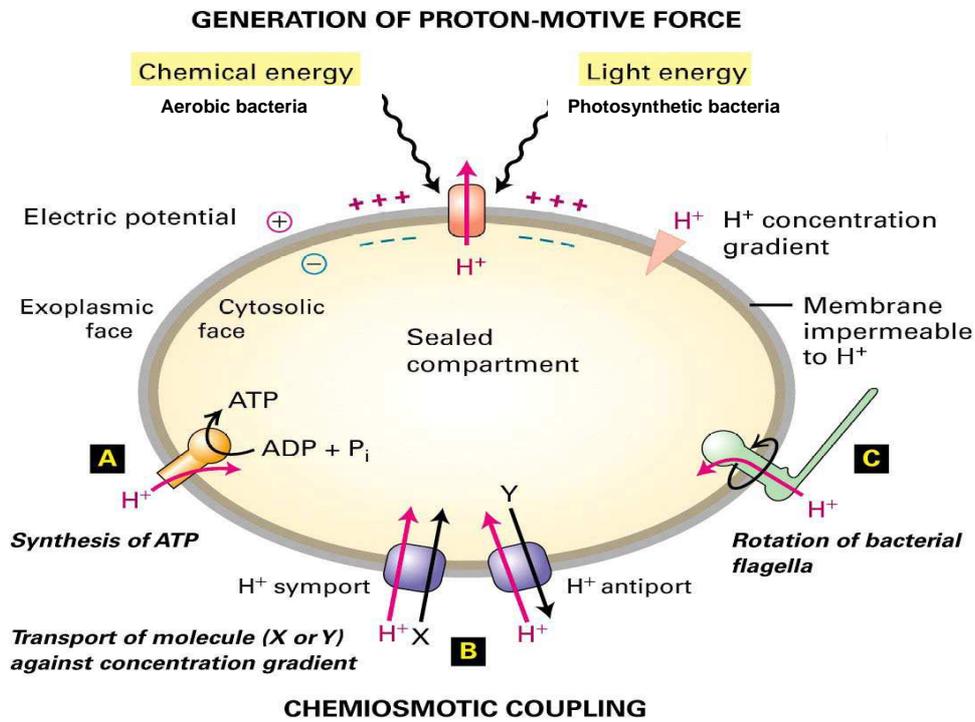


Figura.19: Esquema de la fosforilación oxidativa en procariontas.

Además, las enzimas deshidrogenasas se encuentran en células viables y se considera que proporcionan información sobre la actividad metabólica global de los microorganismos.

Por todo ello, se convierten en buenos indicadores del sistema redox microbiano y, por tanto, un buen indicador de las actividades oxidativas del mismo (Casida, 1977; Nannipieri y *col.*, 1990).

Tabla.35: Enzimas respiratorias y substratos en *E.coli* (Uden G, Bongaerts, J., 1997).

Enzima respiratoria	Par redox	Potencial medio (V)
Formato deshidrogenasa	Bicarbonato / Formato	-0.43
Hidrogenasa	Protón / Hidrógeno	-0.42
NADH deshidrogenasa	NAD ⁺ / NADH	-0.32
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	DHAP / Gli-3-P	-0.19
Piruvato oxidasa	Acetato + Dióxido de carbono / Piruvato	?
Lactato deshidrogenasa	Piruvato / Lactato	-0.19
D-aminoácido deshidrogenasa	2-oxoácido + Amoníaco / D-aminoácido	?
Glucosa deshidrogenasa	Gluconato / Glucosa	-0.14
Succinato deshidrogenasa	Fumarato / Succinato	+0.03
Ubiquinol oxidasa	Oxígeno / Agua	+0.82
Nitrato reductasa	Nitrato / Nitrito	+0.42
Nitrito reductasa	Nitrito / Amoníaco	+0.36
Dimetil sulfóxido reductasa	DMSO / DMS	+0.16
Trimetilamina N-óxido reductasa	TMAO / TMA	+0.13
Fumarato reductasa	Fumarato / Succinato	+0.03

1.4.2.1.b. Actividad fosfatasa (APH):

Las fosfatasas son hidrolasas que, de forma general, están implicadas en reacciones inespecíficas de hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico (Figura.20) (Eivazi y Tabatabai, 1977; Speir y Ross, 1978; García y col., 2003).

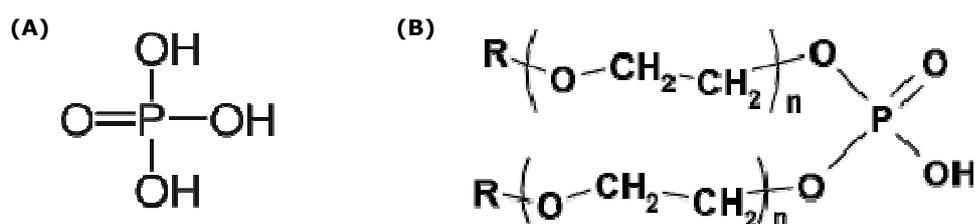


Figura.20: Ácido fosfórico (A) y ésteres del ácido fosfórico (B).

Dentro del grupo de las fosfatasa se incluye una amplia gama de enzimas responsables de catalizar la hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico. Se pueden encontrar (García y col., 2003):

- Fosfatasa que actúan sobre los enlaces tipo éster (E.C. 3.1.):
 - *Monoésterfosfato hidrolasas (E.C. 3.1.3.):* a este grupo pertenecen las fosfomonoesterasas alcalina y ácida (fosfatasa alcalina y ácida). Estas son las enzimas de suelo más estudiadas debido a la sencillez y fiabilidad del método para la determinación de su actividad y, en parte, también, porque hasta un 60% del fósforo orgánico que se ha identificado en el suelo se corresponde con fosfatos de inositol, es decir, con monoésterfosfatos (Halstead y McKercher, 1975; García y col., 2003).
 - *Diésterfosfato hidrolasas (E.C. 3.1.4.)*
 - *Triésterfosfato hidrolasas (E.C. 3.1.8.)*
 - *Difosfato monoéster hidrolasas (E.C. 3.1.7.)*
 - *Trifosfato monoéster hidrolasas (E.C. 3.1.5.)*
- Fosfatasa que actúan sobre los anhídridos ácidos que contengan grupos fosfato, como la adenosíntrifosfatasa y la pirofosfatasa (Speir y Ross, 1978): las pirofosfatasa son enzimas de importancia en el suelo debido a que gran parte de los fertilizantes empleados de forma agrícola son pirofosfatos (Douglas y col., 1976; Dick y Tabatabai, 1978; Baligar y col., 1991; García y

col., 2003). Para que las plantas puedan emplear este P es necesario que se hidrolice el pirofosfato a ortofosfato (Baligar y col., 1991).

No se suele medir esta actividad por la dificultad en encontrar un método fiable para la cuantificación de P inorgánico (Douglas y col., 1976; Dick y Tabatabai, 1978).

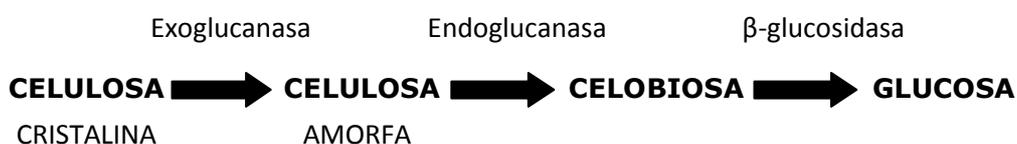
- Fosfatasas que actúan sobre enlaces P-N, como las fosfoamidasa (Eivazi y Tabatabai, 1977).
- Fosfatasas que actúan sobre enlaces C-N, como la fosfonoacetato hidrolasa.

1.4.2.1.c. Actividad β -glucosidasa (AG):

La enzima β -glucosidasa es, al igual que las fosfatasas, una hidrolasa, que cataliza la hidrólisis de β -D-glucopiranosidos.

Este grupo de enzimas que cataliza la hidrólisis de diferentes glucósidos y, al igual que las fosfatasas, también, se clasifica de acuerdo con el tipo de enlace que hidrolizan.

Concretamente, las β -glucosidasas intervienen en la hidrólisis completa de la celulosa (Szegi, 1988), participando en la fase final de su degradación, descomponiendo los derivados de bajo peso molecular acumulados en el suelo, liberando glucosa:



La intervención de la β -glucosidasa resulta decisiva para que se produzca la degradación completa de la celulosa, puesto que en caso contrario, se produciría un aumento de la concentración de celobiosa, que inhibe, precisamente, la acción de exocelulasas y endocelulasas.

Por todo ello, se plantea el uso de esta enzima como bioindicador de la actividad metabólica del suelo debido a su importante papel en la degradación de

los carbohidratos del suelo y al hecho de que los productos de su actividad hidrolítica representa un aporte de energía importante para los microorganismos de los suelos (Tabatabai, 1982; Eivazi y Tabatabai, 1990). Además, esta actividad enzimática está, normalmente, correlacionada con el contenido de C orgánico del suelo.

1.4.2.2 Estimación de la producción y el contenido de ATP en suelo

En los seres vivos se dan reacciones químicas que, o bien, liberan energía (reacciones exergónicas) o bien, absorben energía (reacciones endergónicas). Como ambos tipos de reacciones se producen simultáneamente, se puede decir que existe un continuo trasiego de energía, que es posible gracias a la existencia de moléculas dispuestas a ceder la energía que almacenan en forma de enlaces cuando el organismo la necesite; estas moléculas actúan como un auténtico depósito o almacén de energía.

Esta misión de reserva energética la desempeñan distintos compuestos ricos en energía, siendo el más importante un mononucleótido, concretamente, el adenosíntrifosfato o ATP (Figura.21). Es la molécula que, ordinariamente, sirve para captar la energía liberada por las reacciones exergónicas y para cederla en las reacciones endergónicas. Por esta razón, el ATP ha sido denominado la *moneda* del metabolismo energético.

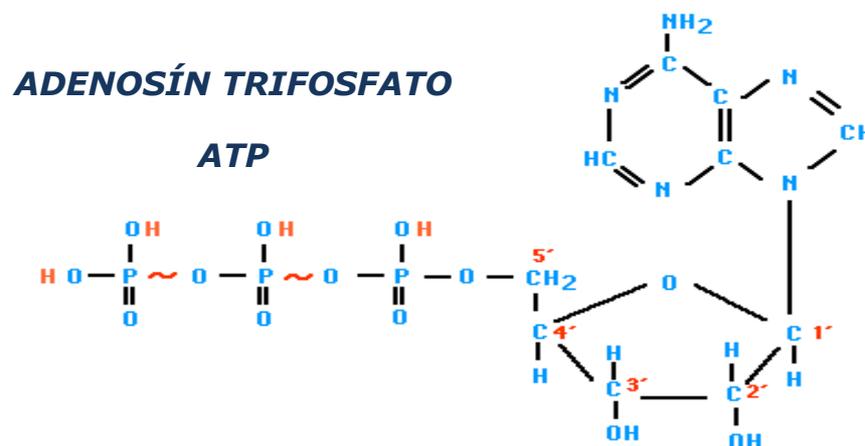


Figura.21: Molécula de ATP.

La molécula de adenosín-5'-trifosfato (ATP) es un componente, altamente, lábil, constituida por una base 6'aminopurina unida por un enlace glucosídico a una molécula de β-D-ribofuranosa. El 5'C de la ribosa está esterificado con 3 grupos fosfatos. Los componentes trifosfato o difosfato de la molécula son inestables debido a que el esqueleto O-P-O-P-O-P está cargado positivamente y repele la nube negativa de O que le rodea. En concreto, el esqueleto de pirofosfato es el que aporta la energía.

Los dos últimos restos de ácido fosfórico están unidos al resto de la molécula por unos enlaces químicos especiales (representados por el signo ~), enlaces de alta energía, responsables de que la molécula de ATP acumule gran cantidad de energía.

La molécula de ATP puede descomponerse y liberar un resto de fosfato y transformarse, así, en *adenosindifosfato* o ADP, o bien liberar dos restos de fosfato, dando lugar a una molécula de *adenosinmonofosfato* o AMP. Estas transformaciones liberan una gran cantidad de energía, almacenada en los enlaces. En el metabolismo celular es muy frecuente la transformación de ATP en ADP, con liberación de energía, pero, además, en muchas reacciones en las que se libera energía, parte de ésta se almacena en forma de ATP al estar acopladas esas reacciones exergónicas a la reacción:



En suelos, los complejos orgánicos, enzimas y componentes inorgánicos promueven la hidrólisis de ATP extracelular, de forma que, este ATP es, rápidamente, hidrolizado si procede de células muertas (Webster y col., 1984). Otras veces, el sistema ATP \longrightarrow ADP se utiliza para traspasar el resto fosfato terminal del ATP a otra molécula, que entonces queda fosforilada y al mismo tiempo dotada de energía.

La molécula de ATP ha sido propuesta, desde hace tiempo, como parámetro capaz de determinar la biomasa microbiana en sedimentos y suelos (Lee y col., 1971; Oades y Jenkinson, 1979; Fairbanks y col., 1984; Lin y Brookes, 1996). Sin embargo, autores como Eiland, 1985 y Nannipieri y col., 1990, consideran que más que una medida para cuantificar la biomasa, es una medida de la actividad

microbiológica en suelo, de forma que, sólo el contenido de ATP determinado, inmediatamente, después de muestrear un suelo, a la temperatura ambiente de dicho suelo y con su humedad representaría la biomasa microbiana activa del suelo en dichas condiciones de campo.

Al considerarse un buen indicador de la actividad microbiana del suelo, se convierte en un indicador adecuado de la evolución del proceso de bioestimulación y, por extensión, de la calidad y la fertilidad del suelo. Los niveles de ATP en el suelo responden a cambios, incluso leves y sutiles, de las distintas variables ambientales en muy corto período de tiempo, minutos incluso. Este incremento se ha atribuido, habitualmente, a la síntesis de nueva biomasa microbiana (Brookes y *col.*, 1983; Sparling y *col.*, 1986). Los métodos de detección de estos niveles de ATP son eficaces a la hora de detectar estos cambios leves de concentración y es, por esto, por lo que cada vez más el ATP del suelo y su medición se usan para monitorizar el impacto del entorno en la microflora edáfica y en sus procesos bioquímicos (Contin y *col.*, 2000; Dilly y Nannipieri, 2001; Shannon y *col.*, 2002).

Una de las principales desventajas de este parámetro es la específica estructura del ATP, que se altera durante el proceso de extracción del suelo, fundamental, para su cuantificación. Esto es debido a que la porción polifosfato puede interaccionar con iones metálicos y, también, con sitios específicos que unen fosfato. Como la mayor parte de la molécula tiene propiedades básicas, mientras que la porción fosfato es ácida, se pueden producir ciertas interacciones (puentes de hidrógenos) que dificultan la extracción eficiente. La adsorción de ATP en suelo se encuentra, positivamente, correlacionada con el contenido de MO (Leytem y *col.*, 2002). La fuerte adsorción de ATP al suelo da como resultado menores rendimientos en la extracción inicial (Martens, 2001; Contin y *col.*, 2002). Este ATP restante, que aún permanece en el suelo retenido puede afectar, considerablemente, a la exactitud de la estimación de ATP, por lo que se suele usar una corrección de recuperación. Sin embargo, en la mayoría de situaciones, basta con realizar una estimación no cuantitativa, sino más bien comparativa de la evolución del comportamiento de los microorganismos del suelo y su metabolismo.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Los objetivos de esta fase del trabajo son los siguientes:

1. El estudio (en microcosmos) del efecto biofertilizante/bioestimulante de los hidrolizados proteicos (producidos por hidrólisis enzimática en la fase anterior) aplicados a un suelo modelo experimental.
2. El desarrollo de un modelo de monitorización del proceso de bioestimulación, basado en la selección y el estudio de diversos parámetros o bioindicadores bioquímicos y biológicos.
3. El estudio del efecto de la modificación de las propiedades físicas (tamaño molecular) de las proteínas de los SOA en el potencial bioestimulante de los hidrolizados enzimáticos.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Suelo experimental

El estudio de evaluación del potencial bioestimulante de los BSE, WCDS-HE y CGHE, se desarrolló sobre un suelo modelo experimental, clasificado como un Antrosol plágico (FAO, 1999), que fue recogido de una parcela experimental, perteneciente a la Escuela Universitaria de Ingenieros Técnicos Agrícolas (EUITA) de la Universidad de Sevilla, localizada en las instalaciones próximas a la escuela, en la Carretera de Utrera km. 1., Sevilla.

Imagen.21: Parcela experimental de la Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola. (EUITA)



3.2. Caracterización físico-química del suelo experimental

3.2.1. Determinación del pH

La determinación del pH en suelo se ha realizado según el método de la pasta saturada en una suspensión de suelo:agua (MAPA, 1986) en proporción 1:2.5 (p/v).

Para ello, se resuspendieron 10 g de suelo en 25 ml de agua. Posteriormente, se agitó la mezcla durante 40 minutos y se midió el pH con un pHmetro Micro-pH 2000 (Crison).

3.2.2. Determinación de carbonatos totales

Para la determinación de carbonatos totales se ha empleado el método calcímetro de Bernard (MAPA, 1986).

Según este método, los carbonatos de la muestra se trataron con una solución de ácido clorhídrico al 50% (v/v) en un dispositivo cerrado a presión y temperatura constante. El incremento del volumen de la solución obtenido es una medida directa del CO₂ producido.

3.2.3. Determinación de carbono orgánico total (COT)

El COT se ha cuantificado por el método de combustión seca (MAPA, 1986).

Previamente a la determinación de COT, se eliminaron los carbonatos de la muestra de suelo mediante acidificación (**3.2.2. Determinación de carbonatos totales**).

A pH 7.5-8, se añadió MgO (en mufla a 900 °C durante 30 minutos y conservado en un desecador con silicagel y NaOH como trampa de CO₂), y se dejó secar a 60°C. Posteriormente, mediante combustión, se ha determinado el COT resultante.

3.2.4. Determinación de MO

La MO se ha cuantificado, también, por el método de combustión seca (MAPA, 1986).

Eliminados los carbonatos de la muestra de suelo mediante acidificación (MAPA, 1986), a las muestras se les ajustó el pH a 7.5-8 mediante la adición de MgO (previamente muflado a 900 °C durante 30 minutos y conservado en un desecador con silicagel y NaOH como trampa de CO₂), y se dejó secar a 60°C; mediante combustión, se ha determinado la MO resultante.

3.2.5. Determinación de la textura del suelo

Para determinar la textura del suelo experimental se ha empleado la metodología basada en la diferencia entre las velocidades de sedimentación del particulado constituyente del suelo, según los criterios establecidos por la ley de Stokes.

Para ello, primero se eliminó la MO presente mezclando 20 gramos de suelo, tamizado por 2 mm, con 50 ml de H₂O₂ en una botella de cristal de 1.000 ml de capacidad y se dejó reposar la mezcla hasta que la efervescencia desapareció. Posteriormente, se añadieron 40 ml de un agente dispersante, como (NaPO₃)₆ 1N, y sonicó en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos, para disgregar el particulado. A continuación, el contenido se depositó en una probeta y se enrasó a un volumen final de 1 litro, con agua desionizada. Se dejó sedimentar y se recogieron volúmenes de 5 ml de la suspensión a 5 cm de la superficie en diferentes momentos, según la ley de Stokes.

3.2.6. Determinación de nitrógeno total

La determinación del nitrógeno total se ha realizado mediante el método Kjeldahl (MAPA, 1986).

Según este método, a 0.5 gramos de muestra de suelo se le añadieron 10 ml H₂SO₄ y 10 ml de H₂O₂ al 33% (v/v), para su digestión. Se dejó reposar durante 30 minutos y, tras este tiempo, se calentó a 420°C. Tras esta digestión, se dejó enfriar y se añadieron 50 ml de agua desionizada. De esta manera, el nitrógeno contenido en la muestra se convirtió en amonio sulfato, de forma que, en presencia de 50 ml de NaOH 10N, los iones amonio se liberaron en forma de amoníaco por destilación y éste se recogió sobre ácido bórico. Finalmente, el amoníaco recogido se valoró con H₂SO₄ 0.05N hasta que tuvo lugar el viraje de color (a rosa).

3.2.7. Determinación de fósforo

La determinación de fósforo se ha llevado a cabo mediante el método Olsen (MAPA, 1986). En este método se emplea como solución extractora el NaHCO₃, que separa de los fosfatos, el calcio como carbonato, dejando el fósforo en solución.

Para ello, a 1 gramo de suelo se le añadieron 20 ml de una solución de bicarbonato sódico (NaHCO_3) 0.5N y se dejó en agitación durante 30 minutos. Posteriormente, se filtró sobre papel de Watman nº40, obteniéndose un filtrado transparente.

Para la determinación analítica, a 2 ml del filtrado se añadieron 20 ml de una solución de molibdato de amonio y ácido ascórbico (2:1). La mezcla se dejó reposar y se midió la coloración en fotocolorímetro con filtro rojo a una longitud de onda de 882 nm.

3.2.8. Determinación de potasio asimilable

El potasio asimilable del suelo se ha determinado por fotometría de llama (MAPA, 1986).

Para ello, se emplearon 10 gramos de suelo, a los que se les añadieron 25 ml de una solución de extracción de acetato amónico 1M, pH 7. Se agitó la mezcla durante 10 minutos y, posteriormente, se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos. La medida en el fotómetro de llama se realizó a una longitud de onda de 766 nm.

3.2.9. Determinación de metales

El contenido en metales se ha determinado por espectrometría de emisión atómica y de plasma ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry), empleando para ello un equipo multielemento secuencial Fisons-ARL 3410, provisto de un sistema de control y adquisición de datos.

Las condiciones de operación estándar de este equipo que se emplearon fueron las siguientes:

1. El gas de transporte, el gas refrigerante y el gas plasma fue argón, a 80 psi de presión.
2. La velocidad de flujo del gas de transporte fue 0.8 l/min, la del gas refrigerante, 7.5 l/min y la del gas plasma, 0.8 l/min.

3. El tiempo de integración fue 1 segundo. Una miniantorcha consumió gas argón a una potencia de radiofrecuencia de 650 W.

3.3. Diseño experimental

Se realizaron dos ensayos de bioestimulación. En el primer estudio preliminar se aplicaron, como materias orgánicas, los BSE obtenidos por hidrólisis enzimática, WCDS-HE y CGHE. Las dosis de trabajo fueron: 0.04%, 0.2%, 1% y 5% (p/v) de materia orgánica.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- **CONTROL:** suelo control sin adición de materia orgánica
- **WCDS-HE 0.04:** WCDS-HE, dosis 0.04% (p/v)
- **WCDS-HE 0.2:** WCDS-HE, dosis 0.2% (p/v)
- **WCDS-HE 1:** WCDS-HE, dosis 1% (p/v)
- **WCDS-HE 5:** WCDS-HE, dosis 5% (p/v)
- **CGHE 0.04:** CGHE, dosis 0.04% (p/v)
- **CGHE 0.2:** CGHE, dosis 0.2% (p/v)
- **CGHE 1:** CGHE, dosis 1% (p/v)
- **CGHE 5:** CGHE, dosis 5% (p/v).

Los microcosmos de ensayo se prepararon empleando botes de plástico de 250 ml de capacidad, a los que se les añadieron 200 gramos de suelo seco. Los bioestimulantes se pesaron y se disolvieron en la cantidad de agua necesaria para mantener en el suelo una capacidad del 60% (WHC). A los controles se les añadió la cantidad de agua para mantener la misma capacidad de campo. Dicha humedad se mantuvo a lo largo de todo el período de incubación mediante pequeños riegos.

Se realizaron muestreos a las 24 horas, 48 horas, 4 días, 7 días, 10 días, 14 días y, finalmente, a los 25 días. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su análisis.

En el segundo estudio de bioestimulación se aplicaron, como materias orgánicas, los siguientes bioestimulantes: WCDS y los BSE obtenidos por hidrólisis enzimática, WCDS-HE y CGHE. Las dosis de trabajo fueron: 0.2% y 1% (p/v) de materia orgánica.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- **CONTROL:** suelo control sin adición de materia orgánica
- **WCDS-HE 0.2:** WCDS-HE, dosis 0.2% (p/v)
- **WCDS-HE 1:** WCDS-HE, dosis 1% (p/v)
- **CGHE 0.2:** CGHE, dosis 0.2% (p/v)
- **CGHE 1:** CGHE, dosis 1% (p/v)

Como en el caso anterior, los microcosmos de ensayo se prepararon empleando botes de plástico de 250 ml de capacidad, a los que se les añadieron 200 gramos de suelo seco. Los bioestimulantes se pesaron y se disolvieron en la cantidad de agua necesaria para mantener en el suelo una capacidad del 60% (WHC). A los controles se les añadió la cantidad de agua para mantener la misma capacidad de campo. La humedad se mantuvo a lo largo de todo el período de ensayo.

Se realizaron muestreos a las 24 horas, 48 horas, 4 días, 7 días, 10 días, 14 días y, finalmente, a los 25 días, y las muestras se mantuvieron en congelación (-20°C) hasta su, posterior, análisis.

3.4. Ensayos de ecotoxicidad: Ensayo Microtox®

La determinación de la toxicidad aguda de los BSE se llevó a cabo mediante el test de Microtox® Solid Phase Test (SPT), desarrollado por Azur Environmental Inc. (Carlsbad, EE.UU.).

Este método se basa en monitorizar los cambios en las emisiones de luz natural de una bacteria luminiscente (Aruldoss y Viraraghavan, 1998), como es *Vibrio fischeri*, cuando esté en contacto con una muestra. Implica la determinación de la concentración efectiva media (EC_{50}), aquella concentración de una muestra que produce una disminución del 50% de la emisión de luz original de *V. fischeri*.

Para el desarrollo de este ensayo, se reconstituyeron, previamente, los liofilizados comerciales de *Vibrio fischeri*, siguiendo las instrucciones del fabricante y se incubaron a 15°C durante 30 minutos frente a un banco de diluciones de los BSE o de los lixiviados de suelo. Los lixiviados de BSE del suelo se obtuvieron de acuerdo con el protocolo de Microtox® Solid Phase Test (SPT), según las instrucciones del fabricante. Así, 7 g de suelo bioestimulado se resuspendieron en

35 ml de NaCl 3.4% (p/v) y se agitaron durante 10 minutos. A continuación, se centrifugaron a 5.500 rpm durante 10 minutos y, con el sobrenadante, se realizó un banco de diluciones seriadas con NaCl 3.5% (p/v). Los BSE se diluyeron formando, igualmente, un banco de diluciones seriadas (Tabla.36)

Las medidas de emisión de luz se realizaron en un luminómetro. La toxicidad y el valor de EC₅₀ se expresan en mg/ml.

Tabla.36: Muestras y diluciones para el ensayo Microtox® Solid Phase Test (SPT).

	I	II	III	IV	V	VI
Muestras	Blanco	1/16	1/8	1/4	1/2	Muestra Original
Diluciones	100 µl de bacterias + 100 µl de blanco	100 µl de bacterias + 100 µl de muestra 1/16	100 µl de bacterias + 100 µl de muestra 1/8	100 µl de bacterias + 100 µl de muestra 1/4	100 µl de bacterias + 100 µl de muestra 1/2	100 µl de bacterias + 100 µl de muestra sin diluir

3.5. Cuantificación de aerobios totales, hongos y levaduras

El número de de aerobios, hongos y levaduras se expresa como unidades formadoras de colonias (ufc) por área de placa y, en esta memoria, vienen referidos a gramos de suelo de muestra.

3.5.1. Cultivo de aerobios totales

Las muestras para el estudio de microorganismos aerobios fueron sembradas en placas tipo "Rodac-PCA" (*Replicate Organism Direct Agar Contact-Plate Count Agar*) e incubadas en estufa durante 48 horas a 30°C, período tras el cual se realizó el recuento final, directamente, en placa.

3.5.2. Cultivo de hongos y levaduras

Para el recuento de hongos y levaduras se emplearon placas tipo "Rodac", pero el medio de cultivo empleado para su crecimiento fue agar con rosa de bengala y cloranfenicol. La presencia de rosa de bengala inhibe el crecimiento bacteriano y restringe el tamaño de los hongos, evitando el solapamiento de colonias de lento crecimiento con las que crecen más rápidamente. La presencia de cloranfenicol favorece la inhibición bacteriana.

3.6. Estudio de la biodiversidad genética microbiana

Para estudiar la evolución de la población microbiana en los diferentes tratamientos de bioestimulación y biofertilización mediante técnicas independientes de cultivo, se ha empleado la técnica de la electroforesis en gradiente desnaturante (DGGE) de productos de PCR que codifican genes 16S rRNA del DNA total del suelo.

Para ello, fue necesario, en primer lugar, la extracción del DNA genómico del suelo; en segundo lugar, la amplificación por PCR de los genes 16S rRNA y, finalmente, la visualización por DGGE de los diferentes fragmentos de genes 16S rRNA amplificados. Posteriormente, se purificaron y se amplificaron de nuevo las bandas (fragmentos de DNA) de DGGE predominantes y se secuenciaron.

3.6.1. Extracción de DNA

Para la extracción se siguieron las instrucciones del kit de aislamiento de DNA de suelo UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc., EE.UU).

El protocolo seguido se basa en el método *bead-beating*, que consiste, inicialmente, en la acción combinada de un proceso de lisis química, mediante el detergente SDS, y una lisis mecánica con micro-esferas de zirconio (0.5 mm de diámetro), mediante agitación vigorosa por vórtex.

Este kit, además, permite la eliminación de posibles inhibidores de PCR presentes en el suelo, tales como son los ácidos húmicos. Brevemente, este paso comprende la precipitación de los compuestos que pueden inhibir la acción de la polimerasa en una reacción posterior de PCR.

El procedimiento de extracción que se ha seguido en este trabajo se ha aplicado a las muestras tomadas los días 0 y 25 de incubación, que se encontraban congeladas a -20°C desde el día de muestreo.

Por etapas, el protocolo de extracción fue el siguiente:

1. Dispersión del suelo (bead-beating): 0.5 g de suelo se añadieron a un vial con microesferas de zirconio. Este paso consistió en una agitación mecánica de la muestras de suelo en contacto con microesferas de zirconio. El objetivo era la dispersión de las partículas de suelo y la disolución de los ácidos húmicos.
2. Ruptura celular: en el mismo vial, se les añadieron a la muestras 60 µl de una solución que contenía SDS como detergente (S1), con el fin de producir la ruptura de las membranas celulares y la liberación del DNA.
3. Eliminación de los inhibidores de la PCR: además de S1, al DNA se le añadieron 200 µl de una solución IRS (Inhibitor Removal Solution) para la precipitación de los ácidos húmicos y otros compuestos, inhibidores de la PCR, debido a que el DNA extraído era destinado a la realización de PCR.
4. Lisis: este es el paso conjunto de lisis mecánica y química. Consistió en una agitación a máxima velocidad en un vórtex, durante al menos 10 minutos, con el fin de lograr una máxima ruptura celular y obtener máximos rendimientos. Tras la lisis, se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm durante 1 minuto, para separar el suelo y las microesferas, y así, recoger la fracción con el DNA extraído.
5. Precipitación de proteínas: este paso, como los posteriores pasos, es un paso de purificación del DNA extraído. En este caso, mediante la adición de 250 µl de una solución de precipitación (S2) y el efecto de la temperatura de incubación (4°C), se logró precipitar proteínas en 10-15 minutos, aumentando así la pureza del DNA. Una vez precipitadas las proteínas, se volvieron a centrifugar las muestras a 10.000 rpm durante 1 minuto.
6. Unión de DNA a filtro de sílica: al sobrenadante obtenido se le añadieron 1.300 µl de una solución rica en sales (S3) para lograr la unión del DNA al

filtro. Así, 700 μ l de la solución de DNA se cargaron sobre filtros de sílica (al menos, se requería 3 repeticiones de este paso), para su unión al filtro. Tras cada carga, se procedió centrifugando las muestras a 10.000 rpm, durante 30 segundos.

7. Lavado: una vez unido el DNA al filtro, en esta fase se realizó el lavado de residuos de sales, ácidos húmicos y otros agentes químicos, mediante la adición de 300 μ l de una solución de etanol (S4). Este lavado iba seguido de un paso de centrifugación, para desechar el etanol. Este paso de lavado se repitió una vez más, por muestra, para lavar aún más. Además, para evitar arrastrar restos de etanol, tras la segunda centrifugación y la retirada del etanol filtrado, se procedió centrifugando de nuevo, esta vez sin volver a añadir S4. Posteriormente, el filtro se depositó en un nuevo tubo Eppendorff, evitando arrastrar cualquier resto de etanol.
8. Dilución de DNA: se añadieron al centro del filtro, con el DNA unido y ya lavado, 50 μ l de un tampón Tris 10mM, pH 8. Finalmente, se centrifugaron las muestras y se descartó, en este paso final, el filtro de cada una.

3.6.2. Cuantificación de DNA extraído

Para conocer la cantidad de DNA extraído del suelo se determinó la concentración de DNA mediante espectrofotometría.

Mediante el empleo de un espectrofotómetro se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm. Para la medida, se empleó como blanco el tampón Tris 10mM pH 8, en el que se disolvió el DNA extraído. Una vez, establecido el blanco, se agregaron 50 μ l de muestra en la cubeta de espectrofotometría y se realizó la lectura. El equipo permitió evaluar la concentración de DNA mediante la relación Abs_{260nm}/Abs_{280nm} . Hay que señalar que la relación Abs_{260nm}/Abs_{280nm} no es lineal, por lo que puede llevar a lecturas erróneas.

3.6.4. Visualización de productos de PCR

La visualización de los productos de PCR se llevó a cabo mediante un análisis electroforético en geles de agarosa (Tabla.39), a una concentración del 2% (p/v), en tampón TBE 1X. Antes de cargar las muestras, se les añadió tampón de carga 1X final. Junto con los productos amplificados se cargan marcadores de tamaño molecular, para conocer si el fragmento amplificado tiene el tamaño esperado (500-600 pb). El rango de estos marcadores de tamaño (10 marcadores) va desde 100 a 1.000 pb.

Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas horizontales (BioRad), empleando una fuente de alimentación Power-Pac 300 (BioRad), a 180-190 V en tampón TBE 0.5X. Finalmente, los productos de PCR se observaron mediante transiluminación de los geles con luz ultravioleta.

Tabla.39: Composición de los geles de agarosa (2%, p/v).

Gel de agarosa	2%, (p/v)
Agarosa	4.8 g
TBE 1X	230 ml
Bromuro de Etidio (10mg/ml)	10 µl

3.6.5. Electroforesis en geles de gradiente químico desnaturizante (DGGE)

Se realizó el DGGE a partir de los productos PCR de los genes 16S rRNA del DNA total del suelo. Estos productos, previamente, fueron secados, en su totalidad, en un concentrador de vacío (Savant) y luego, resuspendidos en 10-20 µl tampón de carga 2X Gel Loading Dye (BioRad).

Por cada muestra, se usaron entre 500-800 ng de producto de PCR, cuantificados, previamente, con el marcador Low DNA Mass Ladder y se cargaron en geles al 6% de poliacrilamida/bis-acrilamida (37.5:1), de 1 mm de grosor, con un gradiente desnaturizante de formamida-urea óptimo establecido en el rango 40-60% (100% desnaturizante: urea 7M y 40% (p/v) de formamida)

Tabla.40: Soluciones desnaturalizantes de urea-formamida empleadas para DGGE.

Sol. Desnaturalizante 40%		Sol. Desnaturalizante 60%	
Acrilamida/Bis	3 ml	Acrilamida/Bis	3 ml
TAE 50x	0.400 ml	TAE 50x	0.400 ml
Formamida	3.2 ml	Formamida	4.8 ml
Urea	3.36 g	Urea	5.04 g
H₂O	hasta 20	H₂O	hasta 20 ml

Los geles se prepararon a partir de las soluciones descritas en las Tabla.40. La formamida empleada fue desionizada, previamente, mezclando 100 ml de formamida con 10 g de resina (MTO-Amberlite MB-1, Supelco) durante 1 hora en agitación magnética. Posteriormente, se filtró, por vacío con filtros de celulosa de 0.2 μm de diámetro de poro.

Una vez preparadas las dos soluciones desnaturalizantes, se procedió a la construcción del gel de poliacrilamida y del gradiente desnaturalizante, empleando el soporte vertical del sistema DCode™ Universal Mutation Detection System (BioRad), y, mediante el empleo de una bomba peristáltica y unos vasos comunicantes. Justo antes de ser añadidas las dos soluciones desnaturalizante a los vasos mezcladores, se les añadió 18 μl de TEMED (Sigma-Aldrich) y 180 μl de APS 10% (p/v) (Biorad), como agentes polimerizantes. Los tubos de las soluciones se agitaron por inversión y se mantuvieron en frío para retrasar la polimerización.

La combinación de ambas soluciones en los vasos comunicantes, en agitación por muesca magnética, acoplados a la bomba peristáltica de salida, permitió la carga de la acrilamida con el gradiente lineal deseado de urea-formamida en los cristales del soporte vertical. Una vez enrasado el volumen con los cristales, se colocó el peine formador de pocillos de carga y se dejó polimerizar, al menos, durante 1 hora, a temperatura ambiente (25-26°C). Tras este período de tiempo, se retiraron los peines y se limpiaron los pocillos de restos de acrilamida polimerizada.

La electroforesis se realizó usando el equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (BioRAD Laboratories), a 100V, empleando, para ello, una fuente de alimentación Power-Pac 300 (BioRad), en tampón TAE 1X. La temperatura del

tanque de electroforesis (7 litros de tampón TAE 1X) fue de 60°C y transcurrió durante durante 16 horas.

3.6.6. Tinción y visualización de geles de DGGE

La tinción de los geles y su visualización se llevó a cabo utilizando una solución de BrEt (10 mg/ml). Para ello, se mezclaron 250 ml de tampón TAE 1X y se le añadieron 25 µl de la solución de BrEt. Sobre esta solución, dispuesta en una bandeja, se depositaron los geles para su tinción, durante 5, 10 y/o 20 minutos. Posteriormente, se lavaban los geles con agua destilada en una nueva bandeja, durante 30 ó 40 minutos.

Los geles se visualizaron por transiluminación en UV y se fotografiaron en un equipo transiluminador automático con procesador de imagen (Imagen.21. GelDoc™ 2000, BioRad). Directamente, las fotografías tomadas se digitalizaron y se analizaron mediante el software Quantity One 4.1. (BioRad).

Imagen.22: Gel Doc™ 2000 Gel Documentation System (BioRad)



3.6.7. Escisión y análisis de bandas de DGGE

Las bandas que se visualizaron más predominantes se recortaron para su estudio. Para ello, se empleó un bisturí estéril, lavado con etanol, previamente a cada corte. Estas bandas recortadas se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

Para extraer el DNA de las bandas de acrilamida, una vez cortadas las bandas, éstas fueron lavadas con 100 µl H₂O Milli-Q, al menos 2 veces. Una vez lavadas, se procedió a su incubación a 37°C en tampón de extracción formado por una solución de acetato amónico 0.5M, EDTA 1mM, pH 8, durante toda la noche.

Posteriormente, con una punta de pipeta estéril y muy fina, se retiraron los restos de acrilamida y, a continuación, se procedió con la precipitación del DNA extraído. Para ello, se le añadieron 100 µl de H₂O Milli-Q, 20 µl de NaCl 5M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, previamente enfriado. Para la precipitación del DNA en estas condiciones salinas, se incubaron las muestras a -80°C, durante 2 horas. Tras este tiempo, los pasos siguientes consistieron en el lavado del DNA. Así, las muestras se centrifugaron 20 minutos a 10.000 rpm y, posteriormente, los *pellets* resultantes se lavaron con etanol frío al 70% (v/v), y se repitió el paso de la centrifugación. Finalmente, los sobrenadantes se retiraron. El pequeño volumen de etanol restante se dejó secar a temperatura ambiente. El DNA precipitado se resuspendió en 20 µl de H₂O Milli-Q.

Una vez extraído el DNA de cada banda recortada, se realizó una reamplificación por PCR con los mismos cebadores F341-GC y R907 (Tabla.39) y el mismo programa de PCR (Tabla.40). Los productos de PCR reamplificados se purificaron mediante un kit de purificación (Qiagen) siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial y posteriormente, se secuenciaron con los mismos cebadores.

3.7. Determinación del contenido de ergosterol en el suelo

Para la determinación del contenido de ergosterol de un suelo se ha empleado el método descrito por Djajakirana y *col.*, 1996. Durante todo el proceso de extracción y de determinación de la molécula de ergosterol las muestras se mantuvieron en oscuridad.

3.7.1. Extracción de ergosterol del suelo

Para la extracción de ergosterol se han empleado 2 gramos de suelo fresco. Inicialmente, a cada muestra se le añadieron 40 ml de etanol absoluto (HPLC grade). A continuación, las muestras se agitaron en noria rotatoria durante 1 hora, y, posteriormente, se centrifugaron durante 30 minutos a 5.000 rpm.

El extracto líquido resultante se trasvasó a un matraz de fondo redondo y boca esmerilada para su concentración hasta sequedad en rotavapor a 50°C y 1 bar de presión.

El extracto secado de cada muestra se disolvió en 1ml de metanol (HPLC grade). El contenido disuelto se tomó con la ayuda de una pipeta y se filtró (filtro de celulosa-acetato de 0,45 µm). Los filtrados se recogieron sobre un vial oscuro para su conservación bajo refrigeración a 4°C (hasta dos semanas).

Para valorar el porcentaje de extracción se añadió a las muestras de ergosterol una solución estándar de ergosterol (25 µg/ml) y el porcentaje de recuperación fue del 88%-93%.

3.7.2. Medida del contenido de ergosterol del suelo

La concentración de ergosterol fue determinada mediante análisis cromatográfico, usando un equipo de FPLC (Äkta Purifier, GE Healthcare). Para ello, se empleó una columna C18 de fase reversa, una Nova Pak C18 (Waters Corp., EE.UU.).

Las condiciones de la cromatografía fueron:

- Tampón de elución: la separación del ergosterol se produjo, de forma isocrática, con metanol (HPLC Grade) al 100% como fase móvil, filtrado y degasificado por sonicación en baño de ultrasonidos, durante 15 minutos, previamente.
- Flujo: 1 ml/min
- Longitud de onda de absorción: 282 nm
- Volumen de inyección: 50 µl
- Volumen de elución: 2 volúmenes de columna (VC)
- Filtración de muestras: filtros Minisart RC 4 de 0.2 µm de diámetro de poro (Sartorius AG).

3.7.3. Cálculos

Para la determinación de la concentración de ergosterol de las muestras de suelo se realizó una curva de calibración con patrones de ergosterol (Tabla.41).

Mediante la recta obtenida (Figura.22) se puede calcular la concentración de ergosterol por muestra mediante la integración del área comprendida bajo el pico de señal del cromatograma obtenido por cada muestra.

Tabla.41. Patrones de ergosterol y áreas cromatográficas.

Patrones (μM)	Área de integración (mAU/ml)
1	86.27 \pm 26.34
2.5	147.92 \pm 43.32
5	260.41 \pm 57.32
7.5	374.08 \pm 57.52
12.5	547.73 \pm 35.44
25	998.41 \pm 33.12

$$(\text{Concentración ERG})_{\text{inyectada}} (\mu\text{M}) = \frac{(\text{Área} - 65.55)}{377.8} \quad (\text{A})$$

$$(\text{Contenido de ERG}) (\mu\text{g ERG/g suelo}) = \left[\frac{(\text{A}) \times 306.3}{2} \right] \times 1000$$

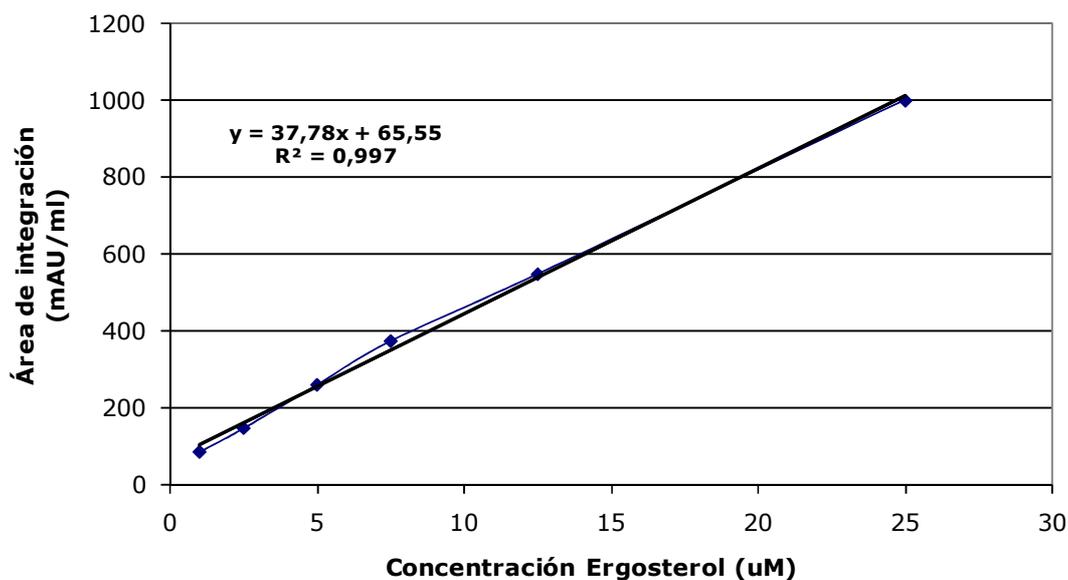


Figura.22: Recta de calibración de patrones de ergosterol. Columna de Fase Reversa C18 Nova Pak C18 (Waters Corp.).

3.8. Determinación de actividades enzimáticas del suelo

De todas las actividades que pueden contribuir al aporte de información sobre los distintos aspectos relacionados con el proceso de bioestimulación microbiana, las que se han seleccionado como más útiles a la hora de monitorizar los cambios en la actividad metabólica del suelo son: la *actividad deshidrogenasa*, la *actividad fosfatasa (ácida)* y la *actividad β-glucosidasa*.

La importancia de estas enzimas radica en que ofrecen información sobre la capacidad potencial del suelo para llevar a cabo reacciones específicas, las cuales son importantes en el ciclo de nutrientes (García y Hernández, 2000; Ros, 2000; Leirós y col., 2000; Trasar-Cepeda y col., 1990).

3.8.1. Actividad deshidrogenasa (ADH)

La actividad deshidrogenasa ha sido determinada mediante una modificación del método establecido por Trevors y col., 1982, a su vez, modificado por García y col., 1993. En nuestro grupo de investigación se han llevado a cabo algunos cambios del método, que han sido empleadas en el desarrollo de la determinación de la actividad (García-Martínez, A.M., Rodríguez-Morgado, B., Tejada, M., Parrado,

J, 2009. *Succinate dehydrogenase activity in soil: a fast and reliable method to asses the soil biological activity*. Applied Soil Ecology. Enviado)

Este método esta basado en el uso de sales solubles de tetrazolio como aceptores artificiales de electrones. En este caso, se ha empleado como sustrato el 2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazolio cloruro (INT). Cuando estas sales se reducen dan lugar a un producto de color rojo-anaranjado, el *p*-iodonitrotetrazolio formazano (INTF), cuya concentración puede determinarse por colorimetría después de su extracción, usando, para ello, un solvente orgánico (Trevors, 1984a; Trevors, 1984b; von Mersi y Schinner, 1991).



La modificación que se ha incluido es la adición de un sustrato específico de la enzima, el succinato. Las deshidrogenasas catalizan, estereoespecíficamente, la deshidrogenación en trans del ácido succínico hasta ácido fumárico, quedando esta reacción inhibida por malonato y maleato, que son análogos estructurales del succinato (Figura.23)

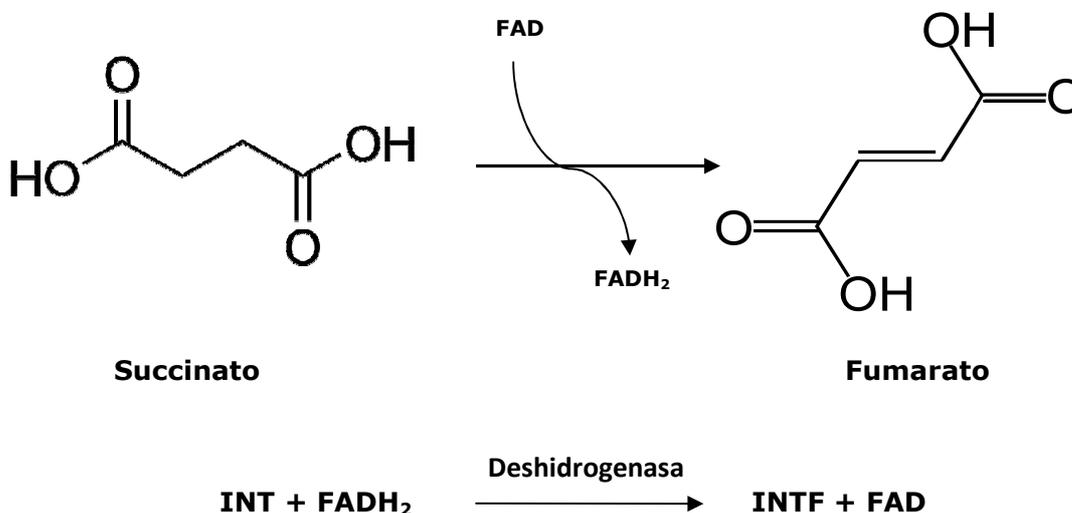


Figura.23: Reacción de deshidrogenación en trans del ácido succínico hasta ácido fumárico.
Reacción catalizada por la succinato deshidrogenasa.

El procedimiento seguido parte de la pesada de 0.5 g de muestra (por triplicado), a los que se les añadió 2 ml de un tampón de reacción (Tabla.42) y 1 ml

de una solución 20 mM de succinato sódico. Siempre en oscuridad y a temperatura ambiente, se incubaron las muestras durante 30 minutos (García-Martínez y col., 2009)

Tras la incubación, se les añadió ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) para producir la parada de la reacción y la precipitación de las proteínas y otros compuestos orgánicos propios del suelo.

Con el fin de extraer el producto INTF resultante de la reducción de INT, se les añadió a las muestras 5 ml de acetato de etilo, como disolvente orgánico, y se mantuvieron en agitación durante otros 30 minutos.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 5.500 rpm durante 1 minuto, para separar el suelo del solvente que contiene el INTF, para no interferir en la medida espectrofotométrica, a una longitud de onda de 490 nm, empleando para ello, un espectrofotómetro (GeneQuant, GE).

Tabla.42: Tampón de reacción para la determinación de la actividad deshidrogenasa.

Tampón de reacción (100 ml)	
Tampón Fosfato 0.1M , pH 7.5	80ml
Substrato (INT)	200 INT en 20 ml de Etanol

3.8.1.1. Cálculos

Una vez medida la absorbancia de las muestras, se procedió a la cuantificación de la actividad deshidrogenasa. Para ello, se aplicó la ley de Lambert y Beer, que relaciona absorbancia con concentración, a través de una constante de proporcionalidad (Abs=εBC), donde ε es el coeficiente de extinción molar.

$$\epsilon_{490nm} = 21.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

B es el paso de luz a través de la cubeta de medida, que es 1 cm; C es la concentración de la muestra.

De esta forma, la actividad enzimática (AE), expresada en mmol/g suelo·min, se calcula según la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{C \times V}{T \times G} \times 1000$$

Donde:

C: concentración de INTF (mM): $C = Abs_{490nm} / \epsilon_{490nm}$

$$\epsilon_{490nm} = 21.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

V: volumen de la muestra (ml): 5 ml

T: tiempo de incubación (min): 30 minutos

G: peso de la muestra (g): 0.5 gramos de suelo

3.8.2. Actividad fosfatasa ácida (APHA)

La actividad fosfatasa ácida se ha medido según el método establecido por Tabatabai y Bremmer (1969), al que se le han añadido ciertas modificaciones.

Este método se basa en la determinación espectrofotométrica de la molécula artificial *p*-nitrofenol (*p*-NF). Este *p*-NF en una solución alcalina manifiesta un color amarillo que puede ser cuantificado por colorimetría.

Para la determinación de esta actividad ha sido necesario hacer controles para cada una de las muestras, debido a posibles cantidades traza de *p*-NF presentes en los productos comerciales de *p*-nitrofenilfosfato o bien, debido a los compuestos orgánicos que se pueden extraer junto con el *p*-NF.

El procedimiento seguido se inicia con el pesado de 0.25 g de muestra (por triplicado), a los que se les añadió 2 ml de un tampón universal (MUB) pH 6.5 (Tabla. 43), y 0.5 ml de una solución de *p*-nitrofenilfosfato 25 mM. En el caso de los controles (también, 0.25 g de suelo), el *p*-nitrofenilfosfato no se incorporó hasta la adición posterior de CaCl₂ 0.5M y NaOH 0.5M.

Tras el período de incubación, las muestras y los controles se colocaron en un baño de hielo durante, al menos, 15 minutos para detener la reacción. A continuación, se les incorporó a cada tubo (muestras y controles) 0.5 ml de CaCl₂ 0.5M y 2 ml de NaOH 0.5M, agitando bien, y siempre en este orden. Es importante el orden en el que se añaden el CaCl₂ y la solución de extracción debido a que, el

CaCl₂ se incorpora para flocular las arcillas, ya que si se quedan dispersas, dificultan, posteriormente, la determinación colorimétrica. Además, así se evita la co-extracción de MO durante el tratamiento con la solución de extracción, con NaOH. Por eso, es importante que el CaCl₂ se añada antes de añadir el tampón de extracción.

El siguiente paso fue la centrifugación de las muestras y sus controles durante 1 minuto a 5.500 rpm y la medición de la intensidad del color de los sobrenadantes en un espectrofotómetro a 400 nm.

Tabla.43: Reactivos de la determinación actividad fosfatasa

Tampón MUB (Stock)		Tampón MUB pH 6.5	
TRIS	12.2 g	Solución Stock	200 ml
Ácido Maleico	11.6 g		
Ácido Cítrico	14 g		Ajustar pH a 6.5
Ácido Bórico	6.28 g		
NaOH 1M	488 ml		
H₂O	Hasta 1L	H₂O	Hasta 1L

3.8.2.1. Cálculos

Una vez medida la absorbancia de las muestras, se procedió a la cuantificación de la actividad fosfatasa. Al igual que en el caso de la actividad deshidrogenasa, se aplicó la ley de Lambert y Beer, que relaciona absorbancia con concentración, a través de una constante de proporcionalidad (Abs=εBC), donde ε es el coeficiente de extinción molar.

$$\epsilon_{400\text{nm}} = 18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

B es el paso de luz a través de la cubeta de medida, que es 1 cm; C es la concentración de la muestra.

De esta forma, la actividad enzimática (AE), expresada en μmol/g suelo·min, se calcula según la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{C \times V}{T \times G}$$

Donde:

C: concentración de *p*-NF (M): $C = \text{Abs}_{400\text{nm}} / \epsilon_{400\text{nm}}$

$\epsilon_{400\text{nm}} = 18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

V: volumen de la muestra (ml): 5 ml

T: tiempo de incubación (h): 0.5 horas

G: peso de la muestra (g): 0.250 gramos de suelo

3.8.3. Actividad β -glucosidasa (AG)

El método de referencia que se ha empleado para la determinación de esta actividad enzimática es el descrito por Tabatabai (1982) y Eivazi y Tabatabai (1988), al que se le han realizado algunas modificaciones.

Este método se basa en la determinación colorimétrica de *p*-NF que se genera por acción de la enzima β -glucosidasa sobre un β -D-glucopiranosido al que se le ha unido un grupo *p*-nitrofenil (*p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido). En un medio alcalino, este *p*-NF presenta un color amarillo, que se puede cuantificar, espectrofotométricamente.

Para la medida de la actividad enzimática, se pesaron 0.25 g de suelo por muestra (por triplicado) y, a su vez, se prepararon los controles correspondientes (también, por triplicado). Se prepararon estos controles debido a las posibles cantidades traza de *p*-NF presentes en los productos comerciales de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, o bien, debido a los compuestos orgánicos que se pueden extraer junto con el *p*-NF.

A este suelo pesado se le añadieron 2 ml de tampón MUB pH 6 (Tabla.44), y 1 ml de agua destilada, tanto a las muestras como a los controles.

Posteriormente, sólo a las muestras, se les añadió 0.5 ml de una solución 25 mM del sustrato *p*-nitrofenil- β -glucopiranosido.

Todas las muestras se incubaron junto con sus controles a 37°C durante 30 minutos, y tras este período de incubación, se colocaron en un baño de hielo durante 15 minutos, para detener la reacción.

A continuación, se le añadió a muestras y controles 0.5 ml de CaCl₂ 0.5M y 2 ml de la solución de extracción, un tampón Tris, pH 12 (Tabla.45), agitando bien, y siempre en este orden. A los controles, posteriormente, se le añadió 0.5 ml de la solución 25 mM de substrato *p*-nitrofenil-β-glucopiranosido.

Tabla.44: Reactivos para la determinación actividad β-glucosidasa.

Tampón MUB (Stock)		Tampón MUB pH 6	
TRIS	12.2 g	Solución	200 ml
Ácido Maleico	11.6 g	Stock	
Ácido Cítrico	14 g		Ajustar pH a 6
Ácido Bórico	6.28 g		
NaOH 1M	488 ml	H₂O	Hasta 1L
H₂O	Hasta 1L		

Es importante el orden en el que se añaden el CaCl₂ y la solución de extracción debido a que, el CaCl₂ se incorpora para flocular las arcillas, ya que si se quedan dispersas, dificultan, posteriormente, la determinación colorimétrica. Además, así, se evita la co-extracción de MO durante el tratamiento con la solución de extracción, con NaOH. Por eso, es importante que el CaCl₂ se añada antes de añadir el tampón de extracción.

Finalmente, se centrifugaron todas las muestras y sus controles respectivos durante 1 minuto a 5.500 rpm y se midió la intensidad del color de los sobrenadantes en un espectrofotómetro a 400 nm.

Tabla.45: Reactivos de la determinación actividad β -glucosidasa

Tampón Tris (Stock) 0.1M pH10		Tampón Tris 0.1M pH12	
Tris	12.2 g	Tris	200 ml
Ajustar pH a 10 con NaOH 0.5M		Ajustar pH a 12 con NaOH 0.5M	
H₂O	Hasta 1L	H₂O	Hasta 1L

3.8.3.1. Cálculos

Una vez medida la absorbancia de las muestras, se procedió a la cuantificación de la actividad fosfatasa. Al igual que en el caso de la actividad deshidrogenasa, se aplicó la ley de Lambert y Beer, que relaciona absorbancia con concentración, a través de una constante de proporcionalidad ($Abs = \epsilon BC$), donde ϵ es el coeficiente de extinción molar. B es el paso de luz a través de la cubeta de medida, que es 1 cm; C es la concentración de la muestra.

$$\epsilon_{400nm} = 18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

De esta forma, la actividad enzimática (AE), expresada en $\mu\text{mol/g}$ suelo $\cdot\text{min}$, se calcula según la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{C \times V}{T \times G}$$

Donde:

C: concentración de p-NF (M): $C = Abs_{400nm} / \epsilon_{400nm}$

V: volumen de la muestra (ml)

$$\epsilon_{400nm} = 18 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

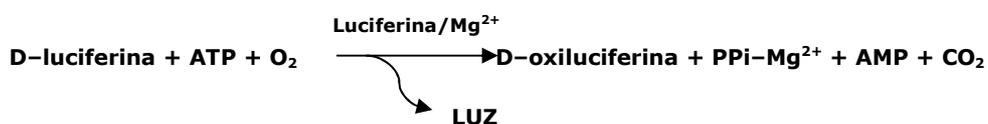
T: tiempo de incubación (h)

G: peso de la muestra (g)

3.9. Determinación del contenido de ATP del suelo

El método de cuantificación que se ha empleado se basa en el método descrito por Webster y *col.*, (1984) modificado, posteriormente, por Ciardi y Nanipieri (1990).

Este método de determinación de ATP en el suelo se basa en la producción de bioluminiscencia que tiene lugar por la acción de la enzima luciferasa en presencia de luciferina y de ATP según la siguiente reacción de oxidación:



La enzima luciferasa oxida la D-luciferina en presencia de oxígeno generando luz bioluminiscente y D-oxiluciferina. Esta reacción necesita del ATP para generar moléculas de D-oxiluciferina en estado excitado.

3.9.1. Extracción de ATP del suelo

El método de extracción de ATP se basa en la modificación, realizada por Ciardi y Nannipieri (1990), del ya establecido, previamente (Webster y *col.*, 1984)

El procedimiento de extracción se llevó a cabo a partir de 1 gramo por muestra de suelo (por triplicado) y se siguió el siguiente protocolo:

1. Se le añadieron a cada muestra 10 ml de solución de extracción (Tabla.46) y se agitaron, vigorosamente, durante 1 minuto.
2. Se sonicaron las muestras durante 1 minuto.
3. Se agitaron en noria rotatoria durante 30 minutos a 4°C.
4. Finalmente, se centrifugaron durante 20 minutos a 13.000 rpm.

Tabla.46: Solución de extracción de ATP. La preparación de esta solución ha sido diaria y en volúmenes inferiores a 100 ml.

Solución de extracción de ATP en suelo	
EDTA (g)	3.724
Urea (g)	60.06
DMSO (g)	100
Adenosina (mg)	100
H₃PO₄ (ml)	22.625
H₂O (ml)	Hasta 500

3.9.2. Medida de ATP

Para la determinación del ATP extraído se empleó el kit de medición de la casa comercial Sigma Aldrich y se realizaron los pasos indicados en las Tabla.47 y Tabla.48.

El kit empleado para la medición contenía:

- 1 vial de ATP Assay Mix: mezcla liofilizada de la enzima luciferasa, luciferina, MgSO₄, DTT, EDTA, BSA, además de sales de tampón de tricina. Su contenido se reconstituyó con 5 ml de agua Milli-Q estéril (pH 7.5) y se hicieron alícuotas.
- 1 vial de ATP Assay Mix Dilution Buffer: mezcla liofilizada de MgSO₄, DTT, EDTA, BSA y sales de tampón de tricina. Su contenido se disolvió en 50 ml de agua Milli-Q estéril y se alícuoteó.
- 1 vial de ATP estándar: vial con, aproximadamente, 1 mg de ATP (2.0x10⁻⁶ moles), en polvo liofilizado. Su contenido se disolvió, igualmente, en agua Milli-Q estéril (1ml). A partir de esta dilución, se obtuvo una solución stock de trabajo: 20ng ATP/ ml.

A la hora de realizar la medida de ATP, se diluyeron el *ATP Assay Mix* en el buffer de dilución, *ATP Assay Mix Dilution Buffer*, en una proporción 1:25. A esta dilución se le asignó el nombre se *ATP MIX*.

Tabla.47: Procedimiento de medición de ATP.

DESCRIPCIÓN	
Paso 1	Neutralización de la muestra (pH 7.3) con un volumen conocido de <i>ATP Assay Mix Dilution Buffer</i>
Paso 2	Mezclar ATP MIX con muestra neutralizada (1:1)
Paso 3	Medir en luminómetro

Tabla.48: Condiciones operacionales.

Condiciones de medición	
Test types	RLUs
Replicates	1
Max. Background	100
Background time	0.5
Meas. Time	10.0

3.10. Tratamiento estadístico

Los datos fueron comparados usando el programa SigmaPlot 2000, usando como método de análisis estadístico la prueba t-Student.

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo, se ha llevado a cabo la *evaluación y el análisis de la capacidad bioestimulante* de los hidrolizados enzimáticos obtenidos en la fase anterior, los denominados WCDS-HE y CGHE. Estos productos tienen un elevado potencial agroquímico como *biofertilizantes/bioestimulantes*, tanto para las plantas como para los microorganismos que en el suelo habitan, debido a que aportan nutrientes esenciales, mayoritariamente, N.

Las actividades desarrolladas en esta fase del trabajo se agrupan en dos etapas:

- Una primera etapa, en la que se realizó un estudio, de carácter preliminar, del *potencial bioestimulante de los hidrolizados enzimáticos, WCDS-HE y CGHE, sobre un suelo modelo experimental*. Los resultados de esta fase permitieron establecer las condiciones de trabajo posteriores.

- Una segunda etapa, en la que se llevó a cabo un *estudio, de forma exhaustiva, de la capacidad bioestimulante de WCDS-HE y CGHE*, una vez demostrada, en la fase preliminar. Este estudio implicó el desarrollo de un modelo de monitorización del proceso de bioestimulación, basado en la selección y en el estudio de diversos parámetros o *bioindicadores*. Mediante estos bioindicadores se ha tratado de evaluar la influencia de la disminución del tamaño molecular proteico en la capacidad bioestimulante de los hidrolizados enzimáticos.

Los resultados generados en las distintas etapas se detallan y se discuten a continuación:

4.1. Fase preliminar del estudio de bioestimulación

4.1.1. Caracterización físico-química del suelo experimental

La Tabla.49 recoge las características físico-químicas (0-25cm) determinadas en el suelo modelo sobre el que se han desarrollado los estudios de bioestimulación.

Tabla.49: Propiedades físico-químicas del suelo experimental. Los resultados son valores medios de tres repeticiones.

PARÁMETROS	
pH (ext (1:2:5))	8.63 ± 0.2
CARBONATOS TOTALES (%)	20.3 ± 1.2
CARBONO ORGÁNICO TOTAL (%)	0.382 ± 0.1
MO (%)	0.66 ± 0.2
RELACIÓN C/N	9.04 ± 0.7
ARENA GRUESA (%)	38.7 ± 5.3
ARENA FINA (%)	14.2 ± 3.5
LIMO	24.2 ± 3.2
ARCILLA (%)	22.9 ± 4.5
CLASE TEXTURAL	Franco-Arcilloso-Arenoso
N ORGÁNICO ESTIMADO	0.042 ± 0.01
FÓSFORO OLSEN (mg/kg)	5.8 ± 1.1
POTASIO ASIMILABLE (mg/kg)	212 ± 46

Tabla.50: Contenido de metales del suelo experimental. Los resultados son valores medios de tres repeticiones.

METALES (ICP-PLASMA)	(mg/Kg)	METALES (ICP-PLASMA)	(mg/Kg)
Fe	15607.30 ± 15.1	Cr	31.31 ± 1.2
Cu	13.84 ± 1.2	Pb	≤0.05
Mn	339.46 ± 5.7	Cd	3.48 ± 0.4
Zn	30.20 ± 1.1	Ni	15.11 ± 0.9

4.1.2. Ecotoxicidad aguda de los BSE: Ensayo Microtox®

Para determinar los posibles efectos tóxicos de los diferentes productos, se ha realizado un ensayo Microtox® en Fase Sólida (SPT), desarrollado por Azur Environmental, 1998, de gran sencillez y alta reproducibilidad.

Este ensayo ha permitido calcular la concentración efectiva (EC_{50}), definida como la concentración de una sustancia que causa una disminución del 50% de la emisión de luz de la bacteria *Vibrio fischeri*. Esto se traduce en que cuanto menor sea la EC_{50} obtenida, mayor es la toxicidad de la sustancia estudiada.

Los resultados obtenidos muestran, en todos los casos, valores de EC_{50} muy bajos, inferiores a 500 mg/l (Tabla.51). Esto sugiere que todos los productos ensayados como bioestimulantes en este trabajo, es decir, WCDS, WCDS-HE y CGHE, se pueden clasificar como tóxicos, según este ensayo.

Tabla.51: Ecotoxicidad aguda (EC_{50}).

ECOTOXICIDAD (EC_{50}) (mg/l)			
	WCDS	WCDS-HE	CGHE
EC_{50}	501 ± 25	480 ± 16	383 ± 31

Sin embargo, una vez determinada la toxicidad aguda de los distintos productos, se han evaluado los posibles efectos tóxicos de éstos, una vez añadidos al suelo, realizando, de nuevo, un ensayo Microtox® SPT, pero en este caso, de un lixiviado del suelo, para cada tratamiento. La dosis de MO, aplicada al suelo, que fue ensayada fue del 1% (p/p), por ser una dosis de trabajo intermedia.

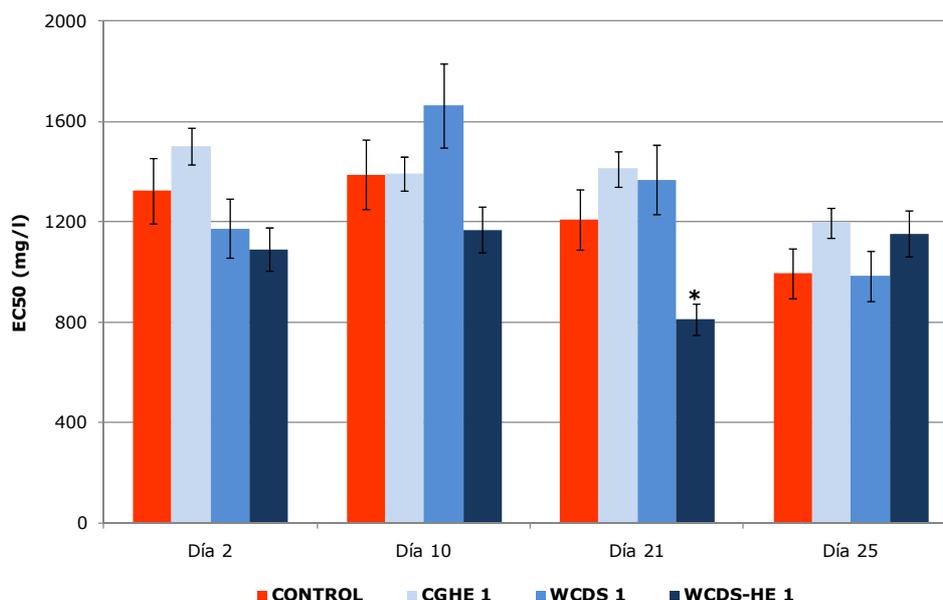


Figura.24: Evolución de la ecotoxicidad a lo largo del tiempo de ensayo. Los resultados expresados son valores medios de 3 análisis. *: Diferencias significativas con respecto al suelo control: $P < 0.001$

Del análisis de los resultados, mostrados en la Figura.52, se determina que la ecotoxicidad de las muestras no manifiesta una tendencia, significativamente, diferencial con respecto al suelo control (sin adición de MO).

De hecho, a lo largo del ensayo de ecotoxicidad, parece producirse un aumento de ésta (disminución de EC_{50}), pero los valores, al cabo de 25 días, son muy similares para todos los tratamientos y similares a los valores encontrados para los lixiviados del suelo control.

Por todo ello, a la vista de estos resultados, estos productos, al ser aplicados, en esta dosis, no pueden considerarse tóxicos para el suelo ni para los organismos que en él habitan, porque no incrementan los valores de toxicidad del suelo de forma significativa.

4.1.3. Estudio de bioestimulación: efecto de la dosis de BSE

En la primera etapa de este trabajo, se han obtenido y caracterizado dos nuevos productos, denominados, genéricamente, BSE, con un alto potencial biofertilizante/bioestimulante: WCDS-HE y CGHE.

Ambos son productos ricos en MO, mayoritariamente, en N, que se presenta en forma de péptidos y aminoácidos libres, es decir, materia que puede ser, fácilmente, usada por los microorganismos que habitan en el suelo, para su crecimiento y desarrollo, no sólo por el bajo tamaño molecular de su contenido proteico, sino, también, debido a la alta solubilidad de los componentes orgánicos.

La solubilidad de esta MO es de gran importancia, pues es una propiedad fundamental que la convierte en biodegradable o metabolizable como primera, e inmediata, fuente de energía para los microorganismos del suelo (Cook y Allen, 1992). La presencia de esta fracción soluble en el suelo es, en gran parte, la que va a determinar la actividad biológica del mismo (Janzen y *col.*, 1992).

El proceso de hidrólisis enzimática, tanto en el caso de WCDS-HE como en el de CGHE, ha ocasionado la ruptura de sus proteínas en fragmentos de menor tamaño (péptidos y aminoácidos). Esta disminución del tamaño molecular, de forma potencial, está aumentando la biodisponibilidad de estos materiales, ya que, entre otros motivos, los péptidos son un vehículo idóneo para el transporte y distribución del N en el suelo, mejor, incluso, que el transporte mediante aminoácidos libres (Higgins y Payne, 1982).

Imagen.23: Microcosmos. Suelo control.



En esta fase preliminar del trabajo, se ha tratado de evaluar el nivel de esta capacidad bioestimulante, que se les presupone a estos BSE obtenidos. Para ello, se ha planteado el análisis de la dosis óptima de trabajo, para posteriores ensayos de bioestimulación en microcosmos.

Se ensayaron, concretamente, 4 dosis de MO en este estudio de bioestimulación: 0.04%, 0.2%, 1%, 5% (p/p), tomando como referencia un suelo control sin bioestimar.

El proceso de bioestimulación fue monitorizado mediante la determinación de sendos bioindicadores bioquímicos, básicos para el análisis de dicho proceso: la actividad deshidrogenasa (ADH) y el contenido de ATP.

4.1.3.1. Determinación de la actividad deshidrogenasa del suelo (ADH)

La Figura.25 refleja los niveles de actividad deshidrogenasa durante los muestreos realizados a lo largo del período de incubación de los distintos tratamientos.

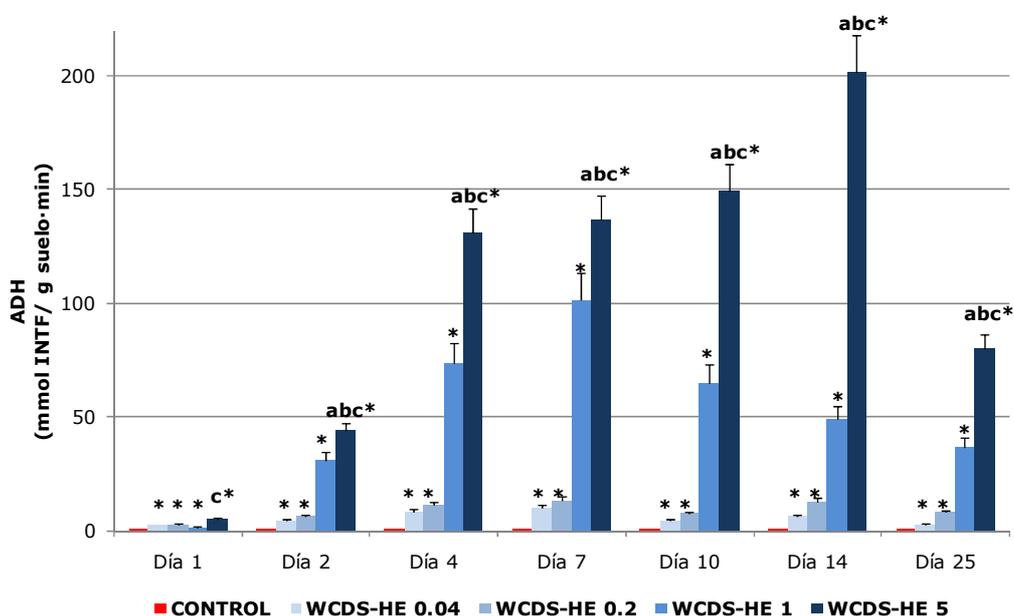


Figura.25: Actividad deshidrogenasa en el suelo experimental tras la adición de WCDS (BSE).

Los resultados son valores medios de 3 análisis.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001. *: tratamientos frente al control; **a, b, c** : WCDS-HE 5 frente WCDS-HE 0.04, WCDS-HE 0.2, WCDS-HE 1, respectivamente.

La ADH, en el suelo tratado con WCDS-HE, muestra resultados en los que se observa que, como era esperado, una mayor concentración de MO aportada produce mayores tasas de actividad enzimática.

Así, los valores obtenidos en el tratamiento con la mayor concentración (5%, p/p) de MO añadida, reflejan un incremento de la ADH, significativamente, mayor al suelo control de referencia y al resto de tratamientos. La actividad enzimática, al 5%, p/p, sigue una tendencia al alza hasta alcanzar su máximo valor (201.86 ± 21.06 mmol INTF/g suelo·min), que se produce a los 14 días desde el inicio de la incubación, mientras que en el resto de tratamientos se alcanza un valor máximo a los 7 días. Parece que el incremento de MO retrasa la máxima expresión de actividad microbiana, lo que produce que perdure su efecto más tiempo.

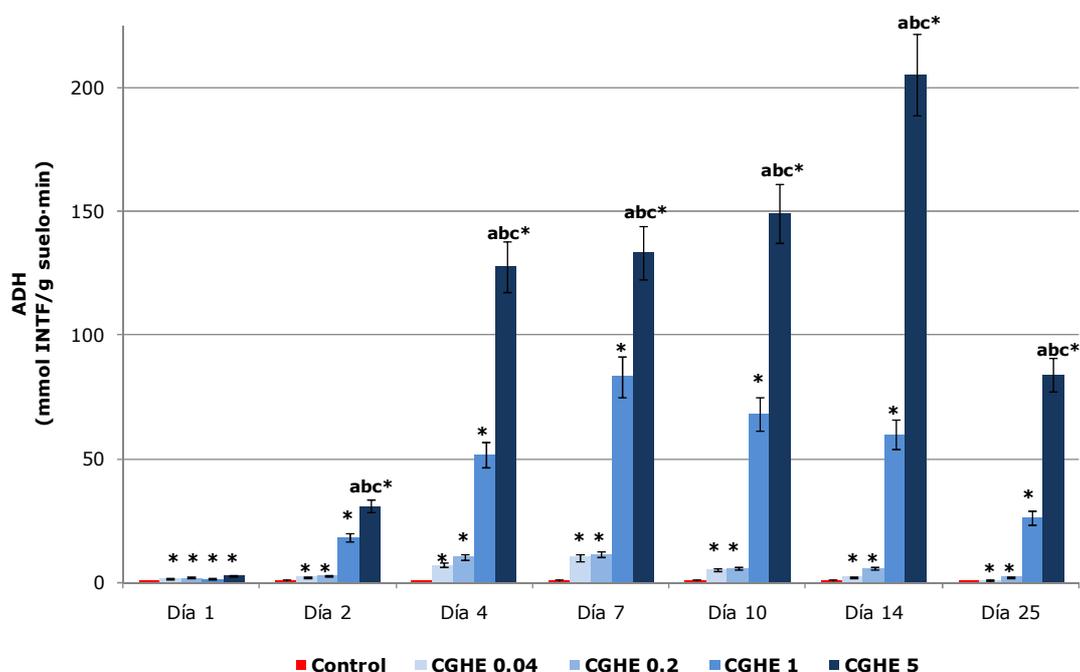


Figura.26: Actividad deshidrogenasa en el suelo experimental tras la adición de CGHE (BSE).

Los resultados son valores medios de 3 análisis.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> $P < 0.001$. *: tratamientos frente al control; **a, b, c** : WCDS-HE 5 frente WCDS-HE 0.04, WCDS-HE 0.2, WCDS-HE 1, respectivamente.

En cuanto al ensayo de la capacidad bioestimulante de CGHE (Figura.26), se encontraron resultados similares a los anteriores: los mayores valores de actividad enzimática se encontraron al aumentar la dosis de MO. Así, se aprecia que el valor máximo de actividad (205.38 ± 16.43 mmol INTF/g suelo·min), obtenido con una

dosis del 5%, p/p, resulta 2 veces superior al valor máximo obtenido con una dosis inferior, del 1% (p/p), y es entre 15 y 20 veces superior a los valores máximos obtenidos con dosis del 0.2% y 0.04%, respectivamente. Al igual que WCDS-HE, su máximo valor es alcanzado a los 14 días, mientras que en los demás tratamientos, esta valor máximo se alcanza a la semana de incubación.

4.1.3.2. Determinación del contenido de ATP del suelo

Un parámetro interesante para evaluar el efecto de la adición de MO sobre la actividad biológica de un suelo es el contenido de ATP (Marín *et al.*, 2004).

En general, el análisis del contenido de ATP en el suelo, en este trabajo, ha reflejado que la actividad de las poblaciones microbiológicas que habitan en el suelo experimental se ven influenciadas por la adición de los distintos BSE, en mayor o menor medida, siempre, en función de la dosis empleada en el ensayo.

De hecho, los valores de producción de ATP en los microcosmos, a los que se les ha añadido BSE, muestran valores muy superiores a los encontrados en el suelo control (Figura.27 y Figura.28), demostrando que la actividad biológica del suelo se incrementa con la incorporación de MO, en forma de péptidos y aminoácidos libres, que son aportados por WCDS-HE y CGHE.

De los datos recogidos en la Figura.27, se pueden observar ciertas diferencias en la respuesta biológica del suelo a las diferentes concentraciones de WCDS-HE.

A primera vista de los resultados, la aplicación de WCDS-HE al 5%, p/p, muestra una respuesta retardada con respecto a la que se manifiesta en el resto de tratamientos. En este caso, es a partir del día 7 cuando se muestra un incremento del contenido de ATP de forma significativa, muy superior al determinado para el resto de tratamientos. De hecho, el máximo de producción tiene lugar a los 14 días de incubación ($2.024,099 \pm 260,21$ ng ATP/g suelo), valor que supera, de forma significativa, a los valores máximos alcanzados en el caso de las otras dosis empleadas, obtenidos, a su vez, entre el día 2 y 4, desde el inicio del ensayo.

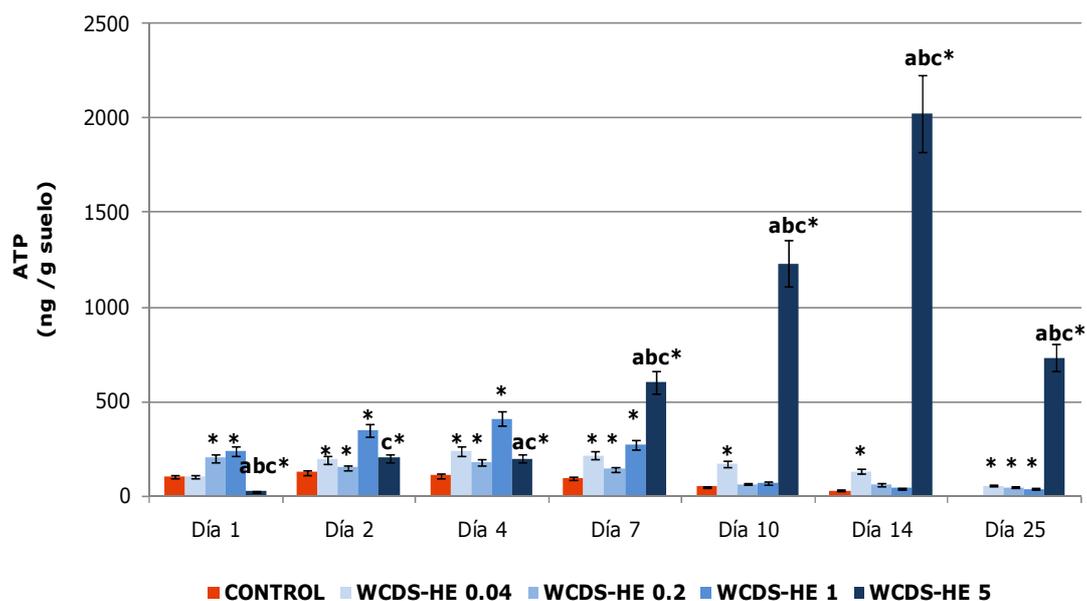


Figura.27: Cambios temporales de la concentración de ATP en el suelo tras la adición de WCDS-HE (BSE). Los resultados son valores medios de 3 análisis.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> $P < 0.001$. *: tratamientos frente al control; **a, b, c** : WCDS-HE 5 frente WCDS-HE 0.04, WCDS-HE 0.2, WCDS-HE 1, respectivamente.

A los 25 días, en el caso de la dosis 5% (p/p), aún se observan valores muy elevados de ATP (731.877 ± 87.32 ng ATP/g suelo), entre 13 y 20 veces superiores a los valores medidos para las dosis inferiores.

Para el resto dosis ensayadas, se observa un incremento de la actividad biológica del suelo de forma rápida, detectándose, a las 24 horas contenidos de ATP que llegan a duplicar los valores controles (como en el caso de WCDS-HE 0.2 y WCDS-HE 1). Esta bioestimulación se retrasa en el tratamiento al 5% (p/p) de WCDS-HE, como ya se había mencionado.

Para el caso de CGHE, mostrado en la Figura.28, se han ensayado las mismas concentraciones de MO que las empleadas para WCDS-HE. Los resultados encontrados son muy similares a los del ensayo anterior, de forma que, incrementos de la concentración de MO inducen incrementos de la actividad biológica y, por tanto, del contenido de ATP en el suelo.

Para la dosis mayor, la inducción de la actividad biológica, se encuentra algo retrasada en el tiempo (máximo a los 14 días) y, al igual que para WCDS-HE, la

producción de ATP se ve, significativamente, incrementada con respecto al suelo control y al resto de tratamientos.

Hay que señalar, tanto en el caso de WCDS-HE como en el de CGHE, que para las dosis 0.04%, 0.2% y 1% (p/p), el efecto estimulante de la actividad biológica se mantiene a lo largo del ensayo, de forma que crece y decrece de forma gradual, aspecto que no se aprecia en el caso de la dosis mayor, en el que se observa una subida súbita del contenido de ATP y, al final del ensayo, mantiene niveles de ATP, significativamente, muy elevados.

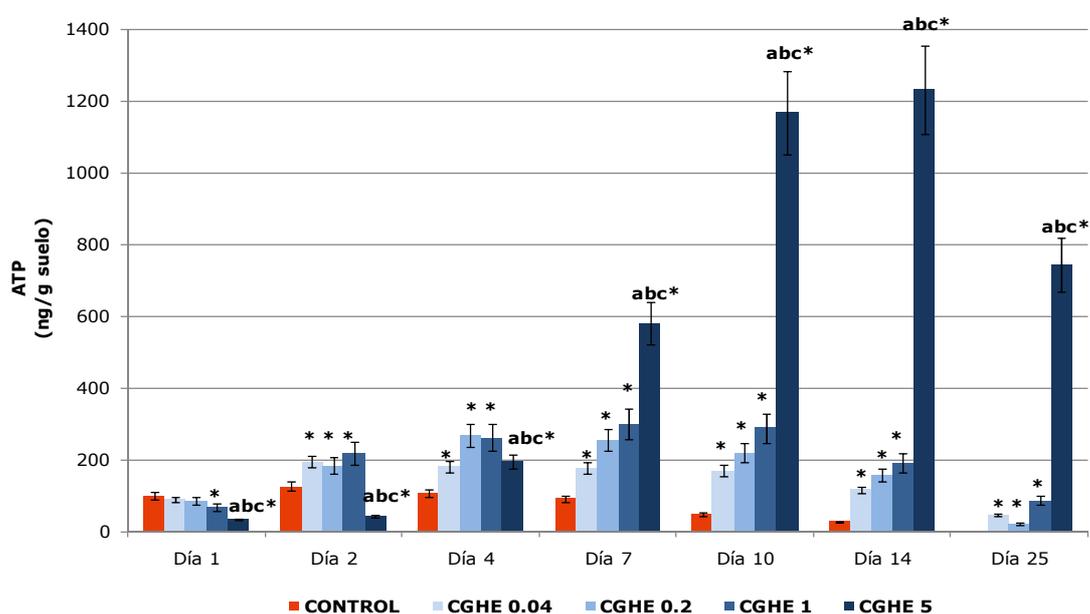


Figura.28: Cambios temporales de la concentración de ATP en el suelo tras la adición de CGHE (BSE). Los resultados son valores medios de 3 análisis.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001. *: tratamientos frente al control; a, b, c : CGHE 5 frente CGHE 0.04, CGHE 0.2, CGHE 1, respectivamente.

4.1.4. Discusión

La MO cumple con funciones muy importantes en el suelo, siempre acordes con la necesidad de preservar su calidad y, por consiguiente, la del medio ambiente. Principalmente, es el soporte fundamental para el mantenimiento de los ecosistemas terrestres, al ser fuente de alimentos (depósito de nutrientes como el N, P o el S) para los diversos organismos que el suelo crecen y se desarrollan, y, por tanto, preserva y mantiene la fertilidad del suelo (Stevenson, 1994).

Con el objetivo de mantener el contenido en MOS, se ha convertido en una herramienta fundamental y habitual la aplicación de distintos subproductos o residuos orgánicos (García y col., 1997; Ros y col., 2003; Moreno y col., 1999; Martens y col., 1992; Pascual y col., 1997), debido a que la MO que aportan, mejora sus condiciones y su calidad, aspecto de especial relevancia en el caso de suelos degradados.

Los productos WCDS-HE y CGHE obtenidos mediante hidrólisis enzimática de distintos SOA, son materiales ricos en MO, concretamente, presentan elevados contenidos de N en forma de péptidos y aminoácidos libres. Este N orgánico soluble que contienen es de gran importancia en la nutrición vegetal, debido a su rápida y fácil absorción. Sin embargo, su importancia no sólo se limita a la nutrición vegetal; los diversos organismos que habitan en el suelo, también, pueden hacer uso de estos nutrientes, tan fácilmente metabolizables. Al hacer uso de ellos, estos nutrientes orgánicos tienen la propiedad, potencial, de inducir incrementos del crecimiento de las poblaciones, así como, de la actividad enzimática del suelo, debido al estímulo de la actividad microbiana (Goyal y col., 1993; Pascual y col., 1998).

Las poblaciones microbianas edafológicas se encargan de descomponer la MOS, de manera que, transforman formas orgánicas complejas en compuestos más simples; igualmente, son responsables de la mineralización de diversos restos orgánicos y la síntesis de sustancias, a través de su metabolismo, tales como aminoácidos, proteínas y aminoazúcares, que participan como unidades estructurales (Labrador, 1996). En definitiva, los microorganismos producen enzimas que catalizan la transformación de compuestos específicos y, por tanto, juegan un papel muy importante en la metabolización de los compuestos orgánicos.

Por este motivo, los parámetros más comunes que se emplean para medir la actividad metabólica de la microbiota del suelo son, aparte de la mineralización neta del N y la respiración microbiana, las actividades enzimáticas del suelo y la energía (ATP) involucrada en los procesos (Nannipieri, 1984; Brookes, 1985).

Establecida la importancia de la MO en el mantenimiento de la fertilidad del suelo y el papel de los microorganismos en la mineralización de dicha MO, en esta fase preliminar, se ensayó la capacidad bioestimulante de los BSE obtenidos en la primera parte del trabajo (Capítulo 1), con el objetivo de analizar su magnitud.

Además, se pretendió establecer las condiciones adecuadas para posteriores estudios de bioestimulación. Concretamente, se analizó el efecto de la concentración de MO en la capacidad bioestimulante. Por esto, para evaluar esta capacidad, se seleccionó una serie de dosis de MO, tales como 0.04%, 0.2%, 1% y 5%, p/p.

Así, los resultados obtenidos sobre ADH y contenido en ATP sugieren que el aporte de N, en forma de péptidos y aminoácidos libres, fácilmente metabolizables, que proporcionan los BSE, es un factor fundamental en el estímulo de la actividad metabólica del suelo. Así, la ADH, propuesta como medida de la actividad metabólica global del suelo (Masciandaro y *col.*, 2001), refleja que la incorporación de productos orgánicos (BSE), estimula dicha actividad, al estimular la actividad metabólica microbiana en el suelo, resultados, totalmente, en concordancia con los obtenidos en numerosos estudios sobre la aplicación de enmiendas orgánicas a los suelos (Rao y Pathak, 1996; Liang y *col.*, 2005; Pascual y *col.*, 1998).

Los altos niveles de ADH y, también de ATP, en los tratamientos con BSE y la rapidez con la que se expresan cambios significativos, sugieren que estos productos proporcionan los nutrientes necesarios de una forma, altamente, biodisponible.

En cuanto al análisis del efecto de la concentración de MO aplicada al suelo sobre la capacidad bioestimulante, los resultados obtenidos muestran que al incrementar la dosis de MO biodisponible, mayor es el efecto estimulante resultante. Por tanto, se puede decir que la actividad metabólica (enzimática) está, fuertemente, relacionada con el contenido en MO, aspecto estudiado por numerosos autores (Nannipieri y *col.*, 1978, Sparling y *col.*, 1981).

En este contexto, se ha observado que, si bien el suelo responde de forma rápida al aporte de los BSE, cuanto mayor es la dosis de MO (5%, p/p), más se retrasa el alcance de los valores máximos de actividad y, por lo tanto, el efecto bioestimulante perdura más en el tiempo.

4.2. Estudio de bioestimulación: efecto del tamaño molecular proteico

La adición de los BSE al suelo experimental como materiales orgánicos y los efectos sobre los procesos metabólicos de distintas concentraciones de estos materiales se han estudiado en la fase previa y se han descrito, de forma preliminar, mediante parámetros o bioindicadores bioquímicos, como son el la actividad deshidrogenasa y el contenido de ATP. La información que brindan estos parámetros ha permitido analizar el efecto bioestimulante de estos productos y establecer las condiciones de operación para el desarrollo de un nuevo ensayo de bioestimulación, más completo.

El ensayo de bioestimulación, que se plantea en este apartado del trabajo, implica una descripción más detallada y exhaustiva de los efectos que induce la aplicación de los BSE sobre el suelo modelo, mediante la selección y determinación de un mayor número de bioindicadores, que han servido para monitorizar, durante el estudio, los procesos biológicos que tienen lugar en el suelo, procesos claves para la conservación de éste (García y *col.*, 2000; Trasar-Cepeda y *col.*, 2000; Bonmartí y *col.*, 2000).

Los resultados obtenidos se han determinado siempre mediante el empleo de diversos bioindicadores, tanto bioquímicos como biológicos, que se han considerados idóneos para describir el proceso de bioestimulación. La importancia de cuantificar todos estos parámetros radica en que su medida ha suministrado la información necesaria sobre la actividad metabólica del suelo en respuesta a la adición de los BSE ensayados.

Así, los parámetros que se han estudiado se pueden agrupar en dos categorías:

➤ **Bioindicadores generales:**

- *Crecimiento microbiológico*
 - Cuantificación de aerobios totales y hongos
 - Determinación del contenido de ergosterol
- Biodiversidad microbiológica: diversidad genética

➤ **Bioindicadores específicos:**

- *Actividades enzimáticas:*
 - Actividad deshidrogenasa (ADH)
 - Actividad fosfatasa (APH)
 - Actividad β -glucosidasa (AG)

- *Contenido de ATP del suelo.*

4.2.1. Estudio de la influencia de los BSE sobre el crecimiento microbiológico

Para estimar el efecto de la aplicación de los BSE sobre el crecimiento microbiológico se han determinado el contenido de bacterias aerobias, hongos y levaduras en el suelo, como bioindicador del proceso de bioestimulación, pero, además, se ha estimado el contenido de ergosterol del suelo.

Para la estimación de aerobios, hongos y levaduras, se han empleado técnicas tradicionales de cultivo, que han permitido evaluar el efecto bioestimulante de los distintos tratamientos ensayados sobre las tasas de crecimiento microbiológico y determinar, así, si existe un efecto positivo de la aplicación de los BSE, que incremente las poblaciones microbianas del suelo.

En cuanto al contenido en ergosterol del suelo, la molécula de esteroles y su cuantificación, actualmente, se está empleando como indicador tanto del contenido de biomasa fúngica como del crecimiento de estos hongos en el suelo (Hart y Reader, 2002). En este trabajo, se ha determinado el contenido de ergosterol en el suelo como parámetro indicador de la respuesta de las poblaciones de hongos a la adición de MO en forma de péptidos y aminoácidos libres, para evaluar la estimulación del crecimiento de la población fúngica del suelo (no para cuantificar biomasa fúngica).

4.2.1.1. Determinación de aerobios totales y hongos

4.2.1.1.a. Cuantificación de aerobios totales

Como se observa en la Tabla.52, en el caso de la dosis menor empleada (0.2%, p/p), las poblaciones bacterianas del suelo han aumentado hasta en dos órdenes de magnitud con la aplicación de los distintos bioestimulantes, tanto WCDS como BSE (WCDS-HE y CGHE), con respecto los controles. Estos incrementos se alcanzan antes en el caso de los BSE, que llegan a ser, significativamente, superiores a los valores encontrados en WCDS. Mientras, la población de microorganismos del suelo control, se mantiene constante a lo largo de todo el período de ensayo.

Además, se aprecia una clara influencia de la dosis sobre el crecimiento y desarrollo, de forma que, resulta más efectiva la dosis más alta (1%, p/p), que mantiene las poblaciones en torno a 10^9 ufc/g suelo seco, durante los 28 días de incubación. La dosis menor (0.2%, p/p) produce incrementos de las poblaciones que se mantienen en torno a 10^8 ufc/g suelo seco.

Tabla.52: Bacterias Aerobias. (10^7 ufc/g suelo peso seco). Los valores expresados son resultantes de tres análisis.

<i>Bacterias aerobias (10^7 ufc/g suelo)</i>							
<i>Días</i>	Control	WCDS 0.2%	WCDS 1%	WCDS-HE 0.2%	WCDS-HE 1%	CGHE 0.2%	CGHE 1%
0	1.20 ± 0.14	1.20 ± 0.14	1.20 ± 0.14	1.20 ± 0.14	1.20 ± 0.14	1.22 ± 0.15	1.22 ± 0.15
2	1.15 ± 0.05	1.17 ± 0.07AB	90.1 ± 13.23aCD*	34.61 ± 1.23*	14.10 ± 0.98b*	17.80 ± 1.11A*	2.68 ± 0.16c*
14	0.97 ± 0.08	1.35 ± 0.08AB	177.0 ± 54.14aC*	20.00 ± 1.11*	157.21 ± 12.23b*	14.25 ± 2.01A*	77.41 ± 0.13c*
21	0.94 ± 0.06	9.02 ± 0.10A*	198.2 ± 47.12a*	17.82 ± 1.00*	169.34 ± 32.11b*	10.96 ± 0.86*	152.13 ± 11.41c*
28	0.87 ± 0.10	8.73 ± 0.87A*	188.1 ± 32.96a*	14.53 ± 0.23*	151.54 ± 11.32b*	10.58 ± 0.88*	211.43 ± 56.13c*

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001

*: tratamientos frente al control.

a: WCDS 1% frente a WCDS 0.2%; **b:** WCDS-HE 1% frente WCDS 0.2%; **c:** CGHE 1% frente CGHE 0.2%; **A,B:** WCDS 0.2% frente a WCDS-HE 0.2% y CGHE 0.2%, respectivamente; **C,D:** WCDS 1% frente a WCDS-HE 1% y CGHE 1%, respectivamente.

Tabla.53: Hongos y levaduras. (10^4 ufc/g suelo peso seco). Los valores expresados son el resultado de tres análisis.

<i>Hongos y Levaduras (10^4 ufc/g suelo)</i>							
<i>Días</i>	Control	WCDS 0.2%	WCDS 1%	WCDS-HE 0.2%	WCDS-HE 1%	CGHE 0.2%	CGHE 1%
0	4.10 ± 0.11	4.10 ± 0.11	4.10 ± 0.11	4.10 ± 0.11	4.10 ± 0.11	4.10 ± 0.11	4.10 ± 0.11
2	5.37 ± 0.32	90.4 ± 2.34AB*	837.1 ± 3.01aCB*	224 ± 12.16*	145 ± 1.32b*	38.35 ± 2.12*	115 ± 1.03c*
14	6.30 ± 0.31	44.5 ± 1.11AB*	179.1 ± 1.21aBC*	111 ± 10.65*	834 ± 2.11b*	24.4 ± 1.11*	411 ± 2.56c*
28	6.29 ± 0.28	17.7 ± 5.87*	11.42 ± 1.01aBC*	25.8 ± 6.12*	15.8 ± 2.54b*	7.61 ± 3.87*	46.2 ± 2.02c*

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001

*: tratamientos frente al control.

a: WCDS 1% frente a WCDS 0.2%; **b:** WCDS-HE 1% frente WCDS 0.2%; **c:** CGHE 1% frente CGHE 0.2%; **A,B:** WCDS 0.2% frente a WCDS-HE 0.2% y CGHE 0.2%, respectivamente; **C,D:** WCDS 1% frente a WCDS-HE 1% y CGHE 1%, respectivamente.

4.2.1.1.b. Cuantificación de hongos y levaduras

De la observación de los datos (Tabla.53), se destaca el efecto positivo de la aplicación de los bioestimulantes, tanto de WCDS como de los BSE. En todos los casos, se aprecia un rápido incremento de las poblaciones de microorganismos, de forma que, en tan sólo dos días de incubación, para todos los tratamientos, se dan valores, significativamente, superiores a los valores de referencia control.

En cuanto al efecto de la dosis, el efecto encontrado es muy distinto en función del tratamiento. Así, para WCDS se alcanzan mayores tasas de crecimiento cuando se incrementa la dosis de MO, logrando valores máximos del orden de 10^6 ufc/g suelo. Para WCDS-HE, también, se comprueba como, a mayor concentración de MO, mayor es el efecto inductor del crecimiento. Sin embargo, este hecho se retrasa en el tiempo con respecto a la dosis menor. Así, en 2 días, se dan diferencias significativas entre ambos tratamientos, pero, a este tiempo, el efecto inductor es mayor en el caso de la dosis 0.2%, p/p. Tras dos semanas, se revierte este comportamiento y, como era esperado, una mayor dosis produce incrementos muy elevados del crecimiento microbiológico.

Sin embargo, los resultados obtenidos en los tratamientos con CGHE, aunque dan lugar a incrementos notables del crecimiento microbiológico con respecto a los valores controles, pero son, significativamente, inferiores a los obtenidos, no sólo para WCDS-HE, sino, también, para WCDS. El efecto de la dosis sí resulta evidente, de forma que los valores máximos obtenidos a una dosis mayor son, estadísticamente, superiores a los obtenidos al 0.2%, p/p., pero, al igual que en el caso de WCDS-HE, existe un retraso temporal en el caso de la dosis mayor, a la hora de alcanzar los valores máximos.

En definitiva, todos estos datos sobre crecimiento, bacteriano y fúngico, reflejan que el aporte de MO induce el crecimiento y desarrollo de los microorganismos edafológicos. Este hecho, durante todo el ensayo resultó visualmente evidente, puesto que al cabo de unos días de incubación, se apreciaba el crecimiento de hongos sobre la superficie del suelo, hongos que no crecían en los controles (Imagen.22 e Imagen.23).

Imagen.24: Detalle del desarrollo de hongos durante el ensayo.

Día 7 de incubación.

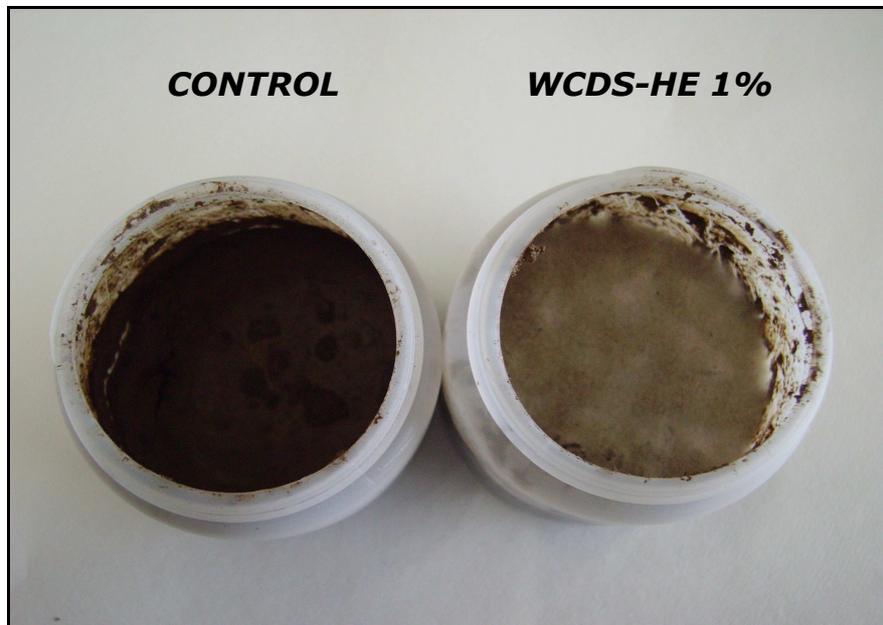


Imagen.25: Desarrollo de hongos en WCDS 1%, p/p.

Día 7 de incubación.



4.2.1.2. Cuantificación del contenido de ergosterol del suelo

A primera vista de los resultados obtenidos, se pone de manifiesto el notable efecto bioestimulante de los distintos tratamientos, tanto de WCDS como de los BSE. Así, en tan sólo 24-48 horas de incubación, para todos los tratamientos, se dan valores, significativamente, superiores a los valores de referencia control.

Si se analiza el efecto de la dosis, se aprecia que los resultados son los esperados: para WCDS se alcanzan mayores niveles de ergosterol en suelo cuando se incrementa la dosis de MO; para WCDS-HE, también, se comprueba como, a mayor concentración de MO, mayor es el efecto inductor e idéntico resultado se produce en los tratamientos con CGHE.

Como ocurría en la cuantificación de hongos y levaduras, los niveles de ergosterol en los tratamientos con WCDS son muy elevados. En este caso, llegan a ser superiores a los encontrados en los tratamientos con BSE. Se encuentra que, para la dosis menor, 0.2%, p/p, a partir de la primera semana de incubación, el contenido de ergosterol es, significativamente, superior a los encontrados en los suelos tratados con WCDS-HE y CGHE. En el supuesto de la dosis superior, 1%, p/p, los valores de ergosterol son, también, significativamente, superiores en el caso de WCDS, hasta los 14 días. Posteriormente, sus niveles decrecen, siendo superados por los encontrados en los tratamientos con los BSE.

Temporalmente, como se ha comentado, la estimulación del crecimiento fúngico es muy rápida (24-48 horas), para todos los tratamientos (independientemente de la dosis), alcanzándose los valores máximos entre los 7 y los 14 primeros días de incubación. Los resultados encontrados muestran que el rango de los niveles de ergosterol en suelo, en este ensayo de bioestimulación, oscila entre los 0.2 (en el suelo control) y los 2.1 µg ergosterol/g suelo (Tabla.54). El valor máximo de 2.122 ± 0.037 µg de ergosterol/g suelo se alcanza a las dos semanas en el tratamiento con WCDS-HE, al 1%, p/p. El valor máximo alcanzado (día 14) en el suelo tratado con CGHE, al 1%, p/p, no supera a los valores máximos medidos en los tratamientos con WCDS (1.710 ± 0.048 µg de ergosterol/g suelo) y WCDS-HE (2.122 ± 0.037 µg de ergosterol/g suelo, encontrados a los 7 y a los 14 días, respectivamente). Sin embargo, CGHE, al 1%, p/p, mantiene niveles, notablemente, superiores al resto de tratamientos al final del período de

incubación, lo que supone una ventaja evidente: mantiene el efecto bioestimulante por más tiempo.

En resumen, todos estos datos sobre contenido de ergosterol reflejan que el aporte de MO induce el crecimiento y desarrollo de los hongos que en el suelo habitan, y que existe un efecto positivo de la disminución del tamaño molecular, puesto que da lugar a incrementos de las poblaciones fúngicas superiores (WCDS-HE) y, sobre todo, mantiene este efecto estimulante por más tiempo que el material sin hidrolizar (CGHE).

Tabla.54: Contenido de ergosterol en los diferentes tratamientos de bioestimulación. Los datos mostrados son valores medios de tres análisis \pm SD.

<i>Contenido de Ergosterol (μg ergosterol/g suelo)</i>							
<i>Días</i>	Control	WCDS 0.2%	WCDS 1%	WCDS-HE 0.2%	WCDS-HE 1%	CGHE 0.2%	CGHE 1%
0	0.200 \pm 0.056	0.227 \pm 0.071	0.270 \pm 0.065	0.216 \pm 0.012	0.289 \pm 0.036	0.225 \pm 0.024	0.296 \pm 0.056
1	0.293 \pm 0.046	0.542 \pm 0.045B*	0.623 \pm 0.054aD*	0.477 \pm 0.025*	0.523 \pm 0.071*	0.239 \pm 0.012*	0.724 \pm 0.023c*
2	0.360 \pm 0.021	0.595 \pm 0.023*	1.632 \pm 0.076aCD*	0.515 \pm 0.035*	0.567 \pm 0.025*	0.595 \pm 0.028*	0.786 \pm 0.031c*
4	0.340 \pm 0.100	0.732 \pm 0.048B*	1.660 \pm 0.021aCD*	0.744 \pm 0.074*	1.145 \pm 0.041b*	0.596 \pm 0.031*	0.979 \pm 0.019*c
7	0.232 \pm 0.067	1.541 \pm 0.054AB*	1.710 \pm 0.048aCD*	0.622 \pm 0.012*	1.411 \pm 0.057b*	0.396 \pm 0.011*	1.240 \pm 0.022c*
14	0.220 \pm 0.021	1.112 \pm 0.064AB*	0.816 \pm 0.078aCD*	0.420 \pm 0.008*	2.122 \pm 0.037b*	0.430 \pm 0.018*	1.422 \pm 0.045c*
25	0.197 \pm 0.102	0.500 \pm 0.038AB*	0.642 \pm 0.023aD*	0.355 \pm 0.079*	0.586 \pm 0.031b*	0.315 \pm 0.003*	1.098 \pm 0.017c*

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> $P < 0.001$

*: tratamientos frente al control

a: WCDS 1% frente a WCDS 0.2%; **b:** WCDS-HE 1% frente WCDS 0.2%; **c:** CGHE 1% frente CGHE 0.2%;

A,B: WCDS 0.2% frente a WCDS-HE 0.2% y CGHE 0.2%, respectivamente; **C,D:** WCDS 1% frente a WCDS-HE 1% y CGHE 1%, respectivamente.

4.2.2. Estudio de la biodiversidad de las comunidades microbianas del suelo.

La metodología empleada para la identificación de microorganismos del suelo, en este trabajo, está basada en técnicas de análisis de los ácidos nucleicos existentes de las poblaciones microbianas del suelo, como son la PCR y la PCR acoplada a una electroforesis en geles con gradiente desnaturizante químico (DGGE), así como el proceso de secuenciación.

El primer paso para la realización de una DGGE es realizar la extracción de DNA de las distintas muestras, como material básico para realizar la amplificación de la región V3-V5 del gen 16S del rRNA. En este trabajo, para la extracción de DNA se utilizó un kit de aislamiento de DNA específico para suelo, el UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit y se siguió el protocolo de extracción suministrado por MoBio Laboratories, Inc., basado en el método *bead-beating*, de ruptura.

Las muestras analizadas fueron las correspondientes a los días 1 y 25, con el fin de evaluar la existencia de diferencias en la composición de la comunidad microbiana.

Tras la extracción, se cuantificó, mediante espectrofotometría, el DNA extraído, sin que existieran diferencias en la cantidad entre las distintas muestras (Tabla.55).

Tabla.55: Concentración de DNA de las muestras de suelo. (Día 1 y 25). Los resultados dados son valores medios de 3 análisis.

DNA extraído (ng/μl)	Control	WCDS 0.2%	WCDS 1%	WCDS-HE 0.2%	WCDS-HE 1%	CGHE 0.2%	CGHE 1%
Día 1	43.8±3.2	47.8±8.1	45.9±12.4	46.6±5.1	47.2±2.1	52.2±7.4	43.2±2.1
Día 25	48.5±4.6	47.7±7.3	46.3±8.1	48.9±4.4	43.4±3.7	48.6±5.2	43.5±2.5

Una vez extraído el DNA, se procedió a llevar a cabo la amplificación mediante PCR. Los productos resultantes de esta PCR se sometieron a un análisis electroforético en gel de agarosa 2%, p/v. Junto con las muestras se cargaron, también, marcadores de tamaño molecular (100-1.000 pb), para determinar el de la banda obtenida. En este caso, la banda amplificada por los cebadores empleados era de unos 500-600 pares de bases. Tras cada PCR, este era el paso seguido, para garantizar que existía suficiente DNA y que se había amplificado la región deseada. Este gel de agarosa se visualizaba bajo luz ultravioleta en un transiluminador.

Finalmente, las muestras amplificadas se cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante con un gradiente 40-60%, que se consideró el óptimo para la adecuada separación de los fragmentos.

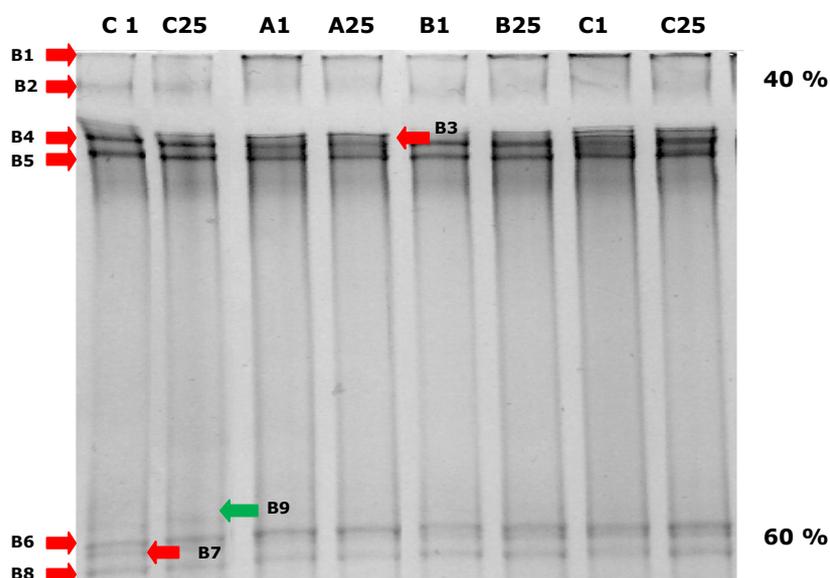
Imagen.26: Equipo de DGGE. Dcode System (BioRad)



El análisis del perfil electroforético encontrado muestra que existe un perfil similar a lo largo del período de incubación (del día 1 al día 25), con 8-9 bandas detectables. Se encuentran bandas coincidentes, lo que lleva a pensar, que la aplicación de los distintos BSE induce incrementos en la actividad de los microorganismos existentes y que producen, también, un aumento de su crecimiento, pero, no implican cambio alguno en la composición de la población microbiológica del suelo.

Imagen.27: Análisis de DGGE de fragmentos 16S rDNA amplificados por PCR.

C1: Control Día 1; C25: Control Día 25; A1: WCDS 0.2% Día 1; A25: WCDS 0.2% Día 25; B1: WCDS-HE 0.2% Día 1; B25: WCDS-HE 0.2% Día 25; C1: CGHE 0.2% Día 1; C25: CGHE 0.2% Día 25.



Tanto para los tratamientos al 0.2% como al 1%, p/p, se detectaron entre 8-9 bandas (la banda 9 no es apreciable en algunas muestras, en esta imagen). De estas 9 bandas sólo fueron secuenciadas 8.

Las bandas observadas e identificadas en los geles se cortaron y fueron reamplificadas usando los mismos cebadores y el mismo programa de PCR inicial. Con esto se logra enriquecer el fragmento mayoritario y se facilita la secuenciación y el posterior análisis para identificar el microorganismo correspondiente.

La secuenciación de las bandas (realizada por la empresa NewBiotechnic, Bollullos de la Mitación, Sevilla) se visualizó mediante un programa sencillo, llamado FinchTV. Este propio programa nos permitió analizar y comparar las secuencias mediante BLAST del NCBI, con bases de datos para identificar los microorganismos.

Todas las bandas de DGGE mostraron una gran similitud en secuencia (89-98%) respecto de las secuencias disponibles en las bases de datos.

La secuenciación de las bandas ha dado como resultado el siguiente perfil (Tabla.56):

Tabla.56: Listado de bandas de DGGE otenidas y secuenciadas: designación de un n° de acceso para cada banda y nivel de similitud respecto a la base de datos.

Banda DGGE	No. Acceso	% Similitud	Organismo Base de Datos Genbank
B1	FJ006903.1	78	<i>Janthinobacterium sp.</i>
B2	-	-	N.d.
B3	AB265150.1	98	<i>Xantomonadaceae bacterium TDMA-47</i>
B4	FJ392837.1	97	<i>Sphingomonas sp</i>
B5	AE005673.1	88	<i>Lysobacter sp EM 0470</i>
B6	DQ337559	98	<i>Caulobacter crescentus CB15</i>
B7	FJ373039.1	98	<i>Pseudomonas sp BBCT</i>
B8	AF368755.1	98	<i>Bacillus sp 57-3</i>
B9*	AB264132.1	95	<i>Pseudomonas saccharaphila</i>

N.d. No determinada

4.2.3. Determinación de actividades enzimáticas del suelo

Para conocer la respuesta del suelo a la adición de MO que aportan los diversos BSE obtenidos en la fase previa de la investigación, se ha propuesto el estudio de algunas actividades enzimáticas del mismo.

4.2.3.1. Actividad deshidrogenasa (ADH)

La medida de esta actividad enzimática es de vital importancia debido a que da información sobre la actividad metabólica global del suelo, es decir, de todos los organismos que en él viven, siendo, por ello, un buen indicador del sistema redox microbiano y, por tanto, de las actividades oxidativas del mismo (Casida, 1977; Nannipieri y col., 1990).

En la fase preliminar, se determinó esta actividad enzimática para los BSE y se comprobó que la adición de MO en forma de dichos productos, inducía incrementos significativos de esta actividad, así que, una mayor concentración de MO añadida, producía, temporalmente, mayores incrementos.

En este ensayo, que se ha llevado a cabo y del que se exponen los resultados obtenidos en las Figura.29 y Figura.30, se ha pretendido analizar si la modificación de las propiedades físicas de las proteínas que constituyen los SOA, produce efectos positivos sobre la actividad del suelo, es decir, si la disminución del tamaño molecular de las proteínas constituyentes (así como un incremento de la solubilidad de la MO) influyen en una mayor capacidad bioestimulante.

El análisis de los resultados obtenidos para esta actividad se ha realizado por dosis de MO aplicada, para facilitar la comprensión de los resultados:

En el caso de la dosis menor, 0.2% (p/p) de MO, lo primero que se comprueba, es que existe un evidente efecto bioestimulante por parte de WCDS-HE y CGHE. Se puede ver que, ya a las 24 horas desde el inicio de la incubación, los distintos tratamientos bioestimulantes reflejan incrementos significativos de la ADH con respecto al suelo control.

El tratamiento con WCDS-HE muestra, a las 24 horas, valores de actividad enzimática que duplican a los determinados en el resto de tratamientos y cuadruplican el valor control de referencia. Así, en tan sólo 48 horas, WCDS-HE produce los valores máximos de actividad metabólica (ADH) (27.93 ± 3.02 mmol INTF/g suelo·min), que son 16 veces superiores a los valores mostrados para el suelo control de referencia, y entre 8 y 10 veces superiores a los resultados determinados en los tratamientos con WCDS y CGHE (0.2%), respectivamente.

Por tanto, en este corto período de tiempo (2 días), se reflejan incrementos significativos de la actividad metabólica en todos los tratamientos con respecto al suelo control, pero destaca, notablemente, la capacidad estimulante de WCDS-HE sobre la del resto de biostimulantes, lo que sugiere, que la disminución del tamaño molecular de las proteínas tiene un efecto positivo que incrementa el potencial bioestimulante de WCDS-HE.

Una vez alcanzado el valor máximo de ADH, con el tiempo de incubación, se comprueba que la inducción de la actividad por parte de WCDS-HE va decreciendo, manteniendo valores, significativamente, superiores al resto de tratamientos hasta la primera semana de incubación. Posteriormente, los valores siguen siendo, estadísticamente, superiores a los valores control, tendiendo hacia los valores, inicialmente, encontrados.

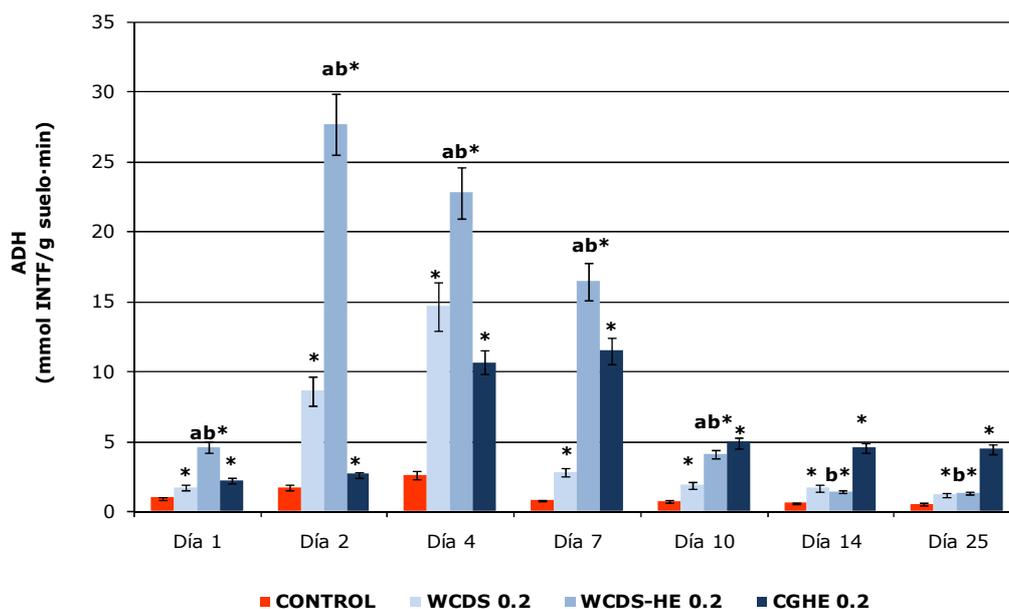


Figura.29: Evolución temporal de la actividad deshidrogenasa en suelos control y tratados con WCDS y los BSE. 0.2% de MO. Los resultados expresados son valores medios de 3 análisis
 DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001. *: tratamientos frente al control; **a**: WCDS-HE frente a WCDS; **b**: WCDS-HE frente a CGHE.

En el caso de los tratamientos con CGHE, durante el tiempo de ensayo, la evolución de la ADH ha resultado distinta a la de WCDS-HE: mientras que con éste, la ADH crece, rápidamente, alcanzando su máximo valor a los 2 días, la actividad medida en el tratamiento con CGHE se va incrementando, paulatinamente, alcanzando, a los 7 días desde el inicio del ensayo, un valor máximo de 11.45 ± 2.54 mmol INTF/g suelo·min, valor inferior al máximo (27.93 ± 3.02 mmol INTF/g suelo·min) determinado en los suelos tratados con WCDS-HE (0.2%, p/p). Esto sugiere que el efecto bioestimulante de CGHE, además de tener menor magnitud, está retrasado en el tiempo con respecto a WCDS-HE, lo que le confiere la ventaja de ejercer su papel bioestimulante durante mayor tiempo.

En cuanto a WCDS, este tratamiento muestra, también, un marcado efecto bioestimulante. Así, a las 24 horas de incubación, duplica la actividad del suelo control y dicha actividad va aumentando hasta los 4 días (14.67 ± 1.63 mmol INTF/g suelo·min). Tras este tiempo, la actividad tiende a los valores iniciales. Hay que destacar que, a pesar de esta marcada capacidad estimulante de la actividad microbiana del suelo, los valores medidos para WCDS son siempre, significativamente, inferiores a los determinados para el tratamiento con WCDS-HE (misma dosis).

Con respecto a la dosis 1% (MO, p/p), los resultados muestran valores de ADH superiores a los encontrados a dosis menores, como era de esperar. La primera diferencia que se observa con respecto a la dosis 0.2% está en que la inducción de la actividad está retrasada hasta las 48 horas en todos los tratamientos. Es a partir del segundo día cuando se manifiestan las primeras diferencias entre los distintos tratamientos. De esta forma, a las 48 horas, WCDS-HE es el tratamiento que mayor ADH muestra (31.15 ± 7.9 mmol INTF/g suelo·min), seguido de CGHE (29.60 ± 3.5 mmol INTF/g suelo·min) y, finalmente, de WCDS (22.39 ± 3.2 mmol INTF/g suelo·min).

A los 4 días, para esta dosis, se producen los valores máximos de ADH en los tratamientos con WCDS y WCDS-HE. En esta situación, se puede comprobar de una forma muy evidente su distinta capacidad inductora y estimulante de la actividad metabólica del suelo: la ADH en el tratamiento WCDS es 1.6 veces inferior (62.01 ± 10.11 mmol INTF/g suelo·min) a la determinada en el caso de WCDS-HE (98.64 ± 19.32 mmol INTF/g suelo·min). A partir de este día, la ADH decrece en ambos tratamientos, tendiendo a los valores iniciales a los 25 días desde el inicio del ensayo.

El tratamiento con CGHE sigue mostrando, a esta dosis, una evolución de la ADH muy similar al que se encontró a la dosis 0.2%, (p/p). En este caso, la ADH crece de forma paulatina, aunque significativa, con respecto a los controles, de manera que, alcanza su máximo a los 7 días (83.38 ± 9.89 mmol INTF/g suelo·min), no a los 4 como ocurre con WCDS y WCDS-HE, triplicando la ADH de estos últimos, es decir, a esta dosis, también se refleja un marcado retraso.

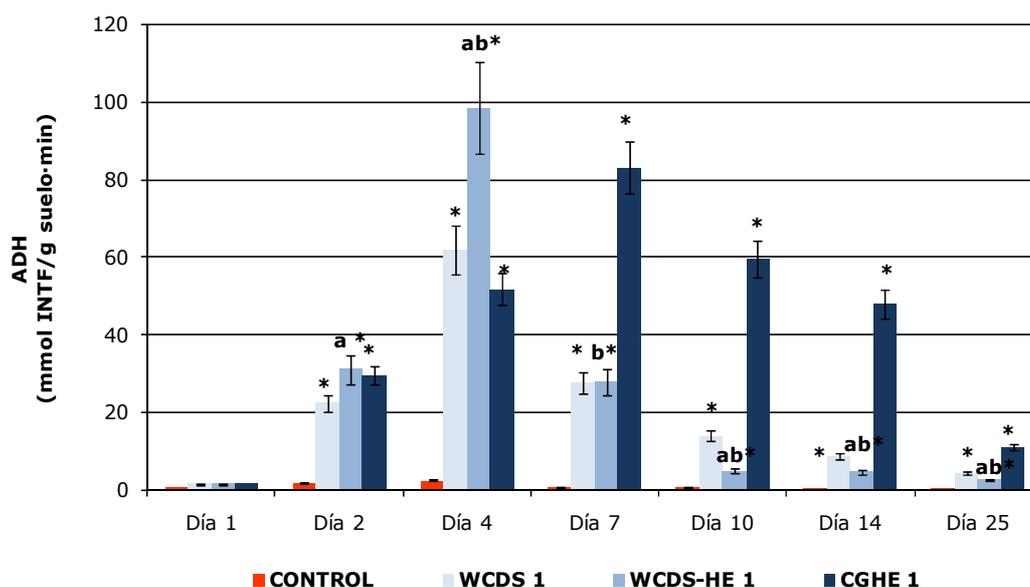


Figura.30: Evolución temporal de la actividad deshidrogenasa en suelos control y tratados con WCDS y los BSE. 1% (p/p) de MO. Los resultados expresados son valores medios de 3 análisis DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001. *: tratamientos frente al control; **a**: WCDS-HE frente a WCDS; **b**: WCDS-HE frente a CGHE.

Aunque para todos los tratamientos se da un mantenimiento de la inducción durante al menos 2 semanas, es CGHE el que mantiene una estimulación del metabolismo, realmente, elevada, (entre 8 y 10 veces superior a los tratamientos WCDS y WCDS-HE, respectivamente).

4.2.3.2. Actividad fosfatasa ácida (APHA)

Las enzimas fosfatasas implican a un amplio grupo de enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico (Eivazi y col., 1977). Concretamente, la fosfatasa ácida pertenece al grupo de las fosfomonoesterasas, que son enzimas inespecíficas, que catalizan la hidrólisis de los glicerofosfatos.

Se mide esta actividad con el objetivo de ver la influencia de los BSE en los ciclos bioquímicos de los elementos fundamentales. Al igual que en el caso de la ADH, se expresan los resultados en función de la dosis empleada, con el fin de facilitar la comprensión de los datos obtenidos.

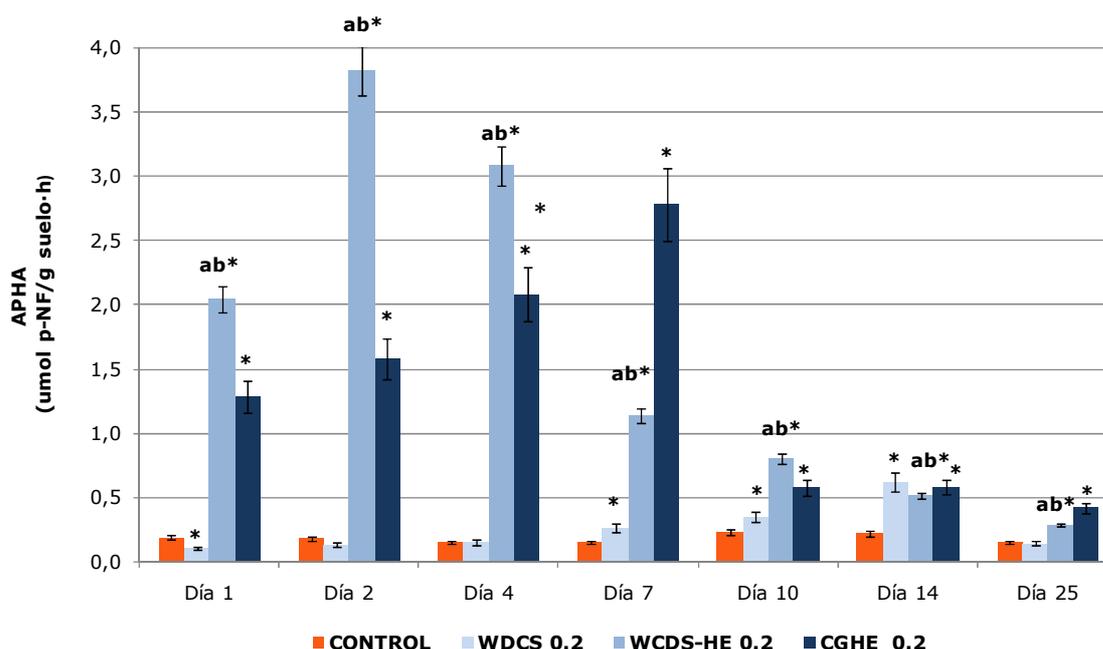


Figura.31: Evolución temporal de la actividad fosfatasa ácida en suelos control y tratados con DS y los BSE. 0.2% (p/p) de MO. Los resultados expresados son valores medios de 3 análisis DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001. *: tratamientos frente al control; a: WCDS-HE frente a WCDS; b: WCDS-HE frente a CGHE

Atendiendo a los resultados encontrados (Figura.31), empleando la dosis 0.2% (MO, p/p), se observa como existe un evidente y rápido (24 horas) efecto inductor de la actividad enzimática en el caso de los BSE, no observándose dicho efecto en el tratamiento con WCDS.

La evolución temporal de la APHA para los tratamientos con sendos BSE es similar a la que se ha mostrado para la ADH. Así, el suelo bioestimulado con WCDS-HE presenta un máximo de actividad ($3.820 \pm 2.5 \mu\text{mol p-NF/g suelo}\cdot\text{h}$) a los 2 días de incubación, superando a los valores determinados en el suelo control y, también, en el suelo con WCDS. Tras alcanzar este valor máximo, la actividad decrece, paulatinamente, hasta alcanzar un determinado valor basal, mostrado a los 25 días.

Por otro lado, la APHA en el suelo con CGHE muestra otro perfil diferente, como ocurría en el caso de la ADH. En esta situación, la APHA se va incrementando hasta alcanzar su máximo a los 7 días, desde el inicio del ensayo, cuando la actividad enzimática en el tratamiento con WCDS-HE ya ha decrecido, notablemente. Este valor máximo ($2.78 \pm 0.34 \mu\text{mol p-NF/g suelo}\cdot\text{h}$) no supera al

máximo logrado por WCDS-HE a las 48 horas, pero, a este tiempo, representa más del doble. Al igual que WCDS-HE, con el tiempo, la tendencia es a decrecer hasta unos valores basales.

En cuanto a los resultados encontrados trabajando con la dosis mayor, 1%, p/p, se destaca primero la gran diferencia en actividad mostrada en los tratamientos con WCDS, con respecto a los BSE, lo que pone de manifiesto una menor capacidad para inducir y estimular la actividad biológica. Evidentemente, induce incrementos de la actividad enzimática con respecto al suelo control, que a los 4 días de ensayo, supera, en un orden de magnitud, a los valores control.

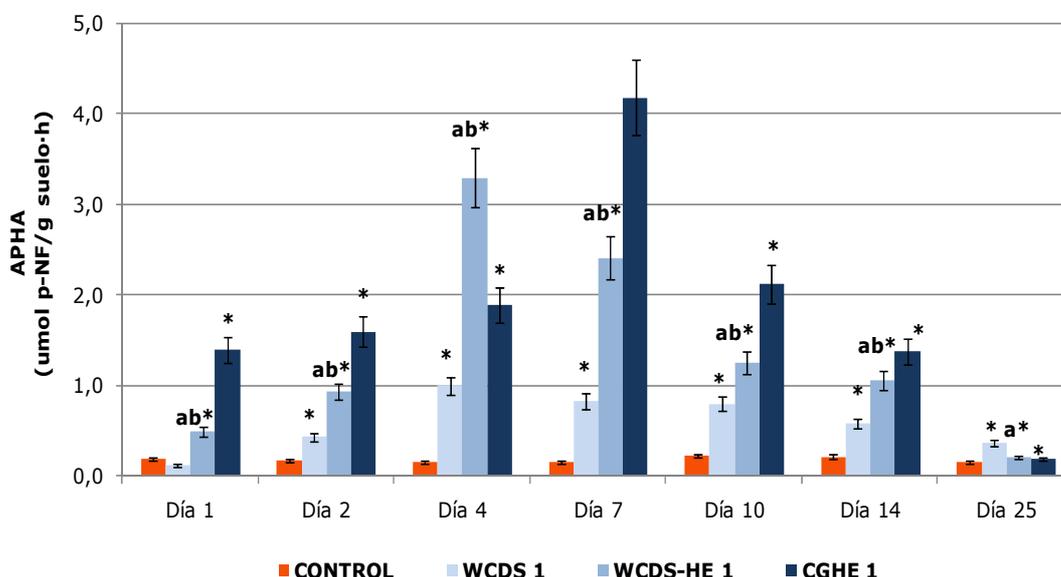


Figura.32: Evolución temporal de la actividad fosfatasa ácida en suelos control y tratados con WCDS y los BSE. 1% (p/p) de MO. Los resultados expresados son valores medios de 3 análisis DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001. *: tratamientos frente al control; a: WCDS-HE frente a WCDS; b: WCDS-HE frente a CGHE

Con respecto a los BSE, se aprecia un evidente efecto inductor de la APHA, que se manifiesta muy rápido, tras las primeras 24 horas de incubación. En el caso de WCDS-HE, se aprecian significativas diferencias en cuanto a la dosis. Así, mientras que, con una dosis de 0.2% (p/p), la APHA se incrementaba hasta $2.044 \pm 2.5 \mu\text{mol p-NF/g suelo}\cdot\text{h}$ (24 horas), con una dosis mayor, del 1%, p/p, esta inducción se ve disminuida hasta $0.498 \pm 0.15 \mu\text{mol p-NF/g suelo}\cdot\text{h}$, es decir, 4 veces menos actividad. A mayor tiempo de incubación, si se compara con los

resultados mostrados en la Figura.31 (0.2%, p/p), la APHA está retrasada, alcanzando su máximo valor a los 4 días y su valor no es más alto, a pesar de la mayor dosis de MO, es decir, que incrementos de la concentración de MO añadida al suelo experimental, aplicada como WCDS-HE, no están dando lugar a mayores incrementos de la actividad enzimática.

Si se analizan los datos del tratamiento con CGHE (Figura.31), se aprecia como, en este caso, sí se mantiene la tendencia de la inducción de la APHA; de esta forma, se alcanza su máximo valor a los 7 días (igual que con la dosis 0.2%). Este valor de actividad sí es, significativamente, superior al alcanzado con una menor concentración de MO (0.2%, p/p), es decir, en este caso una mayor concentración de MO sí induce mayores incrementos de la APHA.

En definitiva, se comprueba que los tratamientos con péptidos y aminoácidos libres presentan una mayor capacidad de estimular la actividad microbiana, representado por incrementos de la actividad enzimática, y que dicha actividad tiende a ser dependiente de la dosis.

4.2.3.3. Actividad β -glucosidasa

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

Como se ha realizado para la APHA, esta actividad se ha medido con el objetivo de analizar la influencia de los BSE en los ciclos bioquímicos de los elementos fundamentales. Al igual que en las demás actividades enzimáticas, se expresan los resultados en función de la dosis empleada, con el fin de facilitar la comprensión de los datos obtenidos.

En general, la adición de MO ha producido un efecto positivo sobre la AG, como ha ocurrido con las demás actividades enzimáticas, aunque éste efecto, en esta situación, ha resultado ser de menor amplitud.

Si se observan los datos de la Figura.33 (dosis 0.2%, p/p), se observa que el efecto inductor de la actividad enzimática no se ve incrementado por la ruptura de las proteínas constituyentes, de forma que, los tratamientos con los BSE al 0.2%, (p/p), no reflejan mayores tasas de AG, con respecto al control, que los tratamientos con WCDS al 0.2%, (p/p), a lo largo de todo el estudio. De hecho, el tratamiento con WCDS muestra valores de AG superiores, en todos los muestreos, aunque las diferencias encontradas no son, estadísticamente, significativas.

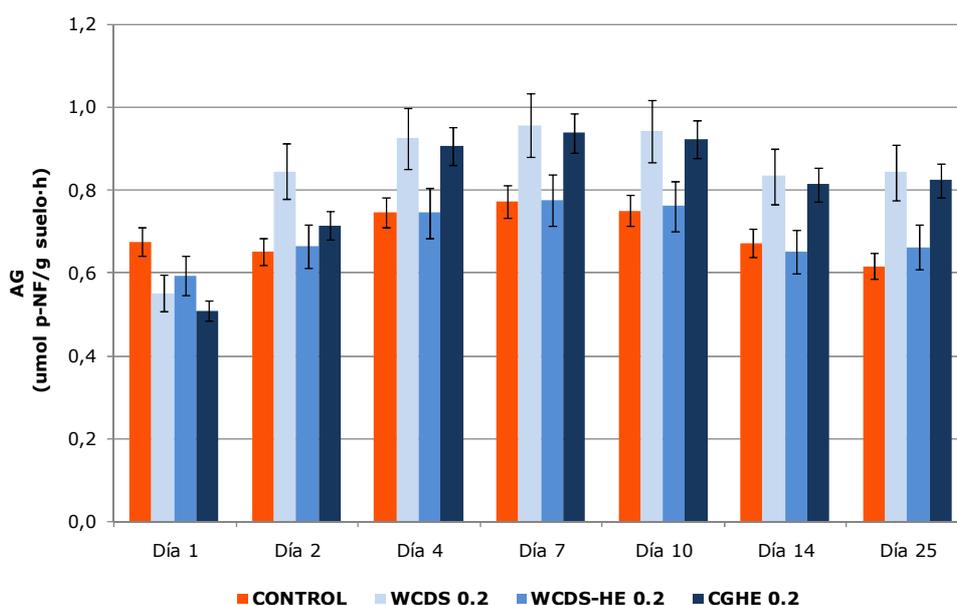


Figura.33: Evolución temporal de la actividad β -glucosidasa en suelos control y tratados con WCDS y los BSE. 0.2% (p/p) de MO. Los resultados expresados son valores medios de 3 análisis.

En el caso de la actividad medida en el tratamiento con CGHE, los datos reflejan que existen incrementos de la actividad con respecto a los valores de referencia del suelo control, aunque no son diferencias significativas.

En el caso de una dosis 1% de MO, p/p, si se analizan los resultados por tratamiento, se comprueba que el suelo con WCDS induce incrementos significativos, con respecto al control, pero a partir del día 7 desde el inicio del ensayo.

En cuanto al hidrolizado de WCDS, WCDS-HE, a mayor concentración, sí que se producen cambios significativos frente al suelo control de referencia. En este caso, los mayores valores de AG se producen en este tratamiento. Además, la

inducción enzimática se da de forma rápida (24 horas) y se mantiene en el tiempo, tendiendo a los valores iniciales al final del proceso de bioestimulación.

Finalmente, en el caso del segundo BSE, CGHE, los datos revelan que no existen diferencias significativas en cuanto a la dosis empleada.

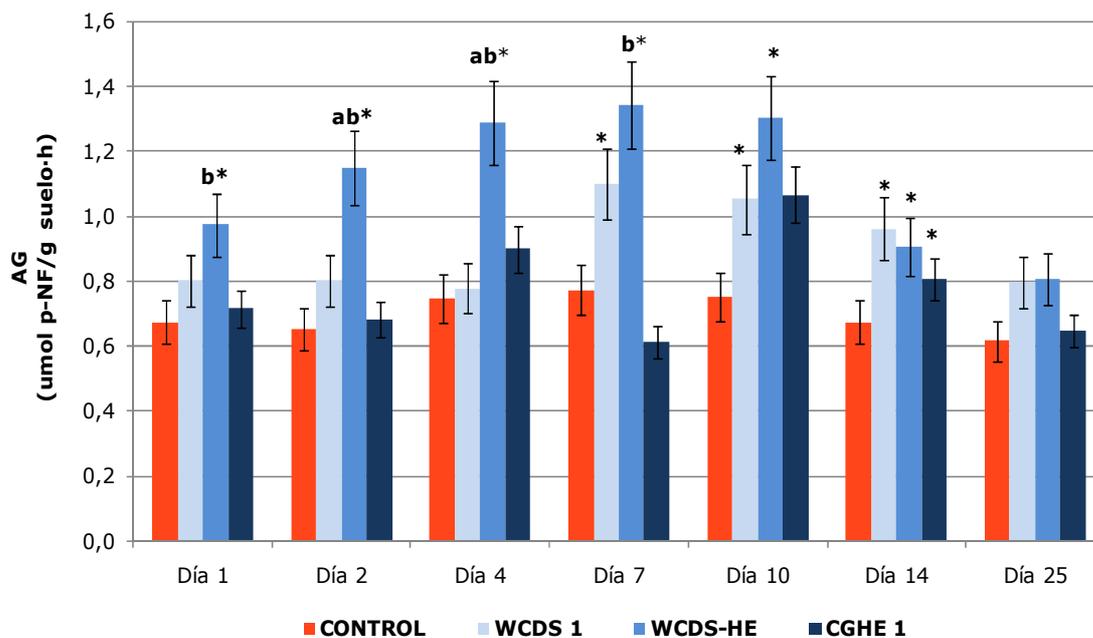


Figura.34: Evolución temporal de la actividad β-glucosidasa en suelos control y tratados con WCDS y los BSE. 1% (p/p) de MO. Los resultados expresados son valores medios de 3 análisis. DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001. *: tratamientos frente al control; a: WCDS-HE frente a WCDS; b: WCDS-HE frente a CGHE

4.2.4. Determinación del contenido de ATP del suelo

Se ha determinado el contenido de ATP en suelo por ser un buen indicador de los cambios que se producen en el suelo, ya que los niveles de esta molécula energética suelen responder a cambios de las condiciones ambientales de forma muy rápida.

Al observar los datos obtenidos de la cuantificación del contenido de ATP del suelo, se comprueba que los niveles de ATP responden a la aplicación de MO, ya sea hidrolizada (BSE) o sin hidrolizar.

El contenido de ATP, como en el caso de la ADH o la APHA, está, fuertemente, influenciado por la presencia de ambos BSE. Así, los tratamientos con WCDS-HE y CGHE producen los mayores valores de actividad metabólica inducida. Hay que señalar, también, que los controles de referencia muestran un contenido de ATP basal, relativamente, elavado, que con el tiempo tiende a decrecer.

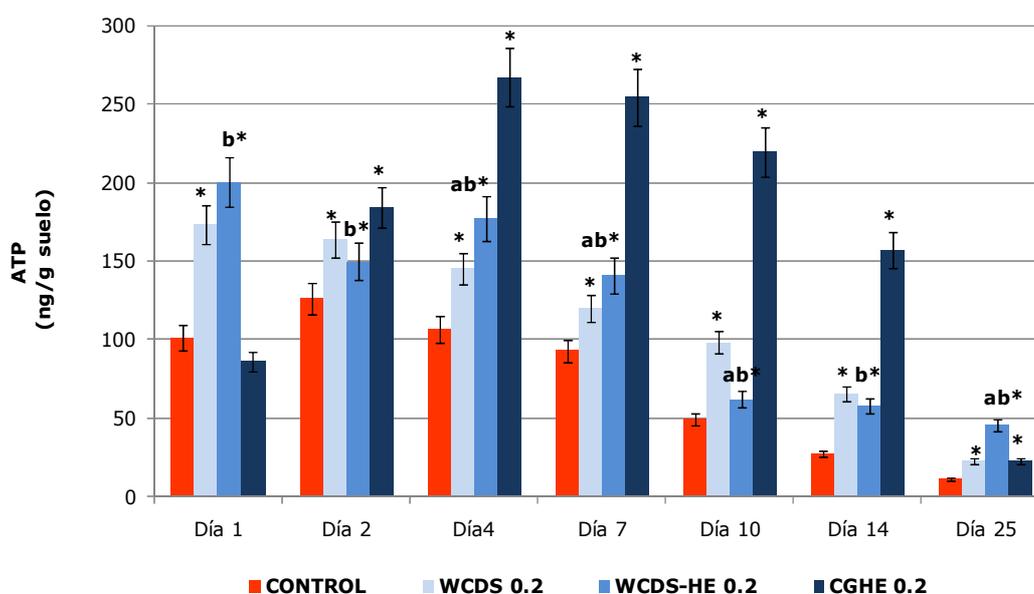


Figura.35: Contenido de ATP en suelos control y tratados con WCDS y los BSE. 0.2% (p/p) de MO.

Los resultados expresados son valores medios de 3 análisis.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001. *: tratamientos frente al control; **a**: WCDS-HE frente a WCDS; **b**: WCDS-HE frente a CGHE

Más detalladamente, analizando los resultados por tratamientos y dosis, se aprecia como, en el caso de WCDS-HE, al 0.2%, p/p, la inducción de la actividad metabólica es muy rápida, de forma que tras 24 horas, se alcanza un contenido máximo de ATP de 200 ± 21.32 ng de ATP/g suelo (que duplica a los valores de referencia), tras el cual, la tendencia es a decrecer con el tiempo hacia valores iniciales. Sin embargo, al finalizar el ensayo, a los 25 días, existen, aún, niveles de ATP elevados con respecto al suelo control (45.86 ± 5.21 ng ATP/g suelo frente a 11.8 ± 1.6 ng ATP/g suelo) y, también, con respecto al suelo tratado con WCDS (22.92 ± 2.6 ng ATP/g suelo). De hecho, los niveles de ATP, medidos a lo largo de todo el ensayo de bioestimulación (a esta dosis), en el suelo tratado con WCDS-HE son, significativamente, superiores a los encontrados en el tratamiento con WCDS.

En cuanto a CGHE, el segundo BSE estudiado, a dosis del 0.2% (p/p) revela una marcada capacidad bioestimulante, puesto que es el tratamiento que mayores concentraciones de ATP en suelo produce. El efecto bioestimulante de este producto no es tan rápido como el de WCDS-HE, pero, evidentemente, el suelo y los organismos del suelo, responden de forma rápida a la presencia de este BSE rico en MO, altamente, soluble y, por tanto, biodisponible. Así, a los 2 días de incubación, mientras el contenido de ATP en el tratamiento con WCDS-HE está decreciendo, en este caso, se observa la subida del contenido de ATP hasta alcanzar a los 4 días un valor superior a los 250 ng ATP/g suelo. Tras alcanzar este valor, con el tiempo, el contenido de ATP decrece, paulatinamente, de forma que a los 14 días aún se encuentran valores, significativamente, elevados (219.76 ± 16.12 ng ATP/g suelo).

En cuanto a los resultados obtenidos a dosis 1%, p/p, en el caso de WCDS-HE, también, se observa una respuesta muy rápida. Así, el contenido de ATP alcanza valores por encima de los 230 ng ATP/g suelo, en tan sólo 24 horas. Este contenido se va incrementando con el tiempo hasta un valor máximo de 410.563 ± 45 ng ATP/g suelo, valor que se alcanza a los 4 días de incubación, que está próximo a cuadruplicar el valor de referencia del suelo control. Además, como se concluye por estos datos, se comprueba que a mayor dosis de MO, mayor es el efecto.

Si se observa la Figura.36, se ve como la evolución del contenido de ATP (para CGHE) sigue el mismo perfil que en el caso de la dosis 0.2% (p/p), es decir, a las 48 horas se aprecia una significativa diferencia entre el contenido de ATP del tratamiento y el suelo control (218.40 ± 14.83 ng ATP/g suelo frente a los 126.41 ± 10.91 ng ATP/g suelo del control). De igual forma que, como se ve en la Figura.35 (0.2%, p/p), el contenido sube hasta alcanzar un máximo, en este caso, a los 7 días, de 301.60 ± 11.32 ng ATP/g suelo. Una vez alcanzado este máximo, disminuye la concentración de ATP de forma paulatina y, finalmente, mantiene niveles, significativamente, superiores a los del suelo control y, también, a los del suelo tratado con WCDS-HE.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en el caso del tratamiento con WCDS, se puede decir que, independientemente de la dosis empleada, existe una notable diferencia en la capacidad inductora del metabolismo del suelo entre de WCDS y ambos BSE. Así, los valores máximos de ATP en el tratamiento con WCDS son inferiores a los máximos obtenidos en el caso de los BSE. A dosis 0.2%, este

máximo alcanzado en WCDS es entre 1.15 y 1.5 veces inferior que el valor máximo obtenido para WCDS-HE y CGHE, respectivamente. Empleando una dosis del 1%, las diferencias están en el mismo rango, pero se invierten los tratamientos, siendo mayor la diferencia con WCDS-HE.

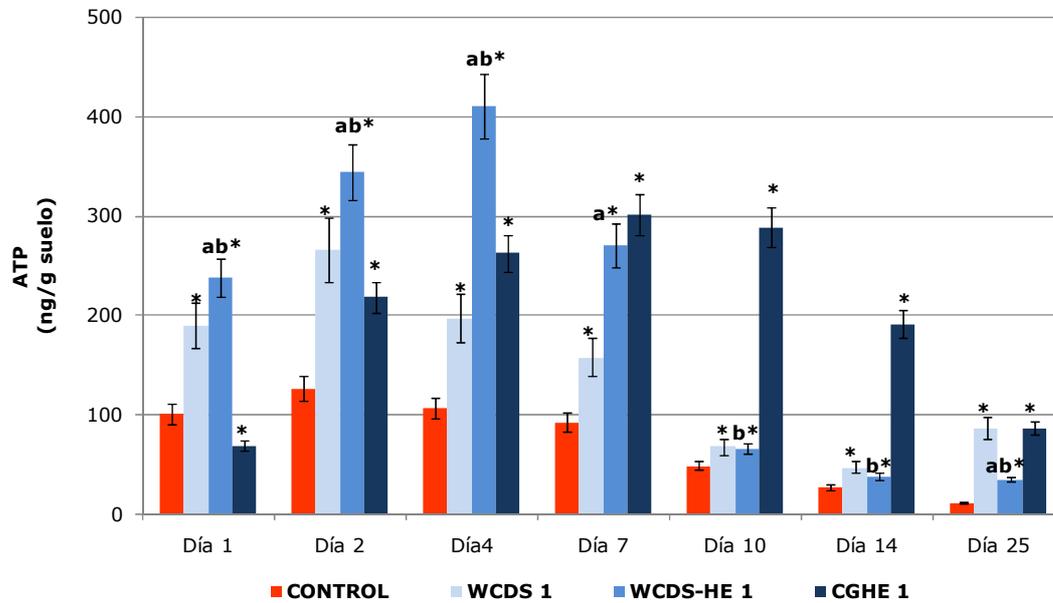


Figura.36: Contenido de ATP en suelos control y tratados con WCDS y los BSE. 1% (p/p) de MO. Los resultados expresados son valores medios de 3 análisis. DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> $P < 0.001$. *: tratamientos frente al control; **a**: WCDS-HE frente a WCDS; **b**: WCDS-HE frente a CGHE

4.2.5. Discusión

En los últimos años, el interés por el suelo como recurso natural ha crecido, notablemente, debido, en gran parte, al incremento de la conciencia de que el suelo es un componente fundamental de la Bioesfera, que cumple con numerosas funciones vitales para el mantenimiento de los ecosistemas terrestres (Marcote y col., 2001).

El suelo es un sistema complejo, en equilibrio dinámico, de enorme importancia, no sólo en la producción agrícola, sino, también, en el mantenimiento de la calidad ambiental (Marcote y col., 2001).

Una de sus principales funciones es la de servir de soporte y de suministro de energía y nutrientes a los microorganismos que habitan en él. Estos microorganismos edafológicos tienen, a su vez, un papel esencial en el sostenimiento de la calidad y la fertilidad del suelo, debido, principalmente, a que son los responsables de la degradación de la MO, para la obtención de energía y nutrientes. De esta manera, dan lugar a compuestos y elementos minerales más simples, que constituyen la base nutricional de plantas y de los demás organismos que crecen y se desarrollan en el suelo. Así, los microorganismos desempeñan una función fundamental en el ciclo global de la MO, mineralizándola hasta CO₂ y H₂O, nitrógeno, fósforo, azufre y otros nutrientes (Bloem y col., 1997). Estos nutrientes inmovilizados en la biomasa microbiana, posteriormente, son liberados cuando los microorganismos son degradados.

El contenido de MO de un suelo es, por tanto, un parámetro indicador de la fertilidad del suelo, ya que constituye la principal reserva de nutrientes esenciales, tales como el N, el P y el S, que son fundamentales para el crecimiento de los distintos organismos. Además, esta MO está bien relacionada con un importante número de propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Arias y col., 2005). De hecho, está unida a la cantidad, tipo y actividad de los microorganismos edafológicos.

Habitualmente, como práctica agrícola se ha aportado MO al suelo, como nutriente de plantas y cultivos, en forma de residuos orgánicos, tales como estiércol (Haynes y Naidu, 1998), lodos de depuración de aguas residuales (Albiach y col., 2001), compost (Tejada y González, 2003) o subproductos agroindustriales

(Tejada y González, 2004a), es decir, productos orgánicos, de muy variada composición y, en muchos casos, desconocida, pero, sobre todo, de baja absorción por parte de los organismos vivos edafológicos.

En este trabajo, se ha planteado la aplicación, como nutrientes edafológicos, de dos nuevos productos, ricos en MO, como son WCDS-HE y CGHE, con el objetivo de evaluar su capacidad de estimular la actividad metabólica del suelo. Como ya se ha descrito en etapas anteriores de este trabajo, estos productos, se han obtenido, a partir de diversos SOA, mediante un proceso de hidrólisis enzimática, descrito y empleado, con anterioridad, para la obtención de bioestimulantes/biofertilizantes (Romero y col., 2007; Parrado y col., 2007). Como consecuencia de la hidrólisis, su componente proteico ha reducido su tamaño molecular, dando lugar a péptidos y aminoácidos libres.

La novedad que supone la aplicación de WCDS-HE y CGHE como biofertilizantes/bioestimulantes radica en que sus componentes orgánicos, en la forma y propiedades que se presentan, son, altamente, biodisponibles para plantas y microorganismos, al ser componentes de elevada solubilidad y de bajo peso molecular, lo que facilita, notablemente, su absorción. Está demostrado que el rango de mineralización de las proteínas hasta CO₂ es, significativamente, inferior a rango de incorporación de los aminoácidos en el suelo (Jan y col., 2009).

Precisamente, esta propiedad (tamaño molecular) determina que el N se presente de una forma, fácilmente, absorbible por parte de todos los organismos vivos del suelo, tales como plantas (Higgins y Payne, 1982; Steiner y col. 1995) y microorganismos (Parrado y col., 1993; Vasileva-Tonkova y col., 2007). Así, recientes estudios han sugerido, por ejemplo, que las plantas son capaces de absorber N orgánico de bajo peso molecular, directamente del suelo, en forma de aminoácidos, aunque se desconoce aún su importancia en la regulación de la productividad de las plantas (Jones y col., 2005). Por otro lado, los aminoácidos pueden ser absorbidos, fácilmente, por las poblaciones microbianas edafológicas mediante una serie de transportadores de membrana (Jones y Hodges, 1999). De hecho, los microorganismos son capaces de usar, directamente, pequeños péptidos (Walker y Altman, 2005), pero, las proteínas que se añaden al suelo, a priori, deben ser hidrolizadas hasta péptidos y aminoácidos por acción de distintas proteasas extracelulares, para que puedan ser absorbidos tanto por plantas como por los propios microorganismos (Jan y col., 2009), debido a la falta de

transportadores de proteínas capaces de transferir intactas éstas a través de las membranas celulares. Esto sugiere que la ruptura de las proteínas en el suelo es un paso limitante en la incorporación de N a los organismos vivos edafológicos.

Para evaluar si la disminución del tamaño molecular de los BSE incrementa el potencial bioestimulante al facilitar el proceso de absorción, se ha analizado la actividad metabólica del suelo en respuesta a la adición de estas materias orgánicas, proceso que puede ser monitorizado a través de una serie de parámetros y/o bioindicadores (García y Hernández, 2000; Trasar-Cepeda y col., 2000).

La actividad metabólica depende de numerosos factores (Burns, 1978) físicos, químicos, biológicos y bioquímicos, pero es, normalmente, mucho más sensible a los cambios de los dos últimos factores, de forma que, frente a ellos responde de una forma rápida y detectable (Ros y col., 2003).

En este estudio, se han seleccionado diversos parámetros bioquímicos y biológicos como bioindicadores del efecto, sobre la actividad metabólica, de la aplicación de WCDS-HE y CGHE. Entre los parámetros bioquímicos que se han estudiado destacan las actividades de diversas enzimas del suelo, como la ADH, la APH y la AG, todas ellas relacionadas con los ciclos de reciclaje del N, P, C, S,...., y proporcionan información sobre el estado biológico del suelo y, por tanto, sobre sus propiedades físico-químicas (Aon y Colaneri, 2001). Su estudio permite analizar la respuesta del suelo frente a los cambios, como es la aplicación de MO en forma de péptidos y aminoácidos libres.

Estas enzimas del suelo son proteínas que catalizan reacciones químicas que se producen en el medio edafológico, actuando sobre substratos específicos, de tal forma que, como resultado, los productos obtenidos se incorporan a los ciclos biológicos de los elementos. Su determinación se considera un parámetro idóneo para la monitorización de la situación en el suelo. Presentan la ventaja de ser, relativamente, resistentes a procesos de desnaturalización (Ladd, 1978) y, además, son capaces de responder de forma rápida a perturbaciones del medio, porque son capaces de adaptarse, rápidamente, a las condiciones ambientales.

Entre todas las enzimas del suelo de las que se suele determinar su actividad, la ADH se considera una de las más importantes, y por ello, es la que más, ampliamente, se usa como indicador de la actividad biológica del suelo, al ser

un reflejo de la situación metabólica global (Masciandaro y *col.*, 2001), al ser una enzima intracelular relacionada con los procesos de fosforilación oxidativa (Trevors, 1984a).

Los resultados que se han obtenido en este estudio del efecto de la aplicación de WCDS-HE y CGHE sobre la ADH del suelo muestran como ambos productos manifiestan una significativa capacidad bioestimulante. En definitiva, esto era lo esperado, ya que está, ampliamente, demostrado que el aporte de MO estimula la ADH (Rao y Pathak, 1996; Pascual y *col.*, 1998; Liang y *col.*, 2005).

De hecho, se ha podido comprobar que los BSE producen rangos de estimulación superiores a los mostrados para WCDS, sin hidrolizar, lo que sugiere que es consecuencia de la disminución del tamaño molecular del contenido proteico: el alto nivel de ADH en los suelos tratados con WCDS-HE y CGHE sugiere que la biodisponibilidad del material orgánico es elevada y que esto favorece e incrementa la actividad microbiana.

Como se ha mencionado anteriormente, se considera que el auténtico cuello de botella del ciclo del N en el suelo lo constituye la ruptura de las proteínas en péptidos y aminoácidos libres (Jones y *col.*, 2004). Las proteínas que constituyen la MO son, relativamente, recalcitrantes al ataque microbiano debido a la protección físico-química que les brinda el suelo (Schulten y Schnitzer, 1998). En el suelo, las proteínas suelen estabilizarse asociadas a moléculas como los polifenoles (taninoos, sustancias húmicas,...) (Talbot y Finzi, 2008), pero el rango de mineralización depende, fundamental y específicamente, del ecosistema (Joanisse y *col.*, 2008). Esto determina que las proteínas no sean tan accesibles como los péptidos y los aminoácidos libres.

Por otro lado, también, se han determinado la actividad de las enzimas hidrolíticas como la fosfatasa (APH) y las β -glucosidasa (AG), que proporcionan información más específica que la ADH, al estar relacionadas con la mineralización de nutrientes elementales como son el P y el C, respectivamente (Ceccanti y *col.*, 1994).

La APH permite monitorizar los procesos que implican la degradación de la MO. Los microorganismos producen esta enzima debido a la demanda de P (García y *col.*, 1994). Los resultados que se han encontrado en los suelos tratados con los BSE reflejan que esta actividad se ha estimulado por la presencia de los BSE, en

mayor medida que en el suelo tratado con WCDS, siempre con respecto a los valores de referencia del suelo control. Además, se cumple que a mayor dosis de MO añadida al suelo, mayor es el efecto y la respuesta de la APH, aunque en este caso, a diferencia de la ADH, los incrementos no sean tan elevados. Estos resultados coinciden con los encontrados con diversos estudios, como los de Dick, en 1992, en los que se encontró que la APH se incrementaba con la adición de materiales orgánicos.

Por otro lado, la AG, al igual que la APH, está implicada en los procesos de descomposición de la MO. Los resultados encontrados en los suelos bioestimulados con WCDS-HE y CGHE mostraban que a dosis bajas (0.2%, p/p) los niveles de esta actividad no eran, significativamente, superiores a los valores control, y, además, el efecto del menor tamaño molecular de las proteínas no estaba claro. Así, a esta dosis, los valores de AG más elevados se dan en WCDS y CGHE, que son muy similares. Sin embargo, a mayores dosis, sí que resultó significativo el incremento de actividad enzimática; así, en esta situación, el efecto positivo sobre la AG de la ruptura de las proteínas es apreciable, de forma que, en pocas horas, la AG determinada en el suelo tratado con WCDS-HE es superior a la medida en el suelo con WCDS.

Junto con las actividades enzimáticas, para conocer la situación de un suelo, se suelen determinar otra serie de parámetros o bioindicadores. Entre otros parámetros bioquímicos de estudio habituales se encuentra la medida del contenido de ATP del suelo. El ATP ha sido estudiado siempre como medida de la biomasa microbiana en el suelo (Lee y *col.*, 1971; Oades y Jenkinson, 1979; Fairbanks y *col.*, 1989; Lin y Brookes, 1996). Sin embargo, diversos autores (Nannipieri, 1990) consideran que, más bien, es una medida de la actividad microbiológica del suelo. Se emplea porque, al igual que las actividades enzimáticas, la producción de ATP en respuesta a los cambios del entorno se ve, rápidamente, afectada por sutiles perturbaciones de las condiciones ambientales.

Por todo ello, se de han determinado los niveles de ATP en el suelo en este trabajo y se ha visto que eran, significativamente, superiores en el caso de los suelos tratados con BSE con respecto a los niveles de referencia, pero, también, respecto a los valores determinados en el caso del suelo con WCDS; por lo que, de nuevo, el efecto de la ruptura del material proteico producía un incremento de la capacidad bioestimulante del BSE (reflejada por la diferencia entre los valores

medidos en el tratamiento con WCDS y con WCDS-HE, independientemente, de la dosis). Así, se determina que existe una buena correlación entre la actividad enzimática y el contenido de ATP.

Por otro lado, se han estudiado otros parámetros biológicos, generales, para el análisis de la bioestimulación, basados en el estudio del incremento de la población microbiana, determinada, directamente, mediante el cultivo en placa y el posterior recuento de colonias, o bien, mediante la cuantificación del contenido de ergosterol, que permite estudiar el incremento de la población microbiológica, en este caso, fúngica.

El cultivo en placa de las poblaciones de microorganismos presentes en el suelo proporciona información sobre el crecimiento microbiológico en respuesta a la presencia de los distintos tratamientos bioestimulantes. En el trabajo que se presenta, se ha empleado el cultivo en placa, con el objetivo, no de identificar microorganismos, sino de evaluar el efecto de los BSE sobre el crecimiento microbiano y comprobar, de nuevo, si existen diferencias en los resultados, debido al tamaño diferencial de los componentes que los constituyen.

Los datos obtenidos reflejan que los BSE inducen el crecimiento y desarrollo de los microorganismos que en el suelo habitan, resultando evidente que un mayor aporte de MO produce mayores tasas de crecimiento, tanto bacteriano como fúngico (efecto dosis), pero, a diferencia de los resultados revelados por los parámetros bioquímicos, no siempre se comprueba que la aplicación de péptidos y aminoácidos produzca un efecto incrementado del crecimiento microbiológico si se compara con el material sin hidrolizar (WCDS). Lo que sí es evidente, es el marcado carácter inductor del crecimiento microbiológico, observable al comparar los rangos de crecimiento de los tratamientos con los valores encontrados en el suelo control.

Hay que señalar que estas técnicas dependientes de cultivo presentan numerosas limitaciones, aunque parten de la suposición de que permiten recuperar la mayor parte de microorganismos de una muestra (Viñas, 2005a). Sin embargo, es sabido que, únicamente, entre el 0.1% y el 10% de las bacterias resultan cultivables (Rondon y *col.*, 2000; Watts y *col.*, 1999; Tiedje y Stein, 2000; Handelsmann y *col.*, 2002; Torsvik y *col.*, 2002).

Existen numerosas explicaciones de este fenómeno: falta de conocimiento sobre los requerimientos nutricionales y las condiciones físico-químicas necesarias para el desarrollo de diversos grupos microbianos; falta de información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que se dan entre los miembros de una comunidad microbiana (McDougald y *col.*, 1998; Tiedje y Stein, 2000; Zengler y *col.*, 2002; Keller y Zengler, 2004). También, se ha sugerido que las bacterias no cultivables son, filogenéticamente, similares a las cultivables, pero su estado fisiológico las hace recalcitrantes a ser cultivadas (Escalante-Lozada y *col.*, 2004).

De cualquier forma, no existe una explicación satisfactoria para entender el bajo porcentaje de microorganismos cultivables, pero este hecho limita mucho los estudios de diversidad microbiana del suelo y de cuantificación de microorganismos existentes. De modo que, todas estas limitaciones y desventajas de la metodología clásica de estudio de las poblaciones microbiológicas del suelo pueden estar detrás de los resultados obtenidos en este trabajo.

En cuanto al análisis del contenido de ergosterol del suelo, es interesante determinar este parámetro como índice de la presencia de hongos (Davis y Lamar, 1992) ya que es una molécula propia de estos (Weete, 1989) y de ciertas microalgas (Newell y *col.*, 1987).

Al igual que la cuantificación de microorganismos en placa, este parámetro suministra información sobre la respuesta del suelo y, de los hongos del mismo, a la presencia de MO, altamente, biodisponible. Durante el desarrollo de este estudio, la influencia de los distintos tratamientos bioestimulantes sobre el crecimiento fúngico, incluido su magnitud, resultó ser un aspecto, realmente, visible. A los pocos días de incubación con los bioestimulantes, se apreciaban, de forma notable, bien desarrolladas distintas poblaciones de hongos, y, además, esas poblaciones eran mayores a mayores dosis. Visualmente, se apreciaba que no existían diferencias relativas a la naturaleza del bioestimulante, pero sí que era determinante la dosis y el tiempo de incubación, de modo que, una mayor dosis de bioestimulante inducía mayores incrementos de poblaciones fúngicas, pero además, a lo largo del tiempo, se podía comprobar como la dinámica del crecimiento fúngico era distinto en función del tratamiento.

La molécula de ergosterol viene empleándose, habitualmente, como un indicador de la biomasa fúngica del suelo (Grant y West, 1986; Frostegard y Baath,

1996), pero, como en el caso de la cuantificación, mediante cultivo, del crecimiento microbiano, es un parámetro que se emplea, también, como indicador del efecto sobre el crecimiento fúngico del suelo.

Visto en el laboratorio el efecto de la aplicación de MO sobre el crecimiento fúngico, en este trabajo, se planteó el análisis de contenido de ergosterol y los resultados obtenidos han mostrado una dinámica similar a la encontrada en la cuantificación, en placa, de poblaciones fúngicas. En este caso, se ha comprobado que, aunque los mayores contenidos de ergosterol se dan en el suelo tratado con WCDS-HE (1%, p/p) a las dos semanas de ensayo, los datos no sugieren que el menor tamaño molecular de péptidos y aminoácidos sea determinante a la hora de incrementar las poblaciones fúngicas. Se ha visto como el contenido en ergosterol en el suelo con WCDS, a determinados tiempos y en función de la dosis, supera los niveles encontrados en los suelos con BSE.

Determinar y cuantificar el contenido de ergosterol de muestras de suelo presenta ventajas tales como su especificidad, en contraste con las actividades enzimáticas y el contenido de ATP (Djajakirina *y col.*, 1996), es decir, se está determinando el comportamiento de los hongos y levaduras en respuesta a la adición de MO en forma de péptidos y aminoácidos libres, pero presenta también ciertos inconvenientes que pueden limitar su potencial como bioindicador de los procesos que tienen lugar en el suelo. El contenido de ergosterol de los hongos varía de unas especies a otras y depende del estado fisiológico de las mismas (Huang *y col.*, 1985; Newell *y col.*, 1987). Además, no todos los grupos de hongos y levaduras producen ergosterol (Weete y Weber, 1980), grupos que pueden resultar importantes en determinados suelos (Stahl y Parkin, 1996); otro inconveniente que se ha descrito sobre el contenido de ergosterol del suelo es su elevada variabilidad en los hongos del suelo en los ambientes naturales (Newell, 1992). Todos estos aspectos negativos han contribuido a la dificultad de estimar el contenido de ergosterol en los suelos de este estudio de bioestimulación. No obstante, los resultados mostrados reflejan el efecto estimulante de la aplicación de MO y, la influencia positivo del menor tamaño molecular de las proteínas.

Como se ha mencionado, el cultivo tradicional en placa permite el aislamiento y la identificación de los microorganismos implicados en el proceso de bioestimulación, pero estas técnicas presentan la limitación de que sólo una pequeña fracción de todas las bacterias del suelo pueden ser aisladas y

caracterizadas (Torsvik y *col.*, 1998). Así, los estudios de caracterización de las poblaciones microbianas del suelo basados en el estudio de los genes de las poblaciones biológicas surgen como alternativas eficaces. Esto complementa, en algunos casos, el análisis metabólico de los suelos (Escalante-Lozada y *col.*, 2004).

En este trabajo se ha analizado el efecto de la aplicación de MO en la composición poblacional del suelo y su biodiversidad mediante métodos moleculares no dependientes de cultivo tales como la electroforesis en gel en gradiente desnaturante (DGGE). Los resultados muestran que no existen cambios poblacionales a lo largo del tiempo, ni en los suelos control ni en los suelos bioestimulados. Se ha comprobado como existe una dominancia de algunas especies (mayor intensidad de bandas) y la aparición y desaparición de bandas minoritarias, tal vez, causadas, precisamente, por su bajo nivel y abundancia. Estos resultados son los esperados puesto que se está aplicando al suelo productos constituidos por los compuestos habituales y propios del metabolismo microbiano, que dispone de las rutas metabólicas adecuadas para su mineralización.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. Tanto WCDS-HE como CGHE no resultan tóxicos para los microorganismos del suelo.
2. Se ha diseñado y desarrollado un modelo de monitorización del proceso de bioestimulación, basado en la determinación y el análisis de distintos parámetros o bioindicadores de propiedades del suelo.
3. En todos los ensayos de bioestimulación llevados a cabo, WCDS-HE y CGHE inducen, ambos, fuertes y rápidos incrementos en la actividad microbiológica del suelo, como han puesto de manifiesto los resultados de las determinaciones enzimáticas (deshidrogenasa, fosfatasa y β -glucosidasa) y la medida de la producción de ATP.
4. La estimulación microbiana es rápida, en cuestión de días, obteniéndose de forma significativa incrementos de actividad metabólica en el suelo en cuestión de 2-4 días.
5. La capacidad bioestimulante de ambos productos es diferente. La primera diferencia se encuentra en el tiempo de acción, de forma que WCDS-HE induce la máxima actividad metabólica en 2-4 días frente a los 7 días que tarda CGHE en producir valores máximos. La segunda diferencia se encuentra en la amplitud de la respuesta que producen, siempre superior en el caso de los suelos tratados con WCDS-HE.
6. El efecto bioestimulante es dependiente de la dosis, de forma que los máximos valores de actividad se alcanzan siempre a dosis 1%-5%.
7. Ambos BSE inducen un aumento de la biomasa tanto de bacterias totales como de hongos y levaduras, siendo este crecimiento dosis-dependiente en el caso de los aerobios totales. En el caso del crecimiento de hongos y levaduras, el efecto de la dosis no es tan evidente.

8. Los BSE no provocan cambios en la diversidad microbológica del suelo a lo largo de todo el ensayo, encontrándose hasta 9 bandas comunes de DGGE entre los distintos tratamientos de bioestimulación.

CAPÍTULO III:

***"Estudio de la influencia de la aplicación de BSE
sobre el proceso de biorremediación de suelos
contaminados con distintos xenobióticos"***

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Un suelo contaminado es aquél que contiene componentes químicos de carácter peligroso y de origen humano, que pueden alterar las características del suelo, tanto físico-químicas como biológicas, en una concentración tal que comporte un riesgo inaceptable para la salud humana o el medio ambiente, y, además, así se haya declarado mediante resolución expresa (art. 3, Ley 10/1998, de Residuos).

En general, los suelos contaminados representan un grave problema ambiental, agravado por la escasa, y, en todo caso, insuficiente, percepción social de sus posibles consecuencias. Es un problema generalizado en todo el mundo, precisamente, debido a la falta de sensibilidad respecto a la contaminación ambiental, que aún persiste en nuestros días.

1.1. Legislación ambiental española sobre suelos contaminados

A nivel europeo, no existe una normativa específica de protección del suelo, pero sí se han establecido las bases legales para que distintos países, como Dinamarca, Holanda, Reino Unido, Alemania, Suecia, Bélgica y, finalmente, España, hayan desarrollado, de forma específica, leyes relacionadas con la protección de los suelos frente a la contaminación.

En España, en 1995, se aprobó el I Plan Nacional de recuperación de suelos contaminados (1995-2005), en el que se fijaban una serie de objetivos en materia de gestión medioambiental y de suelos, principalmente. Este Plan supuso el punto de partida en España de las iniciativas para la protección del suelo frente a la contaminación.

1.1.1. Ley 10/1998, de Residuos.

Esta ley es la primera norma legal que ha permitido proteger, eficazmente, los suelos contra la contaminación y, en caso de contaminación, establecer las pautas para identificar estos suelos contaminados y caracterizarlos, mediante una metodología normalizada.

Brevemente, sus principales contenidos son:

- Régimen técnico-jurídico básico de los suelos contaminados.
- Establecimiento de la obligación de descontaminación de todos los terrenos declarados contaminados.
- Determinación de los criterios de caracterización de un emplazamiento contaminado.
- Exigencia de un listado de actividades, potencialmente, contaminantes del suelo.
- Criterio de responsabilidad.
- Establecimiento de la responsabilidad de la Administración en las tareas de descontaminación.

1.1.2. Real Decreto 9/2005, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados

En este Real Decreto 9/2005 se encuentra una relación de actividades, potencialmente, contaminantes del suelo y se recogen los criterios básicos para clasificar un suelo como contaminado.

Establece 2 tipos de prescripciones:

- De carácter ambiental: se recoge un listado con las actividades, potencialmente, contaminantes del suelo (104). Además, también, establece un doble listado donde se detallan las sustancias, potencialmente, contaminantes (para la salud humana por un lado y por otro, para los ecosistemas); determina los criterios básicos para la declaración de suelo contaminado; crea la figura de evaluación del riesgo y recoge, también, los criterios fundamentales para la identificación de suelos que requieren una valoración de riesgos y los criterios para llevar a cabo esta valoración de los riesgos,...
- De carácter técnico-administrativo: se determinan los Niveles Genéricos de Referencia (NGR), que se definen como la concentración de un contaminante a partir de la cual hay que realizar un estudio de riesgos, para determinar si éste es aceptable para la salud humana y

para el medio ambiente, que dependerá, fundamentalmente, del uso del suelo; se establece un régimen sancionador,...

1.1.3. II Plan Nacional de recuperación de suelos contaminados

En el año 2007, se aprobó el II Plan Nacional de recuperación de suelos contaminados (2007-2015). Los objetivos de este plan se centran en: la promoción de medidas de prevención de la contaminación; la creación de un inventario nacional de suelos contaminados, según el R.D. 9/2005 (relación de actividades, potencialmente, contaminantes del suelo) y la elaboración de un mapa nacional de emplazamientos contaminados; la plena puesta en marcha del R.D. 9/2005; y, la elaboración de una estrategia nacional de rehabilitación de los suelos contaminados.

Este Plan Nacional establece, de manera prioritaria, la prevención de la contaminación, pero, en casos de contaminación previa, promueve la implantación de un programa de medidas de recuperación ambiental de estos suelos, mediante medidas de descontaminación. Siempre que sea posible, la recuperación se orientará a eliminar los focos de contaminación y a reducir la concentración de los contaminantes del suelo.

Para ello, se concede gran importancia a la aplicación de las mejores técnicas disponibles, en función de las características de cada caso. Las actuaciones de recuperación que se establezcan como adecuadas, en función de cada situación, deben garantizar que materializan soluciones permanentes. Además, se hace prevalecer, en la medida de lo posible, las técnicas de tratamiento *in situ* que eviten la generación y traslado del residuo.

1.2. Biorremediación de suelos contaminados

La biorremediación es una técnica de descontaminación de suelos que emplea procesos naturales para eliminar las sustancias químicas perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente.

El proceso más importante de transformación de estas sustancias perjudiciales, en el que se basa la biorremediación, es la biodegradación, entendiendo por biodegradación el resultado de los procesos de digestión,

asimilación y metabolización de un compuesto orgánico, llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos y otros organismos.

Hay que destacar que los sistemas de tratamiento biológico de suelos y, también, de aguas contaminadas, se presentan como alternativas viables y prometedoras frente a las técnicas físico-químicas convencionales de descontaminación (excavación, extracción química, incineración,...). Estos procesos físico-químicos tradicionales son, económicamente, muy costosos y, a menudo, no solucionan de forma permanente el riesgo de contaminación (riesgo: probabilidad de que un contaminante presente en el suelo entre en contacto con algún receptor, con consecuencias adversas para la salud de las personas o para el medio ambiente).

Sin embargo, la tecnología de la biorremediación, basada en el empleo de los microorganismos y su potencial metabólico biodegradador, para eliminar o transformar los contaminantes del medio en productos inocuos (Alexander, 1999), manifiesta ciertas ventajas respecto a las metodologías tradicionales, tanto por su menor coste económico (Ulrici, 2000), como por la no afectación de otros compartimentos ambientales y la optimización de los recursos (Exner, 1994; Klein, 2000; Viñas, 2005a). Además, su efectividad y su mayor aceptación por el público en general, como se deriva del hecho de ser un proceso basado en actividades naturales de los microorganismos, hacen de la biorremediación un candidato ideal para numerosos casos de recuperación de zonas contaminadas (Gibson y Subramanian, 1984).

No obstante, hay que tener en cuenta que los procesos biológicos aplicados a la biorremediación (biodegradación), también, presentan inconvenientes frente a otros tratamientos, debido, principalmente, al tiempo necesario para alcanzar unos niveles de biodegradación aceptables (según normativas). Es sabido que durante un proceso de biorremediación se produce una ralentización del proceso de biodegradación, ya sea por un enriquecimiento de componentes recalcitrantes o por una disminución de la biodisponibilidad de los contaminantes (Alexander, 1999; Alexander, 2000; Viñas, 2005a).

1.2.1. Biodegradación microbiana de xenobióticos

Los microorganismos que viven en el suelo son capaces de metabolizar gran parte de los productos xenobióticos (sintetizados por el hombre y con estructuras diferentes a los productos naturales), que se vierten al medio.

El gran problema de estos compuestos xenobióticos radica en su gran persistencia en el medio ambiente (Castillo y *col.*, 2005), lo que aumenta su toxicidad. Sin embargo, su composición química elemental, aunque distinta, suele ser similar a los compuestos orgánicos habituales en la naturaleza. Por ello, cuando los microorganismos implicados en la descontaminación digieren en su totalidad las sustancias químicas presentes en el subsuelo, las transforman en los productos habituales del metabolismo: agua y dióxido de carbono.

Por esto, la biodegradación es una herramienta muy poderosa para mitigar la contaminación medioambiental (Collin, 2001), sobre todo, en suelos contaminados con compuestos orgánicos.

La biodegradabilidad de un xenobiótico presente en un suelo depende de diversos factores como son:

- La presencia de una población microbiana degradadora, potencialmente, activa.
- La estructura molecular del contaminante, su concentración y biodisponibilidad.
- Factores ambientales como el pH, la temperatura, la humedad del suelo, la presencia de aceptores de electrones disponibles y la existencia de nutrientes disponibles.

Los factores ambientales suelen ser determinantes a la hora de influir sobre el rango de biodegradación de un compuesto por parte de una cepa, puesto que cada una tiene un determinado rango de tolerancia. Por ejemplo, factores ambientales como la temperatura, el pH y la salinidad influyen en el proceso de biodegradación, de forma que pueden afectar al crecimiento y actividad de las poblaciones microbianas. Así, la biodiversidad se hace, en estos casos, vital, puesto que, cuanto mayor sea la diversidad de microorganismos existentes, teóricamente, mayor será el rango de tolerancia.

No existen unas condiciones preestablecidas que sean óptimas en todos los casos, pero en términos generales, a pH y temperaturas extremas y en suelos salinos, la biodegradación se ralentiza, siendo los rangos óptimos para la biodegradación un pH entre 6-8 y temperaturas entre 20-30°C (Alexander, 1999).

La variación del pH del suelo afecta a la actividad microbiana y, también, a la solubilización y adsorción/absorción de los contaminantes. En general, el pH óptimo para las bacterias heterótrofas es neutro (pH 6-8), mientras que es más ácido para los hongos (pH 4-5), de forma que, se establece que el pH óptimo para los procesos de biodegradación es neutro (pH 7.4-7.8) (Dibble y Bartha, 1979). En determinados casos, se ha conseguido duplicar la biodegradación de un suelo contaminado con gasolina incrementando el pH de 4.5 a 7.4 (Verstraete y col. 1976). También, con poblaciones microbianas adaptadas, se han descrito procesos de biodegradación de HAPs en suelos, extremadamente, ácidos (pH 2) (Stapleton, 1998).

La temperatura, también, es uno de los factores ambientales que más afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas. Se debe a que las reacciones están catalizadas por enzimas, que cumplen con esta ley. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor, lo que conlleva a una pérdida de su actividad catalítica. Todas las enzimas presentan una temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima (temperatura óptima), es su temperatura óptima de acción. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece, rápidamente, hasta anularse. Los límites de actividad para la mayor parte de las enzimas tienen lugar entre los 10°C y 50°C.

Otro parámetro fundamental que influye en el proceso de biodegradación es la humedad del suelo, que puede limitar de forma severa el proceso degradativo, fundamentalmente, en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de agua. Un déficit de agua en el suelo puede disminuir el transporte de nutrientes y de contaminantes, así como, la migración bacteriana a través del suelo. Por otro lado, el exceso de agua en un suelo desplaza el aire residente en los poros, generándose, con mayor facilidad, condiciones anaeróbicas, al agotarse el oxígeno disuelto en agua (Alexander, 1999; Menn y col., 2000).

Dibble y Bartha, 1979, describieron un rango de humedad óptimo del 30%-90% de la capacidad de campo en el caso de un proceso de biodegradación aeróbica de suelos contaminados con crudo de petróleo, mientras que otros autores, como Lajoie y Strom (1994) y, también, Pramer y Bartha (1972), recomendaron llevar a cabo procesos de biorremediación a una humedad entre el 50% y 70% de la capacidad de campo.

Brevemente, la tasa de degradación va a depender, también, tanto de la capacidad de transporte y del metabolismo microbiano, como de la transferencia de masas del compuesto. La relación entre estos factores se conoce como biodisponibilidad. En los suelos, la transferencia de masas limita la biodegradación. Los microorganismos edafológicos suelen tener amplias capacidades biodegradativas, al estar expuestos a una gran variedad de compuestos orgánicos diferentes, pero los procesos de adsorción, absorción, desadsorción, disolución y difusión son fenómenos, propios de la transferencia de masas, que condicionan la biodisponibilidad de los contaminantes (Stucki y Alexander, 1987; Tabak y *col.*, 1994 y 1995; Harms y Bosma, 1996; Bosma y *col.*, 1997). Con la finalidad de aumentar la disponibilidad de los xenobióticos existen numerosos ejemplos en la bibliografía de la utilización de tensioactivos sintéticos y biotensioactivos en los tratamientos para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos (Volkering y *col.*, 1998; Chritofi y Ivshina, 2002).

En cuanto a la influencia de los nutrientes, las concentraciones de nitrógeno y fósforo asimilables presentes en el suelo suelen ser limitantes para lograr el incremento y activación de la población microbiana, mientras que otros nutrientes esenciales, como el Ca, Na, Fe y S, suelen estar ya presentes en cantidades suficientes en el suelo (Menn y *col.*, 2000).

La adición de fuentes de N y P inorgánicas, generalmente, tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados (Dott y *col.*, 1995; Breedveld y Sparrevik, 2001; Chaineau y *col.*, 2003). Las proporciones molares de C:N:P, descritas en la bibliografía, respecto al contenido de carbono son muy distintas. Se recomienda utilizar proporciones C:N de 100:10 a 1000:10 para la biodegradación de suelos contaminados por hidrocarburos y dentro de este intervalo se han descrito proporciones C:N de 600:10 (Dibble y Bartha, 1979), 500:10 (Zhou y Crawford,

1995) y de 100:10 a 300:10 respecto al carbono orgánico total a degradar (Bossert y Bartha, 1984; Oudot y Dutrieux, 1989; Alexander, 1999; Atagana y col., 2003).

Aunque, en general, la adición de fuentes inorgánicas de N y P al suelo es beneficiosa para los procesos de biodegradación, existen estudios que han descrito efectos inhibitorios en la adición de nutrientes inorgánicos. Morgan y Watkinson (1992) describieron una inhibición de la mineralización de fenantreno al añadir nitrógeno inorgánico. Asimismo, el uso excesivo de nutrientes inorgánicos, también, puede inhibir los procesos de biodegradación (Zhou y Crawford, 1995; Margesin y Schinner, 1997a, 1997b; Genouw y col., 1994). Para evitar el exceso de nutrientes, así como la pérdida de los mismos por lixiviación, también, se han utilizado fertilizantes inorgánicos oleofílicos de liberación lenta (Inipol EPA® 22) para la biorremediación de suelos contaminados (Lindstrom y col., 1991; Pritchard y Costa, 1991).

Además, es importante destacar que la acción de los nutrientes inorgánicos puede estar limitada debido a la interacción química con los minerales del suelo. Así, el amonio se puede unir a las arcillas por intercambio catiónico y el fosfato puede unirse y precipitar con iones calcio, hierro y aluminio (Morgan y Watkinson, 1992), lo que determina que no estén disponibles para los microorganismos.

En resumen, la biodegradación de xenobióticos es un proceso que está sometido a diversas restricciones químicas, físicas y medioambientales. Así, el tiempo necesario para que tenga lugar un proceso de biodegradación será función de la temperatura, la presencia de nutrientes, las buenas condiciones de los microorganismos,...

Por ello, estos factores limitantes pueden ser modificados para intensificar la acción degradante de los microorganismos, a través de la corrección de algunos factores medioambientales que limitan la bioactividad.

1.2.2. Bioestimulación microbiana

Los procesos de bioestimulación constituyen herramientas útiles para la modificación de las condiciones del suelo que se encuentren limitando los procesos de biodegradación, ya que permiten adecuar las condiciones ambientales mediante la introducción de nutrientes en los sistemas contaminados. De esta forma, se

incrementan las poblaciones microbianas (Pankrantz, 2001), lo que implica, en consecuencia, un potencial aumento, también, de la velocidad de degradación, por estimularse la metabolización de los compuestos orgánicos.

Las bacterias desempeñan el papel de mayor importancia en la biodegradación de contaminantes orgánicos en los suelos. Precisamente, en suelos bien aireados, las bacterias y los hongos son muy importantes, pero en suelos, pobremente, aireados, solamente, las bacterias son las responsables de los cambios biológicos y químicos que en él suceden (Alexander, 1999). También, desempeñan un papel importante en la biodegradación de xenobióticos los protozoos, al consumir materiales particulados tales como los distintos microorganismos.

1.2.2.1. La ecología microbiana

1.2.2.1.a. Bacterias

Las bacterias son el grupo de organismos más abundante presentes en los suelos. Miles de especies han sido identificadas en suelos de todo el mundo, aunque se cree que existen varios millones más de especies aún sin determinar. El número de bacterias y la presencia de especies dominantes es una función de las características del suelo y los ambientes específicos (temperatura, humedad, etc).

Las bacterias son un grupo, extremadamente, diverso y son los degradadores primarios de la MO en el suelo. Debido a su diversidad, las bacterias se encuentran, regularmente, en comunidades heterogéneas. Así, algunas especies inician la degradación de la MO en el suelo y otras especies, posteriormente, crecerán sobre los compuestos resultantes de la degradación parcial o sobre los productos residuales de la degradación primaria.

Usualmente, los compuestos orgánicos disponibles en el suelo incluyen una extensa cantidad de estructuras y tamaños moleculares, por lo que más de una especie será competitiva en su degradación. Por ejemplo, la gasolina está compuesta por, aproximadamente, 60 hidrocarburos que contienen de 5 a 12 átomos de carbono, entre ellos hidrocarburos alifáticos, alifáticos ramificados, aromáticos y compuestos cíclicos. Atendiendo a las diferentes formas de rotura que sufren estos compuestos en el suelo, se puede deducir que diversos números de

especies están involucrados y que algunas son, considerablemente, más factibles de biodegradar que otras (Viñas, 2005a).

1.2.2.1.b. Hongos

Con respecto a las bacterias, los hongos son, generalmente, menos numerosos, y crecen a velocidades, considerablemente, más bajas. Como grupo, los hongos tienden a ser más tolerantes a los ácidos que las bacterias (muchas especies crecen a un pH óptimo de 5 ó menos) y son más sensibles a la variación del contenido de humedad.

1.2.2.1.c. Protozoos

Muchos protozoos se alimentan por predación, ingestión de bacterias o de otros organismos como levaduras, esporas de hongos y de otros protozoos. Algunos, también, emplean sustancias orgánicas disueltas como nutrientes.

En los procesos biológicos de biodegradación, los protozoos juegan un papel importante en la reducción del número de bacterias degradadoras de los contaminantes. Un incremento en el contenido bacteriano de un suelo en el que se realiza una biodegradación activa está acompañado por un aumento en el número de protozoos. En estudios de laboratorio, se ha estimado que un solo protozoo consume, en alguna ocasión, entre varios cientos y varios cientos de miles de células bacterianas por hora, número que depende del tipo de protozoo y de bacteria (Paul y Clark, 1989). Por lo tanto, las poblaciones de protozoos pueden ser un factor importante para la proliferación de las comunidades bacterianas responsables de degradar los contaminantes, y por lo tanto, para el desarrollo del proceso de biorremediación.

Sin embargo, en los suelos contaminados la cantidad de bacterias consumida por los protozoos es mucho más baja, debido, probablemente, a su inaccesibilidad. Esta inaccesibilidad es debida a que las bacterias tienden a colonizar, en forma de agregados, los poros y grietas del suelo, y éstos, son tan pequeños, que no permiten el paso de los protozoos.

1.2.2.1.d. Asociaciones microbianas

Es importante observar a los microorganismos empleados en los tratamientos biológicos como una asociación, una comunidad o un consorcio. Una asociación, generalmente, implica una interacción positiva entre ellos, donde un grupo de organismos se beneficia de otro grupo. Por ejemplo, en la biodegradación de compuestos químicos, se ha encontrado que especies aisladas a partir de cultivos puros son incapaces de mineralizar ciertos compuestos, mientras que la utilización de diversos grupos de bacterias produce la mineralización completa del mismo (Viñas, 2005a).

Sin embargo, las interacciones entre grupos de microorganismos no siempre son positivas. En algunos casos, los productos resultantes del metabolismo de un grupo resultan tóxicos y pueden ser inhibitorios para la actividad de otros grupos. En otras situaciones, la competición entre grupos por algún compuesto puede resultar en el predominio de una especie microbiana sobre otra. Cada uno de los organismos presentes en una asociación ocupa un nicho ecológico y el número relativo de especies cambiará con las condiciones externas.

1.2.2.2. Tipos de bioestimulantes empleados en tratamientos de biorremediación de suelos contaminados

A continuación, se hace un resumen de los principales tipos de bioestimulantes utilizados en biorremediación:

➤ **Bioestimulantes edafológicos inorgánicos (BSEI):**

Existen múltiples estudios en los que se evalúa el efecto de la adición de distintas mezclas de fuentes nitrogenadas y fosfatadas. Así, se destacan trabajos como los realizados por Bento y *col.*, 2005, en los que se hace una comparativa del fenómeno de biorremediación de un suelo contaminado, bajo tratamientos de bioestimulación, bioaumentación (adición de microorganismos específicos degradadores de compuestos orgánicos) y la propia atenuación natural de la contaminación.

Los suelos fueron bioestimulados añadiendo una mezcla de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y K_2HPO_4 en una relación N:P:K de 5:1:2. Los resultados obtenidos, de forma muy

resumida, ponen de manifiesto que el efecto de la adición de nutrientes en los suelos que trataron promovía, significativamente, la degradación (72%) de la fracción ligera de los hidrocarburos del petróleo.

En los estudios realizados por Yu y *col.*, 2005, sobre atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación en sedimentos contaminados con HAPs, evaluaron el efecto de una solución mineral salina, cuya composición incluía un ratio de N:P:K de 2:6:7. Se comprobó que, en 2 semanas, en los sedimentos bioestimulados se obtenían porcentajes de degradación próximos al 90% en el caso del pireno, mucho mayor que en la atenuación natural (21%) y en los tratamientos de bioaumentación (17%), alcanzándose porcentajes cercanos al 100% a la cuarta semana de incubación, es decir, la degradación del pireno se veía, fuertemente, aumentada por la adición de nutrientes.

Otros estudios, Olaniran y *col.*, 2009, sobre los efectos de la bioestimulación y bioaumentación en la biodegradación aerobia de los dicloroetanos, emplearon un fertilizante inorgánico comercial, denominado KOMPEL (Chemicult products, Pty Ltd.), cuyo ratio N:P:K era de 3:1:6. Los resultados reflejaron que se obtuvo una mayor degradación para los *cis*-dicloroetanos en el tratamiento con KOMPEL y el mayor rango de degradación para los *trans*-dicloroetanos se obtuvo en el tratamiento que combinaba bioestimulación y bioaumentación. El rango más bajo de degradación lo obtuvieron en el microcosmos sin nutrientes y sin inóculo.

Todos estos trabajos son un claro ejemplo del efecto beneficioso sobre los procesos de biodegradación de la aplicación de nutrientes, en este caso, inorgánicos, a los suelos contaminados, como herramienta de trabajo. Sin embargo, como ya se mencionó con anterioridad, la adición de nutrientes inorgánicos presenta algunos problemas. Así, pueden manifestar un efecto inhibitor, tanto en cantidad como en diversidad, de las poblaciones microbianas del suelo (Sarkar y *col.*, 2005), efectos ya muy conocidos del uso de fertilizantes inorgánicos en el ámbito de la agricultura y, además, otros efectos colaterales como es la probabilidad de contaminación (aguas subterráneas y acuíferos) por parte de los componentes de los fertilizantes, mediante procesos de lixiviación.

➤ **Bioestimulantes edafológicos orgánicos (BSEO):**

En el Capítulo II, se comentó que existen numerosos productos que pueden ser empleados como bioestimulantes edafológicos (Miller, 1990) y se distinguió entre BSEI y BSEO. Dentro de la categoría de BSEO se encontraban los BSEO no hidrolizados, que proceden de procesos de compostaje, residuos sólidos de plantas de depuración, estiércoles,..., que siguen en fase experimental para el tratamiento de suelos contaminados (Walworth y Reynolds, 1995; Cho y col., 1997; Williams y col., 1999; Namkoong y col., 2002).

La adición de enmiendas orgánicas, como los lodos de depuradoras de aguas residuales o el compost, pueden facilitar la degradación de los contaminantes porque juegan un papel muy importante como suplemento de nutrientes y fuente de carbono. Estas enmiendas contienen abundante nitrógeno y MO (entre un 40%-50%), lo que les confiere un gran potencial en la biorremediación.

Por otro lado, se describieron los BSEO hidrolizados, que, mediante procesos de hidrólisis enzimática, solucionan los problemas de biodisponibilidad de sus componentes, por solubilización completa de sus componentes orgánicos y por una disminución del tamaño molecular de su componente proteico.

Estos BSEO hidrolizados, hoy en día, están siendo estudiado como instrumentos para la bioestimulación de los microorganismos responsables de la degradación de hidrocarburos en suelos (Radwan y col., 2000), ya que son compuestos, fácilmente, asimilables y presentan una emisión lenta: los péptidos son biomoléculas cargadas y las partículas minerales que conforman el suelo presentan, también, carga, predominantemente, negativa (silicatos); la interacción entre ellos produce una inmovilización de estos componentes en el suelo.

Otra de las ventajas de estos productos, además de las descritas en este trabajo, es su capacidad para formar emulsiones gaseosas, debido a su composición proteica. Estas emulsiones tienen un considerable potencial en la creación de microambientes dentro de los suelos para la degradación de los hidrocarburos; estas emulsiones gaseosas o espumas son un reservorio de oxígeno, nutrientes (N, P,...) y de microorganismos.

1.3. Xenobióticos contaminantes de los suelos

Además de los compuestos naturales susceptibles de biodegradación, existen miles de compuestos químicos, que son sintetizados por la industria, denominados xenobióticos, que poseen una gran capacidad de contaminación ambiental, dado que, al contrario que los compuestos naturales, pueden presentar una mayor o menor resistencia a la biodegradación (recalcitrancia) (Castillo y col., 2005).

Uno de los xenobióticos que mayores problemas de contaminación genera, a nivel mundial, es el crudo del petróleo y sus derivados. La elevada demanda de petróleo y derivados (gasolina y gasoil, principalmente) da lugar a grandes cantidades de productos, que deben ser transportados por todos los lugares del mundo, de forma anual. Inevitablemente o no, se producen numerosos fenómenos de vertidos y, por tanto, de contaminación ambiental (Ripley y col., 2002) a nivel mundial. El volumen de contaminación es tan elevado que ha crecido, notablemente, la atención hacia la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías de bajo coste, efectivas e innovadoras, que logren acabar con este problema de contaminación (Ripley y col., 2002).

Por otro lado, otro grupo de xenobióticos de gran importancia, desde el punto de vista cuantitativo, son los derivados clorados y nitrados, base de la industria de fabricación de explosivos, colorantes, herbicidas, plaguicidas,... Estos compuestos suponen, por regla general, un grave problema de contaminación ambiental, por el enorme volumen de productos que se emplea a nivel mundial y por su elevada persistencia y recalcitrancia. No obstante, algunos compuestos clorados y nitrados son de origen natural, por lo que existen rutas biodegradativas, más o menos elaboradas, que pueden ser empleadas para lograr la degradación de estos compuestos (Castillo y col., 2005).

1.3.1. Crudo del petróleo y sus derivados: composición general

El crudo del petróleo se caracteriza por presentar una composición química, sumamente, compleja. Está constituido, mayoritariamente, por miles de compuestos de la familia de los hidrocarburos (HC) (50%-95% de la composición) (Rosini, 1960; Viñas, 2005a).

El petróleo representa la principal fuente de energía para la humanidad, pero, a su vez, los HC que lo componen son uno de los más importantes contaminantes ambientales (Verma y col., 2006; Romaniuk y col., 2007), tanto por su abundancia, como por su persistencia en los distintos compartimentos ambientales (Casellas y col., 1995).

A lo largo del siglo XX, se ha registrado, en casi todo el mundo, un incremento vertiginoso en la cantidad de suelos contaminados con petróleo y/o sus derivados. La disposición final de cantidades excesivas del lodo aceitoso generado en las refinerías de petróleo, así como, la remediación de ecosistemas contaminados por derrames accidentales imponen grandes desafíos tecnológicos (Vasudevan y Rajaram, 2001). La contaminación de suelos con petróleo crudo y sus subproductos suele venir ocasionado por una mala gestión en las actividades de la industria petrolera (Saval, 1995).

La composición elemental de un crudo de petróleo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo HC (Viñas, 2005a): 84%-87% de C, 11%-14% de H, 0%-8% de S y 0%-4% de O, N y otros metales (Clark y Brown, 1977; Howe-Grant, 1996).

Los principales componentes que se encuentran en el petróleo son:

- Fracción saturada: n-alcanos; alcanos ramificados con cadenas alquílicas e isoprenoides; cicloparafinas o cicloalcanos.
- Fracción aromática: HC monoaromáticos; HC diaromáticos; HC aromáticos policíclicos (HAPs).
- Fracción de resinas: agregados de piridinas; quinolinas; carbazoles; tiofenos; sulfóxidos; amidas.
- Fracción de asfaltenos: agregados de HAPs; ácidos nafténicos; sulfuros; ácidos grasos; metaloporfirinas; fenoles polihidratados;... (Speight, 1991).

Para la obtención de los derivados del petróleo, el crudo sufre un proceso de refinado, que implica distintos pasos de destilación, con la finalidad de eliminar el color y olor, así como, también, los compuestos azufrados (Viñas, 2005a). Las destilaciones se realizan a distintas temperaturas crecientes, que permiten separar 4 fracciones principales: *gasolina*, *queroseno*, *destilados medios* (entre ellos, el

gasoil) y un *residuo*, que, posteriormente, se vuelve a destilar obteniéndose otros productos como aceites lubricantes, ceras, parafinas, alquitranes,...

Durante el refinado del petróleo para la obtención de sus distintos subproductos y derivados, se eliminan componentes de la fracción asfáltica (muy recalitrante), lo que implica que los refinados intermedios, como son el gasoil, fueles, querosenos y, también, las gasolinas, sean productos, relativamente, más biodegradables que los alquitranes residuales (Viñas, 2005a).

Existe, por tanto, una diferencia en la composición química de la gasolina y la del gasoil, debido a que se han obtenido como productos de destilación del petróleo, a partir de diferentes intervalos de temperaturas. Los fueles ligeros y el gasoil forman parte de la fracción intermedia de destilación en el proceso de refinado (rangos de puntos de ebullición entre 185-345°C), encontrando compuestos de 10-25 átomos de C, siendo los más abundantes los C₁₅-C₁₇. Su composición básica es de un 30% en parafinas (n-alcanos e isoprenoides, 45% de naftenos (cicloalcanos) y un 24% de aromáticos (alquilbencenos y, los más abundantes, naftalenos y sus alquilados). También, se han encontrado, pero en cantidades menores, el fenantreno y el fluoreno. No contienen ni pireno ni fluorantreno (compuestos de 4 anillos aromáticos), cuyos puntos de ebullición son más elevados que el intervalo usado en la destilación de fracciones intermedias (Viñas, 2005a).

1.3.2. Biodegradación de hidrocarburos

Los microorganismos juegan un papel esencial en la eliminación de los HC de los ecosistemas terrestres y acuáticos, siendo la degradación microbiana el principal proceso de descontaminación natural (Prince, 1993; Sutherland y *col.*, 1995).

La elevada complejidad de la composición del crudo del petróleo y sus derivados implica la necesidad de una amplia capacidad enzimática, si se quiere conseguir una degradación significativa (Viñas, 2005a). No obstante, la mayor parte de los microorganismos son capaces de degradar las cadenas hidrocarbonadas que constituyen el petróleo, aunque existen cepas que son capaces de degradar, de forma selectiva, cadena alquílicas de ciertos HAPs, que son muy abundantes en el crudo (Davis y Raymond, 1961).

Los factores ambientales son un aspecto fundamental a tener en cuenta en los procesos de biodegradación, debido a sus posibles efectos limitantes del crecimiento y actividad microbiana. Estudiar y evaluar la influencia de los distintos parámetros ambientales permite optimizar los procesos de tratamiento biológico.

Normalmente, el metabolismo de hidrocarburos alifáticos y aromáticos requiere la presencia de oxígeno molecular, ya que el primer paso de su ruta degradativa es una reacción de oxigenación para producir alcohol o fenol. Aún, se cuestiona la posibilidad de que, en ocasiones, una serie de elementos inorgánicos puedan ser portadores de oxígeno en condiciones anóxicas.

Los valores de pH son, también, determinantes para la actividad microbiana en general (pH 6.5-8.0) y la temperatura óptima para la degradación de hidrocarburos está, generalmente, entre 30°C y 40°C (Viñas, 2005a).

Debido a la deficiencia de N y P que presentan los contaminantes del petróleo, habitualmente, se requiere la fertilización de los suelos para equilibrar la alta proporción de C existente en esos compuestos. También, se requiere un número mínimo de microorganismos (10^6 - 10^8 ufc/g suelo) y versatilidad heterotrófica para conseguir buenas proporciones de degradación.

Combinando todos estos parámetros y teniendo en cuenta cada caso concreto, es difícil generalizar sobre una metodología exitosa para abordar cualquier emplazamiento contaminado. De cualquier forma, los microorganismos del suelo son, normal y suficientemente, versátiles como para ser susceptibles de tratar cualquier mezcla de hidrocarburos, bajo condiciones adecuadas y con suficiente tiempo. La mayor parte de los factores, excepto la temperatura, pueden ser ajustados *in situ* por distintas técnicas, aunque muchos de ellos no están muy bien definidos, especialmente, para la zona insaturada del suelo.

La efectividad de la biorremediación en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos depende a menudo de que la población microbiana del suelo sea enriquecida y mantenida en un ambiente óptimo. En ecosistemas terrestres es habitual encontrar microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos del petróleo y sus derivados. Sin embargo, en situaciones donde la población de estos sea escasa o donde no haya tiempo de realizar un

enriquecimiento natural de dicha población, la bioestimulación es una opción realista y práctica.

Los contaminantes orgánicos, a menudo, son metabolizados como donadores de electrones y como resultado del metabolismo bacteriano se oxidan, mineralizándose en su totalidad, en el mejor de los casos. En este contexto de la biodegradación de hidrocarburos, la exposición previa de las poblaciones microbianas a los hidrocarburos parece esencial para acelerar las tasas de degradación posteriores (Leahy y Colwell, 1990). Las poblaciones microbianas expuestas a los hidrocarburos se adaptan a ese medio, sufriendo un enriquecimiento selectivo y cambios genéticos que incrementan, no sólo, la proporción de degradadores de hidrocarburos en esa comunidad microbiana, sino, incluso, la proporción de degradadores que codifican genes catabólicos de hidrocarburos (Garbisu y Alkorta, 1997). Por ello, un enriquecimiento de cepas microbianas degradadoras es una práctica recomendada en los procesos de biorremediación de hidrocarburos, especialmente, cuando existen componentes en esa mezcla de hidrocarburos más resistentes a la biodegradación.

Finalmente, la limpieza de derrames de petróleo en el ecosistema marino es uno de los ejemplos más exitosos de este tipo de metodologías (Atlas, 1997).

1.3.3. Herbicidas organoclorados: atrazina

Los herbicidas se han convertido en un elemento fundamental, hoy en día, en la agricultura intensiva (Singh y col., 2004). Su amplio y generalizado uso, durante las últimas décadas, ha dado lugar a un grave problema de contaminación de los recursos edafológicos e hídricos (Wehtje y col., 1983; Spliid y Kopper, 1998).

Dentro del grupo de los herbicidas, la atrazina (Figura.37) es uno de los más usados en la producción de maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor*) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) para el control de muchas malas hierbas. Este herbicida está prohibido en Europa desde el año 2004, debido a su elevada persistencia en el suelo, que incrementa, notablemente, su toxicidad. Sin embargo, en países, como los EE.UU., es uno de los herbicidas más, ampliamente, utilizados (Burkart y col., 1988).

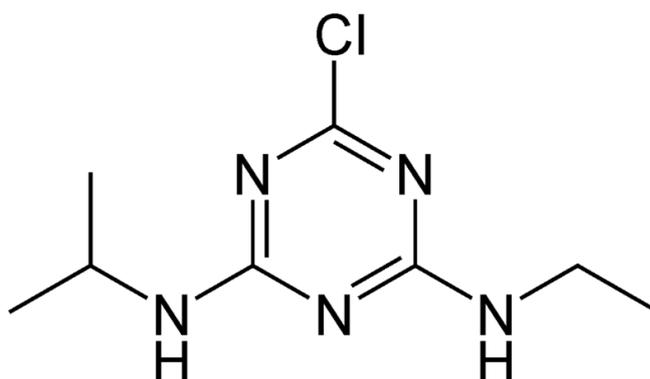


Figura.37: Molécula de atrazina

La atrazina (6-cloro-2-etilamina-4-isopropilamina-1,3,5-triazina) es un compuesto orgánico formado por un anillo de s-triazina (Figura.38), que la convierte en un compuesto, relativamente, persistente en el medio ambiente (Mandelbaum y *col.*, 1993). Presenta una vida media larga y su movilidad es moderada, por lo que se puede encontrar cantidades detectables de este herbicida en los distintos compartimentos medioambientales, como son las aguas superficiales (Wenk y *col.*, 1997).

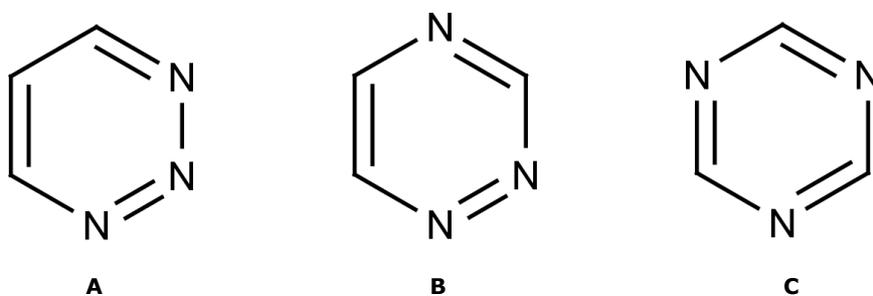


Figura.38: Isómeros de la Triazina. A: 1,2,3-Triazina; B: 1,2,4-Triazina; C: 1,3,5-Triazina.

Su moderada persistencia en el medio ha estimulado, notablemente, la investigación y el desarrollo de la metodología adecuada para lograr la degradación de esta molécula. Las pérdidas por volatilización, arrastre superficial y degradación de la atrazina han sido, ampliamente, investigadas (Curran y *col.*, 1992; Fleming y *col.*, 1992), pero, aún, no se ha resuelto el problema de la contaminación.

La molécula de atrazina es, relativamente, bastante estable en el suelo, por lo que existe cierta resistencia al ataque microbiano de degradación. No obstante, existen numerosos factores que pueden hacer que se induzca la hidrólisis y degradación de la atrazina.

➤ Factores abióticos:

- Temperatura.
- Falta de nutrientes: en ausencia de nutrientes, los microorganismos edafológicos usan la molécula de atrazina como fuente de C y energía.
- Contenido de C y N (Assaf y Turco, 1994.)
- Propiedades del suelo: un alto contenido en arena favorece la lixiviación del herbicida, ya que estos suelos carecen de MO y arcilla, lo que disminuye su habilidad para retener agroquímicos. Así, pueden ser desplazados a otras zonas donde no existan poblaciones degradadoras (Burkart y Kolpin, 1993).
- Cubierta vegetal: ayuda a retener el herbicida (Shelton y Jones, 1995).
- Contenido de humedad del suelo: determina la estabilidad de los residuos de atrazina debido a que está asociada a la MO (Barriuso y Houot, 1996; Barriuso y col., 1997).
- pH: a pH bajo, la atrazina se encuentra protonada. Así, en suelos con pH entre 4-6 adsorben con mayor facilidad a la atrazina que suelos con un pH más bajo (Clay y Koskinen, 1990; Liu y col., 1995)
- Adsorción.
- Absorción por las plantas.
- Transporte o arrastre a través del suelo.
- Manejo del suelo y cultivo (Koskinen y Clay, 1997).

De todos ellos, se establece que los elementos más importantes en la hidrólisis de la atrazina son el contenido en agua y el pH (Widmer y col., 1993).

➤ Factores bióticos:

- Poblaciones microbianas: la presencia de una amplia gama de microorganismos debe garantizar la degradación o eliminación de

compuestos tóxicos presentes en el suelo mediante la acción de enzimas, que son liberadas e inmovilizadas sobre los coloides del suelo (Tortensson, 1980).

- Enzimas hidrolíticas: amidasas, esterases, fosfatasas, arilsulfatasa, ureasas,... son enzimas implicadas en procesos de hidrólisis. Las esterases y las hidrogenasas son indicadores de actividad microbiana, mientras que fosfatasas y sulfatasas están relacionadas con el ciclo de los nutrientes.

1.3.4. Biodegradación de atrazina

Al igual que en el caso de los HC, el principal mecanismo de degradación de la atrazina es el mediado por microorganismos. Un amplio número de microorganismos han sido aislados e identificados como transformadores, al menos, parcialmente, de la atrazina, pero el número disminuye, notablemente, cuando se trata de organismos que mineralizan, completamente, este importante herbicida (Rhine y *col.*, 2003).

Los microorganismos son capaces de oxidar las cadenas alquílicas de la atrazina como única fuente de C y energía (Cook, 1987; Buhler y *col.*, 1993; Yanze-Kontchou y Gschwind, 1994). Sin embargo, las cadenas laterales de la molécula y el N presente en el anillo de *s*-triazina, también, pueden ser empleados como fuente de N, en el caso de distintos microorganismos (Cook y Hütter, 1981; Mandelbaum y *col.*, 1995; Radosevich y *col.*, 1997).

La aplicación continuada y repetitiva de este herbicida en el suelo provoca la selección de la población microbiana con capacidad para usar el compuesto químico como sustrato para el crecimiento, lo que conlleva a incrementos en los rangos de biodegradación (Rhine y *col.*, 2003). Este fenómeno de aceleración de la biodegradación es característico de muchos agentes empleados en el control de plagas como herbicidas, insecticidas y fungicidas en suelos, tales como 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Ka y *col.*, 1994), MCPA (ácido 4-cloro-*o*-toliloxiacético) (Smith y *col.*, 1986), EPTC (*s*-etilpropiltiocarbamato) y el carbofurano (Rhine y *col.*, 2003). Así, un suelo tratado repetidas veces con un plaguicida mostrará una biodegradación acelerada, siendo los periodos de efectividad cada vez menores, lo que provoca un fallo en el control de la plaga diana, debido a la disminución de la

persistencia. Bajo estas condiciones se producirá una pérdida del control de las malas hierbas (Rhine y col., 2003; Krutz y col., 2007).

No obstante, se ha visto como, en ocasiones, la degradación de plaguicidas esta disminuida a causa de un insuficiente aporte o falta de disponibilidad de diversos nutrientes. En los estudios sobre la dinámica de la degradación de atrazina se pone de manifiesto que este fenómeno se puede controlar mediante el ratio C/N ambiental (Abdelhafid, 2000). Bajo condiciones de una alta relación C/N, la mineralización de la atrazina se ve incrementada, como consecuencia de la limitación de N. Sin embargo, bajo condiciones en las que el N no es limitante, este fenómeno se ve modificado y se ralentiza la mineralización o ésta es inhibida.

Diversos estudios han mostrado que se produce el incremento de la mineralización con la adición de enmiendas orgánicas tales como paja (Hance, 1973), almidón, cáscaras de arroz, compost (Alvey y Crowley, 1995), estiércol (Topp y col., 1996),..., pero otros estudios muestran como esta degradación está inhibida en el suelo debido al aporte de glucosa y/o citrato sódico (Alvey y Crowley, 1995). Estos resultados sugieren que la fuente de MO, y no el ratio C/N, es lo que influye en la mineralización de la atrazina. La aplicación de residuos orgánicos, como estiércol, lodos de depuradora, compost, residuos de cosechas al suelo, como se ha repetido en distintas ocasiones, es una práctica muy común en agricultura para el mantenimiento de la MO del suelo y la recuperación de suelos degradados, pero, también, es una metodología fundamental como tratamiento de biorremediación de suelos contaminados, en este caso, de atrazina.

Por otro lado, el aporte de nutrientes orgánicos tales como los BSEO, ya se ha visto que, puede inducir cambios en la actividad del suelo, lo que provoca cambios en la dinámica poblacional, que, a su vez, puede influir en el proceso de mineralización. Es claro que su presencia en el suelo hace disminuir la relación C/N, lo que puede ser determinante a la hora de modificar los rangos de biodegradación de la atrazina. Son compuestos constituidos, principalmente, por proteínas, péptidos y aminoácidos, pero, también, por polisacáridos, ácidos húmicos, fitohormonas,... (Parrado y col., 2008). Como se ha expuesto, están implicados en numerosos mecanismos de activación biológica, lo que incluye a la actividad microbiana del suelo y de las enzimas críticas de éste, así como, al incremento de las poblaciones microbianas.

Todos los compuestos orgánicos pueden influir en el proceso de degradación de la atrazina debido al aporte nutricional de N en forma de proteínas (BSEO no hidrolizados), péptidos y aminoácidos libres (BSEO hidrolizados).

Objetivos

2. OBJETIVOS

En este capítulo III, una vez estudiada la capacidad bioestimulante de los BSE, WCDS-HE y CGHE, y evaluado el nivel de estimulación de la actividad microbiana en un suelo modelo, se pone de manifiesto el interés para su utilización en procesos de biorremediación de suelos contaminados, con el fin de inducir los procesos de biodegradación microbiana.

Así, los objetivos de este último capítulo han sido:

1. Evaluar el efecto de la capacidad bioestimulante de los hidrolizados enzimáticos, WCDS-HE y CGHE, en suelos contaminados con distintos xenobióticos.
2. Estudiar el efecto de la bioestimulación en la biodegradación de los distintos xenobióticos ensayados.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental *CASO 1: Estudio de los efectos de los BSE en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos (gasoil)*

El estudio se realizó sobre un suelo modelo, caracterizado por un pH alcalino estimado en 8.6, con bajos niveles de MO (0.66%), de carbono orgánico (0.38%) y de nutrientes (N: 0.042%, P: 5.8 mg/kg, K: 212 mg/kg), clasificado como un Antrosol plágico (FAO, 1999). Este suelo empleado es el mismo que se utilizó para los ensayos de bioestimulación del Capítulo II (**Capítulo II, Sección 3. Materiales y Métodos, Apartados 3.1. Suelo experimental y 3.2. Caracterización físico-química del suelo experimental**).

El suelo, secado en estufa a 55°C, se dispuso en bandejas de plástico y se trató con una dosis de gasoil comercial de 10.000 mg/kg suelo. El gasoil fue disuelto en acetona para facilitar su incorporación al suelo. La mezcla se realizó de forma manual, para garantizar una buena homogeneización.

Los bioestimulantes se añadieron a razón de una dosis del 1% de MO, p/p. Se pesaron y se disolvieron en la cantidad de agua necesaria para mantener en el suelo una capacidad del 60% (WHC).

El suelo contaminado se dispuso en macetas de plástico de 30 cm de diámetro y 5 l de capacidad y se rellenaron con 4 kg de suelo. En la base de las macetas se dispuso una capa de grava, para facilitar el drenaje.

El estudio constó de 6 tratamientos:

- **CONTROL NEGATIVO o C(-):** sin contaminante.
- **CONTROL POSITIVO o C(+):** con contaminante.
- **CONTROL ABIÓTICO o CAB:** 0.2% azida sódica (p/p).
- **WCDS:** suelo contaminado con gasoil + WCDS, al 1% (p/p).
- **WCDS-HE:** suelo contaminado con gasoil + WCDS-HE, al 1% (p/p).
- **CGHE:** suelo contaminado con gasoil + CGHE, al 1% (p/p).

El muestreo se realizó a las 24 horas, a la semana, a los 14 días, a los 25 y a los 60 días.

En este estudio sobre los efectos de los BSE sobre la actividad metabólica de un suelo contaminado con gasoil, los análisis a realizar comprendieron la caracterización metabólica del suelo, mediante la determinación de la ADH, y la caracterización de la diversidad genética, mediante técnicas moleculares como es el DGGE. Además, se determinó la concentración de gasoil en las muestras tomadas.

3.2. Diseño experimental CASO 2: Estudio de los efectos de los BSE en el tratamiento de suelos contaminados con atrazina

El estudio se realizó sobre un suelo caracterizado por un pH alcalino estimado en 8.6 (1:2.5), con bajos niveles de MO (0.66%), de carbono orgánico (0.38%) y de nutrientes (N: 0.042%, P: 5.8 mg/kg, K: 212 mg/kg), clasificado como un Antrosol plágico (FAO, 1999). Este suelo empleado es el mismo que se utilizó para los ensayos de bioestimulación del Capítulo II (**Capítulo II, Sección 3. Materiales y Métodos, Apartados 3.1. Suelo experimental y 3.2. Caracterización físico-química del suelo experimental**).

Este mismo suelo se dispuso en bandejas de plástico y se trató con una dosis de atrazina en polvo de 100 mg/kg suelo. Para llevar a cabo la contaminación, se realizaron particiones del suelo, para distribuir, homogéneamente, la atrazina.

Los bioestimulantes se añadieron a razón de una dosis del 1% de MO, p/p. Se pesaron y se disolvieron en la cantidad de agua necesaria para mantener en el suelo una capacidad del 60% (WHC).

El estudio constó de 6 tratamientos:

- **CONTROL NEGATIVO o C(-):** sin contaminante.
- **CONTROL POSITIVO o C(+):** con contaminante.
- **CONTROL ABIÓTICO o CAB:** 0.2% azida sódica (p/p).
- **WCDS:** suelo contaminado con atrazina + WCDS, al 1% (p/p).
- **WCDS-HE:** suelo contaminado con atrazina+ WCDS-HE, al 1% (p/p).
- **CGHE:** suelo contaminado con atrazina + CGHE, al 1% (p/p).

El suelo contaminado se dispuso en botes de plástico de 150 ml de capacidad y se rellenaron con 200 gr de suelo contaminado.

El muestreo se realizó a las 24 horas, a la semana, a los 14 días, a los 25 y a los 60 días.

En este estudio sobre los efectos de los BSE sobre la actividad metabólica en un suelo contaminado con atrazina, los análisis a realizar comprendieron la caracterización metabólica del suelo, mediante la determinación de la ADH, y la caracterización de la diversidad genética, mediante técnicas moleculares como es el DGGE. Además, se determinó la concentración de gasoil en las muestras tomadas.

3.3. Suelo experimental

Los ensayos de biorremediación se llevaron a cabo en microcosmos, empleando el mismo suelo experimental caracterizado y usado en el Capítulo II, del presente trabajo (**Capítulo II, Sección 3. Materiales y Métodos, Apartado 3.1. Suelo experimental**).

El suelo (0-25 cm) fue mezclado y homogenizado y, posteriormente, tamizado bajo malla de 2 mm de diámetro.

3.4. Materias orgánicas empleadas y dosis de trabajo

Las materias orgánicas empleadas en esta fase del trabajo fueron:

- **WCDS:** *Wheat Condensed Distillers' Solubles*.
- **WCDS-HE:** hidrolizado enzimático de WCDS.
- **CGHE:** hidrolizado enzimático de CG.

Como ya se ha mencionado, la dosis de MO empleada en esta fase del trabajo fue del 1%, p/p.

3.5. Determinación de la actividad metabólica global del suelo: actividad deshidrogenasa (ADH)

De todas las actividades enzimáticas del suelo, la que más puede contribuir en el suministro de información sobre la situación metabólica de un suelo contaminado con distintos xenobióticos y sobre el efecto bioquímico y biológico de la adición a dicho suelo de los distintos bioestimulantes estudiados en este trabajo, se ha considerado que es la actividad deshidrogenasa.

La metodología y el procedimiento seguido es el mismo que se ha descrito en el apartado **3.3.1. Actividad Deshidrogenasa (ADH)**, de la sección **3. Materiales y Métodos**, del **Capítulo 2**. Brevemente, 0.5 g de suelo se incubaron, durante 30 minutos a temperatura ambiente, en un tampón de reacción que contenía como sustrato (colorimétrico) 2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazolio cloruro (INT) y como sustrato inductor de la reacción una solución de succinato sódico (20 mM). El producto de la reacción, *p*-iodonitrotetrazolio formazano (INTF) fue medido a 490nm usando un espectrofotómetro (GeneQuant 1300, GE Healthcare).

3.6. Determinación de la concentración de hidrocarburos totales del gasoil

La determinación de hidrocarburos totales presentes en el gasoil se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en la norma EPA 3550.

Según este método, la extracción de los hidrocarburos del suelo (a partir de 7 g de suelo) se realiza empleando un solvente orgánico como el diclorometano. La extracción se realiza mediante sonicación. El extracto resultante se redujo, en atmósfera protectora de N₂, hasta 1 ml, para su conservación hasta su análisis. Para llevar a cabo el análisis, todo el contenido extraído se limpió, posteriormente, en una columna de florisil. Se empleó hexano como eluyente.

El extracto resultante se analizó mediante cromatografía de gases en un sistema GC (HP 6890, Agilent), empleando un detector HRGC/FID, empleando el método descrito NEN 5733.

3.7. Determinación del contenido de atrazina en suelo

La extracción de atrazina de las muestras de suelo fue llevada a cabo usando el procedimiento descrito por Navarro y col., 2000, al que se han realizado algunas modificaciones.

A 0.5 g de suelo se le añadió 4.75 ml de agua destilada y 10 ml de acetonitrilo. La mezcla, vigorosamente agitada, fue sonicada durante 5 minutos. Se le añadieron, posteriormente, 10 ml de diclorometano. La mezcla se centrifugó a 5.500 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica se separó por decantación y, posteriormente, fue deshidratada con sulfato amónico, filtrada y evaporada a 37°C hasta sequedad. El residuo se resuspendió en 1 ml de diclorometano. Como estándar interno se emplearon 100 ppm de una solución de 1,4-dibromobenceno, que fueron añadidas a cada muestra.

Las muestras se inyectaron en un espectrómetro GC/MS AUTOSPEQ-Q (CE Instruments) para determinar la concentración de atrazina en el suelo. Este equipo iba equipado con una columna fusionada de gel de sílice (columna DB-5, 30 mm x 0.25 mm D.I. x 0.25 µm de espesor de fase, TeknoKroma) y recubierta con enlaces cruzados de goma 5% fenil-metil-silicona.

Los números de masas usados para la cuantificación de atrazina fueron m/z 215 y 200.

Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

- Volumen de inyección: 1 µl (inyección sin división).
- Temperatura del inyector: 280°C
- Temperatura de línea de transferencia: 300°C
- Flujo del gas (Helio): 1.5 ml/min (compensación de vacío)
- Programa: temperatura inicial de 80°C durante 30 segundos. Posteriormente, la temperatura se incrementa hasta 180°C a un ritmo de 30°/min y, finalmente, aumenta hasta 230°C a un ritmo de 30°C/min, temperatura que se mantiene durante 5 minutos.

3.8. Estudio de la diversidad genética microbiana

Para estudiar la influencia de distintos xenobióticos sobre la diversidad genética de un suelo contaminado y para evaluar la evolución de las poblaciones microbianas en los distintos tratamientos de biorremediación se han empleado técnicas moleculares independientes de cultivo: electroforesis en gradiente desnaturizante químico (DGGE) de productos de PCR de genes 16S rRNA presentes en el DNA total del suelo.

La metodología seguida es la misma que la descrita en el apartado **3.6. Estudio de la biodiversidad genética microbiana**, de la sección **3. Materiales y Métodos**, del **Capítulo 2**.

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este último capítulo, se ha llevado a cabo un *estudio del efecto de los bioestimulantes WCDS-HE y CGHE sobre el proceso de biodegradación de distintos xenobióticos*, una vez demostrada la capacidad bioestimulante de éstos.

Las actividades que han tenido lugar en esta última fase del trabajo se han dividido en 2 casos:

- *CASO 1: Estudio de los efectos de los BSE en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos (gasoil).*
- *CASO 2: Estudio de los efectos de los BSE en el tratamiento de suelos contaminados con atrazina.*

Los resultados generados se detallan y se discuten a continuación:

4.1. CASO 1: Estudio de los efectos de los BSE en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos (gasoil)

Los BSEO hidrolizados están siendo estudiados para su aplicación en la bioestimulación de la degradación de hidrocarburos en suelos (Radwan *y col.*, 2000). Su capacidad estimulante de la actividad microbiana es un factor fundamental a la hora de incrementar el metabolismo degradador de los microorganismos y, así, aumentar las tasas de degradación del contaminante en cuestión.

4.1.1. Determinación de la actividad metabólica global del suelo: actividad deshidrogenasa (ADH)

Se ha planteado el análisis de la actividad metabólica del suelo en presencia de gasoil, para evaluar el potencial bioestimulante de los BSE en presencia del contaminante.

La Figura.38 refleja los niveles de actividad deshidrogenasa durante los muestreos realizados a lo largo del período de incubación de los distintos tratamientos:

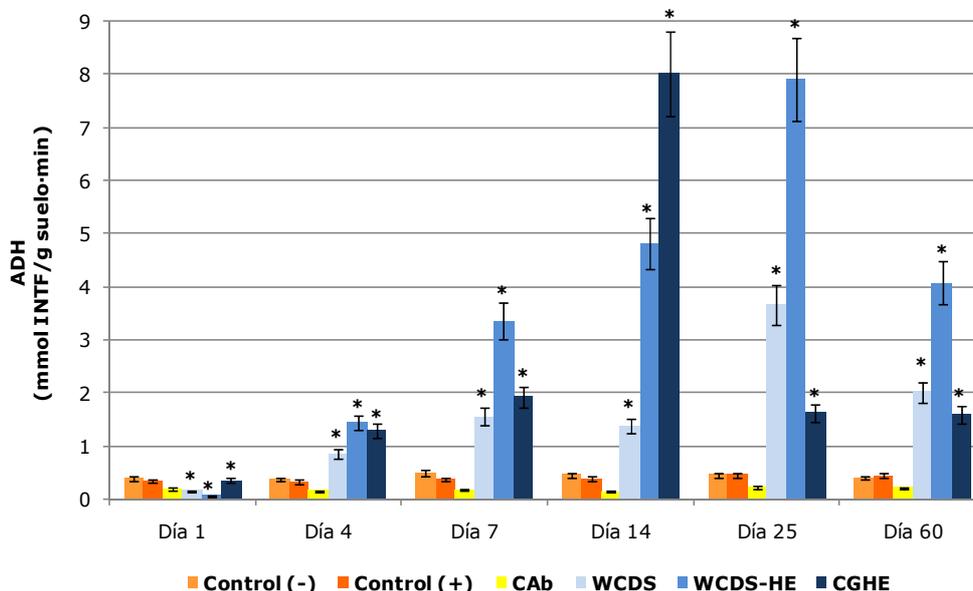


Figura.38: Actividad deshidrogenasa en el suelo experimental (contaminado con gasoil).
 DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001. *: tratamientos frente a C(+).

De la observación de los resultados encontrados, lo primero que llama la atención es la baja ADH encontrada en todos los tratamientos, si lo comparamos con los valores encontrados en los suelos tratados sin contaminar. Mientras que en un suelo sin contaminar, los valores de ADH encontrados en los distintos tratamientos alcanzaban valores máximos de 62.02 ± 10.11 , 98.64 ± 19.32 , 83.38 ± 9.89 mmol INTF/g suelo·min, para WCDS, WCDS-HE y CGHE, respectivamente, en esta situación de contaminación, los resultados son, significativamente, muy inferiores, obteniéndose máximos de 3.66 ± 0.37 , 7.91 ± 0.75 y 8.02 ± 0.79 mmol INTF/g suelo·min para los tratamientos con WCDS, WCDS-HE y CGHE, respectivamente, lo que representa, a su vez, 17, 12 y 10 veces menos ADH.

Estos datos sugieren que la presencia de gasoil en el suelo ejerce un efecto inhibitorio de la actividad metabólica del suelo.

El segundo aspecto a considerar del análisis de los resultados está relacionado con el aporte de MO. Resulta evidente que la adición de MO induce incrementos de la actividad microbiana con respecto a los valores de referencia de los suelos control, C(+), C(-) y CAb, aunque, como se ha especificado, en menor medida que en un suelo sin contaminar. Además, estos incrementos son dependientes del tamaño molecular proteico, de forma que, los tratamientos que muestran mayores valores de actividad son WCDS-HE y CGHE, es decir, los tratamientos con los hidrolizados enzimáticos, que aportan péptidos y aminoácidos libres.

La inducción de la actividad enzimática, además de estar inhibida por la presencia de gasoil (menores valores de ADH que en los suelos sin contaminar), también, muestra un retraso temporal. Así, el suelo con WCDS-HE muestra un máximo (7.91 ± 0.8 mmol INTF/g suelo·min) a los 25 días desde el inicio del ensayo, mientras que el mismo suelo sin contaminar tratado con WCDS-HE, a los 4 días ya alcanzaba un máximo de actividad (98.64 ± 19.32 mmol INTF/g suelo·min), es decir, se encuentran menores valores de actividad y con 20 días de retraso.

En el caso de CGHE, no parece que se cumpla, el retraso de la inducción microbiana con respecto a los suelos con WCDS-HE, como ocurría en los suelos sin contaminar, pero sí se aprecia, igualmente, un retraso en esta inducción debido a la presencia de gasoil. De esta forma, a los 14 días desde el inicio de la incubación con el bioestimulante, se observa el máximo de actividad, 8.01 ± 0.96 mmol INTF/g suelo·min), valor 10 veces inferior al valor máximo de ADH determinado en el mismo tratamiento, pero sin gasoil.

4.1.2. Evolución de la biodegradación de hidrocarburos (gasoil)

Los cambios en la concentración de TPH a lo largo del ensayo de bioestimulación se muestran en la Figura.39.

Se observa una importante caída de la concentración de hidrocarburos en los tratamientos con los BSE: los resultados muestran que la degradación de los TPH resultante en los suelos bioestimulados con los BSE es superior a los controles de referencia y al tratamiento con WCDS.

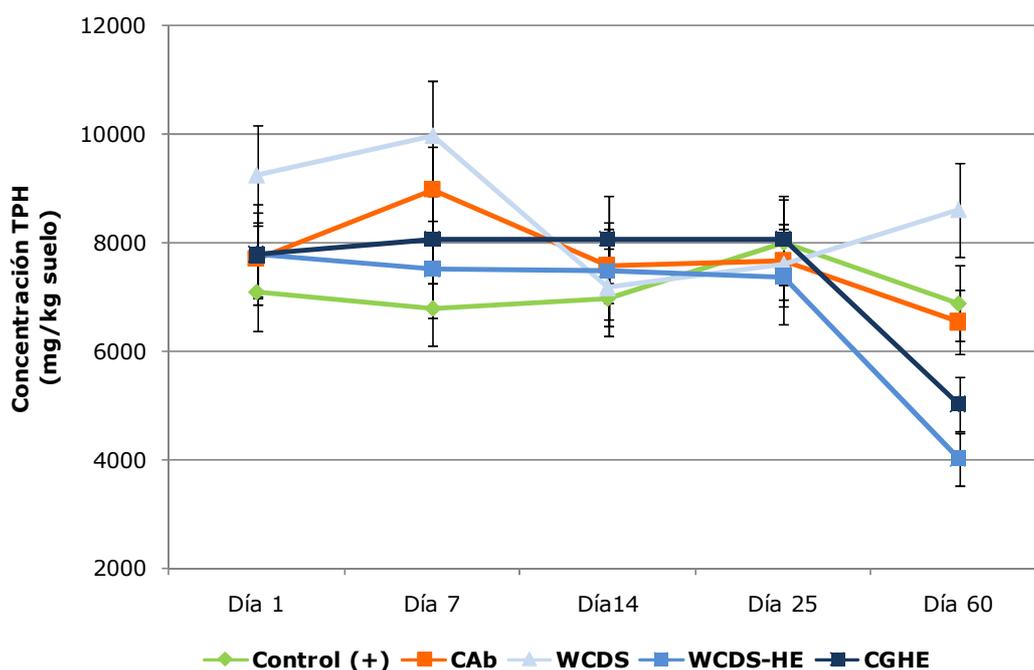


Figura.39: Perfil de degradación de TPH en suelos tratados con WCDS y BSE en comparación con suelos control y abióticos.

Estos resultados sugieren dos cosas: la primera, que la disipación de los hidrocarburos en el suelo se ha debido, mayoritariamente, a un proceso de biodegradación microbiana, ya que el control abiótico, no ha mostrado rangos de degradación, significativamente, mayores que los encontrados en el suelo control (+); en segundo lugar, parece que hay una influencia positiva del tamaño molecular de las proteínas de WCDS-HE y CGHE sobre el proceso biodegradativo, debido a que son los tratamientos que mayores rangos de biodegradación reflejan.

Es importante señalar que no se aprecian cambios significativos en la concentración del contaminante en los suelos con BSE hasta los 25 días. Es en este momento en el se inicia la caída de los valores hasta alcanzar un porcentaje de eliminación del $48.34 \pm 2.5\%$, al final del ensayo (60 días), en el caso de los tratamientos con WCDS-HE, y del $35.5 \pm 3.2\%$ en el caso de los suelos tratados con CGHE.

4.1.3. Caracterización por DGGE de las poblaciones microbianas del suelo modelo contaminado con hidrocarburos (gasoil)

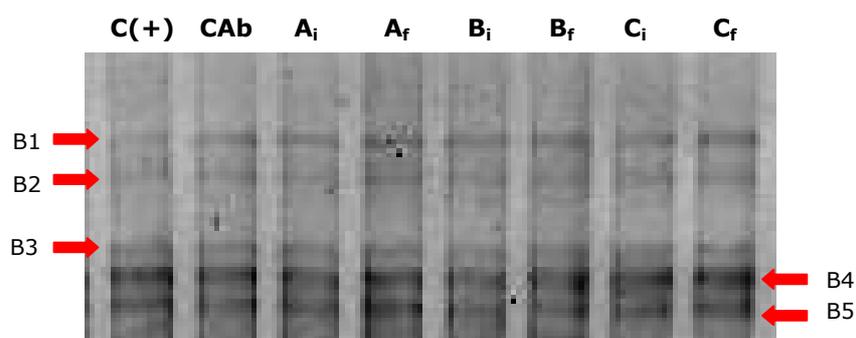
Los resultados que se muestran en la Imagen.26 se corresponden con la zona superior de un gel de DGGE, en el que se ha empleado un gradiente desnaturante 35%-50%. Se corresponde con las bandas comunes que aparecen en todos los tratamientos y que son compartidas por los suelos control y los tratamientos con los bioestimulantes.

Imagen.28: Análisis de DGGE de fragmentos 16S que codifica para rRNA amplificados por PCR a partir de DNA genómico.

C(+): suelo control con gasoil; CAb: suelo control con azida sódica;

A: suelo contaminado+WCDs; B: suelo contaminado+WCDs-HE; C: suelo contaminado+CGHE

i: inicial (Día 1); f: final (60 días)



La comparación de los perfiles de DGGE (Imagen.26) de la zona superior reveló que existía un perfil similar a lo largo del período de incubación con 5 bandas comunes y detectables.

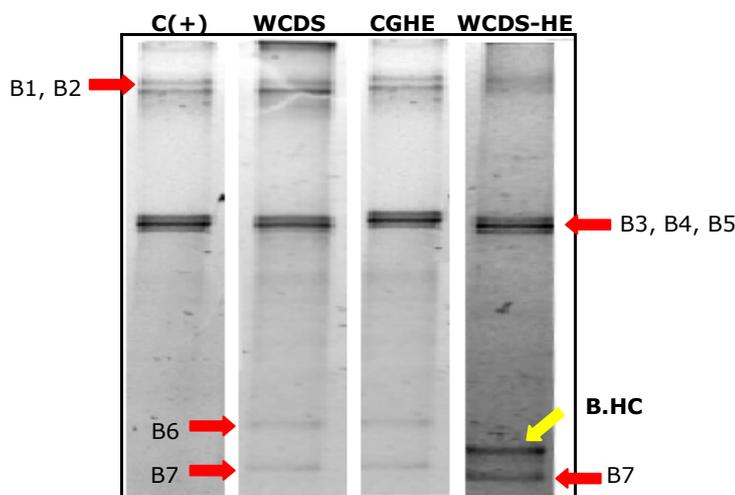
Además, estas bandas identificadas y secuenciadas (Tabla.57) se corresponden con las encontradas e identificadas en suelos sin contaminar, tanto en los controles como en los tratamientos con los distintos bioestimulantes. Este resultado es significativo, puesto que revela que estas especies bacterianas no se han visto afectadas por la presencia del contaminante, aunque se haya visto, que la actividad metabólica sí se encuentra afectada, negativamente, por la presencia de HC del gasoil.

Tabla.57: Listado de bandas de DGGE obtenidas y secuenciadas: designación de un n° de acceso para cada banda y nivel de similitud respecto a la base de datos.

Banda DGGE	No. Acceso	% Similitud	Organismo Base de Datos Genbank
B1	FJ006903.1	78	<i>Janthinobacterium sp.</i>
B2	-	-	N.d.
B3	AB265150.1	98	<i>Xantomonadaceae bacterium TDMA-47</i>
B4	FJ392837.1	97	<i>Sphingomonas sp.</i>
B5	AE005673.1	88	<i>Lysobacter sp EM 0470</i>

Sin embargo, del análisis de la zona inferior del gel, se observan ciertas diferencias entre los controles y los tratamientos y, también, con respecto a los suelos sin contaminar.

Imagen.29: Análisis de DGGE de fragmentos 16S que codifica para rRNA amplificados por PCR a partir de DNA genómico. (Día 60).



Se aprecia (Imagen. 27), siempre con respecto al suelo modelo sin contaminar, como desaparecen todas las bandas inferiores en el suelo contaminado control C(+) (no aparecen ni en las muestras iniciales, ni en las finales), pero, también, desaparecen bandas en los tratamientos con los bioestimulantes. Tanto en WCDS, como en WCDS-HE y CGHE aparecen otras nuevas (Tabla.55). Sin embargo, existe una merma de la diversidad, ya que en el cómputo global, hay pérdidas de bandas y, por tanto, de organismos en el suelo como consecuencia de la contaminación del suelo con hidrocarburos del gasoil.

El resultado más notable se ha producido en el suelo con el BSE, WCDS-HE, en el que ha aparecido una banda, denominada B.HC (Tabla.55), que sólo aparece en este tratamiento y es detectable en la muestra a tiempo final. Esta banda, que se identificó como *Ralstonia sp.*, es una bacteria habitual aislada en suelos contaminados con hidrocarburos (Lu y col., 2006).

Tabla.58: Listado de bandas de DGGE obtenidas y secuenciadas: designación de un nº de acceso para cada banda y nivel de similitud respecto a la base de datos.

Banda DGGE	No. Acceso	% Similitud	Organismo Base de Datos Genbank
B6	DQ479415.1	89	<i>Clostridium sp.</i>
B7	EF111112.1	90	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
B.HC	AM159310.1	94	<i>Ralstonia sp.</i>

4.1.4. Discusión

El crudo del petróleo y, sobre todo, sus derivados son los productos más, ampliamente, usados en nuestra sociedad. La masiva cantidad de estos productos químicos empleada como combustibles de automoción, para las calefacciones de miles de hogares y el enorme volumen de estos productos que se almacena, se transporta o se transfiere dan lugar a fenómenos de contaminación de suelos por vertidos accidentales (Sarkar y col., 2004).

El petróleo contiene numerosas sustancias tóxicas y peligrosas tales como bencenos, toluenos, etilbencenos, xilenos,... y estos compuestos suponen un riesgo para la salud de las plantas, los animales y los humanos (Zhou y Crawford, 1995; Liebeg y Cutright, 1999; Vasudevan y Rajaram, 2001).

Para tratar suelos contaminados por petróleo y sus derivados existen distintos tratamientos, tanto físicos como químicos, sin olvidar los métodos biológicos, que suponen la gran ventaja de ser bastante más económicos que los dos primeros. Los tratamientos biológicos implican la degradación o metabolización microbiana de compuestos contaminantes, dando lugar a otros en formas no tóxicas (Riser-Roberts, 1998).

Como tratamientos biológicos de la contaminación de suelos se han venido aplicado los procesos de bioestimulación de poblaciones microbianas endógenas, de forma que, mediante la adición de nutrientes, se ha podido incrementar, significativamente, los rangos de biodegradación de los xenobióticos contaminantes (Ripley y col., 2002). Por tanto, resultan ser tratamientos muy interesantes como estrategias de biorremediación de suelos contaminados.

Habitualmente, en el campo de la bioestimulación, el aporte de nutrientes para la biodegradación de hidrocarburos se centra en la aplicación de N y P, tanto orgánicos como inorgánicos, debido a que el C es el principal componente del petróleo y sus derivados. De hecho, se ha estudiado de forma exhaustiva que la fertilización de un suelo con abonos nitrogenados da lugar a incrementos de la degradación de HC en distintos tipos de suelos (Song y col., 1990; Aislabie y col., 1998).

En este trabajo, se ha planteado la aplicación de los BSE como nutrientes orgánicos para los microorganismos del suelo con el objetivo de evaluar la magnitud del efecto bioestimulante en situaciones de contaminación del suelo, concretamente, en presencia de gasoil, una vez que se ha demostrado su capacidad bioestimulante en una situación modelo sin contaminar, y ver si esta influencia sobre el metabolismo microbiano produce incrementos en la tasa de biodegradación de HC.

Para caracterizar el comportamiento bioquímico del suelo en respuesta a la presencia del xenobiótico y la aplicación de estas materias orgánicas, caracterizadas por su alto contenido en N orgánico, en forma, mayoritariamente, de péptidos, se ha determinado y analizado la actividad deshidrogenasa del suelo, por ser el mejor indicador de la actividad metabólica global del suelo (Masciandaro y col., 2001). Así, de acuerdo con los resultados que se han obtenido, ambos productos manifiestan una significativa capacidad bioestimulante, como era de esperar, puesto que ya se ha demostrado dicha capacidad. Si se compara los resultados de los tratamientos de bioestimulación con los datos encontrados en el suelo control de referencia (contaminado), se comprueba que la aplicación de nutrientes estimula la actividad microbiana, aunque los valores de AE no alcancen a los valores determinados en ausencia de contaminante. Este potencial bioestimulante se ve muy reducido, si se comparan los valores obtenidos en situación de contaminación con los valores determinados en un suelo sin contaminar. Esto sugiere que la presencia de gasoil, constituido, principalmente, por HC, produce un efecto inhibitorio de la actividad metabólica o bien induce un descenso de las poblaciones microbianas.

Ahora, si se analizan los datos de biodegradación de los TPHs del gasoil, la bioestimulación de las poblaciones microbiológicas, con la adición de los BSE, significativamente, ha incrementado los rangos de biodegradación. Comparado con los resultados del contenido de TPHs de los suelos control, la aplicación de los BSE, significativamente, ha incrementado la mineralización de los TPHs. Estos resultados no son nuevos, en el sentido de que, con anterioridad, diversos estudios han encontrado similares resultados: la biodegradación de HC se ha visto incrementada por la adición de nutrientes, en mayor o menor medida (Sarkar y col., 2005). Por todo ello, estos BSE se convierten en herramientas muy atractivas como tratamientos para la biorremediación *in situ* de suelos contaminados con gasoil.

En este trabajo, se ha presentado una evidencia considerable de que ambos bioestimulantes, WCDS-HE y CGHE, pueden cambiar los rangos de descomposición y mineralización de los hidrocarburos del gasoil. Así, a medida que transcurre el tiempo de incubación, los niveles de HC disminuyen, paulatinamente, hasta los días 14-25, a partir de los cuales, disminuye, significativamente, el contenido de TPHs en los suelos bioestimulados con WCDS-HE y CGHE. Estos incrementos de la biodegradación coinciden, en el tiempo, con los valores máximos de AE. De forma que, se producen cuando los microorganismos y su metabolismo están, fuertemente, estimulados.

Frecuentemente, la biodegradación de contaminantes exhibe un rápido descenso del contenido contaminante, que disminuye con el tiempo, debido, básicamente, a cambios en las condiciones de crecimiento de los microorganismos y a la acumulación de metabolitos intermedios tóxicos y, de forma más habitual, a la mayor recalcitrancia de las fracciones resultantes de la metabolización del contaminante (Kazunga *y col.*, 2001; Mahro *y col.*, 2001; Sabaté *y col.*, 2004). Los resultados encontrados reflejan que los microorganismos edafológicos son capaces de metabolizar numerosos productos químicos presentes en los derrames de diferentes compuestos orgánicos, entre ellos, los HC, principales componentes del gasoil. En el caso concreto de este trabajo de investigación, con el tiempo, se han ido incrementando los porcentajes de degradación de HC, lo que sugiere, que ese efecto inhibitor de la biodegradación que surge al mineralizar los contaminantes, en el tiempo de ensayo, no ha aparecido. Esto puede ser debido al hecho de que la composición química elemental de los HC es muy similar a los compuestos orgánicos habituales en la naturaleza que emplean los microorganismos para su crecimiento y desarrollo. Cuando los microorganismos implicados en la biodegradación de HC son capaces de usar estos HC como nutrientes y los incorporan a sus rutas metabólicas, son capaces de transformarlos, completamente, en los productos habituales del metabolismo: agua y dióxido de carbono, no generando metabolitos recalcitrantes y tóxicos.

Además, para conocer y entender los efectos de la presencia de contaminantes en el suelo y de la bioestimulación microbiana se se han aplicado métodos basados en técnicas moleculares (PCR y DGGE), que han permitido la detección de distintos microorganismos, debido a que es sabido que la mayor parte de los microorganismos de muestras ambientales no pueden ser cultivados en los

medios de laboratorio, que son los factores limitantes del crecimiento específico de los microorganismos (Amann y *col.*, 1995; Torsvik y *col.*, 2002).

Los datos obtenidos del análisis por DGGE de las poblaciones confirman que existen diferencias en las poblaciones microbianas entre los tratamientos y, también, con respecto al suelo control. Así, en los suelos control contaminados desaparecen algunas poblaciones minoritarias que existían y que fueron identificadas en el Capítulo 2; lo que sugiere que la presencia de HC en el suelo ejerce un papel tóxico sobre las poblaciones microbianas. Estas poblaciones desaparecidas tampoco aparecen en los suelos tratados y bioestimulados, pero sí que aparecen, en estos suelos tratados, nuevas poblaciones, de las que se cree que son las responsables de los incrementos en los rangos de biodegradación de los hidrocarburos. A conclusiones similares han llegado diversos autores, que han observado la presencia de determinadas bacterias de forma predominante en tratamientos de diversos derivados del petróleo en los que se determinaban los mayores rangos de biodegradación (Kasai y *col.*, 2001; Roling-Wilfred y *col.*, 2002; Viñas y *col.*, 2005b).

Concretamente, la identificación de la especie bacteriana *Ralstonia sp.*, en los suelos tratados con WCDS-HE, se relaciona con la mayor desaparición y mineralización de HC encontradas en estos tratamiento. De hecho, se ha visto como miembros de este género tienen un papel fundamental en la biorremediación de suelos contaminados con HC del petróleo, debido a su capacidad de producir biosurfactantes extracelulares que emulsionan estos HC, mecanismo que facilita la biodegradación por parte de los microorganismos (Lu y *col.*, 2006).

4.2. CASO 2: Estudio de los efectos de los BSE en el tratamiento de suelos contaminados con atrazina

En esta etapa, se ha evaluado el papel y la influencia que ejercen los BSE sobre la biodegradación de la atrazina en el suelo modelo.

Al igual que en el CASO 1, se ha planteado el análisis de la actividad metabólica global del suelo en presencia del contaminante, para evaluar el potencial bioestimulante de los BSE en presencia de atrazina. También, se ha analizado la influencia de la aplicación de las distintas MO sobre la diversidad de las poblaciones microbianas y en el proceso de biodegradación de este herbicida.

4.2.1. Determinación de la actividad metabólica global del suelo: actividad deshidrogenasa (ADH)

La Figura.40 refleja los niveles de actividad deshidrogenasa durante los muestreos realizados a lo largo del período de incubación de los distintos tratamientos.

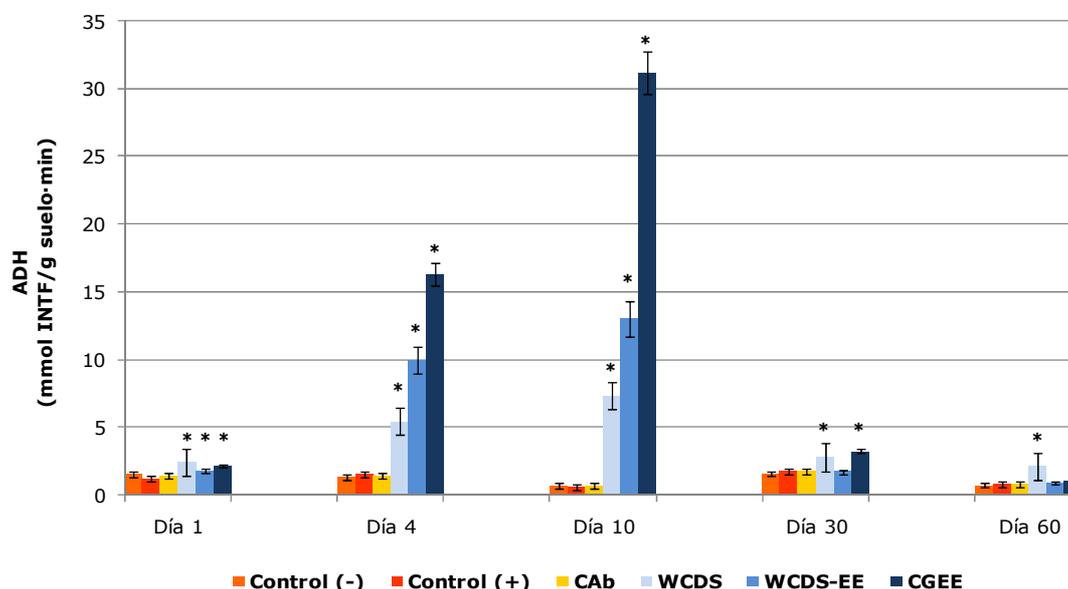


Figura.40: Actividad deshidrogenasa en el suelo experimental (contaminado con atrazina). DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001. *: tratamientos frente al C(+).

Del análisis de los resultados, se observa que se ha determinado una baja ADH, encontrada en todos los tratamientos con respecto al mismo suelo bioestimulado, pero sin contaminar. Al igual que en el caso de los hidrocarburos, parece que la presencia de este compuesto orgánico, atrazina, ejerce un efecto inhibitorio de la actividad metabólica.

Los datos revelan, además, que la adición de MO induce incrementos de la actividad microbiana con respecto a los valores de referencia de los suelos control contaminados C(+), aunque en menor medida que en un suelo sin contaminar, y que estos incrementos son dependientes del tamaño molecular proteico. Así, los tratamientos que muestran mayores valores de actividad son WCDS-HE y CGHE, es decir, los tratamientos con los BSEO hidrolizados enzimáticamente.

En esta situación, parece que la presencia de atrazina determina que haya cierto nivel de inhibición de la inducción de la actividad enzimática (menores valores de ADH en los tratamientos con suelo contaminado que en los suelos tratados sin contaminar), pero, también, parece que esta inducción de la actividad muestra cierto retraso temporal.

Así, el suelo con WCDS-HE muestra un máximo (13.06 ± 2.01 mmol INTF/g suelo·min) a los 10 días desde el inicio del ensayo, mientras que el mismo suelo sin contaminar tratado con WCDS-HE, a los 4 días ya alcanzaba un máximo de actividad (98.64 ± 19.32 mmol INTF/g suelo·min), es decir, unas 7.5 veces menos actividad en estos suelos con atrazina.

Si analizamos los datos determinados en los suelos con CGHE, no se da un retraso de la estimulación metabólica con respecto a los suelos con WCDS-HE, como ocurría en los suelos sin contaminar, alcanzándose el máximo de actividad a los 10 días, también (30.20 ± 2.87 mmol INTF/g suelo·min). Este valor es unas 2.7 veces inferior al valor máximo observado en el mismo tratamiento, pero sin atrazina (valor determinado en el día 7).

4.2.2. Evolución de la biodegradación de la atrazina

En función de los resultados obtenidos (Figura.41), en nuestro modelo experimental, el principal mecanismo de degradación de atrazina observado fue el biológico, puesto que los controles abióticos no mostraron disipación de atrazina y los valores permanecieron constantes a lo largo de todo el período de incubación.

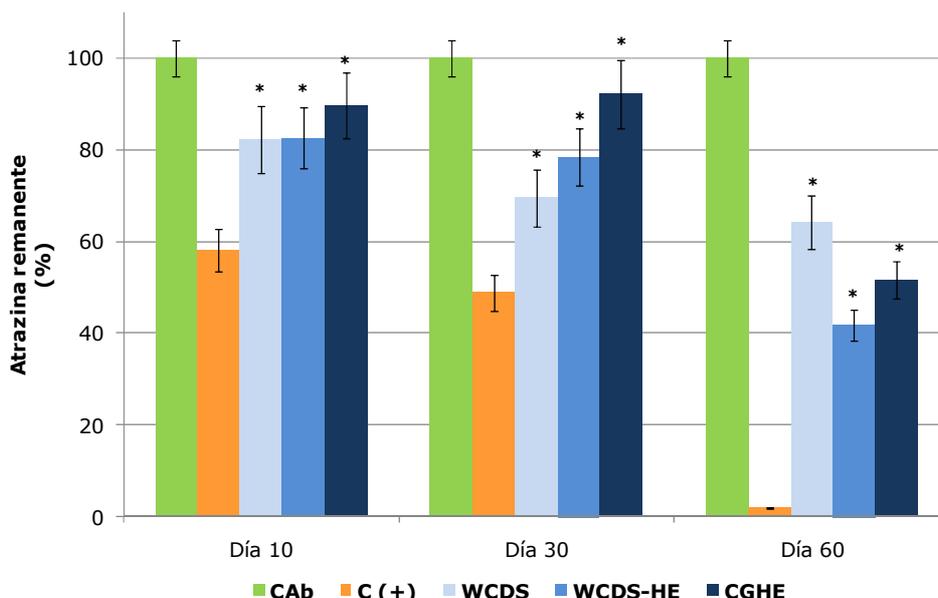


Figura.41: Nivel de atrazina remanente en el suelo en el ensayo de bioestimulación.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS >>> P<0.001. *: tratamientos frente al C(+).

Debido a la actividad metabólica de los microorganismos en los suelos C(+), la concentración de atrazina disminuye en el tiempo. En este caso, el proceso de biodegradación ha sido rápido, de forma que, después de 10 días, los valores de recuperación de atrazina fueron del $58.1 \pm 5.1\%$, es decir, que se ha degradado casi un 42% de la atrazina con la que se contaminó el suelo. Después de 30 días, sólo un $48 \pm 5.5\%$ de la atrazina fue recuperada (Figura.41). Finalmente, a los 60 días, el nivel de atrazina que se recuperó del suelo era inferior al 2%.

Sin embargo, resultados bien distintos se encuentran en los suelos bioestimulados. En este estudio, la adición de los bioestimulantes, tanto de WCDS como de los BSE (WCDS-HE y CGHE), con elevado contenido en N (en forma de proteínas o de péptidos, respectivamente) produce un fenómeno de inhibición del proceso de biodegradación.

Se puede observar como, tras 10 días, los porcentajes de atrazina que se encuentran en el suelo superan de forma significativa a los valores encontrados en C(+): $82.2 \pm 8.21\%$ en WCDS; $82.5 \pm 8.6\%$ para WCDS-HE y $89.6 \pm 7.5\%$ para CGHE. Esto supone entre 1.4 y 1.5 veces más atrazina que en el C(+). A los 30 días, empiezan a verse, de forma notable, las diferencias, no sólo con el control, sino entre los distintos tratamientos. Los porcentajes de atrazina en los suelos con WCDS y WCDS-HE decrecen hasta valores del $69.44 \pm 7.1\%$ y del $78.47 \pm 7.3\%$, respectivamente; valores superiores, significativamente, a los determinados en el C(+). El suelo con CGHE no muestra un descenso de la concentración de atrazina a los 30 días.

Finalmente, los resultados más importantes se obtienen a los 60 días. Se aprecia como los valores de atrazina en los suelos tratados son, no sólo, significativamente, superiores a los valores control, sino que, además, aún son muy elevados (entre un 40% y un 60% de atrazina), mientras que en el suelo control, prácticamente, he desaparecido toda la atrazina aplicada.

Estos resultados sugieren que la presencia de MO rica en N produce una inhibición de la biodegradación de atrazina. Además, parece que la biodisponibilidad de los nutrientes esenciales tiene una importancia fundamental en la desaparición del contaminante. Así, el tratamiento con WCDS, de menor biodisponibilidad, muestra porcentajes de atrazina, estadísticamente, superiores, a los valores determinados en el resto de bioestimulantes.

4.2.3. Caracterización por DGGE de las poblaciones microbianas del suelo modelo contaminado con atrazina

Los resultados que se muestran en las Imagen.30 e Imagen.31 se corresponden con la zona superior e inferior de un gel de DGGE, respectivamente, en el que se ha empleado un gradiente desnaturizante de urea-formamida del 30%-50%.

Imagen.30: Análisis de DGGE de fragmentos 16S que codifica para rRNA amplificados por PCR a partir de DNA genómico.

C(+): suelo control con atrazina; CAb: suelo control con azida sódica;

A: suelo contaminado+WCDs; B: suelo contaminado+WCDs-HE; C: suelo contaminado+CGHE

i: inicial (Día 1); f: final (Día 60).

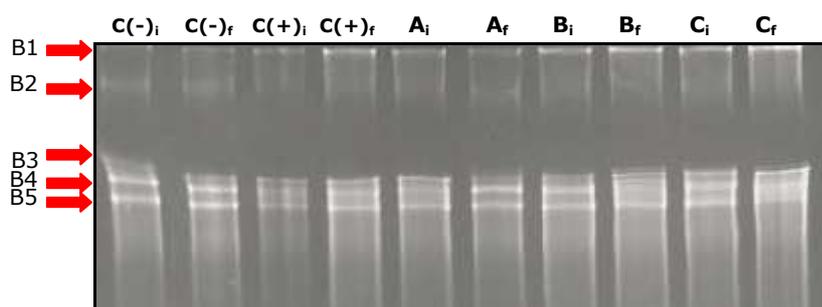


Imagen.31: Análisis de DGGE de fragmentos 16S que codifica par rRNA amplificados por PCR a partir de DNA genómico.

C(+): suelo control con atrazina; CAb: suelo control con azida sódica;

A: suelo contaminado+WCDs; B: suelo contaminado+WCDs-HE; C: suelo contaminado+CGHE

i: inicial (Día 1); f: final (Día 60).

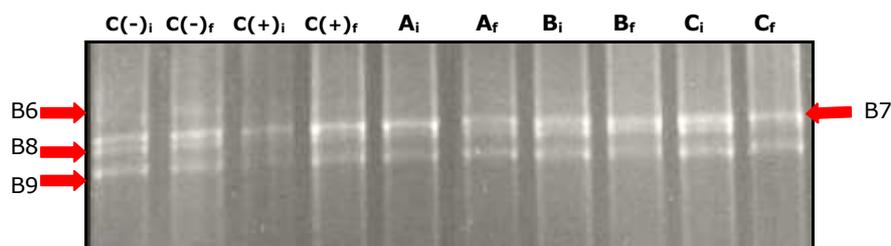


Tabla.59: Listado de bandas de DGGE obtenidas y secuenciadas: designación de un n° de acceso para cada banda y nivel de similitud respecto a la base de datos.

Banda DGGE	No. Acceso	% Similitud	Organismo Base de Datos Genbank
B1	FJ006903.1	78	Janthinobacterium sp.
B2	-	-	No determinada.
B3	AB265150.1	98	Xantomonadaceae bacterium TDMA-47
B4	FJ392837.1	97	Sphingomonas sp
B5	AE005673.1	88	Lysobacter sp EM 0470
B6	DQ337559	98	Caulobacter crescentus CB15
B7	FJ373039.1	98	Pseudomonas sp BBCT
B8	AF368755.1	98	Bacillus sp 57-3
B9	AB264132.1	95	Pseudomonas saccharaphila

El perfil de bandas electroforéticas encontradas (Tabla.56) coincide con el que se mostró en el **Capítulo II (4. Resultados y Discusión, 4.2.2. Estudio de la biodiversidad de las comunidades microbianas del suelo)**.

Así, se detectaron 8-9 bandas, de las que fueron identificadas tan sólo 8. Las bandas observadas y marcadas en el gel fueron cortadas y reamplificadas (PCR), para su posterior secuenciación (NewBiotechnic).

Estos resultados demuestran que la presencia de atrazina no induce cambios en las poblaciones microbianas presentes en el suelo y que los organismos endógenos que se encuentran en el suelo son los responsables de la metabolización de la atrazina.

4.2.4. Discusión

El herbicida atrazina es el herbicida organoclorado que más se usa en EE.UU. (Burkart *y col.*, 1988). Debido al gran uso que se hace de este herbicida en todas partes del mundo, especialmente, en EE.UU., la presencia de atrazina en los suelos agrícolas supone un gran problema de contaminación. Su moderada movilidad y persistencia han provocado que, a menudo, se detecte atrazina en concentraciones superiores a las consideradas legales en aguas superficiales, como ríos y lagos (Solomon *y col.*, 1986; Harman-Fetcho *y col.*, 1999; Hoffman *y col.*, 2000) y en los acuíferos (Kolpin *y col.*, 2000).

La atrazina es una molécula que puede ser degradada de forma abiótica, aunque el principal mecanismo de degradación de este herbicida es la metabolización microbiana. Un amplio número de bacterias es capaz de emplearla como fuente de C y energía (Rhine *y col.*, 2003).

Esta capacidad de los microorganismos de metabolizar la atrazina presente en el suelo trae como consecuencia una pérdida de la actividad de este herbicida, por lo que es frecuente que se repitan sus aplicaciones agrícolas, lo que, a su vez, produce un enriquecimiento de las poblaciones microbianas que son capaces de emplear atrazina como fuente de C y energía (Rhine *y col.*, 2003).

Todo esto sugiere que la biodegradación de atrazina como tratamiento de descontaminación de suelos es un tratamiento eficaz y de un alto rendimiento. De hecho, muchos microorganismos edafológicos son capaces de degradar, totalmente, la atrazina hasta CO₂ y H₂O, al emplearla como fuente de C (Behki *y col.*, 1986). Sin embargo, también, determinados microorganismos pueden usarla como fuente de N, mediante reacciones de N-dealquilación o dehalogenación de las cadenas laterales y del anillo de s-triazina central, que forman la molécula de atrazina (Mandelbaum, 1993; Rodosevich *y col.*, 1997). El hecho de que los microorganismos la empleen la atrazina, alternativamente, como fuente de C o de N va a depender de la relación C/N existente, de forma que, un alto valor de esta relación determina que la degradación de la atrazina se incrementa, al ser limitante la disponibilidad de N, es decir, la atrazina sería empleada como fuente de N (Rhine *y col.*, 2003).

Precisamente, este último aspecto sugiere que la adición de MO puede modificar la relación C/N y, de esta manera, influir en los rangos de mineralización de la atrazina ya que, en presencia de estos materiales orgánicos, se puede promover su uso por parte de los microorganismos del suelo (Entry and Emmingham, 1995; Topp y *col.*, 1996). Estudios previos sugieren que la adición de material orgánico acelera la degradación de atrazina, debido a la estimulación de las poblaciones microbianas (Hance, 1973; Entry y Emmingham, 1995; Topp y *col.*, 1996), pero es la relación C/N la que regula el rango de mineralización en el suelo (Entry y Emmingham, 1995; Alvey y Crowley, 1995; Abdelhafid y *col.*, 2000).

En este trabajo, en el que se han aplicado materiales orgánicos, como son WCDS-HE y CGHE, productos ricos en N orgánico, de fácil absorción, esta relación C/N se ve alterada, disminuyendo, considerablemente. En presencia de atrazina y los distintos BSE se ha comprobado que la actividad microbiana se ha incrementado, significativamente, con respecto a los suelos control, lo que era esperado, pero, sin embargo, no se ha producido una mayor metabolización del herbicida, sino que, estos incrementos de la actividad metabólica están, negativamente, relacionados con el proceso biodegradativo.

Los datos que se han encontrado sugieren que, bajo condiciones en las que el N no es un elemento limitante, las poblaciones microbianas emplean, prioritariamente, como fuente N los BSE, porque aportan N orgánico en forma de péptidos y aminoácidos, fácilmente, accesible y utilizable, debido a su menor tamaño molecular y a la fácil absorción por parte de los microorganismos. Distintos autores, entre los que se destacan a Alvey y Crowley, 1995, sugieren este mismo aspecto, que la forma de la MO es un factor fundamental, más que la relación C/N, con respecto a los incrementos de la actividad microbiana y del rango de mineralización de la atrazina.

La influencia de los bioestimulantes sobre las propiedades biológicas y bioquímicas del suelo y el proceso de mineralización de la atrazina, en este trabajo, se comprueba que dependen del tipo de MO añadida, como se ha sugerido, en trabajos previos. El efecto de cada bioestimulante depende de su componente dominante: así, los resultados reflejan la evidencia de que el tamaño molecular del componente proteico de los BSE tiene una gran influencia en los procesos de bioestimulación y biodegradación.

A este respecto, los tratamientos con WCDS-HE y CGHE, ambos, principalmente, compuestos por péptidos y aminoácidos libres (< 10.000 Da), muestran valores de actividad metabólica mayores que los suelos tratados con WCDS, que está compuesto, mayoritariamente, por proteínas (> 10.000 Da). No obstante, los suelos tratados con estos BSE son los que menor rango de biodegradación de atrazina muestran, de forma que, a los 60 días se encuentran porcentajes de degradación que oscilan entre el 40% y el 60%, para CGHE y WCDS-HE, respectivamente. Estos porcentajes han ido incrementándose, a medida que estas fuentes nutricionales han ido agotándose. En el suelo tratado con WCDS, que aporta N, pero, en este caso, en forma de proteínas de medio-alto peso molecular, se observa cómo, a tiempo final, es el que mayor concentración de atrazina presenta, lo cuál podría contradecir lo anterior, pero si se observan los resultados de DHA, se ve cómo, a los 60 días, aún persiste la estimulación que induce WCDS. Esto sugiere que el uso de atrazina como fuente de N está inhibido al existir aún WCDS como fuente de N.

Estos resultados representan un importante avance en la investigación sobre el uso y la persistencia de la atrazina en suelo. La degradación de atrazina por parte de los microorganismos del suelo supone un notable gasto de energía. Así, la presencia de MO compuesta por péptidos y aminoácidos, de bajo peso molecular, supone una nueva fuente de energía y de nutrientes menos costosa para los organismos. Los resultados expuestos sugieren que, preferentemente, los microorganismos emplean las materias más, fácilmente absorbibles, y mientras estos obtengan la energía y los nutrientes de estas fuentes, la biodegradación de la atrazina por parte de los microorganismos es lenta. De esta forma, la vida media de la atrazina en el suelo se va incrementando.

Cabe pensar que la aplicación de los BSE, WCDS-HE Y CGHE produce un aumento de la persistencia de la atrazina en suelo (*extenders* los denomina Alexander, 1999), lo que podría aumentar su toxicidad y los riesgos de contaminación. Sin embargo, este aumento del tiempo de vida medio en el suelo puede dar lugar a una disminución de las repeticiones de aplicación que hay que realizar por pérdidas del herbicida, mediante degradación microbiana, principalmente. De forma que, podrán utilizarse menores dosis del herbicida, lo que supone un beneficio, no sólo económico, sino, también, medioambiental, pues serán menos las cantidades del herbicida que estén disponibles en el medio ambiente. A su vez, la aplicación de los BSE, junto con la disminución de las

aplicaciones del herbicida, da lugar a una activación metabólica, que mejora la fertilidad del suelo y su calidad, especialmente, de suelos degradados. Este principio ha sido el empleado para la creación de la patente "*Producto Orgánico Potenciador de la Persistencia de Atrazina en Suelo y Bioestimulante Edafológico*". Nº:200801621. J. Parrado, A.M. Garcia-Martinez, M. Tejada Moral, J.D. Bautista Palomas, B. Rodríguez-Morgado.

Finalmente, aunque la presencia de atrazina en un suelo, en principio, hace pensar que las poblaciones microbianas pueden disminuir, en este estudio, el análisis, mediante DGGE, de las poblaciones existentes en el suelo ha reflejado que, tanto la dosis del herbicida empleada (100 ppm) y la MO aplicada no afecta a las poblaciones microbianas durante el período experimental (60 días). Estos resultados, aunque discrepan con los encontrados en el suelo contaminado gasoil, en el que sí se reflejaban cambios poblacionales como consecuencia de la presencia del contaminante, están en consonancia con otros estudios en los que se ha visto que los microorganismos en suelos contaminados con atrazina no se ven afectados por la presencia de este herbicida, bajo determinadas dosis (Ros y col., 2006), entre las que se encuentra la empleada en este estudio. Estos trabajos sí revelaron que si se incrementa la concentración de atrazina, los perfiles de poblaciones obtenidos por DGGE se ven alterados, en muchos casos disminuyendo las poblaciones.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. La información sobre la capacidad bioestimulante de WCDS-HE y CGHE se ha visto confirmada con los resultados obtenidos en suelos contaminados con hidrocarburos y atrazina. Así, los suelos contaminados tratados con estos productos muestran incrementos significativos de su actividad metabólica.
2. Esta capacidad bioestimulante es inferior en los casos de suelos contaminados, tanto con hidrocarburos como con atrazina. Además, existe un retraso significativo en la respuesta a la aplicación de las materias orgánicas.
3. La adición de bioestimulantes orgánicos al suelo contaminado con hidrocarburos aumenta las tasas de biodegradación de los TPH, a partir de los 25 días de incubación. Así, los suelos con WCDS-HE muestran las mayores tasas de biodegradación.
4. Existe una relación entre el aumento de la biodegradación de TPH y el tamaño molecular del componente proteico de los BSE. De hecho, los tratamientos con WCDS no revelan tasas de biodegradación elevadas a lo largo de todo el ensayo.
5. La presencia de contaminantes orgánicos, en este caso, hidrocarburos del gasoil, hace disminuir la población indígena que habita en el suelo, apareciendo, no obstante otras poblaciones. El descenso de la actividad metabólica en presencia de los BSE es debida a la desaparición de estas poblaciones.
6. En suelos contaminados con hidrocarburos del gasoil, ha aparecido la especie, *Ralstonia sp.*, en los tratamientos con WCDS-HE, especie encontrada y aislada en suelos contaminados con hidrocarburos. Esta bacteria podría ser la responsable principal de las mayores tasas de biodegradación de TPH que se observan en los tratamientos con WCDS-HE, superiores a las medidas en el tratamiento con CGHE.

7. En el caso de suelos contaminados con atrazina, la biorremediación de atrazina está inhibida por la presencia de los bioestimulantes orgánicos (ricos en N).

8. Los BSE peptídicos funcionan como *extenders* de la función de la atrazina en suelos.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ **Abdelhafid, R., Hout, S., Barriuso, E., 2000.** How increasing availabilities of carbon and nitrogen affect atrazine behaviour in soils. *Biology and Fertility of Soils* (30):333-340.
- ❖ **Acton, D. F., Gregorich, L. J., 1995.** The health of our soils. CLBRR. Publication 1906/E. Canada.
- ❖ **Adler-Nissen, J., 1977.** Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Process Biochemistry* (12):18-23.
- ❖ **Adler-Nissen, J., 1981.** Limited enzymatic degradation of proteins: a new approach in the industrial application of hydrolases. *Journal of Chemical Technology* (32):138-156.
- ❖ **Adler-Nissen, J., 1986.** ISSOH - The production and properties of an enzymatic food protein hydrolysate. In: *Enzymatic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, Ltd. 263-313.
- ❖ **Adler-Nissen, J., 1993.** Proteases. En: *Enzymes in food processing*. Nagodawithana, T., Reed, G., (Eds.). Academic Press. San Diego, EE.UU. 159-203.
- ❖ **Aislabie, J., McLeod, M., Fraser, R., 1998.** Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica. *Applied Microbiology ND Biotechnology* (49):210-214.
- ❖ **Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F., 2001.** Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. *Bioresource Technology* (77):109-114.
- ❖ **Alexander, M., 1977.** Introduction into soil microbiology. John Wiley & Sons., NY.
- ❖ **Alexander, M., 1999.** Biodegradation and Bioremediation. Segunda edición. Academic Press, Inc., San Diego.
- ❖ **Alexander, M., 2000.** Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology* (34):4259-4265.

- ❖ **Alvear, M., Pino, M., Castillo, C., Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F., 2006.** Efecto de la cero labranza sobre algunas actividades biológicas en un alfisol del sur de Chile. *Ciencias del Suelo y Nutrición Vegetal* (6):38-53.
- ❖ **Alvey, S., Crowley, D.E., 1995.** Influence of organic amendments on biodegradation of atrazine as a nitrogen-source. *Journal of Environmental Quality* (24):1156-1162.
- ❖ **Amann, R. I, Ludwig, W., Schleifer K. H., 1995.** Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiology Reviews* (59):143-169.
- ❖ **Antibus, R., Sinsabaugh, R.L., 1993.** The extraction and quantification of ergosterol from ectomycorrhizal fungi and roots. *Mycorrhiza* (3):137-144.
- ❖ **AOAC, 1990.** Official Methods of Analysis, 14th ed. Washington, DC.
- ❖ **Aon, M.A., Colaneri, A.C., 2001.** Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* (18):255-270.
- ❖ **Arias, M.E., González-Pérez, J.A, González-Vila, F.J., Ball, A.S., 2005.** Soil Health-a new challenge for microbiologists and chemists-. *International Microbiology* (8):13-21.
- ❖ **Arshad, M.A., Coen, G.M., 1992.** Characterization of soil quality: physical and chemical criteria. *American Journal of Alternative Agriculture* (7):25-31.
- ❖ **Arshad, M.A., Martin, S., 2002.** Identifying critical limits for soil quality indicators in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* (88):153-160.
- ❖ **Aruldoss, J. A., Viraraghavan, T., 1998.** Toxicity Testing of Refinery Wastewater Using Microtox®. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (60):456-463.
- ❖ **Assaf, N.A., Turco, R.F., 1994.** Accelerated biodegradation of atrazine by a microbial consortium is posible in cultura and soil. *Biodegradation* (5):29-35.
- ❖ **Atagana, H. I., Haynes, R. J., Wallis, F. M., 2003.** Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation* (14):297-307.

- ❖ **Atlas, R. M., Bartha, R., 1997.** Microbial Ecology, fundamentals and applications. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Redwood City, CA.
- ❖ **Azur Environmental, 1995.** Microtox™ Basic Solid-Phase Test (Basic SPT), Carlsbad, CA, EE.UU.
- ❖ **Baheri, H., Meysami, P., 2002.** Feasibility of fungi bioaugmentation in composting a flare pit soil. *Journal of Hazardous Materials* (89):279-286
- ❖ **Baligar, V.C., Wright, R.J., Smedley, M.D., 1991.** Enzyme activities in Appalachian soils. 3. Pyrophosphatase. *Communications in Soils Science and Plant Analysis* (22):15337-1545.
- ❖ **Barret, G.C., Elmore, D.T., 1998.** Reactions and analytical method for amino acids and peptides. En: Barret, G.C., Elmore, D.T., (Eds.). *Amino acids and peptides*. University Press, Cambridge, RU. 55-57.
- ❖ **Barriuso, E., Houot, S., 1996.** Rapid mineralization of the s-triazine ring of atrazine in soils in relation to soil management. *Soil Biology and Biochemistry* (28):1341-1348.
- ❖ **Barriuso, E., Houot, S., Serra-Wittling, C., 1997.** Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. *Pesticide Science* (49):65-75.
- ❖ **Behki, R.M., Khan, S.U., 1986.** Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (34):746-749.
- ❖ **Belyea, R., Eckhoff, S., Wallig, M., Tumbleson, M., 1998.** Variability in the nutritional quality of Distillers Solubles. *Bioresource Technology* (66):207-212.
- ❖ **Benítez, R., Ibarz, A., Pagan, J., 2008.** Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* (42):227-36.
- ❖ **Bento B., Camargo F., Okeke B., Frankenberger W., 2005.** Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* (96):1049-105.

- ❖ **Beynon, R.J., Bond, J.S., 1989.** Proteolytic enzymes: A practical approach IRL Press, Oxford, R.U.
- ❖ **Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tarvin, T.L., 1984.** Rapid analysis of aminoacids using pre-colum derivatization. *Journal of Chromatography* (336):93-104.
- ❖ **Bloem, J.D., Ruiten, P., Bouwman, L., 1997.** Soil food webs and nutrient cycling in agroecosystems. En: van Elsas D.J., Trevors, T.J., Wellington, H.M.E., (Eds). *Modern Soil Microbiology*. 245-275. Marcel Dekker, Inc. New York.
- ❖ **BOE 114, de 13-05-95.** Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados. Resolución de 28 de abril de 1995, de la secretaría de estado de Medio Ambiente y Vivienda.
- ❖ **BOE 96, de 21-04-98.** Ley 10/1998, de Residuos.
- ❖ **BOE 15, de 18-01-05.** R.D. 9/2005. REAL DECRETO 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.
- ❖ **BOE 49, de 26-02-09.** Plan Nacional Integrado de Residuos para el período 2008-2015. Resolución de 20 de enero de 2009, de la Secretaría de Estado de Cambio Climático.
- ❖ **Bonmartí, M., Jiménez, P., Álvarez, H., Calero, E., Juliá, M., Morillo, M., Núñez, E., 2000.** Evolución de actividades enzimáticas en el proceso restaurador de dos suelos procedentes de la explotación de canteras de Cataluña utilizando altas dosis de lodos de depuradora. En: García, C., Hernández, M.T., (Eds). *Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España*. CEBAS-CSIC. 229-293.
- ❖ **Bosma, T. N. P., Middeldorp, P. J. M., Schraa, G., Zender, A. J. B., 1997.** Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. *Environmental Science and Technology* (31):248-252.
- ❖ **Bossert, I. D., Bartha, R., 1984.** The fate of petroleum in soil ecosystems. En: Atlas, R. M., (Ed.). *Petroleum microbiology*. MacMillan Publishing Co. NY. 453-473
- ❖ **Breedveld, G. D., Sparrevik, M., 2001.** Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation* (11):391-399.

- ❖ **Brookes, P.C., Tate, K.R., Jenkinson, D.S., 1983.** The adenylate energy charge of the soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* (15):9-15.
- ❖ **Bruce, K. D., Hiorns, W. D., Hobman, J. L., Osborn, A. M., Strike, P., Ritchie D. A., 1992.** Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* (58):3413-3416.
- ❖ **Buhler, D.D., Randall, G.W., Koskinen, W.C., Wyse, D.L., 1993.** Water-quality-atrazine and alachlor losses from subsurface tile drainage of a clay loam soil. *Journal of Environmental Quality* (22):583-588.
- ❖ **Burkart, M.R., Ragon, S.E., Thurman, E.M., Perry, C.A., 1988.** Water resources investigation report. US Geological Survey Report. 88-42220:4. 45-452. US Geological Survey.
- ❖ **Burkart, M.R., Kolpin, D.W., 1993.** Hydrologic and land-use factors associated with herbicides and nitrate in near-surface aquifers. *Journal of Environmental Quality* (22):646-656.
- ❖ **Burns, R.G., 1978.** Enzyme activity in soil. Some theoretical and practical considerations. En: Burns, R.G., (Ed.). *Soil Enzymes*. Academic Press, NY. 295-340.
- ❖ **Casellas, M., Fernández, P., Bayona, J. M., Solanas, A. M., 1995.** Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). *Chemosphere* (30):725-740.
- ❖ **Casida, J.E., 1977.** Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. *Applied and Environmental Microbiology* (4): 630-636.
- ❖ **Castillo Rodríguez, F., 2005.** Biodegradación de compuestos xenobióticos En: *Biotecnología Ambiental*. Ed. Tébar. Madrid. (15):465-483.
- ❖ **Ceccanti, B., Pezzarosa, B., Gallardo-Lancho, F.J., Masciandaro, G., 1994.** Bio-tests as markers of soil utilization and fertility. *Geomicrobiology Journal* (11):309-316.
- ❖ **Chaineau, C. H., Yepremian, C., Vidalie, J. F., Ducreux, J., Ballerini, D., 2003.** Bioremediation of a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments. *Water, Air and Soil Pollution* (144):419-440.

- ❖ **Chen, S.K., Subler, S., Edwards, C.A., 2002.** Effets of agricultural biostimulants on soil microbial activity and nitrogen dynamics. *Applied Soil Ecology* (19):249-259.
- ❖ **Chen, S.K, Edwards, C.A., Subler, S., 2003.** The influence of two agricultural biostimulants on nitrogen transformation, microbial activity, and plant growth in soil microcosmos. *Soil Biology and Biochemistry* (35):9-19.
- ❖ **Cho, B-H., Chino, H., Tsuji, H., Kunito, T., Nagaoka, K., Otsuka, S., Yamashita, K., Matsumoto, S., Oyaiz, H., 1997.** Laboratory-scale bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait with soil amendment materials. *Chemosphere* (35):1599-1611.
- ❖ **Christofi, N., Ivshina, I. B.. 2002.** Microbial surfactants and their use in field studiesof soil remediation *Journal of Applied Microbiology* (93):915–929.
- ❖ **Ciardi, C., Nannipieri, P., 1990.** A comparison of methods for measuring ATP in soil. *Soil Biology and Biochemistry* (22):725-727.
- ❖ **Clark, R. C., Brown, D. W., 1977.** Petroleum: properties and analyses in biotic and abiotic systems. En: Malins, D. C., (Ed.). *Effects of petroleum on arctic and subarctic environments and organisms.* Academic Press Inc. Londres. 1-75.
- ❖ **Clay, S. A., Koskinen, W. C., 1990.** Characterization of alachlor and atraine desorption from soils. *Weed Science* (38):74-80.
- ❖ **Clegg, C. D., Lovell-Roger, D. L., Hobbs, P. J., 2003.** The impact of grassland management regime on the community structure of selected bacterial groups in soils. *FEMS-Microbiology Ecology* (43):263-270.
- ❖ **Clemente, A., Sánchez-Vioque, R., Vioque, J., Bautista, J., Millán, F., 1997.** Chemical composition of extracted died olive pomaces containing two and three phases. *Food Biotechnology* (11): 273-291.
- ❖ **Coello N., Bernal C., Bertsch A., Estrada O., Moccó Y., Hasegawa M., 2003.** Las plumas como residuo agroindustrial: su utilización biotecnológica para producir insumos de interés industrial. *Revista de la Facultad de Ingeniería, UCV.* (18):119-126.
- ❖ **Cole, S.T., Girons, I.S., 1994.** Bacterial genomics. *FEMS Microbiology Review* (14):139-160.

- ❖ **Collin, P.H., 2001.** Dictionary of Ecology and the Environment, 4th Edition. Peter Collin Publishing, Londres.
- ❖ **Contin, M., Corcimaru, S., Nobili, M.D., Brookes, P.C., 2000.** Temperature changes and the ATP concentration of the soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* (32):1219-1225.
- ❖ **Contin, M., Jenkinson, D.S., Brookes, P.C., 2002.** Measurement of ATP in soil: correcting for incomplete recovery. *Soil Biology and Biochemistry* (32):1219-1225.
- ❖ **Cook, A.M., Hütter, R. 1981.** s-Triazines as nitrogen sources for bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (29):1135-1143.
- ❖ **Cook, A.M., 1987.** Biodegradation of s-triazine xwnobiotics. *FEMS Microbiology Reviews* (46):93-116.
- ❖ **Cook, B.D., Allen, D.L., 1992.** Dissolved organic matter in old field soils: total amounts as a measure of available resources for soil mineralization. *Soil Biology and Biochemistry* (24):585-594.
- ❖ **Davis, J. B., Raymond, R. L., 1961.** Oxidation of alkyl substituted cyclic hydrocarbons by a *Nocardia* during growth on n-alkanes. *Applied Microbiology* (9):383-388.
- ❖ **Davis, M.W., Lamar, R.T., 1992.** Evaluation of methods to extract ergosterol for quantification of soil fungal biomass. *Soil Biology and Biochemistry* (24):189-198.
- ❖ **DeLonge, E. F., Wickham, G. S., Pace, N. R., 1989.** Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science* (243):1360-1363.
- ❖ **De Neve, S., Hofman, G., 2000.** Influence of soil compaction on carbon and nitrogen mineralization of soil organic matter and crop residues. *Biology and Fertility of Soils* (30):544-549.
- ❖ **Dibble, J. R., Bartha R., 1979.** Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology* (37):729-739.
- ❖ **Dick, W.A., Tabatabai, M.A., 1978.** Inorganic pyrophosphatase activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* (10):59-65.

- ❖ **Dilly, O., Nannipieri, P., 2001.** Response of ATP content, respiration rate and enzyme activities in an arable and a forest soil to nutrient additions. *Biology and Fertility of Soils* (34):64-72.
- ❖ **Djajakirana, G, Loergensen, R.G., Meyer, B., 1996.** Ergosterol and microbial biomass relationship in soil. *Biology and Fertility of Soils* (22):299-304.
- ❖ **Doran, J.W., Parkin, T.B., 1994.** Defining and assessing soil quality. En: Doran, J.W., (Ed.). *Defining soil quality for a sustainable environment*. Soil Science Society of American Special Publication. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, 3-21.
- ❖ **Doran, J.W., Parkin, T.B., 1996.** Quantitative indicators of soil Quality: a minimum data set. En: *Methods for assessing Soil Quality*, SSSA Special Publication (49). Wisconsin, EE.UU. 25-37.
- ❖ **Dott, W., Feidieker, D., Steiof, M., Beckerc, P. M., Ktimpfera, P., 1995.** Comparison of Ex situ and In situ Techniques for Bioremediation of Hydrocarbon-polluted Soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 301-306
- ❖ **Douglas, L.A., Riazi-Hamadani, A., Field, F.B., 1976.** Assay of pyrophosphatase in soil. *Soil Biology and Biochemistry* (8):391-393.
- ❖ **Drouliscos, N.J., Malekafi, V., 1980.** Nutritional evaluation of the germ meal and its protein isolate obtained from the carob seed (*Ceratonia siliqua*) in the rat. *British Journal of Nutrition* (43):115-123.
- ❖ **Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F., 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* (28):350-353.
- ❖ **Edwards, U., Rogal, T., Blöker, H., Emde, M., Böttger E. C., 1989.** Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes-characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* (17):7843-7853.
- ❖ **Eiland, F., 1983.** A simple method for quantitative determination of ATP in soil. *Soil Biology and Biochemistry* (15):665-670.
- ❖ **Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1977.** Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* (9):167-172.

- ❖ **Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1988.** Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* (9):167-172.
- ❖ **Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1990.** Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry* (22):891-897.
- ❖ **Ellouz, Y., Bayaoudh, A., Kammoun, S., Gharsallah, N., Nasri, M., 2001.** Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. *Bioresource Technology* (80):49-51.
- ❖ **Entry, J.A., Emmingham, W.H., 1995.** The influence of dairy manure on atrazine and 2,4- dichlorophenoxyacetic acid mineralization in pasture soils. *Canadian Journal of Soil Science* (75):379-383.
- ❖ **EPA Method 3550B, 1984.** Rev.2. U.S. EPA, Interlaboratory Comparison Study. Methods for Volatile and Semi-Volatile Compounds. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, Las Vegas, NV, EPA 600/4-84-027.
- ❖ **Eriksen, J. 1995.** Gross sulphur mineralization-immobilization turnover in soil amended with plant residues. *Soil Biology and Biochemistry* (37):2216-2224.
- ❖ **Escalante-Lozada, A., Gosset-Lagarda, G., Martínez-Jiménez, A., Bolívar-Zapata, I., 2004.** Diversidad microbiana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia* (38):538-592.
- ❖ **Exner J. H. 1994.** *Bioremediation: Field Experience.* Lewis publishers. Boca ratón, FL, EE.UU.
- ❖ **Fairbanks, B.C., Woods, L.E., Bryant, R.J., Elliot, E.T., Cole, C.V., Coleman, D.C., 1984.** Limitations of ATP estimates of microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* (16):549-558.
- ❖ **FAO (1999).** World Reference Base for soil resources. World Soil Resources Reports, nº 84 F.A.O.-ISRIC-ISSS. Roma.
- ❖ **Feeney, R.E., Whitaker, J.R., 1977.** Food Proteins: Improvement through chemical and enzymatic hydrolysis. ACS Symposium Series (160). American Society. Washington, D.C.

- ❖ **Ferguson, R.L., Buckley, E.N., Palumbo, A.V., 1984.** Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Applied and Environmental Microbiology* (47):49-55.
- ❖ **Fisher, S.G., Lerman, L.S., 1979.** Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* (16):191-200.
- ❖ **Fox, P.F., Morrisey, P.A., Mulvihill, D.M, 1982.** Chemical and enzymatic modification of food proteins. En: *Developments in food proteins 1*. Ed. B.J.F. Hudson. Applied Science Publishers Inc., Englewood, N. Jersey 07631, EE.UU. 1-5.
- ❖ **Franco, A.R., Gee, M.A., Guilfoyle, T.J., 1990.** Induction and superinduction of auxin-responsive mRNAs with auxine and protein synthesis inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* (265):15845-15849.
- ❖ **Friedman, M., 1999.** Chemistry, nutrition, and microbiology of d-amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (47):3457-3479.
- ❖ **Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., Rossi, P., 2002.** Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* (4):634-643.
- ❖ **Fröstegard A, Bääth E. 1996.** The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* (22):59-65.
- ❖ **Fruton, J.S., 1982.** Proteinase-catalysed synthesis of peptide bonds. *Advanced Enzymology* (53): 239-306.
- ❖ **Fuhrman, J. A., McCallum, K., Davis, A. A., 1988.** Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. *Applied and Environmental Microbiology* (54):1426-1429.
- ❖ **Gamiz, R., Espejo, J.A., Tejada, M., Dobao, M.M., Gonzalez, J.L., 1998.** Evolución de los contenidos de clorofilas en plantas de espárrago verda (*Asparragus officinalis*, L.) tras la adición de aminoácidos y ácidos húmicos. VII Simposio Nacional-III Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas (1):173-178.

- ❖ **Garbisu, C., Alkorta, I., Carlson, D.E., Leighton, T., Buchanan, B.B., 1997.** Selenite bioremediation potential of indigenous microorganisms from industrial activated sludge. *Microbiologia SEM* (13):437-444.
- ❖ **García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., Masciandaro, G., 1993.** The dehydrogenase activity of soil as an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. En: Gallardo-Lancho, J., (Ed.). *Proceedings of the XI International Symposium of Environmental Biogeochemistry, Salamanca*. 1185-1191.
- ❖ **García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., 1994.** Biochemical parameters in soils regenerated by the addition of organic wastes. *Waste Management and Research* (12):457-466.
- ❖ **García, C., Hernández, T., 2000.** Investigación y perspectivas de la enzimología de suelos en España. *CEBAS-CSIC, Murcia*. 352.
- ❖ **García, C., Hernández, T., 2003.** Determinación de la actividad deshidrogenasa del suelo. En: *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. García, C., Gil, F., Hernández, T., Trasar, C., (Eds.). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- ❖ **Genesse, A., 1997.** The use of nug meal as a low cost substrate for the production of alkaline protease by the alkaliphilic *Bacillus* sp. AR-009 and some properties of the enzyme. *Bioresource Technology* (63):59-61.
- ❖ **Genouw, G., De Naeyer, F., Van Meenen, P., Van deWerf, H., De Nijs, W., Verstraete, W., 1994.** Degradation of oil sludge by landfarming- a case study at the Ghent harbor. *Biodegradation* (5):37-46.
- ❖ **Gessner, M.O., Chauvet, E., 1993.** Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* (59):501-507.
- ❖ **Gibson, D. T., Subramanian, V., 1984.** Microbial degradation of aromatic compounds. En: Gibson, D.T., (Ed.). *Microbial Degradation of Organic compounds*. Marcel Dekker, NY.
- ❖ **Gjalakshimi, S., Abbasi, S.A., 2004.** Neem leaves as a source of fertilizer-cum-pesticide vermicompost. *Bioresource Technology* (92):291-296.
- ❖ **Gould, J.B., 1975.** Enzyme data. En: *Handbook of enzyme biotechnology*. Wiseman, A., (Ed.) Ellis Horwood Ltd. Chichester. 128-162.

- ❖ **Goyal, S., Mishra, M.M., Dhankar, S.S., Kapoor, K.K., Batra, R., 1993.** Microbial biomass turnover and enzyme activities following the application of farmyard manure to field soils with and without previous long-term applications. *Biology and Fertility of Soils* (15):60-64.
- ❖ **Grant, W.D., West, A.W., 1986.** Measurement of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine in soil: evaluation as indicators of microbial biomass. *Journal of Microbiological Methods* (6): 47-53.
- ❖ **Grossman, A.D., 1995.** Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics* (29): 477-508.
- ❖ **Gruiz, K., Kriston, E., 1995.** In situ bioremediation of hydrocarbon in soil. *Journal of Soil Contamination*. 4:163-173.
- ❖ **Guadix, A., Guadix, E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P., Camacho, F., 2000.** Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *ARS Pharmaceutica* (41):79-89.
- ❖ **Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B., 2002a.** An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology* (60):381-395.
- ❖ **Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., 2002b.** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* (59):15-32.
- ❖ **Halstead, R.L., McKercher, R.B., 1975.** Biochemistry and cycling of phosphorous. En: Paul, E.A., McLaren, A.D., (Eds.). *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, Nueva York. (4):31-63.
- ❖ **Hance, R.J. 1973.** The effect of nutrients on the descomposition of the herbicides atrazine and linuron incubated with soil. *Pesticide Science* (4):817-822.
- ❖ **Handelsman, J., Liles, M., Mann, D., Riesenfeld, C., Goodman, R.M., 2002.** Clonig the metagenome: culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivable microbial world. En: *Methods in Microbiology. Functional Genomics*. Wren, B., Dorrel, N., (Eds.). Academic Press. Amsterdam. 241-255.

- ❖ **Hanlon, G.W., Hodges, N.A., 1981.** Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus lichiniformis* on poorly utilized carbon and nitrogen sources. *Journal of Bacteriology* (147):427-431.
- ❖ **Harman-Fetcho, J.A., McConnell, L.L., Baker, J.E., 1999.** Agricultural pesticides in the Patuxent River, a tributary of the Chesapeake Bay. *Journal of Environmental Quality* (28):928-938.
- ❖ **Harms, H., Bosma, T. M. P., 1996.** Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (16):1-9.
- ❖ **Harris, R. F., Bezdicek, D. F., 1994.** Descriptive aspects of soil quality. En: Doran, J. W., Coleman, D. C., Bezdicek, D. F., Stewart, B. A., (Eds.). *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. SSSA Spec. Pub. (35). ASA, CSSA, y SSSA, Madison, WI.
- ❖ **Hart, M., Reader, R., 2003.** Ergosterol and Mycorrhizal Fungi: The Way Forward *New Phytologist* (159):536-537.
- ❖ **Hayano, K., Tubaki, K., 1985.** Origin and properties of β -glucosidase activity of tomato-field soil. *Soil Biology and Biochemistry* (17):553-557.
- ❖ **Haynes, R.J., Naidu, R., 1998.** Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: A review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* (51):123-137.
- ❖ **Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W., 1998.** Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* (35):1-21.
- ❖ **Hicks, R., Amann, R.I., Stahl, D.A., 1992.** Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom level 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* (58):2158-2163
- ❖ **Higgins, C.F., Payne, J.W., 1982.** Plant peptides. In: Boulder, D., Parthier, B., (Eds). *Encyclopedia of Plant Physiology*, 14A. Springer. 438-458.
- ❖ **Hoffman, R.S., Capel, P.D., Larson, S.J., 2000.** Comparison of pesticides in eight US urban streams. *Environmental Toxicology and Chemistry* (19):2249-2258.

- ❖ **Holben, W. E., Jansson, J. K., Chelm, B. K., Tiedje, J. M., 1988.** DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil community. *Applied and Environmental Microbiology* (54):703-711.
- ❖ **Howe-Grant, M., 1996.** Petroleum. *Encyclopedia of chemical technology* 4th Ed. Wiley Interscience Publication. Nueva York. 342-480.
- ❖ **Huang, B. H., Yung, K. H., Chang, S. T., 1985.** The sterol composition of *Volvariella volvacea* and other edible mushrooms. *Mycologia* (77):959-963.
- ❖ **Hugenholtz, P., Pace, N. R., 1996.** Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends in Biotechnology* (14):190-197.
- ❖ **Jan, M.T., Roberts, P., Tonheim, S.K., Jones, D.L., 2009.** Protein breakdown represents a major bottleneck in nitrogen cycling in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* (41):2272-2282.
- ❖ **Janzen, H.H., Campbell, C.A., Brandt, S.A., Lafond, G.P., Townley-Smith, L., 1992.** Ligth-fraction organic matter in soils from long-term crop rotations. *Soil Science Society of American Journal* (56):1799-1806.
- ❖ **Jenny, H., 1941.** Factors of soil formation. Mc Graw-Hill. 281. NY.
- ❖ **Jenkinson, D.S., Oades, J.M., 1979.** A method for measuring adenosine triphosphate in soil. *Soil Biology and Biochemistry* (11):193-199.
- ❖ **Joanisse, G.D., Bradley, R.L., Preston, C.M., Bending, G.D., 2008.** Sequestration of soil nitrogen as tannin-protein complexes may improve the competitive ability of sheep laurel (*Kalmia angustifolia*) relative to black spruce (*Picea mariana*) *New Phytologist* (181):187-198.
- ❖ **Jones, J.G., 1977.** The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. *Freshwater Biology* (7):67-91.
- ❖ **Jones, D.L., Hodge, A., 1999.** Biodegradation kinetics and sorption reactions of three differently charged amino acids in soil and their effects on plant organic nitrogen availability. *Soil Biology and Biochemistry* (31):1331-1342.

- ❖ **Jones, D.L., Shannon, D., Murphy, D.V., Farrar, J.F., 2004.** Role of dissolved organic nitrogen (DON) in soil N cycling in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* (36):749-756.
- ❖ **Jones, D.L., Healey, J.R., Willet, V.B., Farrar, J.F., Hodge, A., 2005.** Dissolved organic nitrogen uptake by plants – an important n uptake pathway? *Soil Biology and Biochemistry* (37):413-423.
- ❖ **Jost, R., Monti, J.C., Pahud, J.J., 1987.** Whey protein allergenicity and its reduction by technological means. *Food Technology* (41):118-121.
- ❖ **Ka, J.O., Holben, W.E., Tiedje, J.M., 1994.** Genetic and phenotypic diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading bacteria isolated from 2,4-D-treated field soils. *Applied and Environmental Microbiology* (60):1106-1115.
- ❖ **Kalisz, H.M., 1988.** Microbial proteinases. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (36):1-65.
- ❖ **Karlen, D.L., Mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F., Schuman, G.E., 1997.** Soil quality: a concept, definition and framework for evaluation. *Soil Science Society of America Journal* (61):4-10.
- ❖ **Kasai, Y., Kishira, H., Syutsubo, K., Harayama, S., 2001.** Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by the Nakhodka tanker oil-spill accident. *Environmental Microbiology* (3):246-255.
- ❖ **Kästner, M., 2000.** Degradation of aromatic and polyaromatic compounds. En: Rehm, H.J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P., (Eds.). *Biotechnology: Environmental processes II. Soil decontamination.* Wiley-VCH. Weinheim. 211-240.
- ❖ **Kazunga, C., Aitken, M. D., Gold A., Sangaiah, R., 2001.** Fluoranthene-2,3- and -1,5-diones are novel products from the bacterial transformation of fluoranthene. *Environmental Science Technology* (35):917-922.
- ❖ **Keller, M., Zengler, K., 2004.** Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews* (2):141-150.
- ❖ **Kennedy, A. C., Papendick, R. I., 1996.** Microbial characteristics of soil quality. En: SQI. 1996. *Indicators for soil quality evaluation.* USDA, Natural Resources Conservation Service. Soil Quality Institute. Agricultural Research Service. USA.

- ❖ **Khan, S., 2000.** An alkaline protease from *Bacillus licheniformis* SB-4 and its potential applications. PhD Thesis, Department of Microbiology, University of Delhi South Campus.
- ❖ **Kilara, A., 1985.** Enzyme-modified protein food ingredients. *Process Biochemistry* (43):149-157.
- ❖ **Klein, J., 2000.** Possibilities, limits, and future developments of soil bioremediation. En: Rehm, H. J., Reed, G., (Eds.). *Environmental processes II. Soil Decontamination, Biotechnology*, 11. Wiley-VCH. Weinheim, FRG. 465-476.
- ❖ **Knights, R.J., 1985.** Processing and evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates. En: *Nutrition for station needs in infance protein hydrolysates*. Lisshlpz, F., (Ed.). (8):105-115.
- ❖ **Kogure, K., Simudu, U., Taga, N., 1980.** A tentative direct microscopic method for counting kiving marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* (26):318-323.
- ❖ **Kolpin, D.W., Barbash, J.E., Gilliom, R.J., 2000.** Pesticides in ground water of the United States, 1992-1996. *Ground Waters* (38):858-863.
- ❖ **Koskinen, W. C., Clay, S. A., 1997.** Factors affecting atrazine fate in north central U.S. soils. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (151):117-165.
- ❖ **Kruntz, L.J., Gentry, T.J., Senseman, S.A., Pepper, I.L., Tierney, D.P., 2006.** Mineralization of atrazine, metolachlor and their respective metabolites in vegeted filter strip and cultivated soil. *Pesticides Management Science* (62):505-515.
- ❖ **Kumar C., Takagi, H., 1999.** Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* (17):561-594.
- ❖ **Labrador, J., 1996.** La materia orgánica en los agrosistemas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Mindi-Prensa. Madrid.
- ❖ **Ladd, J.N., 1978.** Origin and range of enzyme in soil. En: Burns, R.G. (Ed.). *Soil Enzymes*. Academic Press, Londres, 51-96.
- ❖ **Ladd, J.N., Foster, R.C., Nannipieri, P., Oades, J.M., 1996.** Soil structure and biological activity. *Soil Biochemistry* (9):23-78.

- ❖ **Lajoie, C.A., Strom, P.F., 1994.** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in coal tar oil contaminated soil. En: Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soil. Wise, D. L., Trantolo, D. J. (Eds). Marcel Dekker. NY. 149-162.
- ❖ **Larson, W.E., Pierce, F.J., 1991.** Conservation and enhancement of soil quality. En: Dumanski, J. (Ed.). Evaluation for sustainable land management in the developing world. International Board for Research and Management Proceedings. Bangkok, Tailandia. 175-203.
- ❖ **Lázaro Belanche, L., Arauzo Pérez, J., 1994.** Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. Hidrólisis enzimática. Zubía (12):227-240.
- ❖ **Leahy, J. G., Colwell, R. R., 1990.** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiology Review (54):305-315.
- ❖ **Lee, C.C., Harris, R.F., Williams, J.D.H., Armstrong, D.E., Syers, J.K., 1971.** Adenosine triphosphate in lake sediments: I. Determination. Soil Science Society of America Proceedings (35):82-86.
- ❖ **Lees, N.D., Skaggs, B., Kirsch, D.R., Brad, M., 1995.** Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathways of *Saccharomyces cerevisiae*: a review. Lipids (30)221-226.
- ❖ **Leirós, M.C., Trasar-Cepeda, C., Seoane, S., Gil-Sotres, F., 2000.** Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oak-wood) in an area of the European temperatura-humid zone (Galicia, N.W., Spain): general parameters. Soil Biology and Biochemistry (32):747-755.
- ❖ **Lehninger, A.L., 1978.** Enzimas de oxidación-reducción y transporte electrónico. En: Lehninger, A.L. (Ed.). Bioquímica, 2ª Edición. Editorial Omega S.A., Barcelona, 487-518.
- ❖ **Leytem, A.B., Mikkelsen, R.L., Gilliam, J.W., 2002.** Sorption of organic phosphorus compounds in Atlantic coastal plain soils. Soil Science (167):652-658.
- ❖ **Liang, Y., Nikolic, M., Peng, Y., Chen, W., Jiang, Y., 2005.** Organic matter manure stimulates biological activity and barley growth in soil subject to secondary salinization. Soil Biology and Fertility (37):1185-1195.

- ❖ **Liaset, B., Espea, M., 2003.** Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. *Process Biochemistry* (43):42-48.
- ❖ **Liebeg, E.W., Cutright, T.J., 1999.** The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* (44):55-64.
- ❖ **Liesack, W., Weyland, H., Stackerbrandt, E., 1991.** Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophilic bacteria. *Microbial Ecology* (21):191-198.
- ❖ **Lin, Q., Brookes, P.C., 1996.** Comparison of methods to measure microbial biomass in unamended, ryegrass-amended and fumigated soils. *Soil Biology and Biochemistry* (28):933-939.
- ❖ **Lindstrom, J. E., Prince, R. C., Clark, J. C., Grossmann, M. J., Yeager, T.R., 1991.** Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* (57):2514-2522.
- ❖ **Liu, Z., Jacobson, A. M., Luthy, R. G., 1995.** Biodegradation of naphthalene in aqueous non ionic surfactants systems. *Applied Environmental Microbiology* (61):145-151.
- ❖ **Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J., 1997.** Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* (63):4516-4522.
- ❖ **Lu, Y., Rosencrantz, D., Liesack, W., Conrad, R., 2006.** Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. *Environmental Microbiology* (8):1351-1360.
- ❖ **Macnaughton, S. J., Stephen, J. R., Venosa, A. D., Davis, G. A., Chang Y. J., White, D. C., 1999.** Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* (65):3566-3574.
- ❖ **Mackowiak C.L., Grossl, P. R., Bugbee, B.G., 2001.** Beneficial Effects of Humic Acid on Micronutrient Availability to Wheat. *Soil Science Society of America Journal* (65):1744-1750.

- ❖ **Mahro, R. M, Müller, R., Kasche, V., 2001.** Bioavailability-the key factor of soil bioremediation. En: Stegmann, R., Brunner, G., Calmano, W., Matz, G., (Eds.). Treatment of Contaminated Soil. Fundamentals Analysis Applications. Springer-Verlag. Berlín Heidelberg. 181-195.

- ❖ **Maidak, B. L., Cole, J. R, Lilburn, T. G., Parker Jr., C. T., Saxman, P. R., Stredwick, J. M., Garrity, G.M., Li, B., Olsen, G. J., Pramanik, S., Schmidt, T. M., Tiedje, J. M., 2000.** The RDP (Ribosomal Database Project) continues. Nucleic Acids Research (28):173-174.

- ❖ **Mandelbaum, R.T., Wackett, L.P., Allan, D.L. 1993.** Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. Applied Environmental Microbiology (59):1695-1701.

- ❖ **MAPA, 1986.** Métodos oficiales de análisis. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1):221-285.

- ❖ **Marcote, I., Hernández, T., García, C., Polo, A., 2001.** Influence of one or two successive annual applications of organic fertilisers on the enzyme activity of a soil under barley cultivation. Bioresource Technology (79):147-154.

- ❖ **Margesin, R., Schinner, F., 1997a.** Bioremediation of diesel-oil contaminated alpine soils at low temperatures. Applied Microbiology and Biotechnology (47):462-468.

- ❖ **Margesin, R., Schinner, F., 1997b.** Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. Applied and Environmental Microbiology (63):2660-2664.

- ❖ **Marin, J.A., 2004.** Biorremediación mediante técnicas biológicas de hidrocarburos contenidos en lodos de refinería. Experiencias en clima semiárido. PhD. Th. Universidad de Murcia.

- ❖ **Martens, C.S., Haddad, R., Chanton, J.P., 1992.** Organic matter accumulation, remineralization and burial in an anoxic coastal sediment. En: Whelan, J.K., Farrington, J.W., (Eds.). Organic Matter: Productivity, Accumulation and Preservation in Recent and Ancient Sediments, Columbia University Press, NY.

- ❖ **Martens, R., 2001.** Estimation of ATP in soil: extraction methods and calculation of extraction efficiency. Soil Biology and Biochemistry (33):973-982.

- ❖ **Martin, F., Delaruele, C., Hilbert, J.L., 1990.** An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. *Mycological Research* (94):1054-1064.
- ❖ **Masciandaro, G., Ceccant, B., Benedicto, S., Lee, H., 2001.** Humic substances to reduce salt effect on plant germination and growth. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* (33): 3-4.
- ❖ **McBride, M.B., 2003.** Toxic metals in sewage sludge-amended soils: has promotion of beneficial use discounted the risks? *Advances in Environmental Research* (8):5-19.
- ❖ **McDougald, D., Rice, S., Weichart, D., Kjelleberg, S., 1998.** Nonculturability: adaptation or debilitation. *FEMS Microbiology Ecology* (25):1-9.
- ❖ **Menn, F-M., Easter, J. P., Sayler, G. S., 2000.** Bacterial activity enhancement and soil decontamination. En: Rehm, H.J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P., (Eds). *Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination.* Wiley-VCH. Weinheim. 425-439.
- ❖ **Metcalfe, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Simpson, H.A., Taylor, S.L., Fuchs, R.L., 1996.** Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically modified crops. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (36):165-186.
- ❖ **Miller, R.H., 1990.** Soil microbiological inputs for sustainable agricultural systems. En: Edwards, C.A., House, G., (Eds.). *Sustainable Agriculture Systems, Soil and Water Conservation Society, Ankuru, IA, 614-623.*
- ❖ **Moré, M., Herrick, J.B., Silva, M.O., Ghiorse W.C., Madsen, E.J., 1994.** Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Applied and Environmental Microbiology* (60):1572-1580.
- ❖ **Moreno, J.L., Hernández, T., García, C., 1999.** Effects of a cadmium-contaminated sewage aludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in arid soil. *Biology and Fertility of Soils* (28):230-237.
- ❖ **Morgan, P., Watkinson, R. J., 1992.** Factors limiting the supply and efficiency of nutrient and oxygen supplements for the in situ biotreatment of contaminated soil and groundwater. *Water Research* (26):73-78.

- ❖ **Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A., 1993.** Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* (59):695-700.
- ❖ **Namkoong, W., Hwang, E., Park, J., Choi, J., 2002.** Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution* (119):23-31.
- ❖ **Nannipieri, P., Johnson, R.L., Paul, E.A., 1978.** Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biology and Fertility* (10):223-229.
- ❖ **Nannipieri, P., Grego, S., Ceccanti, C., 1990.** Ecological significance of the biological activity in soil. En: Bollag, J.M., Stotzky, G. (Eds.). *Soil Biochemistry*, 6. marcel Dekker, NY, 293-355.
- ❖ **Nannipieri, P., 1994.** The potential use of soil enzyme as indicators of productivity, sustainability and pollution. En: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R., (Eds.). *Soil Biota: Management in sustainable farming systems*. CSIRO, Adelaide. 238-244.
- ❖ **Nannipieri, P., Landi, L., Badalucco, L., 1995.** La capacità metabólica e la qualità del suolo. *Agronomia* (29):312-316.
- ❖ **Navarro, S., Oliva, J., Barba, A., García, C. 2000.** Determination of simazine, terbuthylazine, and their dealkylated chlorotriazine metabolites in soil using sonication microextraction and gas chromatography. *Journal of AOAC International* (83):1239-1243.
- ❖ **Newell, S.Y., Miller, J.D., Fallon, R.D., 1987.** Ergosterol content of salt-marsh fungi: effect of growth conditions and mycelia age. *Mycologia* (79):688-695.
- ❖ **Newell, S.Y., Arsuffi, T.L., Fallon, R.D., 1988.** Fundamental procedures for determining ergosterol content of decaying plant material by liquid chromatography. *Applied and Environmental Microbiology* (54):1876- 1879.
- ❖ **Newell, S. Y., 1992.** Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter. En: *The Fungal Community: Its organization and role in the ecosystem*. Carroll, G. C., Wicklow, D. T., (Eds.). Marcel Dekker, New York. 521-561

- ❖ **Newell, S.Y., 1994.** Total and free ergosterol in mycelia of saltmarsh Ascomycetes with access to whole leaves or aqueous extracts of leaves. *Applied and Environmental Microbiology* (60):3479-3482.
- ❖ **Núñez R., 2003.** Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la bioremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis Doctoral. Universidad de La Habana. Cuba.
- ❖ **Oades, J.M., Jenkinson, D.S., 1979.** Adenosine triphosphate content of the soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* (11):201-204.
- ❖ **Ochoa, V., Hinojosa, B., Gómez-Muñoz, B., García-Ruiz, R., 2007.** Actividades enzimáticas como indicadores de la calidad del suelo en agroecosistemas ecológicos. *Iniciación a la Investigación. Revista electrónica. Universidad de Jaén.*
- ❖ **O'Hara, H., Hageman, J.H., 1990.** Energy and calcium ion dependence of proteolysis during sporulation of *Bacillus subtilis* cells. *Journal of Bacteriology* (172):4161-4170.
- ❖ **Olaniran, A.O, Balgobinda, A., Pillaya, B., 2009.** Impacts of heavy metals on 1,2-dichloroethane biodegradation in co-contaminated soil *Journal of Environmental Sciences* (21):661-666.
- ❖ **Olsman, H., 1979.** Hydrolysed and autolysed vegetable proteins as functional food ingredients. *Journal of the American Oil Chemists' Society* (56):375-376.
- ❖ **Olsson, P.A., van Aarle, I.M., Allaway, W.G., Ashford, A.E., Rouhierm H., 2002.** Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhizal cultures. *Plant Physiology* (130):1162-1171.
- ❖ **Olvera-Novoa, M. A., Olivera-Castillo, L., 2000.** Potencialidad del uso de las leguminosas como fuente proteica en alimentos para peces. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola.* La Paz, B.C.S., México. 327-348.
- ❖ **Ordoñez, C., Asenjo, M.G., Benitez, C. Gonzalez, J.L., 2001.** Obtaining a protein concentrate from integral defatted sunflower flour. *Bioresource Technology*, (78):187-190.

- ❖ **Ortiz Marcos, S., 2003.** Buscando combustibles alternativos: el bioetanol. Anales de Mecánica y Electricidad (462):46-53.
- ❖ **Oudot, J y E. Dutrieux. 1989.** Hydrocarbon weathering and biodegradation in a tropical estuarine ecosystem. Marine Environmental Research (27):195-213.
- ❖ **Outtrup, H., Boyce, C., 1990.** Microbial proteinases and biotechnology. En: Fogarty, C.T., Kelly, K. (Eds). Microbial enzymes and biotechnology. Elsevier, London, 227-254.
- ❖ **Overbeck, J., 1991.** Early studies on ecto- and extracellular enzymes in aquatic environments. En: Chóst, R.J. (Ed.) Microbial enzymes in aquatic environments. Springer. NY. 1-5.
- ❖ **Pankhurst, C.E., 1997.** Biodiversity of soil organisms as an indicator of soil health. En: Pankhurst, C.E., Double, B.M., Gupta, V.V.S.R., (Eds.). Biological indicators of soil health. Chapter 12. CAB Int., R.U. 297-324.
- ❖ **Pankrantz, T.M., 2001.** Environmental Engineering Dictionary and Directory. CRC Press, Boca Raton, FL.
- ❖ **Parrado, J., Millán, F., Hernández-Pinzón, I. Bautista, J., Machado, A., 1993.** Sunflower peptones: use as nitrogen source for the formulation of fermentation media. Process Biochemistry (28):109-113.
- ❖ **Parrado, J., Romero, E., Bautista Palomas, J.D., 2005.** Procedimiento para la obtención de bioestimulantes a partir de residuos agroindustriales. Patente ES 2 259542A1.
- ❖ **Parrado, J., Escudero-Gilete, M.L., Friaza, V., García-Martínez, A., González-Miret, M.L., Bautista, J., Heredia, F.J., 2007.** Enzymatic vegetable extract with bioactive components: influence of fertiliser on the color and anthocyanins of red grapes. Journal of the Science of Food and Agriculture (87):2310-2318.
- ❖ **Parrado Rubio, J., Bautista Palomas, J.D, Romero Ramírez, E.J., García-Martínez, A.M., Friaza Patiño, V., Tejada, M., 2008.** Production of a Carob Enzymatic Extract: Potential Use As a Biofertilizer. Bioresource Technology (99):2312-2318.

- ❖ **Pascual, J.A., Hernández, T., Ayuso, M., García, C., 1997.** Changes in the microbial activity of arid soils amended with urban wastes. *Biology and Fertility of Soils* (24):429-434.
- ❖ **Pascual, J.A., Hernández, T., García, C., 1998.** Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: laboratory experiment. *Bioresource Technology* (64):131-138.
- ❖ **Paul, E.A., Clark, F.E., 1989.** *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, San Diego. 275-276.
- ❖ **Pérez-Armendariz, B., Loera-Corral, O., Fernández-Linares, L., Esparza-García, F., Rodríguez-Vázquez, R., 2004.** Biostimulation of micro-organisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. *Letters in applied microbiology* (38):373-377.
- ❖ **Pierce, F.J., Larson, W.E., 1993.** Developing criteria to evaluate sustainable land management. En: Kimble, J. M., (Ed.). *Proceedings of the Eighth International Soil Management Workshop: Utilization of Soil survey Information for Sustainable Land Use*. USDA Soil Conservation Service. National Soil Survey Center. Lincoln. NE. 7-14.
- ❖ **Pramer, D., Bartha, R., 1972.** Preparation and processing of soil samples for biodegradation studies. *Environmental Letters* (2):217-224.
- ❖ **Prendergast, K., 1974.** Protein hydrolyzate – a review. *Food Trade Review*. 44:14-21.
- ❖ **Priest, F.G., 1977.** Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriology Review* (41):711-753.
- ❖ **Prince, R. C., 1993.** Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit. Review Microbiology* (19):217-242.
- ❖ **Pritchard, P. H., Costa, C. F., 1991.** EPA's Alaska oil spill bioremediation project. *Environmental Science and Technology* (25):372-379.
- ❖ **Radosevich, M., Traina, S.J., Hao, Y.L., Touvinen, O.H., 1997.** Atrazine mineralization in laboratory-aged soil microcosms inoculated with s-triazine-degrading bacteria. *Journal of Environmental Quality* (26):206-214.

- ❖ **Radwan, S.S, Al-Mailem, D., El-Nemr, I., Salamah, S., 2000.** Enhanced remediation of hydrocarbon contaminated desert soil fertilized with organic carbons. *International Biodeterioration and Biodegradation* (46):129-132.
- ❖ **Rao, D.L.N., Pathak, H., 1996.** Ameliorative influence of organic matter on the biological activity of salt affected soils. *Arid Soil Restoration and Rehabilitation* (10):311-319.
- ❖ **Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (62):597-635.
- ❖ **Reddy, L.V.A., Wee, Y.J., Yun J.S., Ryu, H.W., 2007.** Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology* (99):2242-2249.
- ❖ **Reysenbach, A., Giver, L.J., Wickham, G.S., Pace, N.R., 1992.** Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* (58) :3417-3418.
- ❖ **Rhine, E.D., Fuhrmann, J.J., Radosevich, M., 2003.** Microbial community responses to atrazine exposure and nutrient availability: linking degradation capacity to community structure. *Microbial Ecology* (46):145-160.
- ❖ **Ripley M.B. , Harrison, A.B., Betts, W.B., Dart, R.K., 2002.** Mechanisms for enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbe-colonized gas-liquid foam. *Journal of Applied Microbiology* (92):22-31.
- ❖ **Riser-Roberts, E., 1998.** Bioremediation of petroleum contaminated soils. Lewis. Chelsea, MI, EE.UU. 232-249.
- ❖ **Ritz, K., McNicol, J. W., Nunan, N., Grayston, S., Millard, P., Atkinson, D., Gollotte, A., Habeshaw, D., Boag, B., Clegg, C. D., Griffiths, B. S., Wheatley, R.E., Glover, L. A., McCaig, A. E., Prosser J. I., 2004.** Spatial structure in soil chemical and microbiological properties in upland grassland. *FEMS Microbiology and Ecology* (49):191-205.

- ❖ **Roling-Wilfred, F. M., Milner, M. G., Jones, D. M., Lee, K., Daniel, F., Swannell-Richard, J. P., Head, I. M., 2002.** Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* (68):5537-5548.

- ❖ **Romaniuk, R., Brandt, J.F., Rios, P.R., Giuffré, L., 2007.** Atenuación natural y remediación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ciencias del Suelo* (25):139-149.

- ❖ **Romero Ramírez, E.J., Bautista Palomas, J.D., García-Martínez, A.M., Cremades, O., Parrado Rubio, J., 2007.** Bioconversion of corn distiller's dried grains with solubles (CDDGS) to extracellular proteases and peptones. *Process Biochemistry* (42):1492-1497.

- ❖ **Roming, D.E., Garlynd, M.J., Harris, R.F., McSweeney, K., 1995.** How farmers assess soil health and quality? *Journal of Soil and Water Conservation* (50):229-236.

- ❖ **Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., 2000.** Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* (66):2541-2547.

- ❖ **Ros, M., 2000.** Recuperación de suelos agrícolas abandonados mediante el reciclaje en los mismos de residuos orgánicos de origen urbano. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

- ❖ **Ros, M., Hernández, T., García, C., 2003.** Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry* (35):463-469.

- ❖ **Ros, M., Goberna, M., Moreno, J.L., Hernandez, García, C., Insam, H., Pascual, J.A., 2006.** Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. [SSEW] *Soil Survey of England and Wales, 1982. Soil Survey Laboratory methods, Technical Monograph* (6). Harpenden, RU.

- ❖ **Rosini, F. D. 1960.** Hydrocarbons in petroleum. *Journal of Chemical Education* (39):554-561.

- ❖ **Ross, D.J., 1971.** Some factors affecting the estimation of dehydrogenase activities of some soils under pasture. *Soil Biology and Biochemistry* (3):97-110.

- ❖ **Ruberto, L., Vazquez, S.C., MacCormack, W.P., 2003.** Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and biodegradation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* (52):115-125.
- ❖ **Rupley J.A., 1967.** Susceptibility to attack by proteolytic enzymes. *Methods in Enzymology* (11):905-917.
- ❖ **Sabaté, J., Viñas, M., Solanas, A. M., 2004.** Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration and Biodegradation* (54):19-25.
- ❖ **Sangali, S., Brandelli, A., 2000a.** Isolation and characterization of a novel feather-degrading strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (87):17-27.
- ❖ **Sangali, S., Brandelli, A., 2000b.** Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. Kr2 strain. *Journal of Applied Microbiology* (89):735-743.
- ❖ **Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R., Birnbaum, S., 2005.** Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Display Settings* (136):187-195.
- ❖ **Saval, B.S., 1995.** Acciones para la remediación de suelos en México. Segundo Minisimposio Internacional sobre Contaminantes del Agua y Suelo. Instituto de Ingeniería. UNAM. México.
- ❖ **Schiessler, A., Schwarzott, D., Walker, C., 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* (105): 1413-1421.
- ❖ **Schroeder, J.W., 2003.** Distillers Grains as a protein and energy supplement for dairy cattle. NDSU Extension Service. North Dakota State University of Agriculture and Applied Science and US Department of Agriculture cooperating.
- ❖ **Schulten, H.R., Schnitzer, M., 1998.** The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils* (26):1-15.
- ❖ **Sessitsch, A., Weilharter A., Gerzabek M. H., Kirchmann H. Kandeler E., 2001.** Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology* (67):4215-4224.

- ❖ **Shaeffer, P., Millet, J., Aubert, J., 1965.** Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceedings of the National Academic of Science USA* (54):704-711.
- ❖ **Shannon, D., Sen, A.M., Johnson, D.B., 2002.** A comparative study of the microbiology of soils managed under organic and conventional regimes. *Soil Use and Management* (18):274-283.
- ❖ **Shelton, H., Jones, R.J., 1995.** Opportunities and limitations in leucaena. En: *Leucaena Opportunities and Limitations. Proceedings of a Workshop in Bogor, Indonesia.* 61.
- ❖ **Shimogaki, H., Takeuchi, K., Nishino, T., Odhera, M., Kudo, T., Ohba, K., Iwama, M., Irie, M., 1991.** Purification and properties of a novel surface-active agent- and alkaline-resistant protease from *Bacillus* sp. Y. *Agricultural Biology and Chemistry* (55):2251-2258.
- ❖ **Sikora, L.J., Enkiri, N.K., 1999.** Growth of tall fescue in compost/fertilizer blends. *Soil Science* (56):125-137.
- ❖ **Singh, B. K., Walker, A., Morgan, J. A., Wright, D. J., 2003.** Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium *Applied and Environmental Microbiology* (69):5198-5206.
- ❖ **Sinsabaugh, R.L., 1994.** Enzymatic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Fertility of Soils* (17):69-74.
- ❖ **Smith, G.A., Nickels, J.S., Kerger, B.D., Davis, J.D., Collins, S.P., Wilson, J.T., McNabb, J.F., White, D.C., 1986.** Quantitative characterization of microbial biomass and community structure in subsurface material- a prokaryotic consortium responsive to organic contamination. *Canadian Journal of Microbiology* (32):104-111.
- ❖ **Sojka, R.E., Upchurch, D.R., 1999.** Reservation regarding the soil quality concept. *Soil Science Society of American Journal* (63):1039-1054.
- ❖ **Soliva, M., Paulet, S., 2001.** Compostaje de residuos orgánicos y aplicación agrícola. En: *Aplicación agrícola de residuos orgánicos. Ediciones de la Universidad de Lleida.* 63-78.

- ❖ **Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Dixon, K.R., Klaine, S.J., La Pointe, T.W., Kendall, R.J., Weiskopf, C.P., Giddings, J.M., Giesey, J.P., 1986.** Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology Chemistry* (15):31-76.
- ❖ **Song, H, Wang, X., Bartha, R., 1990.** Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied and Environmental Microbiology* (56):652-656.
- ❖ **Sparling, G.P., Speir, T.W., Whale, K.N., 1986.** Changes in microbial biomass C, ATP content; soil phospho-monesterase and phospho-diesterase activity following air-drying of soils. *Soil Biology and Biochemistry* (18):363-370.
- ❖ **Speir, T.W., Ross, D.J., 1978.** Soil phosphatase and sulphatase. En: Burns, R.G., (Ed.). *Soil Enzymes*. Academic Press, Londres. 197-250.
- ❖ **Speir, T.W., Ross, D.J., Orchard, V.A., 1984.** Spatial variability of biochemical properties in a taxonomically uniform soil under grazed pasture. *Soil Biology and Biochemistry* (16):153-160.
- ❖ **Spliid, N.H., Kopper, B., 1998.** Occurrence of pesticides in Danish Shallow ground water. *Chemosphere* (37):1307-1316.
- ❖ **SQI, 1996.** Indicators for soil quality evaluation. USDA, Natural Resources Conservation Service. Soil Quality Institute. Agricultural Research Service. USA.
- ❖ **Stahl, P.D., Parkin, T.B., 1996.** Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. *Soil Biology and Biochemistry* (28):847-855.
- ❖ **Staley, J.T., Konopka, A., 1985.** Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* (39):321-346.
- ❖ **Stapleton, R. D., 1998.** Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. *Applied and Environmental Microbiology* (64):4180-4184.
- ❖ **Steinhardt, J., Beychock, S., 1964.** Interaction of proteins with hydrogen ions and other small ions and molecules. En: *The proteins* (11):139-304.
- ❖ **Stevenson, F.J., 1994.** Humus chemistry: Genesis, composition, reactios. Wiley-Interscience, N.Y.

- ❖ **Stryer, L., 1995.** Biochemistry. 4th edition. Freeman and company, Nueva York.

- ❖ **Stucki, G., Alexander, M., 1987.** Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. Applied and Environmental Microbiology (53):292-297.

- ❖ **Sutherland, J. B., Rafii, F., Khan, A. A., Cerniglia, C. E., 1995.** Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. En: Young L. Y., Cerniglia C. E., (Eds.), Micribial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley-Liss. Nueva York. 269-306.

- ❖ **Szegi, J., 1988.** Cellulose descomposition and soil fertility. Akademiai Kiado. Budapest.

- ❖ **Tabak, H. H., Gao, C., Lai, L., Yan, X., Pfanstiel, S., Kim, I. S., Govind R., 1994.** Determination of bioavailability and biodegradation kinetics of phenol and alkylphenols in soil. En: Tedder, D. W., Pohland, F. G., (Eds.). ACS Symposium Series 554. Washington. 51-57.

- ❖ **Tabak, H. H., Govind, R., Gao, C., Lai, L., Yan, X., Pfanstiel, S., 1995.** Determination of bioavailability and biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. En: Tedder, D.W., Pohland, F.G., (Eds.). Emerging technologies in hazardous waste management. ACS symposium series. Washington.

- ❖ **Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969.** Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biology and Biochemistry (1):301-307.

- ❖ **Tabatabai, M.A., 1982.** Soil Enzymes. En: Page, A.L., Miller, E.M., Keeney, D.R., (Eds.). Methods of Soil Analysis (2). Chemical and Microbiological properties. Soils Science Society of America, Inc. Madison. 903-947.

- ❖ **Talbot, J.M., Finzi, A.C., 2008.** Differential effects of sugar maple, red oak and hemlock tannins on carbon and nitrogen cycling in temperate forest soils. Oecologia (155):583-592.

- ❖ **Tejada, M., Gonzalez, J.L., 2003a.** Effects of the application of a compost originating from crushed cotton gin residues on wheat yield under dryland conditions. European Journal of Agronomy (19):357-368.

- ❖ **Tejada, M., Gonzalez, J.L., 2003b.** Application of a by-product of the two-step olive oil mil process on rice yield. Agrochimica (47):94-102.

- ❖ **Tejada, M., Gonzalez, J.L., 2004.** Effects of application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on maize yield. *Agronomy Journal* (96): 692-699.
- ❖ **Tiedje, J., Cloete, T.E., 2000.** Microbial diversity: strategies for its recovery. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain, A.L., Davies, J.E., (Eds.) ASM Press. Washington. EE.UU. 682-692.
- ❖ **Topp, E., Tessier, L., Gregorich, E.G., 1996.** Dairy manure incorporation stimulates rapid atrazine mineralization in agricultural soil. *Canadian Journal of Soil Science* (76):403-409.
- ❖ **Torstensson, L., Borjesson, E., 2004.** Use of imazapyr against equisetum arvense on Swedish Railway Tracks. *Pesticide Management Science* (60):565-569.
- ❖ **Torsvik, V., Goksoyr J., Daae, F. L., 1990.** High diversity of DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* (56):782-787.
- ❖ **Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A., Ovreas L., 1998.** Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* (64):53-62.
- ❖ **Torsvik, V., Ovreas, L., 2002.** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion Microbiology* (5):240-245.
- ❖ **Torsvik, V., Ovreas, L., Thingstad, T. F., 2003.** Prokaryotic Diversity - Magnitude, Dynamics and Controlling Factors. *Science* (296):1064-1066.
- ❖ **Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Gil-Sotres, F., Seoane, F., 1999.** Defining the validity of a biochemical index of soil quality. *Biology and Fertility of Soils* (30):140-146.
- ❖ **Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., Gil-Sotres, F., 2000.** Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry* (28):1867-1875.
- ❖ **Trevors, J.T., Mayfield, C.I., Inniss, W.E., 1982.** Measurement of electron transport system (ETS) activity in soil. *Microbial Ecology* (8):163-168.
- ❖ **Trevors, J.T., 1984a.** Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biology and Biochemistry* (16):673-674.

- ❖ **Trevors, J.T., 1984b.** Effect of substrate concentration, inorganic nitrogen, O₂ concentration, temperature and pH on dehydrogenase activity in soil. *Plant and Soil* (77):285-293.
- ❖ **Trinsoutrot, J., Nicolardot, B., Justes, E., Recous, S., 2000.** Decomposition in the field of residues of oilseed rape grown at two levels of nitrogen fertilization. Effects on the dynamics of soil mineral nitrogen between successive crops. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* (56):125-137.
- ❖ **Truper, H. G., 1992.** Prokariotes- an overview with respect to biodiversity and environmental importance. *Biodiversity Conservation* (1):227-236.
- ❖ **Tsai, Y.L., Olson, B. H., 1991.** Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* (57):1070-1074.
- ❖ **Tunlid, A., White, D.C., 1992.** Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. En: Strotzky, G., Bollag, J.M., (Eds.). *Soil Biochemistry*, 7. Marcel Dekker, NY, 229-262.
- ❖ **Turgeon, S.L., Gauthier, S.F., 1990.** Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process: Production and characterization. *Journal of Food Science* (55):106-110.
- ❖ **Ueda, T., Sada, I., Kato, T., Izumiya, N., 1985.** Cyclic peptides. XIX. Synthesis, conformation, and biological activity of cyclo(-Pro-Val-Pro-Val-) with L-L-L-L and L-D-L-D sequences. *International Journal of Peptides and Proteins Research* (25):475-480.
- ❖ **Ulrici, W., 2000.** Contaminated soil areas, different countries and contaminants monitoring of contaminants. En: Rehm, H. J., Reed, G., (Eds.). *Environmental Processes II. Soil Decontamination, Biotechnology*, 11b. Weinheim, FRG, 5-42.
- ❖ **Uden, G., Bongaerts, J., 1997.** Alternative respiratory pathways of E.coli: energetic and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta* (1320):217-234.
- ❖ **Vasileva-Tonkova, E., Nustorova, M., Gushterova, A., 2007.** New Protein Hydrolysates from Collagen Wastes Used as Peptone for Bacterial Growth, *APB Current Microbiology* (54):54-57.

- ❖ **Vasudevan, N., Rajaram, P., 2001.** Bioremediation of oil sludgecontaminated soil. *Environment International* (26):409-411.

- ❖ **Venosa, A.D., Suidan, B.A., Wrenn, K.L., Strohmeier, K.L., Haines, J.R., Eberhart, B.L., King, D., Holder, E., 1996.** Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delawere Bay. *Environmental Science and Technology* (30):1764-1775.

- ❖ **Verma, S., Bhargava, R., Pruthi, V., 2006.** Oily sludge degradationby bacteria from Ankleshwar, India. *International Biodeterioration and Biodegradation* (57):207-213.

- ❖ **Verstraete, W.R., Vanlooche, R., de Borger, R., 1976.** Modeling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. En: *Proc. 3rd International Biodegradation Symposium*. Sharpley, J.M., Kaplan, A.M., (Eds). Applied Science Publishers. Londres. 98-112.

- ❖ **Viñas, M., 2005a.** Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.

- ❖ **Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M.J., Solanas, A.M., 2005b.** Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation durin bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* (71):7008-7018.

- ❖ **Volkering, F, Breure, A. M, Rulkens, W. H., 1998.** Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* (8):401-417.

- ❖ **von Mersi, W., Schinner, F., 1991.** An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitrotetrazolium chloride. *Biology and Fertility of Soils* (11):216-220.

- ❖ **Walworth, J.L., Reynolds, C.M., 1995.** Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: effects of phosphorus, nitrogen, and temperature. *Journal of Soil Contamination* (4):299-310.

- ❖ **Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K.H., 1993.** Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* (59):1520-1525.

- ❖ **Wagner, M., Erhart, M., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D., Schleifer, K.H., 1994.** Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* (60):792-800.

- ❖ **Walker, J., Altaman, E., 2005.** Biotinylation facilitates the uptake of large peptides by *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental microbiology* (71):1850-1855.

- ❖ **Wang, G. C. Y., Wang, Y., 1996.** The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology*. (142):1107-1114.

- ❖ **Wang, X., Gong, Z., 1998.** Assessment and analysis of soil quality changes after eleven years of reclamation in subtropical China. *Geoderma* (81):339-355.

- ❖ **Wang, Y., Belton, P.S., Bridon, H., Garanger, E., Wellner, N., Parker, M.L., Grant, A., Feillet, P., Noel, T.R., 2001.** Physicochemical studies of caroubin: a gluten-like protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (49):3414–3419.

- ❖ **Ward, O.P., 1983.** Proteinases. En: Fogarty, W.M., (Ed). *Microbial enzymes and biotechnology*. Elsevier Applied Science Publish, Londres. 251-317.

- ❖ **Ward, D.M., Bateson, M.M., Weller, R., Ruff-Roberts, A.L., 1990.** Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *FEMS Microbiology Reviews* (75):105-116.

- ❖ **Watson, S.A., Ramstad, P., 1987.** Structure and composition. En: *Corn: Chemistry and Technology*. Watson, S. A., Ramstad, P. E., (Eds.). American Association of Cereal Chemist. St Paul. Minnesota. EE.UU. 605.

- ❖ **Watts, J.E., Huddleston, A.S., Wellington, E.M.H., 1999.** Bioprospecting. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain, A.L., Davies, J.E., (Eds.). ASM Press. Washington. EE.UU. 631-641.

- ❖ **Webster, J.J., Hampton, G.J., Leach, F.R., 1984.** ATP in soil: a new extractant and extraction procedure. *Soil Biology and Biochemistry* (4):335-342.

- ❖ **Weete, J.D., Weber, D.J., 1980.** Lipid biochemistry of fungi and other organisms. Plenum Publishing. NY.

- ❖ **Weete J.D., Gandhi, S.R., 1996.** Biochemistry and molecular biology of fungal sterols. En: Brambl, R., Marzluf, G., (Eds.). The mycota III biochemistry and molecular biology. Springer. Berlín, Alemania. 421-438.
- ❖ **Wenk, M., Bourgeois, M., Allen, J., Stucki, G., 1997.** Effects of atrazine-mineralizing microorganisms on weed growth in atrazine-treated soils. Journal of Agricultural and Food Chemistry (45):4474-4480.
- ❖ **Whehtje, G.R., Spading, R.F., Burnside, O.C., Lowry, S.R., Leavitt, J.C.R., 1983.** Biological significance and fate of atrazine under aquifer conditions. Weed Science (31):610-618.
- ❖ **Widmer, S., Olson, J., Koskinen, W., 1993.** Kinetics of atrazine hydrolysis in water. Journal of Environmental Science (28):19-28.
- ❖ **Williams, C.M., Grimes, J.L., Mikkelsen, R.L., 1999.** The use of poultry litter as co-substrate and source of inorganic nutrients and microorganisms for the ex situ biodegradation of petroleum compounds. Poultry Litter (78):956-964.
- ❖ **Yanga, J., Shihb, I.L., Tzengc, Y.M., Wanga, S.L., 2000.** Production and purification of protease from *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme and Microbial Technology (26): 406-413.
- ❖ **Yenze-Kontchou, C., Gschwind, N., 1994.** Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by *Pseudomonas* strain. Applied and Environmental Microbiology (60):4297-4302.
- ❖ **Young, M., Cole, S.T., 1993.** *Clostridium*. En: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R., (Eds.). *Bacillus subtilis* and other Gram-positive organisms. American Society for Microbiology. Washington DC. 35-52.
- ❖ **You-Shang, Z., 1983.** Enzymatic synthesis of proteins and peptides. Trends in Biochemical Sciences (1):16-17.
- ❖ **Yu, Z., Morrison, M., 2004.** Comparisons of Different Hypervariable Regions of *rrs* Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Applied Environmental Microbiology (70):4800-4806.

- ❖ **Yu, K.S.H., Wong, A.H.Y., Yau, K.W.Y., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2005.** Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin* (51):1071-1077.

- ❖ **Zayas, J., 1997.** Solubility of Proteins. En: Zayas, J., (Ed.). *Functionality of Proteins in Food*. Springer-Verlag. Berlín. 6-67.

- ❖ **Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M., Séller, M., 2002.** Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. EE.UU. (99):15681-15686.

- ❖ **Zhou, E., R. L. Crawford, 1995.** Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. *Biodegradation* (6):127-140.

- ❖ **Zoneveld, I. S., 1972.** Land evaluation and landscape science. *ITC Textbook of Photointerpretation* (7).

Publicaciones

PUBLICACIONES Y PROYECTOS

A) Publicaciones relacionadas, directamente, con esta Tesis Doctoral:

A.1. **Revistas de carácter científico:** parte de los resultados presentados en esta memoria han sido publicados en las siguientes revistas:

- Parrado, J., Escudero-Gilete, M.L., Friaza, V., **García-Martínez, A.**, González-Miret, M.L., Bautista, J., Heredia, F.J., 2007. **Enzymatic vegetable extract with bioactive components: influence of fertiliser on the color and anthocyanins of red grapes.** Journal of the Science of Food and Agriculture (87):2310-2318.
- Romero Ramírez, E.J., Bautista Palomas, J.D., **García-Martínez, A.M.**, Cremades, O., Parrado Rubio, J., 2007. **Bioconversion of corn distiller's dried grains with solubles (CDDGS) to extracellular proteases and peptones.** Process Biochemistry (42):1492-1497.
- Parrado, J., Bautista, J., Romero, E.J., **García-Martínez, A.M.**, Friaza, V., Tejada, M., 2008. **Production of a carob enzymatic extract: potential use as a biofertilizer.** Bioresource Technology (99):2312-2318.
- **García-Martínez, A.**, Diaz, A., Tejada, M., Rodríguez, B., Bautista, J., Santamaria, C., Revilla, E., Parrado, J., 2009. **Enzymatic production of an organic soil biostimulant from Wheat Condensed Distillers' Solubles: effects on soil biochemistry and biodiversity.** Process Biochemistry. Aceptado para su publicación.
- **García-Martínez, A.M.**, Rodríguez-Morgado, B., Tejada, M., Parrado J., 2009. **Succinate dehydrogenase activity in soil: a fast and reliable method to assess the soil biological activity.** Applied Soil Ecology. Enviado para su publicación.

- **García-Martínez, A.M.,** Tejada, M., A.I. Díaz, Rodríguez-Morgado B., Bautista, J., Parrado, J. **Design and obtention of soil biofertilizers with atrazine extender capacity.** Journal of Agricultural of Food Chemistry. Enviado para su publicación.

A.2. **Patente de invención:** los resultados presentados han sido empleados para el desarrollo y creación de la siguiente patente de invención:

- **Producto Orgánico Potenciador de la Persistencia de Atrazina en Suelo y Bioestimulante Edafológico.** Inventores: J. Parrado, A.M. Garcia-Martinez, M. Tejada Moral, J.D. Bautista Palomas, B. Rodríguez-Morgado. Solicitud: 2008-05-30. Nr.:200801621.

A.3. **Congresos nacionales e internacionales:** gran parte de los datos expuestos han sido presentados en diversos congresos nacionales e internacionales:

- Obtención de bioestimulantes orgánicos y su influencia en la bioquímica, actividad metabólica y biodiversidad en suelos. **II Congreso Ibérico de la Ciencia del Suelo.** IICICS2006. Huelva 13-17 Junio 2006.
- Design of organic biostimulants and its influence on soil biochemistry parameters: Metabolic activity and microbial biodiversity. Influence in bioremediation of petroleum hydrocarbons. **4th International Workshop Bioavailability of pollutants and Soil Remediation.** Sevilla 10-13 Septiembre 2006.
- Role of protein size on soil biostimulation: effects on biochemistry, biodiversity and bioremediation. **SOWETOX 2007. Soil and Wetland Ecotoxicology.** ISBN 978-84-475-3247-6. Barcelona 26-27 Noviembre 2007.
- Role of organic nitrogen on soil biostimulation: effects on biochemistry, biodiversity and bioremediation of atrazine contaminated soils. **ConSoil 2008 10th International UFZ-Delatares/TNO Conference on Soil-Water Systems.** ISBN-978-3-00-024598-5. Milán 3-6 Junio 2008.

- Enzymatic Production of an organic soil biostimulant from Wheat Condensed Distillers' Solubles: effects on soil biochemistry and biodiversity. **II International meeting of Soil Enzymology (SGSE'08)**. Burgos 11-12 Diciembre 2008.

B) Otras publicaciones en revistas de carácter científico realizadas:

- Tejada, M., Gonzalez, J.L., **Garcia-Martinez, A.M.**, Parrado, J., 2008. ***Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield.*** Bioresource Technology (99):1758-1767.
- Tejada, M., Gonzalez, J.L., **Garcia-Martinez, A.M.**, Parrado, J., 2008. ***Application of a green manure and green manure composted with beet vinasse on soil restoration.*** Bioresource Technology (99):4949-4957.
- Tejada, M., **Garcia-Martinez, A.M.**, Parrado, J., 2009. ***Relationship between biological and chemical parameters on the composting of a municipal solid waste.*** Bioresource Technology (100):4062-4065.
- Tejada, M., **Garcia-Martinez, A.M.**, Parrado, J., 2009. ***Effects of a vermicompost composted with beet vinasse on soil properties, soil losses and soil restoration.*** Catena (77):238-247.
- Revilla, E., Santa Maria, C., Miramontes, E., Bautista, J., **García-Martínez, A.**, Cremades, O., Cert, R., Parrado, J., 2009. ***Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran.*** Food Research International (42):387-393.
- Gavilán, M.P., Castaño, A., Torres, M., Portavella, M., Caballero, C., Jiménez, S., **García-Martínez, A.**, Parrado, J., Vitorica, J., Ruano, D., 2009. ***Age-related increase in the immunoproteasome content in rat hippocampus: molecular and functional aspects.*** Journal of Neurochemistry (108):260-272.

C) Proyectos, contratos y ayudas:

Las actividades desarrolladas en esta Tesis Doctoral han sido financiadas, directamente, mediante distintos proyectos de investigación:

- *"Diseño de extractos enzimáticos vegetales con actividad bioestimulante de degradación de xenobióticos: estudio de la degradación de PAHs, estimulación microbiana en suelo y rizosfera".* Proyecto N° 284/2005/3-B, del Programa Nacional de Ciencias y Tecnologías Medioambientales del Plan Nacional de I+D+i. Ministerio de Medio Ambiente.
- *"Diseño de extractos enzimáticos vegetales con actividad bioestimulante de degradación de xenobióticos: estudio de la degradación de hidrocarburos, estimulación bioquímica y microbiana en suelo".* Proyecto N° 262/2006/2-1.2, del Programa Nacional de Ciencias y Tecnologías Medioambientales del Plan Nacional de I+D+i. Ministerio de Medio Ambiente.
- *"Diseño de extractos enzimáticos vegetales con actividad bioestimulante de degradación de xenobióticos: estudio de la degradación de hidrocarburos, estimulación bioquímica y microbiana en suelo".* Proyecto N° A211/2007/1-01.2, del Programa Nacional de Ciencias y Tecnologías Medioambientales del Plan Nacional de I+D+i. Ministerio de Medio Ambiente.
- *"Producción y conversión de residuos orgánicos mediante procesos bioquímicos bifásicos en bioestimulantes microbiológicos: estudios de su aplicación ambiental en la regeneración de suelos contaminados".* Proyecto N° CTM2007-60210, del Programa del Plan Nacional de I+D+i. Ministerio de Ciencia y Educación.
- *"Uso de enzimas de residuos agroindustriales".* Contrato 68/83 N° OG-048/06. Pevesa, S.L.-Universidad de Sevilla.
- *"Transferencia de tecnología en descontaminación de suelos mediante sistemas de bioestimulación".* Ayudas a proyectos OTRI N° OTRI/06-PC06. Universidad de Sevilla.

D) Otras ayudas recibidas a través de Proyectos de financiación pública, Contratos con empresas y Ayudas OTRI:

- *Preparación de productos enriquecidos en aminoácidos esenciales, PUFAs y antioxidantes a partir de *Procambarus clarkii*. Contrato 68/83 N° OG-035/05.*
- *Diseño y producción de alimentos funcionales derivados de la carne de pollo. Contrato 68/83 N° OG-005/07. Tomás Guerrero, S.A.-Universidad de Sevilla.*
- *Transferencia de tecnología sobre diseño y producción de alimentos funcionales. Ayudas a proyectos OTRI N° OTRI/06-OE06. Universidad de Sevilla.*
- *Depuración y Biodegradación del alpechín: diseño de un sistema para la eliminación biológica y el tratamiento adaptado a las condiciones a la región noroeste de Marruecos. Proyecto A/0221143/08. Programa de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica entre España y Mediterráneo de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo. Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación.*
- *"Estudio de viabilidad de diversos residuos inertes como sustratos forestales". N° 0545/0048. 2009. EGMASA-Universidad de Sevilla.*

