



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

“AISLAMIENTO DE *Colletotrichum gloesporioides* A PARTIR DE SUELO EN UNA HUERTA
EN LA REGION DE ZITACUARO MICHOCAN”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

pQFB Diana Edith Madrigal Silva

ASESOR

D.C. Consuelo de Jesús Cortes Penagos

Enero del 2009

RESUMEN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es una de las 50 especies frutales más conocidas y consumidas a nivel mundial se encuentra prácticamente en todas las áreas tropicales y subtropicales del mundo, es cultivado de forma comercial en la India, Pakistán, Brasil, Puerto Rico, Cuba y algunos otros países y regiones. México ocupa el segundo lugar en producción mundial de guayabo, los principales estados productores son Zacatecas, Aguascalientes y Michoacán que ocupa el primer lugar en producción nacional. La antracnosis es una enfermedad cosmopolita cuyo agente causal es *Colletotrichum gloesporioides*, que provoca la limitación de la comercialización del fruto en fresco. Ya es conocido que este fitopatógeno tiene alta afinidad por los sustratos que le provee el guayabo (follaje, fruto) por lo que es necesario realizar estudios para revelar como es favorecida la interacción planta microorganismo para así proponer métodos eficaces para el control de la virulencia de este fitopatógeno en el cultivar. El presente estudio se llevo a cabo en el Laboratorio de Investigación en Biotecnología de Alimentos “M.C Víctor Manuel Rodríguez Alcocer” en la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El aislamiento de *Colletotrichum gloesporioides* se realizo en la región de Zitacuaro Michoacán, México de una huerta seleccionando de la plantación 10 árboles para cada metodología utilizada para el aislamiento del fitopatógeno a partir de suelo, obteniendo cepas características del cultivo in vitro de *Colletotrichum gloesporioides*.

Tesis apoyada por Recursos de la Coordinación de la Investigación Científica.

INDICE GENERAL

Resumen	1
I. INTRODUCCION	5
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	7
2.1 Ecosistema del suelo	7
2.1.1 Componentes del suelo	8
2.2 La química, estructura y ambiente del suelo	9
2.3 Distribución de los microorganismos en el suelo	14
2.4 El pH	17
2.5 La temperatura	18
2.6 Los nutrientes del suelo	19
2.7 Población microbiana del suelo (biota del suelo)	21
2.7.1 Las bacterias	22
2.7.2 Los protozoarios	24
2.7.3 Los Hongos	25
2.8 Impacto de las interacciones microbianas en suelos agrícolas	26
2.8.1 La actividad fúngica y el ambiente	27
2.8.2 La micobiota y los fertilizantes agrícolas	29
2.9 Los contaminantes y el suelo	30

III. OBJETIVO GENERAL	31
IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS	31
V. MATERIALES Y METODOS	32
5.1 Características del muestreo	33
5.2 Manejo del muestreo	34
5.3 Tratamiento de hipoclorito de sodio para los lotes de fruto	35
5.4 Diseño de experimento	35
5.5 Método de aislamiento 1	36
5.6 Método de aislamiento 2	38
5.7 Método de aislamiento 3	39
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	40
6.1 Determinación de pH del Suelo	41
6.2 Características del aislamiento de Colletotrichum gloesporioides	42
6.2.1 Cultivo in vitro	43
6.2.2 Morfología Macroscópica de Colletotrichum gloesporioides	44
6.2.3 Morfología Microscópica de Colletotrichum gloesporioides	45
VII. CONCLUSIONES	47
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	49

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIG. 1 Imagen representativa de suelo	7
FIG. 2 Componentes inorgánicos y orgánicos del suelo.	9
FIG. 3 Las capas del suelo.	11
FIG. 3 Perfil de un suelo típico mostrando los horizontes A, B Y C.	14
FIG. 4 Disponibilidad de nutrientes en función del pH.	19
FIG. 5 Columna de Winogradsky.	23
FIG. 6 Huerta donde se realizo el muestreo	25
FIG. 7 Muestreo de suelo	28
FIG. 8 Muestreo de Frutos	30
FIG. 9 Fotografía de metodologías	34
FIG .10 Imagen de cultivo in vitro	35
FIG. 11 Imagen de cultivo in vitro en PDA	36
FIG.12 Imagen de microscopias de Colletotrichum gloesporoides	40
Cuadro 2.1 Número y biomasa de microorganismos en los 15cm. superiores del suelo agrícola.	15
Cuadro 2.2 Transferencias del fruto	18

“AISLAMIENTO DE Colletotrichum gloesporioides A PARTIR DE SUELO EN UNA HUERTA
EN LA REGION DE ZITACUARO MICHOACAN”

I. INTRODUCCION

La producción de guayaba en el estado de Michoacán es alrededor de 6288 hectáreas las cuales tienen una producción anual de 16.5 toneladas por hectárea destinada al consumo en fresco en mercados nacionales y de exportación también es procesada en ates, mermeladas y fruta cristalizada o en conserva.

El fruto es de amplia aceptación por los consumidores debido a su disponibilidad de consumo durante el año y también a que el fruto que destaca por su alto valor nutritivo teniendo vitamina A, azúcares, vitamina C que favorece la asimilación de hierro de los alimentos y la resistencia a enfermedades, vitaminas del grupo B y también provee a el organismo de minerales tales como el potasio que es necesario para la actividad muscular normal, participa en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula, además aporta fibra al organismo necesario de consumo en la dieta diaria (Languado et al. 1998).

La producción y explotación comercial de la guayaba está extendida en numerosos países de América, Asia y África. Se estima una producción mundial de 1.2 millones de toneladas de guayaba de los cuales el 25% se produce en México y se concentra en 3 estados principales: Michoacán, Aguascalientes y Zacatecas.—Actualmente Michoacán sobresale como productor de guayaba abarcando el 20% de la producción nacional (Sagarpa 2007).

Sin embargo la elevada producción de fruto es ligado con su carácter perecedero por las pérdidas poscosecha a causa de los daños mecánicos, patológicos o fisiológicos (Fernández-Trujillo 2000), lo que repercute directamente con la comercialización en el mercado nacional e internacional del fruto.

Es por esto que se recurre al implemento de la tecnología para controlar los problemas poscosecha debido a la importancia de producir alimentos que sean inocuos y que permitan mantener la calidad del fruto desde la recolección hasta su consumo (Mejía Ruiz, 2007).

En la presente investigación el objeto de estudio es el suelo en una huerta en Zitacuaro, Michoacán; con 3 metodologías diferentes se aisló el fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides* causante de la Antracnosis, se estudio el aislamiento del fitopatógeno *Colletotrichum Gloesporioides* in vivo e in vitro de suelo debido a que el suelo provee de fuente de carbono y de macronutrimientos y micronutrimientos necesarios para el desarrollo completo del guayabo por ello se evaluó el crecimiento in vitro de su aislamiento de las tres metodologías teniendo como resultado un panorama más completo del proceso de patogénesis del hongo y de la interacción entre planta-microorganismo para posteriormente proponer una estrategia eficaz en el control de la Antracnosis.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ecosistema del suelo

El termino suelo es el sistema complejo formado en la superficie de un terreno inicialmente por la alteración física y química de las rocas y también por la influencia de los seres vivos, desarrollando una estructura en niveles superpuestos, el perfil, y una composición química y biológica definidas. El suelo es un recurso natural no renovable, provee soporte mecánico, es un productor de alimentos y fuente de materias primas pero por otra parte también es un hábitat biológico (Eweis et al, 1998).

En términos de agricultura es una región que soporta a la planta y la provee de muchos de sus nutrientes. Químicamente el suelo contiene una gran cantidad de bacterias, actinomicetos, algas, protozoarios y hongos; es uno de los sitios mas dinámicos donde ocurren muchas de las reacciones químicas concernientes a la destrucción de materia orgánica (Alexander, 1991).



Fig. 1 Imagen representativa de suelo

2.1.1 Componentes del suelo

El suelo está formado de cinco componentes principales: materia mineral, agua, aire, materia orgánica y organismos vivos, su cantidad es directamente proporcional de la localidad por lo que no es la misma en todos los suelos (Eweis et al, 1991). Las capas del suelo se forman como resultado de interacciones entre el suelo, agua, atmosfera y vegetación. Las propiedades de las capas superiores son particularmente afectadas por las actividades biológicas de las plantas y de los microorganismos (Major et al, 1998 y Richards, 1987).

La porción inanimada, la cantidad de materia mineral y materia orgánica, está relativamente fijada a un solo lugar, la porción de aire y agua varia. Los minerales dominantes en el suelo son el dióxido de silicio (SiO_2), el aluminio y el hierro, mientras que el calcio, magnesio, potasio, titanio, manganeso, sodio, níquel, fosforo y azufre se presentan en pequeñas cantidades (Eweis, et al 1998), la fracción mineral contribuye a menos de la mitad del volumen, se origina de la desintegración y descomposición de las rocas y su composición química determina la fertilidad del suelo. La materia orgánica usualmente constituye del 3 al 6% del volumen total. La porción de los organismos vivos solamente ocupan un lugar menor al 1% el suelo. El aire y el agua en conjunto forman aproximadamente la mitad del volumen del suelo (Alexander, 1991; Richards, 1987; Mayor, 1998).

La porción inorgánica del suelo ha marcado ciertos efectos sobre los microorganismos debido a su influencia sobre la disponibilidad de nutrientes, aireación y retención de agua.

La fase líquida es de gran importancia para la flora subterránea por que contiene muchos nutrientes requeridos. La aireación y la humedad están directamente relacionadas debido a que la porción del poro que no contiene agua está llena de gas. El aire se mueve a través de estos poros que están libres de agua, el agua desplaza al aire. Este gas que es encontrado se dice que constituye la atmosfera del suelo. Los cambios en la atmosfera del suelo alteran el tamaño y funciones de la microflora ya que CO_2 y O_2 son necesarios para su crecimiento.

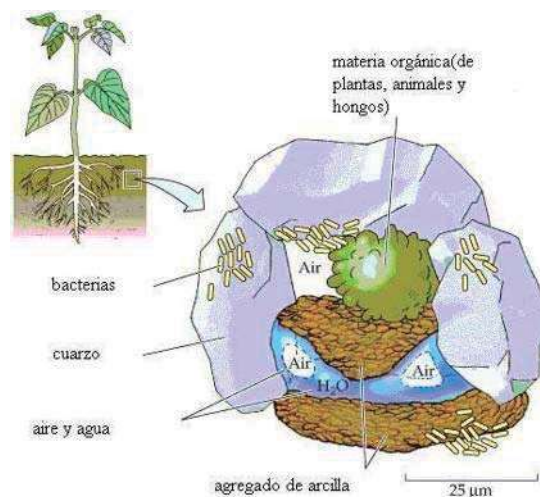


FIG. 2 Componentes inorgánicos y orgánicos del suelo. Purves, et al. Life The Science of Biology.

2.2 La química, estructura y ambiente del suelo

El suelo es un medio muy complejo compuesto de tres fases principales (sólido, líquido y gas) que están dispuestas en diversas formas, tanto a nivel macroscópico como microscópico, para formar los cientos de diferentes tipos de suelo conocidos en el mundo. El suelo se forma por el intemperismo físico, químico y biológico de las rocas en partículas pequeñas (el componente mineral).

La composición química del suelo refleja la de la roca de la que este fue formado. El componente principal en la mayoría de los suelos minerales es la sílice en las arenas y arcillas, aunque la turba contiene poco de esta. El aluminio, hierro, potasio, sodio, titanio y magnesio también se presentan en varios minerales. El calcio y el magnesio derivan especialmente de calizas (Paul, 1989).

Los principales nutrientes de las plantas que se han estudiado constituyen solo una fracción de 1% de los minerales en el suelo. Los minerales se encuentran en el suelo como partículas de varios tamaños, cada una de las cuales puede tener más de un tipo de mineral; las piedras y grava son mayores de 2mm de diámetro. La arena de 2 a 0.2mm, la arena fina de 0.2 a 0.02mm, el limo de 0.02 a 0.002 mm y la arcilla de menos de 0.002mm.

Alexander menciona que los principales componentes inorgánicos del suelo son la arcilla, arena y limo. Las partículas de arcilla son muy parecidas en tamaño a una célula bacteriana pero también pueden ser más pequeñas. Las arcillas tienen una carga neta negativa al igual que las bacterias, una vez que la superficie ha sido cargada puede atraer iones cargados de la fase acuosa circundante. Por lo tanto las bacterias pueden interaccionar con arcillas por que las cargas en la célula y la arcilla se vuelven polarizadas o forman un puente con un metal. Sin embargo cuando las arcillas se unen a los microorganismos, pueden tener muchas y variadas influencias sobre sus actividades. Los principales minerales de la arcilla son: caolinita, montmorilonita e illita (Lynch, 1983; Paul y Clark, 1989).

El limo ejerce una menor influencia en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. La partícula de arena afecta al movimiento del agua y del aire. La textura es determinada con base en el contenido de arena, limo y arcilla presente en el suelo (Alexander 1991; Eweis et al, 1998).

Los materiales sólidos ocupan cerca de la mitad del volumen del suelo, el resto está compuesto de poros llenos de aire y agua. La cantidad de poros depende de la textura, estructura y contenido de materia orgánica. La porosidad de suelos pesados es afectada por el estado de agregación. Los agregados son unidades estructurales largas compuestas de partículas de arcilla y limo. Los agregados de arcilla, limo, arena son estructuras temporales donde su estabilidad es muy variable con respecto a el manejo del suelo, actividad microbiana y otros factores. Los agregados son de interés microbiológico desde que el material celular y las excreciones de bacterias, hongos y actinomicetos son factores que afectan a la formación y estabilidad de los gránulos.

Los suelos se pueden nombrar con base en la distribución de los tamaños de sus partículas. La materia orgánica en los suelos forma una proporción variable pero muy importante de partículas solidas y pueden ser fragmentos de partículas solidas y pueden ser fragmentos poco alterados de plantas o animales, o bien pueden descomponerse y convertirse en humus; estos humus y las partículas de arcilla forman un sistema coloidal que es muy importante esta superficie formada para los fenómenos de adsorción y adhesión (Burns R.G.).

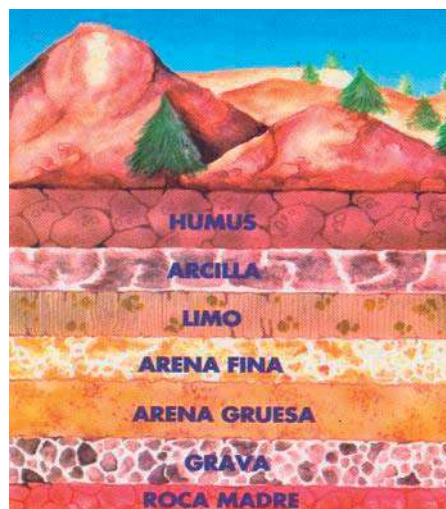


FIG. 3 Las capas del suelo.

Estos fenómenos pueden tener efectos directos sobre los organismos, debido a que los nutrientes adsorbidos están disponibles y pueden ser desplazados del sitio de adsorción H^+ producido por los microorganismos, aunque esto podría tener efectos colaterales principalmente modificando el pH local del suelo.

Los microorganismos pequeños, las toxinas, enzimas extracelulares y nutrientes pueden ser adsorbidos cambiando así la actividad de los microorganismos, su supervivencia, tasas de crecimiento e interacciones (Berkeley R.C.W. et al).

Los polisacáridos extracelulares que producen muchos microorganismos integran las partículas del suelo en fragmentos o gránulos; las hifas de los hongos y actinomicetos también intervienen aunque esto aun no es muy claro. La estructura de los fragmentos es sumamente importante ya que participa principalmente en el drenaje del suelo y por lo tanto en la aeración; un suelo que tiene una estructura de fragmentos completamente desarrollados y/o con alto contenido de arena tendrá buen drenaje y estará bien aereado.

En los suelos agrícolas con mal manejo e inundados, la estructura de los fragmentos esta por lo general mal desarrollada. En general, los microorganismos viven en superficies de partículas o en espacios de interconexión (poros) entre los fragmentos.

El agua del suelo es importante por varias razones dentro de las cuales destacan; es el sistema disolvente en el que las plantas absorben los nutrientes minerales y otra es que la cantidad de agua en el suelo esta inversamente relacionada con la cantidad de atmosfera del suelo, de modo que los suelos inundados son anaeróbicos. Existen diferentes formas en las que el agua se conserva en el suelo, algunas son por drenaje obstruido, en el que participan las fuerzas de adhesión y cohesión y por adsorción a las partículas del suelo.

Sin embargo también hay agua en el suelo que tanto las plantas como los microorganismos no pueden utilizar debido a las fuerzas físicas y al nivel en el que se encuentran las sustancias disueltas impidiendo la absorción osmótica. La mayoría de las partículas del suelo están rodeadas por películas de agua en todas condiciones a excepción de las más secas, y cuando las hifas cruzan huecos en el suelo pueden cubrirse de una película de agua o llevar gotas en su superficie.

Aunque en los suelos más secos no todas las superficies están cubiertas por una película de agua libre; si hay agua puede ser una capa muy delgada posiblemente de unas cuantas moléculas de grosor, la localización de la atmosfera del suelo se encuentra en los espacios del poro que no son ocupados por agua y por lo común están saturados de vapor de agua. La composición de la atmosfera del suelo depende de la actividad biológica y de las tasas de difusión de gases y flujo de masa, estos dependen a su vez de las solubilidades de los gases en el agua y el tamaño del poro.

El suministro de oxígeno y la eliminación de bióxido de carbono y menos oxígeno en el aire. Por lo general en la atmosfera del suelo hay de 10 a 100 veces mas bióxido de carbono y menos oxígeno que en el aire. También pueden encontrarse en concentraciones altas materiales orgánicos volátiles, como el metano, ácido sulfhídrico, amoníaco e hidrógeno.

La superficie del suelo, en particular si no hay cubierta vegetal, está expuesta a cambios de temperatura mayores y más grandes. La temperatura de la superficie aumenta debido a la insolación sobre todo en rocas y suelos de color oscuro, y se tienen temperaturas de más de 50°C en regiones templadas mientras que de 70°C en los

trópicos e incluso hasta de 88°C. La temperatura de la superficie puede disminuir muy rápidamente por radiación durante la noche y pocos milímetros de la parte superior pueden congelarse mientras la temperatura del resto del suelo es comparativamente moderada.

En las regiones polares se presentan casos extremos de los opuestos al fenómeno de las regiones tropicales; hay suelos que están permanentemente congelados a cierta profundidad pero las temperaturas de la superficie pueden ser moderadas o incluso muy altas a la luz del sol. Las bacterias de esos suelos no son psicrófilicos sino mesófilicos que sobreviven a condiciones desfavorables.

Algunos suelos antárticos son limitados por el contenido de humedad y no por el frío y la poca actividad está relacionada con la parte inferior de las rocas o incluso con el interior de las mismas donde los productores primarios son las cianobacterias que utilizan la luz que se filtra a través del cuarzo translucido.

El pH del suelo es determinado en gran medida por la naturaleza química de los materiales y la materia orgánica presente. Los suelos ácidos son más comunes en áreas lluviosas con brezales o vegetación de coníferas, mientras que las condiciones alcalinas se presentan en regiones áridas de pastizales.

El pH total del suelo puede dar un dato erróneo de las condiciones en que se encuentra el suelo por que las superficies de las arcillas pueden tener un pH diferente, por lo general inferior de hasta 1 o 2 unidades debido a la adsorción de los iones. También hay algunos suelos especialmente alcalinos con un pH de 8 a 9 en los que la microflora o al menos su actividad, parece estar muy restringida aunque muchas de las bacterias más comunes e importantes del suelo por ejemplo *Rhizobium* y *Nitrobacter* pueden sobrevivir.

La composición química, la distribución de los tamaños de partículas y la concentración de materia orgánica también cambian la profundidad de manera discontinua. La hojarasca vegetal depositada en la superficie se descompone y el movimiento del agua a

través del suelo causa la lixiviación de los minerales solubles, especialmente si la hojarasca es acida, también hay desplazamiento de materia particulada. Una secuencia de capas más o menos definidas llamadas horizontes, se forman en el suelo. Hay una capa superficial de fragmentos vegetales que yacen sobre minerales mezclados con materia orgánica con una capa de minerales o subsuelo. De otra forma también existen suelos formados por ocho o nueve horizontes en áreas lluviosas con hojarasca ácida.

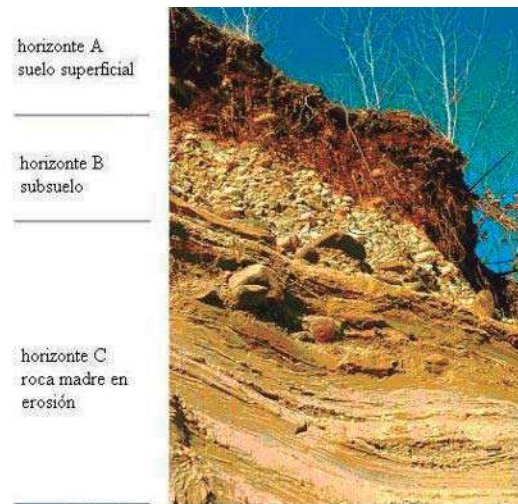


FIG. 3 Perfil de un suelo típico mostrando los horizontes A, B Y C.

2.3 Distribución de los microorganismos en el suelo

En el suelo o edosfera, existen un número inespecífico de comunidades de microorganismos, que viven en estrecho contacto y que se relacionan de formas diversas, en contraste con lo que se observa cuando están los microorganismos en medio de cultivo artificial.

Para tener una idea del tamaño de la población se debe considerar el número y la biomasa de los microorganismos; un gramo (peso seco) de suelo agrícola contiene varios millones de bacterias, cientos de miles de propagulos de hongos y decenas de miles de protozoarios y algas. La biomasa de los hongos y las bacterias puede ser casi igual, y el de los protozoarios y las algas, de un orden de magnitud menor.

Estos valores varían mucho para los diferentes tipos de suelo, pero en cualquier caso la biomasa de microorganismos es pequeña en comparación con la de las plantas

superiores cultivadas en los campos agrícolas o de los bosques. Los microorganismos son importantes en los ecosistemas de suelos.

Organismo	Núm. g de peso seco ⁻¹	Biomasa g m⁻³
Bacterias	10 ⁸	160
Actinomicetos	10 ⁵ - 10 ⁶	160
Hongos	10 ⁵	200
Algas	10 ⁴ - 10 ⁵	32
Protozoarios	10 ⁴	38

Cuadro 2.1 Número y biomasa de microorganismos en los 15cm. superiores del suelo agrícola.

El principal determinante de la distribución microbiana a pequeña escala es la naturaleza de las partículas de las cuales se compone el suelo. Esto en gran parte se debe a la respuesta a los nutrientes, ya que los microorganismos crecen más en partículas de humus que en granos de arena; por ejemplo; las partículas que constituyen solo el 15% de suelo, pero tienen más del 50% de bacterias asociadas a ellas.

Se ha demostrado que los minerales de la arcilla afectan la tasa de crecimiento de los microorganismos, por ejemplo; la montmorilonita incrementa el crecimiento bacteriano pero reduce significativamente la tasa de crecimiento lineal de la mayoría de las hifas. También hay efectos físicos de las arcillas y coloides de la materia orgánica que adsorben bacterias, nutrientes entre otros. (Berkeley R.C.W. et al y Burns R.G. et al).

Las bacterias tienden a crecer como microcolonias pequeñas (con una frecuencia menor de 10 células) sobre las superficies de las partículas del suelo y las raíces. Los hongos y en un grado menor los actinomicetos, difieren en cuanto a que crecen activamente a través del suelo a partir de una base alimenticia. Aunque son originados en una partícula orgánica, las hifas pueden ramificarse a través de los espacios de aire o en regiones que contienen casi puros minerales. En general no se desarrollan como las colonias compactas directas que se ven en un cultivo puro, en su lugar una hifa llega a una

partícula de materia orgánica utilizable, cubre la superficie de esta ramificándose y al agotarse el sustrato la hifa comienza a crecer de nuevo; la hifa original se pudo haber lisado. En consecuencia hay un extremo con hifas en avance discontinuo que por lo general no deja nada vivo atrás de él.

La mayor parte del crecimiento microbiano en el suelo se restringe a unos cuantos hábitats dispersos. La esporulación de los hongos se lleva a cabo en la superficie del suelo o de la hojarasca o bien en los espacios de poros más grandes. La distribución de algas y protozoarios en el suelo depende del tipo de morfología. Las formas unicelulares se presentan individualmente en las películas de agua, sobre todo si estas son móviles, con muchos protozoarios, algas flageladas y diatomeas.

Como la mayoría de los microorganismos viven en películas de agua, son afectadas principalmente por aquellos aspectos de la estructura del suelo que determinan las condiciones del agua. Incluso en suelo áridos de desiertos en los que aparentemente no hay agua libre, la humedad relativa en la atmosfera del suelo es por lo general mayor que la del aire circundante y las esporas, quistes y otras estructuras de resistencia pueden sobrevivir durante mucho tiempo.

Las algas y protozoarios móviles, en particular los flagelados, algunos ciliados específicos (por ejemplo, *Disemastostoma spp.*, *Spirotella*, *Spirofilopsis*, etc.), *Euglena* y miembros de los *Volvocales* responden muy bien al agua libre y pueden incrementar su número en suelo húmedo o temporalmente húmedo o en charcos de lluvias que persisten durante días.

Los hongos y la mayoría de los protozoarios son aerobios, mientras que algunas bacterias son anaerobios obligados o facultativos. Aunque también la masa del suelo rara vez es anaeróbica o microaerofila, hay gradientes de oxígeno y bióxido de carbono pronunciados en las microcolonias o alrededor de ellas, y los microambientes anaeróbicos o microaerofilos se presentan incluso hasta la superficie del suelo, donde la materia orgánica particulada y disuelta esta oxidándose rápidamente. Por lo tanto, no hay una simple relación entre la profundidad del suelo y las proporciones en organismos aeróbicos y las proporciones en organismos aeróbicos y anaeróbicos. En un cultivo,

niveles bajos de oxígeno y/o altos de dióxido de carbono tiene efectos morfogénicos en los hongos, como el cambio de hifas a levaduras en algunas especies (como es el caso de *Colletotricum gloesporioides* y su telomorfo *Glomerella cingulata* o el caso de *Mucor*) por lo tanto, la forma observada en cajas de Petri con agar puede ser muy diferente de la que hay en el suelo y en forma inversa, la observación directa del suelo puede revelar microorganismos no identificables que son de hecho formas de crecimiento distintas de las especies comunes.

2.4 El pH en el suelo

La función del pH en la distribución de los microorganismos del suelo es muy compleja debido a que tiene efectos de amplio espectro sobre la lixiviación, disponibilidad de nutrientes, adsorción, enzimas extracelulares, etc. Sin embargo se pueden hacer algunas generalizaciones:

- Los hongos tienen pH óptimo bajo para su crecimiento que en la mayoría de las bacterias y esto se refleja en su presencia; puesto que los hongos se presentan en la mayoría de los suelos ácidos (alrededor de un pH de 5) los hongos tienden a ser más importantes que las bacterias.
- En algunos suelos ácidos es la proporción de hongos la que aumenta, en comparación con los suelos alcalinos,
- Aunque también hay excepciones como las Bacterias oxidantes de azufre (*Thiobacillus*) que toleran condiciones extremadamente ácidas, y el efecto del pH puede ser ocultado por el efecto de la materia orgánica o las raíces de las plantas.
- La acidez es característica de muchas turbas especialmente las de grandes altitudes y latitudes.

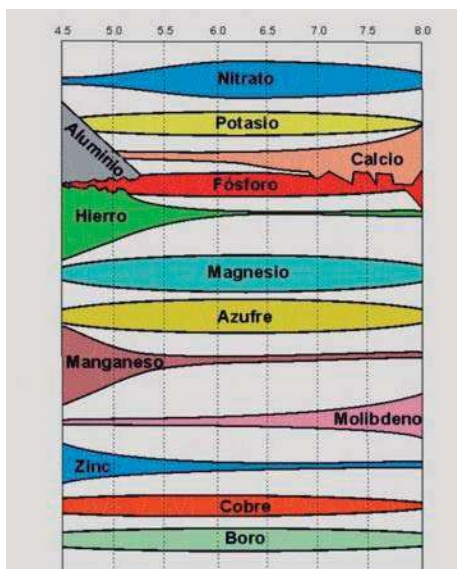


Fig. 4 Disponibilidad de nutrientes en función del pH.

Hay muchos tipos de turbas y las poblaciones microbianas muestran variación en respuesta a los factores del suelo como las plantas superiores, la turba tiene una proporción de hongos mayor y el número de bacteria, incluyendo los actinomicetos y las anaerobias, es muy bajo quizás debido al pH bajo.

Las cianobacterias son raras en suelos ácidos, son comunes en condiciones ligeramente alcalinas, aunque algunas muestran tolerancia extrema en desiertos alcalinos. Las algas son más variables en su respuesta a la acidez; las clorofitas son en su mayoría tolerantes al ácido (los *desmidos*, *cylindrocystis* y *Maesotaenium*). Las bacilariofitas (diatomeas) tienden a ser más frecuentes en suelos neutros o ligeramente alcalinos (*Epithemia zabra* y *Rhopalodia spp.*), aunque excepciones notables que son características de suelos ácidos (*Caloneis fasciata*). Entre los protozoarios, los rizópodos especialmente las amibas testadas son características de lugares ácidos, mientras que los cilioforos (ciliados) por lo general se encuentran en suelos neutros o alcalinos.

2.5 La temperatura

La temperatura es uno de los principales factores que controla la actividad microbiana, aunque existen poblaciones psicrófilas y termófilas asociadas con los suelos árticos y

tropicales y con hábitats especializados como los montones de composta, donde la actividad microbiana provoca el aumento de temperatura. Muchas algas y cianobacterias pueden resistir las fluctuaciones extremas de temperatura en la superficie del suelo, así como los problemas de la pérdida de agua. Algunas algas incluso llegan a crecer en suelos congelados o en la nieve. Aun cuando las temperaturas del suelo excedan el intervalo para el crecimiento normal, muchos microorganismos pueden sobrevivir en forma de esporas o quistes. (A. Brack y C. Mendiola, 2000)

2.6 Los nutrientes del suelo.

La última variable principal en el medio es el status de nutrientes. Para las algas y otros autótrofos esto significa los niveles de minerales. La materia orgánica puede ser inhibitoria para algunos organismos pero algunos otros estarán estrechamente relacionados con hábitats ricos en materia orgánica. La abundancia de materia orgánica hacen que el hábitat sea completamente favorable para la proliferación de amibas, mientras que por ejemplo para los protozoarios estarán limitado por el numero de bacterias presentes en dicho hábitat; pero para los hongos y las bacterias heterótrofas el factor decisivo es estrictamente la cantidad de materia orgánica y hasta cierto grado su calidad. La mayor parte de la materia orgánica es insoluble y no está distribuida de forma uniforme en el suelo y el número de bacterias y hongos a menudo se correlaciona con esta distribución.

Una parte de la flora del suelo está en un estado de actividad relativamente continuo y utiliza el material insoluble menos tratable, como la lignina y el humus. La flora autóctona incluye ascomicetos, basiomycetos, actinomicetos y algunas otras bacterias. Los heterótrofos que utilizan substratos más simples y a menudo solubles son por lo regular latentes y solo son importantes cuando se añade materia fresca al suelo. Por lo tanto la actividad de esta ultima flora (la flora zimogena) varía mucho con el tiempo y el espacio, aunque siempre están presentes en estado de latencias.

Las poblaciones más estables de flora autóctona están relacionadas con una tasa reproductora baja pero están especializadas para los hábitats o sustratos específicos

algunos suelos agrícolas pueden tener un nivel de materia orgánica disponible tan bajo durante la mayor parte del año, que la mayoría de los microorganismos están latentes; sin embargo en suelos naturales especialmente en los bosques, hay probablemente suficiente hojarasca como para que la disponibilidad de los nutrientes no sea limitante.

Estas generalizaciones sobre la actividad en el suelo son apoyadas por las tasas de crecimiento de las poblaciones de los microorganismos en el suelo, aunque no son comunes las mediciones directas del crecimiento.

La mayor parte de estas mediciones se obtiene por cálculos sucesivos de cosechas en pie o de datos básicos sobre la cantidad de recursos disponibles que son comparados con los requerimientos conocidos para la energía de mantenimiento o el crecimiento mínimo, por lo general determinado en quimiostatos. Es por esto que en los suelos naturales su crecimiento es muy lento o no existe durante la mayor parte del tiempo; y la gran mayoría de las poblaciones microbianas deben estar latentes en los suelos agrícolas, excepto quizás en la rizosfera y en los sitios de formación de hojarasca local.

Muchos de estos factores ambientales influyen sobre los microorganismos del suelo de acuerdo con los ritmos estacionales (el suministro de materia orgánica y las fluctuaciones de temperatura en regiones templadas). En consecuencia la actividad microbiana sigue un patrón estacional así los factores climáticos son más importantes en cuanto a las variaciones estacionales que el suministro de materia orgánica.

En algunos estudios sobre microorganismos del suelo se han utilizado análisis de factores o componentes principales para identificar diferentes poblaciones de microorganismos en distintos suelos. Estos análisis se agrupan como aislamientos y dichos grupos pueden coincidir con el origen a partir de suelos diferentes, mostrando así que distintos suelos tienen organismos diferentes.

Los datos anteriores corresponden a suelos naturales pero hay situaciones en las que participa el hombre las cuales tienen poblaciones muy diferentes. En particular los arrozales con suelos inundados son muy importantes en la producción mundial de

alimentos. Cuando estos suelos están inundados su microbiología es semejante a la de los sedimentos acuáticos, con una capa superficial aeróbica, y por debajo de ella hay microorganismos anaeróbicos que dependen de sulfato, nitrato o carbono como sus aceptores terminales de electrones. Por lo tanto, las bacterias predominan durante la etapa de inundación, pero existe una flora fungosa específica capaz de tolerar estas condiciones. Los hongos adquieren más importancia a medida que drenan los suelos o que se secan, antes de la cosecha.

2.7 Población microbiana del suelo (biota del suelo)

El suelo contiene 5 grupos importantes de microorganismos: bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios, las bacterias se encuentran en una menor proporción del total de la masa celular microbiológica. En la superficie del suelo la población de microorganismos es más densa y el abastecimiento de nutrientes es mayor (Alexander 1991).

Los microorganismos son los principales agentes responsables de reciclar el carbono en la naturaleza, en muchos ecosistemas hay una adecuada comunidad microbiana capaz de degradar compuestos tóxicos o xenobióticos mediante su actividad metabólica (Atlas y Bartha, 1997).

2.7.1 Las Bacterias

Winogradsky clasifica a las bacterias del suelo en dos tipos: autóctonas (donde hay un lento nivel estacionario de actividad en la materia orgánica en el suelo nativo) y alóctonas o zimógenas (donde hay un rápido metabolismo de materia orgánica disponible).

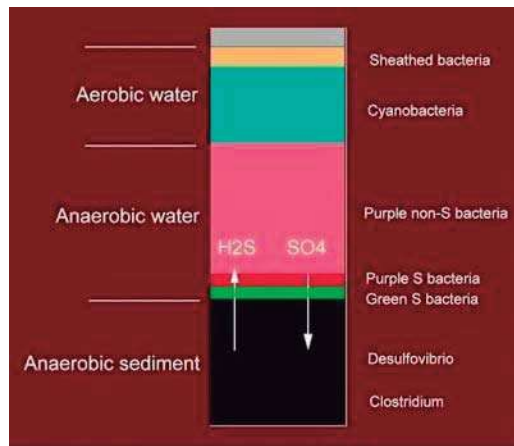


FIG. 5 Columna de Winogradsky.

Las poblaciones autóctonas pueden tener estados resistentes y soportan largos periodos sin tener actividad metabólica, pero a veces estas nativas proliferan y participan en funciones bioquímicas de la comunidad, pueden crear ya sea mediante la adición de nutrientes al suelo o en caso contrario lo pueden tomar de la fracción orgánica del suelo (Sergei Winogradsky, 1888).

Debido a que los nutrientes no están del todo disponibles y están presentes en periodos muy largos por lo que estos organismos crecen de forma muy lenta y su abundancia no es sujeta a fluctuaciones. Las alóctonas no participan en ninguna actividad relacionada con la comunidad. Las bacterias se pueden encontrar típicamente de 10^6 a 10^9 bacterias por gramo de suelo (Alexander, 1991, Lynch, 1983). Mucha de la atención se le da a las bacterias y a los hongos, desde que estos grupos de microbios están íntimamente ligados al flujo de energía y transferencia de nutrientes en ecosistemas.

Casi cualquier microorganismo se puede encontrar en el suelo, por lo general los corineformes comprenden al menos la mitad de las colonias inoculadas en medios no selectivos, 10% de la población (*Bacillus*) producirá esporas.

Los anaeróbicos se han estudiado muy poco excepto y los cuales representan alrededor del 5% de la población. Los actinomicetos, en particular *Streptomyces*, son aparentemente comunes y se pueden aislar con facilidad de suelos aeróbicos neutros o

ligeramente alcalinos, constituyendo alrededor de un 20 o 30% del total de las bacterias.

Los géneros anteriores son los que se han aislado satisfactoriamente sin embargo también hay muchas otras bacterias dentro de las que destacan: *Pseudomonas*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Azotobacter* y *Rhizobium*, estas bacterias son muy importantes para los ciclos de nutrientes en el suelo. En conjunto estas bacterias suman menos del 10% de las colonias y la mayoría de este 10% corresponde casi exclusivamente a *Pseudomonas*.

2.7.2 Los protozoarios

Los géneros de protozoarios del suelo son semejantes a los acuáticos aunque las especies más pequeñas o incluso los individuos mas pequeños de una especie dada, tienden a ser más comunes. Las especies comunes en la mayoría de los suelos incluyen a *Heteromita globosa*, *Oikomonas termo* y *Cercomonas spp.* (todos ellos son flagelados); *Colpoda cucullus* y *C. steinii* (ciliados); *Naegleria gruberi*, *Acanthamoeba spp.* Y *Hartmanella hialina* (amibas). Y algunos otros mas, como los rizópodos testados que están restringidos casi por completo a suelos ácidos.

Los protozoarios son los más frecuentes en horizontes superficiales y pueden mostrar una respuesta marcada a la humedad del suelo. Muchos mohos mucilaginosos (mixomicetos) y los mohos mucilaginosos celulares (acrasiomicetes) se encuentran en el suelo y sus estadios ameboideos no pueden distinguirse de las amibas comunes de vida libre.

El estudio de estos microorganismos se ve considerablemente reducido por los problemas de metodologías para su aislamiento.

2.7.3 Los Hongos

Los hongos forman parte del total de la masa microbiana en el suelo. Son organismos eucariotes y son del grupo de organotrofos primarios responsables de la descomposición de los compuestos orgánicos. Constituyen una porción alta de la biomasa microbiana del suelo. Se pueden encontrar en el suelo como autóctonos o alóctonos y pueden de ser de vida libre o estar asociados con las micorrizas con raíces de plantas (Atlas y Bartha, 1987; Paul y Clark, 1989).

La mayoría de los hongos corresponden a los que producen grandes números de esporas. En especial los mucorales (*Mucor*, *Mortierella* y *Rhizopus*) y los deuteromicetos (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Botrytis*), la observación directa muestra muchas hifas de color oscuro, posiblemente deuteromicetos o bien micelio estéril. Rara vez son aislados los Basidiomicetos que son importantes para la degradación de la materia orgánica y están ampliamente distribuidos, como lo ponen de manifiesto los grandes cuerpos fructíferos de los agaricales y los afiloforales que aparecen año tras año.

Los Basidiomicetos también forman asociaciones como micorrizas con los árboles, lo cual es causa hasta cierto punto de su distribución.

Los miembros de la microbiota dependen unos de otros para utilizar compuestos inorgánicos y/o orgánicos en su supervivencia, y si el ambiente lo permite, el posterior crecimiento(2), al mismo tiempo durante la búsqueda de alimento base de su supervivencia, existen los que ejercen influencia negativa sobre otros (6), en especial cuando la biota autóctona, en contacto con la alógena o invasora ingresa al suelo (1,4) cambia continuamente con las prácticas agrícolas culturales: como el enriquecimiento con estiércol animal, aplicación intensiva y extensiva de fertilizantes, pesticidas para controlar malezas, insectos, hongos y bacterias fitopatógenas (8,10,12).

En suelos vírgenes la ausencia del disturbio humano permite una diversidad de comunidades microbianas en delicado equilibrio (7,9,13), son activas o latentes con base

a las propiedades físicas y químicas de ese sitio, en especial si existen plantas (1,14), en función de la concentración de materia orgánica vegetal de fácil mineralización, del tipo de compuestos nitrogenados, de la disponibilidad de minerales limitantes su crecimiento (4,15): fosfatos, hierro, azufre y otros elementos que son de base del desarrollo de las poblaciones microbianas, que afectan el patrón de absorción nutricional radical, de plantas, las que a la vez seleccionan la microbiota que domina ese ambiente (5,16).

Las actividades biogeoquímicas de las poblaciones microbianas en el suelo y en la rizosfera causan cambios continuos del pH, con alteraciones en su densidad, y variabilidad en un momento específico del año.

Estos hechos son evidentes en suelos vírgenes que se utilizan en agricultura, en los cuales al eliminar la vegetación nativa, con la maquinaria agrícola, las dosis crecientes de fertilizantes químicos, el sistema de riego y en especial el cultivo vegetal sembrado (13,17,19), provocan drásticas modificaciones en la dinámica de las poblaciones microbianas originales, tales alteraciones dan lugar a que ciertos grupos proliferen, algunas deletreas para el suelo como las desnitrificantes, o fitopatógenas, en consecuencia surgen problemas de: fertilidad, sanidad vegetal, contaminación de acuíferos, y el suelo reduce su productividad (18,20,22).

En el esquema del manejo sostenible en agricultura, se intenta minimizar el impacto negativo del sistema de producción agrícola sobre la fertilidad del suelo, a pesar de su explotación (6, 9,21).

2.8 Impacto de las interacciones microbianas en suelos agrícolas

Actualmente es ampliamente documentado el impacto negativo del hombre sobre los procesos naturales de descomposición de materia orgánica y de su inmovilización para que los ciclos biogeoquímicos faciliten la productividad agrícola.

Desde el inicio de la agricultura esta actividad fue considerada contaminante por sus efectos sobre la estructura del suelo, con la introducción del monocultivo vegetal, al

igual que el uso intensivo y extensivo de fertilizantes químicos y pesticidas para el control de plagas y enfermedades, y por el empleo de maquinaria agrícola con sus insumos, que tuvieron y tienen un drástico impacto sobre las diversas interacciones microbianas, que influyen directa y drásticamente sobre los procesos de descomposición de materia orgánica que aumenta o reduce la productividad de un suelo al cambiar las concentraciones de los macroelementos limitantes de su crecimiento, además de la aplicación de pesticidas de amplio espectro, que reducen la densidad y diversidad de las poblaciones microbianas, que favorecen la dominancia de los que causan problemas de sanidad vegetal, al eliminar las poblaciones nativas antagonistas de los fitopatógenos (37,50), así como de aquellas benéficas.

En consecuencia suelos originalmente productivos se transforman en pobres y contaminados por su pérdida de diversidad biológica y de minerales que faciliten la producción agrícola (35,40).

La agricultura sustentable es un intento por retornar a prácticas culturales que causen el mínimo impacto negativo sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos, para una producción agrícola basada en la conservación del suelo, que evite su sobreexplotación: mediante la labranza cero, optimización en el uso y manejo del agua, por la restricción estricta en la aplicación de fertilizantes químicos, con una tendencia a su disminución o sustitución con abonos verdes, animales o composta (10).

Estas estrategias favorecen la conservación del suelo y el mantenimiento de la diversidad biológica en la que las interacciones microbianas en equilibrio, aseguren la dinámica de los ciclos y que la contaminación ambiental de cualquier tipo sea mínima (10,59). Si el manejo de la producción agrícola no da un drástico giro el problema futuro de alimentar a la humanidad será crítico, pues el suelo y agua manejados como hasta hoy, están en riesgo de desaparecer, es por ello que la política para el campo y ley intentan que la producción vegetal se modifique hacia un esquema de conservación recursos naturales (35,45).

2.8.1 La actividad de los hongos del suelo

Sin embargo la microbiota es capaz de atacar a la materia orgánica compleja, entre las fuentes de carbono orgánico como: azúcares, ácidos orgánicos, disacáridos, almidón, pectina, celulosa, grasas, lignina particularmente resistente a la degradación microbiana obtienen el nitrógeno del amonio o nitratos también de proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos orgánicos nitrogenados.

Algunos géneros son dependientes nutricionales pues requieren aminoácidos, vitaminas del complejo B, u otros factores de crecimiento para una división celular, mientras que otros crecen rápidamente en medio de cultivo con un azúcar y sales inorgánicas.

Los hongos fitopatógenos de plantas superiores necesitan células vivas para reproducirse por su extrema dependencia nutricional.

La predación es común entre los hongos, existen protozoarios susceptibles a ciertos géneros, durante el ataque, las hifas penetran en el protozoario disminuyen su movimiento, luego lo digieren el contenido celular. La supervivencia de estos predadores depende de los protozoarios sus esporas no germinan hasta que haya protozoarios sensibles.

Los hongos también atacan nematodos atrapan y devoran, mediante extensiones de las hifas, entre los géneros *nematófagos* o atrapadores de nematodos, comunes en el suelo son: *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella* y *Harposporium*. Aunque no existe una función definida para las especies predadoras que participar en el balance poblacional en el suelo al limitar el tamaño, la actividad de protozoarios y nematodos. No obstante valor limitado del número de hongos en el suelo, se dispone de información sobre su función.

2.8.2 Actividad fúngica y el ambiente

La actividad fisiológica de la micobiota en diferentes ecosistemas es dependiente del tipo de metabolismo de los hongos y del ambiente fisicoquímico que les rodea en un tiempo determinado. Los géneros existentes su densidad en un tipo de suelo es relacionado con sus propiedades físicas y químicas. Un género de hongo específico capaz de supervivir, adaptarse y crecer en un ecosistema depende del ambiente que le rodea.

Las principales influencias internas que se imponen a la comunidad de hongos son: nivel y clase de la materia orgánica, concentración del ion hidrógeno o pH, la aplicación de cierto clase de fertilizantes orgánicos e inorgánicos, el grado de humedad, aireación, variación de temperatura, posición en el perfil del suelo, estación del año y composición de la vegetación nativa o cultivada.

En general, el número de hongos filamentosos en el suelo depende del tipo y nivel de concentración de la materia orgánica utilizable; aunque los hongos existen en áreas pobres en materia orgánica, en los suelos agrícolas la mineralización fúngica mejora el *status* de nutrientes inorgánicos al incorporar éstos a los cultivos vegetales, mientras que los abonos verdes u otros compuestos de carbono en esos suelos, incrementa la composición de los géneros de la micobiota que afectan el dominio relativo de: *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Mucor*.

La actividad fúngica de mineralización de la materia orgánica es mayor en la primavera y otoño, donde por las condiciones propicias de la temperatura y humedad, la red de hifas invade esos detritus orgánicos lo que favorece la riqueza del suelo en minerales. Algunos géneros de hongos son abundantes con la adición de fuentes orgánicas de carbono, que disminuyen después de aumento inicial, otros géneros de hongos mantienen elevadas densidades de población por periodos largos con la incorporación de restos vegetales.

Esta respuesta fúngica depende de la composición química de los residuos de plantas incorporados al suelo y de factores ambientales; los hongos, dominan en la diversidad de la microbiota al adicionar carbono orgánico sencillo en ambientes ácidos si existe una suficiente cantidad de nitrógeno en formas combinadas inorgánicas y/u orgánicas. Mientras que la concentración del ion hidrógeno es un factor que regulan la actividad, el tipo de micobiota, ciertos géneros de hongos se desarrollan en un amplio intervalo de pH, desde extremo ácido al alcalino., pero en medio de cultivo artificial, existen aquellos que crecer en valores de pH de 2.0-3.0 otros son activos a pH de 9.0 o más, por ello las bacterias y los actinomicetos no son comunes en ambientes ácidos, en estas áreas donde los hongos dominan a la comunidad microbiana, no es porque este es un pH óptimo para este grupo, sino derivado de la ausencia de la competencia microbiana por las reservas de carbono orgánico la tolerancia de esos hongos a la elevada concentración de ion hidrógeno y el estrecho intervalo de pH de supervivencia de bacterias y actinomicetos, así los hongos constituyen más del 50 del porcentaje de la comunidad microbiana, son responsables de la mineralización de la materia orgánica sencilla y compleja en suelo ácido, las especies fúngica individuales son menos tolerantes a elevadas concentración del ion hidrógeno, comparadas con la comunidad total de hongos, la sensibilidad al pH es crítica en la actividad de los hongos fitopatógenos que se originan en el suelo, los que por el intervalo de pH en el que se desarrollan, son más virulentos en una condición ambiental ácida, que neutra o alcalina. (Eweis et al, 1998; Riser- Roberts, 1992).

Algunos hongos fitopatógenos como *Plasmodiophora brassicae* , *Colletotrichum gloesporioides* crecen sin problema en suelos ácidos, mientras que la enfermedad que causa es rara o leve en suelos agrícolas con pH ligeramente alcalino de 7.5. Otros fitopatógenos crecen mejor en suelos neutros, mientras que ciertas géneros y especies de hongos que atacan proliferan en sitios con pH alcalino, ahí la acidificación es una práctica fisicoquímica de control biológico de esos hongos, por lo que la recomendación de encalamiento o de acidificación del suelo, no es indicada para la micobiota patógena vegetal de actividad fermentativa que no les afecta negativamente el cambio de pH.

2.8.3 La micobiota y los fertilizantes agrícolas

La aplicación de fertilizantes químicos (FQ) cambia la cantidad y diversidad fúngica como resultado de la acidificación y/o de la adición de nutrientes orgánicos.

El tratamiento con FQ con sales de amonio cambia el número de hongos que estimula la oxidación microbiana de compuestos de nitrógeno que favorece la formación de ácido nítrico y la frecuente aplicación de FQ como el amonio induce el crecimiento de los hongos, reduce el número de bacterias y actinomicetos.

Los suelos que se cultivan intensivamente con maíz o trigo, indican que la avena tiene una acción selectiva sobre la micobiota del suelo, el género dominante con este cereal es *Aspergillus fumigatus*, mientras con el maíz, el género común es *Penicillium funiculosum*, ello depende de las excreciones específicas de las raíces, y de los componentes químicos de los tejidos en descomposición.

2.9 Los contaminantes y el suelo

Los contaminantes ambientales son compuestos químicos de origen animal o sintético que son liberados por la actividad del hombre hacia el medio, donde tienen un efecto dañino debido a derrames, fugas de pipas, liberación de aguas negras, desechos industriales y el uso de pesticidas. Esto involucra la contaminación del suelo, mantos acuíferos, así como la contaminación de sedimentos en los cuerpos de agua (Riser-Roberts E. 1992, Eweis et al 1998) Numerosos procesos han sido utilizados para la eliminación de contaminantes: tratamientos biológicos, tratamientos físicos, inmovilización, inyección profunda, tratamientos de suelos, evaporación solar, incineración y recuperación de recursos (The Fu Yen, 1999).

Sin embargo se debe de tomar en cuenta que alguno de estos procesos puede provocar nuevos problemas ambientales, ya que si se emplea por ejemplo la incineración, se corre el riesgo de contaminar el aire, o si se entierra el contaminante, se podría causar problemas causar problemas de contaminación en el suelo o del agua (timmis y piper, 1999).

III. OBJETIVO GENERAL

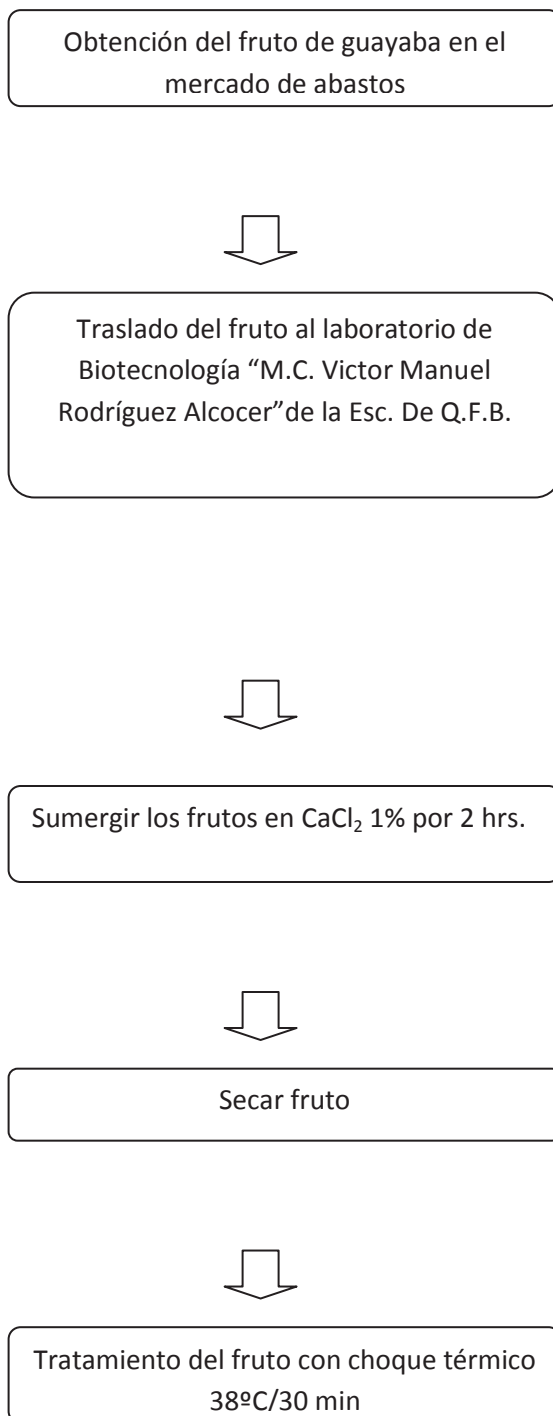
Determinar la evolución de la calidad química de frutos de guayaba tratados con Calcio y choque térmico almacenados en frigorífico y transferidos a temperatura ambiente.

IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.-Establecer los tratamientos con CaCl_2 y choque térmico sobre el fruto de guayaba.
- 2.-Almacenar en frigorífico a los frutos de guayaba estableciendo los tiempos de mercadeo.
- 3.-Transferir los frutos de guayaba de su almacenamiento en frigorífico a temperatura ambiente.
- 4.-Determinar la calidad química de frutos de guayaba transferidos a temperatura ambiente.

V. MATERIALES Y METODOS

Diagrama del proceso:



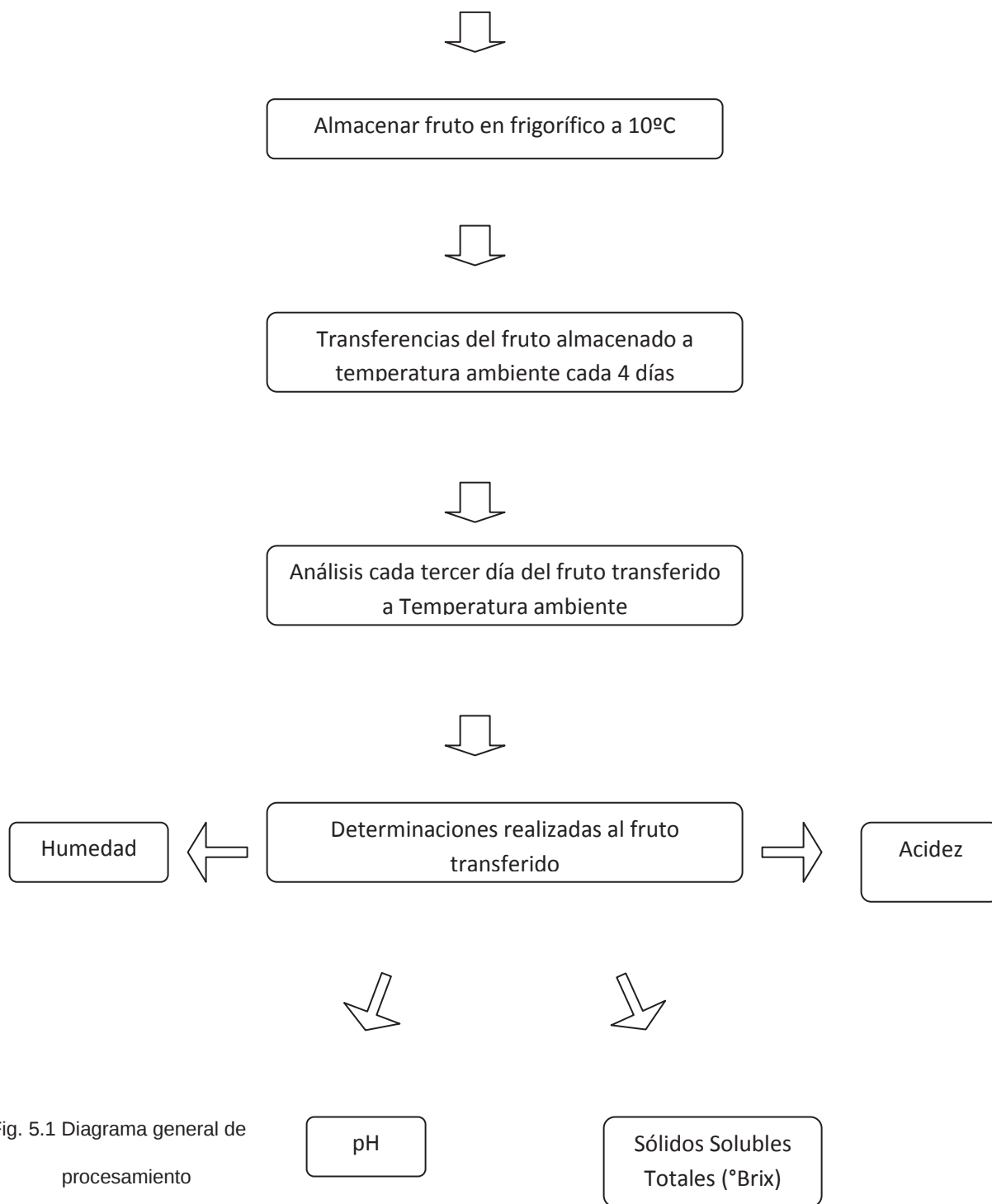


Fig. 5.1 Diagrama general de procesamiento

5.1 Características del muestreo

La guayaba es un fruto comestible, redondo o en forma de pera, tiene una corteza delgada y delicada color verde pálido a amarillo; una pulpa cremosa de color blanca o naranja-salmón y con muchas semillas de constitución dura, llega a pesar de 60 a 500 gramos y mide de 4-12 cm de longitud y de 4-7cm de diámetro, según la variedad. Su sabor es agri dulce y es rico en vitaminas A, B y C.

5.2 Manejo del muestreo

El fruto de guayaba fue adquirido en el mercado de Abastos en un estado de maduración verde durante el mes de mayo y fue transportado en cajas de empaque al laboratorio de Biotecnología “M.C. Victor Manuel Rodríguez Alcocer” de la escuela de Q.F.B evitando provocar daños mecánicos por manejo del fruto.

Una vez en el laboratorio el fruto fue seleccionado separando y desechando los frutos dañados, se ordenó en 8 grupos de 100 frutos cada uno.

5.3 Tratamiento de hipoclorito de sodio para los lotes de fruto

Cada grupo de 100 frutos de guayaba se colocó por inmersión en cubetas con solución de cloruro de calcio al 1% por 2 horas. Agotado el tiempo en la solución de cloruro de calcio el fruto se secó uno por uno con unas pequeñas toallas.

5.4 Diseño de experimento

Una vez concluido el tratamiento de calcio, el fruto se introdujo en una cámara climática marca Labline biotronette mark III, modelo 845 NR de forma manual colocando el fruto sobre las 2 parrillas y extendiéndolo en toda su superficie para efectuar el choque térmico, donde se expuso el fruto a una temperatura de $38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30

minutos. Las puertas de la cámara se mantuvieron cerradas para evitar el escape de calor.

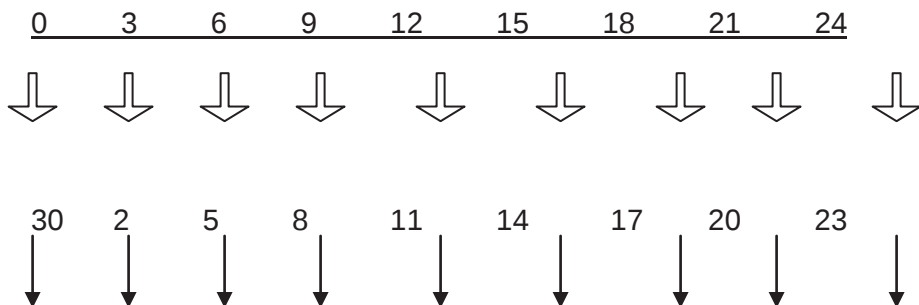
5.5 Método de aislamiento 1

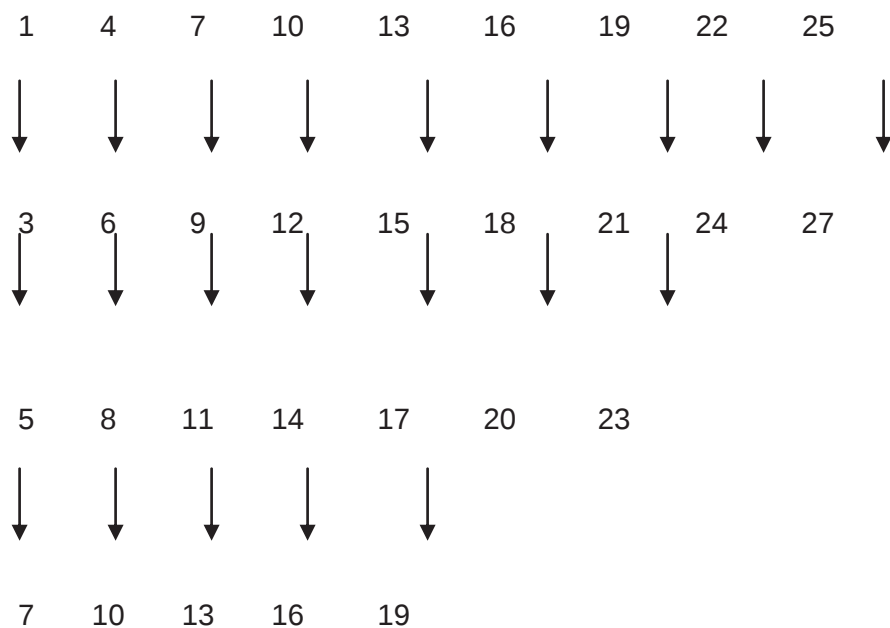
Terminado el tiempo de exposición a choque térmico el fruto fue colocado en refrigeradores marca Mabe a una temperatura de 10°C y una humedad relativa de 85-90%, se colocaron sobre las parrillas de manera manual dividiéndolos en 4 grupos con 234 frutos cada uno y marcados por el numero de repetición.

5.6 Método de aislamiento 2

Las transferencias del fruto a temperatura ambiente se realizaban cada 4 días con un monto de 30,24 o 18 frutos cada una.

Cuadro 2. TRANSFERENCIAS DEL FRUTO





5.7 Método de aislamiento 3

Diseño experimental: Completamente al azar con 3 repeticiones

Tiempo de almacenamiento: 0,3,6,9,12,15,18,21,24

Transferencias: cada 4 días

Evaluaciones: cada tercer día 6 guayabas

La unidad experimental consistió de un lote de 234 frutos de guayaba en estado de maduración verde para cada repetición de los cuales se tomaba un total de 30 frutos para las primeras 5 transferencias a temperatura ambiente, 24 frutos para las 2 siguientes transferencias a temperatura ambiente y 18 frutos para las 2 últimas transferencias a temperatura ambiente y de ahí se realizaron las pruebas químicas cada

tercer día con 6 frutos de guayaba (3 para humedad y 3 para pH, °Brix y acidez titulable).

Los sólidos solubles totales se determinaron a través de un refractómetro manual (rango 0 – 32°Bx). Para tal fin, se extrajo el jugo de 3 guayabas tomadas al azar por cada tiempo de evaluación, del jugo extraído se tomo una gota y se colocó en el prisma del refractómetro. La lectura se realizó en forma directa observando a través del ocular sobre la escala interna

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Determinación de pH del Suelo

Para la determinación de pH se utilizó el jugo extraído en la evaluación de Sólidos Solubles Totales. La lectura se hizo mediante un potenciómetro 530 marca Corning Pinnacle, el cual fue calibrado con solución buffer de pH 4 y pH 7 para posteriormente introducir el electrodo dentro del vaso de precipitado con la muestra contenida y se realizó la lectura correspondiente.

La acidez titulable fue determinada por titulación con una solución de NaOH 0.1 N. Esta fue valorada con una solución de ácido clorhídrico 0.1 N. Para la determinación de la acidez, se tomaron 2.5g de muestra del jugo obtenido de 3 guayabas y se colocaron dentro de un matraz EM de 250ml, se diluyó con 12.5ml de agua destilada se agregaron 3 gotas de fenofaleína al 1% como indicador y se tituló con la solución de NaOH hasta obtener un viraje de color (de transparente a rosa) en la solución.

La acidez se reportó como porcentaje de ácido cítrico por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ac. Cítrico} = V * N(\text{NaOH}) * \text{meq ac cítrico} / \text{pm} * 100$$

Donde:

V= volumen gastado de NaOH

N= Normalidad de NaOH

meq ac cítrico= 0.07003

pm= peso de la muestra

6.2 Características del aislamiento de *Colletotrichum gloesporioides*

Para la determinación de la humedad se tomaron 3 guayabas en total, las cuales fueron picadas y colocadas en una charola de aluminio, posteriormente se introdujeron en la estufa a 105 °C hasta peso constante, Se registraron los tiempos inicial y final. La diferencia de peso se expresó como porcentaje de humedad.

Los Grados Brix equivalen al contenido de azúcar y sólidos solubles (aminoácidos, fructosa, proteínas, sacarosa y vitaminas) en total contenidos en un líquido de cualquier viscosidad. Se considera para un fruto tropical un mínimo de 9 °Brix para que sea catalogado como un fruto de calidad.

Los Grados Brix están relacionados con la firmeza y aceptación del producto (a medida que el fruto madura el contenido de azúcares incrementa). El aumento de los sólidos solubles totales se puede atribuir a la conversión del almidón en azúcares sencillos debido a un aumento en la actividad de las enzimas hidrolasas del almidón.²

La cantidad de sólidos solubles (°Brix) registrada durante el almacenamiento tanto a 10°C como a temperatura ambiente mostró un comportamiento de maduración natural observándose que el cambio de temperatura afecta notablemente la calidad comercial del fruto. Sin embargo se puede observar un incremento del 53% en el día 12 de almacenamiento a 10°C pero esto sucedió porque no se utilizó el mismo fruto durante todo el experimento ya que se destruía en cada prueba.

También para el día 24 de almacenamiento a 10°C se observa un incremento significativo durante los días de almacenamiento a temperatura ambiente pero esto no se toma mucho en cuenta ya que para esta fecha la mayoría de los frutos ya no presentaban calidad comercial.

El incremento observado en la concentración de sólidos solubles es un producto de la respiración, donde las reacciones metabólicas van degradando los azúcares de reserva (almidón) y formando azúcares sencillos como glucosa, ribosa y sacarosa, contenidos en la guayaba.

La acidez de la guayaba está dada principalmente por los ácidos orgánicos (en la guayaba es el ácido cítrico) que el fruto forma como consecuencia del metabolismo o el proceso respiratorio.

6.2.1 Cultivo in vitro

Generalmente los ácidos disminuyen en la maduración porque son sustratos respiratorios o son convertidos en azúcares. De tal forma que estos pueden ser considerados una fuente de energía y se esperaría que disminuyeran durante la actividad metabólica que se desarrolla en la maduración.⁴

La concentración de ácido cítrico registrada durante el experimento fue disminuyendo como era de esperarse ya que es un sustrato respiratorio y es convertido en azúcar durante la maduración.

Sin embargo para el día 12 de almacenamiento a 10°C se observa un incremento del 30% el cual puede deberse a la utilización de varios frutos a lo largo del experimento; en el día 18 de almacenamiento a 10°C también se observa un incremento del 39% durante la transferencia a temperatura ambiente el cual también puede deberse a la utilización de varios frutos en cada análisis.

6.2.2 Morfología Macroscópica de *Colletotrichum gloesporioides*

El pH es un factor básico en la conservación del fruto, aumenta debido a que existe un incremento en la velocidad de degradación de las sustancias celulosas pecticas y a pesar de su incremento se mantiene en rangos de 3.8-4.2 lo que favorece la hidrólisis de los carbohidratos polímeros debilitándose las paredes celulares lo que se traduce en pérdida de firmeza.

6.2.3 Morfología Microscópica de Colletotrichum gloesporioides

Dentro de los resultados de pH se observa una serie de cambios significativos tanto en almacenamiento a 10°C como a temperatura ambiente esto se debe a los cambios metabólicos ocurridos dentro de cada fruto analizado. Sin embargo se observa que a pesar de la variación el pH se mantiene ligeramente ácido, medio que se requiere para llevar a cabo los procesos metabólicos de maduración.

El porcentaje de humedad presente en las células vegetales es uno de los factores principales que determinan la calidad y la vida de anaquel de los productos perecederos como la guayaba. La pérdida de agua ocurre al mismo tiempo que ocurre la respiración esto es porque al respirar el fruto produce calor que debe ser disipado o se calienta y ocasiona una disminución del peso, apariencia y elasticidad del producto.⁶

Los resultados de humedad no presentaron variaciones significativas en los frutos almacenados a 10°C ni al ser transferidos a temperatura ambiente, esto se debió al equilibrio que mantenía con su entorno el cual no permitió la salida de grandes cantidades de vapor de agua.

VIII. CONCLUSIONES

Se compararon los resultados obtenidos de los frutos que recibieron tratamiento con los frutos no tratados y sólo se observó una disminución en la concentración de sólidos solubles (°Brix) en los frutos tratados, esto es porque el contenido de calcio en la pulpa tiene efecto sobre el desdoblamiento del almidón. Los indicadores de acidez titulable, Humedad y pH cambiaron según el metabolismo del fruto en ambos casos igual por lo que se cree que esta variación es consecuencia del almacenamiento y no de los tratamientos dados a los frutos.

Las muestras de frutos estudiadas presentaron síntomas característicos de las enfermedades conocidas como antracnosis, moho gris y pudrición blanda. La antracnosis se caracterizó, en frutos semimaduros y maduros, por la presencia de lesiones hundidas, de forma circular o irregular, inicialmente acuosas y posteriormente secas, de color marrón oscuro a negro, en donde se destacan áreas de color salmón, las cuales corresponden a masas de conidios. Sobre frutos verdes, se observaron manchas pardas o negras, en la región apical para luego extenderse hasta cubrir todo el fruto, llegando a momificarlo y alcanzar el cáliz y el pecíolo. Síntomas similares han sido reportados por varios autores (1, 3, 5, 7).

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Ammann, R. I., L. Krumholz, and A. D. Stahl.** (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cell for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
2. **Anton, J., I. Meseguer, and F. Rodríguez-Valera.** (1988). Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2381-2386.
3. **Barnett, H. L., and B. B. Hunter.** (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. American Phytopathology Society, St. Paul, Minn.
4. **Bartlett R. and James B.** (1980) Studying dried stored soil samples- some pitfalls. –*soil Science Society of America Journal.* 44, 721-724.
5. **Binnerup. S. J. and Sorensen J.** (1992). Nitrate and nitrite microgradients in barley rhizosphere as detected by a highly sensitive denitrification bioassay. *Appl. Environ Microbiol.*, 58: 2375-2380.
6. **Bottomley, P. J.**(1994). Light microscopic methods for studying soil microorganisms, *In Weaver et al. (ed.) Methods of soil analysis. Part 2 Microbiological and biochemical properties.* Soil Science Society of America. Madison, Wis. P. 81-106
7. **Bryan, M. P., and L. A. Burkey.** (1953). Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.* 36: 205-217.
8. **Chanway C. P. and Nelson L. M.** (1990). Field and Laboratory studies of *Triticum aestivum* L. inoculated with co-existent growth-promoting *Bacillus* Strains. *Soil Biol. Biochem.*, 22: 789-795.

9. **Chanway C. P., Nelson L. M., and Holl F. B** (1988). Cultivar-specific growth promotion of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) by co-existent *Bacillus* species. *Can. J. Microbiol.* 34: 925-929.
10. **Chanway C. P., Turkington R. and Holl F.B.** (1991) Ecological implications of specificity between plants and rhizosphere microorganisms. *Advances in Ecological Research.* 21: 121-169.
11. **Cowling A. J.,** (1994) Protozoan distribution and adaptation, p. 5-42. *In* J. F. Darbyshire (ed.), Soil protozoa. CAB International, Oxon, United Kingdom.
12. **Darbyshire J. F. and Greaves M. P.** (1973). Bacteria and protozoa in the rizoshere. *Pestic. Sci.*, 4: 349-360.
13. **De Leij, F. A. A. M., E. J. Sutton, J. M. Whipps, and J. M. Lynch.** (1994). Spread and survival of a genetically modified *Pseudomonas aureofaciens* in the phytosphere of wheat and in Soil. *Appl. Soil Ecol.* 1: 207-218.
14. **DeLong, E. F., G. S. Wickham, and N. R. Pace.** (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells, *Science* 243: 1360-1363.
15. **De Weger, L. A., A. J. van der Bij, L. C. Dekkers, M. Simmons, C. A. Wijffelman, and B. J. J. Lugtemberg.** (1995) Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonas. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17: 221-228.
16. **Doran, J. W. & Parkin, T. B.** (1994) in *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment* (Eds Doran, J. W., Coleman, D. C., Bezdicsek, D. F. & Stewart, B.A.) (Soil Sci. Soc. Am.), Madison, Wisconsin. 3-21
17. **Drinkwater, L. E., Wagoner, P. & Sarrantonio.** (1998) M. Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses. *Nature* 396: 262-265.

18. **Gardner, W.K., Barber, D.A., and Parbery, D.G.** (1983). Non-infecting rhizosphere microorganisms and the mineral nutrition of temperate cereals. *J. Plant Nutr.* 6: 185-199.
19. **Gilbert G. S., Parke J. L., Clayton M. K. and Handelsman J.** (1993) Effects of an introduced bacterium on bacterial communities on roots. *Ecology* 74: 840-854.
20. **Guevara, M. A., M. T. Gonzalez-Jaen, and P. Estevez.** (1997) Multiple forms of pectic lyase polygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*: regulation of their synthesis by galacturonic acid. *Can. J. Microbiol.* 43: 245-253
21. **Hurek, T., B. Reinhold-Hurek, M. Van Montagu, and E. Kellenberg.** (1994) Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* 176: 1913-1926.
22. **Ikeda, K., K. Toyota, and M. Kimura.** (1998). Role of extracellular pectinase in the rizoplane competence of a rhizobacterium *Burkholderia pickettii* MSP3RIF. *Soil Biol. Biochem.* 30: 323-329.
23. **Kennedy, A. C., and K. L. Smith.** (1995) Soil microbial diversity and the sustainability of agriculture soils. *Plant Soil.* 170: 75-86.
24. **Kloepper J. W.** (1993) Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*, ed. E. B. Metting, Jr., pp. 255-274 Marcel Dekker, New York.
25. **Kloepper J. W., Mc Inroy J. A. and Bowen K. L.** (1992). Comparative identification by fatty acid analysis of soil, rhizosphere, and geocarposphere bacteria of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant and soil* 139: 85-90.
26. **Kragelund, L., and O. Nybroe.** (1996) Competition between *Pseudomonas fluorescens* Ag1 and *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4) during colonization of barley roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20: 41-51.
27. **Linderman R. G.** (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions, p. 45-70. In G. J. Bethlenfalvay and R. G. Linderman

(ed.), Mycorrhizae in sustainable agriculture. ASA Special Publication, Madison, Wis.

28. **Linderman R. G. and Paulitz T.C.** (1990) Mycorrhizal rhizobacterial interactions. In *Biological Control of Soil Borne Plant Pathogens*, ed. D. Hornby, pp. 262-283. CAB International, Wallingford.
29. **Martin, J. P.** (1950) Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.* 69: 215-232.
30. **Marschner, H., Römheld, V., Horst, W. J., and Martin, P.** (1986). Root-induced changes in the rhizosphere. Importance for the mineral nutrition of plants. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 149: 441-456.
31. **Marschner, H., Treeby, M., and Römheld, V.** (1989). Role of root-induced changes in the rhizosphere for iron acquisition in higher plants. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 152: 197-204.
32. **Matson, P.A., Parton, W. J., Power, A.G. & Swif, M. J.** (1997) Agricultural intensification and ecosystem properties, *Science* 277: 504-509.
33. **Misaghi, I. J., M. W. Olsen, J. M. Billote, and R. M. Sonoda.** (1992). The importance of rhizobacterial mobility in biocontrol of bacterial wilt of tomato. *Soil Biol. Biochem.* 21: 287-293.
34. **Mueller T., Joergensen R. G. and Meyer B.** (1992). Estimation of soil microbial biomass C. in the presence of living roots by fumigation-extraction. *Soil Biol. Biochem.* 24: 179-181.
35. **Nishiyama, M.,** Y. Shiomi, S. Suzuki, and T. Marumoto. (1999) Suppression of growth of *Ralstonia solanacearum*, tomato bacterial wilt agent, on/in tomato seedlings in a suppressive soil in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.* 45: 79-87.
36. **Oberson, A., J. C. Fardeau, J. M. Besson, and H. Sticher.** (1993) Soil phosphorus dynamics in cropping systems managed to conventional and biological agricultural methods. *Biol. Fert. Soils* 16: 111-189.

37. **Okon, Y. & Labandera-Gonzalez, C.** (1994). Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation experiments. *Soil Biol biochem* 26: 1591-1601.
38. **Okon, Y. & Vanderleyden, J.** (1997). Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News* 63: 366-370.
39. **O'Neill G. A., Radley R. A. and Chanway C.P.** (1992a) Variable effects of emergence-promoting rhizobacteria on conifer seedling growth under nursery conditions. *Biology and Fertility of Soils* 13: 45-49.
40. **Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans, and J. De Ley.** (1987). *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogenfixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L. Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43-51.
41. **Reinhold-Hurek B., T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. Vancanney, K. Kersters, and J. De Ley.** (1993) *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species. *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 574-584.
42. **Ryoo, D., H. Shim, K. [Canada](#), P. Barbieri, and T. K. Wood.** (2000). Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-*o*-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Nat. Biotechnol.* 18: 775-778.
43. **Sansavini, S.** (1997). Integrated fruit production in Europe: Research and strategies for a sustainable industry. *Sci. Hort.* 68: 25-36.
44. **Schönwitz, R. and Ziegler, H.** (1989). Interaction of maize roots and rhizosphere microorganism. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 152: 217-222.
45. **Shim, H., and T. K. Wood.** 2000. Aerobic degradation of mixtures of chlorinated aliphatics by cloned toluene-*o*-xylene monooxygenase and toluene-*o*-monooxygenase in resting cells. *Biotechnol. Bioeng.* 70: 693-698.
46. **Shishido M., Loeb. B. M. and Chanway C. P.** (1995) External and internal root colonization of lodge pole pine seedlings by two growth-

promoting *Bacillus* strains originated from different root microsites.

Canadian Journal of Microbiology 41: 707-713.

47. **Shishido M., Petersen D. J., Massicotte H. B. and Chanway C. P.** (1996b) Pine and spruce seedling growth and mycorrhizal infection after inoculation with plant growth promoting. *Pseudomonas* strains. *FEMS Microbiology Ecology* 21: 109-119.
48. **Smiley, R. W. and Cook, R.J.** (1973). Relationship between take-all of wheat and rhizosphere pH in soils fertilized with ammonium vs. nitrate-nitrogen. *Phytopathology*. 63: 882-890.
49. **Söderberg, K. H., and E. Bääth.** (1998). bacterial activity along a young barley root measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1239-1268.
50. **Thomas-Bauzon D, Weinhard P. Villecourt P, Balandreau J.** (1982). The spermosphere model. 1: Its use in growing, counting and isolating N₂fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.*, 28: 922-928.
51. **Tillman, D.** (1999) Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96: 5995-6000.
52. **Trân Van, V., O. Berge, S. Ngo Ke, J. Balandreau, and T. Heulin.** (2000) Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia Vietnamiensis* on early and late yield component in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil* 218: 273-284.
53. **Trolldenier, G.** (1989) Plant nutritional and soil factors in relation to microbial activity in the rhizosphere, with particular emphasis on denitrification. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 152: 223-30.
54. **Viallard, V., I. Poirier, B. Cournoyer, J. Haurat, S. Wiebkin, K. Ophel Keller, and J. Balandreau.** (1998). *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*]

phenazine, [*Pseudomonas*] *pirrocinia*, and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 549-563.

55. **Weller D. M.** (1988) Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology 26: 379-407.
56. **Weller, D. M., and L. S. Thomashow.** (1993) Use of rhizobacteria for biocontrol. Curr. Opin. Biotechnol. 4: 306-311.
57. **Yee, D.C., J. A. Maynard, and T. K. Wood.** (1998). Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene *ortho*-monooxygenase constitutively. Appl. Environ. Microbiol. 64:112-118.
58. **Zelles L., Adrian P., Bai Q. Y., Stepper K., Adrian M. V., Fischer K., Maier A. and Zeigler A.** (1991) Microbial activity measured in soils stored under different temperature and Humidity conditions. Soil Biology & Biochemistry 23: 955-962.
59. **Zhou, J., M. R. Fries, J. C. Chee-Sanford, and J.M. Tiedje.** (1995). Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and descriptions of *Zoarcus tolulyticus* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 500-506.