

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo



Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo

María Elena Castelán · Claudina María Hack
Miriam Porta · Cristina Esther Sotelo

COORDINADORAS

Silvia A. Arzuaga · Karina R. Ávalos Llano
Natalia Banegas · Sebastián Carnicer
Mónica M. Collavino · Stella M. Contreras Leiva
Amilcar Correa · Marcela R. Cossoli
Mario R. Delfino · Mariana Ferrerira
Daniela González · Daniel H. Grasso
María C. Iglesias · Natalia Mansilla
Cecilia Martin · Gernán L. Pérez
José M. Recalde · Amalia M. E. Romero
Julieta Rojas · Matías H. Serafini
Andrea A. Sirio · Cristina E. Sotelo
Marcela Toledo · Emilce Viruel

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo / Silvia A. Arzuaga ... [et al.]; coordinación general de María Elena Castelán ... [et al.]. - 1a edición para el alumno - Corrientes : Editorial de la Universidad Nacional del Nordeste EUDENE ; Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo, 2022. Libro digital, PDF - (Ciencia y técnica)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-656-211-3

1. Técnicas de Análisis. 2. Microbiología. 3. Suelos. I. Arzuaga, Silvia A. II. Castelán, María Elena, coord.

CDD 577.57

Edición: Irina Wandelow

Corrección: Facundo Alarcón / Irina Wandelow

Diseño y diagramación: Julia Caplan



© EUDENE. Coordinación de Comunicación Institucional, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina, 2023.

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723.
Reservados todos los derechos.

25 de Mayo 868 (cp 3400) Corrientes, Argentina.
Teléfono: (0379) 4425006
eudene@unne.edu.ar / www.eudene.unne.edu.ar

Capítulo 2. Capacidad celulolítica del suelo en aerobiosis

María C. Iglesias, Amalia M. E. Romero
y Marcela R. Cossoli

La celulosa es uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal, es el polisacárido más importante en la constitución de los restos vegetales, llegando hasta un 60% o más del peso seco, dependiendo del tipo de vegetal. Representa una gran fuente de energía para los microorganismos, principales responsables de la descomposición de la materia orgánica del suelo, como también para otros organismos del suelo, y es fuente de carbono que promueve la actividad microbiana y la estabilidad de los agregados del suelo. El conocimiento en mayores detalles de los procesos y microorganismos que actúan en la degradación de la celulosa radica en que la descomposición de los residuos vegetales provee materia orgánica necesaria para mejorar y/o mantener la calidad de los suelos¹.

La importancia agronómica del estudio de la descomposición de la celulosa o «celulólisis» radica en que los rastrojos o residuos de las cosechas, así como los excedentes de los pastoreos, constituyen el principal aporte de este material a los agroecosistemas, como lo hacen las hojarasca en los bosques y el monte, manteniéndose el nivel de materia orgánica de un suelo.

La disponibilidad de este sustrato es un factor importante que influye en el nivel de actividad de los organismos del suelo. Por lo tanto, se encuentra relacionado con el uso del suelo y su descomposición representa una fuente de nutrientes que podrán ser utilizados por las plantas y diferentes organismos presentes en el ecosistema, teniendo en cuenta que la celulólisis es solamente

1. Agradecimientos por los aportes a la implementación y uso de estas metodologías al Ing. Agr. Juan Quant Bermúdez†, al Ing. Agr. Crispín Venialgo†, al Ing. Agr. (Dr.) Juan Prause y al Dr. Luis Wall, así como también a todos y cada uno de los alumnos/as, pasantes y becarios/as que aportaron con sus trabajos a consolidar las técnicas y sus resultados.

una parte del conjunto de fenómenos involucrados en la mineralización de los vegetales incorporados al suelo y es un proceso lento en relación con otros compuestos del carbono.

La descomposición de los restos vegetales de cualquier naturaleza se realiza entre dos extremos de potencial redox, condiciones principalmente aeróbicas y/o preponderantemente anaeróbicas. En el primer caso intervienen hongos, actinomicetes o actinobacterias, bacterias, protozoos, entre otros. En cambio, en el segundo predominan las bacterias y participan algunos hongos de grupos específicos.

La degradación de los restos orgánicos está influenciada por las condiciones ambientales como la humedad, la temperatura, la aireación, el contenido y la composición de materia orgánica, como así también de los grupos de microorganismos intervinientes.

De la degradación de celulosa en medio aeróbico se llega a la formación de biomasa microbiana, CO_2 , H_2O , ácidos urónicos, entre otros, favorables para la estructuración del suelo.

Los factores más importantes que afectan la degradación son:

- Nivel de N: los microorganismos requieren una parte de N por cada 35 o 50 partes de celulosa.
- Nivel de P: en algunos suelos este elemento puede ser limitante.
- Temperatura: el proceso se realiza desde el punto de congelamiento hasta los 65 °C, lo que varía realmente es la población actuante.
- pH: tiene mayor influencia en los procesos aeróbicos, dado que las bacterias anaeróbicas son más tolerantes a los cambios. La celulólisis es más activa en suelos neutros o bien provistos de bases.
- Humedad y aireación: condiciona la población actuante. Por el rendimiento energético, el proceso es más lento en ambientes anegados.

A mayor profundidad en los suelos, hay menor actividad, dependiendo de las características del suelo y de las condiciones ambientales. La presencia de fuentes de carbono más simples, como disacáridos y glucosa, entre otros, incrementan la actividad. La proporción de lignina tiene un efecto inhibitorio mecánico resultante de la estrecha unión entre estos polisacáridos, siendo una barrera inicial y debiendo darse determinada sucesión microbiana como ser lignolíticos-celulolíticos (Alexander, 1981; Cátedra de Microbiología Agrícola, 1999-2020; Coyne, 2000; Frioni, 1990, 2011; Madigan *et al.*, 2015).

La celulosa es degradada por una serie de microorganismos mediante la acción de varias enzimas no asociadas en complejos, como en los hongos filamentosos y en algunos actinomicetos, o formando un complejo denominado «celulosoma» (Ramírez y Cocha, 2003). La hidrólisis de la celulosa se realiza mediante un complejo enzimático llamado celulasas, integrado por algunas exoenzimas inducibles frente al agregado del sustrato, constituido básicamente por tres enzimas: exoglucanasas, endoglucanasas y β -glucosidasas. La complejidad del sistema enzimático implicado y la heterogeneidad de las técnicas y unidades empleadas para la cuantificación de la degradación de celulosa hacen a su medición un desafío. El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) es el más usado en la actualidad para la cuantificación y determinación de la actividad celulolítica (Cortes Ortiz *et al.*, 2013; Cadenas, 2016). Además, se pueden encontrar otras técnicas como el recuento de microorganismos específicos por gramo de suelo y dentro de las denominadas «técnicas ecológicas», la técnica de Schaefer (1971), que entierra trozos de papel de filtro dentro de sobres de malla de polietileno; Landaburu (1982) utilizó un método parecido, sustituyendo el papel de filtro por tela de algodón y la técnica ecológica de Winogradsky (1949) y sus diferentes modificaciones, con microdiscos de papel de filtro (Quant Bermúdez y Bakos, 1984). En estas últimas técnicas ecológicas, luego de un determinado período de incubación, se registra el porcentaje de degradación y/o la determinación de la pérdida de peso. Es posible en estas técnicas aplicar y calcular la constante de degradación por el tiempo (Van Wesemael, 1993).

2.1. FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS

Los tres métodos presentados se basan en la incorporación del sustrato «celulosa» al suelo *in situ*, a una muestra de suelo en laboratorio, dentro de una pila de compostaje y mediante observaciones periódicas y al final de la incubación o del tiempo estimado, se describirá el estado del sustrato, se evaluará la degradación y se determinará la masa remanente.

Dentro de las «técnicas ecológicas» describiremos tres técnicas utilizadas en suelos con las modificaciones o las determinaciones complementarias incorporadas.

2.1.1. Placa de suelo con microdiscos de papel de filtros

Esta metodología ha tenido modificaciones a lo largo de los años:

- Winogradsky (1949): placa de sílicogel con papel en la superficie, donde se siembran granos de suelo. Las colonias se desarrollan sobre la superficie del papel, alrededor de los granos de suelo.
- Fuentes Godo (1968): incorpora suelo granulado en placas y, por encima, se ubica el papel. Las colonias crecen en la superficie del papel.
- Quant Bermúdez y Bakos (1984): utilizan placas de suelo granular con microdiscos de papel de filtro en la superficie.

A partir de los 2000 se incorporó en diferentes trabajos de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE el cálculo de la constante de degradación (Van Wesemael, 1993; Prause *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2012).

2.1.1.1. Objetivo de la determinación

Evaluar la degradación de celulosa en el tiempo mediante la comprobación de la desaparición del sustrato incorporado.

2.1.1.2. Equipamiento y materiales

El equipamiento y los materiales necesarios son los detallados a continuación:

- Cámara de cultivo o estufa de incubación
- Balanza
- Muestras de suelo
- Placas de Petri
- Pipetas
- Agua para humedecimiento
- Fuente de celulosa: papel de filtro en microdiscos obtenidos con perforadora, se utilizan 50 microdiscos por cada caja.

2.1.1.3. Acondicionamiento del suelo

Para lograr el acondicionamiento del suelo, se realizarán los siguientes pasos:

1. Pesar 30 g de suelo por muestra con sus respectivas repeticiones, llevar a placa de Petri. Suelo seco al aire, molido y tamizado (malla 2 mm).
2. Humedecer el suelo hasta 40 o 60% de su capacidad de retención (previamente determinar la capacidad máxima de retención de agua).
3. «Sembrar» con una pinza 50 microdiscos de papel de filtro en forma ordenada (para facilitar las observaciones) sobre toda la superficie de la placa de suelo, cuidando que tengan buen contacto con el mismo.

4. Tapar la placa de Petri.
5. Repetir el procedimiento para cada muestra.
6. Pesar la muestra de suelo húmeda con los microdiscos sembrados, para el control de humedad semanalmente, reponiendo cuando sea necesario.
7. Llevar a la cámara de cultivo. Incubar en las condiciones de temperatura que se quieran evaluar.
8. Pesar previamente los 50 microdiscos de papel de filtro para obtener el dato en mg de sustrato incorporado.

La lectura de cada caja de Petri es realizada a intervalos regulares. El lapso entre una y otra lectura depende del tiempo de incubación que se haya previsto.

2.1.1.4. Conteo de los microdiscos

Para realizar la medición, se observa el nivel de degradación de cada microdisco.

- Degradación parcial: en esta etapa se observa que el microdisco va perdiendo consistencia, aunque la extensión y el sitio de la zona atacada varía mucho. En algunos casos aparecen sobre el microdisco gotas de consistencia mucilaginosa, coloraciones o crecimiento miceliar producto de la actividad microbiana.
- Degradación total: el microdisco ha perdido por completo su consistencia, es imposible separarlo del suelo y está prácticamente desintegrado o ha desaparecido.

«A», grado de utilización del sustrato. Cada microdisco representa un valor del 2% del total de la celulosa (50 microdiscos por placa) y el grado de ataque se expresa en porcentaje sobre el total. También se puede expresar estimando en mg de celulosa degradada, dado el peso inicial de los 50 microdiscos.

«B», tiempo que se ha asignado a las lecturas. Al que se le puede asignar un valor según el intervalo transcurrido entre lectura y lectura. No es lo mismo un 100% de degradación total a los 15 días que un 100% de degradación total a los 30 días. Cuando se analiza la degradación con relación al tiempo, para determinar el incremento entre cada lectura u observación se debe descontar o restar la anterior.

La descripción que se ha hecho corresponde a la placa básica, a partir de esta se pueden introducir todas las variantes que se deseen, con el fin de estudiar y analizar los diferentes factores que intervienen en la celulólisis.



Figura N° 1. Vista de una placa de Petri, con suelo y microdiscos (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).



Figura N° 2. Vista de placas de Petri, con suelo y microdiscos inicial y final (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

Se puede observar la diversidad microbiana registrando las manifestaciones de las diferentes colonias a medida que avanza la degradación.

Es posible, por medio del microscopio de barrido (MEB), mediante métodos de preparación convencional, realizar observaciones de la diversidad de manifestaciones y llegar a un escaneado electrónico (*Scanning electron micrographs*) de la microflora que coloniza la celulosa (Metcalf *et al.*, 2002).

2.1.2. Minired con celulosa en bandejas de suelo

En esta técnica se adaptó la metodología de redes de degradación o *litter bag*. Se incorporan las bandejas con el suelo, las miniredes con la fuente de celulosa y la incubación en cámaras de cultivo con humedad y temperatura controladas (Iglesias y González Lequizamón, 1988).

2.1.2.1. Objetivo de la determinación

Evaluar la degradación de celulosa en un tiempo determinado, mediante la utilización de miniredes con placas de celulosa pequeñas en cajas de incubación, calculando la masa remanente final.

2.1.2.2. Equipamiento y materiales

Los equipos y materiales necesarios son los siguientes:

- Cámara de cultivo o estufa de incubación.
- Estufa de secado.
- Balanza.
- Bandejas con tapa de volumen determinado o caja de incubación con tapa (200 ml/400 ml).
- Muestras de suelo. Cantidad de suelo por unidad, acorde a la caja elegida.
- Fuente de celulosa: papel de filtro de 1 mm de espesor de 10 x 10 cm (1 por caja) o ajustado al tamaño de la caja.
- Red de nylon con un entramado de 2 x 2 mm (1 por caja), ajustado al tamaño de la caja.
- Pipetas.
- Agua destilada.

2.1.2.3. Procedimiento

El procedimiento lleva los siguientes pasos a seguir:

1. Armar pequeñas redes de nylon en las que se introduce una placa de celulosa de tamaño acorde a la red, previamente pesada.
2. Colocar en la caja de incubación la mitad de la muestra de suelo, luego la minired y por encima, el suelo restante. De



Figura N° 3. Examen con lupa de la superficie de las placas (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

- esta manera, la minired con placa de celulosa queda entre capas de suelo de aproximadamente 2 cm.
3. Humedecer lentamente a capacidad de campo o con los ajustes necesarios por el tipo de suelo y las alteraciones del acondicionamiento de la muestra.
 4. Incubar a la temperatura seleccionada.
 5. Incubar durante el tiempo de estudio, 30-45 días, a temperatura ambiente, registrando la misma y controlando que se mantenga el nivel de humedad o bien en estufa, a temperatura controlada, con el periódico control de humedad.
 6. Retirar las miniredes al cumplirse el tiempo de incubación, lavar cuidadosamente con agua, registrar la presencia de manchas, hongos y mucílago, secar en estufa hasta peso constante, registrar el peso y determinar la masa remanente.

2.1.3. Redes de degradación con celulosa-litter bag

Se adapta la metodología de redes de degradación a campo *litter bag* con diferentes materiales celulósicos, como rastrojos y hojarasca, según antecedentes de Van Wesemael (1993), y se colocan en las redes placas de celulosa, con el fin de uniformar el sustrato y poder realizar estudios comparativos en diferentes ambientes, sitios, lotes con distintos cultivos, pilas de compost, entre otras opciones.

2.1.3.1. Objetivo de las determinaciones

El objetivo es evaluar la degradación de celulosa a campo bajo las condiciones climáticas del sitio.

2.1.3.2. Materiales y herramientas

Los materiales y herramientas necesarios son los siguientes:

- Balanza.
- Estufa de secado.
- Estacas, hilo, tijeras, bolsas, palas.
- Redes de nylon con un entramado de 2 mm (*litter bags*).
- Placa de celulosa de 10 x 10 cm previamente pesadas (g) o ajustado al tamaño de red elegido.



Figura N° 4. Examen con lupa de la superficie de las placas (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

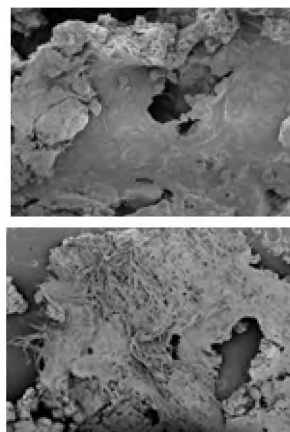


Figura N° 5. Observaciones con microscopio electrónico de barrido (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).



Figura N° 6. Secuencia para el armado y control de la metodología empleada para evaluar la degradación de celulosa en miniredes. Incubación de 45 días con humedad constante y temperatura controlada (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

2.1.3.3. Procedimiento

Se utilizan placas de celulosa. La técnica consiste en la colocación de estas placas de celulosa de peso conocido y dispuestas en las redes de degradación, a profundidad determinada constante para todos los sitios, tratamientos o repeticiones.

Un tiempo de incubación *in situ* o de estadía en el campo, dependiendo de la placa de celulosa colocada y de la planificación realizada.

El retiro de las mismas, para ser llevadas al laboratorio, se realiza al cumplirse el tiempo planificado.



Figura N° 7. Degradación en laboratorio con humedad controlada, control a los 15 días (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).



Figura N° 8. Representación esquemática de la metodología empleada para evaluar la degradación de celulosa a campo.

En el laboratorio, las placas son lavadas minuciosamente, llevadas a estufa a temperatura de secado hasta peso constante y se determina el peso seco de las mismas. De esta manera, se calcula el porcentaje de degradación y/o la masa remanente de las placas de celulosa en un determinado tiempo.

2.2. CÁLCULOS

En los tres casos se puede calcular el porcentaje de degradación o la masa remanente:

I- Determinar el porcentaje de degradación total de los microdiscos y calcular los mg de celulosa degradada partiendo del peso de los microdiscos.

II y III- Determinar la masa remanente por la diferencia de peso de las placas.

Masa remanente en % = $\frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$ y en todos los casos se puede calcular la constante de degradación por el tiempo de incubación $(-k \cdot t)$ (Van Wesemael, 1993).

$$(-1) \cdot \ln (MR/100) / T$$

Donde: Ln es el logaritmo natural, MR es la masa remanente y T es el tiempo.

Para que los valores de la constante de degradación sean comparables, se debe prestar atención a que el tiempo sea registrado de la misma manera (días, meses o años).

2.2.1. Ejemplos

Determinaciones comparando sitios, manejos y tiempos de incubación del proyecto interdisciplinario Biospas (Biología del Suelo y Producción Agropecuaria Sustentable) 2009-2013 y del proyecto Biospas, subproyecto PID N° 52 microorganismos cultivables, del Grupo 8 Micro-FCA-UNNE 2009-2013. Corresponden a muestras de Monte Buey y Bengolea (Córdoba), Pergamino (Buenos Aires) y Viale (Entre Ríos), con tres situaciones distintas en cada uno: AN (Ambiente Natural de cada localidad), BPA (Buenas prácticas agrícolas-rotación intensiva de cultivos) y MPA (Prácticas agrícolas no sustentables-monocultivo).



Figura N° 9. Redes de degradación. Degradación en el campo luego de 30 días con escasas precipitaciones (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

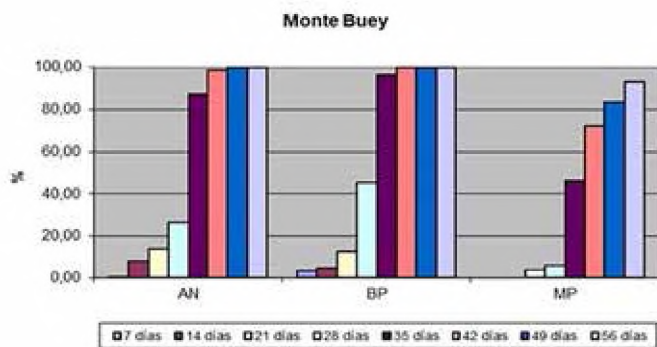


Figura N° 10. Placas de suelo con microdiscos de celulosa. Porcentaje de degradación con el transcurso del tiempo (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

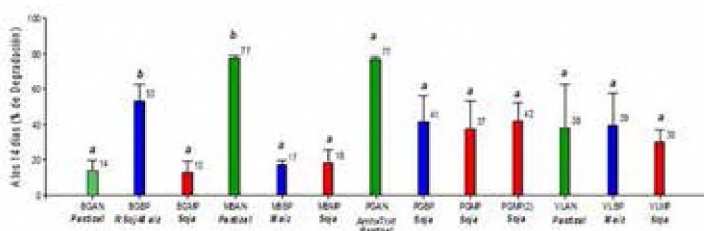


Figura N° 11. Porcentaje de degradación de celulosa en placas de suelo (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

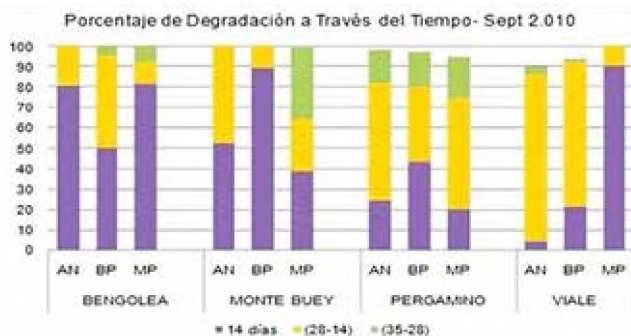


Figura N° 12. Evolución de la degradación de celulosa a través del tiempo en porcentaje (Gómez *et al.*, 2012; Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

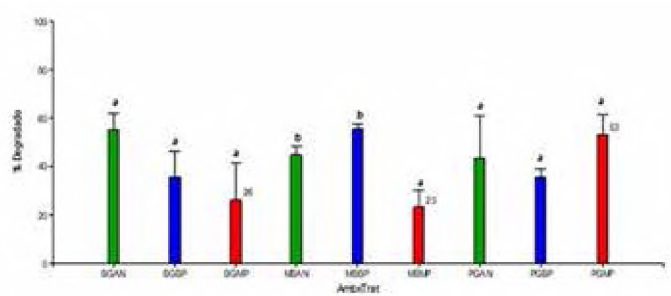


Figura N° 13. Porcentaje de degradación de placas de celulosa en miniredes con temperatura y humedad controladas (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

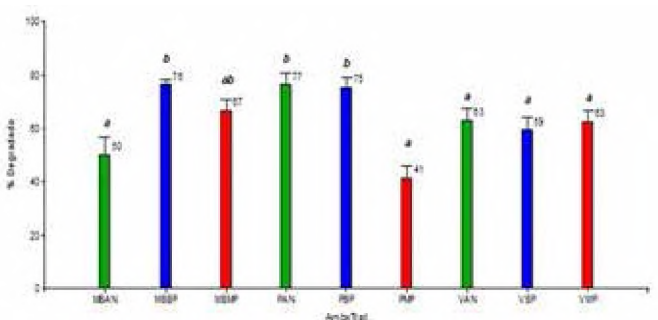


Figura N° 14. Porcentaje de degradación de placas de celulosa a campo mediante redes de degradación (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

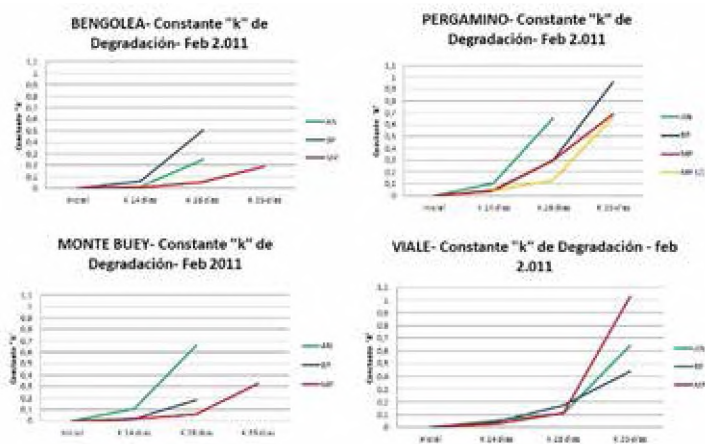


Figura N° 15. Constante «k», velocidad de la degradación a través del tiempo (Gómez *et al.*, 2012; Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).



Figura N° 16. Utilización de redes y miniredes de degradación a campo y en laboratorio (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

2.3. OTRAS CONSIDERACIONES

Para la utilización de redes de degradación como trampa para posteriores aislamientos, se debe tener presente que la degradación microbiana de celulosa también puede ser estudiada realizando otros experimentos con la celulosa contenida en las redes de nylon (*litter bags*) y enterrada en el campo que permita identificar las comunidades microbianas. Para determinar la estructura de las comunidades microbianas, se puede realizar el análisis de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), previa extracción y amplificación del ADN (Krsek y Wellington, 2006). Es posible determinar la actividad enzimática durante la degradación de la celulosa.

En resumen. Se pueden integrar todos los resultados en un modelo que contribuya a explicar mejor la actividad celulolítica del suelo y que, a su vez, nos permita diseñar un indicador de calidad de suelo sobre la caracterización de dicha actividad celulolítica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. (1981). *Introducción a la microbiología del suelo*. México: AGT Editor.
- CADENAS, T. (2016). *Estudio comparativo de dos métodos analíticos para la determinación de la actividad enzimática de celulasas en suelos*. Venezuela: Centro de Investigación en Ambiente, Biología y Química (Ambioquim), Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo.
- CORTÉS ORTIZ, W., Ibla Gordillo, J., Calderón Velásquez, L. y Herrera Bueno, A. (2013). «Cuantificación de azúcares reductores en las cáscaras de naranja y banano». *Journal of Technology*, 12(2), 72-76.
- COYNE, M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. España: Ed. Paraninfo.
- FRIONI, L. (1990). *Ecología microbiana del suelo*. Montevideo, Uruguay: Departamento de Publicaciones y Ediciones de la Universidad de La República.
- _____ (2011). *Microbiología básica, ambiental y agrícola* (1ª ed.) Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora.
- FUENTES GODÓ, P.M. (1968). «Estudio de descomposición de la celulosa en placa de tierra granulada». *2ª Conferencia Latino Americana de Biología del Suelo*. Santa María, Brasil.
- Cátedra de Microbiología Agrícola (1999 y -). *Guía de trabajos prácticos*. Corrientes: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.
- GÓMEZ, E.L., Romero, A.E., Wall, L.G. e Iglesias, M.C. (2012). «Degradación de celulosa en lotes agrícolas bajo siembra directa» [Actas]. *XIX Congreso latinoamericano de la ciencia del suelo y XXIII Congreso argentino de la ciencia del suelo*. Mar del Plata, Argentina.
- IGLESIAS, M.C. y Gonzales Leguizamón, R. (1988). «Adaptación del método de "litter bags" para determinar la constante de degradación de la celulosa en laboratorio». *9ª Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas*. Corrientes: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.
- KRSEK, M. y Wellington, E.M. (2006). «Studies of microbial community structure and function below ground in a managed upland grassland site at Sourhope». *Research Station Applied Soil Ecology*, 33(2), 127-136.
- LANDABURU, A.C. (1982). «Descomposición de celulosa en un pastizal natural de la depresión del Salado». *Revista de la Facultad de Agronomía*, 3(1), 51-55.
- MADIGAN, M.T., Martinko, J.M., Bender, K., Buckley, D. y Sthal, D. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (14ª ed.) Madrid: Pearson Educación.

- METCALFE, A.C., Krsek, M.G., Gooday, W., Prosser, J.I. y Wellington, E.M.H. (2002). «Molecular analysis of a bacterial chitinolytic community in an upland pasture» *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5042-5050.
- PRAUSE, J., Lifschitz, A., Dalurzo, H.C. y Agudo, D.E. (2002). «Leaf litterfall and decomposition in a forest of the Chaco argentino». *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 33, 19-20, 3653-3661.
- QUANT BERMÚDEZ, J.F. y Bakos, B. (1984). «Empleo de microdiscos de papel de filtro para la evaluación de la celulólisis en placa de tierra granulada». *Publicación Técnica*, 1. Resistencia, Chaco: Instituto Agrotécnico, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.
- QUANT BERMÚDEZ, J.F., Bakos, B. y López, N.F. (1984). «La capacidad celulolítica en placas de tierra granulada de suelos dedicados a la agricultura del nordeste de la Provincia de Santa Fe y su relación con otras características de los mismos». *Publicación Técnica*, 2. Resistencia, Chaco: Instituto Agrotécnico, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.
- QUANT BERMÚDEZ, J.F. (1969). «Descomposición de celulosa en placa de tierra moldeada» [Actas]. *5ª Reunión Argentina de la Ciencia del Suelo*, 180-183.
- RAMÍREZ, P. y Cocha, J.M. (2003). «Enzymatic degradation of cellulose for thermophilic actinomycete: isolation, characterization and cellulolytic activity determination». *Revista Peruana de Biología*, 10(1), 67-77.
- SCHAEFER, R. (1971). *Estudios sobre actividad de poblaciones microbianas en suelos chilenos. Proyecto de Estudios y Reconocimiento de suelos chilenos*. Santiago, Chile: ONU-Minagri.
- VAN WESEMAEL, B. (1993). «Litter decomposition and nutrient distribution in humus profiles in some mediterranean forests in southern Tuscany». *Forest Ecology and Management*, 57, 99-114.
- WINOGRADSKY, S. (1949). *Microbiologie du sol. Problemes et methodes. Cinquante ans recherches*. Boulevard Saint-Germain, París: Masson Et Cie Editeurs.