

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 4. Determinación de las proteínas del suelo reactivas a Bradford - BRSP (glomalina)

Germán L. Pérez, Andrea A. Sirio,
Cristina E. Sotelo y Sebastián Carnicer

La glomalina es una glicoproteína relacionada a los hongos micorrízicos (endomycorrizas). Los hongos micorrízicos arbusculares son microorganismos que se asocian simbióticamente a la mayoría de las plantas y se detectan a nivel de raíz. Esta relación beneficia a la planta en aspectos relacionados a la nutrición e hidratación, entre otros, y se da gracias al aumento de la superficie explorada por medio de las hifas de las micorrizas. Existen dos tipos de micorrizas: las ectomicorrizas, que se encuentran en la superficie radical, y las endomicorrizas, que se extienden en el micelio dentro del tejido radical. Esta infección es sensible a las condiciones edáficas y puede evaluarse para establecer relaciones de fertilidad y estado nutricional de la planta, como así también utilizarse como indicador ambiental. La medición de este parámetro (glomalina) puede realizarse por diferentes métodos: por el método de Bradford y por el Elisa (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), entre otros. Este parámetro es útil como indicador de manejo de suelos, ya que tiene un importante papel en su agregación y como almacén de carbono.

Las micorrizas vesículo arbusculares son microorganismos biotrofos obligados y pertenecen al *Phylum Glomeromycota*, estas especies de hongos se encuentran ampliamente distribuidas en el ecosistema terrestre y forman una relación simbiótica con más del 80% de las especies vegetales (Shüßler y Walker, 2001; He *et al.*, 2020). En esta relación, la planta otorga a las micorrizas los polisacáridos necesarios para su desarrollo y, como contraparte, estos hongos ayudan a la nutrición de las plantas al aumentar el volumen de suelo a explorar gracias a las hifas que generan (Borie y Rubio, 1999; Frioni, 2006; Grümberg *et al.*, 2010; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020).

Desde el punto de vista edáfico o de la salud del suelo, se encontró una relación positiva entre estos microorganismos, la estabilidad de los agregados y el contenido de carbono, debido a una glicoproteína que estos organismos producen y que tiene ciertos efectos benéficos sobre algunas de las propiedades edáficas (Wright y Anderson 2000; Purin y Klauberg Filho, 2008; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020).

Un ejemplo de estas glicoproteínas son las que Wright y Upadhyaya en 1996 denominaron glomalina, en referencia a su ocurrencia exclusiva en el orden glomales, que incluía las micorrizas arbusculares según la clasificación de *Glomeromycetes* en ese momento. Esta molécula de alta estabilidad, que está compuesta por proteínas y azúcares, tiene características recalcitrantes e hidrofóbicas. Las mismas son exudadas por las hifas de estos hongos que luego se depositan en la pared más externa de las mismas. En las raíces colonizadas y a medida que senescen, lo hacen sobre las partículas del suelo de la rizósfera. Al ser hidrofóbicas y tener características cementantes, ellas favorecen la estabilidad y el proceso de agregación del suelo y son parte del reservorio o *stock* de carbono (se acumula llegando a representar hasta el 5% del carbono total) y nitrógeno (Rillig *et al.*, 2003; González-Chávez, Gutiérrez-Castorena y Wright, 2004; Treseder y Turner, 2007; Huidobro y Pérez Brandán, 2011; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020).

Esta molécula se encuentra fuertemente adherida tanto en la superficie como en el interior de los micro y macroagregados, logrando una vida media de entre 7 y 42 años, siendo mayor a la vida media de otros productos metabólicos de origen microbiano del suelo (Nichols, 2003; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020).

Diversos estudios indican una relación entre estas glicoproteínas y distintas situaciones de uso o manejo del suelo, encontrando mayor concentración en los suelos en condiciones prístinas o de manejos sustentables, al compararlos con sistemas de manejo intensivo o poco conservacionista (Wright y Anderson, 2000; Purin y Klauberg Filho, 2010; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020).

Este método cuantifica la proteína del suelo relacionada con la glomalina y reacciona con el compuesto de Bradford. Esta puede extraerse del suelo o de las hifas de los hongos, obteniéndose dos fracciones según el procedimiento de extracción empleado. Para su evaluación, se divide a esta proteína en dos, la Glomalina Fácilmente Extraíble (GFE), que corresponde a un material recientemente producido y depositado en el suelo y de naturaleza muy lábil, y la Glomalina Total (GT), integrada por las proteínas fuertemente unidas a las partículas del suelo, producidas y excretadas en un período de tiempo mayor (González-Chávez,

Gutiérrez-Castorena y Wright, 2004; Lovelock *et al.*, 2004; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020)¹.

Dado que esta proteína puede no solo determinarse, sino también dividir el estudio para su interpretación (GFE y GT) y su sensibilidad a las distintas situaciones de manejo del suelo, es que la cuantificación de esta proteína es un parámetro importante a la hora de evaluaciones edáficas con fines ambientales (Pérez *et al.*, 2020; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020). Este capítulo está basado en metodologías propuestas por Wright y Upadhyaya (1996, 1998) y por Bradford (1976), con algunas modificaciones realizadas en el Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo de la Universidad Nacional del Nordeste.

4.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El ensayo de Bradford (1976) se fundamenta en la unión del colorante azul de Coomassie G-250 con las proteínas. La forma azul (más aniónica) del colorante, que se une a la proteína, tiene una absorbancia máxima a 590 nm. Por lo tanto, la cantidad de proteína puede ser estimada por medición de la cantidad de colorante en la forma iónica azul. Esto es usualmente alcanzado al medirse la absorbancia de la solución a 595 nm.

El colorante parece unirse más fuertemente a residuos de arginina y lisina, y en menor extensión a residuos de histidina y

1. Es menester tener presente que los términos utilizados para referirse a las distintas fracciones de glomalina deben considerarse con mucho cuidado debido a la coextracción de sustancias orgánicas que interfieren en el método de Bradford y tienen potenciales reacciones cruzadas en inmunoensayos. Por esta razón, Purin y Klauberg (2008), adaptando lo expuesto por Rilling (2004), proponen denominar las extracciones de la siguiente manera: BRSP (Proteína Total Reactiva por el Método de Bradford) en reemplazo de «glomalina total» y EE-BRSP (Proteína Reactiva Fácilmente Extraíble por el Método de Bradford) en reemplazo de «glomalina fácilmente extraíble». Esto es debido a que el método de Bradford no es específico para una única proteína. Asimismo, en el caso de determinaciones de anticuerpos, IRSP (Fracción de BRSP Reactiva al Anticuerpo Monoclonal MAb 31b11) es reemplazo de «IRTG» (Glomalina Total Inmunoreactiva) y EE-IRSP (Fracción de EE-BRSP Reactiva al Anticuerpo Monoclonal MAb 31b11) en reemplazo de «IREEG» (Glomalina Fácilmente Extraíble Inmunoreactiva). Esto es debido a que hay posibilidad de reactividad cruzada con el anticuerpo. En este capítulo se denominará solo «glomalina», pero se debe tener presente que en la determinación hay otras proteínas del suelo relacionadas.

aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina). Esta especificidad puede llevar a variaciones en la respuesta del ensayo a diferentes proteínas, siendo este su principal inconveniente.

En general, la proteína usada para construir la curva patrón debe ser la misma que la que está siendo determinada. Frecuentemente esto no es posible y la respuesta del colorante con la muestra es relativamente cuantificada como una proteína genérica. La albúmina bovina sérica es comúnmente usada como proteína estándar, porque es económica y se consigue fácilmente en su forma pura. El argumento más fuerte para el uso de esta proteína es que permite que el resultado sea comparado directamente con aquellos estudios previos que también han usado esta proteína.

El complejo proteína-colorante debe reaccionar por un determinado tiempo para que se desarrolle por completo el color. La velocidad de formación de este complejo es dependiente de la temperatura, y en la medida que la temperatura del reactivo aumenta, también aumenta la absorbancia de la mezcla ensayada. Por lo tanto, es importante que el reactivo de Bradford se encuentre a temperatura ambiente al inicio del ensayo. Sin embargo, con el tiempo se forman agregados de proteína-colorante que se vuelven precipitados visibles y que interfieren con la precisión de la medida espectrofotométrica del complejo proteína-colorante. Esto usualmente no es un problema en la primera hora luego de la adición del reactivo de Bradford, pero si un precipitado visible se ha formado antes de la medición, el ensayo debe ser repetido y la absorbancia medida antes que suceda esto nuevamente (Walker, 2009).

4.2. OBJETIVOS DE LA DETERMINACIÓN

La importancia de determinar el contenido de glomalina es que la misma está altamente relacionada con la estabilidad de los agregados, funciona como un pegamento de las partículas del suelo al mejorar la estructura e influir en la aptitud frente a la erosión y pérdida de agua.

Por otra parte, la glomalina es un reservorio de carbono del suelo, siendo esto importante a nivel ambiental. Una de sus fracciones es muy sensible a los cambios en el manejo de los agroecosistemas, lo que le confiere aptitudes como indicador biológico.

Actualmente, hay interés por correlacionar los niveles de glomalina en el suelo con otros parámetros físico-químicos y biológicos, existiendo aún pocos estudios al respecto.

La cuantificación de proteína es una técnica rápida, objetiva, barata y relativamente fácil de realizar.

4.3. EQUIPAMIENTO Y MATERIALES

Los siguientes reactivos, materiales y equipos son necesarios para cada etapa de la determinación de la Glomalina Fácilmente Extraíble (GFE) y Glomalina Total (GT):

4.3.1. Confección y la curva patrón

Para la confección de la curva patrón, son necesarios los siguientes reactivos, materiales y equipos:

- *Reactivos:* albúmina bovina, reactivo de Bradford y agua destilada y/o desionizada.
- *Materiales:* matraz aforado (50 ml), tubos de ensayo (7 o más), vasos de precipitados (4) y tips (0,1, 1 y 5 ml).
- *Equipos:* micropipetas automáticas (0,1, 1 y 5 ml), espectrofotómetro y cubetas de vidrio o cuarzo.

4.3.2. Extracción de Glomalina Fácilmente Extraíble (GFE) y Glomalina Total (GT)

Se requieren los siguientes materiales y equipos:

- *Materiales:* tamiz (2 mm), tubos tipo Falcon (15 ml), tubos tipo Falcon (50 ml), probeta graduada (10 ml), tubos Eppendorf (1,5 ml), papel aluminio y cesto metálico para tubos.
- *Equipos:* balanza analítica de precisión, autoclave, centrífuga (3500 rpm), micropipetas automáticas (5 y 10 ml), espectrofotómetro y cubetas de vidrio o cuarzo.

4.3.3. Lectura de las muestras

Se requieren los siguientes reactivos, materiales y equipos:

- *Reactivos:* reactivo de Bradford y agua destilada y/o desionizada.
- *Materiales:* tubos de ensayo (7 o más), vasos de precipitados (4) y tips (0,1, 1 y 5 ml).
- *Equipos:* micropipetas automáticas (0,1, 1 y 5 ml), espectrofotómetro y cubetas de vidrio o cuarzo.

4.3.4. Recomendaciones preanalíticas

Las recomendaciones son las siguientes:

- a. **Condiciones ambientales del lugar de trabajo y medidas de seguridad del personal de laboratorio.** El trabajo de laboratorio debe realizarse con adecuada luz y ventilación.

Se debe usar guardapolvo, guantes, barbijo y gafas protectoras.

b. Acondicionamiento del material de laboratorio. Lavado de todo el material con agua corriente 3 veces y 1 vez con destilada.

c. Preparación de las muestras de suelo para el análisis. Se deben seguir los siguientes pasos:

c.1. Una vez la muestra de suelo llega al laboratorio, se seca al aire colocándola en una bandeja plástica sobre la mesada con ambiente ventilado, luego es molida con mortero y pilón de porcelana, y tamizada por malla de 2 mm (tamiz N° 10).

c.2. Las muestras de suelo, una vez acondicionadas, se colocan en recipientes limpios de plástico o bolsas resistentes. Si no se analizarán en el corto tiempo, se recomienda guardarlas refrigeradas a 4 °C.

4.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A continuación, se detallarán las soluciones necesarias y los pasos para alcanzar la concentración y características requeridas.

Sodio citrato 20 mM (para preparar una solución de 1000 ml, Figura N° 1) ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) o ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$):

1. Calcular la cantidad necesaria de sodio citrato según se encuentre o no hidratado (1 mM de sodio citrato anhidro son 258,06 mg; en el caso de sodio citrato 2-hidrato, serían 294,06 mg) para preparar una solución de 20 mM.
2. Disolver, una vez pesado, un poco en un vaso de precipitado, se lleva con ayuda de un embudo y se trasvasa a un matraz.
3. Llevar a volumen con agua destilada (matraz de 1000 ml).
4. Verificar que la solución tenga pH 7,00 (corregir con un ácido o base según corresponda).

Sodio citrato 50 mM (para preparar una solución de 1000 ml) ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) o ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$):

1. Calcular la cantidad necesaria de sodio citrato según se encuentre o no hidratado (1 mM de sodio citrato anhidro son 258,06 mg; en el caso de sodio citrato 2-hidrato, serían 294,06 mg) para preparar una solución de 50 mM.

2. Disolver, una vez pesado, un poco en un vaso de precipitado, se lleva con ayuda de un embudo y se trasvasa a un matraz.
3. Llevar a volumen con agua destilada (matraz de 1000 ml).
4. Verificar que la solución tenga pH 7,00 (corregir con un ácido o base según corresponda).

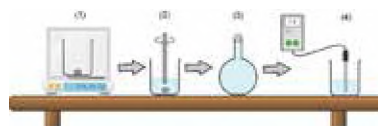


Figura N° 1. Preparación de las soluciones de sodio citrato.

Tabla N° 1. Composición del reactivo de Bradford

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Agua desionizada	hasta 1000 ml
Azul de Coomassie G-250	100 mg
Ácido fosfórico 85%	100 ml
Etanol 95%	50 ml

Para su preparación, realizar los siguientes pasos:

1. Disolver en un matraz el azul de Coomassie con el etanol.
2. Agregar el ácido fosfórico con cuidado (reacción exotérmica).
3. Llevar a volumen en un matraz de 1 litro con agua desionizada.
4. Enrasar, esperando, en caso de que sea necesario, la desaparición de la espuma que suele generar al agregar agua.

El reactivo se debe filtrar con papel de filtro Whatman N° 1 y luego almacenarlo en una botella color caramelo en la heladera. Es estable por varias semanas. Antes de usar, sacarlo a temperatura ambiente. Durante el período que el colorante esté guardado, puede precipitar, por lo que debe filtrarse antes de usar.

Solución stock de albúmina. Se pesan 50 mg de albúmina bovina (esta se conserva en heladera a 4 °C), se lleva a un matraz aforado de 50 ml y se enrasa con agua destilada.

- Agregar el agua por las paredes del matraz, evitando la formación de espuma, ya que luego esta tarda en desaparecer.
- Anotar la fecha de preparación de los reactivos.
- Guardar en la heladera.

4.5. PROCEDIMIENTO

A continuación, se detallarán los pasos a seguir para la extracción y determinación de la BRSP.

4.5.1. Confección de la curva patrón y lectura de muestras

Para comenzar, realizaremos un curva patrón a la que referir los valores obtenidos de las muestras:

1. Tomar con la pipeta volúmenes por triplicado de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μl de una solución madre de albúmina de 1 mg/ml de concentración en tubos de ensayo (la absorbancia de una solución de albúmina bovina de concentración 1 mg/ml es de aproximadamente 0,60, ver Tabla N° 2) para la curva de calibración.
2. Llevar a un volumen final de 100 μl con agua destilada.
3. Pipetear en un tubo 100 μl de agua destilada como blanco.
4. Agregar 5 ml de reactivo de Bradford a cada tubo, mezclar bien por inversión o suavemente vorterearlo. Evitar la formación de espuma, que lleva a una baja reproducibilidad.
5. Medir la absorbancia a 595 nm, luego de los 5 minutos de agregado el reactivo y antes de los 60 minutos.

Tabla N° 2. Proporciones de los reactivos para realizar la curva patrón y la concentración de la proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en cada dilución

	Blanco	P1	P2	P3	P4	P5	P6
H ₂ O destilada (μl)	100	90	80	60	40	20	--
Patrón (μl)	--	10	20	40	60	80	100
Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0	10	20	40	60	80	100
Reactivo de Bradford	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

La curva de calibración no es lineal, y las absorbancias precisas varían dependiendo del tiempo del reactivo de Bradford (desde su preparación). Consecuentemente, es esencial construir una curva de calibración para cada ensayo.

En la Figura N° 2 vemos un ejemplo con el R² y la ecuación de la recta.

1. Usar cubetas plásticas (descartables) o de vidrio, que deben estar limpias y libres de detergente. No deberían usarse cubetas de cuarzo, ya que el reactivo de Bradford se une a este material e interfiere en el ensayo. Trazas de colorante que se encuentren en vidrio o plástico pueden removerse con lavados con metanol o soluciones de detergente.
2. Lavar la cubeta con etanol entre las tandas de lecturas (se va coloreando con el reactivo).
3. Usar siempre el mismo reactivo de Bradford para las determinaciones de las muestras y la curva patrón; si se termina y se prepara otra solución, se debe volver a determinar la curva patrón.
4. Colocar papel de diario en la mesada donde se trabaja porque el reactivo de Bradford mancha al realizar las lecturas en el espectrofotómetro.

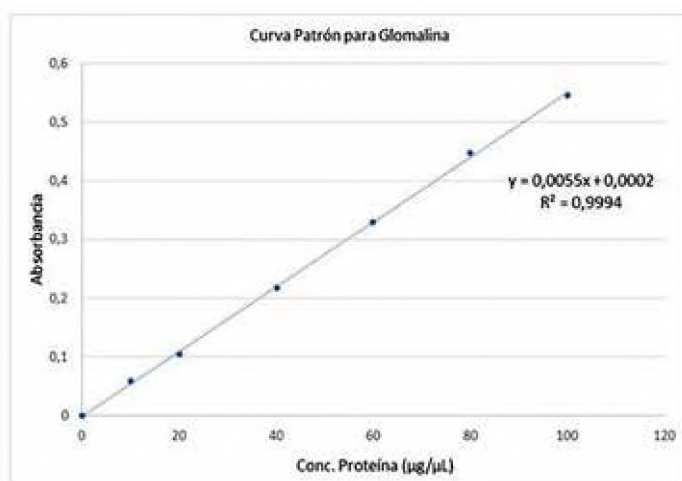


Figura N° 2. Ejemplo de curva patrón relacionando concentraciones de proteína y absorbancia.

4.5.2. Procedimiento de extracción y medición de glomalina

Para la extracción de glomalina, se procede según el siguiente esquema:

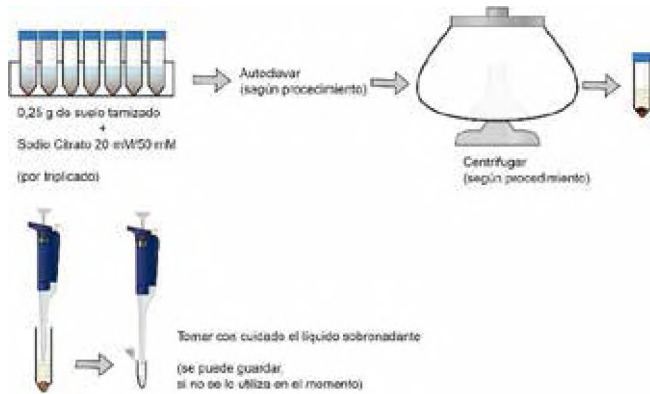


Figura N° 3. Esquema para la extracción de glomalina.

En la determinación de glomalina se realiza el procedimiento descrito a continuación:

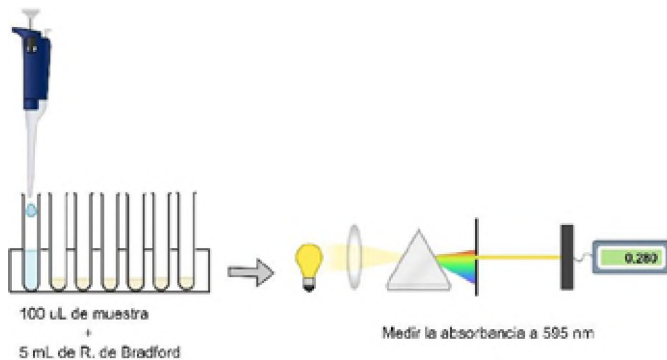


Figura N° 4. Esquema para la determinación de glomalina.

4.5.3. Extracción y determinación GFE

Una vez secadas las muestras de suelo al aire, los pasos son:

1. Pesar 0,25 g de suelo en un tubo plástico de 15 ml, por triplicado por muestra.
2. Agregar 2 ml de citrato de sodio 20 mM (con el pH verificado) a cada tubo.
3. Agregar un tubo como blanco, sin suelo, solo con citrato de sodio.
4. Cubrir con papel aluminio cada tubo o con la tapa floja.

5. Autoclavar 30 minutos a 121 °C y 1 atm.
6. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente. La solución obtenida tendrá una coloración marrón, cuya intensidad estará relacionada a la cuantificación.
7. Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos. La centrifugación es solo para formar un pellet de suelo y puede hacerse entre 3000-10000 xg.
8. Sacar el sobrenadante y colocarlo en un Eppendorf de 1,5 ml (se puede guardar a 4°C hasta una semana).
9. Pipetear en un tubo de ensayo 100 µl de la muestra problema.
10. Agregar 5 ml de reactivo de Bradford a cada tubo, mezclar bien por inversión o suavemente vorterearlo. Evitar la formación de espuma.
11. Medir la absorbancia a 595 nm, luego de los 5 minutos de agregado el reactivo y antes de los 60 minutos.



Figura N° 5. Tubos Falcon con suelo y citrato de sodio luego de un ciclo de autoclavado.

4.5.4. Extracción y determinación GT

A partir de las muestras de suelo secas al aire, se procede de la siguiente manera:

1. Pesar 0,25 g de suelo en un tubo plástico de 15 ml, por triplicado por muestra.
2. Agregar 2 ml de citrato de sodio 50 mM (con el pH verificado) a cada tubo.
3. Agregar un tubo como blanco, sin suelo, solo con citrato de sodio.
4. Cubrir con papel aluminio cada tubo o con la tapa floja.
5. Autoclavar 60 minutos a 121 °C y 1 atm.
6. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos.
8. Medir el volumen del líquido sobrenadante en una probeta graduada de 10 ml.
9. Guardar a 4 °C (en heladera) en tubos Falcon de 50 ml.
10. Volver a colocar 2 ml de citrato de sodio 50 mM en el tubo con suelo anteriormente autoclavado.
11. Repetir los puntos del 6 al 10 hasta que el extracto quede transparente, de manera que se pueda observar fácilmente a través de él. Los extractos de una muestra se van recolectando en el mismo tubo Falcon de 50 ml.
12. Pipetear en un tubo de ensayo 100 µl de la muestra problema.
13. Agregar 5 ml de reactivo de Bradford a cada tubo, mezclar bien por inversión o suavemente vorterearlo. Evitar la formación de espuma.

14. Medir la absorbancia a 595 nm, luego de los 5 minutos de agregado el reactivo y antes de los 60 minutos.

4.6. CÁLCULOS

Para realizar los cálculos, pasar los valores de las lecturas de la curva a Excel siendo: el eje «y» correspondiente a las lecturas de absorbancia a 595 nm y el eje x, la concentración de albúmina en μg (ver Figura N° 2). Luego, hacer el gráfico de dispersión y agregar línea de tendencia, presentar ecuación del gráfico y el valor de R^2 (que deberá ser 0,99 o superior).

De la ecuación $a+bx$ se despeja «x» y queda: $x = \frac{y-a}{b}$

Esos valores obtenidos de concentración (μg) corresponden a 100 μL de extracto, calcular para los ml totales de extracto:

$$Proteína \frac{\mu g}{\mu L} = \frac{Abs_{595nm} - a}{b}$$

Donde: y es la lectura de la absorbancia, a es la ordenada al origen y b es la pendiente.

$$Proteína \left(\frac{\mu g}{\mu g_{suelo}} \right) = \left(\frac{Proteína \left(\frac{\mu g}{\mu L} \right) * Ve}{Vp + 250000} \right) * 4$$

Donde: Ve es el volumen (μL) de solución de extracción y Vp, el volumen (μL) de solución problema.

Finalmente, convertir la unidad para expresarlo en $mg.g^{-1}$ de suelo.

En resumen. Esta determinación es una herramienta que puede ayudar a poner en evidencia los efectos de disturbios ambientales en la vida del suelo asociada a la actividad de hongos micorrízicos arbusculares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORIE, F. y Rubio, R. (1999). «Effects of arbuscular-mycorrhizae and liming on growth and mineral acquisition of Aluminum -tolerant and Aluminum-sensitive barley cultivars». *Journal of Plant Nutrition*, 22, 121-137.
- BRADFORD, M.M. (1976). «A rapid and sensitive Method for the Quantization of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding». *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- DA SILVA SOUSA, C., Menezes, R., Simões, C., Valadares de Sá Barretto Sampaio, E. y De Sousa Lima, F. (2012). «Glomalina: características, produção, limitações e contribuição nos solos». *Semina: Ciências Agrárias*, 33(1), 3033-3044. [Consulta 2 de junio de 2021]. Disponible en <https://bit.ly/3L4y9cP>
- FRIONI, L. (2006). *Microbiología. Básica, ambiental y agrícola*. Uruguay: Ediciones Universidad de la República Montevideo.
- GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.C.A., Gutiérrez-Castorena, M.C. y Wright, S. (2004). «Hongos micorrízicos arbusculares en la agregación del suelo y su estabilidad». *Terra Latinoamericana*, 22(4), 507-514.
- GRÜMBERG, B., Conforto, C., Rovea, A., Boxler, M., March, G., Luna, C., Meriles, J. y Vargas Gil, S. (2010). «La glomalina y su relación con la productividad del cultivo de maíz». *Información Agronómica*, 47. Disponible en <https://bit.ly/3qpsjLa>
- HE, J.D., Chi, G.G., Zou, Y.N., Shu, B., Wu, Q.S., Srivastava, A.K., y Kuča, K. (2020). «Contribution of glomalin- related soil proteins to soil organic carbon in trifoliolate orange». *Applied Soil Ecology*, 154, 103592. Doi:10.1016/j.apsoil.2020.103592
- HUIDOBRO, J. y Brandán, C.P. (2011, abril 18-20). «Niveles de glomalina y estabilidad de agregados del suelo, en distintos sistemas de manejo de tabaco en el Valle de Lerma, Salta» [Actas]. *Congreso Nacional de Ecología y Biología de Suelos*. Mar del Plata, Buenos Aires.
- LOVELOCK, C.E., Wright, S.F. y Nichols, K.A. (2004). «Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil». *Soil Biology and Biochemistry*, 36(6), 1009-1012.
- NICHOLS, K. (2003). *Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi*. PhD dissertation. College Park, MD: University of Maryland.
- PÉREZ, G.L., Sotelo, C.E., Sirio, A.A., Carnicer, S., Mansilla, N.P., Fernández, C., López, Castelán, M.E. (2020). «Análisis comparativo de suelos cultivados y de monte de la provincia del Chaco, Argentina». *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 40(2), 91-101.
- PURIN, S. y Klauberger Filho, O. (2010). «Glomalina: nova abordagem para entendermos a biologia dos fungos micorrizicos arbusculares».

- En Siqueira, J.O., Souza, F.A., Cardoso, E.J.B.N. y Tsai, S.M. (eds.) *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil* (pp. 503-524). Brasil: Lavras, Ufla.
- RILLIG, M.C. (2004). «Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation». *Canadian Journal Soil Science*, 84, 355-363.
- RILLIG, M.C., Wright, S.F., Nichols, K.A., Schmidt, W.F. y Torn, M.S. (2001). «Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils». *Plant Soil*, 233, 167-177.
- RILLIG, M.C., Ramsey, P.W., Morris S. y Paul E.A. (2003). «Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change». *Plant Soil*, 253, 293-299.
- RODRÍGUEZ-YON, Y., Chiriboga-Morocho, R., Concha-Egas, T.G. y De León-Lima, D.P. (2020). «Caracterización de las fracciones de glomalina en suelos Ferralíticos Rojos con diferente uso». *Cultivos Tropicales*, 41(4), e04. E-pub 01 de diciembre de 2020. Recuperado en 10 de junio de 2021. Disponible en <https://bit.ly/3Jzad15>
- SHÜSSLER, A. y Walker, Ch. (2010). *The Glomeromycota: species list with new families and new genera*. Disponible en <https://bit.ly/3L4lNBv> Último acceso 10 de junio de 2021.
- TRESEDER, K.K. y Turner, K.M. (2007). «Glomalin in Ecosystems». *Soil Science Society of American Journal*, 71, 1257-1266. Disponible en <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0377>
- WALKER, J.M. (2009). *The Protein Protocols Handbook*. Cap. 4 The Bradford Method for Protein Quantitation (3a ed.) EE.UU.: Ed. Springer. Disponible en <https://bit.ly/3N88odA>
- WRIGHT, S.F. y Upadhyaya, A. (1996). «Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi». *Soil Science*, 161, 575-586.
- WRIGHT, S.F. y Upadhyaya, A. (1998). «A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi». *Plant Soil*, 198, 97-107.
- WRIGHT, S.F. y Anderson, R.L. (2000). «Aggregat estabily and glomalin in alternative croprotations for the central Great Plains». *Biology and Fertility of Soils*, 31, 249-253. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s003740050653>