

# La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg

B. Nogales

Área de Microbiología, Dept. Biología, Universidad de las Islas Baleares, Crtra. Valldemossa km 7,5. 07122 Palma de Mallorca. España

La aplicación de técnicas de biología molecular al estudio de la microbiología del suelo ha representado un gran avance en el conocimiento de estos ecosistemas. El reconocimiento de la presencia de una gran diversidad de microorganismos en suelos, que resultaban totalmente desconocidos porque no se habían obtenido en cultivos de laboratorio, es sólo el comienzo de una nueva era en la microbiología molecular de suelos. El gran reto actual es determinar el papel funcional de los diferentes microorganismos que constituyen las comunidades edáficas. La integración de técnicas de estudio de la microbiología más tradicional, junto con metodologías moleculares, incluyendo los avances que suponen las técnicas de genómica y metagenómica sin duda contribuirá a un mejor conocimiento del funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo.

The application of molecular biology techniques to studying soil microbiology has greatly improved our knowledge on soil ecosystems. The beginning of this new era of soil molecular microbiology was the discovery of the enormous microbial diversity present in soil with novel microbes, totally unknown previously since they were not cultured in the laboratory. The current challenge of soil microbiology is to determine the functional role of the different microorganisms integrating soil communities. The use of traditional microbiology methods together with molecular biology, including the most advanced techniques of genomics and metagenomics will certainly contribute to widen our current knowledge on the function of microbial communities in soil.

## El suelo como hábitat para los microorganismos

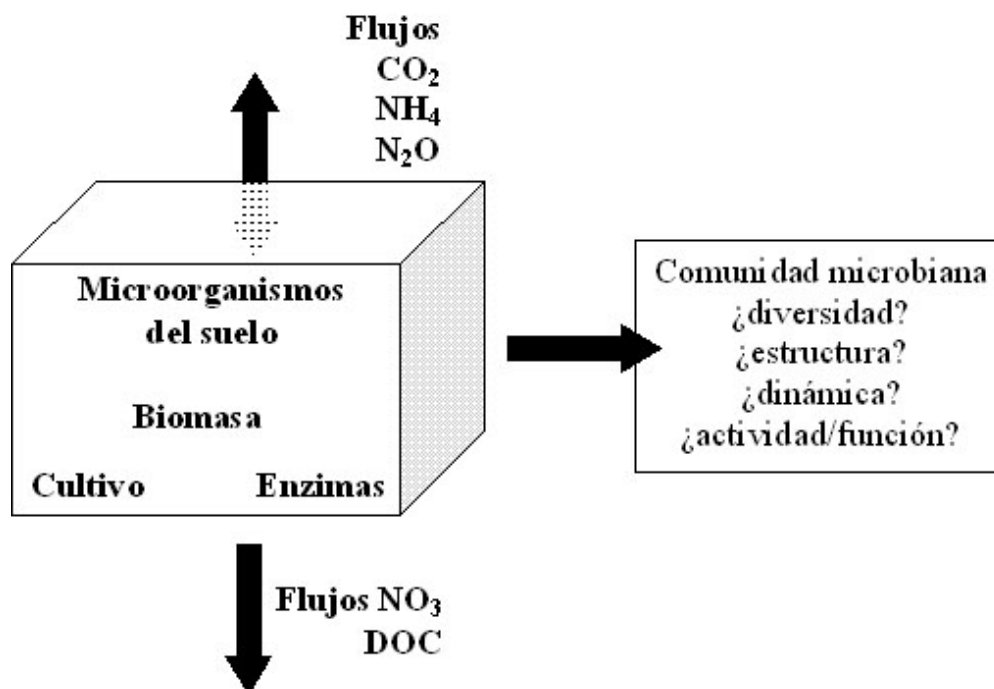
Llamamos suelo a la parte más externa de la corteza terrestre, resultante de la meteorización de las rocas subyacentes y con unas características claramente diferenciadas de las mismas. Podemos considerar el suelo como un sistema de interacción entre tres fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida, y una fase gaseosa o atmósfera del suelo. El tipo y composición de la materia mineral viene dado por las características de las rocas del subsuelo, así como de los procesos edáficos que hayan tenido lugar en su formación. La porción inorgánica es muy importante por su influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación, retención de agua, etc. La materia orgánica procede de la actividad de los distintos organismos vivos del suelo y su composición y cantidad es variable, principalmente en función del tipo de cubierta vegetal. El resto del volumen del suelo está prácticamente constituido por espacios porosos, que a su vez están ocupados por agua y los gases que constituyen la atmósfera edáfica. La porosidad (cantidad y tamaño de los poros) depende de la textura, determinada por la cantidad de arena, limo y arcilla, la estructura y el contenido en materia orgánica. Todos estos factores determinan a su vez el movimiento y capacidad de retención de agua del suelo y la composición gaseosa de su atmósfera. De forma característica la atmósfera del suelo se encuentra enriquecida en dióxido de carbono y empobrecida en oxígeno, como resultado de la respiración aeróbica de raíces de plantas, animales y microorganismos. Sin embargo, cuando se producen condiciones de anaerobiosis (p.e. por acumulación de agua en los poros del suelo) aparecen en la atmósfera del suelo otros gases como óxido nitroso, nitrógeno gaseoso y metano, resultantes de actividad respiratoria anaeróbica bacteriana. Tanto el contenido en agua como la composición de la atmósfera del suelo son factores que fluctúan ampliamente.

Este sistema complejo que constituye el suelo, característicamente heterogéneo espacial y temporalmente, alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas. El suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas). También encontramos virus y bacteriófagos. Todos estos organismos establecen relaciones entre ellos en formas muy variadas y complejas y

también contribuyen a las características propias del suelo por su papel en la modificación de las fases sólida, líquida y gaseosa antes mencionadas. Los microorganismos desempeñan funciones de gran importancia en relación con procesos de edafogénesis; ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, el nitrógeno, oxígeno, el azufre, el fósforo, el hierro y otros metales; fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos, etc.

Los organismos del suelo no se distribuyen al azar sino que siguen patrones espaciales de agregación, a escalas diferentes (desde nm a km) que se superponen. Esta estructuración obedece al efecto causado por diferentes factores de control y es totalmente dinámica (Ettema, *et al.*, 2002). Utilizando técnicas de observación de secciones ultrafinas de suelo mediante microscopía electrónica, tomografía, análisis geoestadístico y la elaboración de modelos, especialmente basados en fractales, se ha demostrado que la distribución de las bacterias edáficas está altamente estructurada, y que esta estructuración es importante para la funcionalidad del suelo. Las bacterias se organizan en microcolonias compuestas de pocas células que pueden pertenecer a diferentes morfotipos (Nunan, *et al.*, 2003). Factores como la presencia de raíces, pequeños agregados, nutrientes y poros parecen gobernar la distribución de bacterias en microhábitats.

La complejidad del suelo como ecosistema (nivel microscópico incluido) junto con las especiales particularidades de los microorganismos, tales como su tamaño microscópico y las dificultades para una diferenciación basada en su morfología, habían proporcionado una visión del mundo microbiano edáfico como una "caja negra" de la cual se sabía que cumplía una función aunque no se conociese su contenido (Insam, 2001). Como muestra la **Figura 1** se habían realizado análisis de biomasa microbiana empleando diferentes metodologías, así como determinación de enzimas, lo cual constituye una aproximación a la actividad y abundancia microbiana, y a los flujos de intercambio con la atmósfera y el subsuelo de compuestos importantes que permitían el análisis de procesos como respiración, desnitrificación, nitrificación, fijación de nitrógeno, etc. Pero el conocimiento de los microorganismos del suelo quedaba limitado a aquellos pocos que podían obtenerse en cultivos de laboratorio. Sin embargo había, y aún sigue habiendo, importantes preguntas que resolver en cuanto a la composición y estructura de las comunidades microbianas edáficas, los cambios que se producen en dichas comunidades en respuesta a diferentes factores ambientales y/o perturbaciones y finalmente, el papel funcional de los diferentes tipos de microorganismos que integran la comunidad.



**Figura 1.** El suelo como una "caja negra" y los principales interrogantes a los que se enfrenta el microbiólogo de suelos (adaptada de Insam, 2001).

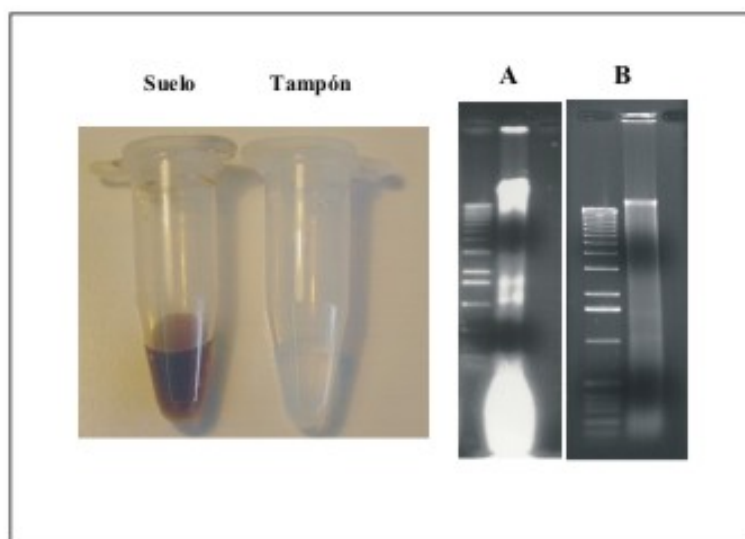
## La utilización de biomarcadores moleculares en el estudio de la microbiología del suelo

Tradicionalmente nuestra visión acerca de la diversidad de los microorganismos edáficos estaba basada en la obtención de cultivos de laboratorio en medios especialmente formulados para ello. Bacterias gram positivas esporuladas (*Bacillus* y *Clostridium*) y actinomicetos (ej. *Streptomyces*) eran considerados procariotas típicos del suelo, junto con bacterias gram negativas heterótrofas tales como *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, etc (Liesack, *et al.*, 1997). Sin embargo la comparación de recuentos microscópicos directos de células con los obtenidos en placas de cultivo puso de manifiesto que al

menos el 99% de los procariotas presentes en el suelo eran incapaces de crecer en medios de cultivo (Roszak, *et al.*, 1987; Torsvik, *et al.*, 1990). Por lo tanto, la mayor parte de la diversidad procariota que integraba la "caja negra" del suelo quedaba fuera del alcance de los métodos de estudio tradicionales, por no mencionar los hongos y protozoos, mucho más difíciles de cultivar en laboratorio.

A partir de la década de los ochenta se produjo una revolución espectacular en el conocimiento de la diversidad microbiana en suelos debido a la incorporación de novedosas y potentes técnicas de estudio, que no requieren del cultivo previo de los microorganismos (Insam, 2001; Kirk, *et al.*, 2004). Estas técnicas se basan en el análisis de marcadores moleculares como ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA) y ácidos nucleicos (DNA y RNA). Ambos tipos de marcadores se encuentran presentes en todas las células, se pueden extraer directamente de muestras de suelo sin necesidad de realizar cultivos previos y además permiten diferenciar distintos grupos de microorganismos. Utilizando estos marcadores no sólo se puede determinar la composición de las comunidades microbianas sino que también se puede cuantificar la abundancia de microorganismos específicos.

La utilización de ácidos nucleicos aplicada al estudio de comunidades microbianas se ha impuesto rápidamente debido a la gran cantidad de información que proporciona y a la relativa facilidad metodológica que implican los análisis de estos compuestos, especialmente tras el gran desarrollo tecnológico que ha experimentado la biología molecular durante los últimos veinte años. La aplicación de técnicas moleculares al estudio de la microbiología del suelo se desarrolló con posterioridad a los análisis en muestras acuáticas debido a problemas metodológicos que se han ido resolviendo paulatinamente. Dos factores son importantes en la extracción de ácidos nucleicos de suelo: (1) la eficiencia de la extracción, que se realiza mediante procesos físicos, químicos y enzimáticos que aseguren la rotura de las resistentes estructuras celulares características de algunos microorganismos del suelo o de las esporas; y (2) la eliminación de sustancias contaminantes (por ejemplo, ácidos húmicos) que se extraen conjuntamente con los ácidos nucleicos y que interfieren en los análisis moleculares posteriores (O'Donnell, *et al.*, 1999). La **Figura 2** muestra un ejemplo típico de extracción de ácidos nucleicos de muestras de suelo. Muchas de estas dificultades técnicas se han resuelto satisfactoriamente y en la actualidad se dispone incluso de métodos comerciales de extracción de DNA de suelos, que resultan altamente eficaces en la mayoría de los casos aunque no existe un método universal para la extracción de ácidos nucleicos que sea aplicable a todos los tipos de suelos.



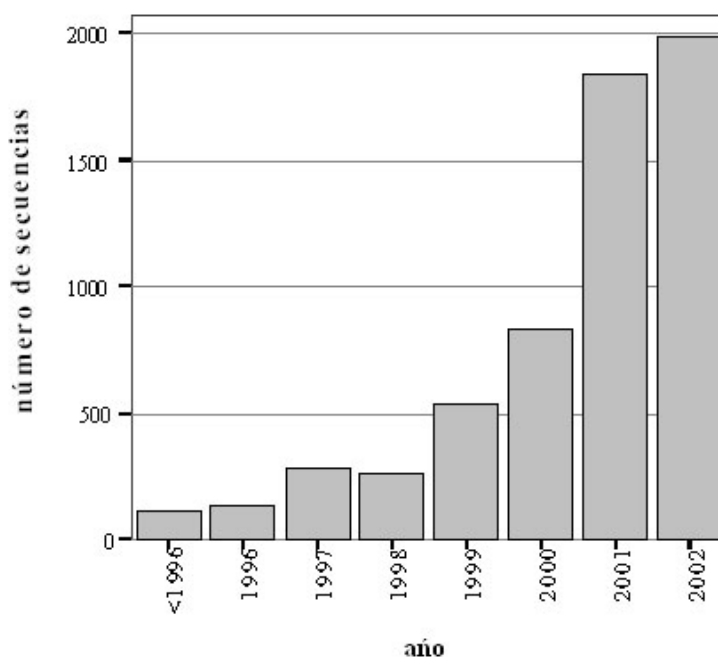
**Figura 2.** Ejemplo del aspecto que presenta un extracto de ácidos nucleicos de un suelo rico en materia orgánica. La coloración marrón del extracto se debe a la presencia de ácidos húmicos. La imagen de la derecha muestra el aspecto típico de un extracto de ácidos nucleicos con un elevado (A) o un bajo contenido en ácidos húmicos (B) en una electroforesis en gel de agarosa. La intensa mancha de color blanquecino en la parte inferior de la muestra de suelo A se debe a la presencia de ácidos húmicos.

## La importancia de la utilización del RNA ribosómico en los análisis de la composición de comunidades microbianas de suelos

Análisis pioneros de la complejidad microbiana en suelos, realizados por Torsvik y colaboradores (Torsvik, *et al.*, 1990) utilizando técnicas de reasociación de DNA, pusieron en evidencia la gran diversidad genética bacteriana presente. Así el número de genomas bacterianos diferentes estimados en una muestra de suelo forestal fue de unos 4.000, en claro contraste con la diversidad genética de las bacterias aisladas en cultivo a partir de la misma muestra (unas 200 veces menor). En otras muestras de suelo la diversidad genómica era incluso superior (8.000-10.000 genomas diferentes) (Torsvik, *et al.*, 1998).

La descripción de los microorganismos presentes en muestras de suelo experimentó un gran avance gracias a la utilización de la información que proporcionan los genes que codifican para RNA ribosómico, y en particular el gen que codifica para la subunidad menor del ribosoma bacteriano, 16S rRNA (y su equivalente en eucariotas, 18S rRNA). Este marcador molecular presenta una serie de ventajas: (1) está presente en todos los organismos y tiene la misma función en todos ellos; (2) debido a restricciones estructurales, diferentes regiones de la molécula presentan distinto grado de variabilidad en secuencia, lo que permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución; (3) su transmisión es principalmente vertical ya que se considera que no está sujeto a transferencia génica horizontal entre microorganismos; (4) la longitud de su secuencia tiene un tamaño adecuado como para proporcionar suficiente información, con un coste asumible, y (5) el análisis de la secuencia nos permite realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos.

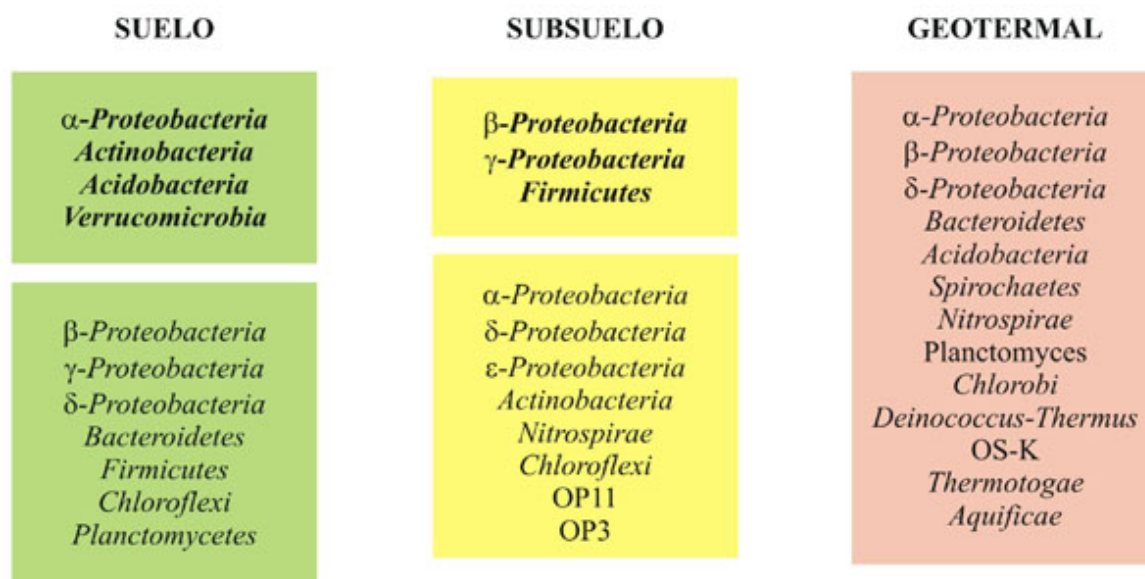
La utilización combinada de diferentes técnicas moleculares basadas en el 16S rRNA ha permitido un estudio en profundidad de la diversidad, estructura y dinámica de comunidades microbianas en general y del suelo en particular. Una forma muy gráfica para entender lo que ha significado el análisis de secuencias de 16S rRNA en el campo de la microbiología de suelos se puede observar en la **Figura 3**, en la que se representa el número de secuencias de genes para 16S rRNA obtenidas a partir de distintas muestras y depositadas en bases de datos públicas, según datos publicados por Rappé y colaboradores (Rappé, *et al.*, 2003). Desde el trabajo pionero de Liesack y Stackebrandt en 1992 con muestras de suelo de Australia (Liesack, *et al.*, 1992), el número de secuencias de 16S rRNA aumentó lentamente hasta el año 1996, cuando se inicia un crecimiento exponencial del número de secuencias en las bases de datos. La utilización de técnicas independientes de cultivo ha supuesto también una revolución en el estudio de comunidades de hongos en el suelo, especialmente importante en la detección de hongos patógenos y en el análisis de hongos que establecen asociaciones con plantas como por ejemplo las micorrizas (Kowalchuck, 1999).

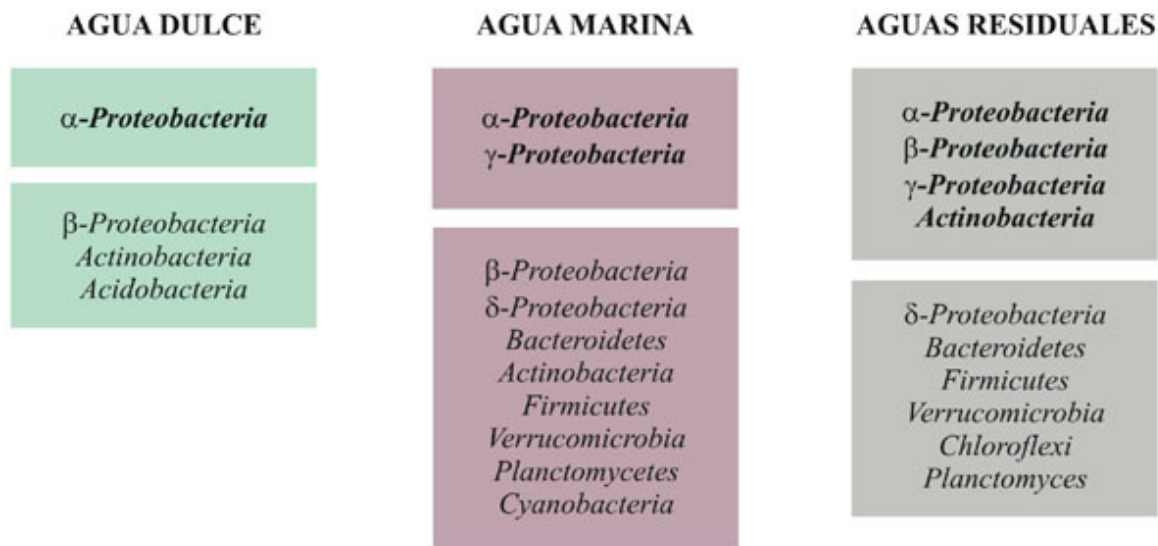


**Figura 3.** Número de secuencias de RNA ribosómico 16S correspondientes a análisis moleculares de suelos depositadas en las bases de datos genéticos en los últimos años (adaptada de Rappé y Giovanonni, 2003).

Los análisis moleculares basados en la utilización de genes ribosómicos mostraron la gran diversidad de microorganismos existente en el suelo. Así mismo, evidenciaron que algunos grupos microbianos se encontraban presentes de forma ubicua, tratándose en ocasiones de grupos descritos en otros ambientes pero cuya presencia en suelos ni tan siquiera se sospechaba (Liesack, *et al.*, 1992; Rheims, *et al.*, 1996). Entre los ejemplos de estos grupos podrían mencionarse los *Planctomycetes*, que se habían descrito previamente exclusivamente en ambientes acuáticos (Neef, *et al.*, 1998), o microorganismos del dominio *Archaea* (Ueda, *et al.*, 1995; Bintrim, *et al.*, 1997; Buckley, *et al.*, 1998), que tan sólo se habían descrito en ambientes extremos o nichos ecológicos particulares ej. termófilos, halófilos extremos, ambientes sulfurosos y metanógenos. Otra de las novedades que aportó la utilización de técnicas basadas en la secuenciación de 16S rRNA en el campo de la microbiología edáfica fue el descubrimiento de nuevos grupos bacterianos, desconocidos hasta el momento porque se carecía de cultivos, que sin embargo se han detectado en múltiples estudios de diversidad en suelos de todo el mundo. Esto hace suponer la importancia de estos nuevos grupos en la funcionalidad de la comunidad microbiana del suelo. El ejemplo más apasionante lo constituye la constatación de la importancia de un nuevo filum bacteriano, denominado *Acidobacteria* (Kuske, *et al.*, 1997; Ludwig, *et al.*, 1997), detectado en todos los suelos estudiados con técnicas moleculares. Desde el punto de vista filogenético se trata de un grupo extremadamente diverso, pero se dispone tan sólo de tres géneros (con una especie cada uno) en cultivo de laboratorio y caracterizados taxonómicamente. Las capacidades metabólicas de estas tres especies son muy diferentes con lo que es difícil inferir el posible papel de las bacterias del filum *Acidobacteria* en suelos.

Un trabajo publicado por Hugenholtz y colaboradores (Hugenholtz, *et al.*, 1998), en el que los autores analizaron la presencia de los diferentes grupos filogenéticos bacterianos en estudios realizados en diferentes ambientes, nos proporciona una idea de la imagen que nos ofrece la biología molecular sobre la diversidad bacteriana edáfica. Así, como se muestra en la **Figura 4** los grupos bacterianos que se encuentran más frecuentemente en muestras de suelo pertenecen a la subclase Alpha de la clase *Proteobacteria*; microorganismos gram-positivos de la clase *Actinobacteria*, y dos fila nuevos, *Acidobacteria* y *Verrucomicrobia*. Si comparamos los resultados que se obtienen en los análisis de suelos con lo que se obtienen de otros ambientes terrestres y acuáticos podemos ver claramente que ciertos grupos filogenéticos bacterianos tienden a predominar en determinados ambientes, e incluso podemos hablar de microorganismos o grupos filogenéticos característicos de un ambiente concreto.





**Figura 4.** Principales grupos filogenéticos bacterianos detectados en estudios moleculares de suelos y otros ambientes. Los grupos indicados en **negrita** estaban representados en más de un 75% de los estudios analizados, el resto de grupos estaban representados entre un 25 y un 75%. El número de secuencias procedentes de cada uno de los diferentes ambientes utilizado fue el siguiente: suelo, 743; subsuelo, 229; geotermal, 212; agua dulce, 107; agua marina, 687; aguas residuales, 430. (Datos obtenidos de Hugenholtz et al., 1998).

Tras una fase inicial de reconocimiento de la alta diversidad microbiana y la caracterización molecular de diversos suelos, el interés de la microbiología molecular en este campo se orientó hacia el análisis de cuestiones importantes para la biología del mismo. Así por ejemplo, se analizaron los cambios temporales y espaciales que se producen en las comunidades microbianas (Felske, et al., 1998; Lukow, et al., 2000; Smit, et al., 2001); y se demostró que la diversidad microbiana asociada a partículas del suelo aumenta al disminuir el tamaño de las mismas (Sessitsch, et al., 2001). También se puso en evidencia que la comunidad microbiana presente en la proximidad de raíces de plantas (rizosfera y rizoplano) presentaba una menor diversidad que muestras de suelo alejadas de las raíces y una composición enriquecida en bacterias gram negativas de la clase *Proteobacteria* (Marilley, et al., 1999a; Duineveld, et al., 2001), y que había una influencia del tipo de planta y del tipo de suelo en la composición de las comunidades de la rizosfera (Wieland, et al., 2001; Marschner, et al., 2004). Otro de los campos donde se ha estudiado intensamente la microbiología molecular edáfica es en suelos agrícolas. Se ha demostrado que las diferentes prácticas agrícolas, el tipo de plantas que se cultivan, la fertilización y los tratamientos con pesticidas y herbicidas tienen un efecto en la diversidad de las comunidades microbianas de suelos (El Fantroussi, et al., 1999; Buckley, et al., 2003; Girvan, et al., 2004; Sun, et al., 2004). También se han realizado numerosos estudios en suelos inundados, principalmente cultivados con arroz, los cuales han hecho un especial hincapié en el análisis de arqueas metanógenas (Fey, et al., 2000; Lueders, et al., 2000). El efecto del cultivo de plantas transgénicas en la diversidad microbiana ha sido también analizado, no habiéndose observado cambios significativos en la composición microbiana de la rizosfera de plantas transgénicas que puedan ser atribuidas al proceso de manipulación genética (Heuer, et al., 2002; Milling, et al., 2004; Sessitsch, et al., 2004).

El impacto de problemas medioambientales importantes en la diversidad de comunidades microbianas ha sido también objeto de estudio. En los últimos años algunos investigadores han prestado atención al efecto del incremento de la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> en las comunidades microbianas de suelos. Se ha observado que niveles elevados de este gas incrementan la producción vegetal, afectando a la cantidad y composición de los compuestos orgánicos que llegan al sistema. Sin embargo tan sólo se han detectado cambios menores en la diversidad microbiana de suelos sometidos a niveles elevados de CO<sub>2</sub> (Marilley, et al., 1999b; Ebersberger, et al., 2004). Así mismo, ha recibido una particular atención el estudio molecular de la microbiota de suelos contaminados con metales pesados (Sandaa, et al., 1999; Müller, et al., 2001) o con contaminantes orgánicos tales como hidrocarburos del petróleo (Juck, et al., 2000; Andreoni, et al., 2004) y bifenilos policlorinados (Nogales, et al., 1999; Nogales, et al., 2001), o de los cambios que se producen durante procesos de bioremedios (Ka, et al., 2001; Siciliano, et al., 2003). El análisis molecular de suelos ha sido incluso propuesto en investigación forense como evidencia para determinar la presencia de un sospechoso en la escena de un crimen (Horswell, et al., 2002).

## Análisis molecular de la función de los microorganismos en el suelo

A pesar de la importancia que han supuesto los análisis de la diversidad microbiana utilizando técnicas moleculares, estamos aún lejos de entender el papel de los microorganismos del suelo en el funcionamiento del ecosistema, en particular de aquéllos que no han sido cultivados en el laboratorio y para los que se desconocen totalmente sus capacidades metabólicas.

Tras unos años de relativo ostracismo de las técnicas de cultivo y en los que el potencial de las técnicas moleculares basadas en el análisis de 16S rRNA se había sobredimensionado, los microbiólogos han vuelto a reconocer la importancia de la obtención de cultivos de laboratorio para poder estudiar la fisiología de los microorganismos y determinar por lo tanto su posible papel en el funcionamiento de los ecosistemas. En la actualidad los métodos de cultivo se benefician del conocimiento acumulado sobre la ecología de los microorganismos, que permiten un diseño más apropiado de las condiciones de cultivo. También es extremadamente importante la información obtenida en estudios moleculares de diversidad microbiana porque ayudan a diseñar experimentos encaminados al aislamiento de microorganismos nuevos, jamás cultivados. Esta aproximación está dando sus frutos y en los últimos años han empezado a proliferar trabajos donde se describe el aislamiento de estos nuevos y, hasta ahora, desconocidos microorganismos, entre los que se cuentan representantes de grupos importantes mencionados anteriormente como *Acidobacteria* y *Verrucomicrobia* (Sait, *et al.*, 2002; Joseph, *et al.*, 2003). La combinación de diferentes técnicas de cultivo y análisis fisiológico y bioquímico con la utilización de técnicas moleculares basadas en 16S rRNA resulta también muy útil para determinar la función de los microorganismos en el ambiente. Un ejemplo reciente es el estudio de Strous y colaboradores que demostró que el microorganismo responsable del proceso de oxidación anaerobia de amonio conocido como ?anammox? pertenece a la clase *Planctomycetes* (Strous, *et al.*, 1999).

Sin despreciar la importancia de los cultivos, los métodos moleculares son indispensables en el estudio de la función de los microorganismos en el suelo. Mediante métodos moleculares se pueden analizar genes funcionales clave en procesos importantes en suelo tales como la desnitrificación, nitrificación, fijación de nitrógeno, oxidación de metano (Rösch, *et al.*, 2002; Jaatinen, *et al.*, 2004; Okano, *et al.*, 2004). De manera análoga a los estudios de diversidad de 16S rRNA, se puede determinar la diversidad de estos genes en diferentes suelos o diferentes condiciones e incluso proceder a su cuantificación. Mucho más importante es determinar si esos genes se están expresando, lo cual está directamente ligado a la participación del microorganismo que los posee en el proceso estudiado. La expresión de genes funcionales mediante la detección de RNA mensajero (mRNA) se ha realizado con éxito en sistemas complejos como suelos (Sessitsch, *et al.*, 2002; Bürgmann, *et al.*, 2003). Las nuevas técnicas de hibridación en microchips para la detección de genes funcionales permitirán realizar estudios mucho más complejos en los próximos años (Cook, *et al.*, 2003).

Un segundo tipo de aproximación molecular al análisis de la función de microorganismos en el suelo consiste en incubar la muestra de suelo en presencia de un sustrato marcado con un isótopo pesado seguida de la identificación de los microorganismos de la comunidad que han incorporado dicho sustrato a sus ácidos nucleicos mediante análisis de 16S rRNA (técnica de SIP, del inglés ?Stable-Isotope Probing?). Utilizando esta técnica, Radajewski y colaboradores analizaron los microorganismos capaces de utilizar metanol en una muestra de un suelo forestal y demostraron la participación en el proceso de bacterias de la subclase Alpha de *Proteobacteria* y de miembros del nuevo phylum *Acidobacterium* (Radajewski, *et al.*, 2000).

## Una visión de futuro sobre la microbiología de suelos del siglo XXI

A pesar de todas las herramientas de que disponen actualmente los microbiólogos del suelo y de todo el conocimiento generado desde la aplicación de técnicas de biología molecular, nos puede parecer que la complejidad de interrogantes que tienen ante sí los microbiólogos del suelo es considerable. Sin embargo, actualmente sabemos que toda la información generada en estos aproximadamente veinticinco años de aplicación de la biología molecular a la microbiología del suelo es tan sólo una pequeña parte de la que se está obteniendo desde hace unos pocos años con la aplicación de técnicas de secuenciación y análisis de genomas. El estudio global de los genomas de todos los microorganismos presentes en una comunidad se denomina metagenómica y ya ha sido realizado con éxito en comunidades microbianas de suelo (Rondon, *et al.*, 2000). Si recordamos que las estimaciones más conservadoras acerca de la complejidad genética de comunidades microbianas de suelos indican la presencia de entre 6.000 y 10.000 genomas diferentes (equivalentes en tamaño al de la bacteria *Escherichia coli*) en suelos orgánicos no perturbados y un número menor (entre 350 y 1.500) en suelos agrícolas o contaminados con metales pesados (Torsvik, *et al.*, 1998), nos podemos hacer una idea de la magnitud de la información nueva que se está generando. En el campo de la microbiología de suelos hasta el momento los estudios metagenómicos se han centrado en la detección de nuevos biocatalizadores y compuestos bioactivos, como por ejemplo enzimas líticos y nuevos antimicrobianos (Daniel, 2004), o bien en la caracterización de genomas de microorganismos no cultivados como *Acidobacterium* o arqueas del suelo (Quaiser, *et al.*, 2002; Quaiser, *et al.*, 2003) que contribuirán a determinar el papel de estos microorganismos en el ecosistema edáfico. Las posibilidades que genera la metagenómica y las demás técnicas moleculares mencionadas anteriormente son múltiples por lo que podemos esperar importantes avances en el conocimiento del funcionamiento de las comunidades microbianas de suelo.

## Referencias

- Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M. A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., et al. 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57: 401-412.
- Bintrim, S. B., Donohue, T. J., Handelsman, J., Roberts, G. P. y Goodman, R. M. 1997. Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 277-282.
- Buckley, D. H., Graber, J. R. y Schmidt, T. M. 1998. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom *Chrenarchaeota* and their diversity and abundance in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4333-4339.
- Buckley, D. H. y Schmidt, T. M. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environ. Microbiol.* 5: 441-452.
- Bürgmann, H., Widmer, F., Sigler, W. V. y Zeyer, J. 2003. mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1928-1935.
- Cook, K. L. y Saylor, G. S. 2003. Environmental application of array technology: promise, problems and practicalities. *Curr. Opin. Biotech.* 14: 311-318.
- Daniel, R. 2004. The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Biotech.* 15: 199-204.
- Duineveld, B. M., Kowalchuck, G. A., Keijzer, A., van Elsas, J. D. y van Veen, J. A. 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of Chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 172-178.
- Ebersberger, D., Wermbter, N., Niklaus, P. A. y Kandeler, E. 2004. Effects of long term CO<sub>2</sub> enrichment on microbial community structure in calcareous grasslands. *Plant Soil* 264: 313-323.
- El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W. y Top, E. M. 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 982-988.
- Ettema, C. H. y Wardle, D. A. 2002. Spatial soil ecology. *Trends Ecol. Evol.* 17: 177-183.
- Felske, A. y Akkermans, A. D. L. 1998. Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soils. *Microbial Ecol.* 36: 31-36.
- Fey, A. y Conrad, R. 2000. Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4790-4797.
- Girvan, M. S., Bullimore, J., Ball, A. S., Pretty, J. N. y Osborn, A. M. 2004. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2692-2701.
- Heuer, H., Kroppenstedt, R. M., Lottman, J., Berg, G. y Smalla, K. 2002. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1325-1335.
- Horswell, J., Cordiner, S. J., Maas, E. W., Martin, T. M., Sutherland, K. B. W., Speir, T. W., et al. 2002. Forensic comparison of soils by bacterial community DNA profiling. *J. Forensic Sci.* 47: 350-353.
- Hugenholz, P., Goebel, B. M. and Pace, N. R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765-4774.
- Insam, H. 2001. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma* 100: 389-402.
- Jaatinen, K., Knief, C., Dunfield, P. F., Yrjälä, K. y Fritze, H. 2004. Methanotrophic bacteria in boreal forest soil after fire.



*FEMS Microbiol. Ecol.* 50: 195-202.

Joseph, S. J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C. A. y Janssen, P. H. 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7210-7215.

Juck, D., Charles, T., Whyte, L. G. y Greer, C. W. 2000. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from Northern Canadian communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 241-249.

Ka, J. O., Yu, Z. y Mohn, W. W. 2001. Monitoring the size and metabolic activity of the bacterial community during biostimulation of fuel-contaminated soil using competitive PCR. *Microbiol. Ecol.* 42: 267-273.

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H. y Trevors, J. T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Meth.* 58: 169-188.

Kowalchuck, G. A. 1999. New perspectives towards analysing fungal communities in terrestrial environments. *Curr. Opin. Biotech.* 10: 247-251.

Kuske, C. R., Barns, S. M. y Busch, J. D. 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid Southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3614-3621.

Liesack, W. y Stackebrandt, E. 1992. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* 174: 5072-5078.

Liesack, W., Janssen, P. H., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L. y Stackebrandt, E. 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. En *Modern soil microbiology*. van Elsas, J. D., Trevors, J. T. and Wellington, E. M. H. (eds.). New York. Marcel Dekker Inc., p. 375-439.

Ludwig, W., Bauer, S. H., Bauer, M., Held, I., Kirchhof, G., Schulze, R., et al. 1997. Detection and in situ diversity of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* 153: 181-190.

Lueders, T. y Friedrich, M. 2000. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2732-2742.

Lukow, T., Dunfield, P. F. y Liesack, W. 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32: 241-247.

Marilley, L. y Aragno, M. 1999a. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl. Soil Ecol.* 13: 127-136.

Marilley, L., Hartwig, U. A. y Aragno, M. 1999b. Influence of an elevated atmospheric CO<sub>2</sub> content on soil and rhizosphere bacterial communities beneath *Lolium perenne* and *Trifolium repens* under field conditions. *Microbiol. Ecol.* 38: 39-49.

Marschner, P., Crowley, D. y Yang, C. H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil* 261: 199-208.

Milling, A., Smalla, K., Maidl, F. X., Schloter, M. y Munch, J. C. 2004. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. *Plant Soil* 266: 23-39.

Müller, A. K., Westergaard, K., Christensen, S. and Sorensen, S. J. 2001. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 11-19.

Neef, A., Amann, R., Schlesner, H. y Schleifer, K. H. 1998. Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* 144: 3257-3266.

Nogales, B., Moore, E. R. B., Abraham, W. R. y Timmis, K. N. 1999. Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Environ. Microbiol.* 1: 199-212.

Nogales, B., Moore, E. R. B., Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R., Amann, R. y Timmis, K. N. 2001. Combined use of 16S

- ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1874-1884.
- Nunan, N., Wu, K., Young, I. M., Crawford, J. W. y Ritz, K. 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-structure of soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 203-215.
- O'Donell, A. G. y Görres, H. E. 1999. 16S rDNA methods in soil microbiology. *Curr. Opin. Biotech.* 10: 225-229.
- Okano, Y., Hristova, K. R., Leutenegger, C. M., Jackson, L. E., Denison, R. F., Gebreyesus, B., et al. 2004. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1008-1016.
- Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Klenk, H. P., Kletzin, A., Treusch, A. H., Meurer, G., et al. 2002. First insight into the genome of an uncultivated chrenarchaeote from soil. *Environ. Microbiol.* 4: 603-611.
- Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Lanz, C., Schuster, S. C., Treusch, A. H., Eck, J. y Schleper, C. 2003. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Mol. Microbiol.* 50: 563-575.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R. y Murrell, J. C. 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403: 646-649.
- Rappé, M. S. and Giovannoni, S. J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 369-394.
- Rheims, H., Spröer, C., Rainey, F. A. y Stackebrandt, E. 1996. Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology* 142: 2863-2870.
- Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., et al. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2541-2547.
- Rösch, C., Mergel, A. y Bothe, H. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3818-3829.
- Rozsak, D. B. y Colwell, R. R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51: 365-379.
- Sait, M., Hugenholz, P. y Janssen, P. H. 2002. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ. Microbiol.* 4: 654-666.
- Sandaa, R. A., Torsvik, V., Enger, O., Daae, F. L., Castberg, T. y Hahn, D. 1999. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 237-251.
- Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M. H., Kirchmann, H. y Kandeler, E. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4215-4224.
- Sessitsch, A., Gyamfi, S., Stralis-Pavese, N., Weilharter, A. y Pfeifer, U. 2002. RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols. *J. Microbiol. Meth.* 51: 171-179.
- Sessitsch, A., Gyamfi, S., Tschirko, D., Gerzabek, M. H. y Kandeler, E. 2004. Activity of microorganisms in the rhizosphere of herbicide treated and untreated transgenic glufosinate-tolerant and wildtype oilseed rape grown in containment. *Plant Soil* 266: 105-116.
- Siciliano, S. D., Germida, J. J., Banks, K. y Greer, C. W. 2003. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 483-489.
- Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S. y Wernars, K. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods.

*Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2284-2291.

Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., et al. 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400: 446-449.

Sun, H. Y., Deng, S. P. y Raun, W. R. 2004. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5868-5874.

Torsvik, V., Goksoyr, J. y Daae, F. L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782-787.

Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A. y Ovreas, L. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* 64: 53-62.

Ueda, T., Suga, Y. y Matsuguchi, T. 1995. Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. *Eur. J. Soil Sci.* 46: 415-421.

Wieland, G., Neumann, R. y Backhaus, H. 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5849-5854.