

# EFECTO DE SUSTANCIAS ORGÁNICAS SOLUBLES DEL SUELO SOBRE LA ABSORCIÓN DE HIERRO EN PLÁNTULAS DE GIRASOL

MARCOS DARÍO BONGIOVANNI<sup>1</sup> & JUAN CARLOS LOBARTINI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 8 km 601, Río Cuarto, Córdoba. e-mail: mbongiovanni@ayv.unrc.edu.ar

<sup>2</sup>Universidad Nacional del Sur, Departamento de Agronomía Altos del Palihue, 8000 Bahía Blanca, lobartini@uns.edu.ar (Autor para la correspondencia).

Recibido: 15-12-08

Aceptado: 19-06-09

## RESUMEN

La materia orgánica del suelo es uno de los recursos naturales que afecta la calidad del suelo. El uso y manejo del suelo pueden hacer disminuir su contenido afectando de este modo sus propiedades físico-químicas y el crecimiento de las plantas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la importancia del carbono orgánico soluble (COS) y de ácidos fúlvicos (AF), ambos afectados por el laboreo, en la absorción de hierro por plantas de girasol. El COS estuvo ausente en el suelo con agricultura y el AF disminuyó en un 57%. Plántulas de girasol crecidas en solución nutritiva aumentaron su contenido de hierro en hojas 18,1 y 6,7 veces con el agregado de 30 mg L<sup>-1</sup> y 40 mg L<sup>-1</sup> de COS y AF, respectivamente. Mayores concentraciones de COS y AF en la solución nutritiva mejoraron la absorción de hierro y evitaron su precipitación en las raíces.

**Palabras clave.** Sustancias húmicas, absorción de hierro, ácido fúlvico.

## EFFECT OF SOLUBLE SOIL ORGANIC SUBSTANCES ON IRON ABSORPTION BY SUNFLOWER SEEDLINGS

### ABSTRACT

Soil organic matter (SOM) is one of the most important natural resources that affect soil quality. Soil uses and management may decrease SOM content affecting physical and chemical soil properties and consequently plant growth. The aim of this study was to evaluate the effect of soluble organic carbon (SOC) and fulvic acids (FA), both affected by tillage, on iron uptake by sunflower seedlings. Soluble organic carbon disappeared in the soil under cultivation and FA was reduced 57%. Sunflower seedlings growing in hydroponic solution increased iron absorption and translocation. Thus, iron content in leaves increased 18.1 and 6.7 times with the addition of 30 mg L<sup>-1</sup> and 40 mg L<sup>-1</sup> of SOC and FA, respectively. Increasing SOC and FA concentration in nutrient solution improved iron uptake and also prevented iron precipitation in roots.

**Key words.** Humic substances, iron uptake, fulvic acid.

## INTRODUCCIÓN

La calidad de un suelo depende en parte de su composición natural, pero también depende de su uso y manejo realizados por el hombre (Pierce & Larson, 1993), siendo la materia orgánica (MO) uno de los recursos naturales más importantes y la base de su fertilidad (Senesi & Loffredo, 1999).

En la Región Pampeana, la agricultura continua ha sido la principal causante de la degradación y disminución en el contenido de MO (SAGyP 1995; Galantini & Rosell, 1997).

La materia orgánica, al lograr una buena agregación y retención de agua, mejoran las propiedades físicas de los suelos, cumpliendo un rol fundamental en la nutrición de las plantas. Estos compuestos orgánicos son fuente directa de nutrientes como nitrógeno o de forma indirecta interactúan con iones metálicos formando compuestos de diferente solubilidad y estabilidad, aumentando su disponibilidad (Stevenson, 1982; Varanini & Pinton, 2000).

Las sustancias húmicas (SH), parte componente de la MO, están formadas por moléculas de carácter aromático de distintos pesos moleculares que poseen propiedades físico químicas diferentes. Así los ácidos húmicos (AH) de alto peso molecular favorecen la estabilidad de los agregados y forman, con cationes polivalentes, complejos de escasa solubilidad, inmovilizando al catión y haciéndolo poco disponible para los vegetales (Piccolo *et al.*, 1997). Por el contrario los ácidos fúlvicos (AF) y los AH de bajo peso molecular, como así también los compuestos orgánicos solubles (COS) forman complejos de mayor solubilidad y movilidad, manteniendo a los cationes en forma más disponibles para las plantas y favoreciendo el transporte por difusión hacia la raíz. (Kalbitz *et al.*, 2000; Varanini & Pinton, 2000). Delprat *et al.* (1997) encontraron en los primeros horizontes de suelos forestales y de pasturas, que los niveles de COS eran superiores que en suelos con varios años de agricultura continua. En un ecosistema de bosque, la parte superficial es la fuente más importante de COS. Alrededor del 10 al 20% de la materia orgánica que llega al suelo como hojarasca es liberada como COS.

En un Haplustol típico de la provincia de Córdoba se observó que los COS habían desaparecido y que las SH se redujeron más del 50% después de aproximadamente 40 años de agricultura, cuando se lo comparó con el suelo conservado en situación de monte (Bongiovanni, 2002; Bongiovanni & Lobartini, 2006).

La disminución de los compuestos orgánicos y SH solubles tienen gran impacto en la nutrición mineral en lo que respecta a la disponibilidad y movilidad del hierro (Cesco *et al.*, 2000). En suelos con pHs cercanos a 7 el Fe en solución se encuentra en una concentración de  $10^{-11}$  M, o sea  $10^5$  veces más baja que la concentración mínima a la que la raíz puede absorberlo (Coïc & Coppenet, 1993; Marschner, 1995).

Si bien la formación de quelatos de Fe (III), y ocasionalmente de Fe (II), por las SH incrementa la concentración de Fe en la solución (Marschner & Römheld, 1996; Marschner, 1995), no se conoce si la capacidad de las plantas de excretar protones y/o quelatos desde las raíces para hacer más disponible al Fe aumenta en función de concentraciones crecientes de COS y AF que secuestran parte del Fe.

El objetivo del trabajo fue evaluar en cultivos hidropónicos si el agregado de AF y COS desaparecido en el suelo cultivado y presente en situación de monte, tenían algún efecto en la absorción de hierro por plántulas de girasol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El suelo en estudio fue un Haplustol típico del área central de Córdoba, Argentina, ubicado  $32^{\circ}36'$  Sur y  $63^{\circ}59'$  Oeste, con dos tipos de uso, monte natural y cultivado. La situación monte (M) es un área con especies arbóreas caducifolias como *Prosopis* sp, *Celtis espinosa* y *Acacia cavens* y la situación cultivada (C) que se trabaja desde hace más de 40 años principalmente con maní (*Arachis hypogaea* L), maíz (*Zea mays* L) y soja (*Glycine max* L).

El clima es subhúmedo-seco templado, con una temperatura media anual de  $17^{\circ}\text{C}$  y la precipitación media anual es de 779 mm, concentrándose el 80% de las precipitaciones anuales en el período primavera estival.

Para poder asumir que las diferencias en las propiedades del suelo estudiadas se deben principalmente a los diferentes usos, es que se tuvo en cuenta que el suelo de los dos sitios evaluados tuviera un desarrollo a partir del mismo material parental y que estaba bajo la influencia del mismo clima. Los lugares de muestreos fueron seleccionados en tres suelos cultivados con áreas adyacentes de monte natural. Las muestras de suelo fueron tomadas al azar del horizonte superficial A o Ap según la situación. Las determinaciones de carbono orgánico (CO) de las muestras de suelo se realizaron por el método de combustión seca en un LECO carbon analyzer, (LECO Corporation). Los AH y AF se extrajeron solubilizando con NaOH 0,1 N y acidificando con HCl para separar AH de AF (Tan, 1996). El AF soluble en el sobrenadante ácido, fue concentrado haciéndolo pasar por una columna con resina XAD8. De esta resina fue desorbido con NaOH 0,1 N y posteriormente pasado por una resina catiónica y finalmente liofilizado (Lobartini *et al.*, 1989). Los COS se obtuvieron agitando una parte de suelo secado al aire en dos partes de agua destilada durante dos horas y separados por centrifugación. La solución obtenida en el sobrenadante se la concentró y purificó de la forma descrita para los AF.

En las experiencias de absorción de Fe se utilizaron plantas de girasol (*Helianthus annuus* Mill.) crecidas en condiciones controladas de luz y temperatura en solución nutritiva  $\frac{1}{4}$  Hoagland modificada sin Fe. A los 12 días de germinadas se colocaron 10 plantas en recipientes con 170 mL de la solución nutritiva conteniendo Fe en forma férrica ( $\text{FeCl}_3$ ,  $10^{-6}$  M) marcado con  $^{59}\text{Fe}$ . El uso de Fe radioactivo permitió calcular el Fe absorbido y su distribución en las distintas partes de la planta independientemente de su contenido inicial y sin expresarlo como concentración en el tejido.

En la primera experiencia los distintos tratamientos consistieron en el agregado de concentraciones crecientes AF de la situación «B». Las concentraciones finales de AF fueron de 0, 40, 80 y 120  $\text{mg L}^{-1}$ . La duración de la experiencia fue de 96 h. Las plantas se cosecharon y se separaron en hojas, tallos y raíces, se secaron en estufa a  $75^{\circ}\text{C}$ , se obtuvo peso seco y se midió la actividad de  $^{59}\text{Fe}$  con un espectrómetro Alfa nuclear unido a un contador de pozo con cristal de centelleo de NaI (TI). Para la medición de  $^{59}\text{Fe}$  remanente en la solución nutritiva se tomó una alícuota de 4 mL que fue medida con el mismo espectrómetro. A la solución también se le midió el pH. En la segunda experiencia se utilizó el COS agregado a la solución nutritiva, siendo los tratamientos 0, 30, 60 y 90  $\text{mg L}^{-1}$  y de EDTA de  $10^{-5}$  M. En todos los casos los tratamientos se realizaron por triplicado.

A los datos se les realizó el análisis de la varianza (ANOVA) con Infostat (2002). Cuando el ANOVA dio diferencia significativa se realizó la comparación de valores medios por la prueba de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de CO en el suelo cultivado (Tabla 1) disminuyó un 54,1% con respecto a la situación con bosque. Los AH y AF sufrieron una disminución significativa, sumándose a esto la desaparición del COS, fracción presente en el suelo sin cultivar en una concentración de 0,3 g kg<sup>-1</sup>. En los AH, a pesar que se encontró diferencia significativa entre las dos situaciones (Tabla 1), fue la fracción que menos disminuyó (45,1%). Esto en principio estaría relacionado a que son moléculas de mayor tamaño y más resistentes a la degradación por parte de microorganismos (Tan 2003). No obstante, si quedan expuestas por la destrucción de agregados efectuados por las labranzas son degradados igual que el resto de los compuestos orgánicos de suelo. Por su parte, los AF disminuyeron significativamente un 57,2% mientras que el COS fue la fracción más afectada que estuvo ausente en el suelo sometido a labranzas.

Estas fracciones de bajo peso molecular y más solubles al complejarse con iones metálicos y tener mayor movilidad en el suelo son las que tendrían un efecto directo en la nutrición mineral de las plantas (Marschner, 1995).

En la Figura 1 se muestra el contenido de Fe absorbido durante 96 h por plantas de girasol crecidas en so-

Tabla 1. Contenido de carbono orgánico (CO), ácido húmico (AH), ácido fúlvico (AF) y carbono orgánico soluble (COS) en suelos bajo dos manejos.

Table 1. Organic carbon content (CO), humic acids (HA), fulvic acids (FA), and soluble organic carbon (SOC) in soils under two management systems.

	Bosque	Cultivado
	g kg <sup>-1</sup> suelo	
CO	25,59	11,74 *
AH	12,81	7,49 *
AF	1,45	0,62 *
COS	0,30	ausente

\* indican diferencia significativa entre las mismas fracciones orgánicas de los dos suelos (p<0,05).

\* indicate significant difference between same organic fractions from both soils (p<0.05).

lución nutritiva ¼ Hoagland modificada, con el agregado de <sup>59</sup>FeCl<sub>3</sub> y diferentes concentraciones de AF. Como se puede apreciar, cuando se utilizó AF como quelante en la solución nutritiva, se encontraron respuestas positivas en la absorción de Fe en relación al Testigo. El aumento de la concentración de AF en la solución nutritiva produjo un incremento significativo en la absorción de Fe y transporte a la parte aérea. En hoja el aumento de Fe fue 8,6 veces mayor cuando la solución contenía 120 mg L<sup>-1</sup> de AF (2,16 µg Fe) comparada con el testigo (0,25 µg Fe). Con las concentraciones de AF de 40 y 80 mg L<sup>-1</sup>, se obtuvieron absorciones de Fe intermedias, aumentando nuevamente entre 80 y 120 mg L<sup>-1</sup>.

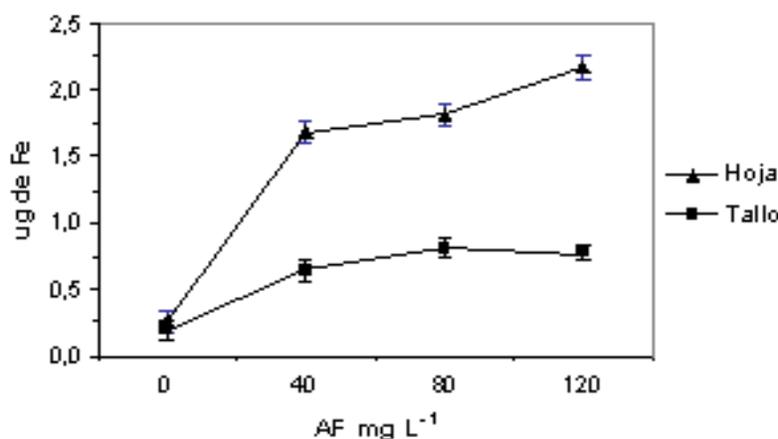


Figura 1. Contenido de Fe en hoja y tallo de plantas de girasol crecidas con diferentes concentraciones de AF en la solución nutritiva. Las barras indican  $\pm$  ES.

Figure 1. Iron content in leaves and stem of sunflower plants grown with different concentration of FA in the nutrient solution. The bars indicate  $\pm$  SE.

En tallo al igual que en hoja el contenido de Fe fue mayor en todos los tratamientos que contenían AF en solución. Con el agregado de 40 mg L<sup>-1</sup> de AF el contenido de Fe (0,63 mg) aumentó con respecto al testigo (0,19 µg) en 3,3 veces. Los incrementos en Fe absorbido no fueron constantes a medida que aumentaba AF a la solución. Con el agregado de 80 mg L<sup>-1</sup> de AF el aumento fue de 1,33 veces mayor comparado con 40 mg L<sup>-1</sup> de AF, no existiendo incremento entre 80 y 120 mg L<sup>-1</sup>.

El contenido de Fe en raíz (Fig. 2) disminuyó a medida que se le agregó mayor concentración AF a la solución. El contenido de Fe en raíz siempre fue menor para todas las concentraciones de AF en solución, coincidiendo esto con resultados encontrados en experiencias similares por Bongiovanni *et al.* (2000). Esto se explicaría ya que la absorción estaría acompañada con un mayor transporte y la presencia de AF en solución evitaría una precipitación o adsorción en las paredes celulares del espacio libre de la raíz.

Esta inmovilización de Fe en la raíz también se vio reflejada en la concentración de Fe en la solución remanente ya que fue mayor a medida que se incrementó el contenido de AF. Así, la concentración de Fe con 120 mg L<sup>-1</sup> de AF (1,05 µg Fe) fue 2,1 veces mayor comparada con la concentración de la solución remanente del testigo (0,5 µg Fe). También fue observado por Welkie & Miller (1993) que la ausencia de quelatos permitió la precipitación del Fe en raíz.

La caracterización química del COS mostró un espectro en infrarojo y un movimiento isotacoforético (datos no mostrados) (Bongiovanni, 2002) similar a fracciones de AF de bajo peso molecular y además los análisis mostraron la presencia de hidratos de carbono. Esta característica le confiere gran importancia en la quelación y provisión de micronutrientes para las plantas (Pinton *et al.*, 1999; Varanini & Pinton, 2000).

Cuando se evaluó al COS como complejante de hierro (Tabla 2), se vio que aumentó la absorción de Fe en

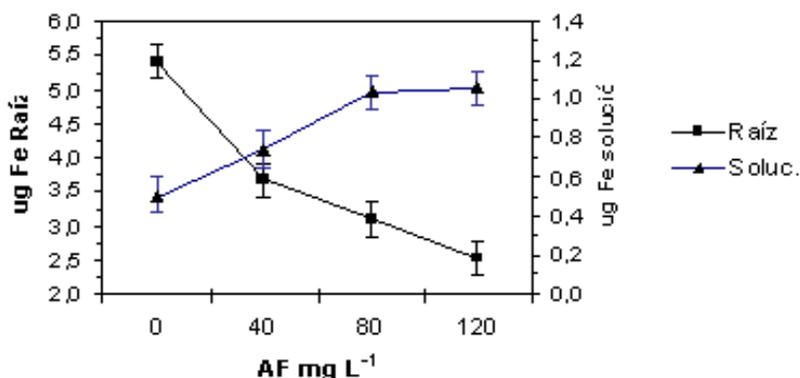


Figura 2. Contenido de Fe en raíz de plantas de girasol y en la solución remanente con diferentes concentraciones de AF en la solución. Las barras de error indican ES.

Figure 2. Iron content in roots of sunflower and in remained nutrient solution at different FA concentration. The bars indicate  $\pm$  SE.

Tabla 2. Peso seco de hoja, tallo, raíz y Fe (mg) absorbido por plantas de girasol crecidas en solución con FeCl<sub>3</sub> 10<sup>-6</sup> M con el agregado de COS en concentraciones de 30, 60, 90 mg L<sup>-1</sup> y EDTA 10<sup>-5</sup>M.

Table 2. Dry weight of leaf, stem, root, and Fe (mg) absorbed by sunflower plants grown in nutrient solution with FeCl<sub>3</sub> 10<sup>-6</sup> M with the addition of SOC at concentration of 30, 60, 90 mg L<sup>-1</sup> and EDTA 10<sup>-5</sup>M.

Tratamientos	Hoja		Tallo		Raíz		Solución
	µg Fe	g	µg Fe	g	µg Fe	g	pH
Testigo	0,012 d	0,40 a	0,041 d	0,99 a	7,454 a	0,26 a	4,14 a
COS 30 mg L <sup>-1</sup>	0,218 c	0,34 a	0,181 c	0,86 a	5,970 b	0,20 a	4,10 a
COS 60 mg L <sup>-1</sup>	0,313 bc	0,43 a	0,224 bc	0,91 a	5,928 b	0,19 a	4,05 a
COS 90 mg L <sup>-1</sup>	0,361 b	0,37 a	0,266 b	0,90 a	5,066 c	0,22 a	4,07 a
EDTA	0,559 a	0,40 a	0,350 a	0,97 a	1,902 d	0,23 a	4,16 a

Números seguidos con la misma letra dentro de una misma columna no difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ).

Numbers followed by the same letter within the same column do not differ statistically ( $p < 0,05$ ).

todos tratamientos. Así, el agregado de 30 mg L<sup>-1</sup> de COS en la solución nutritiva significó un aumento del contenido de Fe en hoja de 17,7 veces, comparado con las plantas crecidas en solución testigo. Además se comprobó que hubo un incremento en la absorción de Fe en función de la concentración de COS en la solución (Tabla 2). Este aumento se vio tanto en hoja como para tallo. El contenido de Fe en raíz siguió la misma tendencia que para AF, con aumentos de concentración del COS se registró menos Fe en la raíz, aún cuando el Fe absorbido en raíz se mantuvo sin variación entre la concentración de 30 mg L<sup>-1</sup> y 60 mg L<sup>-1</sup> de COS.

El tratamiento con el agregado de EDTA se lo hizo simplemente con la finalidad de tener un quelante de referencia usado habitualmente en soluciones hidropónicas.

En todos los tratamientos las plantas bajaron el pH inicial de la solución nutritiva de 6,5 a valores de alrededor de 4,5 (Tabla 2), ya que la respuesta fisiológica del girasol ante un estrés de deficiencia de Fe es la de excretar protones para disminuir el pH y así aumentar la disponibilidad de Fe. (Marschner & Römheld, 1996).

En la experiencia realizada no se encontraron incrementos significativos en la materia seca de hoja, tallo y raíz, esto estaría principalmente relacionado a que fueron ensayos de 96 h de duración. Resultados similares fueron citados por Cooper *et al.* (1998), que trabajando en ensayos de corta duración con *Agrostis stolonifera* L. encontró aumentos despreciables de la materia seca con el agregado de AH tanto en hidroponia como en arena.

## CONCLUSIONES

La agricultura continua hizo que disminuyeran el CO y las SH. En función de lo planteado es que cobra importancia la disminución de los AF en el suelo, ya que son sustancias muy relacionadas con la toma de nutrientes por las plantas. Los AF disminuyeron en un 57%, siendo lo más destacado la desaparición de la fracción COS de bajo peso molecular. La absorción de Fe por plantas de girasol fue influenciada por la presencia de COS, aumentando en hoja 18,1 veces el contenido de Fe al pasar el contenido de COS en solución de 0 a 30 mg L<sup>-1</sup>. La presencia de AF en la solución al ser agregado en 40 mg L<sup>-1</sup> produjo un aumento en el contenido de Fe en hoja en 6,7 veces, siendo la influencia menor que con el agregado de COS. La disminución de AF y la pérdida de COS por laboreo podrían condicionar la absorción de micronutrientes en aquellos cultivos dependientes de la complejación por sustancias orgánicas.

## AGRADECIMIENTO

Trabajo parcialmente financiado con PGI24/A148 de SGCYT de la UNS.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bongiovanni, MD. 2002. Cambios en los componentes de la materia orgánica del suelo producidos por el uso y su efecto sobre la agregación y disponibilidad de nutrientes. Tesis de Magister en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Sur.
- Bongiovanni, MD & JC Lobartini. 2006. Particulate organic matter, carbohydrate, and humic acid contents in soil macro- and microaggregates as affected by cultivation. *Geoderma* 136: 660-665.
- Bongiovanni, MD; JC Lobartini & GA Orioli. 2000. Las sustancias húmicas afectan la disponibilidad del hierro. Actas de XXIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Bremner, JM & CS Mulvaney. 1986. Total nitrogen. in *Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and microbiological properties*. N°9. 2nd edn. Agronomy AL Page & DR Keeney (eds). Soil Sci. Soc. America, Madison, WI. pp. 595-624.
- Cesco, S; V Romheld; Z Varanini & R Pinton. 2000. Solubilization of iron by a water extractable humic substances fraction. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163: 285.
- Coic, Y & M Coppenet. 1993. Los oligoelementos en la agricultura y ganadería. Incidencias en la nutrición humana. Editorial Hemisferio. Buenos Aires.
- Cooper, RJ; C Liu & DS Fisher. 1998. Influence of humic substances on rooting and nutrient content of creeping bentgrass. *Crop Sci.* 39: 1639-1644.
- Delprat, L; P Chassin; M Lineres & C Jambert. 1997. Characterization of dissolved organic carbon in cleared forest soils converted to maize cultivation. *Eur. J. Agron.* 7: 201-210.
- Galantini, JA & RA Rosell. 1997. Organic fractions, N, P, S changes in Argentine semiarid Haplustoll under different crop sequences. *Soil Till. Res.* 42: 221-228.
- INFOSTAT/Profesional Versión 1.1, 2002. Universidad Nacional de Córdoba. Estadística y Diseño - F.C.A.
- Kalbitz, K; S Solinger; JH Park; B Michalzik & E Matzner. 2000. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Sci.* 165(4): 277-304.
- Lobartini, JC; KH Tan; LE Asmussen; RA Leonard; D Himmelsbach & AR Gingle. 1989. Humic matter isolated from soils and water by the XAD 8 resin and conventional NaOH methods. *Comm Soil Sci Plant Anal.* 20: 1453-1477.
- Marschner, H & V Romheld. 1996. Root-Induced Changes in the Availability of Micronutrients in the Rhizosphere. In: *Plant roots: the hidden half* (eds. Y Waisel, A Eshel and U. Kafkafi). Second edition. Marcel Dekker, Inc. New York. pp 557-579.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Second Edition. Academic Press. London. 889 pp.

- Piccolo, A; G Pietramellara & JSC Mbagwu. 1997. Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. *Geoderma* 75: 267-277.
- Pierce, F & C Larson. 1993. Developing criteria to evaluate sustainable land managements. *En: Proceedings of the VIII Internacional Soil Management Work-shop. Utilization of soil survey information for sustainable land use (ed. JM Kimble)* Sacramento, CA. 7-14 pp.
- Pinton, R; S Cesco; S Santi; F Agnolon & N Varanini. 1999. Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants. *Plant and Soil* 210: 157.
- Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca (SAGyP) y Consejo Federal Agropecuario (CFA) en Alerta Amarillo. 1995. El deterioro de las tierras en la Republica Argentina. 287 pp.
- Senesi, N & E Loffredo. 1999. The Chemistry of Soil Organic Matter: *In: Soil Physical Chemistry. (ed. DL Sparks)* CRC Press, Boca Raton. Florida. 239-370 pp.
- Stevenson, FJ. 1982. Humus Chemistry. J. Willey, New York. 443 pp.
- Tan, KH. 1996. Soil Sampling, Preparation and Analysis. Marcel Dekker Inc. 432 pp.
- Tan, KH. 2003. Humic matter in soil and the environment. Principles and controversies. Marcel Dekker Inc. 325 pp.
- Varanini, Z & R Pinton. 2000. Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition. *In: The Rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. (eds. R Pinton; Z Varanini & P Nannipieri.)* Marcel Dekker, Inc New York. 141-157 pp.
- Welkie, GW & GW Miller. 1993. Plant iron uptake physiology by nonsiderophore systems in plants and soil microorganisms. *In: Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms. (eds. L Barton & B Hemming.)* Academic Press Inc. New York. US. 251-280 pp.