

**TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE  
SUELOS Y ABONOS ORGÁNICOS**

Cipriano García Gutiérrez  
Jaime Alberto Félix Herrán



# TÉCNICAS DE MICROBIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR PARA EL ANÁLISIS DE SUELOS Y ABONOS ORGÁNICOS

Cipriano García Gutierréz<sup>1</sup>

Jaime Alberto Félix Herrán<sup>2</sup>

Antonio Cardenas Flores<sup>3</sup>

Blanca Estela Gómez Luna<sup>4</sup>

Graciela Ma. de la Luz Ruiz Aguilar<sup>5</sup>

## Análisis de la biomasa microbiana de suelos y abonos orgánicos sólidos

### BIOMASA MICROBIANA DEL SUELO

La medición de la biomasa microbiana se ha utilizado como un indicador de la fertilidad del suelo. La medición de biomasa microbiana puede utilizarse también en monitoreo ambiental, ya que los microorganismos pueden actuar también como indicador sensible de contaminación por metales pesados o bifenildiclorados.

Dentro de las técnicas para medir la biomasa microbiana la más empleada es la de fumigación por su simplicidad y relativo bajo costo. Esta se basa en la ruptura de la membrana celular por un biocida, entre los que se encuentran: cloroformo, etanol, propanol, hexanol,  $\beta$ -propiolactina, formaldehído, glutaraldehído, óxido de etileno y metilbromuro. El cloroformo es uno de los biocidas más efectivos, debido a que no solubiliza la materia orgánica no microbiana del suelo y la vuelve susceptible a descomposición.

---

1 Profesor investigador del departamento de biotecnología agrícola CIIDIR (COFAA) IPN Unidad Sinaloa.

2 Profesor de los programas educativos de Ingeniería Forestal e Ingeniería en Desarrollo Sustentable de la Universidad Autónoma Indígena de México.

3 Investigador del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA).

4 Profesora del Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

5 Profesora del Departamento de Ciencias Ambientales, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato.

#### DETERMINACION DE CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA DEL SUELO Y DE UN ABONO ORGÁNICO POR EL MÉTODO DE FUMIGACIÓN-INCUBACIÓN

Desde principios del siglo pasado, agentes químicos han sido utilizados como fumigantes. Cuando un suelo es expuesto a un fumigante volátil y este es removido para posteriormente incubar el suelo, la respiración microbiana es inicialmente más baja que en un suelo no fumigado utilizado como control. Sin embargo, después de un tiempo la velocidad de respiración en el suelo fumigado es a menudo más alta que en el suelo control. Así, en un corto período de tiempo el suelo consume más oxígeno que en un suelo no fumigado.

Como otros tratamientos biocidas, la fumigación acelera brevemente la oxidación de la materia orgánica del suelo, comparado a un suelo no fumigado. En su trabajo de 1966, Jenkinson propone que esta diferencia de descomposición es completamente causada por la mineralización de los organismos muertos durante la fumigación. Esto permite relacionar el tamaño de biomasa presente en el suelo, con la diferencia de mineralización entre un suelo fumigado y uno no fumigado. Esta diferencia de mineralización es definida por Jenkinson y Powlson (1976) como la diferencia de oxígeno consumido (o CO<sub>2</sub> emitido o N mineralizado) entre un suelo fumigado y un suelo no fumigado y en este trabajo se le llamará *flux* de CO<sub>2</sub> emitido o N mineralizado. Este *flux* de CO<sub>2</sub>, está entonces definido como:

$$F_c = (C-CO_2 \text{ obtenido del suelo fumigado}) - (C-CO_2 \text{ obtenido del suelo no fumigado})$$

En una serie de artículos Jenkinson y cols. (1976) establecieron las bases para validar su teoría: mostraron que más CO<sub>2</sub> se producía de un suelo en incubación aerobia posterior a una fumigación con cloroformo libre de etanol siguiendo su remoción, que de un suelo similar sin fumigar; además, demostraron que este CO<sub>2</sub> extra proviene de las células microbianas muertas cuando son descompuestas por la población recolonizante. Ellos sugirieron que la cuantificación de la diferencia o *flux* de CO<sub>2</sub>, puede proveer una estimación de la cantidad de biomasa en el suelo.

Este método se basa en las siguientes consideraciones (Jenkinson y Land, 1981):

- La fumigación del suelo mata la biomasa microbiana y no afecta

la materia orgánica no viva.

- El número de organismos muertos en el suelo no fumigado es insignificante comparado con el del suelo fumigado.
- La fracción del carbono mineralizado de la biomasa microbiana muerta en un período de tiempo de 10 días no difiere en diferentes suelos.

El cloroformo es escogido como fumigante debido a que es un producto comercial más fácil de remover en un suelo que el metil-bromido, formaldehído y el cloropicrin. En la medición del *flux* de CO<sub>2</sub>, es importante que todas las trazas del fumigante sean removidas. Una remoción incompleta del fumigante puede interferir con la actividad de los microorganismos, sirviendo a estos como sustrato. Es por esto que el cloroformo debe estar libre de etanol, que generalmente se encuentra en la presentación normal del reactivo y que puede servir como sustrato. El cloroformo provoca la muerte celular, al lisar las membranas celulares; la lisis de las células microbianas depende del tiempo, de la temperatura, así como de la localización de los microorganismos en la estructura del suelo y de las propias características del suelo, tales como porosidad y materia orgánica, arcilla y contenido de carbonatos. Temperaturas bajas y tiempo de fumigación cortos pueden afectar los factores ( $k_c$ ) y así la estimación de biomasa microbiana.

El valor  $k_c$  se considera constante para todos los suelos sin importar el tipo de microorganismos que existan en dichos suelos. Sin embargo, existen muchos trabajos en los que se cuestiona dicha afirmación.

Lynch y Panting (1980) reportan que la fumigación con cloroformo mata el 82-89% de las bacterias y cerca del 99% de hongos en un suelo arcilloso.

Hu y Van Bruggen (1998) encontraron que la eficiencia de fumigación con cloroformo para bacterias es de 98.5-93.46%. Toyota y cols. (1996) propusieron que esta diferencia puede deberse a los exopolisacáridos secretados por las bacterias que las protegen de la acción del cloroformo, así como la propia matriz del suelo cuando estas están embebidas en ella.

Anderson y Domsch (1978) encontraron que el promedio de la mineralización de hongos y bacterias no es el mismo después de la fumigación, datos contrarios a los encontrados por Jenkinson y Powlson (1976).

Anderson y Domsch (1978) consideraron que es debido a que las paredes celulares son más resistentes a la degradación que el citoplasma, el grupo que tiene una relación pared celular citoplasma más grande será el más resistente a la degradación: las bacterias.

Ross (1990) calibró el método de Fumigación-Incubación (F-I), encontrando que el valor de  $k_c$  depende de los porcentajes de hongos y bacterias componentes de la biomasa del suelo y puede variar apreciablemente con diferentes tipos de suelo.

El método F-I no puede ser usado en suelos que han sido recientemente secados (*air dried*): El secado por aire mata parte de la biomasa y adiciona algo de carbono que no es de biomasa. El F-I da valores de biomasa erróneos en suelos que contienen una gran cantidad de  $\text{CaCO}_3$  libre, suelos a los que se les haya adicionado sustrato recientemente, suelos inundados, o suelos con un pH menor a 4.5.

## Materiales y métodos

NaOH 1 N

Pesar 40 g y disolver en 1 L de agua destilada previamente hervida.

HCl 1 N

Tomar 82.64 mL de HCl concentrado con 37.5% de pureza y disolverlo en 1 L de agua destilada.

HCl 0.1 N

Tomar 8.264 mL de HCl concentrado con 37.5% de pureza y disolverlo en 1 L de agua destilada.

### Valoración del HCl 1 y 0.1 N

Tomar 5 mL de HCl que se desea valorar agregar tres gotas de anaranjado de metilo, adicionar la solución de  $\text{NaHCO}_3$  1 N (pesar 84.01 g de  $\text{NaHCO}_3$  anhídrido y disolver en 1 L de agua destilada). El vire es de canela a amarillo. Para determinar la normalidad real del bicarbonato de sodio:

$$N = \frac{(P_{\text{NaHCO}_3})(N_{\text{NaHCO}_3})}{P\text{-eq}}$$

$P_{\text{NaHCO}_3}$  = peso de bicarbonato de sodio para 1 L.

$N_{\text{NaHCO}_3}$  = normalidad calculada.

P – eq = peso equivalente del sodio.

Para calcular la normalidad real del HCl valorado:

$$N_{\text{HCl}} = \frac{(N_{\text{NaHCO}_3})(\text{alícuota})}{\text{vol. promedio}}$$

$N_{\text{NaHCO}_3}$  = normalidad real del bicarbonato de sodio.

Vol. promedio = volumen promedio gastado de  $\text{NaHCO}_3$  para titular el HCl.

Alícuota = volumen usado de HCl para la titulación.

### INDICADOR ANARANJADO DE METILO

Si está en forma ácida, pesar 0.1 g de anaranjado de metilo en 100 mL de agua; si está como sal, pesar 0.1 g de anaranjado de metilo y disolverlo en 100 mL de agua destilada, al final agregar 1.5 mL de HCl 0.1 N.

### INDICADOR FENOLFTALEÍNA

Pesar 0.5 g de fenolftaleína y disolver en 50 mL de alcohol etílico, aforar a 100 mL con agua destilada.

### Procedimiento

#### PREINCUBACIÓN

Todos los suelos son tamizados (malla <5 mm) y homogeneizados; se toman por duplicado muestras de 25 g de suelo (si se requiere cubrir todas las determinaciones), y se dividen en dos grupos; el primero son las muestras de suelo que será fumigado, el segundo grupo son las muestras de suelo no fumigado. La humedad de las muestras se ajusta al 40% de su CRA con agua destilada. Para ajustar la capacidad de retención de agua (CRA) del suelo, se emplea la metodología propuesta por Castellanos y cols. (2000). El procedimiento se describe en el apartado sobre determinaciones de propiedades físicas de suelos y abonos orgánicos sólidos.

Una vez hecho lo anterior, las muestras son preincubadas para estabilizar el metabolismo microbiano del suelo. Este proceso

consiste en la colocación de las muestras en cubetas de plástico, junto con dos frascos: uno con agua destilada y otro con NaOH 1 N. Las cubetas se cierran y se permite la incubación de las muestras en oscuridad a 25 °C durante 7 días. Después de la preincubación se reajusta la humedad del suelo al 40% de la CRA.

#### DETERMINACIÓN DE CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA

Una vez terminada la preincubación, se toman las muestras de suelo para fumigar, y se colocan dentro de un desecador de vacío sobre papel absorbente húmedo. Junto con las muestras, se coloca un frasco con 25 mL de cloroformo libre de etanol. Ya cerrado el desecador se conecta a una bomba de vacío y se espera a que el cloroformo ebulle por 2 min, una vez cumplido este tiempo, los suelos se incuban 24 h en oscuridad a 25 °C.

Después de la incubación, el cloroformo es evacuado mediante vacío por intervalos de 30 s el procedimiento se repite varias veces (aproximadamente 6–8), hasta que no es detectable al olfato. A ambos suelos (fumigado y no fumigado) se les reajusta la CRA al 40% y las muestras fumigadas son inoculadas con 5% del peso seco de suelo no fumigado.

Posteriormente, tanto los frascos con suelo fumigado como los que contienen suelo no fumigado son transferidos a frascos herméticos de 970 mL cada uno conteniendo un frasco con 20 mL de NaOH 1 M, además se agregan 20 mL de H<sub>2</sub>O en el fondo del frasco de 970 mL para estabilizar la atmósfera. Todas las muestras son incubadas en oscuridad durante 10 días a 25 °C.

Al terminar el período de 10 días de incubación, se determina el contenido de C (reportado en mg-C/kg<sub>ss</sub>) por titulación del NaOH 1 M con HCl 0.1 N. Con la fórmula siguiente:

$$\text{mgC} - \text{CO}_2 / \text{kg}_{\text{ss}} = \left[ \frac{4 \times (V_{\text{HCl}_M} - V_{\text{HCl}_{\text{Bco}}}) \times N_{\text{HCl}} \times 12}{P_{\text{muestra}}} \right] \left( \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \left( \frac{1000 \text{ g}_{\text{ss}}}{1 \text{ kg}_{\text{ss}}} \right)$$

kg<sub>ss</sub> = suelo seco

V<sub>HCl<sub>M</sub></sub> = mL de HCl consumidos por la muestra

V<sub>HCl<sub>Bco</sub></sub> = mL de HCl consumidos por el Bco.

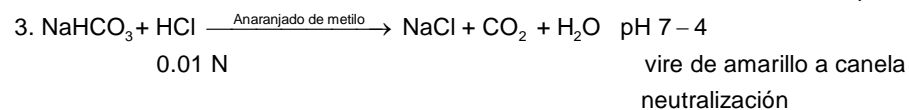
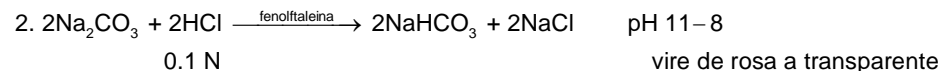
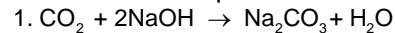
N<sub>HCl</sub> = Normalidad del ácido clorhídrico

4 = volumen utilizado de NaOH, de 20 mL iniciales se toman 5 mL.

12 = equivalente químico del C

P<sub>muestra</sub> = Peso de la muestra

Las reacciones que ocurren en la titulación son:



#### TITULACIÓN DEL NaOH 1 N

Tomar alícuotas de 5 mL de NaOH 1 N y adicionar 20 mL de H<sub>2</sub>O, agregar 1 gota de indicador (fenolftaleína), y adicionar HCl 0.1 N, el cual neutralizara el excedente de NaOH que no reaccionó, se verifica con el paso de solución color púrpura o rosa a transparente, una vez hecho el vire de color, adicionar 5 gotas de indicador anaranjado de metilo, y adicionar HCl 0.01 N, con el cual titularemos el CO<sub>2</sub> secuestrado por el NaOH 1 N. Para verificarlo se observa el cambio de anaranjado a canela. A este procedimiento se le llama retrotitulación.

Una vez determinado el contenido de C en las muestras (ecuación inmediata anterior) se procede a calcular el carbono de la biomasa microbiana mediante la siguiente fórmula:

$$\text{C de Biomasa Microbiana} = \frac{(\text{C-CO}_2 \text{ Fumigado}) - (\text{C-CO}_2 \text{ No Fumigado})}{k_C} = \text{mg-C/kg}_{\text{ss}}$$

kg<sub>ss</sub> = kg de suelo seco

C-CO<sub>2</sub> fumigado = carbono del dióxido de carbono del suelo fumigado

C-CO<sub>2</sub> no fumigado = carbono del dióxido de carbono del suelo no fumigado.

$k_C$  = coeficiente de extracción del carbono de biomasa microbiana después de la fumigación (0.45 a 25 °C) (Jenkinson, 1988).

#### **CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA DEL SUELO Y DE UN ABONO ORGÁNICO POR EL MÉTODO DE FUMIGACIÓN-EXTRACCIÓN**

Jenkinson y cols. (1976) cuantificaron la cantidad de carbono extraíble por fumigación con  $K_2SO_4$  0.5 M, observando una mayor cantidad de este en un suelo fumigado que en el control. Vance y cols. (1987) retomaron este trabajo, mostraron una cercana relación lineal entre carbono de biomasa medido por F-I y el *flux* de carbono orgánico extraíble ( $E_C$ ) que está definido como:

$$E_C = (C_{org. \text{ extraíble del suelo fumigado}}) - (C_{org. \text{ extraíble del suelo no fumigado}})$$

Vance y cols. (1987), propusieron que el carbono de biomasa ( $B_C$ ) puede ser estimado como sigue:

$$B_C = \frac{E_C}{k_{EC}}$$

$E_C$  = carbono orgánico extraíble

$B_C$  = carbono de la biomasa microbiana

$k_{EC}$  = proporción de carbono de biomasa microbiano que es extraído con  $K_2SO_4$  0.5 M.

El valor de  $k_{EC}$  más aceptado en la actualidad es el obtenido por Wu y cols. (1990), que proponen  $k_{EC} = 0.45$ .

#### **Materiales y métodos**

##### **NaOH 1 M**

Pesar 39.99 g y disolver en 1 L de agua destilada previamente hervida.

##### **HCl 1 N**

Tomar 82.64 mL de HCl concentrado con 37.5% de pureza y disolverlo en 1 L de agua destilada.

##### **HCl 0.1 N**

Tomar 8.264 mL de HCl concentrado con 37.5% de pureza y disolverlo en 1 L de agua destilada.

##### **Valoración del HCl 1 y 0.1 N**

Este procedimiento se lleva a cabo igual al señalado en el método de fumigación incubación.

##### **INDICADOR ANARANJADO DE METILO**

Si está en forma ácida, pesar 0.1 g de anaranjado de metilo en 100 mL de agua; si está como sal, pesar 0.1 g de anaranjado de metilo y disolverlo en 100 mL de agua destilada, al final agregar 1.5 mL de HCl 0.1 N.

##### **INDICADOR ORTOFENANTROLINA (FERROINA)**

Pesar 0.7 g de sulfato ferroso heptahidratado y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Posteriormente agregar 1.8 g de 1,10-ortofenantrolina y disolver.

##### **INDICADOR FENOLFTALEÍNA**

Pesar 0.5 g de fenolftaleína y disolver en 50 mL de alcohol etílico, aforar a 100 mL con agua destilada.

##### **DICROMATO DE POTASIO 0.4 N**

Pesar 19.612 g de dicromato de potasio y disolver en 1 L de agua destilada.

##### **SULFATO DE POTASIO 0.5 M**

Pesar de 87.135 g de sulfato de potasio y diluir a 1 L con agua destilada.

##### **MEZCLA DIGESTORA**

Mezclar 100 mL de ácido nítrico ( $HNO_3$ ) concentrado con 200 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado.

##### **SULFATO FERROSO AMONIACAL 0.2 N**

Pesar 78.428 g de sulfato ferroso amoniacal  $[Fe(NH_4)SO_4] \times 6H_2O$ , agregar agua destilada y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Aforar a 1 L con agua destilada. El ácido sulfúrico se agrega con la finalidad de evitar que el sulfato se oxide rápidamente y la normalidad cambie.

## Procedimiento

### PREINCUBACIÓN

Llevar a cabo el proceso de preincubación señalado en el método de fumigación incubación.

### DETERMINACIÓN DE CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA

Una vez terminada la preincubación, ajuste la capacidad de retención de agua al 40%. Una mitad de las muestras a analizar será extraída inmediatamente utilizando 120 mL de una solución de  $K_2SO_4$  0.5 M. Los frascos deben ser cerrados y agitados durante 1 h. Filtrar posteriormente utilizando papel Whatman núm. 42. El extracto será usado para análisis de C orgánico y N inorgánico.

La otra mitad de las muestras se fumigan colocándolas dentro de un desecador, el cual contiene papel filtro humedecido (para mantener la humedad) y 25 mL de cloroformo libre de etanol (esto se logra destilando el cloroformo) en un pequeño matraz con trozos de vidrio o esferas del mismo material (esto tiene la finalidad de romper la tensión superficial del cloroformo y evitar que este al hervir, se proyecte hacia fuera del frasco). El desecador debe evacuarse con una bomba de vacío hasta lograr que hierva durante 2 min y entonces, colocar en oscuridad e incubar a 25 °C.

Después de 24 h, el frasco con cloroformo debe removerse y el vapor del mismo debe ser evacuado repetidas ocasiones (6–8 veces) también con la bomba de vacío antes de la extracción.

Para la extracción, el suelo debe transferirse a un frasco de 250 mL y se adicionan 120 mL de  $K_2SO_4$  0.5 M. Los frascos deben ser cerrados y agitados durante 1 h. Filtrar con papel Whatman núm. 42.

El C orgánico del extracto se determina por digestión de 20 mL del mismo con 10 mL de la mezcla digestora y 5 mL de la solución de dicromato de potasio 0.4 N. Colocar los frascos con la mezcla en autoclave a 15 lb durante 45 min. Dejar enfriar y titular con la solución de sulfato ferroso amoniacal 0.2 N. Adicionar antes ocho gotas de ortofenantrolina.

La manera en que se presentará el vire es la siguiente: el extracto es de color amarillo posteriormente se tornará verde, azul gris y el vire final es a marrón.

Este procedimiento se hace también con las muestras de suelo no fumigadas que se extrajeron inmediatamente.

El contenido de carbono inorgánico se determina en base al  $CO_2$

atrapado por el NaOH 1 M titulado con HCl 0.1 N ya antes descrito en el método de fumigación incubación. El mismo extracto puede ser usado para determinar el nitrógeno inorgánico.

Para determinar el contenido de C orgánico ( $mg\text{-C}/kg_{ss}$ ). Con la fórmula siguiente:

$$mgC/kg_{ss} = \left[ \frac{(V_{HCl_M} - V_{HCl_{Bco}}) \times N_{SFA} \times 7 \times 0.003}{P_{muestra}} \right] \left( \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \left( \frac{1000 \text{ g}_{ss}}{1 \text{ kg}_{ss}} \right)$$

$kg_{ss}$  = suelo seco

$V_{HCl_M}$  = mL de HCl consumidos por la muestra

$V_{HCl_{Bco}}$  = mL de HCl consumidos por el Bco.

$N_{SFA}$  = Normalidad del sulfato ferroso amoniacal

7 = dilución utilizada para analizar las muestras, de 35 mL de la mezcla de extracto-mezcla digestora-dicromato de potasio se toma una alícuota de 5 mL.

$P_{muestra}$  = Peso de la muestra

0.003 = miliequivalente químico del C.

Una vez determinado el contenido de C en las muestras (ecuación inmediata anterior) se procede a calcular el carbono de la biomasa microbiana mediante la siguiente fórmula:

$$C \text{ de Biomasa Microbiana} = \frac{(C\text{-CO}_2 \text{ Fumigado}) - (C\text{-CO}_2 \text{ No Fumigado})}{k_C} = mgC/kg_{ss}$$

$kg_{ss}$  = kg de suelo seco

$C\text{-CO}_2$  fumigado = carbono del dióxido de carbono del suelo fumigado

$C\text{-CO}_2$  no fumigado = carbono del dióxido de carbono del suelo no fumigado.

$k_C$  = coeficiente de extracción del carbono de biomasa microbiana después de la fumigación (0.45 a 25 °C) (Jenkinson, 1988).

### CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO INORGÁNICO ( $\text{NO}_3^-$ , $\text{NO}_2^-$ y $\text{NH}_4^+$ )

La actividad microbiana en suelos y abonos orgánicos se puede cuantificar estimando la velocidad de mineralización del nitrógeno. Las plantas y microorganismos requieren del nitrógeno para su desarrollo, y este elemento se considera como un factor limitante para que se lleven a cabo los procesos biológicos del suelo, de ahí la gran importancia del nitrógeno orgánico en el suelo y abonos orgánicos. La mineralización del nitrógeno ocurre en dos fases, la primera es la amonificación por organismos heterótrofos, y la segunda es la oxidación por bacterias autótrofas del amonio a nitritos y nitratos, que se conoce como nitrificación.

Las tres principales formas biológicas de nitrógeno son las proteínas, los constituyentes de las paredes celulares como la quitina y peptidoglucanos, y los ácidos nucleicos.

La mineralización del nitrógeno orgánico se referirá entonces a la degradación de las proteínas, aminoazúcares y ácidos nucleicos a amonio, su forma mineral. Este proceso está en relación con la temperatura, humedad, cantidad de oxígeno presente, tipo de compuesto y el pH.

El nitrógeno inorgánico producto de la mineralización puede ser inmovilizado y fijado por las arcillas del suelo, también puede continuar el proceso con la reducción de los nitratos hasta nitrógeno atmosférico por la desnitrificación, o bien los nitratos pueden lixivarse a los mantos acuíferos, el exceso de nitratos en los acuíferos puede provocar la proliferación de algas a lo que se le conoce como eutrofización; puede provocar metahemoglobinemia adquirida en niños y animales, por un exceso de metahemoglobina, forma oxidada e inactiva de la hemoglobina, los niveles altos se producen cuando fallan los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo dentro de los globulos rojos y el ion ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) del grupo hemo de la hemoglobina se oxida a su estado ferrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ), esto convierte la hemoglobina en metahemoglobina, esta presenta una mayor afinidad al oxígeno que la hemoglobina, causando una disminución de la capacidad de liberar oxígeno a los tejidos, provocando la hipoxia (coloración azul a marrón en la sangre).

La metahemoglobina se reduce con la donación de electrones de los sistemas enzimáticos de protección como la NADH metahemoglobina reductasa y en menor medida el ácido ascórbico; al haber un exceso de nitratos en los mantos freáticos también se

puede provocar la formación de compuestos carcinogénicos como las nitrosaminas al reaccionar los nitratos con otros compuestos nitrogenados.

Se determina la concentración de nitratos, nitritos y amonio mediante. Se toma el suelo que se incubó para determinar el C de la biomasa microbiana, y se le agregan 120 mL de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.5 M, se coloca en un agitador horizontal a 180 rpm durante 60 min, una vez finalizada la agitación el suelo se filtra con papel whatmann núm. 42. El  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.5 M obtenido se almacena a  $-20^\circ\text{C}$  para posteriores análisis.

### Reactivos

#### $\text{K}_2\text{SO}_4$ 0.5 M

Pesar 87.135 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y disolver en 1 L de agua destilada.

### Clarificación de las muestras

En caso de que la muestra esté demasiado turbia o de color intenso. Esta se puede realizar siguiendo dos métodos:

#### MÉTODO DEL SULFATO DE ZINC ( $\text{ZnSO}_4$ )

##### **Solución de $\text{ZnSO}_4$**

Pesar 100 g de sulfato de zinc, disolver en 500 mL de agua destilada, mezcle y homogenice, afore a 1000 mL con agua destilada.

### Procedimiento

Agregar 1 o 2 mL de la solución de  $\text{ZnSO}_4$  a 100 mL de muestra. Ajustar el pH a 10.5 y dejar reposar unos minutos. Filtrar con papel Whatman núm. 42.

#### MÉTODO DEL HIDRÓXIDO DE ALUMINIO [ $\text{Al}(\text{OH})_3$ ]

##### **Suspensión de $\text{Al}(\text{OH})_3$**

Disolver 125 g de alumbre de potasio [ $\text{K}_2\text{Al}_2(\text{SO}_4)_4 \times 24\text{H}_2\text{O}$ ] y disolver en 1000 mL de agua destilada, calentar a  $60^\circ\text{C}$  y agregar posteriormente 55 mL de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) concentrado lentamente y en agitación constante.

Dejar reposar la mezcla durante 1 h y posteriormente se pasa a un recipiente de mayor capacidad para lavar el precipitado por adiciones (mezclando adecuadamente) y decantaciones sucesivas hasta que se encuentre exento de amoníaco, cloruro de nitrito y nitrato.



## Procedimiento

Adicionar 1 o 2 mL de la suspensión de hidróxido de aluminio a 20 o 25 mL de muestra. Agitar 30 min y filtrar con papel Whatman núm. 42.

## NITRATOS ( $\text{NO}_3^-$ )

Al proceso de conversión del amonio en nitratos mediado por dos grupos de bacterias altamente especializadas: las quimioautótrofas y las aerobias obligadas, se le conoce como nitrificación. Este proceso ocurre en dos etapas: el amonio es oxidado a nitrito y después el nitrito es oxidado a nitrato. El amonio, más que el nitrato, se puede adsorber en los coloides orgánicos e inorgánicos del suelo.

Esta determinación se basa en la cuantificación del  $\text{NO}_3^-$  con el ácido 2,4-fenildisulfónico en un medio ácido, que la añadir el KOH desarrolla el color amarillo de la sal potásica del ácido nitrofenoldisulfónico.

## Materiales y métodos

### ÁCIDO FENILDISULFÓNICO

Disolver 25 g de fenol (usar mascarilla para proteger de los vapores y guantes) blanco puro en 150 mL de ácido sulfúrico concentrado; agitar bien y calentar a baño maría por 2 h. La solución se deja enfriar y se guarda en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

### KOH 12 N

Pesar 673.2588 g y disolverlos en 1 L de agua destilada.

## Procedimiento

1. Primeramente se elabora una curva estándar utilizando nitrato de potasio ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) como solución estándar.

2. Se toma una alícuota de 10 mL de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.5 M de cada muestra, y evaporar a sequedad a  $105^\circ\text{C}$  por 24 h.

3. Las sales presentes en el frasco contenedor de la muestra después de la evaporación deben mezclarse con 2 mL de ácido fenildisulfónico a cada frasco con muestra seca, agitando manualmente hasta disolver.

4. Hecho lo anterior, se agregan 20 mL de agua, y con una varilla de vidrio se termina de disolver la muestra. A esta solución se le

agregan 7 mL de KOH 12 N (o más hasta lograr máximo desarrollo de color amarillo, no más de 20 mL). Finalmente filtrar o decantar para eliminar cualquier hidróxido floculado. Afore a 50 mL con agua destilada.

5. Por último, se mide la absorbancia a 410 nm. Reportar en  $\mu\text{gNO}_3^- \text{-N}/\text{g}_{\text{ss}}$ .

## SOLUCIÓN STOCK DE $\text{NO}_3^-$

1. Secar  $\text{KNO}_3$  en un horno a  $105^\circ\text{C}$  por 24 h.

2. Disuelva 0.7218 g en agua y afore a 1 L con agua destilada

(concentración de  $100 \mu\text{gNO}_3^- \text{-N}/\text{mL}$ ).

3. Preservar con 2 mL de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ )/L; esta solución es estable por al menos seis meses.

4. Solución estándar de  $\text{NO}_3^-$ ; diluya 50 mL de la solución madre de nitrato en 500 mL con agua destilada; para obtener una solución de concentración  $10.0 \mu\text{gNO}_3^- \text{-N}/\text{mL}$ .

5. De la solución estándar de  $10.0 \mu\text{gNO}_3^- \text{-N}/\text{mL}$ , tomar 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mL para hacer la curva estándar de nitratos (Figura 1).

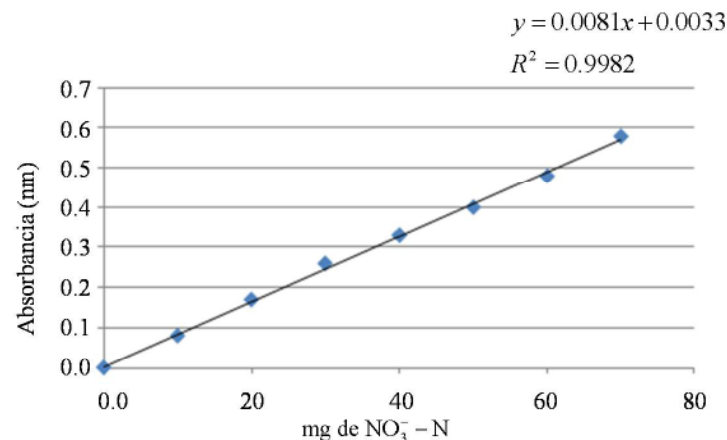


Figura 1. Curva de la solución estándar de  $\text{KNO}_3$  ( $10.0 \mu\text{g}$ ) a 410 nm.

## NITRITOS ( $\text{NO}_2^-$ )

El contenido de nitritos en suelo normalmente es muy pequeño;

sin embargo, en suelos abonados con fertilizantes nitrogenados se pueden acumular cantidades apreciables. El nitrito se determina por la formación de un colorante azopúrpura rojizo, producido a pH de 2.0–2.5 por acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorhidrato de NED).

### Materiales y métodos

ÁCIDO ETILENDIAMINTETRAACÉTICO DISÓDICO (EDTA DISÓDICO)

Disuelva 0.50 g de EDTA disódico en agua libre de nitritos y diluya a 100 mL.

### ÁCIDO SULFANÍLICO

Disuelva completamente 0.60 g de ácido sulfanílico en 70 mL de HCl concentrado, afores a 100 mL con agua destilada (desionizada) y mezcla cuidadosamente.

CLORHIDRATO DE NAFTILAMINA

Disuelva 0.60 g de  $\alpha$ -naftilamina y agregar 1 mL de HCl concentrado en agua destilada y afores a 100 mL con agua destilada. Una vez preparada la solución guardar en refrigeración y en frasco ámbar (duración máxima del reactivo de 2–3 semanas). Por precaución, maneje este reactivo con extremo cuidado, utilice pipeta automática, evite inhalación y la exposición a la piel, ya que la  $\alpha$ -naftilamina es un agente carcinógeno.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ACETATO DE SODIO 2 M

Disuelva 16.4 g de  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$  o 27 g de  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada exenta de nitritos, afores a 100 mL. Filtre si la solución no está clara.

### Procedimiento

1. Primeramente se elabora una curva estándar utilizando nitrito de sodio (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de solución).

2. Se toma una alícuota de 10 mL de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.5 M de cada muestra, y se le agregan 40 mL de agua destilada y/o desionizada.

3. Posteriormente en una campana de extracción, se le adicionan: 2 mL de clorhidrato de naftilamina, y se mezcla manualmente; 1 mL de EDTA, y se mezcla manualmente; 1 mL de ácido sulfanílico, y se mezcla manualmente. Se deja en reposo por 10 min. Después agregar 1 mL de clorhidrato de naftilamina, y se mezcla manualmente.

4. Hecho lo anterior, se agrega 1 mL de acetato de sodio y se agita manualmente. Dejar en reposo por 45 min.

5. Por último, se mide la absorbancia a 520 nm. Reportar en  $\mu\text{gNO}_2^-/\text{g}_{\text{ss}}$ .

La disolución desarrolla una coloración rojo intenso, en caso de excesiva coloración, hacer diluciones antes de leer al espectrofotómetro.

SOLUCIÓN STOCK DE  $\text{NO}_2^-$

1. Pesar 1.232 g de  $\text{NaNO}_2$  y aforar a 1 L con agua destilada (concentrado de 250  $\mu\text{g NO}_2^- - \text{N}/\text{mL}$ ).

2. Tomar 50 mL de esta solución y aforar a 250 mL con agua destilada (concentrado de 50  $\mu\text{g NO}_2^- - \text{N}/\text{mL}$ ).

3. De esta solución tomar 50 mL y aforar a 500 mL con agua destilada (concentrado de 5  $\mu\text{g NO}_2^- - \text{N}/\text{mL}$ ).

4. De la solución estándar de 5  $\mu\text{g NO}_2^- - \text{N}/\text{mL}$ , tomar 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mL para elaborar la curva estándar de nitritos (Figura 2).

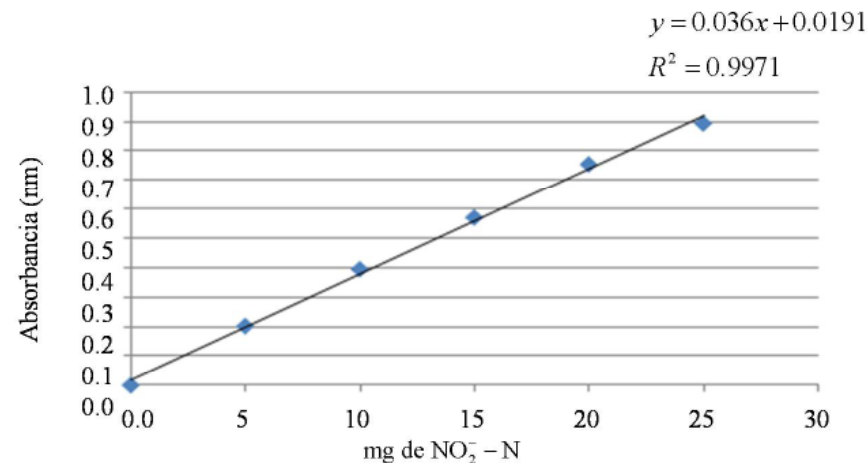


Figura 2. Curva de la solución estándar de nitrito de sodio (5.0  $\mu\text{g}$ ) a 520 nm.

## AMONIO ( $\text{NH}_4^+$ )

El nitrógeno orgánico en forma de proteínas y ácidos nucleicos, es convertido por la descomposición microbiana a amonio, por un proceso conocido como amonificación.

La primera etapa de la hidrólisis de las proteínas, es la liberación de aminoácidos, los cuales son hidrolizados en condiciones aerobias o anaerobias.

La velocidad de amonificación depende de la relación C/N de los compuestos orgánicos, a baja relación C/N se obtienen altas tasas de amonificación.

Con excepción de la hidrólisis de urea por la enzima ureasa extracelular, la amonificación es enlazada al metabolismo de las células activas.

El método de determinación de amonio es una modificación del método de Azul de Indofenol descrito por Keeney y Nelson (1982), solo que se usa salicilato en vez de indofenol para producir color. Por ello es menos tóxica y el análisis puede hacerse fuera de la campa de extracción.

## Materiales y métodos

### NITROPRUSIATO-SALICILATO

Pesar 0.12 g de nitroprusiato de sodio, disolverlo en 70 mL de agua destilada y agregar 7.813 g de salicilato de sodio. Llevar al volumen de 100 mL con agua destilada, debe ser colocado en obscuridad (duración máxima de la solución es de 2-3 semanas).

### ÁCIDO ETILENDIAMINTETRAACÉTICO DISÓDICO (EDTA DISÓDICO)

Pesar 0.6 g de EDTA disódico y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Refrigerar hasta su uso.

### AMORTIGUADOR DE HIPOCLORITO DE SODIO

- Disolver 2.96 g de NaOH en 10 mL de agua destilada con agitación magnética.

- Pesar 9.96 g de fosfato de sodio dibásico y disolverlo en 65 mL de agua destilada con agitación magnética hasta que esté completamente disuelto y transparente (no refrigerar). Agregar el fosfato disuelto en agua al NaOH, lentamente y con agitación magnética.

- Posteriormente agregar 10 mL de hipoclorito de sodio (cloralex)

por cada 100 mL de solución. Agitar hasta homogenizar. Aforar a 100 mL con agua destilada. Colocar la solución en un frasco y no refrigerar (duración no mayor a dos semanas, pues se precipitan las sales).

- Medir el pH, de ser necesario ajustar a  $13 \pm 0.2$  con una solución de NaOH.

Primero se disuelve el NaOH en agua y luego se agrega el fosfato, porque si no se cristaliza el fosfato y es muy difícil disolverlo. Del mismo modo, se debe procurar que no haya cambios bruscos de temperatura, porque las sales pueden cristalizar y no disolverse más).

## Procedimiento

1. Primero se elabora una curva usando como estándar sulfato de amonio ( $2 \mu\text{g/mL}$ ).

2. Se toma una alícuota de 1.5 mL de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.5 M de cada muestra, y se procesan de la siguiente manera: a cada frasco se le agregan 0.5 mL de EDTA disódico (esta solución evita interferencia por precipitación de cationes polivalentes particularmente el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$ ), 2 mL de nitroprusiato, 2.5 mL de agua y 1 mL de amortiguador de hipoclorito de sodio y mezclar manualmente. Por último se agregan 1.5 mL de agua destilada.

3. Si se forma un precipitado después de la adición del amortiguador de hipoclorito de sodio, debe usarse una alícuota más pequeña o el doble de EDTA disódico.

4. Calentar en baño maría 30 min a  $40^\circ\text{C}$  (rango de  $37-40^\circ\text{C}$ ). Se deja enfriar hasta que se iguale la temperatura a la del ambiente, de 10-25 min. En este lapso también se formará una coloración amarilla.

5. Leer a 660 nm usando celda de cuarzo. Reportar en  $\mu\text{gNH}_4^+ - \text{N} / \text{g}_{\text{ss}}$ .

## Solución stock de $\text{NH}_4^+$

1. Pesar 0.7003 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y aforar 1 L con agua destilada (concentrado de  $0.1 \text{ g NH}_4^+ - \text{N} / \text{mL}$ ).

2. Tomar 50 mL de esta solución y aforar a 500 mL con agua

destilada (concentrado de  $10 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N} / \text{mL}$ ).

3. De esta solución se toman 20 mL y se aforan a 100 mL con agua destilada (concentrado de  $2 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N} / \text{mL}$ ).

4. De la solución estándar de  $2 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N} / \text{mL}$ , tomar 0, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3.5 y 5 mL para elaborar la curva estándar de amonio (Figura 3).

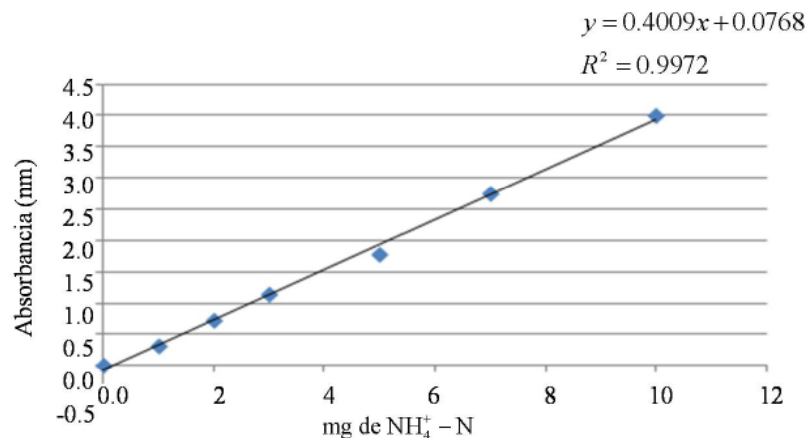


Figura 3. Curva de la solución estándar de sulfato de amonio ( $2.0 \mu\text{g}$ ) a  $660 \text{ nm}$ .

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA

En la oxidación biológica de compuestos orgánicos intervienen procesos de deshidrogenación y estos se llevan a cabo por enzimas del grupo oxidoreductasas (E.C. 1), que actúan con compuestos orgánicos con grupo funcional alcohol, aldehído, alcanos, aminas primarias y secundarias como donadores de electrones, y compuestos como  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ , citocromos, oxígeno, disulfuros, entre otros como aceptores de electrones (Moss, 2013).

Las deshidrogenasas presentan alta especificidad a sustratos, y su actividad se puede determinar mediante sistemas de deshidrogenasas, los cuales son parte integral de los microorganismos, y estos sistemas pueden ser utilizados como indicadores de la actividad microbiana del suelo.

Hay diversos reportes de que los sistemas de deshidrogenasas se han utilizado para comparar suelos sin perturbar y suelos agrícolas, para evaluar la incorporación de residuos frescos al suelo, y para

evaluar suelos perturbados y suelos contaminados con metales pesados, pesticidas y por lluvia ácida. El método se basa en el supuesto de que en condiciones de anaerobiosis (ausencia de  $\text{O}_2$ ) el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC) actúa como aceptor de H, formándose el rojo de trifeniltetrazoliumformazan (TPF). Esto se puede explicar con la siguiente reacción:



#### Materiales y métodos

Reactivos

**ACETONA O ALCOHOL METÁLICO GRADO REACTIVO**

**CARBONATO DE CALCIO**

2, 3, 5-CLORURO DE TRIFENILTETRAZOLIUM (TTC) 3%

Pesar 3 g de TTC y aforar a 100 mL con agua destilada.

SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE ROJO DE TRIFENILTETRAZOLIUMFORMAZAN (TPF)

Pesar 100 mg de TPF y disolver en 80 mL de acetona grado reactivo, después de esto, aforar a 100 mL con acetona grado reactivo, la concentración final de la solución será  $1000 \mu\text{g}$  de TPF/mL de acetona.

PREPARACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE TPF

Para preparar la curva se toman 0, 0.5, 1.0, 2.0 3.0 y 4.0 mL de la solución estándar de TPF en un matraz aforado de 50 mL, se adicionan 8.3 mL de buffer tris (pH 7.6) y aforar a 50 mL con acetona para obtener las siguientes concentraciones: 0, 10, 20, 40, 60 y  $80 \mu\text{g}$  de TPF/mL.

#### Procedimiento

Se pesan 2 g de suelo, previamente ajustada su CRA al 40%, en tubos de ensayo de  $16 \times 150 \text{ mm}$  por triplicado, y se adicionan 67 mg de  $\text{CaCO}_3$ , 1 mL de solución de TTC y 2.5 mL de agua destilada.

Mezclar en vortex para que la muestra libere el aire atrapado (tanto como sea posible). Incubar los tubos por 24 h a  $37^\circ\text{C}$ . Al finalizar la incubación, el trifenilformazan (TPF) formado por la reducción del TTC se extrae agitando a mano en un embudo de

separación con 10 mL de acetona por 5 min y filtrando. Repetir este paso de siete a ocho veces para asegurar la extracción completa del TPF. El filtrado se afora a 50 mL con acetona, y se leen las muestras en un espectrofotómetro de luz visible a una absorbancia de 485 nm usando acetona como blanco

La actividad deshidrogenasa en suelos es expresada como  $\mu\text{g}$  de TPF producido/ $\text{g}_{\text{ss}}$  en 24 h. La absorbancia de las muestras se compara con una curva estándar de TPF en acetona, construida con concentraciones entre 0-1000 mg/L. Los blancos se utilizan con extractos acetónicos o metanólicos de suelo sin TTC o TPF.

La lectura de las concentraciones ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de la curva de calibración se debe corregir por los valores control y calculados.

Para calcular la actividad deshidrogenasa ( $\mu\text{g}$  de TPF/ $\text{g}_{\text{ss}}$ /día), para el peso de suelo seco, se debe tomar 1 g de suelo húmedo y se deja secar 48 h a 37 °C, se usa la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad deshidrogenasa} = \frac{(\text{TPF})(40)}{P_{\text{muestra}}}$$

TPF = concentración de TPF en  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

$P_{\text{muestra}}$  = peso del suelo seco (g).

40 = volumen de acetona adicionada a la muestra de suelo en el ensayo.

### Evaluación de microbiológica de suelos y abonos orgánicos sólidos

#### EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

La microflora del suelo presente en la fracción biótica del mismo y del abono orgánico sólido, conformada por las bacterias, hongos, actinomicetos, entre otros, juegan un papel clave en los ciclos de los nutrientes, descomposición de desechos y residuos, control de patógenos del suelo, así como en la desintoxicación de compuestos contaminantes en el ambiente.

Las actividades de los microorganismos del suelo y del compost afectarán la calidad del ambiente no solo por la sobreproducción de algún compuesto químico, sino también por las fallas en la desintoxicación de contaminantes, o por proliferación indeseable de biomasa (eutrofización).

La importancia de los procesos del suelo mediados por microorganismos nos lleva a entender el efecto a largo plazo de la diversa microflora nativa del suelo. Las actividades de las poblaciones de microorganismos del suelo están tan relacionadas entre sí que la suma de todas las actividades de todas las poblaciones dentro de una comunidad produce un efecto más acentuado, lo que es difícil de relacionar.

Por ejemplo, no es posible separar los efectos directos de un tratamiento en un organismo en particular de los efectos indirectos resultantes de la inhibición o estimulación de un segundo organismo, por el que el primer organismo solo tiene una relación de neutralismo.

Por esta razón es difícil interpretar los efectos de tratamientos particulares en los microorganismos del suelo o en sus funciones, o aun para entender la causa real de los efectos que se han demostrado. Por lo que el incremento en la actividad microbiana benéfica está relacionado con el incremento de materia orgánica. La biota del suelo regula varias funciones críticas. La reducción excesiva de la biodiversidad del suelo, especialmente la pérdida de especies claves y/o especies con funciones únicas, puede tener efectos ecológicos en cascada, al conducir a un deterioro a largo plazo de la fertilidad del suelo y a la pérdida de la capacidad productiva agrícola.

#### MÉTODO COMÚN DE SIEMBRA MICROBIOLÓGICA

##### Materiales y métodos

##### PREPARACIÓN DE INÓCULO

1. Se comienza elaborando una solución de suelo 10% (p/p). Para ello, se toman 10 g de la muestra a probar, los cuales se diluyen en condiciones de esterilidad en 90 mL de agua destilada estéril. A partir de este punto se debe procurar trabajar en condiciones de asepsia.

2. Se agita la muestra por cinco min, hasta lograr una buena suspensión del suelo en el solvente.

3. Con una pipeta estéril de 10 mL se añade esa misma cantidad (dilución 1:10) de la mezcla inicial a otro recipiente con 90 mL de agua destilada estéril y así sucesivamente, hasta la obtener tantas diluciones como se desee. Nota: cambiar la pipeta de una dilución a otra para no alterar las diluciones.

## SIEMBRA

1. Sembrar las diluciones predeterminadas anteriormente según el grupo microbiano a estudiar. En el caso de la siembra por el método *de viables*, se realizará por triplicado y se sembrará 1 mL de la dilución. En este caso se debe añadir el medio de cultivo con una temperatura que lo soporte la mejilla del microbiólogo. Una vez añadido el medio se agita la placa horizontalmente cinco veces a la derecha y cinco veces a la izquierda, teniendo cuidado de forma que no se derrame el medio fundido.

2. Si se tratase de medio semisólido, se inocula de 0.2 a 0.3 mL de la dilución en cada tubo.

En trabajo seriado, si la siembra se realiza de la dilución menor a la mayor es posible utilizar solo una pipeta para sembrar en placa. Por el contrario, si la siembra se realiza de la dilución mayor a la dilución menor, la pipeta debe cambiarse rigurosamente en cada dilución.

### Cuenta viable de bacterias totales

Para la cuantificación de bacterias totales se deben preparar diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), como se explicó en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 20 min o a 20 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min.

Para bacterias se debe inocular 0.1 mL de muestra de cada dilución y con una varilla de vidrio acodada se debe expandir la muestra en el medio. Para el óptimo desarrollo de las bacterias, el medio se debe incubar a 28 °C según el tipo de bacteria, se van a cuantificar las colonias emergentes a las 24, 48 y 72 h. Para que sus resultados sean representativos debe hacer replicas ( $\geq 3$ ).

### Medio extracto de suelo (Zuberer, 1986)

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos para: 1000 mL de medio

- pH: 6.8–7.0
- Agar: 15.0 g
- Glucosa: 1.0 g
- $K_2HPO_4$ : 0.5 g
- Extracto de suelo: 100.0 mL
- $H_2O$  destilada: 900 mL

## Procedimiento

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE SUELO (1:1 SUELO: AGUA)

1. Se tamiza el suelo con malla 20.
2. Se agrega agua destilada relación 1:1 (suelo: agua).
3. Esterilizar la mezcla por 20 min a 15 lb/in<sup>2</sup>.
4. Se filtra en embudo con papel filtro y algodón.
5. Se agrega  $CaCO_3$  (es opcional) 0.5 g/L.

Es de este extracto (esterilizado-filtrado) que se tomarán los 100 mL para preparar el medio de cultivo. En caso de que no se complete el volumen necesario (del filtrado) se puede completar el volumen con agua destilada.

Para evitar el crecimiento de hongos en este medio se puede utilizar un fungicida como la ciclohexamida (se esteriliza por filtración) 40 mg/L. Esta se agrega en condiciones de asepsia, ya que el medio esté estéril pero aún caliente (soportable al tacto con la mano) para poder agitarlo y disolver el fungicida de manera homogénea.

El extracto de suelo también se puede utilizar para cuenta viable de bacterias degradadoras de celulosa empleando el medio siguiente:

#### REACTIVOS PARA 1000 mL

- $K_2HPO_4$ : 0.5 g
- $NO_3 \times NH_4O$ : 15 g
- Carboximetil celulosa: 1.25 g
- Agar: 20 g
- Extracto de suelo<sup>6</sup>: 100 mL
- $H_2O$ : 900 mL

## Procedimiento

Mezclar todos los componentes en 500 mL de agua destilada, ajustar el pH a 6.5 y aforar a 1000 mL con agua destilada. Esterilice el medio, deje enfriar y vierta en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

<sup>6</sup> Para preparar el extracto de suelo, se sigue la metodología empleada para preparar el medio extracto de suelo.

## **AGAR NUTRITIVO**

### **Materiales y métodos**

REACTIVOS PARA: 1000 mL

- Agar nutritivo: 20 g
- H<sub>2</sub>O destilada: 1000 mL

### **Procedimiento**

Mezclar los componentes en 500 mL de agua destilada, homogeneizar, ajustar el pH a 7.0 y aforar a 1000 mL con agua destilada.

## **AGAR NUTRITIVO**

Si no cuenta con el agar nutritivo comercial, lo puede preparar con la siguiente metodología.

### **Materiales y métodos**

REACTIVOS PARA 1000 mL

- Peptona: 5 g
- Extracto de carne: 3 g
- Extracto de levadura: 1 g
- Agar: 15 g
- Glucosa: 5 g
- Agua: 1000 mL

### **Procedimiento**

Mezclar los componentes en 500 mL, homogenizar, ajustar a pH 7.0 y aforar a 1000 mL. Esterilice el medio, deje enfriar y vierta en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

## **AGAR SOYA TRIPTICASA (MARTIN, 1975)**

También conocido como TSA, por sus siglas en inglés Trypticase Soy Agar, es un medio de crecimiento no selectivo, donde crecen diversos tipos de microorganismos, aun cuando en el medio TSA no crecen todos los tipos de bacterias, si crecen la mayoría. Presenta mayor uniformidad y fácil preparación que el agar extracto de suelo.

### **Materiales y métodos**

REACTIVOS PARA 1000 mL

- Caldo soya tripticasa: 3 g

- Agar: 15 g
- Agua :1000 mL

### **Procedimiento**

Mezclar los componentes en 500 mL de agua, homogenizar y aforar a 1000 mL con agua destilada. Esterilice el medio, deje enfriar y vierta en las cajas de Petri, siembre ya que solidifique.

## **LECHE PEPTONADA**

En este medio crecen más microorganismos que en el agar extracto de suelo, dando colonias más pigmentadas y de actinomicetos en mayor cantidad comparado con el agar extracto de suelo o agar soya tripticasa.

### **Materiales y métodos**

REACTIVOS PARA 1000 mL

- Leche peptonada: 1 g
- Ciclohexamida; 0.1 g
- Agar: 15 g
- Agua destilada: 1000 mL

### **Procedimiento**

Mezclar los componentes en 500 mL de agua, homogenizar y aforar a 1000 mL con agua destilada. Esterilice el medio, deje enfriar y vierta en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

## **AGAR CUENTA EN PLACA**

### **Materiales y métodos**

REACTIVOS PARA 1000 mL

- Triptona (digestión pancreática de caseína): 5 g
- Extracto de levadura: 2.5 g
- Glucosa: 1.0 g
- Agar :15 g
- Agua destilada: 1000 mL

### **Procedimiento**

Mezclar los componentes en 500 mL de agua, homogenizar y aforar a 1000 mL con agua destilada. Esterilice el medio, deje enfriar y vierta en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

## TINCIÓN GRAM

La tinción Gram se usa para clasificar a las bacterias, en positivo o negativo, la designación Gram (+) o G<sup>+</sup> se da a las células que retienen el cristal violeta después de ser expuestas a una solución de yoduro de potasio (lugol), safranina y alcohol cetona, la coloración se da al reaccionar el cristal violeta con los peptidoglucanos de la pared celular, mientras que las Gram (-) o G<sup>-</sup>, al carecer de peptidoglucanos en su pared celular no retienen el color.

Las bacterias G<sup>+</sup> tienen la capacidad de hidrolizar compuestos complejos, como la quitina, al producir enzimas líticas como las quitinasas, caso contrario las bacterias G<sup>-</sup> hidrolizan compuestos sencillos, como los carbohidratos.

### Reactivos

- Alcohol cetona
- Safranina
- Cristal violeta
- Lugol

### Procedimiento

Con una asa bacteriológica tome un poco de muestra y colóquela en el porta objetos, fije la muestra al porta objetos con calor, una vez esté seca la muestra, se agregan unas gotas de cristal violeta y se deja en reposo 1 min, se lava con agua destilada, después se vierte un poco de lugol sobre la muestra y se deja en reposo 1 min, una vez terminado el minuto se lava con agua destilada, se agregan unas gotas de alcohol cetona y se deja en reposo de 10 a 15 s, después se lava con agua destilada, y por último se agrega la safranina y se deja en reposo un minuto, y se lava con agua destilada. Observar en microscopio, en los objetivos de 10 y 45X.

### Cuenta viable de actinomicetos

En los medios de cultivo para cuantificar actinomicetos, también puede haber desarrollo de bacterias, para diferenciar las colonias basta tocar la colonia con una aguja de disección, las colonias de actinomicetos no se rompen, se deslizan por la superficie del medio, en cambio las colonias de bacterias sí se rompen.

Para la cuantificación de actinomicetos totales se deben preparar diluciones pero como su abundancia en suelos y abonos orgánicos no es tan alta como las bacterias, por lo tanto se ocupan

menos diluciones ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ), en caso de que en la dilución  $10^{-2}$  la abundancia sea incontable, se puede preparar una dilución más, como se explicó en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 20 min o a 20 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min.

Para actinomicetos se debe inocular 0.1 mL de muestra de cada dilución y con una varilla de vidrio acodada se debe expandir la muestra en el medio. Para el óptimo desarrollo de los actinomicetos, el medio se debe incubar a 37 °C, se van a cuantificar las colonias emergentes a las 48 y 72 h. Para que sus resultados sean representativos debe hacer réplicas ( $\geq 3$ ).

## MEDIO CZAPECK DOX

### Materiales y métodos

- Agar de Czapeck Dox 50 g/L

### Procedimiento

Mezclar los componentes en 500 mL, calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 min, hasta disolver completamente, aforar a 1000 mL con agua destilada. Esterilice el medio, deje enfriar y vierta en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

## MEDIO CASEÍNA AGAR

### Materiales y métodos

REACTIVOS PARA: 1000 mL pH 7.0

- Almidón soluble: 10 g
- Caseína: 1 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.5 g
- Agar: 10 g
- H<sub>2</sub>O destilada: 1000 mL

### Procedimiento

Mezclar todos los componentes en 500 mL en agua destilada, ajustar el pH 7.0, aforar a 1000 mL. Esterilice el medio, deje enfriar y vierta en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

## AGAR DE ALMIDÓN Y CASEÍNA

### Materiales y métodos

REACTIVOS PARA 1000 mL

- Agar: 15 g
- Almidón: 10 g



- Caseína (libre de vitaminas): 0.3 g
- KNO<sub>3</sub>: 2.0 g
- NaCl: 2.0 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 2.0 g
- MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O: 0.05 g
- CaCO<sub>3</sub>: 0.02 g
- FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O: 0.01 g
- Agua: 1000 mL

### Procedimiento

Mezcle todos los componentes en 500 mL de agua destilada, homogenice, ajuste a pH 7.2, aforar a 1000 mL con agua destilada. Esterilice el medio, deje enfriar y vierta en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

### Cuenta viable de propágulos de hongos

En los medios de cultivo para cuantificación de hongos en muestras de suelo y abonos orgánicos, se deben preparar diluciones (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>), como se explicó en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 20 min o a 20 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min.

Para hongos se debe inocular 1.0 mL de muestra de cada dilución y con una varilla de vidrio acodada se debe expandir la muestra en el medio. Para el óptimo desarrollo de los hongos, el medio se debe incubar a 37 °C, se van a cuantificar las colonias emergentes con desarrollo de micelio a las 48 h. Para que sus resultados sean representativos debe hacer replicas (≥ 3).

### MEDIO MARTIN

#### Reactivos para: 1000 mL pH 5.5-6.0

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1.0 g
- MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0.5 g
- Peptona: 5.0 g
- Dextrosa: 10 g
- Rosa de Bengala al 1%: 3.3 mL
- Agar bacteriológico: 20 g
- H<sub>2</sub>O: 1000 mL
- Estreptomicina: 30 mg/L

La estreptomicina es termolábil y se esteriliza por filtración con una membrana de 0.22 μm de tamaño de poro, se almacena a -20 °C. Se recomienda preparar una solución madre de 100 mg de estreptomicina en 10 μL de agua

### Solución de rosa de bengala 1%

Tomar 1 mL de rosa de bengala y aforar a 100 mL con etanol.

### Procedimiento

Mezclar todos los componentes en 500 mL de agua destilada, ajuste el pH 5.5–6.0, homogenice y aforar a 1000 mL con agua destilada. Esterilice, deje enfriar a 48 °C, y agregue la estreptomicina. A este medio también se le conoce como medio rosa de bengala con estreptomicina, deje que solidifique el medio y siembre.

### AGAR DE PAPA DEXTROSA

También conocido como medio PDA (papa dextrosa agar). Es un medio que se puede utilizar para el cultivo de levaduras y hongos filamentosos.

### Materiales y métodos

- Reactivos para 500 mL
- Infusión de papa: 200 mL
- Agua: 300 mL
- Agar: 20 g
- Glucosa: 20 g

### Procedimiento para la infusión de papa

Trocee 200 g de papa (sin pelar) las papas, agregue 1 L de agua destilada, hierva 30 min. Filtre utilizando algodón o tela. Conserve el filtrado.

### Procedimiento

Mezcle los 200 mL de infusión de papa, con el agua, y glucosa, homogenice y ajuste el pH a 5.6±0.2, agregue los 15 g de agar. Esterilice el medio, deje enfriar y vierta en las cajas de Petri, ya que solidifi que siembre.

### Cuenta viable de levaduras

Las levaduras son hongos que se desarrollan formando agregados

y que pueden presentar diferentes formas, desde globosas hasta cilíndricas, también formas alargadas u ovoides, a diferencia de los hongos filamentosos que presentan micelio verdadero y microscópico. Las levaduras, en medio sólido se desarrollan formando colonias semejantes a las de las bacterias.

Otra diferencia entre las levaduras y los hongos filamentosos, es que las levaduras, pueden ser identificadas mediante las pruebas bioquímicas.

En los medios de cultivo para cuantificación de levaduras en muestras de suelo y abonos orgánicos, se deben preparar diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ), como se explicó en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 20 min o a 20 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min.

Para hongos se debe inocular 0.1 mL de muestra de cada dilución y con una varilla de vidrio acodada se debe expandir la muestra en el medio. Para el óptimo desarrollo de los hongos, el medio se debe incubar a 25 °C, se van a cuantificar las colonias emergentes a las 96 h. Para que sus resultados sean representativos debe hacer replicas ( $\geq 3$ ).

#### **AGAR CZAPEK PROPIONATO DE SODIO**

##### **Materiales y métodos**

REACTIVOS PARA 100 mL

- Propionato de sodio: 3.5 g
- Sacarosa: 30 g
- Nitrate de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ): 2.0 g
- Fosfato bipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ): 1.0 g
- Cloruro de potasio (KCl): 0.5 g
- Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ): 0.5 g
- Sulfato de hierro ( $\text{FeSO}_4$ ): 0.01 g
- Agar: 15 g
- Agua destilada: 100 mL

##### **Procedimiento**

Mezclar todos los componentes en 80 mL de agua, menos el  $\text{FeSO}_4$ , mezcle bien y homogeneice, agregue el  $\text{FeSO}_4$ , afore a 100 mL con agua destilada. Esterilice, deje enfriar a temperatura ambiente, ajuste el pH a 3.5 con una solución estéril de ácido láctico al 10%. Use inmediatamente. Vierta el medio en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre. El medio puede ser almacenado sin acidificarse hasta su uso.

#### **AGAR GLUCOSA PEPTONA EXTRACTO DE LEVADURA**

##### **Materiales y métodos**

1000 mL

- Glucosa: 5.0 g
- Peptona: 1.0 g
- Extracto de levadura: 2.0 g
- Nitrate de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ): 1.0 g
- Fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ): 1.0 g
- Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ): 0.5 g
- Cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ): 0.01 g
- Bilis de buey bacteriológica: 5.0 g
- Propionato de sodio: 1.0 g
- Agar: 20.0 g
- Agua destilada: 940 mL

##### **Procedimiento**

Mezclar todos los componentes en 500 mL de agua destilada, homogeneice, y afore a 1000 mL con agua destilada. Esterilice, deje enfriar a 48 °C. Prepare una solución de antibióticos disolviendo 30 mg de clorotetraciclina y 30 mg de estreptomina en 60 mL de agua destilada estéril, esterilice la solución por filtración con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, y adicione al medio cuando esté frío y usar inmediatamente. Vierta el medio en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

#### **MEDIO DE LIPOMYCES**

##### **Materiales y métodos**

REACTIVOS PARA 1000 mL

- Glucosa: 5.0 g
- Timina: 0.5 g
- Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 1.0 g
- Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ): 0.5 g
- Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ): 0.01 g
- Agar purificado: 10.0 g
- Agua destilada: 940 mL

##### **Procedimiento**

Mezclar todos los componentes en 500 mL de agua destilada, homogeneice y esterilice, deje enfriar a 48 °C. Prepare una solución de antibióticos con 200 mg de ciclohexamida (Actidiona), 100 mg de

estreptomycin, 50 mg de aureomicina en 60 mL de agua destilada estéril, esterilice la solución de antibióticos por filtración, adicionar al medio cuando este frío. Vierta el medio en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

Danielson y Jurgensen (1973) recomiendan agregar Tergitol NP-27 a una concentración final de 100 ppm para facilitar la dispersión del inóculo. Este género de levaduras ha sido aislado en medios de cultivo libres de nitrógeno, siendo este medio selectivo para identificar el género *Lipomyces* en muestras de suelo.

### Medio para evaluar grupos fisiológicos

En los medios de cultivo para cuantificación de bacterias y hongos degradadores de grupos fisiológicos como celulosa, quitina, lignina y pectina entre otros en muestras de suelo y abonos orgánicos, se deben preparar diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ), como se explico en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 20 min o a 20 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min.

Se debe inocular 1 mL de muestra de cada dilución y con una varilla de vidrio acodada se debe expandir la muestra en el medio. Para el óptimo desarrollo de bacterias y hongos, el medio se debe incubar a 28 °C para bacterias y 37 °C para hongos, se van a cuantificar las colonias emergentes a las 24, 48 y 72 h. Para que sus resultados sean representativos debe hacer réplicas ( $\geq 3$ ).

#### MEDIO MÍNIMO

Materiales y equipo

REACTIVOS PARA: 1000 mL

- Agar: 18 g
- NaNO<sub>3</sub>: 3.00 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O: 1.31 g
- MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O: 0.50 g
- KCl: 0.50 g
- FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O: 0.01 g

#### Procedimiento

Mezcle los componentes en 500 mL de agua destilada, ajuste a pH 5.5 si se desea aislar hongos, o ajustarlo a 7.0 si se desean aislar bacterias. Afore a 1000 mL con agua destilada. Esterilice el medio, deje enfriar y vierta en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

Si se desean cuantificar los organismos degradadores de lignina

se utiliza el colorante remazol azul brillante R (RBBR).

Para degradadores de celulosa y pectina, primero se calienta el agua, se disuelven las sales, se calienta el agua de nuevo, y se disuelve la pectina o la celulosa (si se calienta el agua después de haber agregado la pectina o la celulosa, aumenta la tensión superficial del agua y esta se derrama, por eso ya que se disuelven en el agua caliente, no se debe volver a calentar), se dejar enfriar para poder ajustar el pH (bacterias a 7.0 y hongos a pH 5.5), se agrega el agar y se esteriliza en autoclave, deje enfriar el medio y viértalo en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

Para aislar degradadores de quitina, se calienta el agua para disolver las sales, se ajusta el pH (a 7.0 para bacterias o a 5.5 para hongos), calentar el agua y agregar el agar y la quitina, como ninguno de los dos se van a disolver en el agua, luego esterilice en autoclave, deje enfriar el medio y viértalo en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

### Método para solubilizadores de fósforo

En los medios de cultivo para cuantificación de bacterias y hongos solubilizadores de fósforo en muestras de suelo y abonos orgánicos, se deben preparar diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ), como se explicó en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 20 min o a 20 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min.

Para hongos se debe inocular 1 mL de muestra de cada dilución y con una varilla de vidrio acodada se debe expandir la muestra en el medio. Para el óptimo desarrollo de bacterias y hongos, el medio se debe incubar a 28 °C para bacterias y 37 °C para hongos, se van a cuantificar las colonias emergentes a las 24, 48 y 72 h. Para que sus resultados sean representativos debe hacer replicas ( $\geq 3$ ).

#### MEDIO RAMOS CALLAO

REACTIVOS PARA: 1000 mL PH 7.0

- Extracto de levadura: 2 g
- Glucosa: 20 g
- Fosfato tricálcico: 2 g
- H<sub>2</sub>O destilada: 1000 mL
- Agar: 22 g

#### Procedimiento

Disuelva los componentes en 500 mL de agua, ajuste el pH y afore

a 1000 mL con agua destilada. Esterilice el medio, déjelo enfriar y viértalo en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre. Incube a 30 °C. Cuente a las 72 h, se contarán los microorganismos que tengan halo de solubilización del fosfato fijado.

Hacer aclaración respecto a qué microbiota es la predominante.

### Método para fijadores de nitrógeno

El proceso de fijación biológica de nitrógeno inicia con la amonificación del nitrógeno orgánico inmovilizado en las biomoléculas de macro y microorganismos, y posteriormente el amonio ingresa a la nitrificación, proceso en el cual la bacteria nitrosomona oxida el amonio a nitrito, y después la bacteria nitrobacter oxida a los nitritos a nitratos. En esta técnica se busca aislar a las bacterias que posean la capacidad de fijar el nitrógeno, al formarse halos de inhibición en la superficie del medio.

En los medios de cultivo para cuantificación de bacterias fijadoras de nitrógeno en muestras de suelo y abonos orgánicos, se deben preparar diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ), como se explicó en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 20 min o a 20 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min.

Para hongos se debe inocular 1 mL de muestra de cada dilución y con una varilla de vidrio acodada se debe expandir la muestra en el medio. Para el óptimo desarrollo de bacterias y hongos, el medio se debe incubar a 37 °C en obscuridad, contar a los 7–10 días después de incubación las diluciones que tengan halo de inhibición, es decir, que presenten un halo de degradación alrededor. Para que sus resultados sean representativos debe hacer replicas ( $\geq 3$ ).

### MEDIO WATANABE

#### Soluciones madre para preparar el medio Watanabe

SOLUCIÓN I 1000 mL

- $H_3BO_3$ : 750 mg
- $ZnSO_4 \times 7H_2O$ : 0 mg
- $CoSO_4 \times 7H_2O$ : 350 mg
- $CoSO_4 \times 4H_2O$ : 21.8 mg
- $MnCl_2 \times 4H_2O$ : 20 mg
- $H_2O$  destilada: 1000 mL

SOLUCIÓN II 1000 mL

- $FeSO_4 \times 7H_2O$ : 0.8 g

- $MgSO_4 \times 7H_2O$ : 4.0 g
- $Na_2MoO_4 \times 7H_2O$ : 0.1180 g
- $CaCl_2 \times 2H_2O$ : 20 mg
- EDTA ácido: 0.800 g
- Solución I: 4 mL
- $H_2O$  destilada: 996 mL

SOLUCIÓN III 1000 mL

- $KH_2PO_4$ : 40 g
- $K_2HPO_4$ : 60 g
- $H_2O$  destilada: 1000 mL

### Medio Watanabe para fijadores de nitrógeno

REACTIVOS PARA 1000 mL

- Glucosa: 5 g
- Manitol: 5 g
- Almidón\*: 4.5 g
- Ácido málico: 3.5 g
- Agar: 1.75 g

\*Solubilizar antes en  $H_2O$  destilada caliente, tener este volumen en cuenta en el medio final.

### INDICADOR AZUL DE BROMOTIMOL AL 1%

Pesar 1 g del indicador y disolver en 100 mL de etanol.

### Procedimiento

Añadir 50 mL de la solución II y 15 mL de la solución III. Ajustar a pH 6.8-7.2. Añadir al medio 20 mL/L del indicador azul de bromotimol al 1% en etanol. Esterilice el medio, deje enfriar y viértalo en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

### MEDIO SELECTIVO HAGEDORN Y HOLT

Es un medio selectivo para aislar bacterias Gram (+) del género *Arthrobacter* Conn y Dimmick (1947). Las bacterias de este género son aerobias obligadas con forma de bacilos.

### Materiales y métodos

REACTIVOS PARA 1000 mL

- Caldo soya triptica: 4.0 g

- Extracto de levadura: 2.0 g
- Cloruro de sodio (NaCl): 20.0 g
- Ciclohexamida (actidiona): 0.1 g
- Agar: 15.0 g
- Agua destilada: 1000 mL

### Procedimiento

Mezclar todos los componentes en 500 mL, homogeneizar y aforar a 1000 mL con agua destilada. Esterilice el medio, deje enfriar a 48 °C. Preparar una solución de rojo de metilo 1.5 g en 10 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Adicionar 1 mL/L de medio de cultivo. La concentración final del rojo de metilo podrá ser de 150 µg/mL. Use inmediatamente. Vierta el medio en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre.

### MEDIO HALÓFILO

Es un medio selectivo para bacterias Gram (-) del género *Chromobacterium* Bergonzini (1880). Las bacterias de este género son bacterias anaeróbicas facultativas.

### Materiales y métodos

1000 mL

- Extracto de carne: 0.25 g
- Extracto de levadura: 0.5 g
- Peptona: 1.25 g
- Cloruro de sodio (NaCl): 1.25 g
- Agar: 1.5 g
- Agua destilada: 1000 mL

### Procedimiento

Mezclar todos los componentes en 500 mL de agua destilada, homogeneizar y aforar a 1000 mL de agua destilada. Esterilice el medio y enfriar a 48 °C, adicionar desoxicolato de sodio y colistina hasta obtener una concentración final de 0.3 mg/mL y 15 mg/mL, respectivamente.

Los antibióticos pueden ser esterilizados mediante filtración antes de su adición. Adicionar ciclohexamida disuelta en acetona hasta obtener una concentración de 30 mg/mL. Vierta el medio en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre. Incube las cajas de Petri en forma invertida a temperatura ambiente y en presencia de luz

durante 5 o 6 días, cuente las colonias típicas de *Chromobacterium*.

### Información del análisis

#### Bacterias y actinomicetos

Para cuantificar las unidades formadoras de colonia (UFC) se puede leer directamente en placa a simple vista o bien utilizando un cuenta colonias, ya que se tiene el número de colonias, se multiplica por la alícuota que se tomó y por la dilución y se divide entre el peso de la muestra, para obtener las UFC/g<sub>ss</sub> o UFC/mL. Se puede emplear la siguiente fórmula.

$$UFC = \frac{(\text{No. de colonias})(\text{dilución})}{\text{peso de la muestra}}$$

Por ejemplo si se tuvieron 38 colonias en la dilución 10<sup>-3</sup> y se tomaron inicialmente 10 g de muestra, quiere decir que multiplicaremos 38 por 1000 entre 10 g, o bien si se tienen 40 colonias en la dilución 10<sup>-1</sup> y se tomaron 10 g de muestra, se tendrán (40 x 10) / 10 = 400 UFC/mL o 400 UFC/g<sub>ss</sub>.

Debido a la heterogeneidad en la abundancia de microorganismos en la muestra de suelos y abonos orgánicos sólidos, para analizar los datos en un paquete estadístico es necesario la transformación angular o arcoseno de las UFC/mL o UFC/g<sub>ss</sub> encontradas, es decir, para que los datos presenten distribución normal. Para ello se puede utilizar la siguiente fórmula:

$$Y = (\text{Arcsen})(UFC/g_{ss}) \left( \frac{\pi}{180} \right)$$

Si usa calculadora debe estar en radianes (rad), y para Excel de Windows use la fórmula directamente.

El error estándar de las muestras, se puede obtener mediante la siguiente fórmula:

$$\text{error estándar} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

s = desviación estándar de la muestra

n = número de repeticiones

Si se emplea algún equipo para inocular los medios de cultivo, en el manual de uso del equipo le mencionarán el procedimiento para cuantificar las UFC.

## Hongos

Para cuantificar los propágulos de hongos filamentosos totales se puede leer directamente en placa a simple vista o bien utilizando un cuenta colonias, ya que se tiene el número de colonias, se multiplica por la alicuota que se tomó y por la dilución y se divide entre el peso de la muestra, para obtener los propágulos/g<sub>ss</sub> o propágulos/mL. Se puede emplear la fórmula aplicada para la cuenta viable de bacterias, y al igual que en las bacterias y actinomicetos, el número de propágulos de hongos filamentosos totales necesita ser normalizado.

### ENSAYO *IN VITRO* DE ACTIVIDAD SUPRESIVA CONTRA FITOPATÓGENOS

#### EFFECTO DEL ABONO ORGÁNICO SÓLIDO SOBRE *PYTHIUM SPP.*, *RHIZOCTONIA SOLANI* Y *FUSARIUM OXYSPORUM*

#### Materiales y métodos

##### MEDIO PAPA DEXTROSA AGAR (PDA)

Lavar perfectamente 200 g de papas; estas se pelan y se cortan en cubitos de 1 cm por lado, se ponen en un recipiente con agua y se hierven por 5 min, se separan las papas cocidas del caldo y este se cuele y se vuelve a poner en el recipiente anterior; luego se agrega 15 g de agar-agar y se agita constantemente para evitar la formación de grumos, después de disuelto el agar se agregan 20 g de dextrosa y se calienta hasta que suelte el hervor. El medio se esteriliza a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 20 min o a 20 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min.

#### Procedimiento

El hongo se inocula en medio PDA por la técnica de colonia gigante y se incuba a 37 °C en oscuridad. Cuando este alcance de 1–1.5 cm de diámetro se coloca el compost alrededor de la colonia fúngica, horadando el medio de cultivo con un sacabocados estéril y colocando el compost con pinzas estériles en cada pocillo. Finalmente se incuban nuevamente las cajas de Petri a 37 °C.

*Pythium spp.* crece muy rápido, por lo que se colocan al mismo tiempo el hongo y el abono orgánico sólido en el medio PDA.

Medir el halo de inhibición a las 24, 48 y 72 h, después de aplicar

el abono orgánico sólido, para evaluar el efecto sobre el desarrollo del micelio del hongo, ver Cuadro 1.

**Cuadro 1. Criterio para evaluar efecto sobre el hongo**

Símbolo	Categoría	cm del halo de inhibición
++	Inhibió bien	> 1.0
+	Inhibió	0.1-1.0
-	No inhibió	0

### HONGOS MICORRÍFICO-ARBUSCULARES

#### Extracción de esporas de hongos micorrízico-arbusculares de suelo

Los hongos micorrízico-arbusculares (HMA) son hongos habitantes del suelo pertenecientes al filum *Glomeromycota*. Estos hongos forman relaciones simbióticas obligadas con las raíces de la mayoría de las plantas terrestres, de las cuales obtienen los compuestos carbónicos esenciales para completar su ciclo de vida. En retribución, los HMA proveen a la planta con nutrimentos minerales, principalmente fósforo, contribuyendo así al bienestar de la planta anfitriona. Gracias a este intercambio hongo-raíz y a la naturaleza cosmopolita de dichos hongos, esta simbiosis (micorrízica-arbuscular) juega un papel fundamental en el balance de nutrimentos en los agro y ecosistemas.

Los HMA forman esporas asexuales, ya sea dentro o fuera de las raíces, de talla muy superior a la mayoría de los hongos, esto es, esporas cuyo diámetro oscila entre de 20–500 µm aproximadamente (incluso pueden apreciarse a simple vista).

Sin embargo, son organismos muy plásticos y las esporas pueden tomar formas globosas a muy irregulares según el medio en el que se forman. El recuperar las esporas de un determinado suelo para su observación nos puede dar una idea de qué tipos de HMA están presentes en dicho suelo y qué tan abundantes son. También nos permite aislarlas para estudiar más profundamente al organismo al cual pertenecen.

La forma más simple para recuperar las esporas de una muestra de suelo bruto es por el método de tamizado húmedo y decantación:

## Material

1. Cubeta de 2–5 L de capacidad.
2. Juego de tamices de 38, 106, 250 y 500  $\mu\text{m}$  de apertura de malla.
3. Piseta.
4. Cajas de Petri.
5. Suelo.

## Procedimiento

1. Se toma una muestra de suelo, generalmente de 100 g de peso y se coloca en la cubeta.
2. Se agrega agua corriente, de preferencia vigorosamente, hasta un volumen adecuado que permita introducir la mano sin que se derrame de la cubeta. Este paso suspenderá esporas y partículas minerales en el agua.
3. Con la mano se van rompiendo poco a poco los terrones y otros aglomerados que estén presentes en la mezcla hasta que se eliminen por completo.
4. Una vez eliminados todos los terrones, se agita la mezcla vigorosamente para permitir que las esporas se separen totalmente de la fracción mineral de la muestra.
5. La mezcla se deja asentar por espacio máximo de 1 min y se decanta inmediatamente sobre los tamices para separar las esporas.
6. Se colocan los tamices uno sobre otro, ordenándolos de mayor a menor apertura de malla (es decir, el de 500  $\mu\text{m}$  quedará arriba y el de 38 abajo). Se puede seleccionar según se desee el número y apertura de malla para definir el grado de separación de partículas.
7. Sobre los tamices se decanta el sobrenadante de la mezcla preparada. En caso de que la muestra sea muy rica en esporas o de que no se tenga noción de la abundancia de esporas en la muestra, se recomienda repetir los pasos dos a siete de dos a tres veces.
8. Con ayuda de la piseta, recuperar las partículas retenidas por los tamices de 38, 106 y 250 en una caja de Petri.
9. Observar al estéreo-microscopio.

En caso de que la muestra recuperada tenga un alto contenido de partículas minerales de suelo se recomienda limpiar la muestra por centrifugación en gradiente de sacarosa.

El paso 8 se realiza con la menor cantidad de agua posible. En

tubos para centrifuga de 50 mL de capacidad, se colocan 30 mL de una solución de sacarosa 2–2.5 M y el sobrenadante recuperado se añade sobre esta solución cuidadosamente. De manera alternativa, se puede colocar la muestra directamente en los tubos de centrifugación y añadir al fondo del tubo los 30 mL de solución de sacarosa con ayuda de una pipeta o de una jeringa provista con una aguja de longitud adecuada.

Finalmente, los tubos se centrifugan a  $g$  (gravedad)  $\times 1000$  durante 3 min. Inmediatamente después se decanta el sobrenadante sobre el tamiz de interés (38  $\mu\text{m}$ ) y se enjuaga la muestra sobre el tamiz con agua limpia para eliminar la sacarosa. Recomenzar a partir del paso 8 para finalizar el procesado de muestras.

Conteo de esporas: Una vez recuperada la muestra de esporas limpias se procede al conteo de esporas totales con ayuda de un microscopio estereoscópico. Los resultados se expresan en núm. total de esporas por 100 g de muestra. Para este propósito y evitar falsos conteos, se puede recurrir a cajas de Petri con fondo cuadrulado, a tubos capilares para descartar esporas contadas.

Es importante señalar que las esporas presentes en una muestra se encuentran en condiciones muy diversas. Así pues, estas pueden estar infestadas superficialmente por bacterias y hongos (incluyendo levaduras), los cuales pueden ser patogénicos para las plantas. Del mismo modo, no todas las esporas serán viables, habrá esporas muertas, dañadas o incluso sin contenido citoplásmico. Estas condiciones deben tomarse en cuenta en caso de que se realicen estudios precisos de densidad de inóculo, ensayos de germinación, viabilidad o análisis molecular.

## CLARIFICACIÓN-TINCIÓN DE RAÍCES Y ESTIMACIÓN DE LA COLONIZACIÓN RADICAL POR HONGOS MICORRÍZICO-ARBUSCULARES

El micelio de un HMA se puede separar en dos fases, una extraradical, que comprende el micelio que se desarrolla fuera de la raíz, el cual es responsable de explorar el suelo y absorber y trasladar los minerales que proporciona a la planta anfitriona. Este micelio es capaz de colonizar nuevas raíces y de formar esporas. La segunda fase se forma intraradicalmente, es la responsable del intercambio de nutrientes con la planta y se compone de hifas que colonizan el córtex radical las cuales pueden formar arbusculos (origen del nombre común de los hongos), esporas, y en algunos taxones vesículas.

Dado que el impacto que tiene la simbiosis sobre el desarrollo de la planta depende en gran medida de la interacción íntima raíz-hongo, es conveniente tratar de medir el nivel de la colonización de la raíz por parte del HMA ya que este es un indicador de la biomasa intraradical acumulada por el hongo así como de la superficie de interacción hongo-raíz.

Con el objeto de determinar este grado de colonización radical se han desarrollado varios métodos desde tinciones simples hasta ensayos enzimáticos y de fluorescencia. Las tinciones simples siguen siendo las más utilizadas y prácticas, todas ellas tienen en común la necesidad de aclarar las raíces previamente a la tinción de las estructuras fúngicas. Diversas soluciones (potasa, blanqueador o agua oxigenada) se pueden usar durante el aclarado de raíces, así como diversos colorantes (azul de tripano, tinta permanente, rojo nilo, fucsina) se pueden emplear para observar al hongo (Gange y cols., 1999).

#### 116 CLARIFICACIÓN-TINCIÓN

##### Materiales y métodos

- Muestras de raíces
- Solución de KOH 1 M
- Solución de HCl 1%
- Tinta para pluma fuente azul permanente (2% en HCl 1%)
- Glicerol acidificado (ejemplo: 50% glicerol en HCl 1% o 75% glicerol en HCl 5%)
- Tubos de ensayo de 15–25 mL
- Cajas de Petri
- Portaobjetos, cubreobjetos

##### Procedimiento

1. Lavar bien las raíces con agua corriente.
2. Cortar las raíces en segmentos de 1–3 cm de longitud.
3. Introducir las raíces en los tubos de ensayo de manera que ocupen máximo  $\frac{1}{4}$  del volumen del tubo.
4. Para clarificar pigmentos solubles en álcali, añadir KOH 1 M hasta 50 o 75% del volumen del tubo de ensayo según la intensidad de la pigmentación de las raíces. Calentar los tubos de ensayo entre 60 y 80 °C durante 1 h. Si las raíces no están muy pigmentadas se pueden dejar a temperatura ambiente por 24 h para clarificar.
5. Después de calentar las raíces por 1 h se dejan reposar.

Las raíces con poca pigmentación requieren reposo mínimo de 2 h, las más pigmentadas se pueden reposar por otras 24 h.

6. Enjuagar las raíces con agua corriente para remover el álcali (se puede apoyar con un colador de cocina).

7. Habiendo removido el álcali, las raíces se acidifican con HCl 1% con volumen suficiente para sumergir las raíces por completo. Agitar levemente e inmediatamente eliminar el HCl y agregar la tinta acidificada hasta 50 o 75 % del volumen del tubo.

8. Los tubos se pueden calentar nuevamente a 60 °C por 2 h, se dejan enfriar y las raíces teñidas se pasan a una solución acidificada de glicerol para remover excesos de colorante.

9. Finalmente, los fragmentos de raíz se montan sobre portaobjetos agregando una o dos gotas de glicerol acidificado fresco y se cubren con cubreobjetos para la observación al microscopio. Hay que tomar en cuenta la disposición de las raíces al momento de montarlas en laminillas, para el método de estimación descrito a continuación, se sugiere montar las raíces de forma paralela al eje más largo de la laminilla y las observaciones se hacen perpendicularmente a dicho eje para facilitar el conteo (flecha punteada) (Figuras 4 y 5).

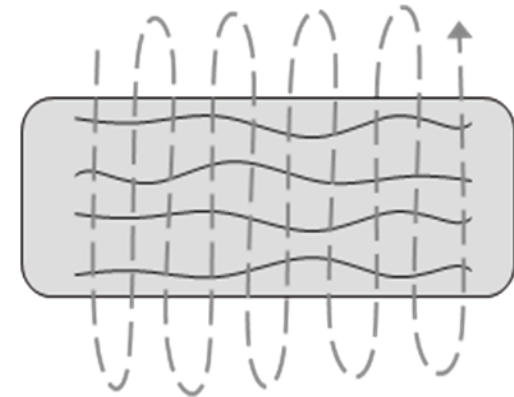


Figura 4. Representación esquematizada del montaje de raíces y de la dirección de observación sugeridas para el método Mcgonigle y cols. (1990).

Existen varios aspectos adicionales que se deben considerar al momento de realizar una clarificación-tinción de raíces. Es preferible ensayar el método de clarificación-tinción con la planta de interés para poner a punto la técnica y no desperdiciar muestras



experimentales. También es preferible trabajar con muestras frescas de raíz. El protocolo aquí especificado puede servir de base para una versión adaptada a las propias necesidades de trabajo según los recursos que se tengan y según las muestras de raíz (por ejemplo, raíz leñosa comparada con raíz no leñosa). Por lo tanto, se puede ensayar clarificar aún más las raíces con hipoclorito de sodio (10% blanqueador casero) o agua oxigenada si el KOH resulta insuficiente.

Sin embargo se debe ser cauteloso en el uso del blanqueador porque impide una tinción óptima.

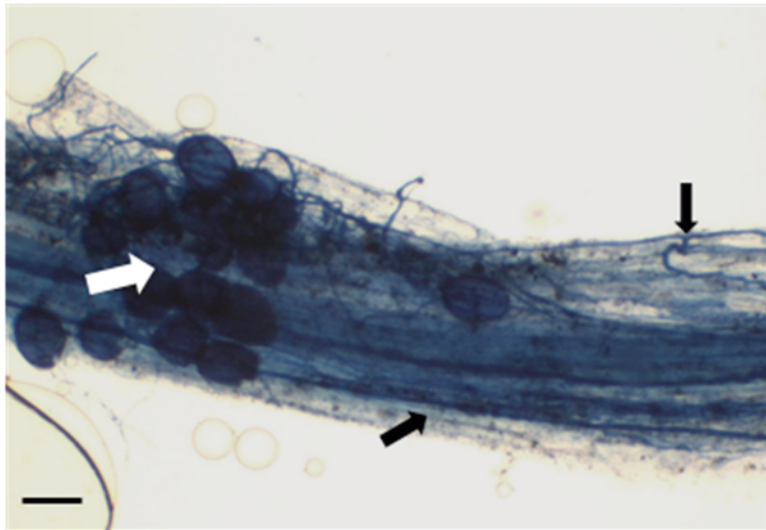


Figura 5. Micrografía de campo claro de una raíz de *Allium porrum* colonizada por *Glomus* sp. teñida con tinta azul permanente. En la imagen se pueden apreciar hifas (flechas negras) y vesículas (flecha blanca) intrarradicales. Barra= 50  $\mu$ m

Es pertinente señalar que si las raíces no fueron clarificadas correctamente y la tinción resulta insatisfactoria, se pueden recuperar las muestras de raíz y someterlas nuevamente ya sea a clarificación, tinción o ambas para mejorar el contraste de las muestras.

Al igual que para las técnicas de clarificación-tinción, existen diversas técnicas para estimar el grado de colonización radical las cuales pueden requerir microscopio estereoscópico o compuesto según sea el caso. Es aconsejable revisar varias de ellas para elegir la más apropiada para el estudio que se realiza.

Aquí exponemos la técnica desarrollada por McGonigle y cols. (1990), una técnica es sencilla, rápida y reduce la subjetividad de las estimaciones. Sin embargo esta no toma en cuenta intensidades o abundancias de hifas, arbusculos o vesículas, solo el porcentaje de presencia del hongo en la raíz.

## ESTIMACIÓN DE LA COLONIZACIÓN

### Materiales y métodos

- Laminillas con raíces clarificadas y teñidas.
- Microscopio óptico.
- Objetivo con gradícula en cruz.

### Procedimiento

1. Las laminillas se observan en el microscopio a una magnificación de 200X.

2. Con el campo visual del objetivo con gradícula, se deben hacer pasadas perpendiculares al eje largo de la laminilla sobre las raíces (intersecciones). Siempre a intervalos constantes (6, 8, 10) por raíz. Estos intervalos deben respetarse al menos por laminilla (Figura 6).

3. El punto de intersección gradícula-raíz se considera el punto donde el centro de la gradícula toca por primera vez el margen de la raíz (Figura 6).

4. Una vez determinado este punto, el objetivo con la gradícula es rotado si así se requiere de tal manera que uno de los ejes cruce perpendicularmente al eje longitudinal de la raíz (Figura 6).

5. Para examinar cada intersección, el plano focal se mueve a través de la raíz y se registra si la gradícula corta hifas, arbusculos o vesículas. En caso de que la raíz exceda el campo visual, la evaluación debe hacerse en dos campos que abarquen el ancho de la raíz.

6. Las intersecciones se registran en las siguientes categorías: (i) negativas (no se encuentran estructuras fúngicas), (ii) solo hifas, (iii) arbusculos y (iv) vesículas (Cuadro 2). Si la gradícula corta una o más hifas, arbusculos, o vesículas la categoría correspondiente solo incrementa por 1. El número total de intersecciones es aquel de las intersecciones con la raíz y no las intersecciones con cada estructura del hongo. Las pasadas visuales sobre secciones de raíces que no tienen córtex no deben ser contadas.

7. El porcentaje de colonización arbuscular (CA) y vesicular (CV) se obtienen dividiendo el número de arbusculos y vesículas respectivamente, entre el total de intersecciones. Sin embargo,

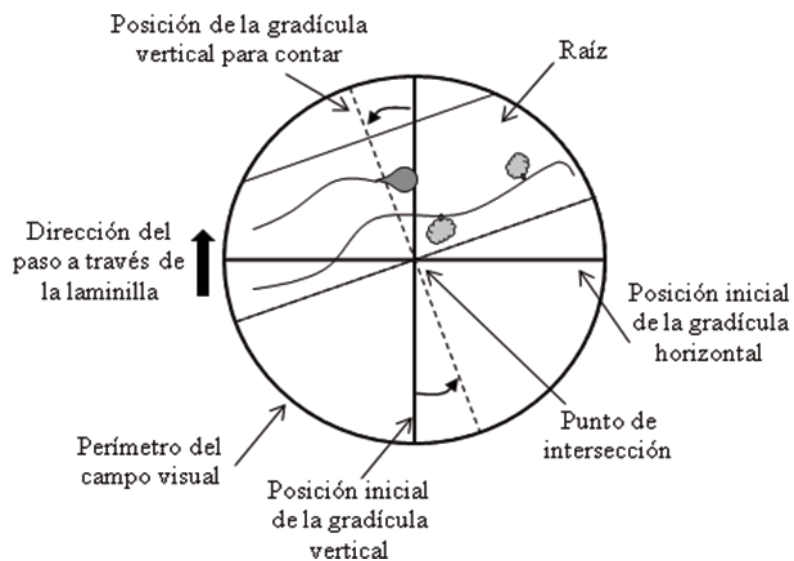


Figura 6. Esquema que muestra una intersección magnificada gradícula-raíz cuando la raíz no está perfectamente alineada con el eje horizontal.

la colonización hifal (CH) se determina dividiendo el número de intersecciones positivas (no-negativas) entre el total de intersecciones (Cuadro 2).

Se recomienda hacer no menos de 150 a 200 observaciones (intersecciones) por planta. Una forma sencilla y adecuada para hacerlo es establecer tres laminillas por planta con 50 observaciones por laminilla. No obstante, la magnitud de los análisis de colonización radical y de muestreos por planta deben adecuarse a las necesidades experimentales: biomasa radical total, profundidad en el suelo, extensión radical en el suelo, disponibilidad de raíces, entre otros.

De ser posible, se recomienda que una segunda persona sea quien etiquete las muestras para minimizar aun más el sesgo ligado al observador.

Cuando se analizan muestras provenientes de campo se debe considerar que una misma raíz puede estar colonizada por más de una especie de hongo, las tinciones simples no reflejan la diversidad presente en la muestra ya que no hacen distinción entre grupos taxonómicos.

Sin embargo, la presencia de células auxiliares en hifas extrarradicales o la ausencia de vesículas en la colonización radical pueden indicarnos que la raíz está colonizada por algún hongo de la familia Gigasporaceae.

#### DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA INMUNOREACTIVA (GLOMALINA) POR ELISA

La glomalina es una glucoproteína termoestable secretada por las hifas de los hongos endomicorrícicos, esta glucoproteína protege a las hifas durante el transporte de nutrimentos desde la planta hasta el extremo de la hifa, y desde el suelo hasta la planta; cuando las hifas dejan de transportar nutrimentos y senescen, la glomalina contenida en su tejido es liberada y se acumula en el suelo. La glomalina actúa mejorando la estabilidad de los agregados del suelo, la estructura del suelo y actúa como un sumidero de carbono en el suelo.

La determinación de la cantidad de glomalina en suelo, puede ser usado como un indicador de la actividad del suelo y de la actividad fúngica, Wright y Upadhyaya (1998) reportan un mayor contenido de glomalina en suelos de bosque comparado con los suelos de pastizales.

Treseder y Turner (2007) observaron mayor concentración de glomalina en suelos de bosque tropical que en suelos de bosque templado, pero menores concentraciones de la glucoproteína en suelos agrícolas y aun menores en suelos desérticos.

El contenido de glomalina en suelo se puede hacer por cuatro métodos: proteína reactiva en suelo por Bradford (BRSP), proteína fácilmente extraíble en suelo por Bradford (EE-BRSP), proteína Inmunoreactiva en suelo (IRSP), y proteína Inmunoreactiva fácilmente extraíble en suelo (EE-IRSP).

La proteína fácilmente extraíble es la fracción de glomalina obtenida en un ciclo de extracción, cuando los suelos son autoclaveados a 121 °C (grados centígrados) por 30 min con una solución de citrato de sodio 20 mM a pH 7.0. Si este procedimiento se desarrollo por períodos de autoclaveado más largos y el citrato de sodio es más alcalino y concentrado, se obtiene la concentración total de glomalina.

El análisis de proteína por Bradford es un método general para determinar concentración de proteínas, mientras que los ensayos con proteína inmunoreactiva se hacen mediante ELISAs con un anticuerpo específico para este compuesto.

**Cuadro 2. Ejemplificación del registro y estimación de la colonización radical por arbusculos, vesículas e hifas según McGonigle y cols. (1990).**

Raíz	Laminilla	INTERSECCIONES					COLONIZACIÓN (%)		
		Negativas <sup>a</sup>	Arbusculos <sup>b</sup>	Vesículas <sup>c</sup>	Hifas <sup>d</sup>	Total <sup>e</sup>	CA <sup>f</sup>	CV <sup>g</sup>	CH <sup>h</sup>
A	1	14	15	1	20	50			
	2	27	10	2	11	50			
	3	35	8	2	10	55			
	Total	76	33	5	41	155	21.3	3.2	51.0
B	1	11	8	1	30	50			
	2	9	11	1	29	50			
	3	27	0	1	22	50			
	4	27	4	0	19	50			
	Total	74	23	3	100	200	11.5	1.5	63.0

<sup>a</sup> = Intersecciones donde la gradícula no cruzó con ninguna estructura fungica (arbusculos, vesículas e hifas). <sup>b</sup> = Intersecciones donde la gradícula cruzó al menos un arbusculo. <sup>c</sup> = Intersecciones donde la gradícula cruzó al menos una vesícula. <sup>d</sup> = Intersecciones donde la gradícula cruzó al menos una hifa pero no arbusculos o vesículas. <sup>e</sup> = Número total de intersecciones. Este número debe ser registrado de manera independiente y no como la suma de a, b, c y d porque en una misma intersección se pueden registrar b y c. <sup>f</sup> =  $(33/155)100$  y  $(23/200)100$ . <sup>g</sup> =  $(5/155)100$  y  $(3/200)100$ . <sup>h</sup> =  $(155-76/155)100$  y  $(200-74/200)100$ .

La determinación por ELISA es más acertada que el método de Bradford, porque el anticuerpo utilizado es específico para la glomalina, en cambio el método de Bradford es general para todo tipo de proteína, esto último es importante porque en el proceso de extracción se extraen también ácidos húmicos, taninos, y otras proteínas contenidas en el suelo, es decir, no es específico para glomalina.

### Materiales y métodos

#### ÁCIDO CLORHÍDRICO 1 M

Tome 8.62 mL de HCl concentrado y agregue 70 mL de agua destilada, mezcle durante 5 min y afore a 100 mL con agua destilada.

#### ÁCIDO CLORHÍDRICO 0.1 M

Pese 0.862 mL de HCl concentrado y agregue 70 mL de agua destilada, mezcle durante 5 min y afore a 100 mL con agua destilada.

#### HIDRÓXIDO DE SODIO 10 M

Pese 40 g de NaOH y disuelva en 50 mL con agua destilada, mezcle durante 5 min y afore a 100 mL con agua destilada.

#### HIDRÓXIDO DE SODIO 0.1 M

Pese 0.399 g de NaOH y disuelva en 50 mL con agua destilada, mezcle durante 5 min y afore a 100 mL con agua destilada.

#### CITRATO DE SODIO 20 mM

Pese 5.161 g de citrato de sodio y disuelva en 200 mL con agua destilada, afore a 1 L.

#### CITRATO DE SODIO 50 mM

Pese 12.9 g de citrato de sodio y disuelva en 200 mL con agua destilada, afore a 1 L.

#### BUFFER FOSFATO ALCALINO (PBS) 1X

Pese 8.06 g de NaCl, 0.22 g de KCl, 1.15 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0.20 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , agregue 500 mL de agua destilada, ajuste el pH a 7.4 con HCl 1 M o NaOH 10 M (según sea necesario). Una vez ajustado el pH, afore a 1 L con agua destilada. Esterilice en autoclave y almacene

a temperatura ambiente (uso rutinario) o bajo refrigeración entre 4 y 8 °C.

#### **BUFFER DIETANOLAMINA**

Tomar 97 mL de dietanolamina concentrada y disolver en 800 mL de agua destilada, ajuste el pH a 9.8, y afore a 1 L con agua destilada.

#### **Procedimiento**

##### EXTRACCIÓN DE LA GLOMALINA

La metodología es la reportada por Wright y Upadhyaya (1996). Se toma 1 g de muestra previamente secada, y se coloca en un tubo con 8.0 mL de citrato de sodio 20 mM a pH 7.0. Las muestras se colocan en una autoclave, a 121 °C por 30 min, y posteriormente se centrifugaron a 5000 g (gravedad) por 15 min.

Recuperar el sobrenadante, y almacenarlo a 4 °C, esta fracción también se le conoce como la proteína fácilmente extraíble.

De ser necesario repita el procedimiento, con citrato de sodio 50 mM a pH 8.0, hasta que el sobrenadante sea color amarillo claro, este se refrigera a 4 °C hasta su posterior uso, a esta última se le conoce como el contenido de proteína total.

##### PURIFICACIÓN DE LA GLOMALINA

Se realiza con la metodología de Wright y cols. (1998), que consiste en precipitar la proteína con HCl 0.1 M a pH 2.0, después se resuspende en un mínimo volumen de NaOH 0.1 M. Por último se realiza una diálisis con agua desionizada, se refrigera a 4 °C hasta su posterior uso.

##### ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

La glomalina extraída se resuspende en un buffer fosfato salino (PBS) a pH 7.4. Se toma una alícuota de 50 µL del extracto, se coloca en las placas para ELISA y se deja secar toda la noche. Posteriormente se incuba con el anticuerpo monoclonal específico para glomalina MA32B11, desarrollado a partir de esporas de *Glomus intraradices*, disuelto en el buffer PBS en relación 1:3 por 1 h. Después se incuba 1 h con el anticuerpo IgM, una vez cumplido este plazo, se incuba 1 h con la enzima fosfatasa alcalina a pH 9.4. Por último, se disuelve una tableta (5 mg) de sustrato para fosfatasa alcalina en buffer dietanolamina, y esta solución se agrega a la placa,

y se incuba por 30 min. El contenido de glomalina inmunoreactiva se mide por espectrofotometría a 405 nm en un lector para placas de ELISA. Como estándar se puede utilizar suelo 100% inmunoreactivo determinado de acuerdo a su valor por ELISA o extracto de hifas de HMA frescas. Los datos se reportan como g de glomalina/kg<sub>ss</sub>.

#### **TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

La vida de microorganismos en el ecosistema del suelo es poco conocida y recientemente ha cautivado la atención de los microbiólogos.

Los microorganismos del suelo presentan una gran diversidad de actividades metabólicas y de interacciones con otros microorganismos, plantas y animales. Debido a la complejidad de la diversidad funcional de la comunidad microbiana, es complicado diferenciar patrones en los ecosistemas naturales y agrícolas.

Actualmente la identificación de microorganismos de ambientes naturales (suelo y agua) se realiza con técnicas que son independientes del cultivo *in vitro*. El análisis de ácidos nucleicos del total de la comunidad provee un gran poder de resolución y ayuda a responder varias preguntas que no podrían ser contestadas por los métodos tradicionales de cultivo.

Los marcadores universales usados en el estudio de microorganismos como las regiones 16S y 18S rRNA, han sido ampliamente utilizados para estudios de filogenia, que ayudan a sistematizar el estudio y ecología de microorganismos de ambientes naturales. Se han desarrollado herramientas con el uso de la biología molecular que permiten el análisis de la composición de la comunidad, filogenética, taxonomía y función de grupos, identificación de cepas específicas y genes funcionales. Como ejemplo de las técnicas más recientes podemos mencionar el análisis de RNA del suelo, el cual proporciona información acerca de la actividad microbiana y de la expresión de genes. Este es uno de los procedimientos más complicados, ya que el RNA es lábil por naturaleza.

#### **EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL DE SUELO**

Las herramientas de biología molecular han ayudado al desarrollo en el análisis de las comunidades de microorganismos en el suelo.

Los métodos de obtención de DNA de suelo requieren de una adecuada ruptura celular y esto ocasiona que el DNA pueda

contaminarse con ácidos húmicos del suelo. La ruptura celular se logra con fuerte agitación de las muestras en un regulador de lisis, el cual contiene altas concentraciones de detergente, sales, o perlas de vidrio; también se recomienda congelar con N<sub>2</sub> líquido y triturar con mortero, adicionalmente otros métodos emplean enzimas lisosimas.

Las técnicas para purificar ácidos nucleicos incluyen separación por electroforesis en geles de agarosa, en columnas de silica gel y otras resinas o biogeles.

El procedimiento que se describe fue desarrollado para la obtención de DNA de un suelo forestal. Este método utiliza cloruro de benzilo y tratamientos con perlas de vidrio (*glass milk*) para obtener un DNA de calidad para ser utilizado en reacciones de PCR.

El cloruro de benzilo interactúa con los carbohidratos de la pared celular y con los lípidos de las membranas celulares, favoreciendo la lisis celular.

## Reactivos

Las soluciones concentradas que se utilizan para la extracción de ácidos nucleicos (Sambrook y cols., 1989) son las siguientes:

- Ácido Etilendiamintetraacético (EDTA) 0.5M pH 8.0: adicionar 186.1 g de EDTA en 800 mL de H<sub>2</sub>O. Agitar vigorosamente y ajustar el pH a 8.0 con NaOH (20 g aproximadamente). Esterilizar en autoclave.

- Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1) pH 8: mezclar cantidades equivalentes de fenol y cloroformo y 1/24 de volumen de alcohol isoamílico. Equilibrar la mezcla con Tris-HCl 0.1 M pH 8. Almacenar la mezcla equilibrada con Tris-HCl 0.01 M pH 8.0 a 4 °C en un frasco de vidrio ámbar.

- NaCl 5 M: disolver 292.2 g de NaCl en 800 mL de H<sub>2</sub>O. Ajustar el volumen a 1 L. Esterilizar en autoclave.

- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10%: disolver 100 g de SDS en 900 ml de H<sub>2</sub>O. Calentar a 68 °C para ayudar a la disolución. Ajustar el pH a 8 por adición de gotas de HCl concentrado. Ajustar el volumen a 1 L.

- Tris 1 M: disolver 12.1 g de Tris base en 800 mL de H<sub>2</sub>O. Ajustar el pH 8 por de HCl concentrado.

- Bromuro de etidio (10 mg/mL): adicionar 1 g de bromuro de etidio a 100 mL H<sub>2</sub>O. Agitar por varias horas para asegurar una adecuada disolución. Almacenar en un frasco ámbar a 4 °C.

- Regulador 6X: preparar una solución que contenga 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% xilen cianol, 30% glicerol en agua.

- TAE Tris-acetato: 50X, 242 g de Tris base, 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de 0.5 M de EDTA pH 8.

- CaCl<sub>2</sub> 1 M: Disolver 54 g de CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O en 200 mL de H<sub>2</sub>O. Esterilizar la solución por membrana con filtro de 0.22 mm. Almacenar a -20 °C.

- CTAB 10%: disolver 4.1 g NaCl en 80 mL de agua y lentamente adicionar 10 g de CTAB con calentamiento y agitación. Ajustar el volumen a 100 mL con agua y almacenar a 4 °C.

- Regulador de fosfato de sodio (0.1 M): para un regulador a pH 8. Mezclar 93.2 mL de NaHPO<sub>4</sub> 1 M y 6.8 mL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M. Ajustar a 1 L. Esterilizar en autoclave.

- Regulador de lisis: 100 mM Tris HCl pH 8.5, 50 mM EDTA pH 8.0, 50 mM NaCl, 10% p/v SDS

- Nitrógeno líquido.

- Cloruro de benzilo.

## Procedimiento

1. Congelar con N<sub>2</sub> líquido una muestra de suelo de 3–5 g y triturar en mortero hasta obtener un polvo fino. Transferir las muestras a un tubo de polipropileno de 50 mL. Adicionar 10 mL de regulador de lisis y mezclar con vortex por 1 min.

2. Enseguida incubar a 65 °C por 15 min con agitación, y adicionar 10 mL de cloruro de benzilo, mezclar con vortex por 3 min. Continuar la incubación a 65 °C por 15 min con agitación. Después adicionar 10 mL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1) pH 8. Mezclar con vortex por 1 min y colocar en hielo por 10 min.

3. Centrifugar a 8500 g (gravedad) por 15 min. Recuperar la fase acuosa y mezclar con un volumen igual de isopropanol. Enseguida incubar a -20 °C por 2 h y centrifugar a 8500 g por 15 min. Descartar la fracción acuosa, lavar la pastilla con etanol al 70%, secar al aire, y disolver en 100 µL de agua desionizada estéril.

## PURIFICACIÓN DEL DNA TOTAL DE SUELO POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los ácidos nucleicos (DNA/RNA) pueden ser separados por electroforesis en gel de agarosa. La separación del DNA se da por peso molecular. La técnica de electroforesis es la migración de moléculas orgánicas en solución acuosa a través de una malla molecular en un campo eléctrico. Los ácidos nucleicos pueden

migrar en un medio básico, porque los grupos fosfato que forman parte de los ácidos nucleicos son ionizados, proporcionando una carga negativa. El porcentaje de agarosa usado depende del tamaño de los fragmentos a separar. En general los geles de agarosa 0.8–3% son adecuados para la separación de moléculas de DNA formadas por 100 a 1500 pares de bases.

### Materiales y métodos

- Agarosa.
- Regulador de corrida TAE 1X (Tris base, ácido acético glacial, EDTA).
- Bromuro de etidio (10 mg/mL): adicionar 1 g de bromuro de etidio a 100 mL H<sub>2</sub>O. Agitar por varias horas para asegurar una adecuada disolución. Almacenar en un frasco ámbar a 4 °C.
- Regulador de carga azul de bromofenol 6X.
- Marcador de peso molecular.
- Solución saturada de NaI.

### Procedimiento

1. Preparar 100 mL de agarosa al 1% (p/v) en TAE 1X, fundir la agarosa en el horno de microondas y adicionar 2 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). Armar la cámara de electroforesis y vaciar la agarosa a un grosor de 4–8 mm. Esperar a que solidifique y agregar el regulador de corrida TAE 1X en la cámara hasta cubrir completamente el gel.

2. Para preparar las muestras de DNA, mezclar 1–3 µL del DNA con 1 µL del regulador de carga azul de bromofenol 6X y colocar la mezcla en uno de los pozos del gel. En un pozo aparte colocar 1 µL de marcador de peso molecular. En seguida conectar a la fuente de poder y correr a 70 volts por 45 min o hasta que el azul de bromofenol este cerca del final del gel. Apagar la fuente de poder apagar los electrodos y sacar el gel. Visualizar las bandas con luz UV.

3. Para recuperar la fracción de DNA de alto peso molecular, se corta con la hoja de bisturí estéril la zona 1.7 a 14.0 kb (kilo base) de peso molecular. Colocar el fragmento del gel en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Adicionar 2–3 volúmenes de solución de NaI e incubar a 56 °C por 5 min. En seguida adicionar 5 mL de *glass milk* e incubar a temperatura ambiente (25–27 °C) por 15 min. Continuar con un pulso en la microcentrifuga de 30 s. Lavar la pastilla tres veces con 250 mL de etanol al 50%. Después de cada

lavado, resuspender la pastilla y dar un pulso en la microcentrifuga por 30 s.

4. Para recuperar el DNA del *glass milk*, resuspender la pastilla en 20 µL de agua desionizada estéril. Enseguida incubar la suspensión a 56 °C por 10 min y dar un pulso en la microcentrifuga por 30 s. Finalmente transferir la fase acuosa que contiene el DNA a un tubo de microcentrifuga limpio.

### EXTRACCIÓN DE RNA DE SUELO

Analizar la composición de la comunidad de bacterias por los métodos clásicos de cultivo y caracterización fisiológica es muy complejo. Las técnicas con ácidos nucleicos son una gran herramienta para detección e identificación de microorganismos en ambientes naturales. La expresión de los genes, encendido y apagado, depende de las condiciones ambientales. Algunos genes están activos únicamente en tiempo específico. A esto se le conoce como actividad genética diferencial. De los ácidos nucleicos el RNA nos indica patrones de expresión genética, provee información del estatus metabólico de los microorganismos del suelo bajo diferentes condiciones ambientales.

### Materiales y métodos

- TPM: preparar una solución que contenga Tris-HCl pH 7.5 50 mM, polivinilpirrolidona 1.7% y 10 mM MgCl<sub>2</sub>.
- TN 150: preparar una solución con Tris-HCl 10 mM pH 8 y 150 mM NaCl.
- TMC: preparar una solución con Tris-HCl 10 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CsCl 0.1 mM.
- TE: preparar una solución con Tris-HCl pH 8 y EDTA 1 mM.
- Albumina Sérica de Bovino (BSA) 10%.
- Complejo vanadil ribonucleosido VRC 200 mM.
- Acetato de sodio 3 M.
- Botellas de 50 mL estériles para homogeneizador celular.
- Tubos de policarbonato de 16 mL estériles.

### Procedimiento:

1. Adicionar 2 g de suelo en una botella estéril del homogeneizador con 4 g de perlas de vidrio. Agitar vigorosamente con 5 mL del regulador de TPM y adicionar 250 µL BSA. Las botellas previamente enfriadas se colocan en el homogeneizador 1500 g (gravedad) por 90 s.

2. Colocar la suspensión en tubos de 16 mL de policarbonato para centrifuga previamente enfriados. Colectar el suelo no resuspendido y agregar 5 mL del regulador TPM. Centrifugar a 15 000 *g* por 15 min a 2 °C. Las perlas de vidrio, las partículas de suelo y los residuos celulares son separados en este paso. Colocar el sobrenadante en un nuevo tubo y centrifugar a 30 000 *g* por 30 min. Colectar el sobrenadante otra vez. Colocar el sobrenadante en tubos de centrifuga de 11 mL previamente enfriados y centrifugar a 100 000 *g* y 2 °C por 2 h.

3. Descartar el sobrenadante. La pastilla formada contiene el RNA. Adicionar a la pastilla 495 µL del regulador de TN150, 5 µL de VRC y centrifugar por 2-5 s a máxima velocidad. Adicionar 400 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:25:1) y mezclar con vortex por 1 min. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio. Adicionar 50 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.5 y dos volúmenes de etanol. Mezclar y almacenar a -70 °C por 30 min. Centrifugar a máxima velocidad por 10 min.

4. Lavar la pastilla de RNA con etanol al 70%, secar y resuspender en 100 µL de regulador TMC que contiene 5 U de DNAsa libre de RNAsa. Las trasas de DNA son digeridas a 37 °C por 15 min. Adicionar 400 µL de regulador TN150 y 400 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1). Agitar el tubo en vortex por 1 min y centrifugar por 1 min en la microcentrifuga a máxima velocidad. La extracción se repite con 400 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El RNA se precipita con etanol. Resuspender la pastilla con 100 µL de regulador TE.

#### AMPLIFICACIÓN DEL DNA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática mediada por oligonucleótidos que son específicos de una secuencia de DNA. El DNA blanco contiene la secuencia de interés, la cual está constituida por cientos de nucleótidos de longitud. La enzima *Taq* DNA polimerasa cataliza la síntesis de millones de copias de la secuencia blanco. Una reacción completa de PCR comprende varios ciclos. Cada ciclo comprende tres pasos: desnaturalización de la doble cadena de DNA, alineación de los dos oligonucleótidos a la cadena molde del DNA, y extensión enzimática de los oligonucleótidos para producir copias que pueden servir como templado en el siguiente ciclo.

El paso de desnaturalización ocurre rápidamente a 94–95 °C.

La alineación de los oligonucleótidos depende de la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ), la cual depende de la composición de la secuencia. La extensión ocurre a 72 °C para la mayoría de los casos.

#### Materiales y métodos

##### Taq DNA POLIMERASA

##### DESOXINUCLEÓTIDOS TRIFOSFATO (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Solución 2 mM de cada desoxinucleótido.

##### REGULADOR DE REACCIÓN DE PCR 10X

Preparar una solución que contenga Tris-HCl 100 mM pH 8.5, MgCl<sub>2</sub> 20 mM y 500 mM de KCl.

##### OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS PARA CADA GRUPO MICROBIANO

##### Procedimiento

1. La mezcla de PCR tiene un volumen final de 25 µL y contiene Tris-HCl 10 mM pH 8.5, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 0.5 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 0.5 µM de cada oligonucleótido, 0.5 U de *Taq* polimerasa y 1 µL del DNA total o 2.5 µL de la dilución (1:50) de un DNA (10–50 ng).

2. Las condiciones de reacción se indican en el Cuadro 3. Se utiliza un control positivo de un DNA de un microorganismo conocido hongo o bacteria y un control negativo con únicamente agua.

#### Cuadro 3. Secuencias de oligonucleótidos para amplificar genes de rRNA de hongos y bacterias.

Secuencia de oligonucleótidos	Código	Referencia
5´TCCGTAGGTGAACCTG 3´	ITS1	White y cols. (1990)
GCTGCGTTGTTTCATCG	ITS2	
TGCCAGCAGCCGTA	16S1	Widmer y cols. (1998)
GACGGCGGTGTGTACAA	16S2	
AGGGTCATTGGAAACTGGG	BacF	Kuske y cols. (1998)
CGTGTGTAGCCAGGTCATA	BacR	

3. Programa en el termociclador (Cuadro 4). Un ciclo inicial de 95 °C por 5 min; 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min 15 s, y 72 °C por 1 min, y un ciclo de 72 °C por 7 min. Cuando el programa termina, los productos de la reacción se visualizan en un gel de agarosa por medio de una electroforesis.

**Cuadro 4. Materiales de reacción de PCR.**

Reactivo	Solución madre	Volumen (mL)
Regulador	10X	2.5
Nucleótidos	2 mM	0.5 de cada uno
Oligonucleótido 1	5 mM	2.5
Oligonucleótido 2	5 mM	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0.75
Taq polimerasa	5 U	0.25
DNA	10-50 ng	2.5
Agua estéril		12.0
Total		25.0

**AMPLIFICACIÓN ALEATORIA DE DNA POLIMÓRFICO (RAPDs)**

La técnica RAPD está basada en un PCR que usa oligonucleótidos cortos de secuencia al azar (Cuadro 5). Los marcadores moleculares obtenidos por RAPD estiman la similitud de la comunidad microbiana en diferentes tipos de suelo. A esta aplicación del DNA es llamada huella molecular y su realización es relativamente rápida y fácil. Esta herramienta se ha utilizado en la clasificación de especies y en el análisis filogenético, identificación de genes de resistencia, análisis del genoma, y análisis genético de las poblaciones.

**Materiales y métodos**

ENZIMA TAQ DNA POLIMERASA  
0.5 U de la enzima.

DESOXINUCLEÓTIDO TRIFOSFATO (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)  
Solución 0.5 mM de cada desoxinucleótido.

OLIGONUCLEÓTIDOS  
Solución 0.5 μM de cada oligonucleótido.

DNA TOTAL  
2.5 μL de DNA total o 5 μL de la dilución (1:50) de DNA de 50 ng.

**Procedimiento**

1. La mezcla de reacción de RAPD tiene un volumen final de 25 μL contiene Tris-HCl 10 mM pH 8.5, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 0.5 mM de cada desoxioligonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5 μM

de cada oligonucleótido, 0.5 U de Taq polimerasa y 2.5 μL del DNA total o 5 μL de la dilución (1:50) de DNA (50 ng DNA).

**Cuadro 5. Secuencia de oligonucleótidos RAPD usados en DNA de suelo.**

Secuencia del iniciador	Código	Referencia	
5´CGTCACAGAG 3´	PS01	Yang y cols. (2000)	
GAGGCCCGTT	PS02		
CAGGCTCTAG	PS03		
GTTGTGCCTG	PS04		
GAGTTCAAC	PS05		
CGACGCCCTG	PS07		
CTCACATGCC	PS08		
GCGTCGAGGG	PS09		
CTCCTGTGCG	PS10		
CCGTCTCTTT	PS11		
CCCGCCGTTG	PS13		
TGGTCTGGC	PS14		
TTCGAGCCAG	OPC01		Serie de operon technology
GTGAGGCGTC	OPC02		
CCGCATCTAC	OPC04		
GATGACCGCC	OPC05		
GAACGGACTC	OPC06		
TGGACCGGTG	OPC08		
CTCACCGTCC	OPC09		
AAAGCTGCGG	OPC11		
AAGCCTCGTC	OPC13		
GACGGATCAG	OPC15		
TTCCCCCAG	OPC17		
TGAGTGGGTG	OPC18		
GTTGCCAGCC	OPC19		
ACTTCGCCAC	OPC20		

2. El programa en el termociclador es (Cuadro 6): un paso inicial de desnaturalización 94 °C por 5 min; 45 ciclos de 94 °C por 45 s, 33 °C por 45 s, y 72 °C por 2 min; y un ciclo de 72 °C por 7 min. Al terminar la reacción revisar los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa.



**Cuadro 6. Materiales de reacción para RAPD.**

Reactivos	Soluciones madre	Volumen (mL)
Regulador	10 X	2.5
Nucleótidos	2 mM	0.5 de cada uno
Oligonucleótido	5 mM	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0.75
Taq polimerasa	5 U	0.25
DNA	10-50 ng	5.0
Agua estéril		12.0
Total		25.0

3. Visualizar los productos RAPD: Preparar 100 mL de agarosa al 2% (p/v) en TAE 1X y fundir en el horno de microondas y adicionar 2 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). Colocar la agarosa en la base para formar el gel a una profundidad de 8–10 mm. Adicionar regulador de corrida TAE 1X en cámara hasta cubrir completamente el gel. Para preparar las muestras de DNA, cada tubo con los 25 µL de productos RAPD y 5 µL del regulador de carga azul de bromofenol 6X, mezclar y colocar cada reacción en un pozo. Colocar 5 µL de marcador de peso molecular en un pozo separado. Conectar los electrodos a la fuente de poder a 60 volts por 3–4 h.

#### ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN

La ecología molecular provee de métodos para analizar en el DNA ambiental de genes específicos. La detección de genes marcadores que participan en la fijación del nitrógeno puede dar una ruta de análisis del potencial de fijación de nitrógeno de un ecosistema. Para la evaluación de poblaciones fijadoras de nitrógeno en el ambiente, el análisis de *nifh*, el gen que codifica para la nitrogenasa reductasa, se han utilizado varios oligonucleótidos para PCR que amplifican este gen para ambos tipos de muestras microorganismos y ambientes. Debido a la vasta filogenia entre los diferentes grupos de nitrógeno, la secuencia de los genes *nifh* tiene una divergencia considerable, e inclusive la secuencia de DNA que codifica para una región conservada de la proteína puede diferir por la redundancia de codones para la mayoría de los aminoácidos. El diseño de oligonucleótidos universales *nifh* requiere de grado de degeneración en la secuencia del DNA y puede resultar en reducción de la especificidad durante la reacción de amplificación por PCR. El

siguiente protocolo refleja la detección y la diferenciación de de varios grupos del taxa de fijadores de nitrógeno.

#### Materiales y métodos

##### MEZCLA DEL PCR

Regulador de reacción 1X, 200 nM de cada deoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 mM de cada oligonucleótido, 5 mg de albumina serica de bovino (BSA), polietilenglicol 8000, 2.5 M NaCl.

##### MEZCLA DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Regulador de enzima de restricción 1X (regulador M para *HaeIII* y regulador B para *TaqI*, que el proveedor del reactivo proporciona) y 2 U de la endonucleasa de restricción (*Hae III* y *Taq I*). Todos los reactivos grado biología molecular.

#### Procedimiento

##### AMPLIFICACIÓN POR PCR ANIDADO

a. Fragmentos de genes *nifh* son amplificados usando la técnica PCR anidado. Se utilizan tres oligonucleótidos, originalmente desarrollados por Zehr y McReynolds (1989) y Ueda y cols. (1995). El primer PCR se realiza con el oligonucleótido directo *nifh* (GCIWTIAYGGNAARGGNGG) y el oligonucleótido reverso *nifh* (GCRTAIABNGCCATCATYTC). El segundo PCR (anidado) se realiza con el oligonucleótido directo *nifh* (GGITGTGAYCCNAAVGCNGA) y el mismo oligonucleótido reverso de la primera reacción.

b. La primera reacción de PCR amplifica un fragmento 464 pb (pares de bases) y el anidado amplifica un fragmento de 371 pb. La mezcla del PCR contiene regulador de reacción 1X, cada desoxinucleótido a una concentración de 200 nM, y cada oligonucleótido degenerado a una concentración de 1 mM y 1 U de *Taq* DNA polimerasa. Para el primer PCR, 5 mg/mL de BSA se adiciona a un volumen final de reacción de 20 µL. Para el PCR anidado, 0.3 mg/mL se adicionan a la reacción el volumen se ajusta a 95 µL.

c. La amplificación se realiza con un paso de desnaturalización a 95 °C por 5 min. Las condiciones de reacción son las siguientes: desnaturalización 11 s a 94 °C y 15 s a 92 °C, alineación 8 s a 48 °C y 30 s 50 °C, y la extensión 10 s a 74 °C y 10 s a 72 °C. Un paso final de extensión 10 min a 72 °C.

d. El primer PCR se realiza por 40 ciclos en un volumen de reacción de 25 µL y la mezcla contiene 2 µL de DNA total. La reacción anidada

se realiza por 35 ciclos con un volumen de reacción de 100  $\mu$ L con 2  $\mu$ L del primer PCR.

#### RFLP

a. Un volumen de 90  $\mu$ L de cada producto de PCR es mezclado con 90  $\mu$ L de solución para precipitar (20% de polietilenglicol 8000, 2.5 M NaCl), se incuba por 30 min a 37 °C y se centrifuga a 8000 *g* (gravedad) por 15 min.

b. La pastilla se lava con etanol al 70% y se seca al aire. La reacción de restricción se realiza con la pastilla resuspendida en 40  $\mu$ L de mezcla de restricción, que contiene regulador de la enzima 1X y 2 U de la enzima de restricción. La enzima *Hae III* con regulador M a 37 °C y la *TaqI* con el regulador B a 65 °C, se deja la digestión por toda una noche.

c. RFLP se analizan en un gel de agarosa MetaPhor al 4%.

### ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA EN SUELO POR ELECTROFORESIS EN GEL DE GRADIENTE DESNATURALIZANTE PCR-DGGE

La electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) se utiliza para hacer separaciones de cambios de hasta una sola base en un segmento de DNA. La técnica de separación DGGE fue descrita primero por Fischer y Lerman (1983). En un gradiente desnaturalizante de gel de acrilamida, la doble cadena del DNA es sujeta a incrementar el grado de desnaturalización de los segmentos llamados dominios. La temperatura es específica para la secuencia de estos dominios. Cuando la  $T_m$  es menor a la del domino tenemos un fragmento parcialmente desnaturalizado. Esto reduce la movilidad del DNA en el gel de poliacrilamida. La presencia de mutaciones en la secuencia de DNA puede observarse por diferencias en la movilidad de los fragmentos de DNA en el gel de poliacrilamida comparando con una secuencia normal.

Los genes blanco en el DNA de suelo son amplificados por PCR. Esto asegura una cantidad adecuada para ser identificada en un gel. Se adicionan de 30 a 40 pares de bases a un oligonucleótido de la reacción de PCR para que los fragmentos de DNA queden parcialmente desnaturalizados.

La separación de los fragmentos de PCR por DGGE es una herramienta útil para analizar la diversidad y funcionalidad de la comunidad microbiana del suelo. Además permite el análisis de varias muestras al mismo tiempo, y generar la huella genética de la comunidad microbiana del suelo.

### Materiales y métodos

En el DGGE, las condiciones desnaturalizantes son creadas por la combinación de temperatura, entre 50–65 °C y un gradiente lineal desnaturalizante formado con urea y formamida. Una solución de 100% desnaturalizante consiste en urea 7 M y 40% de formamida. Los geles contienen, 8% (p/v) de poliacrilamina en TAE 1X pH 8.0 (acrilamida, bisacrilamida 37.5:1), el gradiente por lo general va de 30 a 55% desnaturalizante de urea 7M y formamida desionizada 40%. TEMED, persulfato de amonio al 10%, regulador de corrida azul de bromofenol 6X, TAE 1X, ácido acético al 10%, formaldehído al 37%, agua grado Milli-Q, AgNO<sub>3</sub> 0.1%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3%, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>×5H<sub>2</sub>O 2 mg/L.

### Reactivos para DGGE:

ACRILAMIDA/BIS-ACRILAMIDA (37.5:1) AL 40%

Pesar 38.9 g de Acrilamida y 1.07 g de Bis-acrilamida, disolver en 500 mL de agua destilada, afore a 1000 mL con agua destilada, filtre con membrana a 0.45  $\mu$ m y almacenar a 4 °C.

PERSULFATO DE AMONIO AL 10%

Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1.0 mL de agua destilada. Esta solución se prepara en el momento que se va a usar.

SOLUCIÓN DE TINCIÓN

Disuelva 1 g de nitrato de plata en 300 mL de agua destilada, agregue 1.5 mL de formaldehído al 37%, afore a 1000 mL con agua destilada.

SOLUCIÓN FIJADORA Y DE PARO

Disuelva 100 mL de ácido acético glacial en 900 mL de agua desionizada.

SOLUCIÓN DE REVELADO

Disuelva 1.5 mL de formaldehído al 37% en 200 mL de agua desionizada, agregue 200  $\mu$ L de Tiosulfato de sodio pentahidratado (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>×5H<sub>2</sub>O) a una concentración de 10 mg/mL, y por último adicione 30 g de carbonato de sodio, afore a 1000 mL con agua desionizada.

## Procedimiento

### PCR

1.La región variable V3 del 16S rDNA es amplificada por PCR con los oligonucleótidos para esta región (Cuadro 7). El oligonucleótido 3 contiene la misma secuencia que el 1, pero tiene en el extremo 5' una adición de 40 nucleótidos rica en GC.

**Cuadro 7. Secuencia de oligonucleótidos para DGGE.**

Oligonucleótido	Código	Referencia
5´CCTACGGGAGGCAGCAG 3´	P1	Muyzer y cols. (1993)
ATTACCGCGGCTGCTGG	P2	
5´CGCCCCGCCGCGCGCGGGGC GGGCGGGGGCACGGGGGCCTA CGGGAGGCAGCAG 3´	P3	

2.La mezcla de PCR contiene: KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8.5 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0.4 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U de *Taq* polimerasa y 50 ng de DNA en un volumen de 50 µL.

3.Las condiciones de amplificación: un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 4 min, 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 52.5 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min; 1 ciclo a 72 °C por 7 min. La amplificación de los productos se revisa en un gel de agarosa al 1%.

### GRADIENTE

Las muestras de PCR 25 µL más 5 µL de regulador de carga azul de bromofenol 6X, aplicar directamente al gel de poliacrilamida 8% con un gradiente de 30 a 55%, en TAE 1X. La electroforesis se realiza a voltaje constante de 45 volts y a 60 °C por 13 h.

### TINCIÓN CON PLATA

1.La fijación se realiza con ácido acético al 10% por 20 min, agitar suavemente y lavar tres veces con agua Milli-Q de 2 min cada una.

2.Tinción con AgNO<sub>3</sub> al 0.1% por 30 min con agitación suave. Lavar con agua Milli-Q por 10 s.

3.Revelador de la tinción contiene NaCO<sub>3</sub>, formaldehído, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>×5H<sub>2</sub>O por 2-5 min.

4.Solución de paro, ácido acético glacial 10% por 5 min con agitación suave.

5.Capturar la imagen del gel.

## GLOSARIO DE UNIDADES

Cantidad base	Unidad Base	Expresión en términos de unidades básicas del SI (BIPM, 2006)
Longitud	centímetro	cm
	milímetro	mm
	nanómetro	nm
	micrómetro	mm
	metro	m
Masa	hectárea	ha
	kilogramo	kg
	gramo	g
	miligramo	mg
	microgramo	mg
	nanogramo	ng
	miligramo por kilogramo	mg/kg
	kg por hectárea	kg/ha
	Litros por hectárea	L/ha
	tonelada	t
tonelada por hectárea	t/ha	
Tiempo	onza	oz
	libra	lb
	segundo	s
	por segundo	/s
	hora	h
	minuto	min
	lón extraíble	centimol por kilogramo
Conductividad eléctrica	deciSiemens por metro	dS/m
Volumen	Litro	L
	Mililitro	mL
	Microlitro	mL
	Galón	gal
Temperatura	Centígrado	°C
Concentración	partes por millón	ppm
	miligramos por litro	mg/L
	gramos por litro	g/L
	Por ciento	%
	peso por volumen	p/v
volumen por volumen	v/v	
	microlitro por litro	mL/L

	microlitro por mililitro	mL/mL
	Milimolar	mM
	Normalidad	N
	Molaridad	M
	Micromolar	mM
	Unidades	U
	gramos por metro cuadrado	g/m <sup>2</sup>
Velocidad	revoluciones por minuto	rpm
	oscilaciones por minuto	ppm
Presión	libra por pulgada cuadrada	lb/in <sup>2</sup>
	Gravedad	<i>g</i>
Crecimiento microbiano	Unidades formadoras de colonia por gramo	UFC/g
	Unidades formadoras de colonia por mililitro	UFC/mL
Potencial eléctrico	Voltios	volts
Densidad	gramos por centímetro cúbico	g/cm <sup>3</sup>

## BIBLIOGRAFÍA

Alcaraz-Romero A., C. Rey-Galán, A. Concha-Torre y A. Medina-Villanueva. 1999. Metahemoglobinemia transitoria en una niña de 13 años. Boletín de la sociedad pediátrica de Asturias, Cantabria, Castilla y León, España. 39: 46–47.

Alef K. and D. Kleiner. 1986a. Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 18: 233–135.

Alef K. and D. Kleiner. 1986b. Arginine ammonification in soils samples. pp. 163-168. *In: The application of enzymatic and microbiological methods in soil analysis*. Veroff Landwirtsch-Chem. Bundesanstalt Linz/Donau.

Altieri, M. A., 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 74:19–31.

Álvarez-Solís, J. D., P. M. Rosset, B. M. Díaz-Hernández, H. Plascencia-Vargas y R. R. Rice. 1998. El impacto de la transformación del paisaje sobre la base productiva de los Altos de Chiapas, México- avances preliminares-. pp. 65-82. *En: Memorias del Seminario sobre Manejo de Suelos Tropicales en Chiapas*. Colegio de la Frontera Sur. San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México.

Anderson, J. P. E. and K. H. Domsch. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 10: 207–213.

APHA, AWWA, WPCF. 1971. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, 13th Ed.

Atlas, R. M. 2010. *Handbook of Microbiological Media*, Fourth Edition, CRC Press, Washington, D. C., USA. p. 2043

Badalucco L., F. De Cesare, S. Grego, L. Landi and P. Nannipieri. 1997. Do physical properties of soil affect chloroform efficiency in lysing microbial biomass?. *Soil Biology & Biochemistry*. 29: 1135–1142.

Bakken, L. R. and A. Frostergard. 2006. Nucleic acid extraction from soil. pp. 49-73. *In: Nucleic Acids and Protein in Soil*, (Eds., P. Nannipieri and K. Smalla). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles and P. M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry*. 196: 80–83.

BIPM (Bureau International des Poids et Mesures). 2006. *The international System of Units*. 8th ed. Organization Intergouvernementale de la Convention du Metre. Paris, Francia.

p. 94–188.

Beck, T., R. G. Joergensen, E. Kandeler, F. Makeschin, E. Nuss, H. R. Oberholzer and S. Schew. 1997. An interlaboratory comparison of ten different ways of measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(7):1023–1032.

Brookes P. C., J. F. Kragt, D. S. Powlson and D. S. Jenkinson. 1985. Chloroform fumigation and release of nitrogen: the effects of fumigation time and temperature. *Soil Biology & Biochemistry*, 17 (6): 831–835.

Brookes, P. C. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of soils*, 19: 269–279.

Bundy L. G. and J. M. Bremner. 1973. Inhibition of nitrification in soils. *Soil Science Society of America Proceedings*, 37: 396–398.

Casida, L. E. Jr., 1977. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. *Applied and Environmental Microbiology* 34: 630–636.

Castellanos J. Z., J. X. Uvalle Bueno y A. Aguilar Santelises. 2000. Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas. 2da edición, México. 201 p.

Chander, K. and P.C. Brookes. 1991. Is the dehydrogenase activity assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils? *Soil Biology and Biochemistry* 23: 909–915.

Cochran V. L., L. F. Elliot and C. E. Lewis. 1989. Soil microbial biomass and enzyme activity in subarctic agricultural and forest soils. *Biology and Fertility of Soils* 7: 283–288.

Danielson, R. M. and M. F. Jurgensen. 1973. The propagule density of *Lipomyces* and other yeasts in forest soils. *Mycopathologia et Mycologia applicata*. Vol. 51 2-3, 191–198.

Dickens, H. E., and J. M. Anderson. 1999. Manipulation of soil microbial community structure in bog and forest soil using chloroform fumigation. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:159–169.

Dusek, L. and M. Tesarova. 1996. Influence of polychlorinated biphenyls of microbial biomass and its activity in grasslands. *Soil Biology and Fertility of soils*, 22: 243–247.

Dweikat, I., S. Mackenzie, M. Levy and H. Ohm. 1993. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 497–505.

Entry, J. A., D. Mills, K. Jayachandran and T. B. Moorman. 2007. Symposium: Molecular-Based Approaches to Soil Microbiology. *Soil Science Society of America Journal* 71: 561.

Felske, A., B. Engelen, U. Nübel and H. Backhaus. 1996. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4162–4167.

Fießbach, A., R. Martens and H. H. Reber. 1994. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 1201–1205.

Fischer, S. and L. Lerman. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitution are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceeding of National Academy Sciences USA* 80: 1579–1583.

Franklin, R. B., D. R. Taylor and A. L. Mills. 1999. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Microbiological Methods*, 35: 225–235.

Frostegard, A., S. Courtois, V. Ramišse, S. Clere, D. Bernillon, F. Le Gall, P. Jeannin, X. Nesme and P. Simonet. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soil samples. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5409–5420.

Furlan V., H. Bärtschi and J. A. Fortin. 1980. Media for density gradient extraction of endomycorrhizal spores. *Trans Br Mycol Soc.* 75:336–338.

Galindo U., A. R. y R. C. Avendaño P. 2005. *Biología elemental*, segunda edición. Editorial imprenta universitaria. México, D.F. 358 p.

Gange A. C., E. Bower, P. G. Stagg, D. M. Aplin, A. E. Gillam and M. Bracken. 1999. A comparison of visualisation techniques for recording arbuscular mycorrhizal colonization. *New Phytol* 142: 123–132.

García C., T. Hernandez and F. Costa. 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communication. Soil Science and Plant Analysis* 28: 123–134.

Gerdemann J. W. and T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc* 46: 235–244.

Gibbs, H. L., K. A. Prior and P. J. Weatherhead. 1994. Genetic analysis of populations of threatened snake species using RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 329–337.

Giovannetti M. and B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84: 489–500.

Grajal-Martin, M. J., C. J. Simon and F. J. Muehlbauer. 1993. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f sp. *psii*. *Phytopathology* 83: 612–614.

Griffiths, B. S., K. Ritz, R. Wheatley, H. L. Kuan, B. Boag, S. Christensen, F. Ekelund, S. J. Srensen, S. Muller and J. Bloem. 2001. An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship in arable soil microbial communities.

Hadar, Y. and Mandelbaum R. 1992. Suppressive compost for biocontrol of soilborne plant pathogens. *Phytoparasitica* 20: S113-S116.

Hadrys, H., M. Balick and B. Schierwater. 1992. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55-63.

Hagedorn, C. and J. G. Holt. 1975. Differentiation of *Arthrobacter* soil isolates and named strains from other bacteria by reactions on dye containing media. *Can. J. Microbiol.* 21: 688-693.

Harry, M., N. Jusseaume, B. Gambier and E. Garneir-Sillam. 2001. Use of RAPD markers for the study of microbial community similarity from termite mounds and tropical soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 417-427.

Hermansson, A., J. S. K. Bäckman, B. H. Svensson and P. E. Lindgren. 2004. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in limed and non-limed acidic coniferous forest soil using real-time PCR. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 1934-1941.

Hoitink, H. A. J., Y. Inbar and M. J. Boehm. 1991. Status of compost amended-potting mixes naturally suppressive to soilborne diseases of floricultural crops. *Plant Dis.* 75: 869-873.

Horn K., A. Hahn, P. Pausch and B. Hock. 1992. Isolation of pure spore and hyphal fractions from vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *J Plant Physiol* 141: 28-32.

Hu S. and A. H. C. Van Bruggen. 1998. Efficiencies of chloroform fumigation in soil: effects of physiological states of bacteria. *Soil Biology & Biochemistry*. 30 (13), 1841-1844.

Ingham E. R. and K. A. Horton. 1987 Bacterial, fungal and protozoan responses to chloroform fumigation in stored soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 19, 545-550.

Jenkinson D. S. and D. S. Powlson. 1976. The effect of biocidal treatments on metabolism in soil. I. Fumigation with chloroform. *Soil Biology and Biochemistry*, 8:167-177.

Jenkinson D. S. and D. S. Powlson. 1976. The effect of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A Method for measuring soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 8:209-213.

Jenkinson D. S., and D. S. Powlson. 1980. Measurement of micro-

bial biomass in intact soil cores and sieved soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 11:521-527.

Jenkinson D. S. and J. N. Land. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. *In: E. A. Paul y J. N. Land (Eds.). Soil Biochemistry*. Vol. 5. Marcell Dekker, New York, 415-471.

Jenkinson, D. S. 1988. The determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil. pp. 368-386. *In: Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems* (J.R. Wilson, Ed.). CAB International. Wallingford.

Klein D. A., T. C. Loh and R. L. Goulding. 1971. A rapid procedure to evaluate the dehydrogenase activity of soils low in organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 3: 385-387.

Kolmodin, L.A. and J. F. Williams. 2000. Polymerase chain reaction. pp. 569-579. *In: The Nucleic Acid Protocols Handbook*, (Eds., R. Rapley) Humana Press Inc., New York.

Kuske, C.R., K. L. Banton, D. L. Adorada, P. C. Stark, K. K. Hill and P. J. Jackson. 1998. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2463-2472.

Küster E. and S. T. Williams. 1966. Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature (London)*. 202: 928-929.

Larkin J. M. 1972. Peptonized Milk as an Enumeration Medium for Soil Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 23(5): 1031-1032.

Lynch J. M. and Panting L. M. 1980. Cultivation and the soil biomass. *Soil Biology & Biochemistry*. 12: 29-33.

Martens R. 1985. Limitations of the application of the fumigation technique to biomass estimations in amended soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 17: 57-63.

Martin J. P. 1950. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science* 69: 215-232.

Martin, J. K. 1975. Comparison of agar media for counts of viable soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*. 7: 401-402.

Martin, G. B., J. G. K. Williams and S. D. Tanksley. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 188: 2336-2340.

Martino E., B. Franco, G. Piccoli, V. Stocchi and S. Perotto. 2002. Influence of zinc ions on protein secretion in a heavy metal tolerant strain of the ericoid mycorrhizal fungus *Oidiodendron maius*.

Molecular and Cellular Biochemistry 231: 179– 185.

McGonigle T. P., M. H. Miller, D. G. Evans, G. L. Fairchild and J. A. Swan. 1990. A new method that gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115: 495–501.

McLaughlin, M. J. and M. Alston. 1986. Measurement of Phosphorus in the soil microbial biomass: a modified procedure for field soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 18(4): 437–443.

Miller, D. N., J. E. Bryant, E. L. Madsen and W. C. Ghioro. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2354–2359.

Morgan G. B., J. B. Lackey and F. W. Gilcreas. 1957. Quantitative determination of organic nitrogen in water, sewage and industrial wastes. *Journal of Analytical Chemistry* II, p. 833

Moss G. P. 2013. International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology. School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary, University of London, Mile End Road, London, E1 4NS, UK. Disponible en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>.

Müller, A. K., C. S. Westergaard and S. J. Sorensen. 2002. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microbial Ecology* 44: 49–58.

Muyzer, G., E. C. De Wall and A. G. Uitterlinder. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient Gel Electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695–700.

Nakatsu, C. H. 2007. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal* 71: 562–571.

Nannipieri P., S. Grag and B. Ceccanti. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. pp. 293-355. *In*: Bollag J. M. y G. Stotzky (Eds.). *Soil Biochemistry*. Vol. 6, Marcell Dekker, New York.

Navarro B. S. y G. Navarro G. 2003. Química Agrícola El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. 2da edición, Ediciones Mundi-Prensa, México, 438 p.

Nichols, K. A., and S. F. Wright. 2005. Comparison of glomalin and humic acid in eight native US soils. *Soil Sci.* 170: 985–997.

Nicorladot B.; R. Chaussod et G. Catrox. 1984. Decomposition de corps microbiens dans les sols fumigés au chloroforme: effets du type de sol et de microorganisme. *Soil Biology & Biochemistry*. 16: 453–458.

Nunan, N., M. I. Morgan and M. Herlihy. 1998. Ultraviolet Absorbance (280 nm) of compounds released from soil during chloroform fumigation as an estimate of the microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 30 (12): 1599–1603

Ogram, A. 2000. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1499–1504.

Ohlinger R. 1986. Effects of stimulated acid rain on soil and young Norway spruce plants in a pot experiment. Part 2. Study of some soils enzyme activities. *Central bl. Gasample Forstwes* 103: 79–89.

Okano, Y., K. R. Hristova, C. M. Leutenegger, L. E. Jackson, R. F. Denison, B. Gebreyesus, D. Lebauer and K. M. Scow. 2004. Application of Real-Time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1008–1016.

Papavizas, G. C. and C. B. Davey. 1959. Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of soil fungi. *Soil Science*, 88: 112–117.

Parkinson. 1986. Fungi. *In*: Klute, A. (Ed.). *Methods of soil analysis*. Second Edition. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA.

Paul E. A. and F. E. Clark. 1989. *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press Limited, United States. p. 271

Phelps, E. B. 1905. The determination of organic nitrogen in sewage by the Kjeldahl process, *Journal of Infectious Diseases*. p. 225

Phillips J. and D. Hayman. 1970 Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55: 158–161.

Ramos A., V. Callao y P. C. T. Carvalho. 1968. La solubilización de fosfatos por hongos del suelo. *Microbiol. España*. 21: 1–15.

Rand, M. C., A. E. Greenberg and K J. Taras (ed.). 1975. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, Inc., Washington, D.C. p. 1193

Reddy, G. B. and A. Faza. 1989. Dehydrogenase activity in sludge

amended soil. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 327–336.

Rillig, M. C., P. W. Ramsey, S. Morris, and E. A. Paul. 2003. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant Soil* 253: 293–299.

Rillig, M. C. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can. J. Soil Sci.* 84: 355–363.

Rillig, M. C., Caldwell, B. A., Wösten, H. A. B. and P. Sollins. 2007. Role of protein in soil Carbon and nitrogen storage: controls in persistence. *Biogeochemistry*, 85: 25–44.

Rosier, C. L., A. T. Hoye, and M. C. Rillig. 2006. Glomalin-related soil protein: Assessment of current detection and quantification tools. *Soil Biol. Biochem.* 38: 2205–2211.

Ross D. J. 1990. Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method: Influence of seasons, soils, and calibration with the fumigation-incubation procedure. *Soil Biology & Biochemistry*. 22 (3), 295–300.

Ryall, C. and M. O. Moss. 1975. Selective media for the enumeration of *Chromobacterium* spp. in soil and water. *J. Appl. Bacteriol.* 38(1): 53–59.

Sambrook, J., T. Maniatis and E. F. Fritschoras. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Appendix B: Preparation of Reagents and Buffers used in molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Press CSH. Printed in the United States of America. B.1-B.25 pp.

Sawyer C. V. and P. L. McCarthy. 1967. *Chemistry for sanitary engineers*, McGraw Hill Book Co.

Shaffer, B. T., F. Widmer, L. A. Porteous and R. J. Seidler. 2000. Temporal and spatial distribution of the *nifH* gene of N<sub>2</sub> fixing bacteria in forest and clearcuts in western Oregon. *Microbial Ecology* 39: 12–21.

Schaffer, A. 1993. Pesticides effects on enzyme activities in the soil ecosystem. *In: Soil Biochemistry*. Vol 8 J. M. Bollag and G. Stotzky. 273–340.

Schindler, F. V., E. J. Mercer, and J. A. Rice. 2007. Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. *Soil Biol. Biochem.* 39: 320–329.

Schüßler A., D. Schwarzott and C. Walker. 2001. A new fungal phylum the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105: 1413–1421.

Sikora, L. J. and D. E. Stott. 1996. Soil organic carbon and nitrogen. pp. 157–167. *In: "Methods for assessing soil quality"*, SSSA Special Publication 49, Soil Science Society of America, 677 S. Segoe Rd.,

Madison, WI 53711, USA,

Sims G. K. 1990. Biological degradation of soil. pp. 289–330. *In: advances in soil science*, USA.

Smith, J. L., J. J. Halvorson and H. Bolton Jr. 1994. Spatial relationship of soil microbial biomass and C and N mineralization in a semiarid shrub-steppe ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 26 (9): 1151–1159.

Smith S. E. and D. J. Read. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3<sup>d</sup> ed. Great Britain. USA. Academic Press. p. 787

Sundari S. K. and A. Adholeya. 2000. Retention of enzyme activity following freeze-drying the mycelium of ectomycorrhizal isolates: part II. Enzymes acting upon carbon compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16: 865–868.

Tingey, S. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs). pp. 675–676. *In: The Nucleic Acid Protocols Handbook*, (Ed., R. Rapley) Humana Press Inc., New York.

Toyota K., Ritz K. and Young I. M. 1996. Survival of bacterial and fungal populations following chloroform-fumigation: Effects of soil matric potential and bulk density. *Soil Biology & Biochemistry*. 28 (10): 1545–1547.

Treseder K. K. and K. M. Turner. 2006. Glomalin in ecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71: 1257–1266.

Ueda, T., Y. Suga, N. Yahiro and T. Matsuguchi. 1995. Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Journal of Bacteriology* 177:1414–1417.

Valsecchi, G., C. Gigliotti and A. Farini. 1995. Microbial biomass activity and organic matter accumulated and soils contaminated with heavy metals. *Biology and Fertility of soils*, 20: 253–259.

Vance, E. D., P. C. Brookes and D. S. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19 (6): 703–707.

Van der Heijden M. G. A., J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken and I. R. Sanders. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69–72.

Vázquez-Marrufo, G., M. S. Vázquez-Garcidueñas, B. E. Gómez-Luna and V. Olalde-Portugal. 2002. DNA isolation from forest soil suitable for PCR assays of fungal and plant rRNA genes. *Plant*



*Molecular Biology Reporter* 20: 379–390.

Vierheilig H., A. P. Coughlan, U. Wyss and Y. Piche. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol* 64: 5004–5007.

Vierheilig H., M. Knoblauch, K. Juergensen, A. J. E. VanBel, F. M. W. Grundler and Y. Piche. 2001. Imaging arbuscular mycorrhizal structures in living roots of *Nicotiana tabacum* by light, epifluorescence, and confocal laser scanning microscopy. *Can J Bot* 79: 231–237.

Vierheilig H., P. Schweiger and M. Brundrett. 2005. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiol Plant* 125: 393–404.

Virgen, C. G., J. García y J. L. Espinoza. 1990. Control biológico del marchitamiento de la sandía causada por *Fusarium oxysporum f. sp. niveum* con inoculación de *Bacillus subtilis* en semilla. Reporte de investigación. CNPH-UAAAN. Méx. 21 p.

Voets L., H. Dupré de Boulois, L. Renard, D. G. Strullu and S. Declerck. 2005. Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. *FEMS Microbiol Lett.* 248: 111–118.

Voroney R. P. and E. A. Paul. 1984. Determination of  $k_c$  and  $k_N$  *in situ* for calibration of the chloroform fumigation-incubation method. *Soil Biology & Biochemistry.* 16, 9–14.

Walker C. 2005. A simple blue staining technique for arbuscular mycorrhizal and other root-inhabiting fungi. *Inoculum* 56: 68–69.

Watanabe, I. and W. Barraquio. 1979. Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living  $N_2$ -fixing bacteria from the rhizosphere of rice roots. *Nature.* 277: 565–566.

Wellington, E. M. H. and I. K. Tothoras. 1986. Actinomycetes. *In:* Klute, A. (Ed.). *Methods of soil analysis.* Second Edition. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA.

Whiffen, L. K., D. J. Midgley, and P. A. McGee. 2007. Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method. *Soil Biol. Biochem.* 39: 691–694.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications,* (Eds., M.A. Innis, D. H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White). Academic Press, San Diego California, USA. 315–322.

Widmer, F., R. J. Seider, P. M. Gillevet and G. D. Giovanni. 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the

genus *Pseudomonas* (sense strict) in environmental samples. *Applied Environmental Microbiology* 64: 2545–2553.

Widmer, F., B. T. Shaffer, L. A. Porteous and R. J. Seidler. 1999. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a douglas-fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Applied Environmental Microbiology* 65: 374–380.

Williams, D. R. and R. Rapley. 2000. Agarose gel electrophoresis of nucleic acids. pp. 67–68. *In: The Nucleic Acids Protocols Handbook.* (Ed., R. Rapley), Humana Press Inc. New York.

Wright, S. F., and A. Upadhyaya. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.* 161: 575–586.

Wright, S. F. and A. Upadhyaya. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil,* 198: 97–107.

Yang, Y. H., J. Yao, S. Hu and Y. Qi. 2000. Effects of agricultural chemicals on DNA sequence diversity of soil microbial community: a study with RAPD marker. *Microbial Ecology* 39: 72–79.

Zehr, J. P. and L. A. McReynol. 1989. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2522–2526.

Zehr, J. P., B. D. Jenkins, S. M. Short and G. F. Steward. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology* 5: 539–554.

Zhou, J. M., A. Bruns and T. M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 312–322.

Zuberer. 1986. Bacteria. *In:* Klute, A. (Ed.). *Methods of soil analysis.* Second Edition. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA.

## TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE SUELOS Y ABONOS ORGÁNICOS

Editado por Fundación Produce Sinaloa, A.C, siendo el coordinador del área de divulgación José Nedel Sánchez Valencia, se terminó de imprimir en Manjarrez Impresores, S. A. de C. V., José Aguilar Barraza 140 Poniente, Jorge Almada, Culiacán, 80200 (Sinaloa) en el mes de julio de 2014.

La corrección de estilo estuvo a cargo de Óscar Paúl Castro Montes. El diseño, a cargo de Loreto Monzón Márquez, se realizó con tipos Segoe de 11:13, 10:12 y 9:11 puntos.

La edición consta de 1000 ejemplares impresos en papel bond de 70 kg.

### Agradecimientos:

Al CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, por las facilidades dadas para la realización de este libro, a través del proyecto: SIP Diseño y evaluación de bioinsecticidas micro y nanoencapsulados para el control de plagas del tomate en Sinaloa. Clave 20140490.

A la Fundación Produce Sinaloa A.C., por su valioso apoyo en la redacción de estilo y el cuidado en el proceso de edición. Al INAPI Sinaloa, por el apoyo económico para la publicación de este libro. A los miembros del comité de arbitraje por su revisión y sugerencias y aportaciones a la obra.

A los participantes, por sus aportaciones y entusiasmo para la realización de la obra.

**FUNDACIÓN  
PRODUCE**  
*Sinaloa A.C.*  
ENLACE, INNOVACIÓN Y PROGRESO



uaim



Unidad Sinaloa



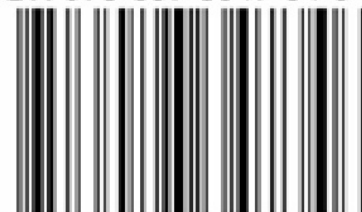
**INAPI  
SINALOA**  
Instituto de Apoyo a la  
Investigación e Innovación



## TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE SUELOS Y ABONOS ORGÁNICOS

El libro técnicas de caracterización de suelos y abonos orgánicos se realizó con base en la revisión de los procedimientos más comunes para el análisis de muestras de suelo y abonos orgánicos. En la primera sección se presentan los métodos de muestreo y el análisis de suelos en términos de sus propiedades fisicoquímicas y orgánicas, mientras que en la segunda sección se describen las técnicas para el análisis microbiológico y la determinación de la actividad microbiana. También contiene técnicas moleculares avanzadas para caracterizar microorganismos del suelo. Esta obra es una herramienta importante para profesionales dedicados al estudio de la ciencia del suelo y para técnicos, investigadores y productores interesados en la conservación y el aprovechamiento de suelos en los que se practica la agricultura orgánica y convencional, en cultivos agrícolas y frutales.

ISBN 978-607-8347-34-6



9 786078 347346 >

