

TÉCNICAS DE MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA EN EL ESTUDIO DEL SUELO Y PLANTA



Rosalva García Sánchez
Gerardo Cruz Flores
Claudia Janette De la Rosa Mera



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



TÉCNICAS DE MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA EN EL ESTUDIO DEL SUELO Y PLANTA



Rosalva García Sánchez

Gerardo Cruz Flores

Claudia Janette De la Rosa Mera

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Datos para catalogación bibliográfica

Autores: Rosalva García Sánchez, Gerardo Cruz Flores, Claudia Janette De la Rosa Mera.

Técnicas de microbiología y bioquímica en el estudio del suelo y planta.

UNAM, FES Zaragoza, enero de 2021.

Peso: 10 MB.

ISBN: 978-607-30-4120-1.

Proyecto: PAPIME PE-214419.

Diseño de portada: Carlos Raziel Leños.

Diseño y formación de interiores: Claudia Ahumada Ballesteros.

DERECHOS RESERVADOS

Queda prohibida la reproducción o transmisión total o parcial del texto o las ilustraciones de la presente obra bajo cualesquiera formas, electrónicas o mecánicas, incluyendo fotocopiado, almacenamiento en algún sistema de recuperación de información, dispositivo de memoria digital o grabado sin el consentimiento previo y por escrito del editor.

Técnicas de microbiología y bioquímica en el estudio del suelo y planta.

D.R. © Universidad Nacional Autónoma de México

Av. Universidad # 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México, C.U.,
Alcaldía de Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México.

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Av. Guelatao # 66, Col. Ejército de Oriente,
Alcaldía de Iztapalapa, C.P. 09230, Ciudad de México, México.

CONTENIDO

- 7 CAPÍTULO I**
- INTRODUCCIÓN**
- 7 Microbiología del suelo
- 8 Microorganismos del suelo
- 12 Rizosfera
- 13 Enzimas del suelo
- 14 Coeficiente metabólico
- 14 Bioquímica del suelo

- 19 CAPÍTULO II**
- FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO**
- 19 El nitrógeno como elemento esencial en el crecimiento de las plantas
- 20 Formación de nódulos fijadores de nitrógeno
- 21 Clasificación de nódulos fijadores de nitrógeno
- 23 Uso de microorganismos fijadores de nitrógeno en la agricultura
- 24 Practica: 2.1 Morfología de los nódulos radicales y bacteroides
- 24 Práctica: 2.2 Aislamiento de rizobios a partir de nódulos
- 28 Práctica: 2.3 Caracterización fenotípica de las cepas aisladas
- 30 Práctica: 2.4 Infección de la raíz de las leguminosas por los rizobios del suelo

- 33 CAPÍTULO III**
- RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE PLANTAS MICORRIZADAS SOMETIDAS A ESTRÉS**
- 33 Micorriza arbuscular
- 34 Indicadores fisiológicos modificados por la micorriza arbuscular en plantas sometidas a estrés
- 36 Práctica: 3.1 Contenido hídrico relativo (CHR) en hoja

- 38 Práctica: 3.2 Determinación de la pérdida de electrolitos
- 40 Práctica: 3.3 Acumulación de pigmentos fotosintéticos
- 42 Práctica: 3.4 Determinación de la concentración de prolina
- 44 Práctica: 3.5 Determinación de los azúcares solubles totales
- 46 Práctica: 3.6 Determinación de glutatión total
- 51 Práctica: 3.7 Determinación del ascorbato total
- 53 Práctica: 3.8 Determinación de la acumulación de peróxido de hidrógeno
- 56 Práctica: 3.9 Determinación del daño oxidativo

61 **CAPÍTULO IV** **RIZOSFERA**

- 61 Introducción
- 61 Práctica: 4.1 Determinación de longitud y densidad de longitud radical por el método de las intersecciones
- 64 Práctica: 4.2 Extracción y manejo de micelio del suelo
- 70 Práctica: 4.3 Biotrampas para recuperar hongos del suelo rizosférico

75 **CAPÍTULO V** **BIOQUÍMICA DEL SUELO**

- 75 Introducción
- 76 Práctica: 5.1 Respiración del suelo (emisión de CO_2), determinación de carbono en biomasa microbiana y coeficiente metabólico
- 81 Práctica: 5.2. Actividad de exoenzimas del suelo
- 83 Práctica 5.2.1. Actividad de las fosfatasa ácidas y alcalinas
- 86 Práctica: 5.3 Determinación de actividad enzimática de la raíz
- 88 Práctica: 5.4. Actividad arilsulfatasa del suelo
- 90 Práctica: 5.4.1. Determinación de sulfatos del suelo
- 91 Práctica: 5.5. Determinación de actividad ureasas del suelo
- 94 Práctica: 5.5.1 Método de N-Total del suelo con inclusión de nitratos
- 96 Práctica: 5.5.2 Efecto de absorción de nitrógeno (N-NH_4^+ y N-NO_3^-) sobre el pH del suelo
- 98 Práctica: 5.6 Extracción y cuantificación de ácidos húmicos y fúlvicos
- 100 Práctica: 5.6.1 Caracterización de la espectroscopía de IR
- 101 Práctica: 5.6.2 Determinación de la relación E4/E6

PRÓLOGO

El deseo de escribir este texto es proporcionar al estudiante de los ecosistemas terrestres y del suelo una serie de herramientas que le permitan acercarse a los procesos que ocurren en el suelo y que repercuten en la productividad de los mismos. En la actualidad distinguir los aspectos biológicos y bioquímicos del suelo pueden ser una fuerte herramienta en otras actividades como la restauración del suelo o de los ecosistemas, la productividad de los agroecosistemas, fitoremediación entre otros. Esta obra aborda aspectos prácticos poco divulgados que conducen a valorar la naturaleza dinámica de las relaciones planta-suelo-microorganismos como un sistema que le confiere estabilidad y resiliencia a los ecosistemas. La obra está estructurada con una breve revisión de los conceptos considerados en las prácticas como la bioquímica del suelo, los capítulos siguientes conforman núcleos de actividades prácticas importantes de las simbiosis más frecuentes en las plantas como son: Fijación biológica del nitrógeno (Capítulo II), Actividad fisiológica relacionada con el fósforo (Capítulo III), estudio de la Rizosfera (Capítulo IV) y el estudio de la bioquímica del suelo (Capítulo V). Cada capítulo tiene sus propias necesidades por ello los capítulos no tienen el mismo formato.

En México, aún existen pocas obras relacionadas con los temas aquí tratados, por lo que consideramos que esta obra puede ser útil en programas relacionados con la enseñanza del suelo, ecología del suelo y de ecología microbiana, especialmente en estudiantes que ya posean conocimientos básicos de esta área.

Dra. Rosalva García Sánchez

Dr. Gerardo Cruz Flores

Dra. Claudia Janette De la Rosa Mera

AGRADECIMIENTOS

A la DGAPA – UNAM. Proyecto PAPIME PE-214419.

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

A LA CARRERA DE BIOLOGÍA.

A la División de Estudios de Investigación y Posgrado de la FES-ZARAGOZA de la UNAM por los apoyos materiales y recursos proporcionados a la línea de investigación: RELACIONES SUELO-AGUA-VEGETACIÓN EN EL MANEJO DE CUENCAS (Gerardo) y a la UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ECOLOGÍA VEGETAL (Rosalva).

AL ZAIDIN, GRANADA, ESPAÑA. En especial al DR. JUAN MANUEL RUIZ LOZANO quién me permitió hacer una estancia en su laboratorio y me guió en aprendizaje de varias de las técnicas aquí plasmadas (Rosalva)

A los estudiantes de los Laboratorios de Investigación Formativa del Ciclo terminal de la Carrera de Biología, Servicio Social y Tesistas que colaboran con los autores.

DEDICATORIA

A la Doctora: **Lucía Varela Fregoso** – Cuyo amor por la enseñanza de los hongos, es una inspiración y guía en el mundo de las micorrizas en México.

A los destacados microbiólogos: Maestro **Alfredo Echegaray Alemán**, Dr. **Roberto Quintero Lizaola** y Dr. **Ronald Ferrera Cerrato**, profesores de Microbiología del suelo, y a los Doctores: **Juan Luis Tirado Torres** y **Gabriel Alcántar González** profesores de Nutrición Vegetal en el Colegio de Postgraduados.

A la M. en C. **María de Jesús Sánchez Colín** (QEPD). Estimada compañera y maestra de la FES Zaragoza quién inicio el estudio de la Microbiología del suelo en la FES.

MICROBIOLOGÍA DEL SUELO

El estudio de la microbiología ocurrió con la invención del microscopio (1680) e inicialmente abordó los estudios de la salud humana, a finales del siglo XIX se incorporó el estudio del suelo (Atlas y Bartha, 2008). A la microbiología del suelo se le puede definir como “El estudio de los microorganismos que habitan en el suelo, su actividad metabólica, sus diversas funciones en el flujo de la energía y en el ciclo nutricional”. Los estudios microbiológicos del suelo hoy día pueden ser desde muy generales hasta muy especializados abordando temas como:

- ▲ Fijación simbiótica del nitrógeno
- ▲ Descomposición de la materia orgánica
- ▲ Transformación del nitrógeno
- ▲ Estudio de la rizosfera (raíces-suelo-microorganismos)
- ▲ Enzimas presentes en el suelo
- ▲ Biorremediación o bioreparación
- ▲ Ciclo de carbono
- ▲ Gases invernadero
- ▲ Ingeniería genética
- ▲ Ecología microbiana
- ▲ Actividad microbiana del suelo

Sin dejar de lado la biotecnología que tiene su propio campo de acción en el suelo.

MICROORGANISMOS DEL SUELO

Los microorganismos que habitan en el suelo son muy diversos, presentan complejas interacciones entre ellos y con las plantas, de entre todas las interacciones posibles sobresalen los microorganismos saprobios, simbioses o parásitos, estas relaciones tienen diferentes efectos en el suelo. Los microorganismos favorecen la eficiencia en la captación de nutrientes de las plantas, además de que su diversidad es esencial para garantizar los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, producen hormonas y contribuyen al control de patógenos. Por lo tanto la actividad microbiana es esencial para mantener la fertilidad del suelo y la nutrición de las plantas.

En el suelo existen cerca de mil millones de microorganismos por gramo (Kennedy, 1998; Soria, 2016). Aunque invisibles a la observación directa, los microorganismos del suelo son esenciales para los ecosistemas por su participación en procesos tales como la transformación de la materia orgánica (Paul y Clark, 1996; Estrada-Herrera *et al.*, 2017). La diversidad de funciones de los microorganismos en el suelo contribuye con las propiedades como la estabilidad y fertilidad del suelo, así como con la nutrición de las plantas (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007); por ello se consideran como un elemento importante en las variables que definen la dinámica del suelo.

De manera general los organismos se dividen en tres grupos de acuerdo a su tamaño:

1. Microfauna – constituida por animales que viven en el agua que se encuentra entre las partículas del suelo, miden menos de 0.1 mm (protozoarios, rotíferos y nemátodos).
2. Mesofauna – formada por animales que viven del aire que se encuentra entre las partículas del suelo cuyo tamaño es de 0.1 a 2 mm, como los microartrópodos (Colémbolos y Ácaros) y pequeños Oligoquetos y Enquitráeidos.
3. Macrofauna – animales de respiración aérea de más de 2 mm hasta 20 mm que se mueven activamente a través del suelo y que pueden elaborar galerías y cámaras en las cuales viven. Estos animales se han nombrado “ingenieros de ecosistemas” como son las lombrices, termitas, hormigas, entre otros (Swift *et al.*, 1979; Fragoso *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2016).

Los microorganismos del suelo se distribuyen en cinco grupos: virus, bacterias, actinobacterias, hongos y algas (Lavelle y Spain, 2001; Tortora *et al.*, 2001). Estos

microorganismos son los más numerosos y por tanto los más activos del suelo, en conjunto a este numeroso grupo de organismos se le refiere como biomasa microbiana.

Los microorganismos utilizan como sustratos energéticos los residuos de las plantas, cuya composición química es importante en los procesos de descomposición, además, participan en los procesos de mineralización de la materia orgánica del suelo (MOS). En una prueba hecha con las poblaciones microbianas del suelo, se observó que prefirieron usar el desecho de plantas anuales sobre el de las plantas perennes, probablemente como resultado de la cantidad y calidad del carbono contenido en el tejido vegetal.

En los ecosistemas, la biomasa microbiana del suelo al morir se reintegra a la comunidad microbiana sobreviviente, sobretodo después de que ha ocurrido una lluvia que incorpora humedad al sistema y dispara los procesos microbianos.

El clima y las diferentes condiciones ambientales están relacionados con la vida de los microorganismos, por ejemplo en condiciones secas, los microorganismos acumulan solutos orgánicos en su citoplasma para reducir su potencial hídrico y no perder agua, en húmedo, existe un equilibrio en las concentraciones de solutos dentro y fuera de su membrana, de no existir este equilibrio la membrana se rompe y el citoplasma junto con los compuestos orgánicos son liberados al suelo, luego entonces, la humedad del suelo juega un papel importante en la dinámica de la comunidad de los microorganismos, en su fisiología y por lo tanto en la mineralización, inmovilidad y disponibilidad de N_2 y otros nutrimentos del suelo.

Los microorganismos rizosféricos afectan al crecimiento y nutrición vegetal (Cano, 2011), un desequilibrio en sus funciones puede ocasionar la pérdida de la productividad sostenida del ecosistema, la cual depende de diversos factores pero fundamentalmente de la estructura física del suelo, y del equilibrio biológico óptimo que engloba la interacción entre la planta, el suelo y los micro- y macro-organismos edáficos presentes en el ecosistema, o agroecosistema por ello, la actividad microbiana ha generado interés agronómico y ecológico reconociendo su potencialidad para reciclar los nutrimentos, mejorar la nutrición de las plantas y disminuir o sustituir la aplicación de fertilizantes químicos.

La mineralización orgánica es el proceso catabólico a través del cual los elementos orgánicos contenidos en los tejidos biológicos son transformados a compuestos inorgánicos como nitratos, fosfatos o sulfatos. Durante la humificación las moléculas orgánicas son transformadas en moléculas recalcitrantes, las cuales pueden perdurar años, décadas o ciento de años en el suelo. La mineralización determina los flujos de nutrimentos disponibles entre plantas y microorganismos y su distribución en tiempo y espacio; la

humificación regula la acumulación de materia orgánica en el suelo, misma que mantiene la fertilidad del suelo (Adeleke *et al.*, 2017). Los principales grupos de microorganismos del suelo involucrados en este proceso por número y por actividad son bacterias y hongos.

BACTERIAS

Las bacterias son los organismos menos evolucionados, de menor complejidad estructural y los más pequeños. Son organismos unicelulares con forma esférica, cilíndrica o en espiral. La composición química de su pared celular permite clasificarlas en dos grandes grupos: Gram-positivas y Gram-negativas. La mayoría de las bacterias del suelo son gram-negativas, tienen forma cilíndrica o esférica, pueden alcanzar densidades de hasta 10^7 UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de suelo (Brady, 1990).

La mayor proporción de bacterias se encuentran en los primeros 30 cm de profundidad del suelo (Van Elsas *et al.*, 1993) se encuentran adheridas a las partículas de arcilla y humus y raramente en la solución del suelo. La cantidad y el tipo de bacterias están determinados por el tipo de suelo, especialmente por su contenido de arcilla, humedad, aireación, temperatura, contenido de materia orgánica y pH, así como por el cultivo, estación del año, profundidad, abundancia de protozoarios y de otros organismos que se alimentan de ellas (Alexander, 1980).

La abundancia y la diversidad bacterianas están limitadas por la disponibilidad de nutrientes y están concentradas en áreas con mayor abundancia de recursos como los sustratos orgánicos incluida la rizósfera (Griffiths, 1990). Los exudados rizosféricos ejercen un efecto estimulante sobre el crecimiento microbiano y sobre la abundancia faunística.

La densidad de bacterias del suelo varía en función del tipo y uso del suelo y de las prácticas agrícolas que se realicen. El manejo del suelo afecta notablemente a los microorganismos: la incorporación de fertilizantes orgánicos favorece el crecimiento de las poblaciones microbianas, mientras que los fertilizantes inorgánicos inhiben su crecimiento (Fauci y Dick, 1994), la introducción de organismos provenientes de otros sitios y la aplicación de pesticidas son otros factores que afectan fuertemente a las poblaciones microbianas autóctonas (Thompson-Eagle *et al.*, 1991; Levanon, 1993).

Condiciones extremas en las propiedades del suelo como de acidez, temperatura o humedad afectan negativamente la abundancia de microorganismos edáficos (Hyseck, 1996), sobreviviendo sólo los más resistentes (Díaz-Raviña *et al.*, 1993).

Su importancia en el suelo se debe principalmente a su capacidad metabólica, dentro de los ciclos biogeoquímicos la participación de bacterias especializadas es clave, por ejemplo en el ciclo del carbono las bacterias participan reduciendo el monóxido de carbono hasta metano y oxidando el dióxido de carbono. Las bacterias también intervienen en el ciclo del nitrógeno, nutriente clave en el crecimiento de los organismos y que forma parte de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, enzimas y otras sustancias como la clorofila, hemoglobina, etc. (Miller y Donahue, 1990).

HONGOS

Son organismos eucarióticos, con núcleo bien diferenciado, pueden ser mucilaginosos o filamentosos, el conjunto de filamentos llamados hifas forman el micelio. Las hifas están rodeadas de pared celular que contiene glucanos y a menudo quitina. Todos son aclorófilos, requieren materia orgánica preformada para su nutrición, la cual obtienen por absorción, ayudados por las secreciones de enzimas extracelulares. Son organismos que se reproducen asexualmente mediante esporas, y algunos grupos presentan esporas sexuales. Al no tener pigmentos fotosintéticos los hongos pueden ser saprófitos, parásitos o simbioses (Alexopoulos y Mimms, 1985; Bryce y Kendrick, 1990). La comunidad de hongos saprófitos está formada tanto por levaduras como por hongos filamentosos, con representantes de los grandes filamentos terrestres: Ascomycota, Basidiomycota y Mucoromycotina, en algunos ecosistemas la biomasa de estos hongos llega a un 39% de la biomasa microbiana total. Su función principal reside en la descomposición de sustratos sólidos recalcitrantes a celulosa, hemicelulosa y lignina.

Los hongos micorrizógenos, formadores de simbiosis mutualista con las plantas facilitan el aporte de nutrientes y H_2O a través de la red micelial, en este grupo de hongos se distinguen a los formadores de ectomicorriza y de endomicorriza, las ectomicorrizas se asocian predominantemente con las gimnospermas, en estas plantas las hifas del hongo no penetran las células vegetales. Sin embargo, en las endomicorrizas el hongo establece simbiosis con las células radicales, entre estas últimas se encuentran la micorriza orquidíode (que es muy específica) y la micorriza arbuscular que no muestra especificidad, así el micelio externo de un mismo hongo puede interconectar los sistemas radicales de distintas plantas que cohabitan y también se conectan entre sí distintos micelios fúngicos, el resultado es la formación de una compleja red de primera importancia para el funcionamiento de los ecosistemas (Van der Heijden y Horton 2009).

La distribución de los hongos del suelo es afectada por la presencia de sustratos orgánicos, textura, temperatura, profundidad de los horizontes, pH y contenido de humedad, la rizosfera es su nicho ecológico preferencial, por lo que en las zonas aledañas a la raíz se encuentran en mayor abundancia (Collins *et al.*, 1991; Buee *et al.*, 2009).

De manera general, se han usado las propiedades físicas y químicas del suelo como indicadores de su condición (en algunos textos se mencionan como la salud del suelo). Sin embargo, recientemente ha cobrado importancia el estatus de los microorganismos del suelo como un indicador útil del estado general del suelo (Garbisu *et al.*, 2007; Estrada-Herrera *et al.*, 2017)

Se conoce que los grupos bacterianos intervienen en los ciclos biogeoquímicos del suelo y desempeñan un papel decisivo en la fertilidad del mismo. Su actividad y efecto en el suelo tiene variaciones a lo largo del año debido a factores climáticos, aporte de materia orgánica y su acumulación, degradación de sustratos y del uso agrícola al que sea sometido.

Varios autores han estudiado el efecto de los cambios estacionales sobre los microorganismos, y su relación con la disponibilidad de nutrientes, un ejemplo es el estudio a lo largo de un año en un suelo forestal de Europa, donde se determinó una densidad máxima de microorganismos en verano y un mínimo en invierno, en otros suelos de pradera el máximo de microorganismos se obtuvo en primavera (Kilbertus *et al.*, 1980).

RIZOSFERA

La rizosfera fue definida por Hiltner, en 1904, como la zona alrededor de las raíces de las plantas, donde se estimula el crecimiento de las bacterias (Harmann *et al.*, 2008). Esta definición se ha ido ampliando a través del tiempo, en la actualidad se reconocen las siguientes zonas: (1) ectorrizósfera, zona alrededor de la raíz; (2) rizoplano, zona de la superficie de la raíz y (3) endorrizósfera, que involucra la epidermis y las células corticales de la raíz (Campbell y Greaves, 1990; Lynch, 1990). En estas zonas se encuentran exudados de la raíz liberados por la planta, resultado de los efectos físicos y ambientales como luminosidad, temperatura, cambios en pH, daños a la raíz y contenido de agua del suelo (Barea, 1998; Walker *et al.*, 2003).

La solución de la rizósfera es la fuente directa del abastecimiento de nutrimentos de la planta; su composición de nutrimentos es muy diferente a la solución del suelo a consecuencia de la exudación de las raíces, absorción de nutrimentos y a la actividad de los microorganismos. La rizósfera está directamente influenciada por la raíz de la planta.

Está bien documentado que las raíces de las plantas cambian el pH del suelo es decir lo modifican al liberar iones hidronio (H^+) y oxidrilos (OH^-). El pH y los ácidos orgánicos tienen un efecto significativo sobre el estado mineral y la solubilidad de los nutrientes (Robert y Berthelin, 1986; Tan, 1986; Gallardo, 2018). La absorción de nutrientes está influenciada por los equilibrios químicos de la rizósfera. Las grandes comunidades de microorganismos pueden incrementar la descomposición de la materia orgánica y por ende incrementar la concentración de nutrientes en la solución del suelo rizósferico (Medina, 2012).

La rizósfera puede ser modificada por varios mecanismos como son: alteraciones de pH, potencial redox y de la composición de iones orgánicos e inorgánicos alrededor de las raíces, así como cambios en las propiedades físicas y químicas del suelo que influyen en la actividad y forma de los nutrientes como el fósforo inorgánico del suelo o en la capacidad de los coloides para suministrar fósforo (Marschner, 1995).

ENZIMAS DEL SUELO

Las enzimas son un tipo especial de proteínas que se combinan con un sustrato específico y actúan para catalizar una reacción bioquímica, sin experimentar cambios en su estructura; en términos generales las enzimas en el suelo son esenciales para la transformación de energía y el ciclaje de nutrientes. Debido a su naturaleza proteica pueden ser afectadas por factores ambientales como son la temperatura y el pH (Alexander, 1980, Paul y Clark, 2007). Las enzimas de suelo son producidas por las plantas, animales y microorganismos del suelo, pueden estar presentes en los restos celulares que son absorbidos por arcillas e incorporados a las sustancias húmicas (Baležentienė y Klimas, 2009).

Las enzimas intervienen en la mayoría de los procesos del suelo, sus funciones son muy importantes. Son responsables de la formación de moléculas orgánicas y tienen una participación vital en el ciclo de nitrógeno, fósforo y carbono, participan en la mineralización de la materia orgánica, inmovilización de nutrientes y fijación biológica de nitrógeno, entre otros.

Las enzimas del suelo más estudiadas son las oxidoreductasas (deshidrogenasas, catalasas y peroxidasas) y las hidrolasas (sobre todo fosfatasa, proteasa y ureasa). Una parte de las enzimas del suelo son extracelulares, las que son liberadas durante el metabolismo y muerte celular. Otras son intracelulares, forman parte de la biomasa microbiana, ciertas enzimas muestran una gran sensibilidad frente a procesos como la contaminación de suelos, su degradación e incluso su desertificación.

COEFICIENTE METABÓLICO DEL SUELO

El coeficiente metabólico (qCO_2) también denominado respiración específica, se define como la tasa de respiración (medida como CO_2 desprendido) por unidad de biomasa microbiana (Anderson y Domsch, 1990) y por lo tanto podría evaluar qué tan eficazmente la biomasa microbiana está empleando el carbono disponible para la biosíntesis (Wardle y Ghani, 1995).

Es un valor que engloba dos conceptos claves en el ciclo del carbono y reciclaje de nutrientes del suelo. La biomasa microbiana comprende menos del 5% de la materia orgánica del suelo. Sin embargo, desempeña funciones críticas en el suelo: es una fuente de nutrientes lábiles, es un reservorio de nutrientes del suelo y es un agente de transformación de sustancias agregadas al suelo.

Además, también está conformado por microorganismos que forman asociaciones simbióticas con las raíces y actúan como agentes antagonistas de patógenos, contribuye a la agregación del suelo, etc. Dentro de las condiciones naturales que más afectan su proporción en los suelos es la textura. En general, los suelos arcillosos presentan en proporción, mayores valores que los arenosos. La respiración microbiana refleja las pérdidas de carbono del suelo por acción de la biota edáfica. Si bien es un proceso necesario, pérdidas excesivas pueden generar reducciones considerables en la biomasa microbiana y en la materia orgánica del suelo. Se encuentra que el qCO_2 es elevado mientras mas alto es el estrés del edafosistema (Sparling 1992).

BIOQUÍMICA DEL SUELO

La incorporación de residuos orgánicos al suelo produce la activación de sus propiedades microbiológicas y bioquímicas, estimulando la proliferación microbiana y su actividad metabólica, como consecuencia de los aportes de las fuentes lábiles de carbono que van a servir como sustrato a la biota del suelo. El aumento en la actividad microbiana en los suelos va acompañada de un incremento en su tasa respiratoria, desprendiéndose CO_2 como reflejo de los procesos catabólicos llevados a cabo sobre las fracciones orgánicas (García-Gil 2001, Toledo *et al.*, 2019).

Los efectos de las aportaciones orgánicas sobre la fertilidad del suelo dependen de las características de los materiales aportados y del propio suelo. La presencia de carbono lábil

y la disponibilidad de compuestos nitrogenados son dos aspectos de especial relevancia (Farrus *et al.*, 2004).

Los aportes de la materia orgánica total no se reflejan durante años en el análisis del nitrógeno y carbono orgánico totales del suelo (Gallardo, 2018); sin embargo, la biomasa microbiana varía con mucha rapidez y su aumento o disminución proporcionan un índice temprano de los cambios que se producen en el suelo (Powlson, 1987). La biomasa microbiana da información sobre las dimensiones de esa biomasa pero no de su actividad metabólica, la respiración del suelo (producción de CO₂) es una medida de dicha actividad.

La evaluación de los parámetros bioquímicos del suelo tienen mucha importancia, debido a que su cuantificación permite obtener información metabólica del suelo para entender procesos como la mineralización y humificación de la materia orgánica, procesos donde intervienen compuestos con fósforo, carbono, nitrógeno y azufre y las transformaciones de la biomasa microbiana (García *et al.*, 2003). Los parámetros que se suelen medir son: contenido de carbono de la biomasa microbiana, la mineralización del nitrógeno y la actividad enzimática.

El nitrógeno, después del agua, es el principal factor limitante para el desarrollo de los cultivos, por esa razón en el período entre 1950 y 1990 se incrementó 10 veces el uso de fertilizantes lo cual llevó a un aumento sin precedentes en la producción de cereales. Sin embargo, la aplicación de fertilizantes y otras acciones industriales han alterado las condiciones del ciclo natural del nitrógeno y contribuyen a la contaminación por nitratos de los ecosistemas terrestres y acuáticos con grave riesgo para la salud humana (Fernández-Pascual *et al.*, 2002).

LITERATURA CITADA

- Adeleke, R., Nwangburuka, C. & Oboirien, B. (2017). Origins, roles and fate of organic acids in soils. A review. *South African Journal of Botany*. 108, 393-406.
- Alexander, M. (1980). *Introduction to Soil Microbiology*. 2ª Ed. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 467.
- Alexander, M. (1980). *Transformaciones microbianas del fósforo. Introducción a la microbiología del suelo*. México: AGT Editor, pp. 355-371.
- Alexopoulos, C. J. & Mimms, C. W. (1985). *Introducción a la micología*. Barcelona, España: Omega, pp. 638.

- Anderson, T.H. & Domsch, K. H. (1990) Application of ecophysiological quotients (qCO₂ and qD) on microbial biomass from soils of different cropping histories. *Soil Biol. Biochem.* 22, 251-255.
- Atlas, R.M. & Bartha, R. (2008). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. España: Pearson Addison Wesley.
- Baležentienė, L. & Klimas E. (2009). *Effect of organic and mineral fertilizers and land management on soil enzyme activities*. Special ISSUE I 9:191-197.
- Barea, J. M. (1998). Biología de la rizósfera. *Investigación y Ciencia* 47: 74-81.
- Brady, N. C. (1990) *The nature and properties of soils* (10th ed.), Cranbury, USA: Macmillan Publishing Company.
- Bryce, B. & Kendrick, B. (1990). Soil fungi, *Soil biology guide*, New York, USA: John Wiley & Sons, 46-68.
- Buee, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S. & Martin, F. (2009). Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity, 184, 449-456.
- Campbell, R. & Greaves, M.P. (1990). *Anatomy and community structure of the rhizosphere*. Chichester, UK: John Willey and Sons.
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15-31.
- Collins, C. H., P. M Lyne & Grang, J. M. (1991). *Collins and lyne's microbiological method* (8th Ed.). Oxford, UK: Butterworth Heinemann.
- Díaz-Raviña, M., Acea, M. J., & Carballas, T. (1993). Seasonal fluctuations in microbial populations and available nutrients in forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, 16(3), 205-210.
- Estrada-Herrera, I. R., Hidalgo-Moreno, C., Guzmán-Plazola, R., Almaraz Suárez, J. J., Navarro-Garza, H., & Etchevers-Barra, J. D. (2017). Indicadores de calidad de suelo para evaluar su fertilidad. *Agrociencia*, 51(8), 813-831.
- Farrus, E., Adrover, M., Forss, A. & Vadell, J. (2004). *Comparación de tres fuentes de materia orgánica sobre las características del suelo*. Memorias del VI Congreso de la SEAE, 11-123.
- Fauci, M. F., & Dick, R. P. (1994). Soil microbial dynamics: Short-and long-term effects of inorganic and organic nitrogen. *Soil Science Society of America Journal*, 58(3), 801-806.
- Fernández-Pascual, M., De Maria. N., & Felipe, M.R. (2002). Fijación biológica de nitrógeno, factores limitantes. *Ciencia y Medio Ambiente*, 195-202.
- Ferrera-Cerrato, R. & Alarcón, A. (2007). *Microbiología agrícola: Hongos, Bacterias, Micro y Macrofauna, Control Biológico y Planta-Microorganismo*. México. Trillas.

- Fragoso, C., Castillo, P. R., & Rojas, P. (2001). La importancia de la biota edáfica en México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, (Es1), 1-10.
- Garbisu, C., Becerril, J., Epelde, M. L. & Alkorta, I. (2007). Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodológica para la evaluación de la eficacia de un proceso fitoremediador. *Ecosistemas* 16, 44-49.
- García-Gil, G. J. C. (2001). *Efectos residuales y acumulativos producidos por la aplicación de compost de residuos urbanos y lodos depuradoras sobre agrosistemas mediterráneos degradados* (Tesis doctoral), Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, España.
- García, C., Gil, F., Hernández, T. & Trasar C. (2003). *Técnicas de análisis de propiedades bioquímicas en suelos: Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. Madrid, España: MundiPrensa, pp. 49-58.
- Griffiths, B. S. (1990). A comparison of microbial-feeding nematodes and protozoa in the rhizosphere of different plants. *Biology and Fertility of Soils*, 9(1), 83-88.
- Hartmann, A., Rothballer, M. & Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and soil*, 31, 7-14.
- Hysek, J. (1996). *Carbon and nitrogen cycles in some forest soils related to the content of humus and microbial activity*. Lesnictvi Forestry, CAB Abstracts, vol. 42, 287-291.
- Kennedy, A. C. (1998). *The rhizosphere and spermosphere. Principles and applications of soil microbiology*. New Jersey, USA: Prentice Hall, Inc.
- Kilbertus, G. (1980). Microhabitats in soil aggregates. Their relationship with bacterial biomass and size of the prokaryotes present. *Revue d'Ecologie et de Biologie du soil* 17(4), 543-557.
- Lavelle, P., Spain, A. V. (2001). *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Boston, London, New York. USA.
- Levanon, D. (1993). Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides Atrazine, Alachlor, Malathion and Carbofuran in soil. *Soil Biology Biochemistry*. 25, 1097-1105.
- Lynch, J.M. (1990). *Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil*. Chichester, UK: John Willey and Sons.
- Marschner, H. (1995). *Rhizosphere pH effects on phosphorus nutrition*. In *Genetic manipulation of crops plants to enhance integrated nutrient management in cropping systems*, FAO/ICRISAT Asia Center, India. PP. 107-115.
- Medina, S. M. (2012). *Caracterización bioquímica y microbiológica de un suelo de praderade *Dactylis glomerata* y *Medicago sativa* bajo diferentes proporciones de siembra* (Tesis doctoral), Universidad de Salamanca. España.
- Miller, R. W. & Donahue, R. L. (1990). *An introduction to soils and plant growth* (6th Ed.). Nueva Jersey, USA: Printice-Hall.

- Paul, E.A. & Clark F.E. (2007). *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press.
- Powelson, D.S., Brookes, P.C. & Christensen, B.T. (1987). Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(2), 159-164.
- Robert, M., & Berthelin, J. (1986). Role of Biological and Biochemical Factors in Soil Mineral Weathering. *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes*, 17, 453-495.
- Rodríguez S., A. C., Cristóbal Acevedo, D., Álvarez Sánchez, E., & Uribe Gómez, M. (2016). Indicadores de calidad de un suelo para la producción de maíz bajo sistemas agroforestal y monocultivo. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(SPE16), 3263-3275.
- Sparling, G.P. (1992) Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as sensitivity indicator of changes in soil organic matter. *Aust. J. Soil. Res.* 30, 195-207
- Swift, M. J., Heal, O. W., Anderson, J. M., & Anderson, J. M. (1979). *Decomposition in terrestrial ecosystems*, University of California Press. vol. (5).
- Tan, K. H. (1986). Degradation of soil minerals by organic acids. *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes*, 17, 1-27.
- Thompson-Eagle, E. T., Frankenberger, W. T., & Longley, K. E. (1991). Removal of selenium from agricultural drainage water through soil microbial transformations. In *The Economics and Management of Water and Drainage in Agriculture*, Boston, MA, Springer, pp. 169-186
- Thompson, E. T., Adeleke, R., Nwangburuka, C. & Oboirien, B. (2017). Origins, roles and fate of organic acids in soils. A review. *South African Journal of Botany*. 108, 393-406.
- Toledo, G., Gargaglione, V., & Peri, P. (2019). Abundancia de carbono en microorganismos en suelos de estepa de Santa Cruz. Su alteración en función a la disponibilidad de humedad. *Informes Científicos Técnicos-UNPA*, 11(2), 70-79.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2001) *Microbiology* (6th Ed). San Francisco, California. USA: Addison Wesley Longman, Inc.
- Van Der Heijden, M. G., & Horton, T. R. (2009). Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology*, 97(6), 1139-1150.
- Van Elsas, J. D., Trevors, J. T. & Wellington, E. M. (1993). *Modern soil microbiology*, New York, USA. Marcel Dekker, 353-373.
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., & Vivanco, J. M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant physiology*, 132(1), 44-51.
- Wardle, D.A. & Ghani, A. A., (1995) Critique of the microbial metabolic (qCO₂) as indicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biol. Biochem.* 27, 1601-1610

FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

EL NITRÓGENO COMO ELEMENTO ESENCIAL EN EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

El nitrógeno es un macronutriente, constituyente esencial de algunas moléculas fundamentales como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, entre otros (Baca *et al.*, 2000). El principal almacén de nitrógeno es la atmósfera, donde ocupa aproximadamente 80% de la concentración de gases. Sin embargo, la forma en la que se almacena (nitrógeno molecular, N₂) limita su disponibilidad para la mayoría de los seres vivos (De la Rosa, 2008). Los únicos seres capaces de utilizar el nitrógeno en forma directa son algunas especies de bacterias mediante un proceso denominado, Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (López, 2016). Se calcula que por medio de la FBN se contribuye con, entre 60 y 80% del nitrógeno que entra en la tierra (Cuadrado *et al.*, 2009). Este proceso biológico juega un papel crítico en la agricultura sostenible, ya que reduce la necesidad de utilizar fertilizantes nitrogenados y además proporciona una eficiente producción de cultivos ricos en proteínas (Wang *et al.*, 2012).

En la FBN, el nitrógeno molecular es reducido, obteniendo amonio, una forma biológica que puede ser consumida directamente por la planta (Wang *et al.* 2012). En este proceso participan algunos procariontes fijadores de nitrógeno y una enzima llamada nitrogenasa (Pawlowski, 2008).

Dos tipos de microorganismos procariontes producen la fijación de nitrógeno, los cuales son denominados microorganismos fijadores de vida libre y microorganismos fijadores simbiotes.

Entre las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas se encuentran las del género *Rhizobium* (Llorente y Martínez-Romero, 2005) y *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium* (Angeles-Núñez y Cruz-Acosta, 2015), dichas bacterias colonizan a las raíces de leguminosas como: *Glycine max* (L.), *Phaseolus vulgaris* (L.), *Pisum sativum* (L.), *Arachis hypogaea* (L.), *Medicago sativa* (L.) y *Trifolium*

repens (L.) (Tortora *et al.*, 2007). Así mismo existen rizobios que colonizan a plantas que no son leguminosas (Santi *et al.*, 2013).

Por otro lado, las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre son abundantes en la rizosfera, región localizada aproximadamente a dos milímetros de distancia de la raíz. La rizosfera representa una reserva nutricional en el suelo. Entre las bacterias de vida libre que pueden fijar nitrógeno, se encuentran *Azotobacter* y *Beijerinckia*, ambas bacterias aeróbicas. Los organismos aerobios utilizan gran cantidad de O_2 , lo que disminuye su difusión hacia el interior de la célula. De este modo evitan que la enzima anaerobia nitrogenasa, ubicada en el interior de la célula, quede expuesta al O_2 (Tortora *et al.*, 2007), es decir se produce una elevada tasa respiratoria, manteniendo así una concentración intracelular de O_2 baja (Mayz-Figueroa, 2004). Otro mecanismo de protección de la nitrogenasa, es su localización en sitios especializados, por ejemplo, las cianobacterias fijan el nitrógeno en los heterocistes, células especializadas que no producen oxígeno en su interior y no le permite su entrada del exterior (Ingraham y Ingraham, 1997). No obstante, también existen algunas bacterias anaerobias que fijan nitrógeno, como ciertas especies de *Clostridium* pero no necesitan adaptaciones especiales, porque viven en ambientes sin oxígeno (Ingraham y Ingraham, 1997; Tortora *et al.*, 2007).

FORMACIÓN DE NÓDULOS FIJADORES DE NITRÓGENO

El resultado de la simbiosis entre una planta y una bacteria es la formación del nódulo, una estructura fundamental para el proceso de FBN (Voisin *et al.*, 2002; Sprent, 2007; Broughton, 2003; Wang *et al.*, 2012). La formación del nódulo está presente en todas las subfamilias (Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae) de Leguminosas pero es menos frecuente en la subfamilia Caesalpinioidea (De Faria *et al.*, 1989; Doyle *et al.*, 1997).

Los nódulos son las estructuras especializadas donde se lleva a cabo la FBN que algunas familias de angiospermas han desarrollado, principalmente en el córtex radical. Y en algunos casos de manera excepcional en el tallo, como es el caso de *Sesbania rostrata* (Lloret y Martínez-Romero, 2005) y *Aeschynomene* sp. (Alazard, 1985).

Sin embargo, detrás de la formación de un nódulo existen eventos importantes en donde ambos organismo participan consistentemente.

De manera general el encuentro entre los simbioses comienza con la liberación de metabolitos secundarios (MS) a la rizosfera por parte de la raíz de la leguminosa. Entre los MS se han reportado: flavonoides (naringenina ($C_{15}H_{12}O_5$), genisteína ($C_{15}H_{10}O_5$) y

daidzeína ($C_{15}H_{10}O_4$)), ácidos aldónicos y betaínas, cuya función es atraer hacia la punta de los pelos radicales a los rizobios (Cárdenas *et al.*, 2008).

Ya liberados los MS el rizobio los reconoce y libera una proteína llamada NodD, que al entrar en contacto con los MS liberados, activa a la enzima que comienza la transcripción de los genes de nodulación llamados genes Nod, que a su vez iniciarán la producción de un conjunto de enzimas encargadas de la síntesis y secreción de los denominados factores de nodulación (factores Nod) (Perret *et al.*, 2000; González y Marketon, 2003; Gage, 2004.)

Los factores Nod son fundamentales para el establecimiento de la simbiosis, además participan consistentemente en su especificidad. Los factores Nod al estar presentes en la rizosfera son reconocidos por la leguminosa induciendo una serie de cambios fisiológicos y morfológicos en sus pelos radicales (**Figura 2.1**) (Gage, 2004).

Entre los cambios fisiológicos se pueden mencionar, modificaciones en los niveles de entrada y salida de ciertos iones como calcio y el cloro, a través de la membrana del pelo radical, induciendo su despolarización. Entre los cambios morfológicos están la formación del primordio nodular (participan proteínas llamadas nodulinas) y el hinchamiento en la zona apical del pelo que eventualmente da lugar a un enroscamiento del mismo, el cual ayuda a atrapar las bacterias localizadas en esta zona, generando un nuevo sitio de crecimiento, ahora hacia adentro del pelo, en forma de túnel llamado hilo de infección (**Figura 2.1**) (Perret *et al.*, 2000).

El hilo de infección es una estructura tubular, por donde se desplazan las bacterias hacia las células del primordio del nódulo, dando lugar a la formación de estructuras membranales que contienen a las bacterias, llamadas simbiosomas. Dentro del primordio nodular las bacterias se diferencian en bacteroides siendo funcional la fijación del nitrógeno atmosférico (Cárdenas *et al.*, 2008).

CLASIFICACIÓN DE NÓDULOS FIJADORES DE NITRÓGENO

El tipo y estructura nodular depende de la planta hospedera, por lo que de manera general se ha propuesto una clasificación que incluye dos tipos de nódulos. Los i) nódulos determinados, caracterizados porque alcanzan en pocas semanas su crecimiento máximo, debido a que su actividad meristemática se detiene tempranamente en su formación, este tipo de desarrollo origina nódulos esféricos o globosos, que pueden organizarse

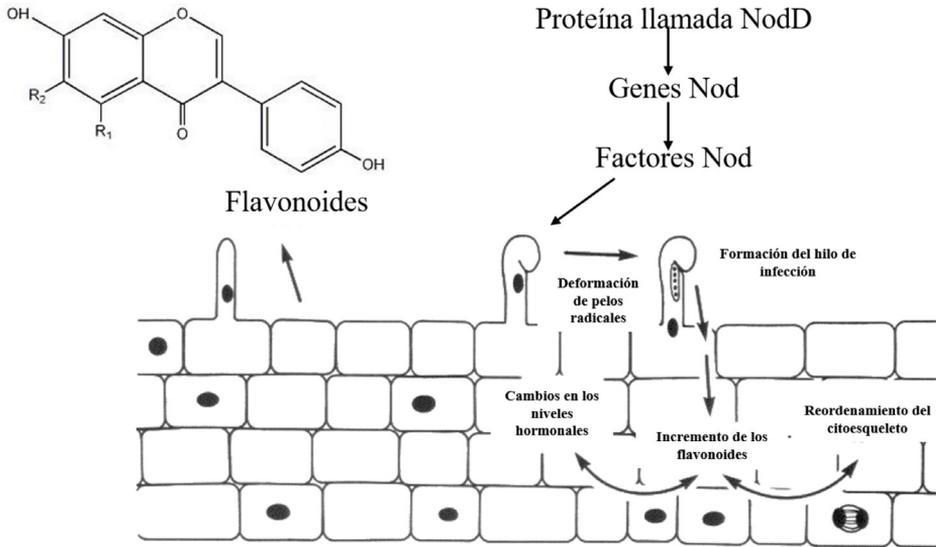


FIGURA 2.1. Proceso de formación del nódulo (Modificado de Hirsch 1992).

alrededor de la raíz para formar los denominados nódulos en collar (Hirsch, 1992; Mayz-Figueroa, 2004). Este tipo de nódulos están presentes en especies de algunos géneros como *Glycine*, *Lotus* y *Phaseolus* (Fernández-Luqueño y Espinoza-Victoria, 2008). Los nódulos determinados son, más frecuentes en especies de leguminosas “tropicales”. Los ii) nódulos indeterminados, los cuales presentan un meristemo persistente, puesto que continuamente se añaden nuevas células a la parte más alejada del nódulo. Este tipo de desarrollo da lugar a nódulos alargados o cilíndricos y ramificados o coraloides (Hirsch, 1992; Mayz-Figueroa, 2004). Los nódulos indeterminados están presentes en especies de algunos géneros como *Medicago*, *Trifolium* y *Pisum*. (Fernández-Luqueño y Espinoza-Victoria, 2008).

La bacteria dentro del nódulo, se transforma en bacteroide, cuya estructura morfológica puede ser ramificada (forma de “Y”), hinchada y/o deforme. Así mismo, el bacteroide sufre una adaptación fisiológica que consiste en la producción de nitrogenasa (Crespi y Galvez, 2000). Por lo tanto la fijación de nitrógeno no se inicia hasta que se han formado los bacteroides (**Figura 2.2**) (Pellock, *et al.*, 2000).

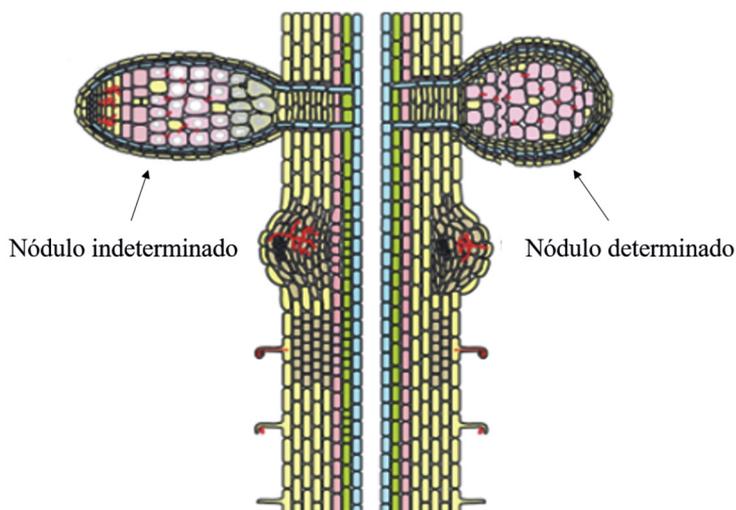


FIGURA 2.2. Representación esquemática del nódulo indeterminado y determinado (Modificado de Popp y Ott, 2011).

EL USO DE MICROORGANISMO FIJADORES DE NITRÓGENO EN LA AGRICULTURA

El uso de esta asociación puede mejorar la disponibilidad de nitrógeno para las plantas en las que se establece. En donde la asociación de Rizobios con las leguminosas es de gran importancia económica para aumentar la producción agrícola. En la actualidad, existe la necesidad de disminuir la dependencia de los fertilizantes químicos y lograr una agricultura sostenible con el uso de fertilizantes microbianos. Sin embargo, es necesario caracterizar morfológicamente los rizobios asociados con los cultivos de interés por lo que es fundamental aislar cepas de rizobios a partir de nódulos, con la finalidad de diferenciarlos morfológicamente y por técnicas de tinción (Miransari, 2011).

PRÁCTICA: 2.1 MORFOLOGÍA DE LOS NÓDULOS RADICALES Y BACTEROIDES

2.1.1 Colecta de raíces noduladas de leguminosas

El muestreo se puede realizar en plantas de leguminosas colectadas o bien establecidas en invernadero. Para lo cual la raíz de cada especie de leguminosa elegida, será extraída cuidadosamente del suelo y depositada en bolsas de plástico previamente etiquetadas para ser transportadas al Laboratorio.

2.1.2 Observación morfológica y estructural de los nódulos radicales

A las raíces noduladas de cada especie se les eliminará el suelo con lavados suaves de agua corriente, separando las raíces con nódulos, las cuales serán colocadas en cajas de Petri para su observación en el microscopio estereoscópico. Así mismo, dos nódulos por cada especie serán retirados de la raíz y a cada nódulo se le realizarán cortes transversales para elaborar preparaciones.

2.1.3 Observación de bacteroides contenidos en los nódulos radicales

Dos nódulos por cada especie de leguminosa serán retirados de la raíz y colocados en un cubreobjetos donde serán macerados, posteriormente, se dejará secar la muestra a temperatura ambiente para enseguida fijar la preparación con el calor del mechero. Posteriormente se teñirán las preparaciones con carbol fucsina durante 10 a 20 s. Después se eliminará el exceso de colorante de la preparación por escurrimiento y se dejará secar. La preparación elaborada será analizada en el microscopio describiendo la morfología de los bacteroides.

PRÁCTICA: 2.2 AISLAMIENTO DE RIZOBIOS A PARTIR DE NÓDULOS

2.2.1 Extracción de raíces noduladas de *Medicago sativa* (alfalfa)

La raíz de *Medicago sativa* será extraída cuidadosamente del suelo y depositada en bolsas de plástico previamente etiquetadas para ser procesadas en el Laboratorio.

2.2.2 Selección y preparación de nódulos

A las raíces noduladas se les eliminará el suelo con lavados suaves de agua corriente, separando las raíces con nódulos, las cuales serán colocadas en cajas de Petri. Después de las raíces noduladas se retirarán los nódulos más grandes y de color rosado (se recomienda tener 50 nódulos por lo menos), dejando adherido un pequeño fragmento de raíz. Los nódulos serán colocados en un pequeño fragmento de gasa (5 x 5 cm) previamente cortado, para ser empaquetados formando un pequeño costal.

2.2.3 Desinfección de los nódulos

En la campana de extracción laminar serán colocados ordenadamente frascos de cristal previamente esterilizados. El primero contendrá alcohol, el segundo agua destilada, el tercero alcohol, el cuarto cloruro de mercurio (II) en ácido clorhídrico y finalmente cinco frascos que contendrán agua estéril (**Figura 2.3**).

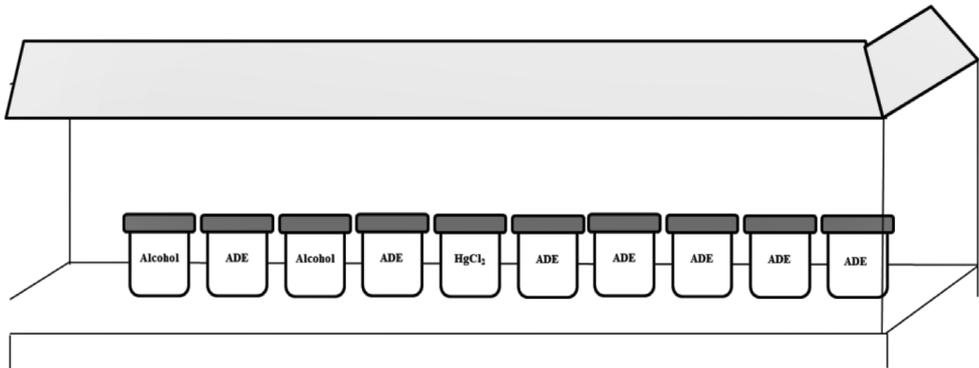


FIGURA 2.3. Secuencia de la desinfección de nódulos de rizobios.
Simbología ADE = agua destilada estéril.

El proceso de desinfección se llevará a cabo por inmersión sucesiva para lo cual, los costalitos serán colocados en alcohol durante 20 segundos, y enjuagados con agua destilada estéril para luego ser colocados nuevamente en alcohol, enseguida, se enjuagarán con agua destilada estéril y se colocaran en cloruro de mercurio (II) en ácido clorhídrico (1%) (0.5 g de HgCl₂ y 5 mL de HCl en 500 mL de agua destilada estéril), por un minuto. Finalmente se lavarán cinco veces con agua destilada estéril (Beck *et al.*, 1993).

2.2.4 Siembra de rizobios

Una vez esterilizados los nódulos se extraerán del costal y serán depositados en una microplaca de 96 pozos (un nódulo por pozo). Diez nódulos serán macerados con una varilla de vidrio adicionando una gota de agua destilada estéril por nódulo. Muestras del macerado serán sembradas por estría cruzada en cajas de Petri que contendrán Agar Manitol Extracto de Levadura-Rojo de Congo (ELMA-RC). Con la siguiente composición: K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.1 g, extracto de levadura 1.0 g, Manitol 10.0 g, Agar 18.0 g, agua destilada 1000 mL, ajustando a un pH de 6.8 – 7.0 esterilizando a 121 °C por 15 min.

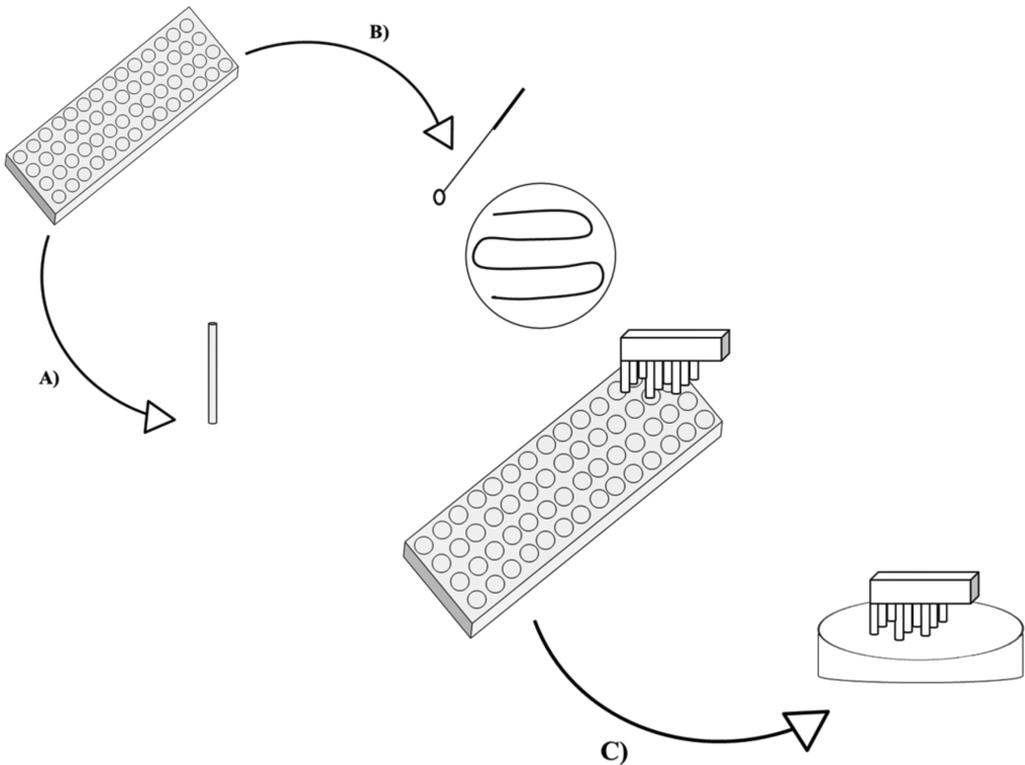


FIGURA 2.4. Técnica para la siembra de rizobios en cajas de Petri.

2.2.5 Aislamiento y tinción diferencial de rizobios

Transcurridas 72 h de la siembra, se seleccionarán 10 colonias definidas de rizobios para su aislamiento, mediante la técnica de estría cruzada. Después se caracterizarán los rizobios por medio de la técnica diferencial de Gram (Figura 2.5). De los aislados se tomarán 10 muestras diferentes y se depositarán en cubreobjetos cada una, para realizar un frotis, cada frotis se secará a temperatura ambiente y se le colocaran 3 gotas de cristal violeta de genciana durante 30 s. Este colorante se preparara en dos partes. La solución A: en un vaso de precipitados de 50 mL se colocará 10 mL de alcohol etílico y se disolverá 1 g de cristal violeta. Para la solución B: en otro vaso se disolverá 0.4 g de oxalato de amonio en 40 mL de agua destilada. Después ambas soluciones se mezclaran cuidadosamente. Después se escurrirá el colorante violeta y se lavará el extendido.

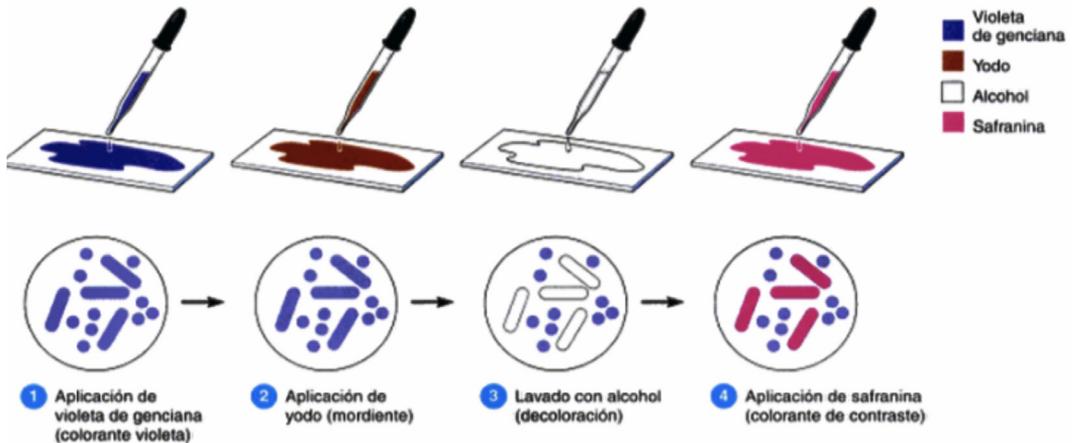


FIGURA 2.5. Técnica de tinción diferencial (Tomado de Tortora *et al.*, 2007).

En un matraz aforado de 50 mL, se disolverán 0.333 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada y enseguida se agregará lentamente 0.166 g de yodo, después de mezclar completamente se aforará con agua destilada. Ya elaborada la solución se cubrirá ésta la preparación durante 30 s., lavando posteriormente con agua.

En este momento las bacterias gram positivas y gram negativas se observarán de color violeta oscuro o púrpura. Después se lava el portaobjetos con tres gotas de una solución alcohol-acetona durante 15 s. Esta solución es un agente decolorante que eliminará el color violeta de las células de algunos rizobios pero de otros no. Se eliminará la solución de alcohol-acetona para después cubrir durante 30 s las muestras con safranina (En un matraz aforado de 50 mL se colocarán 5 mL de alcohol etílico y disolverán 0.125 g de safranina y se aforará con agua destilada), un colorante básico. Finalmente se lavarán los frotis con agua y se dejarán secar al aire. Las muestras serán examinadas al microscopio para la diferenciación de los rizobios (**Figura 2.5**).

PRÁCTICA: 2.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS AISLADA

2.3.1 Obtención de cepas

Las cepas de rizobios pueden ser aisladas de raíces de leguminosas previamente inoculadas.

2.3.2 Morfología colonial y velocidad de crecimiento

Las cepas de rizobios aisladas serán sembradas por estría cruzada en cajas de Petri que contendrán Agar Manitol Extracto de Levadura-Rojo de Congo (ELMA-RC). Después de 3 días de incubación se realizarán observaciones diarias para determinar el diámetro de la colonia. Así mismo, se realizarán evaluaciones morfológicas para las cepas de rápido y moderado crecimiento (4-5 días), y para aquellas de crecimiento lento (7 días).

2.3.3 Morfología microscópica

En el centro de un portaobjetos se colocará una gota de agua destilada y en ella una muestra de la colonia aislada con la ayuda de un asa de siembra, se dejará secar la gota a temperatura ambiente.

La muestra se fijará bajo la llama de un mechero. Posteriormente a la muestra se le colocarán 3 gotas de cristal violeta durante 30 seg, transcurrido el tiempo se lavará el frotis con agua de la llave eliminando el exceso colorante, a continuación, se les colocará a las muestras tres gotas de yodo por 30 seg, lavando posteriormente con agua, para aplicar tres gotas de alcohol-acetona durante 15 segundos, para después cubrir durante 30 segundos las muestras con safranina. Finalmente se lavarán los frotis con agua y se

dejará secar al aire. Las muestras serán examinadas al microscopio para la diferenciación de las bacterias.

2.3.4 Caracterización fisiológica de los rizobios (producción de ácido o álcali)

Las cepas de rizobios se sembraran por estría cruzada en el medio extracto de levadura-manitol conteniendo Azul de Bromotimol (ELMA-ABT) y se incubaran de 4 a 7 días según la tasa de crecimiento. Después se agruparan los rizobios álcali productores o ácido productores. Los rizobios productores de ácido provocan que el medio de cultivo se torne amarillo, mientras que los que producen álcali se distingue por una coloración violeta en el medio de cultivo (Wang *et al.*, 2001).

2.3.5 Ensayo de leche tornasolada

El ensayo de leche tornasol muestra las múltiples reacciones metabólicas de las bacterias en el medio láctico. El medio de leche tornasolada se elaborará disolviendo 100 gramos de leche descremada deshidratada y 0.75 gramos de polvo de tornasol en un litro de agua, después se esterilizará en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Por duplicado las cepas de rizobios serán sembradas en leche tornasolada y se incubaran por 7 días realizando observaciones periódicas, sin agitar los tubos. La presencia de suero en la superficie del medio (reacción ácida) se considerara como prueba positiva, y la presencia de coágulo (reacción alcalina) como prueba negativa (Trinick, 1980).

2.3.6 Crecimiento a diferentes concentraciones de Cloruro de sodio (NaCl)

Se sembrarán por duplicado las cepas bacterianas en tubos de ensayo que contendrán el medio, caldo extracto de levadura manitol (LM), con diferentes concentraciones de NaCl (0, 2, 3, 5 %). Con la siguiente composición: K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.1 g, extracto de levadura 1.0 g, Manitol 10.0 g, Agar 18.0 g, agua destilada 1000 mL, ajustando a un pH de 6.8 – 7.0 esterilizando a 121 °C por 15 min.

Después de la siembra los tubos de ensayo se mantendrán en agitación durante 7 días. La presencia de crecimiento evidenciarán la tolerancia a la salinidad.

PRÁCTICA: 2.4 INFECCIÓN DE LA RAÍZ DE LAS LEGUMINOSAS POR LOS RIZOBIOS DEL SUELO

2.4.1 Desinfección y germinación de semillas

Las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), serán colocadas en un recipiente que contendrán alcohol al 90%, después de 10 minutos serán enjuagadas con agua destilada estéril y posteriormente a las semillas se les adicionará cloruro de mercurio (II) en ácido (1%), durante 20 segundos, más tarde serán enjuagadas 5 veces con agua destilada estéril.

En cajas de plástico se colocará papel filtro humedecido con agua estéril, en estas cajas 20 semillas desinfectadas serán colocadas y cubiertas con papel filtro humedecido. Las cajas serán incubadas durante 7 días. Cuando la radícula emerja las semillas germinadas serán inoculadas con los rizobios.

2.4.2 Inoculación de semillas germinadas

La cepa bacteriana será sembrada en botellas de vidrio con 50 mL de caldo nutritivo (Para su elaboración se disolverán 5.0 g de Peptona de caseína, 8.0 g NaCl, 3.0 de Extracto de carne y se ajustara el pH 6.5 -7.0. Posteriormente se distribuirá el medio en matraces y se esterilizará en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.) (Aquiahuatl *et al.*, 2012). Las botellas serán colocadas en agitación a 180 rpm durante tres días. Transcurrido el tiempo se realizará dos lavados a las cepas bacterianas con agua destilada estéril. Para lo cual, el caldo nutritivo que contenía a la cepa bacteriana será colocado en tubos tipo falcón y centrifugados a 7000 rpm durante 15 minutos. Después se retirará el sobrenadante y se resuspenderá el precipitado en agua destilada estéril utilizando un vortex, este procedimiento se repetirá una vez más.

La inoculación consistirá en depositar 1 mL de la suspensión bacteriana sobre cada una de las semillas a inocular. Posteriormente, las cajas serán incubadas por 5 días para después observar los cambios morfológicos ocurridos en los pelos radicales de *P. vulgaris*.

2.4.3 Observación al microscopio

Veinte segmentos de raíz en etapa intermedia de desarrollo serán tomados y colocados durante 15 min en el colorante azul de metileno (1%), posteriormente los segmentos serán enjuagados con agua destilada (3 veces).

Cada segmento será sutilmente colocado en un portaobjetos, cubriéndolo con un cubreobjetos y realizando la observación al microscopio.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alazard, D. (1985). Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (3), 732-734.
- Angeles-Núñez, J. G., & Cruz-Acosta, T. (2015). Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijól. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(5), 929-942.
- Aquiahuatl, R. Ma. De los A., Volke, S. T., Prado, B. L. A., Shirai, M. K., Ramírez, V. F., & Salazar, G. M. (2012). Manual de Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. pp 75.
- Baca, B. E., Soto Urzúa, L., & Pardo Ruíz, M. P. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos*, Mexico, 7(38), 43-49.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant and soil*, 252 (1), 55-128.
- Cárdenas, L., Martínez, A., Sánchez, F., & Quinto, C. (2008). Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *The Plant Journal*, 56(5), 802-813.
- Crespi, M., & Gálvez, S. (2000). Molecular mechanisms in root nodule development. *Journal of plant growth regulation*, 19(2), 155-166.
- Cuadrado, B., Rubio, G., & Santos, W. (2009). Caracterización de cepas de Rhizobium y Bradyrhizobium (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijól caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 38(1), 78-104.
- De Faria, S. M., Lewis, G. P., Sprent, J. I., & Sutherland, J. M. (1989). Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New phytologist*, 111(4), 607-619.
- De la Rosa, D. (2008). *Evaluación agro-ecológica de suelos para un desarrollo rural sostenible*. Editorial CSIC-CSIC Pres.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L., Ballenger, J. A., Dickson, E. E., Kajita, T., & Ohashi, H. (1997). A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *American Journal of Botany*, 84(4), 541-554.
- Fernández-Luqueño, F., & Espinosa-Victoria, D. (2008). Bioquímica, fisiología y morfología de la senescencia nodular: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 26(2), 133-144.
- Gage, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280-300.
- González, J. E., & Marketon, M. M. (2003). Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 574-592.

- Hirsch, A. M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122(2), 211-237.
- Ingraham, J. L. & Ingraham, C.A. (1997). *Introducción a la microbiología I*. España. Reverte.
- Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de rhizobia. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1-2), 43-60.
- López, S. M. Y. (2016). *Análisis de las alteraciones estructurales y/o regulatorias en los genes de nodulación y fijación de nitrógeno, en aislados de Bradyrhizobium japonicum que difieren en su capacidad de fijar nitrógeno* (Tesis Doctoral), Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UIDO Agrícola*, 4(1), 1-20.
- Miransari, M. (2011). Soil microbes and plant fertilization. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(5), 875-885.
- Pawlowski, K. (2008). Nodules and oxygen. *Plant biotechnology*, 25(3), 291-298.
- Pellock, B. J., Cheng, H. P., & Walker, G. C. (2000). Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of bacteriology*, 182(15), 4310-4318.
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201.
- Santi, C., Bogusz, D., & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of botany*, 111(5), 743-767.
- Sprent, J. I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist*, 174(1), 11-25.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9ª Ed.), Editorial Médica Panamericana.
- Trinick, M. J. (1980). Growth of *Parasponia* in agar tube culture and symbiotic effectiveness of isolates from *Parasponia* spp., *New Phytologist*, 85(1), 37-45.
- Voisin, A. S., Salon, C., Munier-Jolain, N. G., & Ney, B. (2002). Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and soil*, 243(1), 31-42.
- Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cellular microbiology*, 14(3), 334-342.
- Wang, E.T., Martínez Romero, J. & López Lara, I. (2001). *Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas*. En: Microbios. Eds. E. Martínez Romero y J.C. Martínez Romero Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México, México

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE PLANTAS MICORRIZADAS SOMETIDAS A ESTRÉS

MICORRIZA ARBUSCULAR

La mayoría de las plantas viven asociadas con ciertos hongos del suelo dando lugar a las micorrizas (“hongo-raíz”). El hongo coloniza la corteza de la raíz sin causar daño a la planta, llegando a formar esta nueva estructura llamada micorriza. El hongo desarrolla un micelio externo que complementa al sistema radical y es altamente efectivo, coloniza el suelo que rodea a la raíz y favorece a la planta al adquirir nutrimentos, minerales y agua, la micorriza se considera la parte metabólicamente más activa de los órganos de absorción de la planta (Varela y Trejo, 2001). Ésta es una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas sino también porque puede estar presente en la mayoría de los hábitats naturales (Hernández-Cuevas *et al.*, 2003).

Se reconocen diferentes tipos de micorrizas, como la ectomicorriza, la orquidoide y la arbuscular. La micorriza arbuscular se caracteriza por la presencia de una hifa intra o intercelular, arbuscúlos (hifas finamente ramificadas que participan activamente en el intercambio de nutrimentos), micelio extra-radical que conecta a la raíz con el suelo y esporas formadas en el micelio extra-radical. Algunas especies forman las estructuras llamadas vesículas que son porciones de hifa que se llenan de lípidos.

La micorriza arbuscular favorece la absorción de iones poco móviles del suelo, particularmente fosfatos, pero también zinc, cobre y amonio. Las hifas del hongo captan el fósforo necesario para la planta, lo que provoca que el hospedero no genere demasiada raíz porque la mayor aportación de fósforo la brinda el hongo, una vez que este nutrimento ingresa al interior de las hifas, viaja 1000 veces más rápido de lo que puede transportarse en el suelo (Parniske, 2004).

La importancia económica de la asociación micorrízica radica en la relación equilibrada de ayuda nutricional que se establece entre ambos organismos, con el flujo bidireccional de nutrimentos (Ferrol *et al.*, 2004). Se sabe que el hongo absorbe, principalmente, fósforo del

suelo y lo transporta a la planta, de ésta se mueven una serie de compuestos carbonados hacia el hongo (Bago *et al.*, 2003). Por esta razón, la planta aunque es capaz de crecer de manera independiente, generalmente, tiene mayor desarrollo cuando es colonizada por el hongo micorrizógeno sobre todo, en condiciones de bajos niveles de nutrimentos en el suelo, lo que afecta la productividad agrícola.

Los hongos micorrizógenos arbusculares obtienen carbono de la planta hospedera (Pfeffer *et al.*, 1999), en forma de moléculas de hexosa, que es convertida a lípidos (triacilglicerol y carbohidratos) y glicógeno en el micelio intrarradical, los cuales son translocados al micelio extrarradical y a partir de los cuales se sintetizan carbohidratos estructurales, quitina y carbohidratos de almacén (trehalosa y glicógeno) (Bago *et al.*, 2003).

El movimiento del ion fosfato desde el suelo a la raíz ocurre a través de la red de hifas externas, inicia con la absorción de la solución del suelo por transportadores de fosfatos H^+ -ATPasa (localizados en la hifa extrarradical), seguido por la conversión a polifosfatos de cadena corta que son translocados a las estructuras intrarradicales a través de vacuolas móviles del hongo, seguida de la hidrólisis de los mismos por las fosfatasa localizadas en las hifas intrarradicales (Ferrol *et al.*, 2004). Enseguida los iones fosfato $H_2PO_4^{-1}$ y HPO_4^{-2} son transferidos del hongo al apoplasto interfacial por flujo, el cual es tomado (en la planta) por transportadores de membrana, de tal manera que generan aumento del crecimiento, sanidad y resistencia al estrés.

Algunos factores, como luz y temperatura, inhiben el óptimo desarrollo y fisiología de la micorriza arbuscular, los cuales, pueden reducir la producción de esporas y disminuir la colonización de la raíz de una planta.

INDICADORES FISIOLÓGICOS DE LA MICORRIZACIÓN ARBUSCULAR EN PLANTAS SOMETIDAS A ESTRÉS

Las plantas hoy día crecen bajo muchos tipos de estrés abiótico tales como sequía y temperaturas extremas, dos factores limitantes que han sido declarados importantes en la problemática del cambio climático y calentamiento global (Mittler y Blumwald, 2010) y que influyen en la disminución de la productividad de los ecosistemas. Además, la planta puede sufrir un estrés por sequía y calor en forma simultánea, causando daños mayores a la productividad. Existen otros factores abióticos que generan estrés a las plantas como la contaminación de suelo y la salinidad, las plantas también se enfrentan a estrés biótico promovido por los hervíboros y patógenos.

La salinización de los suelos es uno de los mayores problemas en los ecosistemas naturales y en los agroecosistemas de todos los ambientes (FAO, 2011). La salinidad del suelo puede originarse por diversas causas naturales o antrópicas, sin importar el origen, la salinidad afecta negativamente el establecimiento, crecimiento y desarrollo de las especies vegetales que no estén adaptadas a esta condición, generando lo que se conoce como estrés salino (Estrada *et al.*, 2013a).

Aunque el grado de estrés salino en las plantas dependerá de varios componentes incluyendo su tolerancia o sensibilidad, la salinidad suele afectarlas fisiológicamente en tres vías conocidas: (i) inhibiendo la síntesis de proteína, hidrolizando a las enzimas, y afectando el balance entre la fotosíntesis y la respiración; (ii) también puede afectar la adquisición y transporte de nutrimentos de la raíz al vástago induciendo un desbalance nutricional y (iii) la acumulación de sales en la solución del suelo genera potenciales hídricos que pueden impedir la absorción de agua por parte de la planta generándole estrés hídrico (sequía fisiológica) (Evelin *et al.*, 2009; Ruiz-Lozano *et al.*, 2012).

Las plantas, a través de la evolución, han desarrollado mecanismos para enfrentar los ambientes estresantes incluyendo los salinos e hídricos, uno de estos mecanismos es la capacidad de formar simbiosis con los microorganismos del suelo, principalmente bacterias y hongos, donde destaca la formación de la micorriza con hongos micorrizógenos arbusculares (Ruiz-Lozano *et al.*, 2012).

La simbiosis micorrizica en las plantas favorece la absorción de agua en los ambientes áridos y semiáridos (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995) y disminuye el estrés salino, sin embargo, recientemente se ha demostrado que no todos los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) toleran la salinidad del suelo, la mayoría de los HMA suelen permanecer inactivos en los ambientes secos, y en ambientes salinos reducen la germinación de las esporas, la colonización micorrizica y se afecta el crecimiento de la red hifal (Estrada *et al.*, 2013b).

En general, la salinidad afecta el crecimiento y producción de las plantas y cultivos al reducir el potencial hídrico de la solución del suelo, disminuyendo la disponibilidad de agua y al crear un desequilibrio nutritivo debido a la elevada concentración de iones sodio (Na^+). En consecuencia las plantas activan diferentes mecanismos para aumentar la capacidad de obtención y retención de agua, además que debe restituirse la homeostasis iónica. Estos mecanismos se reflejan en un menor crecimiento, en la modificación de la razón entre parte aérea y la raíz (V/R), y en la disminución del área foliar, que son consecuencia de los cambios bioquímicos y fisiológicos. Por la importancia de los flujos hídricos en los procesos de ajuste osmótico celular, la actividad de las acuaporinas juega un papel clave en los mecanismos de osmoregulación celular como adaptación al estrés.

Uno de los factores determinantes de la tolerancia celular a la salinidad es la capacidad de mantener una alta relación K^+/Na^+ en el citosol de las plantas. Además la tolerancia al estrés frecuentemente se le relaciona con los contenidos de compuestos como el ascorbato, glutatión, flavonoides, carotenoides y tocoferoles. Algunos compuestos como el ascorbato y el glutatión son metabolitos esenciales que regulan las funciones celulares.

La raíz, como principal órgano de absorción de agua y iones, tiene gran importancia en la respuesta a corto y a largo plazo ante el estrés salino. En la raíz se sintetiza ácido abscísico (ABA) que es una de las señales tempranas al estrés capaz de producir cambios fisiológicos locales como la conductancia hidráulica y a distancia como el cierre estomático (Sauter *et al.*, 2002).

El flujo de agua provocado por la transpiración foliar produce el movimiento de sales desde las raíces hasta las hojas, En las raíces los solutos entran siguiendo el flujo transpiratorio, se mueve por el apoplasto, atraviesa la membrana de la célula radical, sigue por el simplasto hasta alcanzar el xilema, en algunas especies como el arroz existen sitios de paso donde los iones pueden saltarse la barrera de la membranas selectivas y continuar su curso transpiratorio vía apoplástica.

El objetivo de las siguientes prácticas es evaluar algunas variables fisiológicas de la planta que se ven modificadas cuando crecen micorrizadas *versus* plantas no micorrizadas creciendo bajo estrés.

1) PRÁCTICAS CON TEJIDO FRESCO

PRÁCTICA: 3.1 CONTENIDO HÍDRICO RELATIVO (CHR) EN HOJA

El contenido hídrico relativo expresa el porcentaje de contenido de agua en un momento y tejido dado. El estado hídrico de la planta está relacionado con el proceso de la transpiración en el cual la planta pierde agua por la superficie foliar, tallos (a través de lenticelas), flores y frutos. El CRH se cuantifica midiendo la masa de una muestra fresca de tejido, permitiendo que absorba agua hasta que se sature, y después secando a un horno a alta temperatura (Borjas *et al.*, 2015).

Procedimiento

- ▲ Se toman fracciones homogéneas de hojas de la planta por ejemplo discos (sacabocados) de aproximadamente 1 cm de diámetro por hoja (5 hojas por planta mínimo) y se pesan.
- ▲ Se colocan en cajas de Petri que contienen agua destilada dónde se mantienen durante 24 en oscuridad y en refrigeración a 4° C.
- ▲ Transcurrido ese tiempo, se vuelve a determinar el peso de los discos de hoja de cada planta (**Figura 3.1**).
- ▲ Por último, los discos se ponen a secar en estufa a 60 °C durante 24 h y se determina el peso seco de los mismos.
- ▲ Con estos datos se calcula el CHR a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{CHR} = (P_f - P_s) / (P_h - P_s) \times 100$$

Donde:

P_f = peso fresco inicial

P_h = peso fresco después de la hidratación con H₂O destilada

P_s = peso seco después de 24 h en estufa a 60 °C.

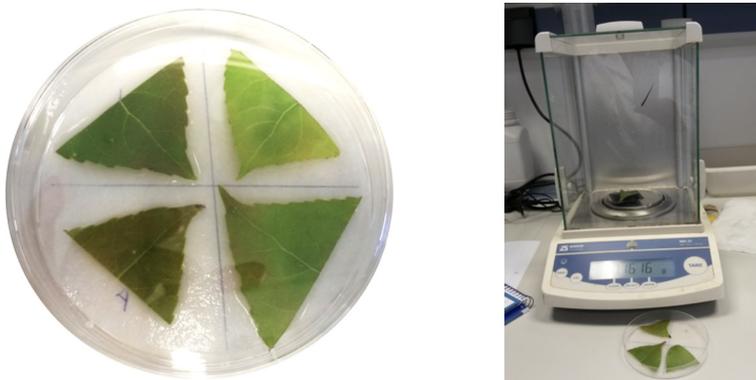


FIGURA 3.1. Hojas de chopo en cámara húmeda y pesándolos en húmedo.

Resultados

Los resultados obtenidos se registran en la siguiente tabla

Muestra	P_f	P_h	P_s	CHR	CHR (%)
1					
2					
3					
4					
5					

PRÁCTICA: 3.2 DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE ELECTRÓLITOS

Los tejidos sometidos a estrés salino suelen perder electrólitos, esta variable se vuelve un buen indicador de la integridad de las membranas, a mayor pérdida de electrólitos las membranas se ven más afectadas y deterioradas (Aguilera y Martínez, 1990).

La pérdida de electrolitos por las membranas se denomina comúnmente como “EL” (del inglés electrolyte leakage), esta técnica consiste en incubar los tejidos de la planta (raíz o parte aérea) en agua destilada (o desionizada).

Procedimiento

- ▲ Se registra la conductividad eléctrica del agua destilada (CW) con un conductímetro.
- ▲ Se toma una muestra de tejido y se coloca en un tubo o falcón, se agita a temperatura ambiente durante 3 h.
- ▲ A continuación se mide la conductividad eléctrica de la solución de los tubos que contienen el tejido vegetal (C0).
- ▲ Los tubos, conteniendo el tejido vegetal se guardan en congelación durante 24 h.

- ▲ Transcurridas las 24 h, las muestras se vuelven a incubar a temperatura ambiente durante otras 3 h con agitación suave.
- ▲ Se mide de nuevo la conductividad eléctrica (CF).
- ▲ Se realiza el cálculo del parámetro “EL” con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ EL} = [(C0-CW)-(CF-CW)] \times 100$$

Donde:

C0 = Conductividad eléctrica inicial (H₂O + tejido vegetal)

CW = Conductividad eléctrica del H₂O

CF = Conductividad eléctrica final (después de 24 h de congelación)

Resultados

Los resultados se registran en el siguiente cuadro

Muestra	C0 ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	CF ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	C0-CW	CF-CW	“EL”
A					
B					

“EL” = % de pérdida de electrolitos.

*Una variante consiste en: colocar el tejido vegetal en el falcón con agua desionizada, dejarlos incubando a 25 °C toda la noche con agitación ligera (100 rpm). Colocar la muestra en autoclave a 121 °C durante 20 min y después evaluar la conductividad final (CF).

PRÁCTICA: 3.3 ACUMULACIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

La fotosíntesis es el mecanismo que realiza la conversión de materia inorgánica a materia orgánica gracias a la energía que aporta la luz, esto ocurre en los cloroplastos, donde se ubican diferentes pigmentos, se distinguen dos variedades de clorofila verde la **clorofila a** que alberga un grupo metilo en el tercer carbono porfirínico y que absorbe luz de longitud de onda cercana a 630 nm y la **clorofila b**, que contiene un grupo formilo y que absorbe luz a 660 nm.

Los carotenoides son isoprenoides y absorben luz de 440 nm, lo que puede ser de dos clases: los carotenos, que son de color rojo, y las xantofilas que son derivados oxigenados de color amarillo, las hojas de la mayoría de las especies absorben más del 90 % de las longitudes de onda (Manrique, 2003).

Procedimiento

- ▲ Para evaluar la concentración de clorofila a (Ca), clorofila b (Cb) y carotenoides (carotenos y xantofilas C_{x+c}) se cortan 3 círculos de hoja de la planta de interés con un sacabocado (los resultados se reportan por área, para ello utilizar la formula del área del círculo).
- ▲ Los círculos de la hoja se colocan en acetona al 80 % en tubos eppendorff.
- ▲ Se mantienen en refrigeración por 24 h.
- ▲ Transcurridas las 24 h, se mide la absorbancia con un espectrofotómetro a tres longitudes de onda (470, 645 y 662 nm).
- ▲ Las concentraciones de los pigmentos se obtienen aplicando las fórmulas de Lichtenthaler (1987). En este caso:

$$Ca = 12.25 A_{662} - 2.79 A_{645}$$

$$Cb = 21.50 A_{645} - 5.10 A_{662}$$

$$Ca+Cb = 7.15 A_{662} + 18.71 A_{645}$$

$$C_{x+c} = 1000A_{470} - [(1.82 Ca) - (85.02 Cb)]$$

A = lecturas del espectrofotómetro a las longitudes de onda indicadas en el subíndice



FIGURA 3.2. Tubo eppendorff con muestra de clorofila.

Resultados

Las lecturas del espectro se registran en el siguiente cuadro

				Ca	Cb	Ca+b	Cx+c
	λ onda	470	645	662			
Muestra:	A						
	B						

Cálculo del área de tejido vegetal

▲ Sacabocado = 0.7 cm de diámetro

▲ Área de hoja = $\pi * r^2 = 3.1416 (0.35)^2 = 0.3848 * 3 = 1.1544 \text{ cm}^2$

El resultado de los contenidos de pigmentos por área se registran en el siguiente cuadro

Muestra	Ca ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Cb ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Ca+b ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Cx+c ($\mu\text{g cm}^{-2}$)
A				
B				

NOTAS * Se puede referir en peso en lugar de área, se pesan 0.3 g de peso fresco de hoja y se trituran en un mortero en 5 mL de acetona al 80%. Se filtra el sobrenadante resultante, posteriormente se diluye en 10 mL de acetona para leer la absorbancia.

* La extracción puede hacerse con metanol, etanol, o acetona al 100%, en cada caso debe modificarse la longitud de onda en la que se leen las concentraciones de clorofilas.

II) PRÁCTICAS CON TEJIDO VEGETAL CONGELADO

La actividad fisiológica de las plantas es continua, por lo que para evaluar algunas variables es preferible coleccionar el tejido de interés (raíz o vástago) y conservarlo en nitrógeno líquido con el fin de inhibir los procesos metabólicos del tejido, el tejido congelado se puede guardar por un largo período de tiempo.

Para evaluar alguna propiedad a partir del tejido congelado, es necesario hacer una extracción con un ácido débil, se recomienda el uso del ácido sulfosalicílico, pero se pueden emplear otros ácidos.

Se debe tomar la precaución de pesar los tubos eppendorf o falcón que se utilizarán durante la extracción para, al final, restar este peso y tener el peso seco de la muestra de interés.

La extracción se hace moliendo la muestra del tejido de interés con nitrógeno líquido en un mortero

PRÁCTICA: 3.4 CONCENTRACIÓN DE PROLINA

La prolina es uno de los aminoácidos que forman parte de las proteínas, se forma a partir del ácido glutámico y por tanto, no es un aminoácido esencial, este aminoácido se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas, cuando éstas crecen en buenas condiciones, en condiciones de estrés, el contenido de prolina aumenta para actuar como un agente osmótico, protegiendo a la planta de la deshidratación (Herrera *et al.*, 2012).

El contenido de prolina en la raíz o vástago se cuantifica por colorimetría.

Procedimiento

- ▲ Hacer una extracción a partir de tejido congelado: moler 0.5 g de tejido en 5 mL de solución acuosa de ácido sulfosalicílico al 5%, colocarlo en frío (sobre hielo)
- ▲ El tejido homogeneizado se centrifuga en frío (no perder la cadena fría).
- ▲ Se toman alícuotas de 2 mL de filtrado y se colocan en tubos de ensayo.
- ▲ Se colocan 2 mL de ninhidrina ácida y 2 mL de ácido acético glacial
- ▲ Se colocan los tubos en baño maría durante 1 h a 98 °C.
- ▲ Transcurrida la hora, la reacción se detiene introduciendo los tubos en baño de hielo picado, dejar la muestra durante 5 minutos.
- ▲ Se le agregan 4 mL de tolueno, agitando fuertemente durante 30 segundos en un agitador mecánico.
- ▲ Dejar reposar 3 minutos para que se separen las fases
- ▲ Se extrae el sobrenadante el cual contiene el cromóforo, se mide la absorbancia a 530 nm, utilizando tolueno como blanco.
- ▲ La concentración de prolina se determina a partir de una curva patrón de prolina.
- ▲ Los resultados se expresan como μ moles de prolina en base al peso de biomasa fresca (g prolina / peso fresco).

NOTA * En tejido fresco, se utilizan 3 g de tejido foliar macerado en 30 mL de ácido sulfosalicílico, centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos, recuperar el sobrenadante y refrigerar a 5 °C.

PRÁCTICA: 3.5 DETERMINACIÓN DE LOS AZÚCARES SOLUBLES TOTALES

Los azúcares facilitan la asimilación de elementos nutrientes y su transporte por la planta ya que reducen la presión osmótica con lo que se mejora su entrada en los tejidos vegetales. Durante el desarrollo vegetativo, el transporte tiene lugar de las hojas hacia los ápices, al tallo y la raíz. Varias reacciones metabólicas y regulaciones unen directamente a los azúcares solubles con las tasas de producción de especies reactivas al oxígeno, como la respiración o la fotosíntesis. Además, en las situaciones de estrés donde los azúcares solubles están involucrados, como las heladas, daño por herbicidas, o ataque de patógenos, están relacionados a cambios en el balance de azúcares solubles, esto coloca a los carbohidratos en un papel importante en los mecanismos adaptativos mostrando efectos diferenciados de glucosa y sacarosa (Padilla y Martínez, 2007).

Procedimiento

- ▲ Hacer una extracción a partir de tejido congelado: moler 0.5 g de tejido en 5 mL de solución acuosa de ácido sulfosalicílico al 5%, colocarlo en frío (sobre hielo)
- ▲ El tejido homogeneizado se centrifuga a 1500 rpm
- ▲ Se toma 0.01 mL (100 μ L) del extracto y se colocan en un tubo de ensaye
- ▲ Se pone en reacción con 3 mL de antrona preparada recientemente (fresca)
- ▲ Se coloca en un baño maría durante 10 minutos.
- ▲ Poner a enfriar en un baño de hielo
- ▲ Leer en un espectrofotómetro a 620 nm
- ▲ La concentración de azúcares se realiza a partir de una curva de calibración
- ▲ La calibración de la curva se realiza usando glucosa en un rango de 20 a 400 μ g/mL
- ▲ El autocero es con antrona

Preparación de la curva patrón de glucosa

Preparar un stock de glucosa: 0.2 g de glucosa en 100 mL de agua. De aquí preparar dos soluciones

Sol A = 10 mL de solución stock en 100 mL de agua (0.2 mg/mL)

Sol B = 20 mL de solución stock en 100 mL de agua (0.4 mg/mL)

El procedimiento consiste en preparar 11 unidades de tubos eppendorf, en cada tubo se colocan con una micropipeta los microlitros (μL) de la solución A ó B más agua destilada, como se señala en el siguiente cuadro, con ello se obtiene la concentración de glucosa deseada.

Concentración en unidades de glucosa	0	20	40	60	80	100	140	180
Solución A	0 μL	100	200	300	400	500	700	900
H ₂ O	1mL	900	800	700	600	500	300	100

Concentración de glucosa	240	320	400
Sol B	600	800	1 mL
H ₂ O	400	200	0

- ▲ Tomar 100 μL de cada punto de la curva (eppendorf) y tratarlas como a las muestras con tejido, ponerles 3 mL de antrona, hervir junto con las muestras problema.

Para preparar antrona: 80 mL = 60 mL de H₂SO₄ + 20 mL de H₂O + 0.16 g de antrona

La curva debe parecerse a la **figura 3.3**.

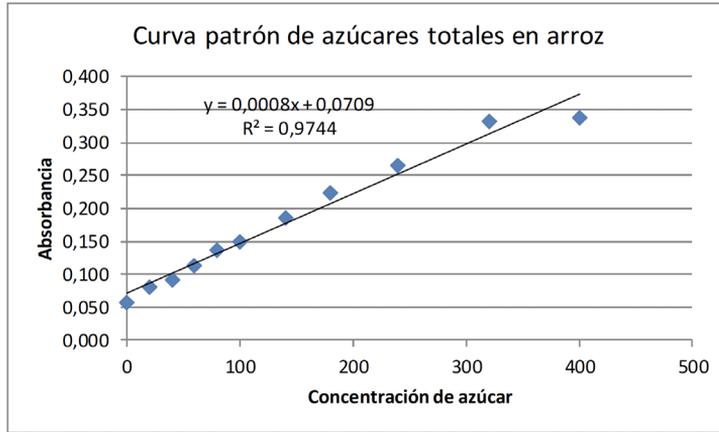


FIGURA 3.3. Curva patrón de azúcares solubles totales.

PRÁCTICA: 3.6 DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL

El glutatión es una molécula orgánica con funciones críticas en el desarrollo de meristemos, en la senescencia de tejidos, en la homeostasis intracelular de las reacciones redox, y en la defensa antioxidante y protección de las plantas.

la función principal del glutatión es proteger las células y las mitocondrias de los radicales libres, la oxidación y la peroxidación. Problemas que van aumentando a medida que la edad avanza. Un aumento de la proporción entre GSSG y GSH (GSSG/GSH = glutatión reducido/oxidado) se considera un indicativo de estrés oxidativo (Benavides *et al.*, 2009).

Procedimiento

- ▲ Pesar los tubos eppendorf o falcon que se utilizarán, para calcular el peso seco final (PSF)
- ▲ Moler un 1 g de muestra de tejido congelado con nitrógeno líquido en un mortero
- ▲ Añadir 5 mL de ácido sulfosalicílico al 5% en el mortero y recogerlo en eppendorf de 2 mL, ponerlo en hielo.

- ▲ Centrifugar 10 min a 10000 rpm a 4 °C
- ▲ Recoger el sobrenadante en eppendorf de 2 mL, midiendo el volumen, (guardar a -20 °C hasta su uso).
- ▲ Colocar el eppendorf con el pellet (tejido) en una estufa, poner a secar a 60 °C hasta peso constante, volver a pesar y registrar el peso seco.

NOTA * Si se usa un tubo falcon centrifugar a 6000 rpm a 4 °C durante 20 min.

Reactivos necesarios para la extracción

A - Solución tampon TFK 0.5 M con pH 7.5 el cual se prepara a partir de dos soluciones:

- i. Solución 1. KH_2PO_4 0.5 M (320 mL)

$$0.5 \text{ mol/L} = x \text{ mol}/0.320 \text{ L } x = 0.16$$

$$m (136.09) = 21.77 \text{ g en } 320 \text{ mL de } \text{H}_2\text{O}$$

- ii. Solución 2. K_2HPO_4 0.5 M (130 mL)

$$0.5 \text{ mol/L} = x \text{ mol}/130 \text{ mL } x = 0.065$$

$$0.065 \text{ Pm } (174.18) = 11.32 \text{ g en } 130 \text{ mL de agua destilada}$$

Vertir la solución 2 sobre la solución 1 y ajustar el pH a 7.5 con KOH. Aforar a 500 mL con agua destilada

B – Solución 0.1 M fosfato sódico + EDTA 5 mM pH 7.5

- i. Solución de fosfato sódico 0.1 M

$$0.1 \text{ mol/L} = x \text{ mol}/0.1 \text{ L } x = 0.01$$

$$0.01 \text{ Pm } (138) = 1.38 \text{ g en } 90 \text{ mL de agua destilada}$$

i. Sol. EDTA 5 mM

$$0.005 \text{ nmol/L} = x \text{ mol}/0.1 \text{ L} \quad x = 0.01$$

$$0.0005 * P_m (372.24) = 0.186 \text{ g en la solución anterior}$$

Ajustar el pH = 7.5 con NaOH. Aforar a 100 mL con agua destilada

0.6 mM 5.5 dithiobis (2-ácido nitrobenzoico)

$$0.006 \text{ mol/L} = x \text{ mol}/0.05 \text{ L} \quad x = 0.0003$$

$$0.0003 * P_m (396.35) = 0.0119 \text{ g en 50 mL de fosfato sódico + EDTA}$$

0.2 mM NADPH

$$0.002 \text{ mol/L} = x \text{ mol}/0.01 \text{ L} \quad x = 0.00002$$

$$0.00002 * P_m (833.36) = 0.0167 \text{ g en 10 mL de agua destilada}$$

- ▲ Preparar una solución de enzima glutatión reductasa (GR) 1 unidad (10 unit/mL) (elaborar al momento de usar)

Es necesario hacer una curva patrón con distintas concentraciones de glutatión oxidasa (GSSG) Para ello se preparan diluciones de concentración conocida de GSSG (en tampón de extracción) y se sigue el mismo procedimiento con las muestras. El blanco se hace igual pero se añade ácido sulfosalicílico en lugar de muestra.

Usar las siguientes concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.125 y 0 mM.

Tomar 375 μL de la muestra y mezclar con 562.5 μL de 0.5 TFK pH=7.5

1. Si se hace la extracción en un tubo falcon es necesario centrifugar antes de tomar 750 μL unos 3 minutos a 10 000 rpm
2. Poner 25 μL de muestra en cada pocillo de la placa del equipo ELISA (3 pocillos por muestra a medir incluidas las muestras de la curva patrón)
3. Añadir con pipeta múltiple directamente a los pocillos

- ▲ 100 μ L fosfato
 - ▲ 50 μ L 5-5 dithiobis 6 mM
 - ▲ 25 μ L NADPH 2 mM
4. Añadir 25 μ L enzima GR e inmediatamente llevar a lectura en el quipo ELISA a 412 nm en un ciclo de 5 lecturas cada minuto (**figura 3.4**).

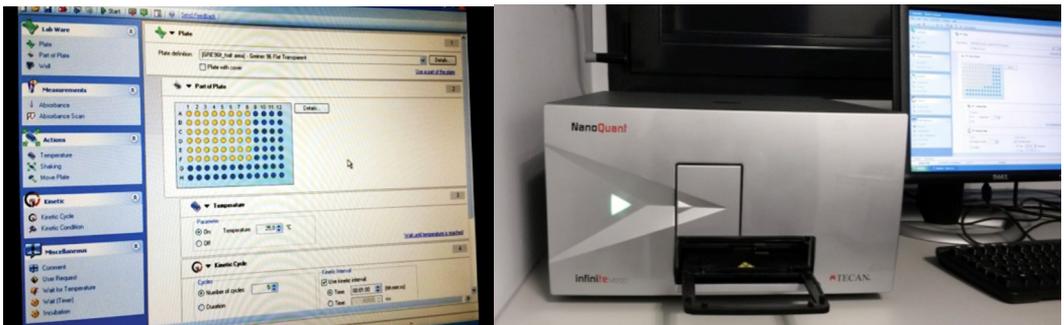


FIGURA 3.4. “Elisa” equipo y pantalla que realiza la cinética con mucha precisión, ya que ejecuta las lecturas de la serie de muestras simultáneamente.

Manejo de resultados

Lo que ocurre en el lector de ELISA es que el color amarillo se intensifica como resultado de la reducción del dithiobis conforme transcurre el tiempo.

Los datos obtenidos son de absorbancia con respecto al tiempo, los que se representan en la recta, se obtiene la pendiente y la ecuación que se aplica para el calculo de la concentración del glutatión.

Los resultados de la concentración de glutatión (x) de las muestras problema, están dados según la concentración de la curva patrón en nmol/mL. Para calcular la cantidad real que contiene la extracción original se hacen los siguientes cálculos:

Dado que es una cinética se calcula la variación de la densidad óptica a lo largo de la variación del tiempo con el siguiente cálculo:

$(\text{Densidad final} - \text{densidad inicial}) / \text{total de tiempo en segundos}$. Se toma el tiempo a 1 segundo y 4 segundos por ejemplo, se aplica a cada repetición de la recta y después se saca el promedio de cada punto.

Ahora se gráfica la absorbancia *vs* concentración y se genera la ecuación de la recta (**figura 3.5**).

Multiplicar los resultados por los mL de la extracción inicial, dividir los resultados por los gramos de peso seco (o fresco) del tejido usado.

El resultado final se reportará en nanomoles de glutatión por gramo de peso seco (o fresco) del tejido.

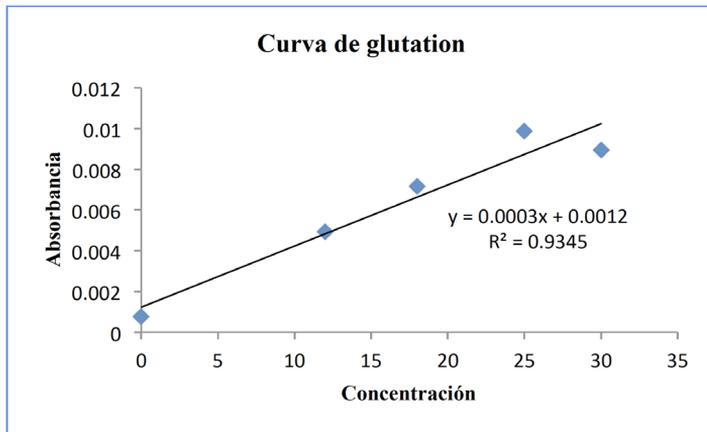


FIGURA 3.5. Curva patrón de la concentración de glutatión.

Las lecturas se pueden hacer en un espectrofotómetro, dependiendo del modelo se establecen los ciclos de lectura para la misma muestra.

PRÁCTICA: 3.7 DETERMINACIÓN DEL ASCORBATO TOTAL

El ascorbato es una de las moléculas antioxidantes más abundantes en las plantas, principalmente en las hojas. Es esencial para el desarrollo, crecimiento y defensa de la planta, ya que interviene en la división celular y en la síntesis de la pared celular, se encuentra en casi todos los tejidos de las plantas, excepto en las semillas, se transporta desde la superficie de las hojas hasta los tejidos. Se acumula en los tejidos fotosintéticos, aunque también se encuentra en tejidos no fotosintéticos como flores, frutos, raíces y ápices de estolones o tubérculos (Gest *et al.*, 2013).

Reactivos:

- ▲ Preparar: 50 mL de 45 % p/v de K_2HPO_4 (= 22.5 g/50 mL)
- ▲ 50 mL 0.1 p/v homocisteína (= 0.05 g/50 mL)
- ▲ 100 mL 2M de ácido cítrico pH = 2.3 (= 42.03 g/100 mL)
- ▲ 100 mL PIP 0.003 % (p/v) (= 0.003 g diclorofenol-indol/100 mL)

Procedimiento

- ▲ La extracción a partir del tejido vegetal se hace con 5 mL de ácido metafosfórico al 2% (p/v) + 1 g de NaCl y 0.02 g de muestra, se pasa por papel filtro.
- ▲ Se recogen en un tubo eppendorf de 2 mL, se toman 300 μ L del extracto, 200 μ L de K_2HPO_4 y 100 μ L de homocisteína.
- ▲ Se colocan en incubación a 25 °C durante 15 min.
- ▲ Agregar 500 μ L de ácido cítrico + 500 μ L de PIP (diclorofenilindol)
- ▲ Mezclar con la pipeta y leer a 524 nm.
- ▲ Hacer una recta patrón con ascorbato de sodio, ó con ácido ascórbico 0.01M
- ▲ Pesar 0.099 g de ácido ascórbico en 50 mL de ácido metafosfórico al 2% (ac. ascórbico = 10 mM).

- ▲ Diluir 100 μL de la solución 10 mM en 900 μL de ácido metafosfórico, se obtiene una solución 1mM.
- ▲ De esta solución (1 mM), tomar 500 μL + 500 μL de ácido metafosfórico = 0.05 mM. Así sucesivamente hacer una solución 0.25 mM, 0.125 mM, 0.0625, 0.0312, 0.0156 y 0.0078.
- ▲ Justo antes de tomar la lectura, agregar a cada dilución de la recta y a cada muestra, 100 μL de citrato y 100 μL de PIP. Tomar la lectura, la curva debe parecerse a la **figura 3.6**.

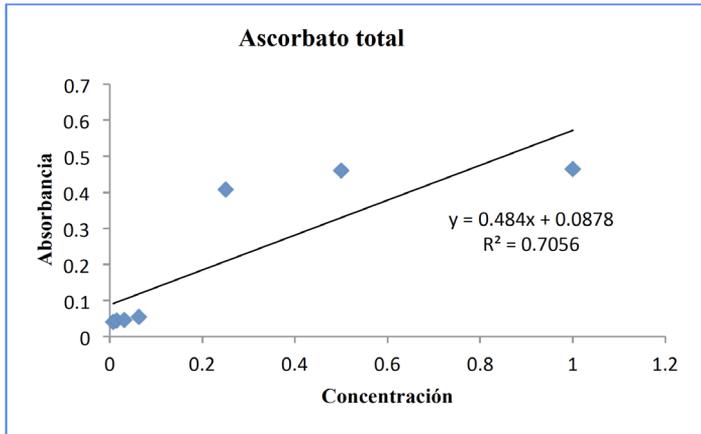


FIGURA 3.6. Curva patrón de ascorbato total.

Los resultados se obtienen despejando “x” de la ecuación de la curva.

PRÁCTICA: 3.8 DETERMINACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El peróxido de hidrógeno, es utilizado por las plantas para controlar las reacciones de sus células a diferentes niveles de luz. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un subproducto de la fotosíntesis en los cloroplastos, es una molécula señal y reguladora de la expresión de algunos genes. Cuando se acumula en las plantas, activa factores de transcripción que regulan diferentes procesos fisiológicos, inhibe el crecimiento y desarrollo vegetal, y estimula los mecanismos de defensa contra el estrés biótico y abiótico (Mora y López, 2006).

Procedimiento

- ▲ Se emplean 0.5 g de raíz de congelada molida en nitrógeno líquido en mortero, una vez que esta hecha polvo se realiza la extracción.
- ▲ Extracción con 5 mL de TCA (ácido tricloro acético) al 5% más 0.1 g de carbón activado y 0.1 g de PVPP (polyvinil polipirrolidone). El extracto se vierte en tubos eppendoff en frío.
- ▲ Se filtra con filtros Millipore 0.22 m (figura 3.9)
- ▲ Se guarda a $-20\text{ }^\circ\text{C}$
- ▲ Se preparan los siguientes reactivos:
 - ▲ TFK = KH_2PO_4 (0.408 g) + K_2HPO_4 (1.219 g) disueltos en 100 mL de agua, ajustar a $pH = 8.4$.
 - ▲ 4-2 pirihidraza, disolver 0.0153 g en 100 mL de agua (proteger de la luz)
 - ▲ Potasio-oxido de titanio- ($C_4K_2O_9Ti.2H_2O$). Disolver 0.016 g en 50 mL de H_2O .
 - ▲ Mezclar 1:1 de 0.6 mM 4-2 pyridiltol + 0.6 mM de oxalato de titanio (preparar 50 mL)
 - ▲ Se preparan 2 tubos eppendorf de 2 mL por muestra, se colocan 100 μL de muestra + 1 mL de TFK + 1 mL de de la mezcla de pyridiltol y oxalato.
 - ▲ Colocar en baño maría a $45\text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 min.

- ▲ Sacar y parar la reacción poniendo en hielo
- ▲ Preparar una recta patrón con H_2O_2 y leer en el espectro a 508 nm.
- ▲ El blanco es igual a 100 μL de TCA al 5% + 1 mL de TFK + 1 mL de mezcla.

**puede hacerse a la mitad de todo para que quede cómodamente en el tubo eppendorf

Para la curva patrón se preparan 2 tubos eppendorf de 2 mL por punto, para poner las diluciones a calibrar. Uno se emplea para las diluciones y el otro para añadir 1 mL de esa dilución más todo lo restante, ya que las diluciones deben ser tratadas igual que las muestras problema.

La curva patrón se prepara con:

10.3 mL de H_2O_2 (al 33% p/v), de aquí se toma 1 mL y se diluye con 9 mL de H_2O , se obtiene H_2O_2 10 mM. Esta solución es el punto 1 de la recta, los siguientes puntos incluyen TCA como se indica en el siguiente cuadro, así sucesivamente hasta completar siete puntos, y como ya se menciono deben tratarse igual que las muestras con tejido.

Punto	Concentración	mL de H_2O	mL de TCA (ácido tricloro acético)
1	1.0	1.0	0.0
2	0.8	0.8	0.2
3	0.6	0.6	0.4
4	0.4	0.4	0.6
5	0.2	0.2	0.8
6	0.1	0.1	0.9
7	0.0	1.0	0.0

La curva patrón debe parecerse a la **figura 3.7**.

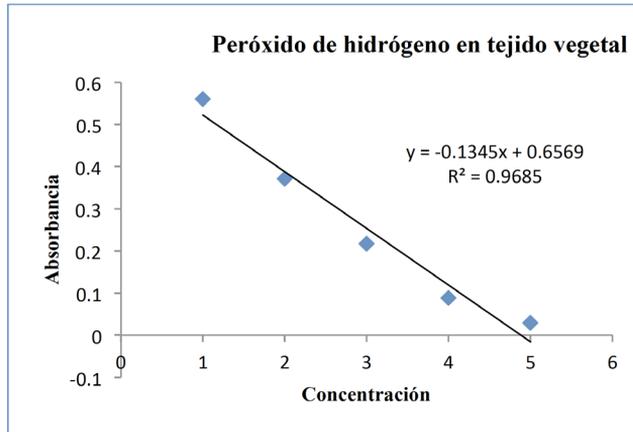


FIGURA 3.7. Curva patrón de la concentración del peróxido de hidrógeno en tejido vegetal.

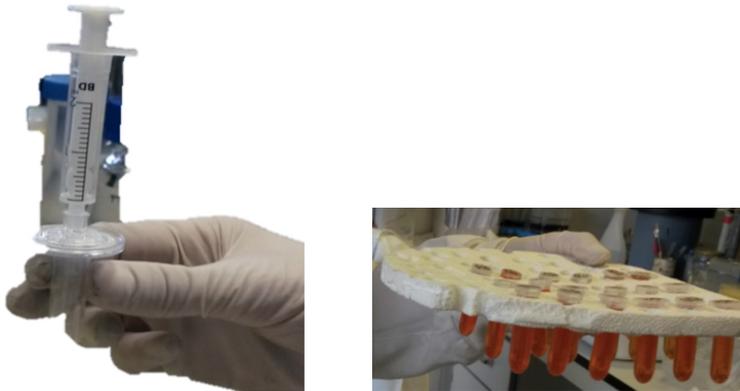


FIGURA 3.8. Sistema de microfiltración y color de la reacción.

Los resultados se obtienen despejando “x” de la ecuación de la curva.

PRÁCTICA: 3.9 DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO

Las reacciones de óxido – reducción ocurren normalmente en la planta. En condiciones ambientales favorables, el metabolismo oxidativo se encuentra en equilibrio entre producción y degradación de especies reactivas del oxígeno (ERO), los incrementos y acumulación de ERO tanto en el estrés abiótico como biótico provocan en la planta estrés oxidativo. La oxidación se genera tanto en el metabolismo fotosintético como en el respiratorio y cumple una doble función: señala la respuesta defensiva frente al estrés, aumentando su concentración, y promueve daños oxidativos en la planta induciendo la muerte, la planta se defiende mediante un complejo sistema antioxidante (aumento del ácido ascórbico y de glutatión), y enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) que secuestran al peróxido de hidrógeno (Benavides, 2002).

Los diferentes tipos de estrés disparan procesos de regulación diferentes, por ejemplo el estrés térmico activa la regulación de iones afectando el contenido de clorofilas, en la selección de genotipos tolerantes al estrés salino, se ha recurrido al contenido de malondialdehído (MDA) que es un producto de la peroxidación de lípidos de membrana como un buen indicador del daño oxidativo.

Procedimiento :

- ▲ Extracción a partir de 0.5 g de muestra congelada en nitrógeno líquido en mortero frío. Agregar 4 mL de tampón de extracción de TCA al 0.1% (puede tener mayor concentración incluso al 5%), recoger el líquido en tubos eppendorf y colocar en hielo. Centrifugar 5 minutos a 10.000 rpm, a 4 °C, recoger el sobrenadante
- ▲ Para la determinación: poner en un tubo eppendorf de 2 mL, al que previamente se le ha hecho una perforación pequeña en la tapa, 0.5 mL de la muestra y mezclar con 1.5 mL de TCA (20%) + TBA (5%).
- ▲ Incubar en baño maría a 95 °C durante 30 minutos, transcurrido este tiempo colocarlo en hielo para parar la reacción.
- ▲ Leer la absorbancia a 532 nm y a 600 nm.
- ▲ A las lecturas obtenidas en absorbancia de 532 nm restar la absorbancia leída a 600 nm, con este nuevo dato calcular la concentración a partir de la ecuación de la recta generada con la curva patrón.

Reactivos

TCA 20 % + TBA al 5 % = 50 g de ácido tricloroacético + 1.25 g de ácido tiobarbitúrico en 250 mL de agua.

TCA al 0.1 % p/v.

La curva patrón se hace a partir de una solución 10 mM de Malondialdehído (MDA) y una serie de diluciones de acuerdo al cuadro siguiente.

Concentración de MDA	μL de solución madre (MDA)	mL de TCA (0.1%)
0.1	10	9.99
0.25	25	9.97
1.0	100	9.90
5.0	500	9.50
10.0	1000	9.00

Tomar 0.3 mL de cada dilución, agregar 1.2 mL de la mezcla TCA + TBA, llevarla a 95 °C en baño maría durante 30 min, pasar al hielo y tomar la lectura a 532 nm en el espectrofotómetro, y luego a 600 nm, la curva debe parecerse a la **figura 3.9**.

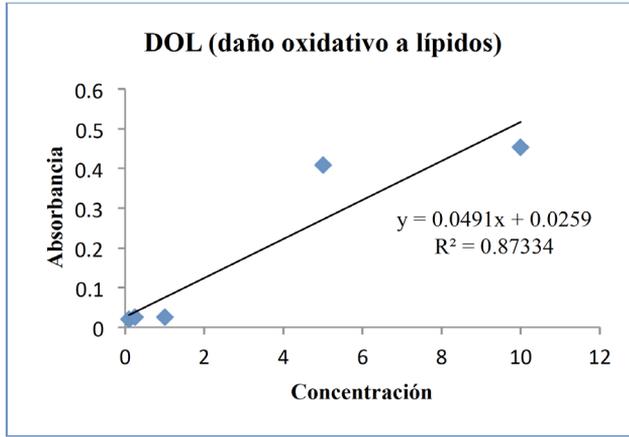


FIGURA 3.9. Curva patrón del daño oxidativo.

Los resultados se obtienen despejando “x” a partir de la ecuación de la curva.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aguilera, C.M. & Martínez, E. R. (1990). *Relaciones agua suelo-planta atmósfera*. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Mexico.
- Bago, B., Pfeffer P.E., Abubaker J., Jun J., Allen J.W., Brouillette J., Douds D.D., Lammers P.J., & Shachar-Hill Y. (2003). Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiol.* 131:1496-1507.
- Barrs, H. D., & Weatherley, P. E. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian journal of biological sciences*, 15(3), 413-428.
- Benavides, M. A. (2002). *Estres oxidativo*. En A. Benavides M. (Editor). *Ecofisiología y bioquímica del estrés en plantas*. (pp. 87-99). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.
- Benavides, M. A., Ramírez, H., Robledo, T. V. & Fuentes-Lara, L. O. (2009). *Antioxidantes en las plantas: algunos factores edáficos y ambientales que los modifican*. En A. Benavides, M. (Compilador). *Temas modernos de nutrición vegetal*. A. C. (pp. 13-26). Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. A.C. Texcoco, México.
- Borjas, R., Rebaza, D. & Julca, A. (2015). Contenido hídrico de dos variedades de livo (*Olea europea* L.) en el Valle de Cañete, Lima Perú. *Scientia agropecuaria* 6(3): 147-154

- Estrada, B., Aroca, R., Barea, J. M., & Ruiz-Lozano, J. M. (2013a). Native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from a saline habitat improved maize antioxidant systems and plant tolerance to salinity. *Plant science*, 201, 42-51.
- Estrada, B., Barea, J. M., Aroca, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2013b). A native *Glomus intraradices* strain from a Mediterranean saline area exhibits salt tolerance and enhanced symbiotic efficiency with maize plants under salt stress conditions. *Plant and soil*, 366(1-2), 333-349.
- Evelin, H., Kapoor, R., & Giri, B. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of botany*, 104(7), 1263-1280.
- FAO, (2011). *Proceedings Of The Global Forum On Salinization And Climate Change (GFSCC2010)*. 1st Ed. [ebook] Rome, Italy: Rhodri P. Thomas, pp.68-69. Available at: <http://www.fao.org/uploads/media/BOOK_printing.pdf> [Accessed 15 July 2020].
- Ferrol N, Calvente R., Cano C., Barea J.M. & Azcón-Aguilar, C. (2004). Analysing arbuscular mycorrhizal fungal diversity in shrub-associated resource islands from a desertification-threatened semiarid Mediterranean ecosystem. *Applied Soil Ecology*. 25:123-133
- Guest, N., Gautier, H & Stevens R. (2013). Ascorbate as seen through plant evolution: The rise of a successful molecule?. *Journal of Experimental Botany* 64(1) 33-53
- Hernández-Cuevas L., Castillo A. S., Guadarrama C.P., Martínez O. Y., Romero R.M., & Sanchez G.I. (2003). Hongos micorrizógenos arbusculares del Pedregal de San Angel. Facultad de Ciencias. UNAM. Mexico. 2-15:84.
- Herrera, F. T. S., Ortíz, C. J., Delgado, A. A. & Acosta, G. A. (2012). Crecimiento y contenido de prolina y carbohidratos de plántulas de frijol sometidas a estrés por sequía. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 3(4): 713-725.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology*, Academic Press, 148, 350-382.
- Manrique, E. (2003). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para fotosíntesis. *Ecosistemas* Vol XII. (1):1-11.
- Mittler, R. & Blumwald, E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology* 61: 443-462.
- Mora, H.M.E. & López, D.H.A. (2006). Tolerancia a baja temperatura inducida por ácidos salicílico y peróxido de hidrógeno en microplantas de papa. *Revista Fitotecnía Mexicana* 29 (2):81-85.
- Padilla, Ch. D. & Martínez B. E. (2007). Factores involucrados en la distribución de azúcares en las plantas vasculares: comunicación entre los tejidos fuente y tejidos demanda. *REB* 26 (3):99-105.
- Parniske M. (2004). Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 414-421.

- Pfeffer P. E., Douds D. D., Bécard G. & Schachar-Hill Y. (1999). Carbon uptake and metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol.* 120:587-598.
- Ruiz-Lozano, J. M., Azcón, R., & Gomez, M. (1995). Effects of arbuscular-mycorrhizal glomus species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and environmental microbiology*, 61(2), 456-460.
- Ruiz-Lozano, J. M., Porcel, R., Azcón, C., & Aroca, R. (2012). Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. *Journal of Experimental botany*, 63(11), 4033-4044.
- Sauter, A., Dietz, K. J., & Hartung, W. (2002). A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 223-228.
- Varela, L. & Trejo, D. (2001). Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México. *Acta Zool. México. Número especial.* 1:39-51.

INTRODUCCIÓN

La raíz de la planta, es la parte que está en contacto con el suelo. Es una zona de interacción única y dinámica entre las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo. La comunidad de la rizósfera consiste en una microbiota (bacterias, hongos y algas) y una micro y mesofauna (protozoos, nematodos, insectos y ácaros). La micro y mesofauna participan activamente en los procesos de descomposición del ecosistema y contribuyen significativamente con el catabolismo de sustancias nocivas en la rizósfera (Barea, 1998)

Las dimensiones de la rizosfera y su actividad microbiana depende de factores específicos del sitio y de la planta como la especie, edad y vigor de las plantas.

La rizósfera provee un complejo y dinámico microambiente, donde las bacterias y hongos, en asociación con las raíces, forman comunidades únicas que tienen un considerable potencial para la detoxificación de compuestos orgánicos nocivos.

Existen varios métodos que han sido descritos para el estudio de las raíces. La longitud de raíz por unidad de volumen de suelo (densidad de longitud radical), es uno de los mejores parámetros para estudiar los procesos de absorción de agua y nutrimentos por las plantas.

PRÁCTICA: 4.1 DETERMINACIÓN DE LONGITUD Y DENSIDAD DE LONGITUD RADICAL POR EL MÉTODO DE LAS INTERSECCIONES

El estudio de las raíces por el método de intersecciones de líneas modificado por Tennant (1975), presenta cierto grado de subjetividad, sobre todo en estudios de campo, donde el sistema radical, suele no recuperarse totalmente, sin embargo su bajo costo y con determinadas condiciones, de rigor en la ejecución, puede ser utilizado con buenos resultados.

Procedimiento

Después de la obtención de las raíces del sustrato en el que se encuentra la planta, su remoción cuidadosa, dispersión del material fino, separación de residuos o detritos orgánicos u otras raíces muertas, lavarlas cuidadosamente con ayuda de mallas finas que limiten la pérdida de material radical, cuando sea necesario almacenarlas hacerlo en alcohol al 40 %, sin refrigerar.

Determinar el peso húmedo total de la raíz y de ser posible el peso seco de las mismas.

El método consiste en tomar una muestra de raíz de peso conocido, de la que debe conocerse el peso fresco total, colocarla sobre la caja petri con dibujo en cuadrícula, agregar un poco de agua destilada y moverla en forma oscilatoria. Contar el número de intersecciones entre las raíces y las líneas verticales y horizontales de la cuadrícula de la caja Petri (**figura 4.1**)

La longitud de la raíz, puede ser estimada con la siguiente ecuación:

$$R = (\pi AN)/2 H$$

Donde:

R = Longitud total de raíz

π = pi

A = Área ocupada por las raíces

N = Número de intersecciones de las raíces

H = largo total de las rectas

Una simplificación de la fórmula anterior para una cuadrícula de dimensiones indeterminadas, pueden convertirse a centímetros usando la siguiente ecuación y contando las intersecciones

$$R = (11/14) N \times \text{unidad de cuadrícula}$$

Con el uso de una cuadrícula de aproximadamente 1 cm, cada intersección del conteo representa 1 cm de longitud radical y para calcular la longitud total de la muestra se cuentan el numero de las intersecciones.



FIGURA 4.1. Muestra de raíz en caja Petri.

Cuando el número de los conteos sea inferior a 50, la determinación debe ser realizada nuevamente con un mayor peso de la submuestra. Conteos cercanos o iguales a 400 son innecesarios.

Para la determinación de **densidad de longitud radical**, el cálculo se realiza obteniendo el cociente entre peso fresco total con longitud total.

$$dr = \text{peso fresco de raíz} / \text{longitud total de raíz}$$

Nota: Se sugiere que de acuerdo a la especie, el método se calibre para tener conteos entre 100 y 200 intersecciones y que sea realizado por la misma persona para disminuir riesgo de error.

PRÁCTICA: 4.2 EXTRACCIÓN Y MANEJO DE MICELIO DEL SUELO

Introducción

La extracción del micelio externo de hongos y en particular de los hongos micorrizógenos arbusculares que se encuentra contenido en el suelo, se realiza mediante su dispersión y suspensión en agua después de agitarse en una solución dispersante de arcillas, rompiendo los conjuntos hifales en una alícuota.

En el suelo existe una red extendida de micelio compuesto de hifas de diferente naturaleza como las hifas exploradoras e hifas de absorción. Las hifas de avance son de paredes gruesas y grandes. Estas hifas son importantes para el mantenimiento de la red micelial, ya que desempeñan una función de soporte (Harley y Smith, 1983).

Las hifas de avance desarrollan hifas exploradoras primarias, las cuales forman ramificaciones y dan lugar a las hifas exploradoras.

Cuando la micorriza termina su desarrollo, se forman unas estructuras con forma de árbol las cuales son conocidas como “estructuras ramificadas de absorción” (BAS, por sus siglas en inglés).

Las hifas absorbentes, caso contrario a las hifas de avance, son de paredes más finas y menor tamaño, las cuales se desarrollan a partir de las hifas de avance; su finura les permite explorar los poros de menor tamaño del suelo y su función primaria es absorber los nutrientes del suelo y dirigirlos hacia el hospedero (Bago *et al.*, 1998).

Las redes miceliales son la parte más dinámica y funcionalmente diversa de la simbiosis; se ha estimado que representan entre el 20-30 % de la biomasa total microbiana del suelo

Actualmente se estudia el papel ecológico y la importancia que tiene el micelio a distintos niveles ecológicos, a nivel individual (planta u hongo) y a nivel de comunidad vegetal como red miceliar (Rillig y Mummey, 2006; Simard *et al.*, 2012).

Procedimiento

- ▲ Se toman 5 g de suelo, previamente secado al aire y tamizado con malla de 2 mm
- ▲ El suelo tamizado se coloca en un frasco transparente de plástico de 500 mL con tapa, se le gregan 250 mL de agua destilada y 31 mL de hexametáfosfato de sodio al 10 %. Tapar el frasco para evitar evaporación y dejar remojar toda la noche (12 h).
- ▲ Sellar el vaso y agitar vigorosamente durante 5 min con la mano tratando de mover todo el sedimento del fondo del frasco, dejar las muestras en agitación durante 30 min con un agitador magnético en una parrilla o en placa de agitación.
- ▲ Tomar 12 mL con una pipeta posicionada en medio del frasco (4 cm aproximadamente), inmediatamente que el agitador se detenga. Transferirlos a un frasco de plástico de 500 mL.
- ▲ Se le agregan otros 250 mL de agua destilada y 31 mL de hexametáfosfato de sodio (10%), agitar nuevamente a máxima velocidad por 3 min.
- ▲ Tomar dos alícuotas de 20 mL cada una inmediatamente que el agitador se detiene, se colocan en tubos de centrifuga de 50 mL
- ▲ Los tubos se ponen a centrifugación a 100 rpm por g de suelo (en este caso: $5 \times 100 = 500$ rpm) durante 8 minutos.
- ▲ Descartar el sobrenadante con cuidado
- ▲ Agregar 10 mL de glicerina al 50% tratando de resuspender la alícuota.
- ▲ Volver a centrifugar a 75 rpm por g de suelo ($75 \times 5 = 375$) durante 30 minutos.
- ▲ Preparar un sistema de filtrado al vacío, empleando un kitasato y un sistema Millipore para muestras múltiples (**Figura 4.2**).

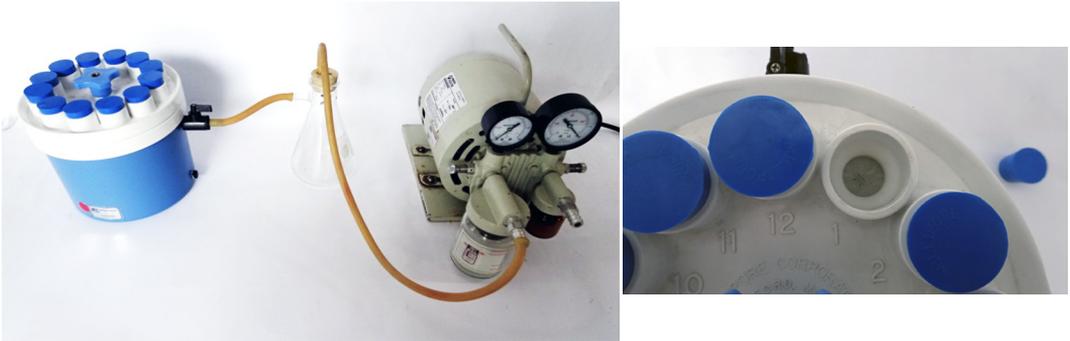


FIGURA 4.2. Sistema de filtración Millipore, en cada espacio se filtra una muestra.

Se filtra al vacío colocando una membrana de nitrocelulosa de 45 μm de apertura en el Millipore.

Cuando la muestra ya esta filtrada se agregan 5 mL de azul tripano al 0.05 % y se deja que se filtre por gravedad a través de la membrana. Después de unos minutos, si es necesario, prender el sistema de vacío para quitar el exceso de colorante.

Montar la membrana sobre un portaobjetos con una gota de alcohol polivinílico (PVLG) y se deja secar a temperatura ambiente por al menos 30 min antes de colocar el cubreobjetos (figura 4.4).

Cálculos:

La cuantificación del micelio extraradical total usando la técnica de Jackbsen (1998) deberá seguir lo siguiente:

- Medir la longuitud de la unidad de la rejilla en el ocular de $10 \times 10^*$ sobre el filtro en mm, usando un objetivo micrométrico
- La longitud total de la hifa sobre el área de filtrado cubierta por 25 rejillas (H)

$$H = 11/14 \times N$$

N = número total de inereptos en 25 campos de observación ** (Figura 4.3)

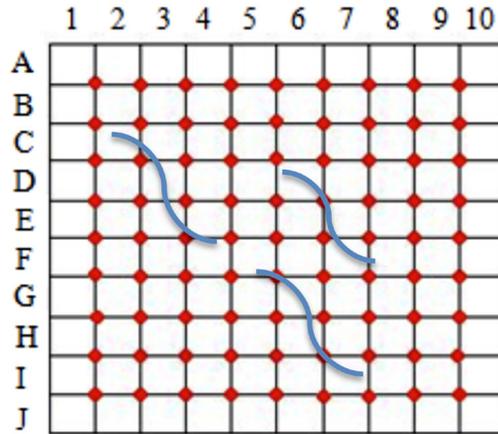


FIGURA 4.3. Cuadrícula donde se evalúa la intersección del micelio.

- c. Determinar el área filtrable sobre el filtro (FA) en mm^2 ***
- d. Calcular el área filtrada cubierta por las 25 unidades de observación (área contable = CA)

$$CA = (10 \times \text{unidad de rejilla})^2 \times 25 \text{ mm}^2$$

- e. Calcular la longitud total de la hifa sobre un filtro (HL)

$$HL = (H/CA) \times FA \text{ mm}$$

- f. Calcular el total de la hifa en a muestra de suelo (TL)

$$TL = ((HL/12\text{mL}^{****}) \times 250 \text{ mL}) / 5 \text{ g}$$

Donde:

5 g es el peso de la muestra de suelo seco

250 mL es el volumen del agua donde la muestra fue suspendida

12 mL es la alícuota de la suspensión pipeteada sobre el filtro

Los pasos de la fórmula deben calcularse en orden, porque los cálculos posteriores requieren los cálculos anteriores.

- g. Tomar la medida de los valores TL dados para las dos submuestras x los 2 filtros por muestra de suelo

Nota: * Unidad de rejilla en el ocular de $10 \times 10 = 0.01$ mm

** El numero N puede variar según el número de campos que se requieran observar. En el caso particular se sugiere observar 25 campos por laminilla

*** El área filtable sobre el filtro (FA) es el área por donde se filtra la muestra en el milipor, no es el área total de la membrana

**** Los 12 mL es la cantidad de glicerina con la que se resuspende la muestra en la segunda centrifugación

Método alternativo

La muestra de 5 g de suelo se pasa por un tamiz fino de 37 a 40 μ m enjuagando perfectamente sobre un recipiente para evitar la pérdida de suelo. Se lava las veces que sea necesario hasta eliminar la mayor cantidad de arcillas.

Limpia la muestra, se vacía en una probeta de 100 mL y se afora a 50 mL, esta solución se vierte en un vaso de agitación mecánica (esquimero) y se repite la acción hasta verter todo el suelo y completar, sin sobrepasar los 250 mL de agua.

Agitarlo en la licuadora de esquimos a alta velocidad por 3 minutos. Inmediatamente decantar la muestra en un matraz Erlenmeyer de 300 mL con un tapón de hule tapparla perfectamente y dejarla reposar un minuto.

Con la ayuda de una pipeta, tomar 5 mL a una profundidad de 4 cm de la superficie en agua. Esta alícuota se vierte en el equipo de filtración al que previamente se le coloca la membrana de nitrocelulosa.

Se filtra al vacío enjuagándose con agua destilada una sola vez, ya enjuagada la muestra se añaden 2 mL de azul tripán al 0.05 % y se deja tiñendo la membrana por 5 min. Transcurridos los 5 minutos y observando que la membrana se encuentra teñida, esta se enjuaga con agua destilada en el mismo dispositivo.

Con la ayuda de unas pinzas, se retira cuidadosamente la membrana y se monta en un portaobjetos para observaciones posteriores. Una vez secas las membranas se le adiciona una o dos gotas de PVLG poniéndole un cubreobjetos sobre las mismas.

Con el objetivo 20X se toman fotografías de los 25 campos escogidos al azar y distribuidos en toda el área del filtro para analizarlas posteriormente con un programa que procese imágenes como el “Image Pro-Plus 6” sobreponiendo una cuadrícula de 500×500 nm en cada fotografía y marcando el micelio que se encuentre dentro de la cuadrícula, de esta manera se obtiene la longitud total de micelio en cada campo. El micelio externo de los HMA se observará teñido de color azul y cenocítico (aseptado) de apariencia tortuosa. En caso de observar micelio viejo, éste puede observarse septado, pero los septos no son regulares (**Figura 4.4**).

Cálculos:

Una vez que se contabilizó la longitud total de las hifas en el área filtrada y estimada en los 25 campos observados, el siguiente paso es calcular el área de filtración (FA) en mm^2

$$FA = r^2$$

Ahora se calcula el área del filtro \times los 25 campos (área contada = CA)

$$CA = (10 \times \text{campo})^2 \times 25 \text{ mm}^2$$

También se requiere calcular la longitud de la hifa en el filtro (HL)

$$HL = (H/CA) \times FA$$

Por ultimo se calcula la longitud total de hifa en las muestras de suelo (TL)

$$TL = ((HL/5 \text{ mL}) \times 250 \text{ mL})/4 \text{ g} = \text{mm/g}$$

Donde:

4.0 = peso de la muestra de suelo seco inicial

250 mL = volumen de agua donde se suspendió la muestra de suelo

5 mL = alícuota sustraída con la pipeta y vaciada sobre el filtro

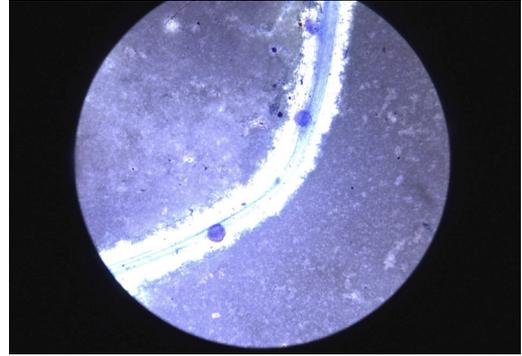
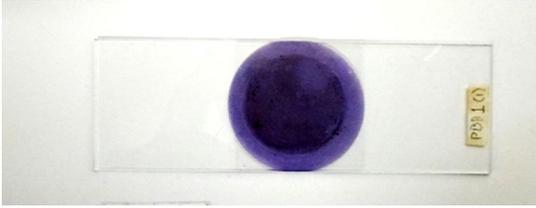


FIGURA 4.4. Membrana de nitrocelulosa y observación del micelio a 40 X.

PRÁCTICA: 4.3 BIOTRAMPAS PARA RECUPERAR HONGOS DEL SUELO RIZÓSFERICO

Introducción

La abundancia de microorganismos suele ser mayor en el entorno de las raíces, estos microorganismos modifican las condiciones de pH, nutrientes e interacciones del entorno de las raíces (suelo rizosférico), algunos grupos de bacterias son muy abundantes en la rizosfera después de ellas, son los hongos el siguiente grupo en abundancia, en este grupo existen hongos además de simbiosites, patógenos y saprobios, para reconocerlos es necesario recolectarlos y hacerlos crecer, para ello hay muchos métodos como el crecimiento en agar papa dextrosa a partir de una dilución de suelo, o con el empleo de trampas como el enterramiento de portaobjetos en la cercanía de la raíz, después de un tiempo, se retira el portaobjeto, se tiñe y se observan las estructuras que se adherieron en el portaobjeto, o bien con el fin de estimar la abundancia y riqueza de los hongos del suelo, ya sean beneficiosos o patógenos, pueden emplearse otras biotrampas como la siguiente.

Procedimiento

- ▲ Colectar muestras de suelo rizosférico de interés para este estudio
- ▲ Secar y tamizar la muestra con un tamiz de 2 mm

- ▲ Elaborar cámaras húmedas y oscuras para la extracción de hongos del suelo de interés empleando rodajas de vegetales ricos en almidón como papa, zanahoria, manzana, camote, etc. (**Figura 4.5**). Para estas trampas pueden emplearse envases plásticos, o cajas de Petri de 20 cm de diámetro.
- ▲ Colocar una capa gruesa del suelo rizosférico sobre una toalla de papel, humedecer al tacto, encima colocarle rodajas delgadas de los vegetales seleccionados, de preferencia combinados como papa y zanahoria, o papa, manzana y zanahoria previamente lavados con cloro comercial y bien enjuagados.
- ▲ Cubrir las rodajas con otra capa de suelo, humedecer y cubrir con una toalla humedecida a fin de generar oscuridad.
- ▲ Dejar las trampas cerradas y etiquetadas en un sitio oscuro y seco, cuidar que no le falte humedad durante seis o siete días (**Figura 4.6**)
- ▲ Abrir las trampas y retirar con cuidado las rodajas infestadas con hongos, colocarlas en una caja de Petri.
- ▲ Tomar muestras de los hongos infestados y colocarlos en cajas Petri con medio agar PDA como medio de cultivo a fin de iniciar el aislamiento de los diferentes hongos.
- ▲ Hacer cultivos posteriores con medios generales o selectivos según sea el interés.
- ▲ Se pueden elaborar preparaciones fijas de los hongos obtenidos directamente de las rodajas del vegetal, empleando un portaobjetos, teñirlos con azul de algodón, observarlos al microscopio con el fin de identificar los géneros de hongos.
- ▲ Se pueden cuantificar las UFC y describir las colonias crecidas en las cajas Petri con medio de cultivo PDA.
- ▲ Se realizan preparaciones con tinción de azul de algodón para determinar la riqueza genérica de los hongos del suelo.



FIGURA 4.5. Rodajas de vegetales colocados en caja Petri.

Trampas de suelo



Trampas húmedas después
de 5 días de incubación



FIGURA 4.6. Hongos del suelo creciendo en las rodajas puestas en el suelo.

LITERATURA CITADA

- Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Goulet, A., & Piché, Y. (1998). Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist*, 139(2), 375-388.
- Barea, J.M. (1998). Biología de la rizósfera. *Investigación y Ciencia* 47: 74-81.
- Farrell, R. E., Walley, F. L., Lukey, A. P., & Germida, J. J. (1993). Manual and digital line-intercept methods of measuring root length: a comparison. *Agronomy Journal*, 85(6), 1233-1237. (No esta referenciado en el texto).
- Manske, G. G. B. (1997). *Manual of methods to study wheat roots in the field: Root length density, root hairs and mycorrhizal infection* (No. CIS-2260. CIMMYT.)
- Tennant, D. (1975). A test of a modified line intersect method of estimating root length. *The Journal of Ecology*, 995-1001.

INTRODUCCIÓN

La física y la química del suelo, son disciplinas que describen tanto la composición como las propiedades del medio ambiente edáfico en el que todos los organismos del suelo y raíces de las plantas, se desarrollan y cierran o completan su ciclo de vida y han sido y son ampliamente estudiadas en diversos cursos y textos de Edafología. Sin embargo, a pesar de su importancia, los ciclos de los elementos biogénicos en los que intervienen diversos procesos bioquímicos son menos abordados como lo demuestra la menor proporción de textos de bioquímica de suelos existentes comparativamente con los publicados sobre física, química y biología del suelo.

Este capítulo tiene la finalidad de señalar la importancia de algunas de las enzimas del suelo (exoenzimas) y su participación fundamental en su fertilidad natural al contribuir con su actividad, mediante hidrólisis enzimática de la materia orgánica, a la liberación y suministro de nutrimentos (Suasteguí, 2009, Colli, 2015 y Jarosch *et al.*, 2020), aunque es importante tener presente que este proceso lo realizan fundamentalmente y de manera más común los diferentes grupos que integran el consorcio de comunidades microbianas del suelo que actúan durante la mineralización de la materia orgánica del suelo (Zak *et al.*, 2015), dado que una de sus funciones más importantes consiste en descomponer diversas tipos de materia orgánica mediante liberación de enzimas extracelulares hidrolíticas que desdoblan las grandes moléculas en compuestos minerales más simples mejorando la fertilidad del suelo. La tasa y alcance de la mineralización depende de la disponibilidad de oxígeno y agua. El metabolismo aeróbico es más versátil y más completo que el anaeróbico, se produce CO₂ y agua.

Algunas de las comunidades bacterianas y fúngicas del suelo ya han sido abordadas en capítulos anteriores de esta publicación y dado que su actividad es mensurable, esta puede evaluarse según Zak *et al.* (2015) a través de la respiración y desprendimiento de CO₂ que tienen los suelos (esterilizados, reinoculados e incubados en condiciones particulares) en este tenor, la liberación o evolución de CO₂ de los suelos se ha reconocido como un indicador importante de la fertilidad, calidad y salud del suelo por estar directamente relacionado con la cantidad y tipo de materia orgánica del suelo (Cruz *et al.*, 2017; Dasat *et al.*, 2020).

PRÁCTICA: 5.1 RESPIRACIÓN DEL SUELO (EMISIÓN DE CO₂), DETERMINACIÓN DE CARBONO EN BIOMASA MICROBIANA Y COEFICIENTE METABÓLICO

Introducción

Indisolublemente ligado a la “síntesis, transformación y asimilación” de compuestos orgánicos mediados por fotosíntesis, biosíntesis de proteínas y asimilación nutrimental autótrófica y que pasa sucesivamente a los diferentes niveles tróficos del ecosistema, se encuentra el conjunto de mecanismos bio-edáficos de descomposición microbiana y bioquímica que reincorpora los residuos vegetales y animales, mediante el ciclaje de todos los nutrimentos utilizados y depositados, como necromasa, para garantizar la perpetuidad de los sistemas biológicos en los ecosistemas (Ruyi *et al.*, 2020). En este contexto, parte del carbono utilizado en el metabolismo de los organismos en los ecosistemas es devuelto a la atmósfera en forma de CO₂ como producto de la respiración y durante la mineralización de la materia orgánica del suelo que realizan los organismos de la flora microbiana, mientras que otra gran proporción del carbono de la necromasa se orienta, en procesos de neosíntesis, al ensamblaje de moléculas libres para formar macro o gigamoléculas sumamente complejas pero muy estables gracias a su combinación con minerales del suelo (Cruz, 2006; FAO, 2017).

Bacterias, hongos, actinomicetos y algas son integrantes de la microflora edáfica que participan en la degradación de la materia orgánica (MO) del suelo y su presencia y abundancia, varían según las propiedades de los suelos en los que se encuentran y la intensidad de su actividad, es función de las condiciones edáficas de humedad, pH, temperatura y disponibilidad de nutrimentos. Un grupo microbiano importante son las algas, organismos fotoautótrofos importantes durante el proceso de colonización del material parental pues contribuyen al proceso de formación de suelo como fuente importante de MO (Rendón, 2014). En referencia a la biomasa microbiana, la de los hongos del suelo, supera ampliamente a la de las bacterias y sin embargo, son éstas últimas el grupo dominante en los procesos de degradación por su gran abundancia y diversidad (Zheng *et al.*, 2019). Si el contenido de nitrógeno es suficiente, la microbiota fúngica y bacteriana predominan en las primeras etapas de la descomposición de residuos de la necromasa, mientras que los actinomicetos expresan su actividad cuando la presión competitiva es menor y cuando los compuestos ya han sido parcialmente degradados (González-Rodríguez *et al.*, 2013).

Aunque las bacterias no tienen un hábitat específico, algunas se pueden encontrar adheridas a la superficie de las partículas de suelo como agregados o interactuando específicamente

con las raíces de las plantas (Rendón, 2014) y son partícipes importantes de la “respiración” del suelo es decir de la liberación de CO_2 . El coeficiente metabólico ($q\text{CO}_2$) o respiración específica es un indicador apropiado de la adversidad de las condiciones ambientales y por lo tanto indica la eficacia de la biomasa microbiana para utilizar el carbono disponible para la biosíntesis.

El coeficiente metabólico ($q\text{CO}_2$) se define como la tasa de respiración (medida como CO_2 desprendido) por unidad de biomasa microbiana y se puede calcular con la relación CBM/COS donde CBM es el carbono de la biomasa microbiana y COS es el carbono orgánico del suelo (Cruz y Etchevers, 2011). Este coeficiente metabólico representa un cociente de mineralización ($qm\text{C}$) que muestra qué proporción del COS se mineraliza durante el proceso de incubación y cuanto del total queda como reserva (Pinzari *et al.*, 1999).

El método de fumigación e incubación para la determinación de desprendimiento de CO_2 se basa en el principio que establece que cuando un suelo se esteriliza con cloroformo y después se reinocula con una pequeña dosis de suelo fresco, las células microbianas destruidas en la fumigación, actuarán como sustrato carbonado y durante su descomposición desprenderán, en forma de CO_2 , una proporción de sus componentes carbonados que, además, resulta razonablemente constante. Determinando el CO_2 desprendido por células microbianas añadidas al suelo en la reinoculación, en condiciones normalizadas, y utilizando un factor, se permite el cálculo de la biomasa a partir de las medidas del CO_2 desprendido (Granados, 2003).

Reactivos

1. Agua Destilada
2. Agua destilada esterilizada
3. Papel filtro
4. Cloroformo
5. KOH 0.5 N
6. HCl 0.5 N.

Procedimiento

La profundidad y el espesor de la capa de suelo donde se tomarán las submuestras y la cantidad de ellas para formar muestras compuestas representativas dependen del objetivo, características particulares de los suelos a estudiar, de la precisión deseada y de la cantidad de recursos disponibles. El autor de este capítulo recomienda para cuadrantes de 1000 m², una cantidad mínima que oscile entre 10 y 15 submuestras uniformemente repartidas y colectadas preferentemente al azar en líneas distribuidas en zig-zag.

Una forma adecuada para la colecta de muestras, una vez determinado el espesor de la capa de suelo a estudiar, es enterrar tubos de cobre o PVC con altura equivalente al espesor señalado, extraerlos con sumo cuidado y tapar posteriormente sus extremos con papel aluminio, plásticos y ligas o cinta adherente que contribuya a impedir la transpiración o que ingrese la humedad del ambiente. Las muestras se almacenan a 4 °C y se transportan a laboratorio para determinar en forma inmediata CO₂, CBM y qCO₂ o antes de una semana, si se mantienen las muestras en cuarto frío. Aún con la complicación de usar muestras frescas, se disgrega el suelo, se eliminan manualmente con uso de espátulas o sucedáneos las piedrecillas o guijarros de mayor tamaño. Posteriormente se hace pasar suelo fresco (con la humedad que presenta en campo) por una malla de 2 mm de abertura para eliminar restos orgánicos y en una muestra alterna determinar el porcentaje de humedad del suelo a estudiar.

- ▲ Separar la muestra en dos fracciones, A (suelo para fumigar) y B (suelo natural) pesando de 20 a 50 g para cada fracción y colocarlas en frascos de vidrio con tapa hermética. Hacer esto mínimamente por cuadruplicado para cada muestra de suelo.
- ▲ Se recomienda el pesado de los frascos ya con su tapa y con los 20 o 50 gramos de suelo dentro de ellos para facilitar, en las siguientes etapas del análisis, el ponerlos cerca de su capacidad de campo respecto a su contenido de agua.
- ▲ A la fracción A, se le adicionan 5 mL de cloroformo y por otro lado 5 mL de agua destilada y esterilizada a la fracción B. Se cierran y se mantienen así por 48 h.
- ▲ Pasado este tiempo o terminada la fumigación, se abren los frascos de las dos fracciones y se colocan en baño maría a 40 °C, con la finalidad de eliminar el cloroformo, lo cual puede requerir un mínimo de hasta tres horas.
- ▲ Terminada la etapa anterior, se reinoculan ambos suelos (fumigado y natural) con 1 g de suelo natural.

- ▲ Se agrega agua destilada estéril y libre de CO₂ de mililitro en mililitro hasta llevar las muestras a un punto equivalente a su capacidad de campo. Las muestras del mismo lugar, deben llevar la misma cantidad de agua.
- ▲ Se introduce en cada frasco un tubo de ensaye que contenga 7 mL de KOH 0.5 N y una tira de papel filtro procurando que la longitud de ésta sea ligeramente mayor que la del tubo.
- ▲ Colocar para corrección de la normalidad, un blanco absoluto (frasco que contenga un tubo con sólo 7 mL de KOH 0.5 N). Hacer esto mínimamente por duplicado.
- ▲ Cerrar los frascos e incubar entre 35 y 37 °C, en una estufa, por el tiempo establecido previamente por el analista (2, 5, 10 ó 20 días).
- ▲ Al término de la incubación se sacan los frascos de la estufa. Se retira cuidadosamente el tubo de ensaye y se transfiere todo su contenido en un matraz Erlenmeyer de 50 mL.
- ▲ Enjuagar el tubo con 1 mL de agua libre de CO₂ y se vierte también en el matraz de 50 mL.
- ▲ Se colocan 2 o 3 gotas de fenolftaleína como indicador y se procede a titular con HCl 0.5 N. Incluir blancos de titulación.
- ▲ Realizar los cálculos para determinar los mg de CO₂ liberados durante la incubación y de carbono en biomasa microbiana.

Cálculos

- ▲ Calcular los miliequivalentes de KOH en el blanco y en las muestras problema.

$$\text{meq KOH} = (\text{Normalidad del ácido})(\text{mL gastados en la titulación})$$

- ▲ Obtener los miliequivalentes de KOH transformados en K₂CO₃.

$$\text{meq K}_2\text{CO}_3 = (\text{meq blanco}) - (\text{meq muestra})$$

- ▲ Igualar unidades a equivalentes químicos.

$$\text{Eq K}_2\text{CO}_3 = (\text{meq K}_2\text{CO}_3 / 1000)$$

- ▲ A partir de esto, obtener gramos de K_2CO_3 formados.

$$\text{g de K}_2\text{CO}_3 = [(\text{eq K}_2\text{CO}_3)(\text{PM K}_2\text{CO}_3)] / (\# \text{ Hidrógenos sustituibles})$$

- ▲ Por estequiometría se obtienen los miligramos de CO_2 .

$$\text{mg CO}_2 = [(\text{g de K}_2\text{CO}_3) (\text{PM CO}_2) / (\text{PM K}_2\text{CO}_3)] 1000$$

- ▲ Por último obtener el peso del carbono en la biomasa microbiana (CBM).

$$\text{mg CBM} = [(\text{mg CO}_2 \text{ suelo fumigado}) - (\text{mg CO}_2 \text{ suelo natural})] / 0.45$$

NOTAS:

Tener presente que se pesaron 20 o 50 g de suelo con su contenido gravimétrico de humedad por lo que se debe hacer referencia a los mg CO_2 que se desprenderían en 1 kg de suelo y referir posteriormente a la unidad de superficie de la parcela o unidad ambiental de que se trate.

Para el cálculo del coeficiente metabólico ($q\text{CO}_2$), se requiere conocer también el contenido de COS, el cual se obtiene analíticamente de la determinación de materia orgánica del suelo, mediante la relación:

$$\text{Masa de COS} = [(\text{peso del suelo}) * (\text{proporción de C en MOS})]$$

y para determinar el $q\text{CO}_2$, se utiliza la relación:

$$q\text{CO}_2 = (\text{CBM} / \text{COS}).$$

PRÁCTICA: 5.2 ACTIVIDAD DE EXOENZIMAS DEL SUELO

Introducción

En general se sabe que toda reacción química del metabolismo celular, la realizan biocatalizadores conocidos como enzimas bajo un estricto control celular. Varios son los factores que influyen en la regulación y en la velocidad de reacción de la actividad enzimática pero destaca la concentración de las moléculas blanco (sustratos), las concentraciones de las moléculas derivadas de la propia reacción enzimática (productos), de la temperatura y del pH del medio de reacción. Durante la reacción enzimática el sustrato que será transformado, forma un complejo intermedio al unirse con una parte de la superficie de la enzima con un alto grado de especificidad para que al final de las reacciones que impulsaron, se originen los productos que la célula requiere y ocurra una liberación de las enzimas que, intactas en su estructura y función garantizan la continuidad de los procesos metabólicos al permitirle a las enzimas el “retorno” por nuevas moléculas de sustrato y así también aseguran la continuidad de la vida mientras las reacciones enzimáticas prosiguen (Lehninger, 1995; McMurry, 2008).

Lo que se ha descrito, líneas arriba ocurre al interior de las células de cualquier ser vivo y por ello ha llamado la atención de manea especial la actividad enzimática del suelo que ha sido un tema muy estudiado en los últimos años, debido a su gran importancia como indicador de la calidad y fertilidad del suelo (Burns, 1982; Colli, 2015). Una parte de los procesos por los cuales la fase orgánica del suelo se transforma en sustancias minerales simples, son catalizados por exoenzimas que fueron secretadas tanto por las raíces de las plantas como por algunos microorganismos y de la misma fauna edáfica (Herbein y Neal, 1990). La actividad enzimática en general, pero también la de exoenzimas presentes en el suelo puede alcanzar en las reacciones la velocidad necesaria para el aprovechamiento de la energía y en los suelos, la actividad de las exoenzimas está en función de diversos componentes bióticos como células latentes, restos celulares y de componentes abióticos como los ácidos fúlvicos y húmicos o minerales arcillosos. Otro tema de amplia discusión es el de la ubicación y el mantenimiento de los sitios activos de esas exoenzimas que mantienen su capacidad oxidativa/reductiva (oxidoreductasas), hidrolítica (hidrolasas), de transferencia (transaminasas) y de síntesis (ligasas), aunque su ubicación en el suelo también puede depender del tamaño y la solubilidad de su sustrato, las especies de microorganismos y la naturaleza física y química de los coloides organominerales del suelo (Burns, 1982; Tabatabai, 1994; Granados, 2003). La primera reacción enzimática consiste en formar un complejo llamado *enzima-sustrato* mediante la afinidad de la exoenzima que se acopla con una molécula específica del sustrato. Este complejo debe disociarse liberando

el producto de reacción y, la enzima libre se habilita para reaccionar nuevamente con otra molécula del mismo sustrato por lo que no cualquier sustancia, aún en cercana presencia, podrá entrar al sitio activo de la enzima (Granados, 2003; Colli, 2015).

La importancia de la actividad de las exoenzimas y la regulación de su cinética es muy grande si se considera que además de la actividad microbiana, los procesos que transforman la materia orgánica del suelo a sustancias minerales simples, son catalizados por las enzimas secretadas por las raíces de las plantas, algunos microorganismos o la fauna del suelo. Estos compuestos proteícos son catalizadores específicos que aumentan la velocidad de una reacción bioquímica aún a concentraciones extremadamente pequeñas de sustrato, aunque la cantidad transformada (producto) en la reacción es mucho mayor, realizando estos procesos en condiciones de pH, temperatura y concentración preferentes, alcanzando el equilibrio químico en poco tiempo y pudiendo en inhibirse o activarse según convenga a las condiciones más favorables de concentración de iones en la solución del suelo y de la demanda nutrimental de las plantas (Devlin y Witham, 1983; Granados, 2003).

Las enzimas del suelo más estudiadas son las oxirreductasas, transferasas, e hidrolasas. La oxirreductasa, deshidrogenasa han sido ampliamente estudiadas por tener el papel de oxidación en la materia orgánica cuando se transfiere hidrógeno de los sustratos al aceptor. La actividad de la deshidrogenasa depende del metabolismo de la población microbiana. Algunas hidrolasas y transferasas han sido extensivamente estudiadas por su importancia en la descomposición de compuestos orgánicos (mineralización), su importancia en el ciclo de nutrimentos y la formación de materia orgánica (Dick *et al.*, 1994). Estas enzimas son:

- 1) Ciclo del Carbono - Amilasa, Celulasa, Lipasa Glucosidasa e Invertasa.
- 2) Ciclo de Nitrógeno - Proteasa, Amidasa, Ureasa y Deaminasa.
- 3) Ciclo de Fósforo - Fosfatasa.
- 4) Ciclo de Azufre - Arylsulfatasa.

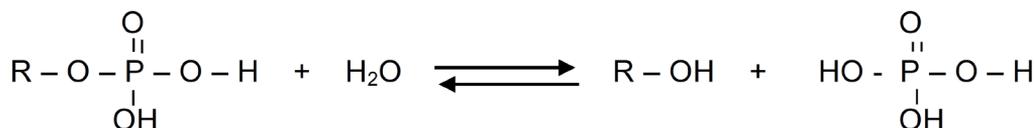
La actividad de las enzimas al catalizar las transformaciones químicas es muy considerable, ya que puede bastar una sola molécula para catalizar la reacción de varios millones de moléculas del sustrato (sustancia reaccionante) por minuto. La enzima acelera la reacción combinándose con el sustrato y disminuyendo la barrera de energía (energía de activación) que las moléculas de dicho sustrato deben superar para transformarse en el producto de la reacción (Chen, 2003; Astudillo, 2013).

PRÁCTICA: 5.2.1 ACTIVIDAD DE LAS FOSFATASAS ÁCIDAS Y ALCALINAS

El nombre general de fosfatasa ha sido usado para describir un amplio grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del P contenido en la materia orgánica, a fosfatos inorgánicos primarios como el $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$ y secundarios como el HPO_4^{2-} para que la planta los tengan disponibles. La fosfatasa ácida secretada por las plantas ante estrés por carencia de fósforo (Portilla-Cruz *et al.*, 1998), tiene gran importancia en las plantas que crecen en suelos con alto contenido de materia orgánica porque interviene en la hidrólisis de fósforo orgánico. Marschner (1995) sugiere que la actividad fosfatásica de la raíz es un factor significativo de la eficiencia nutrimental bajo un limitante suministro de P mineral.

Como otras enzimas, éstas son en gran parte, enzimas extracelulares de bajo peso molecular producidas en abundancia por bacterias gram positivas, hongos y raíces. Son con frecuencia, enzimas cuya localización extracelular puede inferirse por su función.

La ecuación química (Tabatabai, 1982) que representa la reacción realizada por la fosfatasa es:



Esta reportado que la actividad de esta enzima es más alta en la superficie de la raíz que en el volumen del suelo (Marschner, 1991) y para trigo y triticale se ha asociado con la eficiencia en adquisición de fósforo en suelos ácidos (Cruz *et al.*, 1994).

El método del p-Nitrofenilfosfato (p-NPP), consiste en evaluar, en la unidad de tiempo, la producción de p-nitrofenol (producto de la acción enzimática sobre el p-NPP) y cuantificarlo colorimétricamente mediante una curva patrón (Tabatabai, 1994).

Reactivos:

1. Tolueno
2. Buffer Universal Modificado (MUB) Solución Stock:

3. Disolver 12.1 g de TRIS hidroximetilaminometano (THAM), 11.6 g de Ácido maleíco, 14 g de Ácido cítrico y 6.3 g de Ácido bórico en 488 mL de NaOH 1N y diluir la solución a 1 L con agua desionizada. Guardar en refrigerador.
4. Buffer Universal Modificado a pH 5.5 (fosfatasa ácida) y a pH 11 (fosfatasa alcalina).
5. Tomar y colocar 200 mL de MUB (solución stock) en un vaso de precipitados introducir una barra magnética y colocar en un agitador magnético, ajustar el pH a 5.5 ó a 11 con HCl 0.1N o NaOH 0.1N para los ensayos de fosfatasa ácida o alcalina respectivamente. Verter la solución en un matraz aforado 1000 mL Guardar en refrigerador.
6. Solución de p-Nitrofenil fosfato 3 mM.
7. Para 50 mL de solución: Disolver, la cantidad apropiada de sal disódica de p-Nitrofenilfosfato tetrahidratada en 40 mL de MUB, pH 5.5 ó a 11 para ensayos de fosfatasa ácida o alcalina respectivamente, aforar la solución con MUB del mismo pH. Guardar en refrigerador.
8. Cloruro de calcio 0.5 M.
9. Disolver 73.5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en cerca de 700 mL de agua y diluir a un volumen de 1L con agua. Guardar en refrigerador.
10. Hidróxido de sodio 0.5 M
11. Disolver 20 g de NaOH en cerca de 200 mL de agua y diluir la solución a 1 L de agua. Guardar en refrigerador.
12. Solución estandar de p-Nitrofenol.

Procedimiento:

- ▲ Colocar 1 g de suelo en mortero.
- ▲ Adicionar 0.2 mL de Tolueno y 2 mL de MUB, pH 5.5 para el ensayo de las fosfatasas ácidas o de pH 11 para el ensayo de fosfatasas alcalinas.
- ▲ Agregar unos granos de arena de cuarzo y macerar hasta homogenización.

- ▲ Tomar alícuota de 0.3 mL de homogenizado y colocarla en tubos o frascos para incubación.
- ▲ Adicionar 4 mL de MUB pH 5.5 o pH 11
- ▲ Agregar 1 mL de p-Nitro-fenil-fosfato 3 mM.
- ▲ Tapar e incubar en baño maría a 37 °C durante 1 h.
- ▲ Remover el tapón y agregar 1 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 M.
- ▲ Adicionar 4 mL de NaOH 0.5 M.
- ▲ Agitar y filtrar la suspensión con papel Whatman No. 2.
- ▲ Leer a 400 nm y comparar la actividad enzimática con base en una curva de calibración que contenga 0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg de p-Nitro-fenol.

Curva de calibración

Para preparar esta curva: coloque 1 mL de la solución estándar de p-Nitrofenol en matraz volumétrico de 100 mL y después de aforar con agua, mezcle fuertemente.

De ésta última solución de p-Nitrofenol, tomar alícuotas de 0, 1, 2, 3, 4, y 5 mL.

Ajustar el volumen a 5 mL con adición de agua y proceder a incubar como cualquier otra muestra.

Agregar 1 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 M y 4 mL de NaOH 0.5 M

Aforar a 50 mL, mezclar y filtrar la suspensión resultante.

Si la intensidad del color del filtrado en las muestras excede la de los 50 mg de p-Nitrofenol; una alícuota del filtrado puede ser diluida con agua hasta que el espectrofotómetro pueda leerlos dentro de los límites de la curva de calibración.

Resultados

Considere el factor de dilución de masa, el factor de dilución de volumen y las posibles diluciones posteriores. Expresar el resultado de la actividad enzimática en las siguientes unidades:

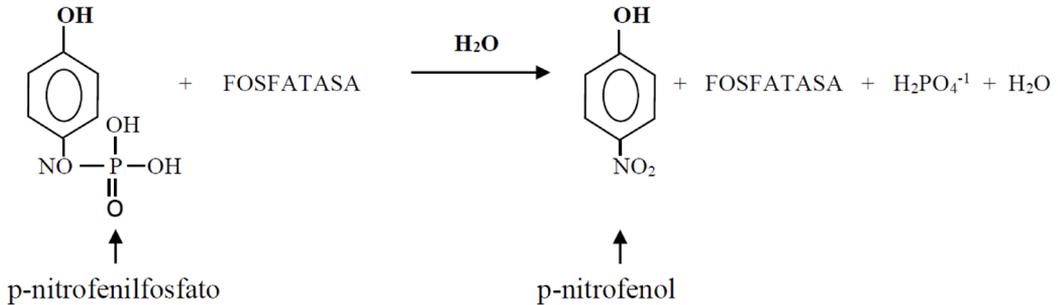
$$\mu\text{g de p-nitrofenol g}^{-1} \text{ de suelo h}^{-1}$$

PRÁCTICA: 5.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA RAÍZ

Introducción

Los ensayos de actividad fosfatasa ácida en el suelo y en la raíz de plantas superiores tienen el mismo fundamento por lo que los ensayos son similares.

La ecuación química (Tabatabai, 1982) que representa la reacción realizada por la fosfatasa es:



Al ser similar la determinación de la actividad de la fosfatasa con la radical se utilizan los mismos reactivos modificando el procedimiento para extraer de los tejidos de la raíz la enzima:

Reactivos:

1. Buffer universal modificado (MUB), pH 5.5
2. p-nitrofenilfosfato (p-NPP) 0.003 M
3. Cloruro de calcio 0.5 M
4. Suspensión de sodio 0.5 M
5. Suspensión de p-nitrofenol (p-NP) 1 g l⁻¹

Procedimiento:

- ▲ Colocar 0.1 g de materia fresca de raíz en un mortero
- ▲ Agregar 2 mL de Buffer Universal Modificado pH 5.5
- ▲ Macerar hasta homogeneizar. (Si el tejido es duro adicionar un poco de arena de cuarzo)
- ▲ Colocar 0.3 mL del homogeneizado en frasco para incubar
- ▲ Agregar 4 mL de MUB y 1 mL de p-NPP 0.003 M
- ▲ Tapar e incubar a 37 °C durante 30 minutos
- ▲ Terminado este tiempo, remover el tapón y agregar 1 mL de CaCl₂ 0.5 M y 4 mL de NaOH 0.5 M
- ▲ Agitar y filtrar la suspensión.
- ▲ Leer a 400 nm

Curva de calibración

Tomar alícuotas de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mL de la solución estándar de p-NP en matraz volumétrico de 50 mL). Ajustar el volumen a 5 mL con adición de agua incubar con las muestras

problema y proceder como con las muestras (4 mL de NaOH y 1 mL de CaCl₂) Después de esto se afora a 50 mL, se mezcla y se filtra para leer a 400 nm.

Resultados

Considere el factor de dilución de masa, el factor de incubación y las posibles diluciones posteriores. Expresar el resultado de la actividad enzimática en las siguientes unidades:

$$\mu\text{g de p-nitrofenol g}^{-1} \text{ de materia fresca h}^{-1}$$

PRACTICA: 5.4 ACTIVIDAD ARILSULFATASA DEL SUELO

Determinación de la actividad Arilsulfatasa (Tabatabai y Bremer, 1970).

El método usado para el análisis de la actividad arilsulfatasa está basado en la estimación colorimétrica del p-Nitrofenol liberado por la actividad sulfatasa cuando el suelo es incubado con p-Nitrofenil-sulfato (Tabatabai y Bremner, 1970).

Reactivos

1. Tolueno.
2. Buffer Acetato 0.5 M, pH 5.8.
3. Disolver 68 g de acetato de sodio trihidratado en 700 mL de agua, adicionar 1.70 mL de ácido acético glacial (99%), y diluir a un litro en un matraz aforado.
4. Solución de p-Nitrofenilsulfato, 0.05 M.
5. Disolver 0.614 g de potasio p-nitrofenil sulfato en 40 mL de Buffer Acetato, y diluir la solución a 50 mL con Buffer. Mantener la solución en refrigeración.
6. Cloruro de calcio (CaCl₂, 0.5 M).
7. Disolver 73.5 g de CaCl₂ · 2H₂O en 700 mL de agua y aforar a 1 L.
8. Hidroxido de sodio (NaOH), 0.5 M.
9. Disolver 20 g de NaOH en 700 mL de agua y aforar a 1 L.

Procedimiento

- ▲ Pesar 1 g de suelo y colocarlo en un tubo de ensayo.
- ▲ Se adicionan 0.25 mL de tolueno, 4 mL de Buffer acetato y 1 mL de la solución de p-nitrofenil sulfato, se agita por varios segundos y se incuba a 37 °C por 1 hora.
- ▲ Se adiciona 1 mL de CaCl_2 0.5 M y 4 mL NaOH, se agita por varios segundos y se filtra la suspensión de suelo con papel Whatman No. 2v.
- ▲ Se midió la intensidad de color a 420 nm en un espectrofotómetro.

Cálculos

Determinar la concentración de p-nitrofenol contenido en los filtrados por referencia la gráfica de calibración que contiene patrones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg de p-nitrofenol. Para preparar esta recta de calibración se diluye 1 mL de solución estándar de p-nitrofenol en 100 mL en un matraz aforado.

- ▲ Se toman muestras de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mL de esta solución y se ajustan el volumen a 5 mL añadiendo agua destilada.
- ▲ Se añade 1 mL de CaCl_2 0.5 M y 4 mL NaOH.
- ▲ Se agita y se mide la intensidad de color a 420 nm en un espectrofotómetro.
- ▲ Si la muestra excede la absorbancia del patrón de 50 mg se diluye con agua destilada hasta alcanzar valores de absorbancia dentro de la recta de calibrado.

Resultados

Considere el factor de dilución de masa, el factor de dilución de volumen y las posibles diluciones posteriores. Exprese el resultado de la actividad enzimática en las siguientes unidades:

$$\mu\text{g de p-nitrofenol g}^{-1} \text{ de suelo h}^{-1}$$

PRÁCTICA: 5.4.1 DETERMINACIÓN DE SULFATOS DEL SUELO

La determinación de sulfatos en el suelo siempre será importante para correlacionar la actividad de la arilsulfatasa, pero como los aniones fosfato del suelo, suelen tener complicaciones semejantes a los de los fosfatos por ello, en este manual, se propone una extracción de sulfatos en solución HCl 0.025 N – NH₄F 0.03 N que ha sido comúnmente utilizada en la extracción de fósforo en el método Bray I o bien si el pH del suelo fuese alcalino se recomienda hacer la extracción de los sulfatos con solución NaHCO₃ 0.5 M. pH 8.5 tal cual se hace en el método de Olsen.

A. Sulfatos extractables utilizando solución HCl (2.5 x 10⁻² N)/ NH₄F (3 x 10⁻² N)

Solución HCl 0.025 N–NH₄F 0.03 N. Disolver 1.11 g de NH₄ en 900 mL de agua destilada y agregar 2 mL de HCl concentrado. Aforar a 1 litro.

B. Sulfatos extractables utilizando solución NaHCO₃

Solución extractante de NaHCO₃ 0.5 M. pH 8.5, disolver 84 g NaHCO₃ en 500 mL de agua destilada, aforar a 1 L, ajustar el pH a 8.5.

Procedimiento

Extracción

- ▲ Pesar 1 g de suelo y se coloca en un tubo de 50 mL.
- ▲ Se le adiciona 15 mL de la solución extractante respectiva (HCl (2.5 x 10⁻² N)/ NH₄F (3 x 10⁻² N) para suelos ácidos, o bien NaHCO₃ 0.5 M. pH 8.5 para el caso de suelos alcalinos.
- ▲ Se cubren los tubos con plástico y se tapan.
- ▲ Se agitan por 5 minutos en un agitador de acción reciproca a 180 opm.
- ▲ El extracto se filtra y simultáneamente se corren blancos de reactivos.

Determinación

- ▲ Se colocan 5 mL de alícuota del extracto del suelo en un tubo Erlenmeyer.

- ▲ Agregar 0.5 mL de la solución de la goma de acacia y 1 mL de HCl 6 N.
- ▲ Agitar el contenido y agregar 0.25 g de cristales de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- ▲ Se deja reposar 1 minuto.
- ▲ Se agita el contenido del tubo hasta que se disuelvan los cristales y se lee la absorbancia a 420 nm.

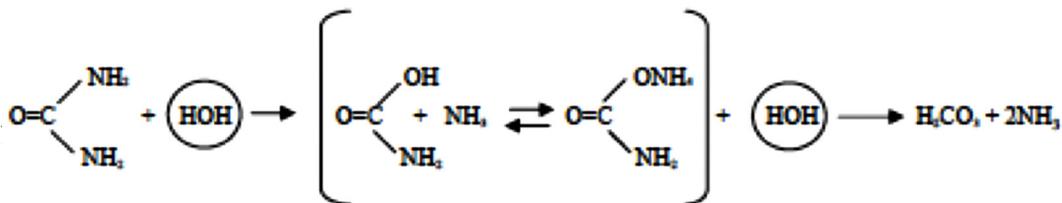
Curva patrón

Disolver 0.54 g de K_2SO_4 en agua o en solución extractora y aforar a un litro, que como resultado la solución contiene 100 ppm de SO_4^{2-} .

Se preparan concentraciones de 0, 4, 8, 12, 16 y 20 ppm de SO_4^{2-} , llevando a cabo las disoluciones correspondientes se toman 5 mL de cada una de las concentraciones en tubos y se agrega 0.5 mL de goma de acacia y 1 mL de HCl 6 N y proceder como en los problemas; leer la trasmittancia a 420 nm.

PRÁCTICA: 5.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD UREASAS DEL SUELO

Entre las diferentes enzimas que existen en el suelo están las amidohidrolasas, cuya función hidrolítica está relacionada con compuestos orgánicos de nitrógeno tanto nativo como el adicionado al suelo. Entre las amidohidrolasas, las más importantes son la L-asparaginasa, L-glutaminasa, amidasa y ureasa la cual cataliza la hidrólisis de la urea a CO_2 y NH_3 .



La mayoría de los métodos utilizados de la actividad ureasa en suelos, involucra la determinación de NH_4^+ liberado después de la incubación, en solución amortiguadora y con urea, del suelo tratado con tolueno, pero la actividad de la ureasa, también puede estimarse por liberación del CO_2 posterior a la acción hidrolítica de la enzima o bien por estimación de la urea remanente posterior a la incubación de una suspensión de suelo con tolueno y una solución de urea y así por diferencia de la urea agregada y la recuperada después de un tiempo de incubación establecido, se conoce la actividad ureasa del suelo.

El método propuesto por Tabatabai y Bremner, 1972 (citado en Tabatabai, 1994), que consiste en estimar el NH_4^+ y aún en suelos que contienen este compuesto, el método se ha utilizado con éxito.

Reactivos

1. Tolueno
2. Tris (hidroximetil) aminometano (THAM $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, $\text{PM} = 121 \text{ g mol}^{-1}$) 0.05 M, pH 9.0
3. Disolver 6.05 g de THAM en 700 mL de agua, llevar el pH de la solución a 9.0. Utilice H_2SO_4 0.2 M o NaOH 0.1 M y lleve a 1 L con agua.
4. Solución de urea (NH_2CONH_2 , $\text{PM} = 60.053 \text{ g mol}^{-1}$) 0.2 M
5. Disolver 1.2 g de urea en 80 mL de buffer THAM y diluir a 100 mL con el mismo buffer THAM (guardar en refrigerador).
6. KCl- Ag_2SO_4 solución (KCl 2.5 M-100 ppm de Ag_2SO_4). Disolver 100 mg de Ag_2SO_4 en 700 mL de agua y a esa solución agregar 187 g de KCl y aforar a 1 L con agua.
7. Reactivos para determinar N- NH_4^+ (MgO, solución de mezcla de indicadores con H_3BO_3).
8. Disolver, en un matraz de 5 L de contenido, 80 g de H_3BO_3 en cerca de 3 L de agua marcar el volumen a 4 L. Calentar y agitar vigorosamente y con velocidad hasta la disolución del ácido. Enfriar y agregar 80 mL de solución de mezcla de indicadores (99 mg de verde de bromocresol más 66 mg de rojo de metilo en 100 mL de alcohol

etílico) Agregar lentamente gotas de NaOH 0.1 N hasta que la solución tenga un color rojo púrpura pH cercano a 5.0 llevar a volumen final de 4 L con agua.

9. H_2SO_4 2.5 x 10⁻³ N. Diluir 0.07 mL de H_2SO_4 concentrado (1.84 g mol⁻¹ y 95% de pureza) con agua en un matraz erlenmeyer, cuando la reacción disminuye colocar en un matraz y aforar.

Procedimiento

- ▲ Colocar 2.5 g de suelo (tamizado < 2 mm) en tubos de ensaye de 70 mL (correr para cada suelo, una muestra blanco bajo el mismo procedimiento, sustituyendo con agua, el volumen de solución de urea).
- ▲ Agregar 0.1 mL de tolueno y 4.5 mL de Buffer THAM, agitar por unos segundos para homogeneizar.
- ▲ Agregar 0.5 mL de urea 0.2 M, agitar nuevamente para su mezcla.
- ▲ Tapar e incubar a 37° C por dos horas. Colocar aproximadamente 15 mL de KCl-Ag₂SO₄, dejar enfriar y aforar a 25 mL de volumen con esta solución. Mezclar nuevamente.
- ▲ Determinación de amonio por destilación por arrastre de vapor para determinar N-NH₄⁺ en la suspensión restante.
- ▲ Adicionar 0.1 de MgO en el bulbo de destilación.
- ▲ Tomar un volumen de 10 mL de esta suspensión y agregar al bulbo de destilación.
- ▲ El destilado recibirlo en 10 mL de H₃BO₃ con mezcla de indicadores.
- ▲ Destilar aproximadamente 4 minutos o hasta un volumen de 50 mL.
- ▲ Titular con H_2SO_4 0.0025 N

Cálculos

$$\text{meq NH}_4^+ \text{ g}^{-1}\text{h}^{-1} = (\text{V muestra} - \text{V blanco}) (\text{N ácido}) (\text{Peso muestra}) (\text{h}^{-1})$$

Donde:

V muestra: volumen en mL de H₂SO₄ gastado para titular la muestra.

V blanco: volumen en mL de H₂SO₄ gastado para titular el blanco.

N ácido: normalidad valorada del H₂SO₄

Peso de la muestra en gramos

PRÁCTICA: 5.5.1 MÉTODO DE N-TOTAL DEL SUELO CON INCLUSION DE NITRATOS

Como en el caso anterior es bueno determinar el contenido de nitrógeno y correlacionarlo con la actividad ureasa. El nitrógeno total en suelo se determina con el método citado por Bremner (1965).

Reactivos

1. Mezcla de ácido sulfúrico con ácido salicílico

Disolver 25 g de ácido salicílico (C₇H₆O₃) en 1 L de H₂SO₄ concentrado.

2. Mezcla de indicadores

Disolver 0.099 g de verde de bromocresol y 0.066 g de rojo de metilo en 100 mL de alcohol etílico a 95% (preparar en el momento de usar).

3. Ácido bórico con indicador.

Se colocan 20 g de H₃BO₃ en un vaso de precipitado de 1 L, se adicionan 900 mL de agua libre de CO₂, se calienta y se agita hasta la completa disolución del ácido. Se enfría la mezcla y se agregan 20 mL de la mezcla de indicadores. El pH de la solución debe ser aproximadamente 5.0 si fuese más ácido se agregan cuidadosamente gotas

de NaOH 0.1 N hasta que la solución adquiriera una coloración púrpura rojiza o se alcance el pH indicado. Se completa a un litro y se mezcla (si la coloración de la solución en verde antes de pH 5.0 hay que preparar nuevamente la solución).

4. Mezcla de catalizadores

Se muele en un mortero y se mezcla 250 g de K_2SO_4 , 25 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y 2.5 g de selenio metálico. La mezcla se muele hasta alcanzar textura de polvo impalpable y se homogeniza perfectamente para evitar segregación de las partículas de los componentes.

5. Hidróxido de sodio 10 N.

Se colocan 400 g de NaOH en un matraz aforado de 1L se adicionan 400 mL de agua se agita hasta que el hidróxido se disuelva y se deja enfriar. Se completa al volumen indicado y se agita vigorosamente. El hidróxido de sodio libre de CO_2 debe protegerse del CO_2 atmosférico, para lo cual debe mantenerse perfectamente tapado.

6. Ácido sulfúrico 0.05 N.

Se diluyen 1.4 mL de H_2SO_4 en agua y se enrasa a 1 L. Se estandariza con Na_2CO_3 seco.

Procedimiento

Digestión

Se pesa 0.1 g de muestra y se colocan en un matraz microkjeldahl o en tubos. Se adicionan 4 mL de la mezcla de ácido sulfúrico-salicílico, cuidando que ésta se ponga en íntimo contacto con la muestra. Simultáneamente se corren blancos de reactivos. Se deja reposar toda la noche o al menos 6 horas.

Destilación.

Se trasfiere el contenido al bulbo del aparato de destilación, se lava el tubo con pequeñas porciones de agua para obtener aproximadamente 7 mL. Se coloca en el tubo de salida del aparato de digestión del matraz Erlenmeyer de 125 mL con 10 mL de la solución de H_3BO_3 con indicador. Se destilan aproximadamente 50 mL y se lava el condensador.

El nitrógeno amoniacal se determina por titulación con ácido 0.05 N. El punto de equivalencia de la titulación ocurre cuando la solución vira de verde a rosado (titular blancos y tomar como referencia este vire).

$$N \text{ (cmol kg}^{-1}\text{)} = (V_{\text{muestra}} - V_{\text{blanco}}) (N \text{ ácido} \times 14) / \text{peso muestra} \times 10$$

Donde

V_{muestra} = volumen de H_2SO_4 para titular la muestra (mL)

V_{blanco} = volumen de H_2SO_4 para titular el blanco (mL)

N = normalidad exacta de H_2SO_4

14 = peso mili-equivalente de N (mg)

1/10 = factor para convertir a porcentaje (100/1000).

PRÁCTICA: 5.5.2 EFECTO DE ABSORCIÓN DE NITRÓGENO (N-NH_4^+ Y N-NO_3^-) SOBRE EL PH DEL SUELO

Introducción.

La variación de pH en rizósfera, es un mecanismo de tolerancia a bajas concentraciones de nutrimentos y por lo tanto la capacidad de modificar el pH está relacionada con la eficiencia mineral. El pH de una solución nutritiva, es una característica inherente a su composición, cada combinación específica de cationes y aniones, tiene su pH específico (Rijck y Schrevens, 1997).

Existen evidencias del efecto de tipo de fuente de nitrógeno sobre el pH de la rizósfera. La mayor disponibilidad de (NO_3^-) y su consecuente absorción por la planta, implica una tendencia a excretar iones hidroxilo (OH^-) o bicarbonato (HCO_3^-) con la finalidad de mantener una neutralidad eléctrica en la membrana.

Cuando la forma nitrogenada es N-NH_4 , es la que es absorbida por las plantas la tendencia es exudar hidrógeno, aunque las solución externas tengan un pH ácido. Existe otros iones en los que durante su absorción, se modifica también el pH de la rizósfera, influyendo así sobre la eficiencia mineral.

Reactivos

1. Soluciones nutritivas N-NH₄ y N-NO₃⁻
2. Material biológico vivo

Procedimiento

- ▲ Colocar, 12 o 24 hs antes del tratamiento en solución CaSO₄ 0.01 M, las plantas a estudiar.
- ▲ Aplicar un aporte nutrimental completo con el uso de soluciones nutritivas cuya composición iónica debe ser la siguiente: (NH₄)₂SO₄, K₂SO₄, MgSO₄·7H₂O y NaH₂PO₄ con 14, 5, 3 y 1.2 meq L⁻¹ respectivamente y de los micronutrientes, H₃BO₃, MnCl₂, ZnSO₄, H₂MoO₄ con 2.86, 1.81, 0.22 y 0.08 mg L⁻¹ y 2.6 ppm de Fe-EDTA, para la solución amoniacal y para la nítrica, sustituir el (NH₄)₂SO₄ por Ca(NO₃)₂.
- ▲ Medir el pH de cada solución nutritiva, al inicio del tratamiento.
- ▲ Registrar el pH de la solución nutritiva a los intervalos determinados (6 h, 12 h, 24 h, etc.).

Resultados. Registrar en el siguiente cuadro los datos obtenidos

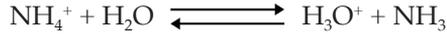
Especie/ variedad	Solución amoniacal		Solución nítrica	
	pH inicial	pH 48 h después	pH inicial	pH 48 h después
Especie 1				
Especie 2				
Especie 3				

NOTAS

Existe en las plantas una preferencial absorción de NO₃⁻, respecto a la forma amoniacal, aunque la absorción de los primeros implica un mayor costo metabólico.

En la solución amoniacal el 100 de N es amonio, Rijck y Schrevens (1997), sugieren que en una solución nutritiva no debe haber más de 10 % de N-NH₄ del total aplicado.

Si el pH de una solución nutritiva, llega a 8.0 o cerca de este valor por una alta absorción de NO₃⁻ (liberación de OH⁻), se induce un sistema “buffer” con base en NH₄⁺ y su base conjugada:



Este sistema parece ser más efectivo en los genotipos eficientes pues se asocia con los resultados obtenidos, una rápida tendencia a la neutralidad.

PRÁCTICA: 5.6 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS HÚMICOS Y FÚLVICOS

Introducción

La fracción orgánica del suelo contribuye de manera importante a liberar los nutrientes requeridos por las plantas, a retener agua y los mismos nutrientes, a dar consistencia y estructura al suelo, es fuente de energía para los microorganismos y en general es una de las propiedades “maestras” por sus múltiples beneficios para los organismos que habitan el suelo.

La materia orgánica fresca aporta una fracción lábil que se descompone en el primer año a una tasa de 1 a 3% aproximadamente pero la fracción recalcitrante dominada por ácidos fúlvicos y húmicos es resistente a la degradación microbiana en el corto plazo y permanece estable. Por ello los ácidos húmicos pueden ejercer un papel muy importante en el transporte y asimilación de nutrientes por las plantas, por su influencia en las actividades enzimáticas y mutando en su estructura, aumentando la capacidad de intercambio catiónico, su capacidad quelante en la construcción de las entidades organizadas del suelo (complejos organo-metálicos, complejos arcillo-húmicos), su color oscuro facilita un incremento térmico, incrementan la capacidad de retención de agua a baja presión de succión (Mendoza, 2014).

Los ácidos húmicos también muestran una capacidad amortiguadora que tienen interés en la regulación del pH en la globalidad del suelo y se ha aceptado que los ácidos húmicos poseen ciertas capacidades para estimular el desarrollo vertical y horizontal de las raíces y

de sus tricoblastos (pelos radiculares y todos sabemos que a mayor esfera de exploración, mejor nutrición y más producción) como posible consecuencia de efectos auxínicos conocidos y de rastros de ácido indolacético (hormona vegetal reguladora del crecimiento). Los ácidos fúlvicos por su parte generan, en las raíces, un incremento en la permeabilidad y captura de O_2 . También estimulan un mayor crecimiento longitudinal e incrementa la resistencia de las raíces frente a agresiones biológicas externas.

También induce la síntesis y actividad de enzimas que como invertasa y esterases, están involucradas en proceso de crecimiento y organogénesis en diferentes estadios de desarrollo de la planta (González, 2006).

Reactivos:

1. Solución de Pirofosfato de sodio ($Na_4O_7P_2$) 0.1 M.
2. Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M.
3. Ácido clorhídrico (HCl) 6 M.

Procedimiento:

- ▲ Secar las muestras de suelo a una temperatura de 30 °C, y tamizar con una luz de malla de 2 mm.
- ▲ Pesar 10 g de suelo y transferir a un tubo con tapa de cierre hermético, adicionar 35 mL de solución 1:1 de Hidróxido de sodio y Pirofosfato de sodio 0.1 M.
- ▲ Agitar por una hora y dejar a temperatura ambiente durante 24 horas bajo atmósfera de nitrógeno.
- ▲ Centrifugar la muestra por 30 minutos a 3000 rpm y decantar el sobrenadante (ácidos húmicos y ácidos fúlvicos) y acidificar con ácido clorhídrico 6 M hasta pH 1.
- ▲ Dejar reposar por 12 horas a temperatura ambiente.
- ▲ Centrifugar por 30 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante (ácidos fúlvicos), se coloca en cápsula de porcelana y se seca en la estufa a una temperatura de 30 a 35 °C.

- ▲ El precipitado corresponde a los ácidos húmicos, los cuales se disuelven nuevamente con 25 mL de solución de pirofosfato de sodio e hidróxido de sodio (1:1), agitar por 4 horas en atmósfera de nitrógeno.
- ▲ Acidificar nuevamente con solución de ácido clorhídrico 6 M hasta pH 1, permitiendo la coagulación de los ácidos húmicos.
- ▲ Centrifugar nuevamente por 30 minutos a 3000 rpm, eliminando el sobrenadante y lavando el precipitado con agua destilada (de 4 a 5 lavados) hasta que el contenido de cenizas sea menor al 4%.
- ▲ Secar los ácidos húmicos en la estufa a una temperatura de 30 a 35 °C.
- ▲ Almacenar en recipientes de cierre hermético.

PRÁCTICA 5.6.1. CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA DE IR

Instrumento: Espectrofotómetro en Infrarrojo con transformadas de Fourier FTIR Nexus Nicolet, acoplado a un microscopio. Los espectros pueden obtenerse en absorción y la posición de las señales se da en número de onda (cm^{-1}).

Preparación de la muestra para análisis IR.

- ▲ Pulverizar en un mortero de ágata 5 mg de la muestra con 100 mg de bromuro de potasio y triturar hasta obtener un polvo fino,
- ▲ Colocar la mezcla en una matriz de acero inoxidable y comprimir en una prensa hidráulica, para obtener una pastilla de KBr, la cual se analiza en el espectrofotómetro IR.

PRÁCTICA 5.6.2. DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN E4/E6

la relación entre absorbancias a 465 nm (E4) y 665 nm (E6), razón E4/E6 es muy útil para caracterizar a las sustancias húmicas. Un valor de E4/E6 bajo, indica alto grado de condensación en los componentes aromáticos, y por otro lado una relación E4/E6 con valor bajo es característico de un alto grado de condensación aromática e indica la presencia de proporciones relativamente altas de estructuras alifáticas. Esta relación suele tener un valor menor de cinco (3.0-5.0) en ácidos húmicos y suele ser mayor a cinco (6.0- 8.5) en los ácidos fúlvicos.

Reactivos

1. NaHCO_3 0.05 M

Procedimiento

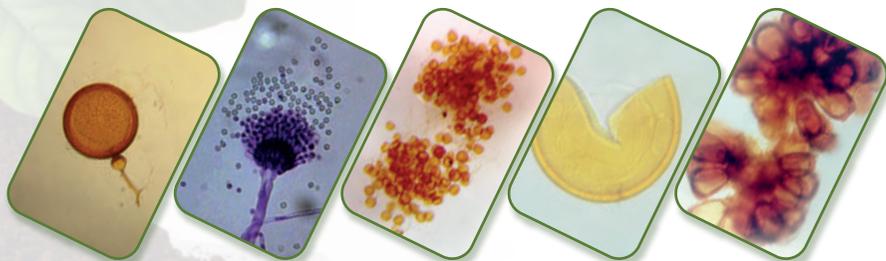
- ▲ Adicionar 10 mL de NaHCO_3 0.05 M a cada muestra y homogeneizar, las soluciones de los ácidos húmicos y fúlvicos
- ▲ Filtrar para eliminar partículas insolubles.
- ▲ Las soluciones de ácidos húmicos debido a su fuerte coloración oscura, deberán diluirse 10 veces transfiriendo un mL de la solución a un matraz aforado de 10 mL completando el volumen con una solución de NaHCO_3 0.05 M.
- ▲ Medir la absorbancia de las soluciones a una longitud de onda de 465 nm (E4) y 665 nm (E6) en un espectrofotómetro de UV/Vis.
- ▲ Calcular la relación dividiendo el valor de absorbancia medida en longitud de onda de 465 nm entre el valor dado en 665 nm.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Burns, R. G. (1982). Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil biology and biochemistry*, 14(5), 423-427.
- Chen, H. (2003). Phosphatase activity and P fractions in soils of an 18-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantation. *Forest Ecology and Management*, 178(3), 301-310.
- Colli, C. P. M. (2015). *Actividades arilsulfatasa y ureasa en la fertilidad de suelos ribereños del Parque Nacional Izta-Popo y su zona de influencia* (Tesis de Licenciatura), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México.
- Cruz-Flores. G., I. Santiago, E. A. Guerra & Pérez, Y. (2017). Compartimentación del almacenamiento de carbono orgánico en ecosistemas ribereños de alta montaña de México. En: *Estado Actual del Conocimiento del Ciclo del Carbono y sus Interacciones en México: Síntesis a 2017*. Programa Mexicano del Carbono en colaboración con el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada y la Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California. pp. 534-539.
- Cruz-Flores G. (2006). *Ecología del suelo, un enfoque hacia la nutrición mineral de plantas superiores*. México, Balzeri SA de CV, 28.
- Cruz-Flores. G., & Etchevers-Barra, J. D. (2011). Contenidos de carbono orgánico de suelos someros en pinares y abetales de áreas protegidas de México. *Agrociencia*, 45(8), 849-862.
- Rijck, G., & Schrevens, E. (1997). pH influenced by the elemental composition of nutrient solutions. *Journal of plant nutrition*, 20(7-8), 911-923.
- Devlin, R. M., & F. H. Witham. (1983). *Plant Physiology* (4th Ed.), Boston, USA: Willard Grant Press.
- González-Rodríguez, H., Ramírez-Lozano, R.G., Cantú-Silva, I., Gómez-Meza, M.V., Cotera-Correa, M., Carrillo-Parra, A. Marroquín-Castillo, J. J. (2013). Producción de hojarasca y retorno de nutrientes vía foliar en un matorral desértico microfilo en el noreste de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Ambiente* 19 (2) 249-262.
- Granados, D. M. R. (2003). *Calidad del suelo y estado nutrimental del género Pinus en la vertiente occidental del Iztaccíhuatl y Popocatepetl*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México.
- Herbein, S. A., & Neal, J. L. (1990). Phosphatase activity in arctic tundra soils disturbed by vehicles. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(6), 853-858.
- Jarosch, K. A., Kandeler, E., Frossard, E., & Bünemann, E. K. (2020). Is the enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus compounds limited by enzyme or substrate availability?. *Soil Biology and Biochemistry*, 139, 107-628.

- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants* (2nd Ed.), San Diego, CA, USA: Academic Press.
- McMurry, J. (2008). *Química Orgánica*, (7^a Ed.), México, D.F. México: Cengage Learning, 1-40.
- Mendoza, C. A., Gallardo, L. J. F., Aceñolaza, G. P., Turrion, M. B. & Pando, V. (2014). Temporal evolution of litterfall and potential bioelement return in a successional forest sequence of the Espinal Ecorregion, Argentina. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). [http:// dx.doi.org/10.5424/fs/2014233-05007](http://dx.doi.org/10.5424/fs/2014233-05007)
- Pinzari, F., Trinchera, A., Benedetti, A., & Sequi, P. (1999). Use of biochemical indices in the Mediterranean environment: comparison among soils under different forest vegetation. *Journal of Microbiological Methods*, 36(1-2), 21-28.
- Portilla-Cruz, I., Molina-Gayosso, E., Cruz-Flores, G., Ortiz-Monasterio, I., & Manske, G. G. B. (1998). *Colonización micorrízica arbuscular, actividad fosfatásica y longitud radical como respuesta a estrés de fósforo en trigo y triticale cultivados en un andisol*. Terra..
- Rendón, L.Garcia A.E. & Vergara L.T. (2014). *La Microbiota del suelo*. Obtenido de: [http:// mymbiologiadesuelos.blogspot.com/2014/08/la-microbiota-del-suelo.html](http://mymbiologiadesuelos.blogspot.com/2014/08/la-microbiota-del-suelo.html).
- Ruyi, L., Kuzyakov, Y., Liu D., Fan, J., Luo, J., Lindsey, S., ShengHe J. & Dinga W. (2020). Nutrient addition reduces carbon sequestration in a Tibetan grassland soil: Disentangling microbial and physical controls. *Soil Biology and Biochemistry*, 107764.
- Schnitzer, M. (1991). Soil organic matter—the next 75 years. *Soil science*, 151(1), 41-58.
- Suastegui, M. E. (2009). *Contribución de la actividad de la ureasa a la liberación de nitrógeno en suelos de uso agrícola y forestal* (Tesis de Licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Mexico.
- Tabatabai, M. A. (1994). Soil enzymes. In 'Methods of soil analysis. Part 2: Microbiological and biochemical properties'. (Eds RW Weaver.). Madison, WI, USA: *Soil Science Society of America*, 775–833
- Zak, D., Reuter, H., Augustin, J., Shatwell, T., Barth, M., Gelbrecht, J., & McInnes, R. J. (2015). Changes of the CO₂ and CH₄ production potential of rewetted fens in the perspective of temporal vegetation shifts. *Biogeosciences*, 12(8).
- Zheng, Q., Hu, Y., Zhang, S., Noll, L., Böckle, T., Dietrich, M., ... & Wanek, W. (2019). Soil multifunctionality is affected by the soil environment and by microbial community composition and diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, 136, 107521.

TÉCNICAS DE MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA EN EL ESTUDIO DEL SUELO Y PLANTA



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza,
Campus I. Av. Guelatao No. 66 Col. Ejército de Oriente,
Campus II. Batalla 5 de Mayo s/n Esq. Fuerte de Loreto.
Col. Ejército de Oriente.
Iztapalapa, C.P. 09230 Ciudad de México.
Campus III. Ex fábrica de San Manuel s/n,
Col. San Manuel entre Corregidora y Camino a Zautla,
San Miguel Contla, Santa Cruz Tlaxcala.

<http://www.zaragoza.unam.mx>



9786073041201