

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

Cipriano García Gutiérrez
Jaime Alberto Félix Herrán



Técnicas de caracterización de suelos y abonos orgánicos

Cipriano García Gutiérrez
Jaime Alberto Félix Herrán

Primera edición: Fundación Produce Sinaloa, A.C., 2014

D. R. © 2014 Cipriano García Gutiérrez

Jaime Alberto Félix Herrán

D. R. © 2014 Fundación Produce Sinaloa, A.C.

Gral. Juan Carrasco, núm. 787 norte, Culiacán, Sinaloa, C. P. 80000

www.fps.org.mx

direcciongeneral@fps.org.mx

Tel. (667) 7120216 y 7120246

Colección: Tecnologías para el productor

ISBN 978-607-8347-34-6

Prohibida la reproducción parcial o total de la presente publicación por cualquier medio, sin la previa autorización por escrito de los propietarios de los derechos reservados.

Editado y hecho en México

Índice

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ORGÁNICA DE SUELOS Y ABONOS ORGÁNICOS ...	9
Muestreo y análisis de suelo y abono orgánico sólido	9
Introducción.....	9
Muestreo de suelo.....	10
Propiedades físicas de suelos y abonos orgánicos sólidos.....	16
Capacidad de retención de agua (CRA)	17
Contenido de humedad	18
Textura del suelo	19
Propiedades químicas de suelos y abonos orgánicos sólidos.....	23
Conductividad eléctrica	25
Nitrógeno inorgánico (Kjeldahl).....	26
NaOH 50%.....	27
H ₃ BO ₃ 40%	27
H ₂ SO ₄ 0.05 N	27
22Fósforo extraíble método Olsen	29
NaOH 1 M.....	30
NaHCO ₃ 0.5 M	30
Fósforo extraíble método Bray y Kurtz.....	33
Capacidad de intercambio catiónico (CIC) y cationes intercambiables (K ⁺ , Na ⁺ , Mg ⁺² y Ca ⁺²)	37
Contenido de materia orgánica.....	37
Relación C/N y % de S	48
Medición de la tasa de respiración de la biomasa microbiana.....	51
en suelos y abonos orgánicos sólidos	58
Determinación del CH₄ y N₂O liberados por la microflora del suelo y la degradación aerobia de la materia orgánica	61
Introducción.....	
Bibliografía	65
MICROBIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE SUELOS Y ABONOS ORGÁNICOS.....	71
Análisis de la biomasa microbiana de suelos y abonos orgánicos sólidos	71
Biomasa microbiana del suelo.....	71
Carbono de la biomasa microbiana del suelo y de un abono orgánico por el método de Fumigación-incubación	72

Carbono de la biomasa microbiana del suelo y de un abono orgánico por el método de fumigación-extracción	78
Cuantificación de nitrógeno inorgánico (NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+)	82
Determinación de la actividad de la deshidrogenasa.....	92

Evaluación de microorganismos cultivables de suelos y abonos

orgánicos sólidos	92
Evaluación microbiológica	92
Método común de siembra microbiológica.....	93
Agar nutritivo	96
Agar Soya Trypticasa (Martin, 1975).....	96
Leche peptonada	97
Agar cuenta en placa.....	97
Tinción Gram	98
Medio Czapeck Dox	99
Medio caseína agar.....	99
Agar de almidón y caseína.....	99
Medio Martin.....	100
Agar Czapek propionato de sodio.....	102
Agar Glucosa Peptona Extracto de Levadura.....	103
Medio de Lipomyces	103
Medio mínimo.....	104
Medio Ramos Callao.....	105
Medio Watanabe	106
Indicador azul de bromotimol al 1%.....	107
Medio Selectivo Hagedorn y Holt	107
Medio Halófilo	108
Ensayo in vitro de actividad supresiva contra fitopatógenos	
Efecto del abono orgánico sólido sobre <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	110
Hongos micorrízico-arbusculares.....	111
Clarificación-tinción de raíces y estimación de la colonización radical por hongos micorrízico-arbusculares.....	113
Clarificación-tinción	114
Estimación de la colonización	117
Determinación de la proteína inmunoreactiva (Glomalina) por ELISA.....	119
Técnicas de biología molecular	123
Extracción de DNA total de suelo.....	123
Purificación del DNA total de suelo por electroforesis en gel de agarosa.....	125
Extracción de RNA de suelo.....	127
Amplificación del DNA por reacción en cadena de la polimerasa	128

Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPDs).....	130
Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.....	132
Análisis de diversidad genética de la comunidad microbiana en suelo por electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante PCR-DGGE.....	134
Bibliografía	139

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ORGÁNICA DE SUELOS Y ABONOS ORGÁNICOS

Jaime Alberto Félix Herrán¹
Cipriano García Gutierréz²
Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez³

Muestreo y análisis de suelo y abono orgánico sólido

INTRODUCCIÓN

La interpretación de los resultados obtenidos del análisis de muestras de suelo o abonos es más completa cuando cuenta con información del sitio de muestreo: topografía, tamaño y tipo de partícula, cobertura vegetal, productividad, material parental y análisis químicos previos, así como antecedentes sobre el manejo del sitio, presencia animal, temperatura media, precipitación pluvial, materia orgánica, pH del suelo, entre otras.

El muestreo de suelos y abonos orgánicos sólidos tiene como objetivo obtener una muestra representativa cuya composición puede usarse para caracterizar un sitio con respecto a la variable medida que pueda ser tratada estadísticamente.

Mediante este proceso la heterogeneidad de estos parámetros del suelo pueden ser estimados en su valor promedio, colectando un determinado número de muestras simples o submuestras para obtener una muestra compuesta.

1 Profesor de los programas educativos de Ingeniería Forestal e Ingeniería en Desarrollo Sustentable de la Universidad Autónoma Indígena de México. Benito Juárez No. 39, Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. C. P. 81890. E-mail: jfelixherran@yahoo.com.mx

2 Profesor investigador del departamento de biotecnología agrícola CIIDIR (COFAA) IPN Unidad Sinaloa. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Guasave, Sinaloa. C.P. 81049, E-mail: cgarcia@ipn.mx

3 Profesor investigador del departamento de biotecnología agrícola CIIDIR (COFAA) IPN Unidad Sinaloa. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Guasave, Sinaloa. C.P. 81049, E-mail: aarmenta@ipn.mx

Para muestras de suelo que serán utilizadas para análisis químicos se recomienda que se congelen o sequen lo antes posible. Para análisis microbiológicos se recomienda analizar la muestra lo más pronto posible, o bien se pueden almacenar las muestras de suelo húmedo a temperatura ambiente o a 4 °C cuando no se puede analizar inmediatamente.

MUESTREO DE SUELO

El análisis de suelo con fines de fertilidad inicia con la toma de muestra, la cual debe ser representativa del suelo en estudio. Si la muestra no es representativa de lo que hay en el campo, los resultados carecerán de importancia. El mayor riesgo de error en el análisis de suelo está en la toma de la muestra, por lo que es necesario tomar en cuenta los siguientes aspectos:

Época de muestreo

La época de muestreo y la mejor fecha para la toma de muestra es después de cosechar y antes del siguiente ciclo agrícola.

10

Para realizar el muestreo se requieren los siguientes materiales:

- Una barrena de cilindro cerrado o pala recta. La herramienta debe garantizar que la muestra obtenida tenga el mismo volumen en espesor y profundidad, de un tamaño suficiente que facilite y permita la formación de las muestras compuestas, que sea fácil de limpiar, resistente al desgaste, útil en suelos arenosos secos y en arcillosos húmedos, y que no contamine las muestras con impurezas.
- La barrena debe ser fácil de manejar y permitir rapidez en el muestreo.
- Bolsas de plástico transparente con capacidad para 2 kg de suelo.
- Marcadores de tinta indeleble.
- Libreta de notas y bolígrafo.
- Plano, mapa o fotografía aérea de la zona de muestreo.

Delimitación de área

Es necesario evitar el exceso de superficie en la unidad de muestreo. Algunos estudios indican que dependiendo de su homogeneidad no debería ser de más de 20 ha. Incluso en suelos considerados relativamente homogéneos es recomendable disminuir a 10 ha la unidad de muestreo.

En general se puede decir que mientras mayor superficie considere la unidad de muestreo, menor será la representatividad del análisis de suelos.

Antes de iniciar el muestreo es importante: dividir el terreno, cuando sea necesario por su diferencia en contenido de sales, cultivo anterior, manejo, pendiente drenaje, color, textura, entre otros, se deben omitir pequeñas áreas no representativas que antes de ser terreno de cultivo tuvieron otro uso como corrales, basureros y construcciones.

Para la toma de muestra en el campo se indican las siguientes instrucciones:

a) En una hoja trazar un plano de terreno y colindancias, con el fin de saber exactamente la localización del área muestreada.

b) Localizar y situar los puntos de muestreo del terreno en el interior del plano previamente trazado. Esto es para que la persona pueda localizar y efectuar las indicaciones que en el laboratorio se le recomiendan para cada muestra.

Toma de submuestras

Las técnicas aprobadas para tomar muestras representativas de un área son varias y el uso de una técnica o de otra dependerá del criterio de la persona que realice dicho muestreo, las técnicas más usuales son: muestreo en zig-zag y muestreo en esquinas y el centro. Este tipo de muestreo se realiza solo en terrenos homogéneos se recomienda tomar un mínimo de veinte submuestras por muestra de suelo en 10 ha.

Para muestrear el terreno en caso de haber muchos residuos orgánicos, se limpia la superficie con la pala para retirar estos residuos y con ello evitar errores en las determinaciones químicas.

En cuanto al procedimiento de muestreo es recomendable no tomar muestras cercanas a las orillas del predio donde suele haber exceso o falta de fertilización, debido a las vueltas y operación de la maquinaria en tales sitios.

Se recomienda retirarse de las orillas del predio al menos 20 m, así como de árboles, cercos o sitios inusuales. Las submuestras normalmente se colocan en una cubeta de plástico marcada con la profundidad de muestreo, cuando se toman muestras de más de un estrato.

Profundidad de muestreo

a) La profundidad del muestreo se determina en función del objetivo que se persigue.

b) Cuando el muestreo es para evaluar la fertilidad de los suelos se puede hacer a la profundidad de máxima exploración radical del cultivo en. Sin embargo, en la mayoría de los cultivos anuales se recomienda realizarlo a una profundidad entre 0–20 o 0–30 cm.

c) En el muestreo de suelos con pastos o prados se sugiere hacer un muestreo a una profundidad entre 5–10 cm.

d) En frutales la recomendación es hacer un muestreo a intervalos de 30 cm hasta el sitio de máxima densidad de raíces.

e) En el caso de suelos con sales, el muestreo se realiza a la profundidad donde germina la semilla, que es entre 0 y 5 cm.

f) Para determinar la actividad microbiana del suelo, el muestreo se realiza en los primeros 10 cm.

g) Es importante señalar que las profundidades a las que se ha hecho referencia, comienzan a contar después de haber removido los residuos orgánicos no descompuestos.

12

Es importante la profundidad de muestreo deba contemplar todo el perfil de suelo señalado, debido a que las propiedades de los suelos cambian considerablemente a pequeñas profundidades.

Muestra compuesta

a) La homogeneización de las submuestras debe realizarse dentro de una cubeta o tina de plástico con capacidad para 30 kg de suelo, evitando la contaminación con otros materiales.

b) El mezclado dentro de la cubeta o tina de plástico se realiza con una pala de aluminio o de acero inoxidable, generalmente es suficiente mezclar con las manos.

c) Después del mezclado de las muestras, estas se vacían sobre una superficie limpia y se forma una torta circular, la cual se divide en cuatro partes iguales, de las cuales se desechan dos cuartos opuestos y con los dos restantes se repite el proceso de mezclado.

d) Repetir el proceso tantas veces como sea necesario, hasta que la muestra final tenga un peso de 1.5 kg.

e) La homogeneización de las submuestras puede realizarse en campo cuando se tienen muchas submuestras, o en el laboratorio si la cantidad de submuestras es pequeña.

Información del análisis

Debe incluir:

- 1.Nombre del productor o interesado.
- 2.Lugar donde fue colectada la muestra (poblado más cercano), si fuera posible sobre un plano o mapa referenciado.
- 3.Nombre del cultivo anterior y cultivo a establecer y el motivo del muestreo.
- 4.Fecha de colecta de la prueba.
- 5.Fuente de agua y fertilización anterior.

Comentarios

1.Es importante conocer más acerca de la historia del terreno a muestrear y del cultivo, datos como fórmula de fertilización edáfica o foliar, dosis aplicadas, época de aplicación, manejo en general del suelo y del cultivo, rendimientos promedios del cultivo y características climáticas y de relieve de la región. Cuando esta información se obtiene previa al muestreo, es de gran utilidad para definir las unidades de muestreo.

2.Se debe cuidar que los materiales y herramientas utilizados en el muestreo no adicionen sustancias o elementos extraños que puedan aumentar la concentración de algún nutrimento en la muestra o que los sustraigan.

13

Preparación de muestras de suelo para su análisis

PRINCIPIO Y APLICACIÓN

Este método de preparación de muestras de suelo tiene el propósito de caracterizarlo y/o almacenarlo para su análisis posterior. Una vez obtenida la muestra de suelo debe ser llevada al laboratorio en donde deberá ser preparada, para luego someterla a los procesos de análisis correspondientes.

La preparación de la muestra es tan importante como el muestreo y análisis de la misma, ya que los errores cometidos pueden invalidar el resultado del análisis químico. La preparación de la muestra de suelo incluye el traslado, recepción, registro, secado, molienda, tamizado, homogeneizado, y el almacenamiento para su conservación. Con el propósito de evitar la contaminación de la muestra de suelo y asegurar mayor precisión y exactitud en el resultado del análisis, esta operación se debe realizar en un lugar especial y limpio.

MATERIALES

- Etiquetas
- Hojas de plástico de 40 x 70 cm
- Mazo de madera
- Cilindro de madera
- Libreta de registro
- Tamices de acero inoxidable de malla <2 mm
- Frascos de vidrio de 1 L (Litro) o cajas de cartón de 2 kg de capacidad

PROCEDIMIENTO

Traslado de la muestra al laboratorio

a. Una vez obtenida la muestra en el campo, esta debe ser cuidadosamente mezclada y las partículas más grandes reducidas de tamaño.

b. Cada muestra debe ir acompañada de una identificación donde se indique claramente su procedencia, nombre del interesado, profundidad de colecta, relieve, cultivo, historial de fertilización, aplicación de mejoradores, así como las determinaciones requeridas, según el propósito del estudio.

c. Durante el traslado es necesario evitar el efecto de factores como la humedad exterior, O₂, CO₂, luz, calor y otros materiales que puedan cambiar la naturaleza de la muestra.

d. Se debe evitar manejar la muestra con materiales que puedan contaminarla, por ejemplo recipientes que se oxiden y cintas adhesivas, entre otros.

Recepción y registro

a. Cuando llegan las muestras al laboratorio deberán registrarse con la identificación de campo y una lista de las determinaciones requeridas, incluyendo los métodos.

b. La identificación de campo de la muestra debe incluir los siguientes datos: nombre del interesado, procedencia, fecha del muestreo, número de muestras o submuestras, profundidad de colecta, pendiente del terreno, manejo del terreno, entre otros.

c. El laboratorio asignará un número de registro a cada muestra, el cual se sugiere hacer con números seriados para facilitar el manejo interno.

Secado

a.El secado se realiza con el propósito de facilitar el manejo de la muestra, mejorar la homogeneización y disminuir los cambios químicos indeseables.

b.Las muestras de suelo se secarán al ambiente.

c.El secado debe realizarse extendiendo la muestra de suelo sobre una superficie que no contamine. Puede secarse sobre charolas de plástico, vidrio, aluminio, fibra de vidrio o sobre una superficie de polietileno o papel.

d.La muestra debe extenderse logrando un espesor inferior a 2.5 cm, colocarse a la sombra a una temperatura no mayor a 35 °C y una humedad relativa entre 30 y 70%.

Molienda

a.Para realizar la molienda deben retirarse, las rocas y el material orgánico visible.

b.La molienda se realiza con un mazo de madera o con un molino para suelos.

15

Tamizado

a.El suelo molido se hace pasar por un tamiz con aberturas de 2 mm de diámetro (malla 10) de acero inoxidable. Este grado de fineza es conveniente para la mayoría de los análisis requeridos con el propósito de diagnosticar el estado del suelo.

b.Una vez tamizado el material se separan 1.5 kg de suelo, cantidad suficiente para realizar las determinaciones químicas y físicas que permitirán caracterizar el suelo desde el punto de vista de su fertilidad.

Homogeneizado

a.Este paso es necesario para evitar sesgo en la selección de la submuestra que va a ser destinada para las determinaciones analíticas.

b.El homogeneizado puede lograrse utilizando bolsas de plástico (pueden ser las mismas donde estaban originalmente las muestras), haciendo girar la muestra en todas direcciones.

Pesaje

a.Una vez tamizada y homogeneizada la muestra de suelo, se extrae la submuestra que va a ser utilizada para cada una de las

determinaciones analíticas.

b. Esto debe realizarse con espátulas y con la ayuda de pinceles de pelo de camello para limpiar completamente la espátula.

c. La submuestra extraída debe ser pesada con balanza de precisión, de preferencia con aproximación de $\pm 0.1\%$.

Almacenamiento

a. Una vez que las determinaciones analíticas han sido realizadas, las muestras deben almacenarse para posteriores comprobaciones u otros usos. Para esto pueden ser utilizados los frascos de vidrio o de plástico perfectamente cerrados, para disminuir los cambios químicos.

b. Los recipientes deben permanecer herméticamente cerrados y debidamente etiquetados. Para esto se recomienda conservar el número de registro en el laboratorio.

c. La muestra almacenada puede sufrir cambios lo cual debe tomarse en cuenta para usos posteriores. En todo caso, es conveniente especificar si los resultados analíticos provienen de muestras recientes o con cierto tiempo de almacenamiento.

16

Propiedades físicas de suelos y abonos orgánicos sólidos

Las propiedades físicas del suelo, determinan principalmente la rigidez, la permeabilidad, la facilidad de penetración de las raíces, retención de humedad y resistencia al laboreo.

Es necesario conocer las propiedades físicas del suelo para entender como influyen estas en el desarrollo de las plantas, y estas propiedades están estrechamente relacionadas con las propiedades químicas y las biológicas, aunque las propiedades físicas pueden contribuir a compensar las propiedades químicas o biológicas deficientes, la productividad del suelo no depende solamente de las características físicas.

Las propiedades físicas de un suelo se alteran con menor facilidad durante el manejo del mismo que sus propiedades químicas. Sin embargo, la estructura y porosidad del suelo pueden alterarse en determinadas condiciones de manejo.

En los suelos inundados, el agricultor puede provocar cambios en propiedades indirectas como son la humedad, la aireación y la temperatura del suelo. El drenaje también puede aumentar la profundidad efectiva del arraigo radical.

A menudo se utilizan técnicas de labranza como el arado

profundo, para fracturar las capas más resistentes a fin de mejorar las condiciones para el desarrollo de las raíces, pero no es fácil cambiar características físicas como la textura, el color y las relacionadas con las características del perfil.

CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)

La determinación de la capacidad de retención de agua (CRA) es un modelo de base física ampliamente utilizado por los investigadores, ingenieros y técnicos para estimar la disponibilidad de agua para las plantas y la calidad del suelo.

Materiales y métodos

- Frasco de vidrio de 250 mL
- Estufa con circulación forzada de aire y temperatura controlada
- Balanza con aproximación de 0.01 g
- Pinzas
- Desecador
- Piseta
- Papel filtro
- Embudo

Procedimiento

Para determinar la CRA de un suelo o abono orgánico sólido, la cantidad de agua retenida por unidad de suelo seco, se puede seguir el siguiente procedimiento.

1. Pesar 10 g de muestra por triplicado y secarlo a 105 °C durante 48 h (horas).

2. Se deja enfriar y se pesa nuevamente (A). La diferencia de peso entre peso inicial y peso seco nos indica la humedad relativa de la muestra.

3. Por otro lado, se corta un papel filtro el cual se coloca en un embudo. Se humedece el papel y se pesa el embudo con el papel (B).

4. Posteriormente se pone la muestra sobre el papel filtro humedecido.

5. Por último se agrega agua lentamente para saturar la muestra y el excedente de agua se drena.

6. Una vez drenada el agua se pesa nuevamente la muestra húmeda más el papel y embudo (C).

7. La fórmula para el cálculo de la CRA (en % p/p) es:

$$\text{CRA}(\%) = \frac{(C - B) - A}{10 \text{ g}} (100)$$

A= peso seco

B= peso del embudo + papel filtro húmedo

C= peso embudo + papel filtro + muestra húmeda

Interpretación de resultados

La CRA de un suelo o abono orgánico sólido indica la capacidad que tiene de retener agua, a lo que también se le conoce como capacidad de campo, estando relacionada con el contenido de humedad del mismo. Es recomendable que sea alta, para que pueda ser reservorio de agua para la planta y funciones metabólicas de los microorganismos nativos.

La CRA es importante cuando se va a establecer un experimento, por ejemplo en la determinación de la tasa de respiración de un suelo o abono orgánico sólido, y también en la determinación de biomasa microbiana del suelo.

18

CONTENIDO DE HUMEDAD

El método gravimétrico para la determinación de humedad de los suelos, sean estos orgánicos o minerales. El método se basa en la medición o determinación de la cantidad de agua expresada en g (gramos) que contiene una muestra de suelo. Esta masa de agua se referencia de la masa de suelo seco de la muestra. La determinación de la masa de agua se realiza por la diferencia en peso entre la masa de suelo húmedo y la masa de suelo seco. Se considera como suelo seco al secado en la estufa a 105 °C, hasta obtener un peso constante.

Materiales y métodos

- Botes de aluminio para humedad
- Estufa con circulación forzada de aire y temperatura controlada
- Balanza con aproximación de 0.01 g
- Pinzas
- Desecador

Procedimiento

Para determinar el contenido de humedad de un suelo o abono orgánico sólido, o cantidad de agua presente por unidad de suelo seco, se sigue el siguiente procedimiento:

1. Para determinar el contenido de agua expresado como porcentaje de humedad. Se pesan 20 g de la muestra (P_{sh}) en un bote de aluminio de peso conocido (P_B).

2. La muestra en el bote se coloca en un horno a 105 °C por 24 h.

3. Los botes se dejan enfriar en un desecador, registrando el peso ($P_B + P_{ss}$).

4. Para calcular el contenido de humedad (% p/p) en relación a suelo seco se usa la siguiente fórmula:

$$\% H = \frac{(P_B + P_{sh}) - (P_B + P_{ss})}{(P_B + P_{ss}) - (P_B)} (100)$$

P_B = Peso del bote con tapa (g).

P_{sh} = Peso de la muestra húmeda (g).

P_{ss} = Peso de la muestra seca (g).

19

TEXTURA DEL SUELO

La textura del suelo se define como la proporción relativa de arena, limo y arcilla presente en una muestra. Da una idea general de las propiedades físicas del suelo. Su determinación es rápida y aproximada.

En general el problema más común es separar los agregados y analizar solo las partículas. En el presente método se elimina la agregación debida a la materia orgánica y la floculación por los cationes calcio y magnesio.

No se eliminan otros cementantes como carbonatos. El tiempo de lectura es de 40 s (segundos) para la separación de partículas mayores de 0.05 mm (arena) y de 2 h para partículas de diámetro mayores de 0.002 mm (limo y arena).

Estos límites han sido establecidos por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) y se han usado para construir el triángulo de texturas. A continuación se detalla el método para la determinación de la textura del suelo por el procedimiento de Bouyoucos.

Materiales y métodos

- Hidrómetro de Bouyoucos con escala de 0–60
- Probetas de 1000 mL
- Cilindro de Bouyoucos
- Agitador con motor para dispersión
- Agitador magnético
- Termómetro de -10–110 °C
- Piseta

Reactivos

AGUA OXIGENADA AL 30%

Tomar 208.3 mL de peróxido de hidrógeno o si es sólido pesar 300 g de peróxido de hidrógeno y aforar a 1 L (Litro) con agua destilada. Este reactivo se utiliza cuando la muestra de suelo presenta alto contenido de materia orgánica.

20

Pueden utilizarse cualquiera de los siguientes dispersantes de suelo

OXALATO DE SODIO SATURADO

Disolver 30 g de oxalato de sodio en 1 L de agua destilada.

METASILICATO DE SODIO CON 36 G/L DE LECTURA CON EL HIDRÓMETRO

Disolver 50 g de metasilicato de sodio en 1 L de agua destilada, ajustar la solución hasta que se obtenga una lectura de 36 g/cm³ con el hidrómetro.

HEXAMETAFOSFATO DE SODIO (CALGÓN)

Disolver 50 g de (Na₃PO₃)₆ en agua destilada y aforar a 1 L.

Procedimiento

1. Pesar 60 g de suelo de aspecto fino o 120 g de suelo de aspecto grueso en un vaso de precipitados de 500 mL, agregar 40 mL de agua oxigenada y dejar que se evapore hasta sequedad, agregar otros 40 mL y observar la reacción. Evaporar nuevamente a sequedad. Repetir hasta que no haya efervescencia al agua oxigenada.

2. En general dos veces son suficientes para la mayoría de los suelos. Después de eliminar la materia orgánica y llevar a sequedad del suelo, pesar 50 g si es suelo de textura arcillosa o 100 g si es suelo de textura arenosa y ponerlos en un vaso de precipitado de 250 mL.

Adicionar agua destilada hasta cubrir la superficie con una lámina de 2 cm. Agregar 5 mL de oxalato de sodio y 5 mL de metasilicato de sodio y dejar reposar durante 15 min. Si el suelo tiene mucha arcilla puede prolongarse el tiempo hasta 30 min.

3. Pasar las muestras de los vasos de precipitado al recipiente del agitador mecánico, pasando todo el material con la ayuda de una piseta. Activar el agitador a velocidad alta y dispersar por 5 min. Al finalizar el tiempo de agitación, bajar la copa del dispersor y pasar el contenido a una probeta de 1000 mL o al cilindro de Bouyoucos, enjuagando la copa con una Piseta.

4. Con el hidrómetro dentro de la suspensión, agregar agua destilada hasta completar 1 L en el caso de la probeta y si utiliza el cilindro de Bouyoucos llevar a la marca inferior (1113 mL). Sacar el hidrómetro y suspender el suelo con un agitador de mano operando durante un minuto.

5. Tomar las lecturas del hidrómetro a los 40 s (segundos) y después de 2 h de terminada la dispersión con el agitador de mano.

6. Para hacer una lectura, colocar el hidrómetro dentro de la probeta 20 s antes del momento de la determinación, cuidando de alterar lo menos posible la suspensión. Después de hacer la lectura se saca el hidrómetro, se lava, se seca y se toma la temperatura. Si, por alguna razón al hacer la lectura se acumula espuma alrededor del hidrómetro, agregar unas gotas de alcohol etílico al 97%.

21

Cálculos

Corregir las lecturas del hidrómetro agregando 0.36 por cada °C arriba de 19.5 °C restando la misma cantidad por cada °C debajo de dicha temperatura (Cuadro 1). Si la muestra de suelo es de 50 g, la lectura a los 40 s, multiplicada por 2, es igual al % de arcilla más limo. Restando del 100% se obtiene el % de arena. La lectura obtenida a las 2 h multiplicada por 2 es igual al % de arcilla. El % de limo se obtiene por diferencia. Cuando se usan 100 g de muestra no debe multiplicarse por 2, ya que el hidrómetro está calibrado considerando 100 g de suelo. Con los % de limo, arena y arcilla se determina la textura correspondiente con el triángulo de texturas (Figura 1).

Cuadro 1. Corrección de lectura del hidrómetro para la determinación de textura de suelos.

Temp. °C	Corrección	Temp. °C	Corrección
15.0	- 1.62	21.5	+ 0.18
15.5	- 1.44	22.0	+ 0.90
16.0	- 1.26	22.5	+ 1.08
16.5	- 1.08	23.0	+ 1.26
17.0	- 0.90	23.5	+ 1.44
17.5	- 0.72	24.0	+ 1.62
18.0	- 0.54	24.5	+ 1.80
18.5	- 0.36	25.0	+ 1.98
19.0	- 0.18	25.5	+ 2.15
19.5	0	26.0	+ 2.34
20.0	0.18	26.5	+ 2.52
20.5	0.36	27.0	+ 2.70
21.0	0.54	27.5	+ 2.858
		28.0	+ 3.06

22

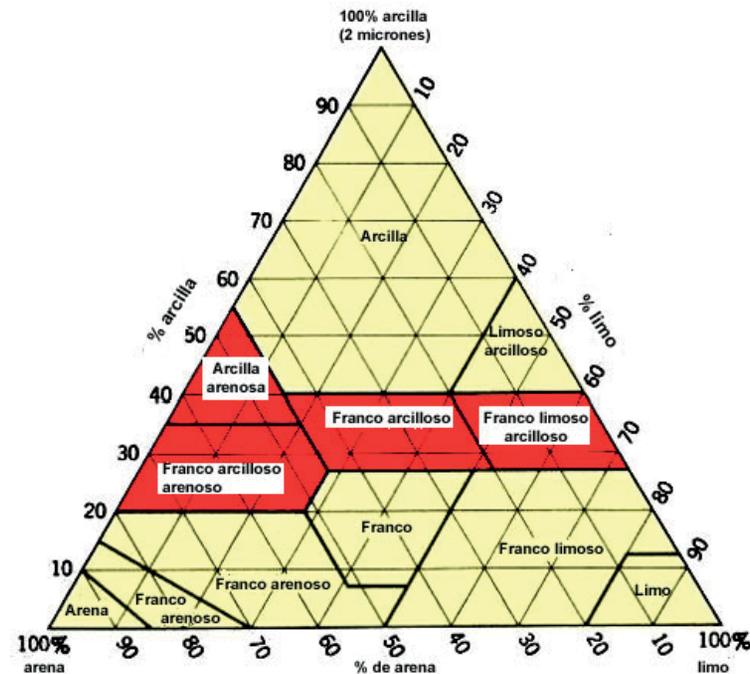


Figura 1. Triángulo de texturas.

Propiedades químicas de suelos y abonos orgánicos sólidos

El suelo es una estructura dinámica formada por materiales orgánicos y minerales que se encuentra en constante cambio por los procesos físicos, químicos y biológicos que en él ocurren.

La química del suelo es una de las ramas que estudia las condiciones químicas o bioquímicas por ejemplo los procesos de adsorción, intercambio iónico y quelación, al igual que el estudio de la estructura, composición y funciones del humus (materia orgánica humificada) que están relacionadas con el crecimiento de las plantas.

El estudio de las fracciones coloidales, inorgánicas, orgánicas o mixtas. Los procesos químicos dirigidos a modificar las condiciones naturales de los suelos para lograr una mayor producción vegetal, y en los que están involucrados aspectos como el pH y la fertilización.

El conocimiento de la dinámica química de los elementos esenciales para las plantas y sus interrelaciones. Los procesos químicos y biológicos que se desarrollan en el suelo, son aspectos en cuyo conjunto pueden incluirse derivaciones de importancia para el estudio del mismo.

En esta sección se explicará la metodología para las siguientes determinaciones: pH, nitrógeno inorgánico por el método Kjeldahl, fósforo extraíble por el método Olsen, fósforo extraíble por el método Bray y Kurtz modificado, y la capacidad de intercambio catiónico.

pH

La acidez afecta la disponibilidad de nutrientes en el suelo dependiendo del tipo de microorganismos que habitan en los sustratos. Si el pH es alto (de neutro a alcalino, entre 7 y 8) y el contenido de nitrógeno es alto (relación C/N baja entre 10 y 15) las bacterias y actinomicetos tendrán un desarrollo más favorable; y para los hongos es favorable el pH bajo (entre 5 y 6) y bajo contenido de nitrógeno (alta relación C/N más de 50). Muchos nutrientes tienden a ser menos disponibles a pH de 7.5–8.0, ejemplos de esto son Fe^{++} , Mn^{++} y Zn^{++} , por el contrario la disponibilidad de molibdeno es mayor a pH alcalino, el fósforo no es soluble en el suelo, pero a pH 6.5 su disponibilidad es alta.

Esta medición se basa en la determinación de la actividad del ión H^+ mediante el uso de un electrodo cuya membrana es sensitiva al pH. En el caso de los suelos y composts el pH se mide de la suspensión sobrenadante de una mezcla de relación muestra: agua (1:2).

Materiales y métodos

Los reactivos utilizados en esta determinación deben ser grado analítico y el agua utilizada en la precipitación de las soluciones debe ser destilada o desionizada.

- Agua destilada
- Soluciones reguladoras de referencia, pH 4.00, 7.00 y 10.00, las cuales se adquieren preparadas o concentradas para diluirse de acuerdo a la instrucción. Estas soluciones deben estar a temperatura ambiente al momento de calibrar el medidor de pH.
- Potenciómetro o medidor de pH equipado con electrodo de vidrio en combinación con electrodo de referencia.
- Balanza con 0.1 g de sensibilidad.
- Frascos de vidrio o plástico transparente de boca ancha con capacidad de 50 a 100 mL.
- Pipeta volumétrica de 20 mL.
- Varilla de vidrio que sirva como agitador manual.
- Piseta.
- Cinta métrica.

Procedimiento

1. Se pesan 10 g de muestra y se le agregan 20 mL de agua destilada.
2. Se agita manualmente durante 30 min y se deja en reposo por tres horas.
3. Se calibra el potenciómetro a pH 4.0 y 7.0 o bien a 7.0 y 10.0 dependiendo si medirá acidez o alcalinidad.
4. Introduzca el electrodo en el sobrenadante y registre el pH medido.

Interpretación de resultados

En el Cuadro 2 se observa la clasificación del suelo en cuanto a su valor de pH.

Cuadro 2. Clasificación del suelo según su pH.

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1-6.5
Neutro	6.6-7.3
Medianamente alcalino	7.4 - 8.5
Fuertemente alcalino	> 8.5

CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

La conductividad eléctrica de una muestra de suelo o abono orgánico se mide del extracto de pasta saturada. El término *extracto de saturación* se usa en este método para designar al extracto acuoso que se obtiene por filtración al vacío de una pasta de suelo saturada hecha con agua destilada.

El término *sales solubles del suelo* se usa para referirnos a los constituyentes inorgánicos del suelo que son apreciablemente solubles en el agua. La conductividad eléctrica del extracto de pasta saturada es uno de los índices más difundidos para evaluar la concentración salina del suelo a nivel de laboratorio. Se puede emplear en suelos con diferente grado de salinidad, en caso de que el valor obtenido este fuera de las categorías de clasificación se puede diluir el extracto.

La conductividad eléctrica es una medida de la capacidad de un material para transportar la corriente eléctrica. Una solución acuosa que contiene iones tiene esa propiedad. La conductividad de una solución electrolítica depende de la concentración total de iones presentes en el agua, de la movilidad de cada uno de los iones disueltos, su valencia y de la temperatura a la que se hace la determinación.

Se prepara una pasta de suelo saturada con agua, se filtra al vacío y en el extracto se determina la conductividad eléctrica. Este método proporciona la medida más representativa del total de sales solubles del suelo debido a que se relaciona estrechamente con el contenido de agua del suelo bajo condiciones de campo.

Materiales y métodos

- Medidor de conductividad de lectura directa (conductímetro)
- Agua destilada

Solución estándar de KCl 0.01 N.

Disolver 0.7455 g de KCl en agua destilada y aforar a 1 L. La conductividad eléctrica de esta solución a 25 °C es 1.412 dS/m.

Procedimiento

Preparación de la pasta saturada

1. Colocar entre 100 y 400 g de suelo en un vaso plástico con tapa.
2. Mientras mayor es el contenido de arcilla del suelo menor es la

cantidad de muestra necesaria.

3. Agregar agua suficiente para saturar la muestra.

4. Revolver suavemente con una espátula y agregar agua o suelo hasta alcanzar el punto de saturación.

Los criterios para este punto son:

- Cuando se golpea al vaso contra el mesón no debe acumularse agua en la superficie

- La pasta brilla por reflejo de la luz

- La pasta fluye lentamente cuando el vaso se inclina

- La pasta se desliza libre y limpiamente de la espátula (excepto en los suelos con alto contenido de arcilla).

- Evitar el exceso de agitación, especialmente en los suelos arcillosos, porque la incorporación de aire dificulta la visualización del punto de saturación.

Obtención de extracto de saturación

26

- Transferir la pasta a un embudo Büchner provisto de un filtro de tamaño de poro $\leq 3 \mu\text{m}$.

- Aplicar vacío y colectar el filtrado. Si el filtrado inicial sale turbio, devolverlo al embudo.

Interpretación de resultados

Por su conductividad eléctrica los suelos se clasifican como se indica en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación de la salinidad de suelos en función de su conductividad eléctrica.

Categoría	C.E. (dS/m)	S.I. (%)
Normal	< 4	< 15
Salino	> 4	< 15
Salino Sódico	> 4	> 15
Sódico	< 4	> 15

C.E.= conductividad eléctrica.

S.I.= sodio intercambiable expresado en %.

NITRÓGENO INORGÁNICO (KJELDAHL)

La determinación del contenido de nitrógeno de muestras de suelos y abonos orgánicos sólidos se hace por Kjeldahl. Este método se utiliza como índice de disponibilidad de nitrógeno en

suelos. Se realizará su evaluación para generar recomendaciones de fertilización. El nitrógeno inorgánico determinado con este procedimiento ha mostrado una alta relación con la respuesta de la planta en estudios de correlación de métodos químicos. Se basa en la extracción del amonio intercambiable por equilibrio de la muestra con KCl 2 N y su determinación por destilación mediante arrastre de vapor en presencia de MgO. La adición de la aleación de Devarda (NOM-021-RECNAT-2000) permite incluir la determinación de nitratos y nitritos.

Materiales y métodos

- Balanza analítica
- Matraz de destilación
- Destilador con arrastre de vapor
- Microburetas de 5 mL, graduadas a intervalos de 0.01 mL
- Matraces Erlenmeyer de 125 mL
- Agitador horizontal regulado a 180 opm (oscilaciones por minuto)

27

Mezcla de ácidos

Se pesan 12.5 g de ácido salicílico y se disuelven en 500 mL de ácido sulfúrico concentrado.

NaOH 50%

Pesar 250 g de NaOH y aforar a 500 mL con agua destilada (hervir el agua para eliminar el CO₂).

H₃BO₃ 40%

Se pesan 200 g de ácido bórico y se afora a 500 mL con agua destilada.

H₂SO₄ 0.05 N

Tomar 1.4 mL de ácido sulfúrico concentrado y aforar a 1000 mL con agua destilada.

Valoración del ácido sulfúrico con carbonato de sodio.

1. Se pesan 0.05 g de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y se disuelven en 10 mL de agua destilada (hervir el agua para eliminar el CO₂ que haya absorbido y dejar enfriar).

2. Agregar 9 gotas de mezcla de indicadores (ver abajo) y titular con ácido sulfúrico.

3. La normalidad real del ácido sulfúrico se calcula con la fórmula:

$$N_{\text{H}_2\text{SO}_4} = \frac{\text{Peso}_{\text{NaHCO}_3} (\text{g})}{(\text{P-eq}_{\text{NaHCO}_3})(\text{Vol. titulado}_{\text{H}_2\text{SO}_4})}$$

$\text{Peso}_{\text{NaHCO}_3}$ = Peso del bicarbonato de sodio.

$\text{P-eq}_{\text{NaHCO}_3}$ = Peso equivalente del bicarbonato de sodio = 0.053.

$\text{Vol. titulado}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = Volumen titulado del ácido sulfúrico.

Mezcla de indicadores

Se pesan 0.5 g de verde bromocresol y 0.1 g de rojo de metilo, se afora a 100 mL con alcohol etílico.

28

Procedimiento

1. Se pesan 0.1 g de muestra previamente tamizada (malla < 5mm), se agregan 6 mL de mezcla de ácidos para predigerir la muestra. Se deja en reposo 24 h.

2. Se agregan 1.1 g de mezcla catalizadora a base de sulfatos con catalizador de selenio. Se calienta a 150 °C por 20 min.

3. Después se sube la temperatura a 390 °C y se calienta por 3 h.

4. Se baja la temperatura a 150 °C y se calienta por 1 h. La coloración de la solución cambia a azul claro.

5. Se deja enfriar, posteriormente se agregan 10 mL de agua destilada. Se filtra la solución y se guarda en viales. A esta solución se le llama digestado.

6. Se toman 10 mL del digestado y se le agregan 10 mL de NaOH 40%, y se colocan en el matraz para destilación.

7. El destilado se recibe en 20 mL de ácido bórico 40% (la manguera debe estar sumergida en el ácido bórico para asegurar que se condense la mayor cantidad de la muestra, con 9 gotas de mezcla de indicadores).

8. El destilado se debe titular con ácido sulfúrico valorado.

9. Para calcular el porcentaje de nitrógeno, se usa la siguiente fórmula:

$$N = \frac{(\text{Vol.}_{\text{muestra}} - \text{Vol.}_{\text{Bco}}) (N_{\text{ácido}}) (14)}{(P_{\text{muestra}}) (10)} = \%N$$

kg_{ss} = kg de suelo seco

Vol._{muestra} = Volumen de la muestra

Vol._{Bco} = Volumen del blanco

N_{ácido} = Normalidad del ácido valorado

14 = miliequivalentes de nitrógeno

10 = vol. de digestado que se usa en la destilación

Si el resultado es en miligramos de N por kg de suelo seco, mg-N/kg_{ss}, use la siguiente fórmula:

$$N = \frac{(\text{Vol.}_{\text{muestra}} - \text{Vol.}_{\text{Bco}}) (N_{\text{ácido}}) (14)(1000 \text{ mg})(1000 \text{ g})}{(P_{\text{muestra}}) (10)(1 \text{ g})(1 \text{ kg})} = \text{mg-N} / \text{kg}_{\text{ss}}$$

Si ocupa el resultado en partes por millón o centimoles por kg de suelo seco, Cmol(+)/kg_{ss}, use la siguiente fórmula:

$$N = \frac{(\text{Vol.}_{\text{muestra}} - \text{Vol.}_{\text{Bco}}) (N_{\text{ácido}}) (14)}{(P_{\text{muestra}}) (10)} (71.428) = \text{Cmol}(+) / \text{kg}_{\text{ss}}$$

Interpretación de resultados

Los resultados de los análisis de nitrógeno inorgánico pueden interpretarse conforme al Cuadro 4.

Cuadro 4. Clases de suelo de acuerdo al contenido de N inorgánico para cereales.

Clase	N inorgánico en el suelo (mg-N/kg _{ss})
Muy bajo	0-10
Bajo	10-20
Medio	20-40
Alto	40-60
Muy alto	> 60

FÓSFORO EXTRAÍBLE MÉTODO OLSEN

Se le llama así a esta técnica porque se utiliza una solución para extraer el fósforo presente en la muestra de suelo. El fósforo es

extraído con una solución de NaHCO_3 0.5 M ajustada a pH 8.5.

En suelos neutros, calcáreos o alcalinos, que contienen fosfatos de calcio, este extractante disminuye la concentración de calcio en solución a través de una precipitación del CaCO_3 , por lo tanto la concentración de fósforo en solución se incrementa. En suelos ácidos que contienen fosfatos de aluminio y hierro tales como la variscita y estregita, la concentración de fósforo en solución se incrementa conforme el pH se eleva. Este extractante evita que se presenten reacciones secundarias en suelos ácidos y calcáreos, debido a que el nivel de aluminio, calcio y hierro se mantiene muy bajo en dicha solución. Para esta determinación se usa el método de Olsen (1965).

Materiales y métodos

- Tubos de polietileno de 100 mL
- Papel Whatman núm. 42 o equivalente
- Agitador mecánico recíproco, ajustado a 180 opm
- Balanza analítica
- Matraces volumétricos de 50 mL
- Bureta de 10 mL
- Espectrofotómetro UV-Visible para leer a 882 nm y celdas de vidrio

30

NaOH 1 M

Pesar 5.26 g de NaOH y disolverlo en 100 mL de agua destilada hervida (el NaOH reacciona con el CO_2 al hervir el agua se libera CO_2).

NaHCO₃ 0.5 M

Disolver 42 g de NaHCO_3 en 1 L de agua destilada. Ajustar el pH de esta solución a 8.5 mediante la adición de NaOH 1 M. Llevar a volumen con agua destilada. Guardar la solución en recipiente de plástico y revisar el pH de la solución antes de usarse, volver a ajustar a pH 8.5.

Tartrato de antimonio y potasio al 0.5%

Pese 0.5 g de $\text{K}(\text{SbO})\times\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\times\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ y afore a 100 mL con agua destilada.

Molibdato de amonio

Disolver 20 g de $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\times 4\text{H}_2\text{O}]$ en 300 mL de agua destilada. Agregue lentamente bajo agitación constante y con cuidado 450 mL de H_2SO_4 14 N (194.9 mL de H_2SO_4 concentrado diluido a 500 mL con agua destilada). Agregue 100 mL de una solución al 0.5% (p/v) de tartrato de antimonio y potasio. Afore las mezclas a 1 L con agua destilada. Este frasco se debe tapar con papel aluminio para protegerlo de la luz.

Solución reductora

Disolver 0.5 g de ácido ascórbico con un poco de molibdato de amonio y aforar a 100 mL con la misma solución. Esta solución se debe preparar cada vez que se va a realizar la prueba.

Solución estándar de fósforo (200 mg/L= 200 ppm)

Pesar 0.8786 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) seco al horno a 105 °C, Disolver en agua y aforar a 1 L. Guardar en envase de plástico o vidrio (no Pyrex) y conservar en refrigeración. Algunos autores recomiendan adicionar 25 mL de H_2SO_4 7 N (97.8 mL de H_2SO_4 concentrado aforado a 500 mL con agua destilada) antes de aforar para conservar la solución libre de contaminantes biológicos.

31

Procedimiento

1. Se pesan 2.5 g de muestra, previamente tamizada (malla 2 mm). Se le añaden 50 mL de solución extractante.
2. Se coloca en un agitador horizontal a 180 opm durante 30 min.
3. La solución se filtra con papel whatman núm. 42, o bien la solución se puede centrifugar a 2500 rpm (revoluciones por minuto) por 10 min.
4. Del filtrado se toma una alícuota de 5 mL y se coloca en un matraz aforado de 50 mL. A este volumen se le adicionan 30 mL de agua destilada.
5. Se agregan 5 mL de solución reductora, se agita manualmente y se afora a 50 mL con agua destilada.
6. Se deja en reposo 30 min.
7. Leer la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 882 nm. Después de 30 min y antes de 60 min.
8. Se compara el resultado con la curva estándar (ver más abajo), y se calcula la concentración de fósforo, en $\text{mg-P/kg}_{\text{ss}}$, con la siguiente fórmula:

$$\text{mg-P}_{\text{extraible}}/\text{kg}_{\text{ss}} = (\text{CC}) \left(\frac{\text{Vol.inicial}}{\text{Peso}_{\text{muestra}}} \right) \left(\frac{\text{Vol.final}}{\text{alícuota}} \right) (100)$$

CC= mg/L de P en la solución. Se obtiene graficando la curva de estándar (absorbancia contra mg/L) e interpolando en la misma los valores de absorbancia de las muestras analizadas a las cuales previamente se les ha restado el valor promedio de los blancos o por medio de una regresión simple.

Vol. inicial= volumen del extractante (NaHCO_3).

Vol. final= volumen al que se afora con H_2O destilada.

Alícuota= volumen de filtrado.

$\text{Peso}_{\text{muestra}}$ = μg de muestra.

32

Se lee después de los 30 min porque el bicarbonato efervesce al mezclarse con la solución reductora a base de ácido ascórbico, por lo que al esperar este período de tiempo se asegura de que se hayan salido las burbujas de aire.

Además al agregar la solución reductora se forma un complejo fosfo-molibdato, el cual da una coloración azul, dependiendo de la concentración de fósforo será la intensidad del color, pero este complejo empieza a precipitar a los 60 min, por lo que después de este tiempo la medición no será exacta.

Para realizar la curva estándar (Figura 2), se requiere información, que se obtiene de la siguiente forma:

1. Se toman volúmenes de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16 y 20 mL de solución estándar (5 ppm), en un matraz aforado de 50 mL.

2. Se agregan 5 mL de solución extractora, y 30 mL de agua destilada.

3. A este volumen se agregan 5 mL de solución reductora de ácido ascórbico, y se afora a 50 mL con agua destilada.

4. Agitar manualmente y leer después de 30 min pero antes de 60 min en espectrofotómetro de luz visible a 882 nm.

5. Se realiza una regresión simple utilizando la información obtenida.

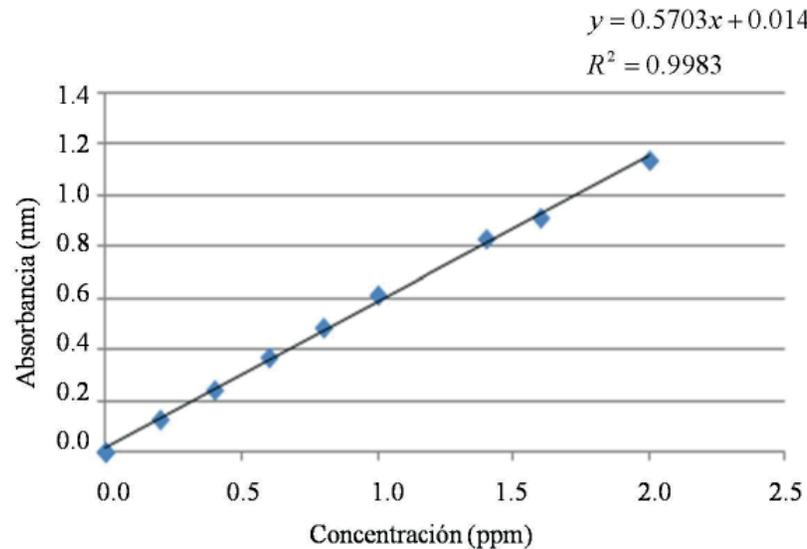


Figura 2. Curva de la solución estándar de fósforo (5 ppm) a 882 nm.

Interpretación de resultados

Los resultados de los análisis pueden interpretarse de forma aproximada con el Cuadro 5.

Cuadro 5. Clases de suelo de acuerdo a la concentración de P extraíble-Olsen.

Clase	mg-P/kg _{ss}
Bajo	< 5.5
Medio	5.5-11
Alto	> 11

Debe recordarse que para cada condición climática y cultivo se genera un nivel diferente de aprovechamiento del fósforo del suelo. Si se conocen los criterios de interpretación para algún suelo y cultivo, estos se reportarán junto con el resultado del análisis.

FÓSFORO EXTRAÍBLE MÉTODO BRAY Y KURTZ

Este método se utiliza para la determinación de fósforo extraíble en suelos o abonos orgánicos sólidos con pH de neutro a ácido. El fósforo determinado por este método está relacionado con la

respuesta de los cultivos. A contrario del método Olsen donde se utiliza bicarbonato de sodio como solución extractora, en esta técnica se emplea una combinación de HCl y NH_4F , esta mezcla remueve formas de fósforo ácido soluble como los fosfatos de calcio y una porción de los fosfatos de aluminio y hierro. El NH_4F disuelve los fosfatos de aluminio y hierro al formar un ión complejo con estos iones metálicos en solución ácida.

Reactivos

FLUORURO DE AMONIO 1 N

Pesar 37 g de NH_4F y aforar a 1 L. Conservar esta solución en botella de polietileno.

ÁCIDO CLORHÍDRICO 0.5 N

Diluir 20.59 mL de HCl concentrado en agua destilada, y aforar a 500 mL.

34

SOLUCIÓN EXTRACTOR BRAY-KURTZ

Mezclar 30 mL de la solución de NH_4F 1 N con 50 mL de la solución HCl 0.5 N, y aforar a 1 L con agua destilada. La solución resultante contiene la siguiente concentración NH_4F 0.03 N y HCl 0.025 N, esta mezcla es estable por más de un año si se conserva en frasco de polietileno.

TARTRATO DE ANTIMONIO Y POTASIO AL 0.5%

Pese 0.5 g de $\text{K}(\text{SbO})\times\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\times\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$, disuelva en agua destilada y afore a 100 mL.

ÁCIDO SULFURICO 14 N

Tomar 194.4 mL de H_2SO_4 concentrado y aforarlo a 500 mL con agua destilada.

MOLIBDATO DE AMONIO

Pese 20 g de $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\times 4\text{H}_2\text{O}]$ y disuelva en 300 mL de agua destilada. A esta solución vierta 450 mL de H_2SO_4 14 N lentamente y bajo constante agitación y con cuidado, posteriormente agregue 100 mL de tartrato de antimonio y potasio 0.5%. Afore la mezcla a 1 L con agua destilada. Este frasco se debe mantener tapado y con papel aluminio y protegido de la luz.

Solución reductora

Pese 0.50 g de ácido ascórbico y disuelva en 30 mL de la solución de tartrato de antimonio y potasio 0.5% y afora a 100 mL con la misma solución. La solución debe prepararse cada vez que se realiza la prueba.

Solución estándar de fósforo (200 mg/L de P= 200 ppm)

Pesar exactamente 0.8786 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) seco al horno a 105 °C, Disolver en agua y aforar a 1 L. Guardar en envase de plástico o vidrio (no Pyrex) y conservar en refrigeración. Algunos autores recomiendan adicionar 25 mL de H_2SO_4 7 N (97.8 mL de H_2SO_4 concentrado aforado a 500 mL con agua destilada) antes de aforar para conservar la solución libre de contaminantes biológicos.

Solución estándar de fósforo (5 mg/L de P= 5 ppm)

Disolver 1 mL (medidos con bureta) de la solución de 200 ppm en 200 mL con agua destilada.

35

Procedimiento

1. Se pesan 2.5 g de muestra, previamente tamizado (malla 2 mm). Se le añaden 25 mL de solución extractante.

2. Se coloca en un agitador horizontal a 180 rpm durante 5 min.

3. La solución se filtra con papel Whatman núm. 42 o bien la solución se puede centrifugar a 2500 rpm por 10 min. Debe recordarse que el papel filtro puede tener cantidades altas de fósforo.

4. Tomar una alícuota de 5 mL de extracto y colocarla en un matraz aforado de 50 mL, verter 40 mL de agua destilada.

5. Agregar 5 mL de la solución reductora, agitar y aforar a 50 mL con agua destilada.

6. Se deja en reposo 30 min, y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro de luz visible a 882 nm. Después de 30 min y antes de 60 min.

7. Se compara el resultado con la curva estándar (ver más abajo), y se calcula la concentración de fósforo, con la siguiente fórmula:

$$\text{mg-P}_{\text{extraíble}}/\text{kg}_{\text{ss}} = (\text{CC}) \left(\frac{\text{Vol.inicial}}{\text{Peso}_{\text{muestra}}} \right) \left(\frac{\text{Vol.final}}{\text{alícuota}} \right) (100)$$

CC= mg/L de P en la solución. Se obtiene graficando la curva de estándar (absorbancia contra mg/L) e interpolando en la misma los valores de absorbancia de las muestras analizadas a las cuales previamente se les ha restado el valor promedio de los blancos o por medio de una regresión simple.

Vol. inicial= volumen del extractante.

Vol. final= volumen al que se afora con H₂O destilada.

Alícuota= volumen de filtrado.

Se lee después de los 30 min porque el bicarbonato bulle al mezclarse con la solución reductora a base de ácido ascórbico, por lo que al esperar este período de tiempo se asegura de que se hayan salido las burbujas de aire.

Además al agregar la solución reductora se forma un complejo fosfo-molibdato, el cual da una coloración azul, dependiendo de la concentración de fósforo será la intensidad del color, pero este complejo empieza a precipitar a los 60 min, por lo que después de este tiempo la medición no será exacta.

36

Para realizar la curva estándar (Figura 3) se requiere información que se obtiene de la siguiente forma:

1. Se toman volúmenes de 0, 1, 2, 3, 4 y 6 mL de solución estándar (5 ppm), en un matraz aforado de 50 mL.

2. Se agregan 5 mL de solución extractora.

3. A este volumen se agregan 5 mL de solución reductora de ácido ascórbico, y se afora a 50 mL con agua destilada.

4. Agitar manualmente y leer después de 30 min pero antes de 60 min en espectrofotómetro de luz visible a 882 nm.

5. Se realiza una regresión simple utilizando la información obtenida.

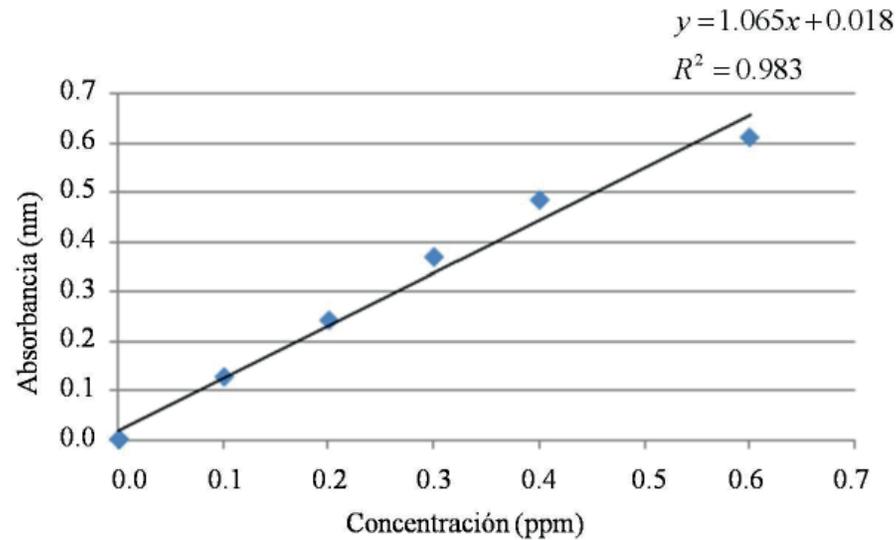


Figura 3. Curva de la solución estándar de fósforo (5 ppm) a 882 nm.

Interpretación de los resultados

Los resultados se reportan en mg-P/kg_{ss} y pueden ser interpretados de manera aproximada con el Cuadro 6.

Cuadro 6. Clases de suelo de acuerdo a la concentración de P extraíble.

Clase	mg-P/kg _{ss}
Bajo	< 15
Medio	15-30
Alto	> 30

kg_{ss} = kg de suelo seco.

CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO (CIC) Y CATIONES INTERCAMBIABLES (K⁺, NA⁺, MG⁺² Y CA⁺²)

Este método consiste en la saturación de la superficie de intercambio de las partículas minerales con un catión índice, el ión amonio; el lavado del exceso de saturante con alcohol etílico; el desplazamiento del catión índice con K⁺ y la determinación del amonio mediante destilación. En esta determinación se emplea el acetato de amonio como reactivo saturante.

Materiales y métodos

ACETATO DE AMONIO 1.0 N pH 7.0

Diluir 57 mL de ácido acético glacial (99.5%) con agua destilada a un volumen de 500 mL. Agregar 60 mL de hidróxido de amonio concentrado, diluir con agua a un volumen de 990 mL, mezclar completamente, ajustar a pH 7.0 y diluir a un volumen final de 1 L con agua destilada.

Una alternativa consiste en pesar y disolver 77 g de acetato de amonio en 900 mL de agua destilada y de ser necesario ajustar a pH 7.0 y entonces completar 1 L con agua destilada.

ALCOHOL ETÍLICO 97%

Se usa el alcohol etílico grado industrial.

CLORURO DE SODIO 10% (P/V)

Pesar 100 g de cloruro de sodio grado analítico y aforar a 1 L con agua destilada en un matraz aforado.

38

CLORURO DE AMONIO 1 N

Pesar 53.50 g de NH_4Cl y disolver en agua destilada. Ajustar a pH 7.0 con hidróxido de amonio y aforar a 1 L con agua destilada en un matraz aforado.

CLORURO DE AMONIO 0.25 N

Pesar 13.38 g de NH_4Cl y disolver en agua destilada. Ajustar a pH 7.0 con hidróxido de amonio y aforar a 1 L con agua destilada en un matraz aforado.

INDICADOR MIXTO

Mezclar volúmenes iguales de rojo de metilo 0.66% y de verde de bromocresol 0.99%. Ambos disueltos en alcohol etílico al 95%:

- Rojo de metilo: disolver 0.66 g de rojo de metilo en 100 mL de alcohol etílico al 95%. Aforar a 100 mL con etanol.
- Verde de bromocresol: disolver 0.99 g de verde de bromocresol en 100 mL de alcohol etílico al 95%. Aforar a 100 mL con etanol.

ANARANJADO DE METILO

Disolver 0.1 g de anaranjado de metilo en 100 mL de agua destilada y aforar a 100 mL con agua destilada.

ÁCIDO BÓRICO

Usar H_3BO_3 al 2% en agua destilada (pesar 20 g y aforar a 1 L con agua destilada) que contenga 10 mL del indicador mixto por L de solución.

HCL 0.01 N VALORADO

Para preparar HCl 0.01 N se toma un volumen de 0.8264 mL de HCl concentrado y se disuelven en 1 L de agua destilada.

Valoración del HCl

Tomar 5 mL de HCl que se desea valorar, agregar tres gotas de anaranjado de metilo, adicionar la solución de NaHCO_3 1 N (pesar 84.01 g de NaHCO_3 anhídrido y disolver en 1 L de agua destilada). El vire de color es de canela a amarillo. Para determinar la normalidad real del bicarbonato de sodio, se emplea la fórmula:

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

39

P_{NaHCO_3} = peso de bicarbonato de sodio para 1 L.

N_{NaHCO_3} = normalidad calculada.

P-eq= peso equivalente del sodio.

Para calcular la normalidad real del HCl valorado

$$N_{\text{HCl}} = \frac{(N_{\text{NaHCO}_3})(\text{Vol. promedio})}{\text{Alícuota}}$$

N_{NaHCO_3} = normalidad real del bicarbonato de sodio.

Vol. promedio= volumen promedio gastado de NaHCO_3 para titular el HCl.

Alícuota= volumen usado para la titulación.

NAOH 40%

Disolver 400 g de NaOH en agua destilada previamente hervida y aforar a 1 L.

AgNO_3 0.1 N

Disolver 16.98 g de nitrato de plata en agua destilada y aforar a 1 L.

LANTANO ACIDIFICADO

Pesar 7.742 g de $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ en un matraz aforado de 250 mL con agua destilada y añadir 17.5 mL de HNO_3 concentrado y aforar a 250 mL.

LANTANO ACIDIFICADO DILUIDO

Tomar 50 mL de la solución de lantano acidificado en un matraz aforado de 500 mL y aforar con agua destilada.

CLORURO DE CESIO ACIDIFICADO

Disolver 11.12 g de CsCl y 250 mL de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ en 500 mL de agua destilada en un matraz aforado de 1 L, añadir 20 mL de HNO_3 2 M y aforar con agua destilada.

40

ÁCIDO NÍTRICO 2 M

Disolver 12.5 mL de HNO_3 concentrado en agua destilada, aforar a 100 mL en un matraz aforado.

Procedimiento

1. Pesar 5 g de muestra secada al aire y tamizada (malla 2 mm) en un tubo para centrifuga de 50 mL con 33 mL de solución de acetato de amonio. Se coloca en un agitador horizontal a 180 opm (oscilaciones por minuto) durante 10 min. Después se centrifuga a 2500 rpm por 10 min, para que el sobrenadante se aclare. El sobrenadante se decanta en un matraz de 100 mL y se repite la extracción otras dos veces, aforar con acetato de amonio y guardarlo para la posterior determinación de las bases intercambiables (solución A). El suelo se guarda para continuar el proceso.

2. A la pastilla de suelo se le agregan 30 mL de la solución de cloruro de amonio 1 N; agitar durante 10 min y luego centrifugar a 2500 rpm por 10 min, hasta que el sobrenadante esté claro y desecharlo. Adicionar 30 mL de la solución de cloruro de amonio 0.25 N, agitar durante 10 min, centrifugar a 2500 rpm durante 10 min y desechar el sobrenadante. El suelo se lava con porciones de 30 mL de alcohol etílico 97% agitando durante 10 min, centrifugar a 2500 rpm durante 10 min y eliminar el sobrenadante cada vez. El lavado termina cuando la prueba de cloruros en el decantado sea mínima.

3. Prueba de cloruros; pipetear 10 mL del sobrenadante alcohólico en un tubo de ensaye y agregar 4 o 5 gotas de nitrato de plata, si se observa un ligero precipitado blanco, la reacción es positiva y se debe continuar el lavado hasta que la prueba de cloruros sea negativa.

4. Se reemplaza el amonio absorbido con tres porciones de 33 mL de cloruro de sodio 10%, en agitación horizontal a 180 rpm durante 10 min y después se centrifuga a 2500 rpm durante 10 min cada vez.

5. Cada reemplazo se decanta en un matraz volumétrico de 100 mL y se afora el volumen graduado con agua destilada. Determinar el amonio a partir de una alícuota de 5 mL la cual se transfiere a un matraz Kjeldahl de 300 mL, se le agregan 10 mL de NaOH 40% y se conecta al aparato de destilación. Recoger el producto de la destilación en un matraz Erlenmeyer que contenga 20 mL de ácido bórico y gotas de indicador. Para determinar la capacidad de intercambio catiónico expresada en $\text{Cmol (+)}/\text{kg}_{\text{ss}}$ por titulación con HCl 0.01 N se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{CIC} = (200)(V)(N) = \text{Cmol (+)}/\text{kg}_{\text{ss}}$$

kg_{ss} = kg de suelo seco.

V = Vol. (mL) de HCl empleado al titular el destilado.

N = Normalidad del HCl.

$$200 = \left(\frac{100}{\text{alícuota}} \right) \left(\frac{100}{P_{\text{suelo}}} \right) = \left(\frac{100 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) \left(\frac{100 \text{ g}}{5 \text{ g}} \right)$$

Para determinar el contenido de Ca y Mg intercambiables

1. Preparar una curva estándar a partir de una solución de 100 ppm (ver más adelante).

2. Se colocan 10 mL de la solución A en un tubo de ensaye.

3. Se agregan 2.5 mL de cloruro de lantano acidificado. Para leer Mg a 285.2 nm.

4. Tomar 2 mL de la primera dilución (2:50) y aforar a 25 mL. Se toma una alícuota de 10 mL y se agregan 2.5 mL de cloruro de lantano para leer Ca a 422.7 nm.

5. Leer en espectrofotómetro de absorción atómica, usando una flama aire-acetileno. Comparar el resultado con la curva estándar para determinar la concentración con la siguiente fórmula:

$$Ca = \frac{(ppmCC)(Dm)(Dv)(100)}{(P-eq)(1000)} = Cmol(+)/kg_{ss}$$

kg_{ss} = kg de suelo seco

$$ppmCC = ppm \text{ en curva estándar} = \frac{\text{Lectura}}{\text{Pendiente}}$$

$$Dm = \text{dilución de masa} = \frac{Aforo_{inicial}}{P_{muestra}}$$

$$Dv = \text{dilución de volumen} = \left(\frac{Aforo_{1^{era} \text{ dilución}}}{Alícuota_{1^{era} \text{ dilución}}} \right) \left(\frac{Aforo_{2^{da} \text{ dilución}}}{Alícuota_{2^{da} \text{ dilución}}} \right)$$

$$P-eq = \text{peso equivalente del Ca} = \frac{PM}{\text{valencia}}$$

42

$$Mg = \frac{(ppmCC)(Dm)(Dv)(100)}{(P-eq)(1000)} = Cmol(+)/kg_{ss}$$

kg_{ss} = kg de suelo seco

$$ppmCC = ppm \text{ en curva estándar} = \frac{\text{Lectura}}{\text{Pendiente}}$$

$$Dm = \text{Dilución de masa} = \frac{Aforo_{inicial}}{P_{muestra}}$$

$$Dv = \text{Dilución de volumen} = \left(\frac{Aforo_{1^{era} \text{ dilución}}}{Alícuota_{1^{era} \text{ dilución}}} \right)$$

$$P-eq = \text{Peso equivalente del Ca} = \frac{PM}{\text{valencia}}$$

Si se lee directa (sin diluir), la dilución de volumen se anula.

Para la curva estándar (0–0.4 ppm de Ca; Figura 4)

1. Pesar 1 g del estándar de Ca y disolver en 1000 mL de agua destilada, para una concentración de 1000 ppm.

2. Se toman 10 mL de la solución estándar de 1000 ppm de Ca y se afora a 100 mL con agua destilada.

1. 3. Se toman alícuotas de 0, 1, 2, 3 y 4 mL de esta solución.

Aforar a 50 mL con agua destilada.

2. 4.Leer en espectrofotómetro de absorción atómica a 422.7 nm en flama aire-acetileno.

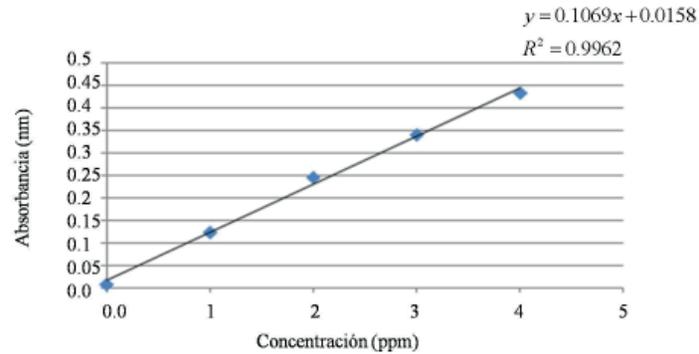


Figura 4. Curva de la solución estándar de Ca (100 ppm) a 422.7 nm.

Para la curva estándar (0–0.5 ppm de Mg; Figura 5)

1.Pesar 1 g del estándar de Mg y disolver en 1000 mL de agua destilada, para una concentración de 1000 ppm.

2.Se toman 10 mL de la solución estándar de 1000 ppm de Mg y se afora a 100 mL con agua destilada.

3.Se pipetea 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mL de esta solución. Aforar a 50 mL con agua destilada.

4.Leer en espectrofotómetro de absorción atómica a 285.2 nm en flama aire-acetileno.

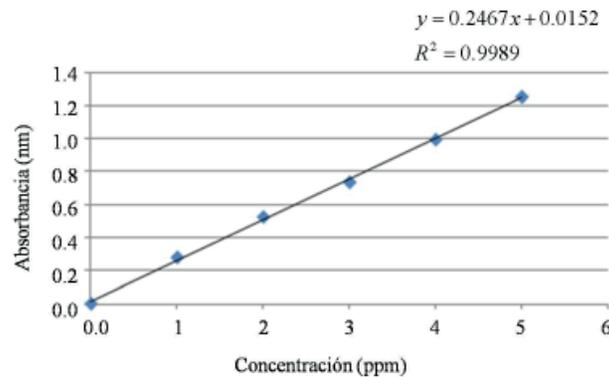


Figura 5. Curva de la solución estándar de Mg (100 ppm) a 285.2 nm.

Determinación de Na y K intercambiables

1. Se añade 1.0 mL de la solución A en un tubo de ensaye.
2. Añadir 1.0 mL de la solución de cloruro de cesio acidificada.
3. Añadir 8 mL de agua destilada y agitar manualmente.
4. Leer en espectrofotómetro de emisión de flama. Comparar el resultado con la curva estándar para determinar la concentración con la siguiente fórmula:

$$Na = \frac{(ppmCC)(Dm)(Dv)(100)}{(P-eq)(1000)} = \text{Cmol(+)}/\text{kg}_{ss}$$

kg_{ss} = kg de suelo seco

$$\text{ppmCC} = \text{ppm en curva estándar} = \frac{\text{Lectura}}{\text{Pendiente}}$$

$$Dm = \text{Dilución de masa} = \frac{\text{Aforo}_{\text{inicial}}}{P_{\text{muestra}}}$$

$$Dv = \text{Dilución de volumen} = \left(\frac{\text{Aforo}}{\text{Alícuota}} \right)$$

$$P\text{-eq} = \text{Peso equivalente del Ca} = \frac{PM}{\text{valencia}}$$

44

$$K = \frac{(ppmCC)(Dm)(Dv)(100)}{(P-eq)(1000)} = \text{Cmol(+)}/\text{kg}_{ss}$$

kg_{ss} = kg de suelo seco

$$\text{ppmCC} = \text{ppm en curva estándar} = \frac{\text{Lectura}}{\text{Pendiente}}$$

$$Dm = \text{Dilución de masa} = \frac{\text{Aforo}_{\text{inicial}}}{P_{\text{muestra}}}$$

$$Dv = \text{Dilución de volumen} = \left(\frac{\text{Aforo}}{\text{Alícuota}} \right)$$

$$P\text{-eq} = \text{Peso equivalente del Ca} = \frac{PM}{\text{valencia}}$$

Para la curva estándar (5–40 ppm de Na; Figura 6)

1. Pesar 1 g del estándar de Na y disolver en 1000 mL de agua destilada, para una concentración de 1000 ppm.
2. Se toman 10 mL de estándar de 1000 ppm de Na y se afora a 100 mL.
3. Se pipetea 5, 10, 20, 30 y 40 mL de esta solución. Aforar a 50 mL con agua destilada.
4. Leer en espectrofotómetro de emisión de flama.

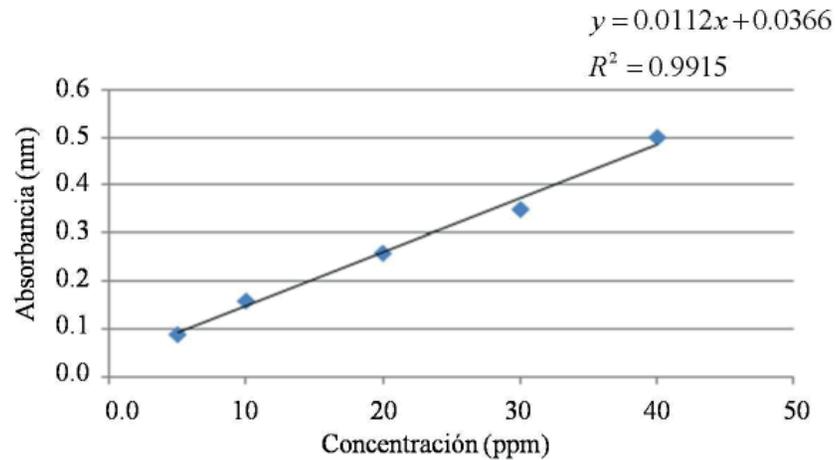


Figura 6. Curva de la solución estándar de Na (100 ppm).

Para la curva estándar (5–30 ppm de K; Figura 7)

1. Pesar 1 g del estándar de K y disolver en 1000 mL de agua destilada, para una concentración de 1000 ppm.
2. Se toman 10 mL de la solución de 1000 ppm de K y se afora a 100 mL.
3. Se pipetea 1, 10, 20 y 30 mL de esta solución. Aforar a 50 mL con agua destilada.
4. Leer en espectrofotómetro de emisión de flama.

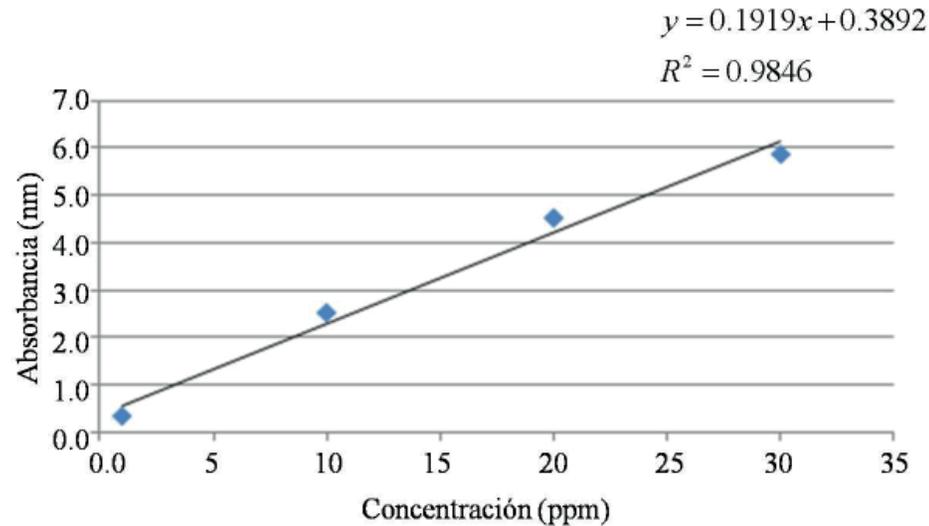


Figura 7. Curva de la solución estándar de K (100 ppm).

46

Interpretación de resultados de la capacidad de intercambio catiónico (CIC)

La CIC no deberá expresarse como meq/100g_{ss}, ya que las unidades en el Sistema Internacional son Cmol(+)/kg_{ss}, por lo tanto los valores de la CIC se dividirán entre 100, para que la CIC se exprese como Cmol(+)/kg_{ss}. El signo (+) es añadido para indicar que la CIC deberá ser expresada como moles de cationes monovalentes; por lo tanto los iones divalentes cuentan el doble.

La CIC es una propiedad química a partir de la cual es posible inferir acerca del tipo de arcilla presente, de la magnitud de la reserva nutricional y del grado de intemperismo de los suelos. El resultado numérico de la determinación sirve además como base en el cálculo del porcentaje de saturación de bases que es un dato ampliamente usado en los estudios pedológicos y de fertilidad. Para poder inferir sobre los minerales arcillosos presentes en los suelos hay que considerar la medición hecha por Grim 1953, (Cuadro 7) en los silicatos laminares del tipo 1:1 y 2:1 empleando acetato de amonio 1 N pH 7.0.

Cuadro 7. Cuadro de Grim para inferir el tipo de arcilla en una muestra de sustrato según su CIC.

Grupo de arcillas	CIC (Cmol(+)/kg _{ss})
Caolinitas	3-15
Esmectitas	80-150
Micas hidratadas	10-40
Vermiculitas	100-150
Cloritas	10-40

Con respecto al grado de intemperismo se considera que un valor de CIC inferior a 10 Cmol(+)/kg_{ss} en un horizonte B con más de 30–40% de arcilla indica la ausencia de minerales primarios intemperizables y la acumulación de minerales secundarios del grupo caolinítico y óxidos libres. Por lo que respecta a la reserva nutrimental se considera que esta es abundante cuando la CIC es mayor de 25 Cmol(+)/kg_{ss} (Cuadro 8). La fertilización se realizará de conformidad con la clasificación elaborada con los resultados analíticos obtenidos con métodos apropiados tanto en suelos ácidos como alcalinos.

47

Cuadro 8. Fertilidad del suelo según su capacidad de intercambio catiónico (CIC).

Fertilidad del suelo	CIC (Cmol(+)/kg _{ss})
Muy alta	> 40
Alta	25-40
Media	15-25
Baja	5-15
Muy baja	> 5

Interpretación de resultados de calcio, magnesio y potasio (Ca, Mg y K)

Los resultados de los análisis de las bases intercambiables pueden interpretarse en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Fertilidad del suelo según su capacidad de intercambio catiónico (CIC).

CAPACIDAD DE INTERCAMBIO	Ca	Mg	K
	Cmol(+)/kg _{ss}		
Muy baja	<2	<0.5	<0.2
Baja	2-5	0.5-1.3	0.2-0.3
Media	5-10	1.3-3.0	0.3-0.6
Alta	> 10	> 3.0	> 0.6

Análisis de propiedades orgánicas del suelo y abonos orgánicos sólidos

CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA

48

Se realiza por el método estequiométrico de Walkley y Black, que se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo por medio de una disolución de dicromato de potasio y el calor de reacción que se genera al mezclarla con ácido sulfúrico concentrado.

Después de un cierto tiempo de espera, la mezcla se diluye y se adiciona ácido fosfórico para evitar interferencias de Fe³⁺ y el dicromato de potasio residual (que no reaccionó) es valorado con sulfato ferroso, utilizando difenilamina como indicador.

Por este procedimiento se detecta entre 70–84% del carbón orgánico total, por lo que es necesario introducir un factor de corrección, el cual varía dependiendo del suelo.

Se puede utilizar el valor obtenido para el carbono orgánico total, multiplicando este valor por el factor de Van Bremelen (1.724).

MATERIALES Y MÉTODOS

Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) 1 N o 0.166 M

Pesar 48.83 g de K₂Cr₂O₇ (para 0.166 M) o pesar 147.09 g de K₂Cr₂O₇ (para 1 N) y aforarlo a 1 L, con agua destilada. Esta medición debe ser muy precisa y el recipiente debe estar seco, porque el dicromato reacciona con el carbono orgánico del suelo y un peso impreciso puede afectar el resultado.

Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)

El manejo del ácido concentrado se hace en campana de flujo laminar, con sus debidas precauciones.

Ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4)

El manejo del ácido concentrado se hace en campana de flujo laminar, con sus debidas precauciones.

Indicador de difenilamina

Pesar 0.5 g de difenilamina y disolverlos en 20 mL de agua destilada, añadir 100 mL de H_2SO_4 concentrado.

Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1 M

Pesar 278 g de sulfato ferroso y disolverlos en agua destilada a la que previamente se le añaden 80 mL de H_2SO_4 concentrado. Dejar enfriar y aforar a 1 L con agua destilada. Esta solución debe ser valorada con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N antes de realizar la determinación (normalidad exacta del sulfato ferroso).

49

Para titular el sulfato ferroso

Se toman 10 mL de sulfato ferroso que se desea valorar, y se le agregan 5 a 10 gotas de indicador de difenilamina, y se titula con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N.

$$N_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}^{\text{real}} = \frac{(\text{Vol.}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}})(N_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7})}{\text{Vol. gastado}_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}}$$

$\text{Vol.}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}$ = alícuota empleada

$N_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}$ = normalidad del dicromato de potasio

$\text{Vol. gastado}_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}$ = volumen de dicromato de potasio gastado para la titulación

Procedimiento

Se pesan 0.5 g de muestra tamizada (0.5 mm) y se añaden 10 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N y se agita; posteriormente se agregan 20 mL de H_2SO_4 concentrado y se agita otra vez.

Se deja en reposo 30 min sobre una lámina de asbesto o sobre

una mesa de madera, con el fin de aprovechar al máximo el calor generado de la reacción. Se añaden 200 mL de H₂O destilado y 5 mL de H₃PO₄ concentrado para eliminar las interferencias por Fe, para después adicionar de 5 a 10 gotas de indicador de difenilamina, dándole una coloración rojo oscuro (ladrillo) a la solución, al titularla con sulfato ferroso vira a verde claro.

Simultáneamente correr un blanco por cada serie para obtener el factor de corrección, para lo cual se toman 10 mL de K₂Cr₂O₇ y se le agregan 20 mL de H₂SO₄, finalmente titular con sulfato ferroso valorado.

Para calcular el porcentaje de materia orgánica se utiliza la siguiente fórmula:

$$\%C_{\text{orgánico}} = \left(\frac{V_{\text{SF}_{\text{BCO}}} - V_{\text{SF}_{\text{M}}}}{\text{Peso muestra}} \right) (N_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}) (0.39) (\text{mcf})$$

$V_{\text{SF}_{\text{BCO}}}$ = Volumen de sulfato ferroso usado en el blanco (mL).

$V_{\text{SF}_{\text{M}}}$ = Volumen de sulfato ferroso usado en la muestra (mL).

N_{SF} = Normalidad del sulfato ferroso.

$\text{Peso}_{\text{muestra}}$ = peso de la muestra empleada (g).

mcf = factor de corrección de humedad = $\left(\frac{100}{\text{peso seco}} \right)$

$$\% \text{Materia orgánica} = (C_{\text{orgánico}}) (1.724)$$

Si al añadir el dicromato de potasio al suelo la solución se torna verdosa o si se gastan menos de 2 mL de sulfato ferroso al titular la muestra, se debe reducir el peso de la muestra a la mitad.

El factor 0.39 resulta de multiplicar

$$\left(\frac{12}{4000} \right) \left(\frac{100}{77} \right) (100) = 0.38961039. \text{ Donde: } \left(\frac{12}{4000} \right) \text{ es}$$

el peso miliequivalente del C, $\left(\frac{100}{77} \right)$ es un factor de corrección

debido a que se supone que el método solo oxida el 77% del C, y

100 es la conversión a porcentaje. En la mayoría de los laboratorios se sigue usando el factor de Van Bremelen de 1.724 para estimar la materia orgánica a partir del carbono orgánico, el cual resulta

de la suposición de que la materia orgánica contiene un 58% de C,

$$\left(\frac{100}{58}\right) = 1.72413793.$$

Alternativamente puede emplearse una solución de sulfato ferroso amoniacal 0.5 N, pesar 196.1 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, disolverlos en 800 mL de agua destilada con 20 mL de H_2SO_4 concentrado y aforar a 1 L.

Interpretación de resultados

Los valores de referencia para clasificar la concentración de la materia orgánica en los suelos minerales y volcánicos se presenta en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Clasificación de suelos según su origen en función de su contenido porcentual de materia orgánica.

CLASE	MATERIA ORGÁNICA (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	≤ 4.0	≤ 0.5
Bajo	4.1-6.0	0.6-1.5
Medio	6.1-10.9	1.6-3.5
Alto	11.0-16.0	3.6-6.0
Muy Alto	≥ 16.1	≥ 6.0

51

RELACIÓN C/N Y % DE S

Carbono total por combustión seca

Para determinar el contenido de carbón y nitrógeno total de una muestra de suelo o abono orgánico, así como el porcentaje de azúfre se puede utilizar el método de combustión seca, que se basa en la oxidación del carbono orgánico y la descomposición térmica de los carbonatos minerales en un quemador de temperatura media.

El CO_2 liberado es atrapado en un compuesto y la determinación se puede hacer por titulación o por gravimetría. Los procedimientos por volumetría y conductimetría se usan en instrumentos comerciales para determinar el CO_2 de la muestra de suelo o abono orgánico sólido.

Alternativamente el CO_2 liberado se puede reducir a CH_4 usando

H₂ y un catalizador a base de Ni, la cuantificación se hace por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de flama.

En el método por combustión seca, la muestra se mezcla con un catalizador (CoO y/o MnO) y se calienta con una resistencia, en presencia de O₂ purificado, el CO₂ es absorbido por ascarita o algún otro absorbente. Otros gases absorbibles que se forman durante la combustión son removidos del O₂ antes de alcanzar el bulbo de absorción del CO₂.

El O₂ (comercial comprimido) primero se pasa por un tren con H₂SO₄ concentrado para remover el NH₃ e hidrocarburos, un absorbente como cal sodada para remover el CO₂, y perclorato de magnesio anhidro [Mg(ClO₄)₂] para remover el vapor de agua.

La tasa de flujo de O₂ es controlado por una válvula de aguja y se mide con un medidor de flujo. El tren para determinar el C total por combustión seca se compone de lo siguiente (Figura 8):

52

- Cilindro de oxígeno y regulador de presión (A).
- Tren de purificación del oxígeno (limpia impurezas en la corriente de O₂) que consiste de H₂SO₄ concentrado para remover el NH₃ e hidrocarburos, un absorbente como cal sodada para remover el CO₂, y perclorato de magnesio anhidro [Mg(ClO₄)₂] para remover el vapor de agua (B).
 - Indicador de flujo y válvula de aguja para controlar el O₂ (C).
 - Resistencia o inductor de combustión (D)
 - a) Resistencia del quemador equipada con un control de temperatura y un indicador para operar de 900 a 1000 °C.
 - b) Insertador de muestras.
 - c) Tubo para la combustión, de 2.5 cm de diámetro por 75 cm (cerámica de zirconio o equivalente).
 - Trampa para el polvo insertada en la salida del tubo para combustión (E).
 - Trampa para azufre llena con MnO₂ activado (F).
 - Horno de catálisis (G), oxida el O₂ a CO₂.
 - Limpiador del gas (H), remueve óxidos de nitrógeno y azufre, halógenos, y vapor de agua de la corriente de gas:
 - a) Torre de ácido sulfúrico para remover el vapor de agua y para prolongar la vida útil de la trampa de perclorato de magnesio anhidro.
 - b) Trampa para vapor de agua llena con perclorato de magnesio anhidro.

- Bulbo para absorber el dióxido de carbono (I) (absorbe el CO_2 para pesarlo), es un tubo de Nesbitt, Fleming o Turner empacado con un absorbente de CO_2 y perclorato de magnesio anhidro. El bulbo contiene lo siguiente de abajo para arriba: fibras finas de vidrio, capa de 3 cm de absorbente de 8 – 14 mm de malla (por ejemplo ascarita), capa de 2 cm de absorbente de 14 – 20 mm de malla, capa de 1 cm de perclorato de magnesio anhidro, y fibra fina de vidrio.

- Trampa de grasa (J)-sella el equipo de la atmósfera en caso de presión trasera generada por una excesiva demanda de oxígeno durante la combustión, y para indicar el flujo de gas de salida.

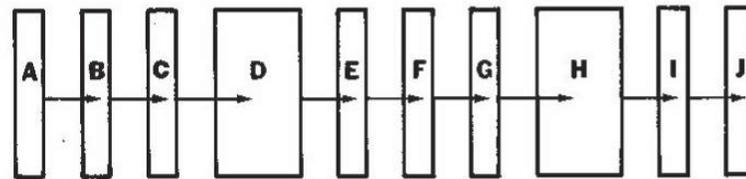


Figura 8. Diagrama de bloques del tren de combustión seca (Allison y cols., 1965)
Materiales y métodos

53

- Gas oxígeno.
- Ácido sulfúrico concentrado.
- Dióxido de manganeso activado.
- Asbesto platinizado, 5% Pt, u óxido cúprico (alambre o en granulos) bajo en C para el catalizador del tubo de combustión.
 - Óxido cúprico en polvo, bajo en C, que sirve como acelerador cuando se mezcla con la muestra de suelo o abono orgánico sólido.
 - Alundum o siderita o equivalente, grado refractario, tamaño de malla 60–0, libre de C.
 - Perclorato de magnesio anhidro.
 - Dióxido de carbono, tamaño de malla de 14–20, por ejemplo ascarita, caroxita e indicarb.
 - Estándar de C (dextrosa o ácido benzoico).

Procedimiento

Se coloca la muestra en un tubo de 7.5 cm, adicionando asbesto platinizado y CuO granular como catalizadores. Se calienta la muestra a una temperatura de $950\text{ }^\circ\text{C}$ se conecta el aparato al flujo

de corriente de oxígeno (O₂) a una velocidad de 100 mL/min durante 10 min. Se quita el tubo y se pesa ya que la materia orgánica en presencia del oxígeno es convertida en CO₂, el incremento en el peso del bulbo que absorbe el CO₂ comparado con un blanco, nos permite calcular el contenido de carbono total en la muestra, así como también emite los resultados para el porcentaje de nitrógeno total y el porcentaje de azufre.

$$\%C_{\text{Total}} = \left[\frac{(gCO_2 \text{ muestra} - gCO_2 \text{ Bco})}{g_{\text{muestra seca}}} \right] (0.2727)(100)$$

Interpretación de resultados

La relación C/N, aporta un dato importante de la materia orgánica, pues los microorganismos para desplegar su actividad necesitan primariamente del nitrógeno. Las leguminosas llegan a una C/N entre 10–15 (baja), pues contienen una mayor cantidad de proteínas en sus tejidos. Debido a esta baja relación C/N las leguminosas son más fácilmente mineralizables por la microflora del suelo que los cereales.

54

Contenido de ácidos húmicos, fúlvicos y carbono orgánico

Las sustancias húmicas representan la mayor parte de la materia orgánica del suelo, también conocida como humus, estas se dividen en tres componentes: los ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y las huminas.

Los ácidos húmicos y los fúlvicos son los fragmentos del humus, solubles en álcalis, mientras que las huminas son la fracción insoluble. Las sustancias húmicas se componen de grupos carboxilo e hidroxilo, con gran potencial de oxido-reducción y asociación-disociación.

Algunos de los usos de estas sustancias son: en agricultura influyen significativamente en la calidad y productividad del suelo, mejorando las propiedades físicas, las condiciones de humedad y la capacidad de intercambio catiónico; los ácidos húmicos reaccionan con el fósforo y calcio, formando complejos fosfo-húmicos y calcio-húmicos respectivamente; el primer complejo mejora la disponibilidad para la planta, mientras que el calcio le confiere estabilidad a los ácidos húmicos; por lo tanto se podría pensar que el abono orgánico sólido con alto contenido de ácidos

húmicos presentan un mayor contenido de fósforo disponible para las plantas y un menor contenido de calcio en su forma catiónica; también forma complejos con el amonio, formando humato de amonio, el cual estimula significativamente el crecimiento en plantas; las sustancias húmicas reducen los metales pesados a sus formas menos reactivas, lo que favorece la biorremediación de suelos contaminados.

Existen muchas teorías sobre cómo se forman las sustancias húmicas, como son la teoría de la condensación de amino-azúcares, la teoría de la lignina y la teoría de los polifenoles. Hoy en día, algunos investigadores suponen que se producen a partir de la lignina.

La materia orgánica se compone de carbohidratos (celulosa, hemicelulosa, almidón, azúcares, entre otros), lignina, polifenoles (taninos, entre otros), proteínas, lípidos, pigmentos, alcaloides y otros compuestos menores. Los compuestos más complejos de la materia orgánica fresca son la lignina y taninos, los cuales se descomponen muy lentamente: la lignina se compone de unidades de fenilpropano, estas unidades al degradarse producen ácidos y aldehídos fenólicos, los cuales por demetilación producen polifenoles, estos al oxidarse mediante las enzimas feniloxidasas pasan a quinonas, estas últimas por condensación con unidades de aminoácidos formarán los ácidos fúlvicos, y estos evolucionarán a ácidos húmicos; los taninos son polímeros polifenólicos que al degradarse liberan unidades de polifenoles, de ahí el proceso es igual al de la lignina, hasta la formación de ácidos fúlvicos, debido a esto se pueden considerar a los polifenoles como los precursores de los ácidos húmicos.

La relación ácidos húmicos:fúlvicos (AH/AF) indica un grado de polimerización de la materia orgánica humificada y puede utilizarse como un índice de madurez o evolución del humus, debido a que provee de información relacionada con la formación de moléculas complejas (AH) a partir de moléculas sencillas (AF). En el abono orgánico sólido la predominancia general de ácidos húmicos orienta a inferir una evolución del humus.

Materiales y métodos

HIDRÓXIDO DE SODIO 1 M

Pesar 4 g de NaOH y aforar a 100 mL con agua destilada previamente calentada.

DICROMATO DE POTASIO ($K_2Cr_2O_7$) 1 N

Se pesan 147.09 g de $K_2Cr_2O_7$ y aforar a 1 L de agua destilada. Pesar con precisión y en un recipiente seco.

SULFATO FERROSO [$FeSO_4 \times 7H_2O$] 1 M

Pesar 278.01 g de sulfato ferroso, agregar 80 mL de ácido sulfúrico concentrado y aforar a 1 L con agua destilada.

INDICADOR DE DIFENILAMINA

Pesar 0.5 g de difenilamina en 20 mL de agua y añadir 100 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Procedimiento

Por la técnica de Sánchez-Monedero y cols. (1996) se toma 1 g de muestra al cual se le adicionan 20 mL de NaOH 1 M, posteriormente se pone en agitación constante por 4 h, centrifugar por 15 min a 8000 g (gravedad) (3000 a 4000 rpm), al recuperar el sobrenadante por decantación se separa en dos volúmenes iguales.

A la fracción 1 de sobrenadante se le determina el contenido de carbono orgánico extraíble total. La fracción 2 se utiliza para conocer el contenido de carbono orgánico de los ácidos fúlvicos, para lo cual hay que adicionar ácido sulfúrico concentrado al sobrenadante hasta ajustar a pH 2.0 (si la muestra proviene de un abono orgánico maduro, adicionando de 10 a 15 gotas de ácido sulfúrico concentrado se logra ajustar el pH a 2.0), al entrar en contacto el H_2SO_4 con el NaOH se produce una reacción exotérmica, por lo que se debe agitar el recipiente para que la muestra no se derrame, cuando se forman coágulos de color café pardo.

Almacenar a 4 °C por 24 h (el precipitado que se forma son los ácidos húmicos), centrifugar 15 min a 8000 g (3000 a 4000 rpm) y medir el contenido de carbono orgánico del sobrenadante (si no se forma bien el coágulo, puede deberse a la falta de ácido sulfúrico o bien de tiempo en la centrifugación).

Determinación del carbono extraíble de la muestra

Se toma una alícuota de 5 mL del sobrenadante de la muestra, al que se le adicionan 5 mL de $K_2Cr_2O_7$ 1 N y 20 mL de ácido sulfúrico, agitar, posteriormente dejar en reposo 30 min sobre una lámina de asbesto o sobre una mesa de madera, añadir 200 mL de agua

destilada y 5 mL de H_3PO_4 conc., adicionar de 5 a 10 gotas de indicador de difenilamina, para titular con sulfato ferroso 1 M. Vira de color a verde claro.

Cálculos

$$C_{\text{org.}} = \frac{(V_{\text{SF}_{\text{BCCO}}} - V_{\text{SF}_{\text{M}}})(N_{\text{SF}})(1.2)(V_{\text{Total extracto}})}{(N_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7})(V_{\text{alícuota}})(P_{\text{muestra}})} = \text{mgC/g}_{\text{ss}}$$

g_{ss} = gramos de suelo seco

$V_{\text{SF}_{\text{BCCO}}}$ = Volumen de sulfato ferroso usado en el Blanco

$V_{\text{SF}_{\text{M}}}$ = Volumen de sulfato ferroso usado en la muestra

N_{SF} = Normalidad del sulfato ferroso amoniacal

$N_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}$ = Normalidad del dicromato de potasio
 1.2 = 1 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ oxidan 1.2 mg de C

$V_{\text{Total extracto}}$ = 20 mL

$V_{\text{Alícuota}}$ = 5 mL

P_{muestra} = 1 g

$$C_{\text{AH}} = C_{\text{ET}} - C_{\text{AF}}$$

C_{AH} = Carbono extraíble de los ácidos húmicos

C_{ET} = Carbono extraíble Total

C_{AF} = Carbono extraíble de los ácidos fúlvicos

Interpretación de resultados

El contenido de sustancias húmicas y carbono orgánico está en función del contenido de materia orgánica de la muestra. Al haber un alto contenido de materia orgánica se espera un alto contenido de carbono orgánico y sustancias húmicas.

En el abono orgánico sólido el contenido de sustancias húmicas varía en función de la relación C/N, contenido de lignina y taninos, el contenido de Ca y Mg, y el contenido de humedad de la materia vegetal a utilizar.

Dependiendo de estos contenidos se acelerará o retardará la degradación de la materia orgánica hasta humus. Por ejemplo, las leguminosas presentan una baja relación C/N (10 – 15), un bajo contenido de lignina y taninos, y un alto contenido de Ca y Mg, lo que hace que la descomposición sea más rápida, sin embargo al final el humus tendrá muy bajo contenido de materia orgánica y sustancias húmicas, pero tendrá un alto contenido de minerales (Ca y Mg).

Los cereales presentan un elevado contenido de lignina y taninos, al igual que relación C/N, por lo que conlleva un proceso de humificación más lento con mayor contenido de materia orgánica y mayor contenido de ácidos húmicos y fúlvicos pero con bajo contenido de nutrientes disponibles para la planta.

Es importante recordar que el contenido de humedad del sustrato es un factor clave en la degradación de la materia orgánica debido al papel tan importante que juega el agua en las funciones metabólicas de los microorganismos y en los cambios físicos que produce.

58

MEDICIÓN DE LA TASA DE RESPIRACIÓN DE LA BIOMASA MICROBIANA EN SUELOS Y ABONOS ORGÁNICOS SÓLIDOS

Se utilizó la técnica de Jenkinson y Powlson (1976), la cual permite cuantificar el contenido de carbono del suelo (expresado como CO₂) que fue respirado por los microorganismos del suelo en diferentes períodos de tiempo.

Materiales y métodos

HIDRÓXIDO DE SODIO (NaOH) 1 N

Pesar 40 g y disolver en medio litro de agua destilada hervida, aforar a 1 L.

ACIDO CLORHÍDRICO (HCl) 1 N

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

HCl 0.1 N

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

Valoración del HCl 1 y 0.1 N

Tomar 5 mL de HCl que se desea valorar agregar 3 gotas de anaranjado de metilo, adicionar la solución de NaHCO_3 1 N (pesar 84.01 g de NaHCO_3 anhidrido y disolver en 1 L de agua destilada). El vire es de canela a amarillo. Para determinar la normalidad real del bicarbonato de sodio:

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

P_{NaHCO_3} = Peso de bicarbonato de sodio para 1 L

N_{NaHCO_3} = Normalidad calculada

$P\text{-eq}$ = peso equivalente del sodio

Para calcular la normalidad real del HCl valorado:

59

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

N_{NaHCO_3} = Normalidad real del bicarbonato de sodio

Vol. promedio = volumen promedio gastado de NaHCO_3 para titular el HCl

Alícuota = volumen usado de HCl para la titulación

Indicador anaranjado de metilo

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

Indicador fenolftaleína

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

Para calcular el contenido de carbono mineralizado por la microflora de la muestra, en $\text{mgC-CO}_2/\text{kg}_{\text{ss}}$, se utilizará la siguiente fórmula:

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

kg_{ss} = suelo seco

V_{HClM} = mL de HCl consumidos por la muestra

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

N_{HCl} = Normalidad del ácido clorhídrico

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

12 = equivalente químico del C

P_{muestra} = Peso de la muestra

61

Interpretación de resultados

La cantidad de carbono mineralizado que se mide en la retrotitulación está en función de la abundancia y actividad de microorganismos aerobios de la muestra. En este parámetro también influye la humedad de las muestras, porque de esta depende el desarrollo de las funciones metabólicas de los microorganismos. La tasa de respiración se puede utilizar como un parámetro de actividad microbiana en muestras de suelos y en suelos enriquecidos con abonos orgánicos.

Determinación del CH_4 y N_2O liberados por la microflora del suelo y la degradación aerobia de la materia orgánica

Un gas de efecto invernadero es aquel que absorbe radiación en determinadas longitudes de onda del espectro de radiación infrarroja que es emitido por la superficie y por las nubes.

El gas, a su vez, emite radiación infrarroja desde un nivel en el

que la temperatura es más baja que en la superficie.

El calentamiento ocurre, porque parte de la energía absorbida queda atrapada, por lo que la superficie tiende a calentarse. En la atmósfera, los gases de efecto invernadero son, básicamente: vapor de agua (H₂O), dióxido de carbono (CO₂), óxido nitroso (N₂O), metano (CH₄) y ozono (O₃).

Más aún las concentraciones atmosféricas globales de CO₂, CH₄ y N₂O han aumentado como resultado de las actividades humanas desde 1750, y ahora han excedido los valores previos a la revolución industrial obtenidos de muestras de hielo de hace cientos de años, los incrementos globales en la concentración de CO₂ se deben a la quema de combustibles fósiles y al cambio de uso del suelo, mientras los incrementos del CH₄ y N₂O se deben principalmente a la agricultura.

En términos de impacto en el ambiente, de acuerdo al Panel Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC) creado en 1988 por la Organización Meteorológica Mundial (OMM) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), el CH₄ y el N₂O contribuyen 21 y 310 veces, respectivamente, más que el CO₂ al calentamiento global.

La agricultura es una fuente y a la vez un sumidero de gases de efecto invernadero (GEI) y el uso intensivo del suelo ha aumentado el intercambio de carbono (C) y nitrógeno (N) entre el suelo y la atmósfera, siendo responsable de al menos el 20% de las emisiones totales de GEI, y de cerca del 50% de las emisiones de metano y del 70% de las de óxido nitroso, en cuanto a las emisiones de dióxido de carbono, la agricultura juega un papel relativamente pequeño.

Los suelos con alto contenido de materia orgánica presentan una mayor absorción o retención de CO₂, 15 a 20% mayor contenido que en suelos convencionales, equivalente a sacar 3500 lb-CO₂/ha (lb de CO₂ por ha), además favorecen la eliminación del metano por medio de su oxidación biológica por organismos metanotróficos.

El nitrógeno contenido en la materia orgánica mineralizable se libera gradualmente, lo que permite que los niveles de nitrógeno libre y en forma de nitratos y amonio sea más bajo, y por consiguiente las emisiones de óxido nitroso son menores; pero al incorporar residuos vegetales, especialmente los que provienen de plantas fijadoras de nitrógeno, emiten cantidades significativas de óxido nitroso, pero no al nivel generado por los fertilizantes químicos.

El proceso de compostaje provoca un impacto en la calidad del

aire, por la producción de: NH_3 , CH_4 y N_2O . La liberación de estos gases esta directamente ligada a la relación C/N de los materiales originales, si presentan un alto contenido de proteínas, la relación C/N será baja, por lo que la descomposición será rápida, liberando más metano y dióxido de carbono, pero se liberará poco óxido nitroso, por el contrario si el material esta muy lignificado, la relación C/N será alta, por lo tanto la descomposición será lenta, en este caso se liberará menos dióxido de carbono y metano, pero se liberará más óxido nitroso, por lo que es necesario tener materiales con relación C/N intermedia.

Condiciones de corrida en cromatografía de gases para cuantificación de metano

- Detector de Ionización de Flama (FID)
- Temperatura inicial del horno: 55 °C
- Temperatura del detector: 65 °C
- Temperatura final del horno: 100 °C
- Columna: *stainless steel*⁴ (ss)
- Soporte: aluminio activado
- Capilar: 10 m CP-Sil 5 CB (0.25 mm de diámetro interno) *Long*⁵: 1 m OD 1/8
 - Empaque: 1 m 10% SE-30 (2 mm de diámetro interno)
 - Ancho del tubo: 10 m CP-Sil 5 CB (0.53 mm de diámetro interno)
 - Rango de malla: 100-120
 - Gas acarreador: H_2 30 mL/min
 - Aire 250 mL/min

63

Procedimiento

1. Pesar 30 g de suelo y colocar en frasco de 250 mL, ajuste la CRA al 40%. Deje airear y tape herméticamente con tapón de goma.

2. Incube a 25 °C y realice muestreos periódicos a los 0, 7, 14 y 28 días, tomando muestras a su vez a las 0, 24 y 48 h después de cada período de incubación. Los muestreos se harán tomando 1 mL de gas en cada frasco con una jeringa e inyectando este en el cromatógrafo. Abrir a los 15 días para evitar anaerobiosis.

3. Las concentraciones del gas se calculan a partir de una curva estándar elaborada con CH_4 50 ppm usando 0, 250, 500 y 1000 ppm del gas.

Condiciones de corrida en Cromatografía de Gases para cuantificación de óxido nítrico

- Detector de captura de electrones (DEC)
- Temperatura inicial del horno: 35 °C
- Temperatura del detector: 250 °C
- Temperatura del inyector: 65 °C
- Temperatura final del horno: 100 °C
- Columna: *Stainless steel*⁴ (ss) Porapack Q
- Soporte: aluminio activado
- Capilar: *Long*⁵: 1 m OD 1/8
- Rango de malla: 80/100
- Gas acarreador: He flujo 55 mL/min

Procedimiento

1. Pesar 30 g de suelo y colocar en frasco de 250 mL, ajuste la CRA al 40%. Deje airear y tape herméticamente con tapón de goma.

64

2. Incube a 25 °C y realice muestreos periódicos a los 0, 7, 14 y 28 días, tomando muestras a su vez a las 0 y 48 h después de cada período de incubación. Los muestreos se harán tomando 1 mL de gas de cada frasco con una jeringa e inyectando este en el cromatógrafo. Abrir a los 15 días para evitar anaerobiosis.

Las concentraciones del gas se calculan a partir de una curva estándar elaborada con N₂O 50 ppm usando 0, 250, 500 y 1000 ppm del gas.

⁴ Acero inoxidable.

⁵ Largo.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar S. A. 1988. Materia orgánica. *En*: Aguilar S. A. (ed.). Métodos de análisis de suelos. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C., Departamento de Suelos, Universidad de Chapingo. México. 88 p.

Alexander, M. 1994. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor, S. A. 2ª Ed. México, pp: 13–26.

Algaidi, A. A. A. 2009. Predicting NO, N₂O and CO₂ emission from agricultural soil through related environmental parameters. PhD Thesis in Environmental Science, Institute of Environmental Science, Hungría. 181 p.

Allison L. E., W. B. Bollen y C. D. Moodie. 1965. Total Carbon. *In* : C. A. Black *et al.* (eds.) Methods of soil analysis, Part 2. Agronomy, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, 9: pp. 1346–1366.

Álvarez-Sánchez M. E. y A. Marín-Campos. 2011. Manual de procedimientos analíticos de suelo y planta Laboratorio de Química, Departamento de Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 66 p.

Bray R. H. y L. T. Kurtz. 1945. Determination of total, organic, and available phosphorus in soil. *Soil Science*. 59: 39–45.

Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. *In*: C. A. Black (ed.), Methods of soil analysis. Part. 2. Agronomy, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. pp. 1149–1178

Burdon J. 2001. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic?. *Soil Science*. 166: pp. 752–769.

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

Chen, J. H., J. T. Wu y W. T. Huang. 2001. Effects of compost on the availability of nitrogen and phosphorus in strongly acidic soils. Taiwan ROC. pp. 1–10.

CSTPA. Council on Soil Testing and Plant Analysis. 1980. Handbook on Reference Methods for Soil Testing. Athens, Georgia, USA. 459 p.

Cubasch, U., D. Wuebbles, D. Chen, M. C. Facchini, D. Frame, N. Mahowald, y J.-G. Winther, 2013: Introduction. *In*: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T. F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P. M. Midgley (eds.)].

Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 40 p.

Davies G. y E. A. Ghabbour (eds.) 1999. Humic substances, structures, properties and uses. The RSC, Cambridge, USA. 259 p.

Fuentes F. y A. Massol-Deyá. 2002. Manual de Laboratorios Ecología de microorganismos. Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico, 17 p.

Ginting, D., A. Kessavalou, B. Eghball y J. W. Doran. 2003. Greenhouse gas emissions and soil indicators four years after manure and compost applications. *Journal of environmental quality*, 32: 23–32.

Haluschak P. 2006. Laboratory methods of soil analysis. Canada-Manitoba Soil Survey. Canada. 133 p.

He, Y. W., Y. Inamori, M. Mizuochi, H. N. Kong, N. Iwami y T. H. Sun. 2000. "Measurements of N₂O and CH₄ from the aerated composting of food waste", *Sci. Total Environ.* 254(1): 65–74.

Hellmann, B., L. Zelles, A. Palojarvi y Q. Bai. 1997. "Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-windrow composting". *Appl. Environ. Microbiol.* 63(3): 1011–1018.

Horneck D. A., D. M. Sullivan, J. S. Owen y J. M. Hart. 2011. Soil test interpretation guide. Oregon State University, Oregon, USA. 12 p.

Houghton, J. T., L. G. Meira Filho, D. J. Griggs y K. Maskell. 1997. Estabilización de los gases atmosféricos de efecto invernadero: implicaciones físicas, biológicas y socioeconómicas. Documento III. Editado por el Panel Intergubernamental para el Cambio Climático del OMM y PNUMA. 63 p.

IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. 2006. *2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories*. National Greenhouse Gas Inventories Programme. [Eggleston, H. S., Buendia, L., Miwa, K., Ngara, T. & Tanabe, K. (eds.)]. IGES, Japón.

Jackson M. L. 1964. Análisis químico de suelos. Traducción al español por J. Beltrán M. editorial Omega, Barcelona, España

Jenkinson D. S. y D. S. Powlson. 1976. The effect of biocidal treatments on metabolism in soil. I. Fumigation with chloroform. *Soil biology and biochemistry*, 8:167–177.

Jenkinson D. S. y D. S. Powlson. 1976. The effect of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil biology and biochemistry*, 8:209–213.

Jenkinson D. S. 1988. The determination of microbial biomass

carbon and nitrogen in soil. *In: advances in nitrogen cycling in agriculture ecosystems* (J.R. Wilson, Ed.) . CAB international Wallingfor, pp. 368–386.

Karam A. 2008. Chemical properties of organic soils. *In: Soil sampling and methods of analysis*. 2da edición, editado por M. R. Carter y E. G. Gregorich, Canadian Society of Soil Science, Taylor and Francis Group, 331–340.

Klöcking R. y B. Helbig. 2005. Medical aspects and applications of humic substances. *In: Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*. Edited by A. Steinbüchel y R. HORAS. Marchessault, Weinheim, 16 p.

Kravchenko, I., P. Boeckx, V. Galchenko y O. Van Cleemput. 2002.

Short- and medium-term effects of NH_4^+ on CH_4 and N_2O fluxes in arable soils with a different texture. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 669–678.

Lang S. S. 2005. Agricultura orgánica produce los mismos rendimientos en maíz y soya que en los cultivos convencionales, pero consume menos energía y no utiliza pesticidas. Boletín de noticias de la Revista Chile orgánico, Editado por la Agrupación de agricultura orgánica de Chile.

Lotosh T. D. 1991. Experimental bases and prospects for the use of humic acid preparations from peat in medicine and agricultural production. (In Russian) *Nauch. Dokl. Vyss. Skoly. Biol. Nauki*. 10: 99–103.

Mäder, P., A. Fliebach, D. Dubois, L. Gunst, P. Fried y Urs Niggli. 2002. Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science*; vol. 296: 1694–1697.

Mesut-Cimrin, K. y I. Yilmaz. 2005. Humic acid applications to lettuce do not improve yield but do improve phosphorus availability. *Taylor & Francis Group*. 23: 57–60.

Nathan M. V., J. A. Stecker y Y. Sun. 2012. *Soil Testing in Missouri A guide for conducting soil tests in Missouri*. University Extension Division of Plant Sciences, College of Agriculture, Food and Natural Resources, University of Missouri, USA, 49 p.

Nelson, D. W. y L. E. Sommers. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. *In: Methods of soil analysis; Part 2 -Chemical and microbiological properties*. 2a ed. Soil science Society of America. Madison, Wisconsin E. U. A. p 539–577.

NMX-AA-132-SCFI-2006. Aprobada por el comité consultivo

nacional de normalización para muestreo de suelos contaminados con metales y metaloides, para en caso de contaminación, ser remediados. 32 p.

NOM-021-RECNAT-2000. Método AS-07 para determinar contenido de materia orgánica en muestras de suelo. Aprobada por el Comité Consultivo Nacional de Normalización para la Conservación, Protección, Restauración y Aprovechamiento de los Recursos Forestales de Suelos y Costas, en sesión celebrada el 14 de agosto de 2001. 85 p.

Oglesby R. T., R. F. Christman, C. H. Driver. 1967. The biotransformation of lignin to humus facts and postulates. *Adv. Appl. Microbiol.* 9: 171–184.

Olsen S. R. y L. A. Dean. 1965. Phosphorus. *In*: C.A. Black (ed.) *Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9.* American Society of agronomy, Madison, Madison, USA. pp. 1035–1049.

Quatmane, A., M. Hafidi, M. El Gharous y J. C. Revel. 1999. Complexation of calcium ions by humic and fulvic acids. *Analysis*, 27:428–432.

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

Peña-Méndez E., J. Havel y J. Patočka. 2005. Humic substances-compounds of still unknown structure: applications in agricultura, industry, environment, and biomedicine. *Journal of applied biomedicine*, 3: 13–24.

Perry, M. y C. Rosenzweig. 2002. Chapter 24: Global warming changes the forecast for agricultura. Publicado por International Food Policy Research Institute..pp. 151–156.

Richards L. A. 1990. Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos. 6ta edición, departamento de agricultura de Estados Unidos de América, Editorial Limusa, México, D.F.

Rodríguez-Suppo, F. 1996. Fertilizantes nutrición vegetal. AGT Editor, 3^{ra} edición, pp. 33–46

Roig, A., A. Lax, J. Cegarra, F. Costa y M. Hernández. 1988. Cation-exchange capacity as a parameter for measuring the humification degree of manures. *Soil Science* 146: 311–316.

Sánchez Monedero M. A., A. Roig, C. Martínez Pardo, J. Cegarra y C. Paredes. 1996. A microanalysis method for determining total organic carbon in extracts of humic substances. Relationships between total organic carbon and oxidable carbon. *In*: *Bioresource Technology.* 57:291–295.

Semple, K. T., B. J. Reid y T. R. Fervor. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ. Pollution* 112: 269–283.

Soil Survey Staff. 2014. Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual. Soil Survey Investigations Report No. 51, Version 2.0. R. Burt and Soil Survey Staff (ed.). U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. 487 p.

Tan, K. H. 2003. Humic matter in soil and the environment, Principles and Controversies. Marcel Dekker, New York, NY. 408 p.

Vance E. D., P. C. Brookes y D. S. Jenkinson. 1986. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil biology and biochemistry*, 19:703–707

Volke-Sepúlveda, T., J. A. Velasco Trejo. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Editorial INE-SEMARNAT. pp. 37–38.

Zhang M. y Z. He. 2004. Long-term changes in organic carbon and nutrients of an Ultisol under rice cropping in southeast China. *Geoderma*. 118: 167–179

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

Cipriano García Gutierréz¹

Jaime Alberto Félix Herrán²

Antonio Cardenas Flores³

Blanca Estela Gómez Luna⁴

Graciela Ma. de la Luz Ruiz Aguilar⁵

Análisis de la biomasa microbiana de suelos y abonos orgánicos sólidos

BIOMASA MICROBIANA DEL SUELO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Como otros tratamientos biocidas, la fumigación acelera brevemente la oxidación de la materia orgánica del suelo, comparado a un suelo no fumigado. En su trabajo de 1966, Jenkinson propone que esta diferencia de descomposición es completamente causada por la mineralización de los organismos muertos durante la fumigación. Esto permite relacionar el tamaño de biomasa presente en el suelo, con la diferencia de mineralización entre un suelo fumigado y uno no fumigado. Esta diferencia de mineralización es definida por Jenkinson y Powlson (1976) como la diferencia de oxígeno consumido (o CO₂ emitido o N mineralizado) entre un suelo fumigado y un suelo no fumigado y en este trabajo se le llamará *flux* de CO₂ emitido o N mineralizado. Este *flux* de CO₂, está entonces definido como:

72

$$F_c = (\text{C-CO}_2 \text{ obtenido del suelo fumigado}) - (\text{C-CO}_2 \text{ obtenido del suelo no fumigado})$$

En una serie de artículos Jenkinson y cols. (1976) establecieron las bases para validar su teoría: mostraron que más CO₂ se producía de un suelo en incubación aerobia posterior a una fumigación con cloroformo libre de etanol siguiendo su remoción, que de un suelo similar sin fumigar; además, demostraron que este CO₂ extra proviene de las células microbianas muertas cuando son descompuestas por la población recolonizante. Ellos sugirieron que la cuantificación de la diferencia o *flux* de CO₂, puede proveer una estimación de la cantidad de biomasa en el suelo.

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

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

la materia orgánica no viva.

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

El cloroformo es escogido como fumigante debido a que es un producto comercial más fácil de remover en un suelo que el metil-bromido, formaldehído y el cloropicrin. En la medición del *flux* de CO₂, es importante que todas las trazas del fumigante sean removidas. Una remoción incompleta del fumigante puede interferir con la actividad de los microorganismos, sirviendo a estos como sustrato. Es por esto que el cloroformo debe estar libre de etanol, que generalmente se encuentra en la presentación normal del reactivo y que puede servir como sustrato. El cloroformo provoca la muerte celular, al lisar las membranas celulares; la lisis de las células microbianas depende del tiempo, de la temperatura, así como de la localización de los microorganismos en la estructura del suelo y de las propias características del suelo, tales como porosidad y materia orgánica, arcilla y contenido de carbonatos. Temperaturas bajas y tiempo de fumigación cortos pueden afectar los factores (k_c) y así la estimación de biomasa microbiana.

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

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

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

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

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

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

El método F-I no puede ser usado en suelos que han sido recientemente secados (*air dried*): El secado por aire mata parte de la biomasa y adiciona algo de carbono que no es de biomasa. El F-I da valores de biomasa erróneos en suelos que contienen una gran cantidad de CaCO_3 libre, suelos a los que se les haya adicionado sustrato recientemente, suelos inundados, o suelos con un pH menor a 4.5.

Materiales y métodos

74

NaOH 1 N

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

HCl 1 N

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

HCl 0.1 N

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

Valoración del HCl 1 y 0.1 N

Tomar 5 mL de HCl que se desea valorar agregar tres gotas de anaranjado de metilo, adicionar la solución de NaHCO_3 1 N (pesar 84.01 g de NaHCO_3 anhídrido y disolver en 1 L de agua destilada). El vire es de canela a amarillo. Para determinar la normalidad real del bicarbonato de sodio:

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

P_{NaHCO_3} = peso de bicarbonato de sodio para 1 L.

N_{NaHCO_3} = normalidad calculada.

$P - eq$ = peso equivalente del sodio.

Para calcular la normalidad real del HCl valorado:

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

N_{NaHCO_3} = normalidad real del bicarbonato de sodio.

Vol. promedio = volumen promedio gastado de NaHCO_3 para titular el HCl.

Alícuota = volumen usado de HCl para la titulación.

INDICADOR ANARANJADO DE METILO

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

75

INDICADOR FENOLFTALEÍNA

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

Procedimiento

PREINCUBACIÓN

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

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

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

DETERMINACIÓN DE CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA

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

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

Posteriormente, tanto los frascos con suelo fumigado como los que contienen suelo no fumigado son transferidos a frascos herméticos de 970 mL cada uno conteniendo un frasco con 20 mL de NaOH 1 M, además se agregan 20 mL de H₂O en el fondo del frasco de 970 mL para estabilizar la atmósfera. Todas las muestras son incubadas en oscuridad durante 10 días a 25 °C.

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

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

kg_{ss} = suelo seco

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

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

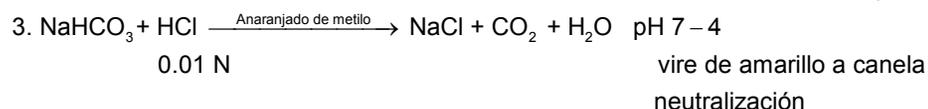
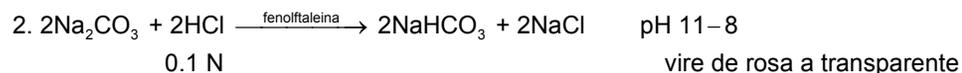
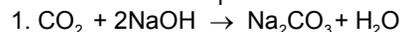
N_{HCl} = Normalidad del ácido clorhídrico

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

12 = equivalente químico del C

P_{muestra} = Peso de la muestra

Las reacciones que ocurren en la titulación son:



TITULACIÓN DEL NaOH 1 N

Tomar alícuotas de 5 mL de NaOH 1 N y adicionar 20 mL de H_2O , agregar 1 gota de indicador (fenolftaleína), y adicionar HCl 0.1 N, el cual neutralizara el excedente de NaOH que no reaccionó, se verifica con el paso de solución color púrpura o rosa a transparente, una vez hecho el vire de color, adicionar 5 gotas de indicador anaranjado de metilo, y adicionar HCl 0.01 N, con el cual titularemos el CO_2 secuestrado por el NaOH 1 N. Para verificarlo se observa el cambio de anaranjado a canela. A este procedimiento se le llama retrotitulación.

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

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

kg_{ss} = kg de suelo seco

C-CO₂ fumigado = carbono del dióxido de carbono del suelo fumigado

C-CO₂ no fumigado = carbono del dióxido de carbono del suelo no fumigado.

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

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

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

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

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

78

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

E_C = carbono orgánico extraíble

B_C = carbono de la biomasa microbiana

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

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

Materiales y métodos

NaOH 1 M

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

HCl 1 N

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

HCl 0.1 N

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

Valoración del HCl 1 y 0.1 N

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

INDICADOR ANARANJADO DE METILO

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

INDICADOR ORTOFENANTROLINA (FERROINA)

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

INDICADOR FENOLFTALEÍNA

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

DICROMATO DE POTASIO 0.4 N

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

SULFATO DE POTASIO 0.5 M

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

MEZCLA DIGESTORA

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

SULFATO FERROSO AMONICAL 0.2 N

Pesar 78.428 g de sulfato ferroso amoniacal $[\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{SO}_4] \times 6\text{H}_2\text{O}$, agregar agua destilada y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado Aforar a 1 L con agua destilada. El ácido sulfúrico se agrega con la finalidad de evitar que el sulfato se oxide rápidamente y la normalidad cambie.

Procedimiento

PREINCUBACIÓN

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

DETERMINACIÓN DE CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA

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

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

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

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

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

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

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

El contenido de carbono inorgánico se determina en base al CO_2

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

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

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

kg_{ss} = suelo seco

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

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

N_{SFA} = Normalidad del sulfato ferroso amoniacal

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

81

P_{muestra} = Peso de la muestra

0.003 = miliequivalente químico del C.

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

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

kg_{ss} = kg de suelo seco

C-CO₂ fumigado = carbono del dióxido de carbono del suelo fumigado

C-CO₂ no fumigado = carbono del dióxido de carbono del suelo no fumigado.

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

CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO INORGÁNICO (NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+)

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

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

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

82

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

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

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

Se determina la concentración de nitratos, nitritos y amonio mediante. Se toma el suelo que se incubó para determinar el C de la biomasa microbiana, y se le agregan 120 mL de K_2SO_4 0.5 M, se coloca en un agitador horizontal a 180 opm durante 60 min, una vez finalizada la agitación el suelo se filtra con papel whatmann núm. 42. El K_2SO_4 0.5 M obtenido se almacena a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para posteriores análisis.

Reactivos

K_2SO_4 0.5 M

Pesar 87.135 g de K_2SO_4 y disolver en 1 L de agua destilada.

Clarificación de las muestras

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

83

MÉTODO DEL SULFATO DE ZINC ($ZnSO_4$)

Solución de $ZnSO_4$

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

Procedimiento

Agregar 1 o 2 mL de la solución de $ZnSO_4$ a 100 mL de muestra. Ajustar el pH a 10.5 y dejar reposar unos minutos. Filtrar con papel Whatman núm. 42.

MÉTODO DEL HIDRÓXIDO DE ALUMINIO [$Al(OH)_3$]

Suspensión de $Al(OH)_3$

Disolver 125 g de alumbre de potasio [$K_2Al_2(SO_4)_4 \times 24H_2O$] y disolver en 1000 mL de agua destilada, calentar a $60\text{ }^\circ\text{C}$ y agregar posteriormente 55 mL de hidróxido de amonio (NH_4OH) concentrado lentamente y en agitación constante.

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

Procedimiento

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

NITRATOS (NO_3^-)

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

Esta determinación se basa en la cuantificación del NO_3^- con el ácido 2, 4- fenildisulfónico en un medio ácido, que la añadir el KOH desarrolla el color amarillo de la sal potásica del ácido nitrofenoldisulfónico.

84

Materiales y métodos

ÁCIDO FENILDISULFÓNICO

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

KOH 12 N

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

Procedimiento

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

2. Se toma una alícuota de 10 mL de K_2SO_4 0.5 M de cada muestra, y evaporar a sequedad a 105°C por 24 h.

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

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

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

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

SOLUCIÓN STOCK DE NO_3^-

1. Secar KNO_3 en un horno a 105°C por 24 h.
2. Disuelva 0.7218 g en agua y afore a 1 L con agua destilada (concentración de $100 \mu\text{gNO}_3^- \text{-N/mL}$).
3. Preservar con 2 mL de cloroformo (CHCl_3)/L; esta solución es estable por al menos seis meses.

4. Solución estándar de NO_3^- ; diluya 50 mL de la solución madre de nitrato en 500 mL con agua destilada; para obtener una solución de concentración $10.0 \mu\text{gNO}_3^- \text{-N/mL}$.

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

85

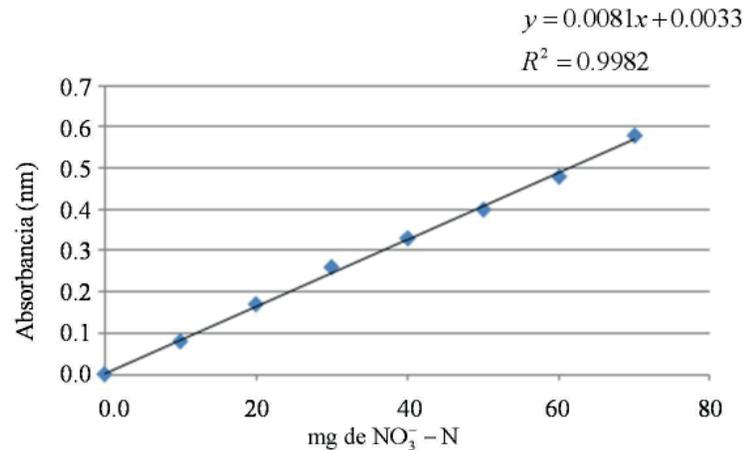


Figura 1. Curva de la solución estándar de KNO_3 ($10.0 \mu\text{g}$) a 410 nm.

NITRITOS (NO_2^-)

El contenido de nitritos en suelo normalmente es muy pequeño;

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

Materiales y métodos

ÁCIDO ETILENDIAMINTETRAACÉTICO DISÓDICO (EDTA DISÓDICO)

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

ÁCIDO SULFANÍLICO

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

CLORHIDRATO DE NAFTILAMINA

86

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

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ACETATO DE SODIO 2 M

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

Procedimiento

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

2. Se toma una alícuota de 10 mL de K_2SO_4 0.5 M de cada muestra, y se le agregan 40 mL de agua destilada y/o desionizada.

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

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

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

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

SOLUCIÓN STOCK DE NO_2^-

1. Pesar 1.232 g de NaNO_2 y aforar a 1 L con agua destilada (concentrado de $250 \mu\text{g NO}_2^- \text{-N/mL}$).

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

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

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

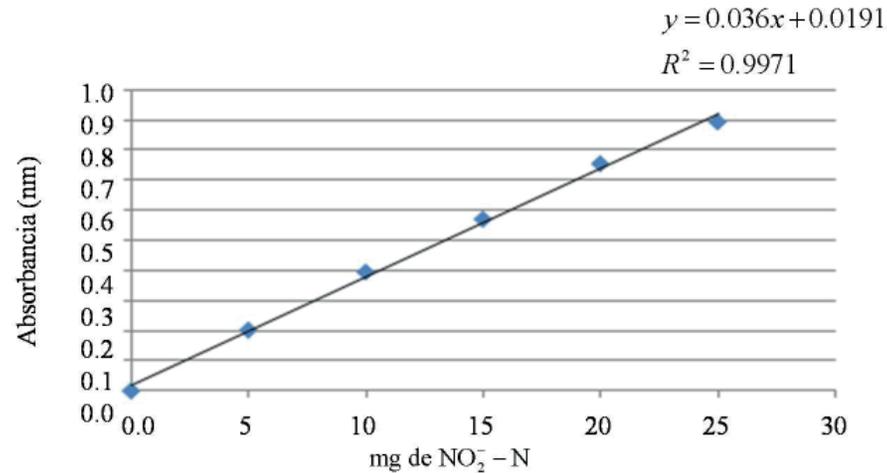


Figura 2. Curva de la solución estándar de nitrito de sodio ($5.0 \mu\text{g}$) a 520 nm.

AMONIO (NH_4^+)

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

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

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

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

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

88

Materiales y métodos

NITROPRUSIATO-SALICILATO

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

ÁCIDO ETILENDIAMINTETRAACÉTICO DISÓDICO (EDTA DISÓDICO)

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

AMORTIGUADOR DE HIPOCLORITO DE SODIO

- Disolver 2.96 g de NaOH en 10 mL de agua destilada con agitación magnética.
- Pesar 9.96 g de fosfato de sodio dibásico y disolverlo en 65 mL de agua destilada con agitación magnética hasta que esté completamente disuelto y transparente (no refrigerar). Agregar el fosfato disuelto en agua al NaOH, lentamente y con agitación magnética.
- Posteriormente agregar 10 mL de hipoclorito de sodio (cloralex)

por cada 100 mL de solución. Agitar hasta homogenizar. Aforar a 100 mL con agua destilada. Colocar la solución en un frasco y no refrigerar (duración no mayor a 2 semanas, pues se precipitan las sales).

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

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

Procedimiento

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

2. Se toma una alícuota de 1.5 mL de K_2SO_4 0.5 M de cada muestra, y se procesan de la siguiente manera: a cada frasco se le agregan 0.5 mL de EDTA disódico (esta solución evita interferencia por precipitación de cationes polivalentes particularmente el Ca^{2+} y el Mg^{2+}), 2 mL de nitroprusiato, 2.5 mL de agua y 1 mL de amortiguador de hipoclorito de sodio y mezclar manualmente. Por último se agregan 1.5 mL de agua destilada.

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

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

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

Solución stock de NH_4^+

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

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

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

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

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

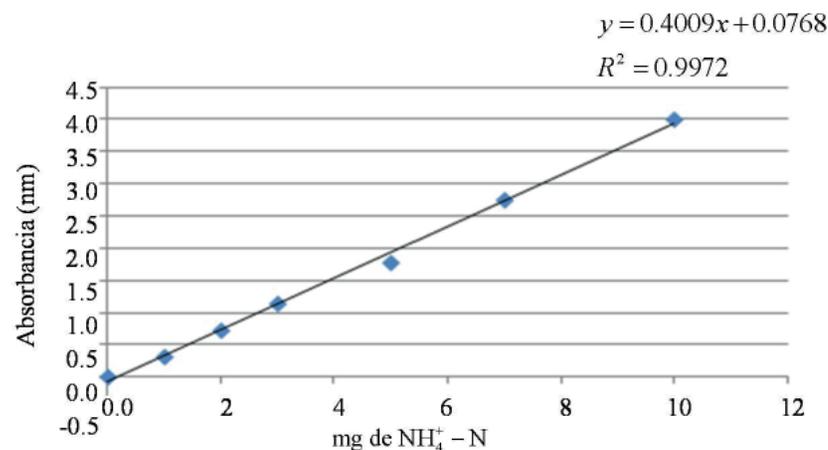


Figura 3. Curva de la solución estándar de sulfato de amonio ($2.0 \mu\text{g}$) a 660 nm .

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA

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

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

Hay diversos reportes de que los sistemas de deshidrogenasas se han utilizado para comparar suelos sin perturbar y suelos agrícolas,

para evaluar la incorporación de residuos frescos al suelo, y para evaluar suelos perturbados y suelos contaminados con metales pesados, pesticidas y por lluvia ácida. El método se basa en el supuesto de que en condiciones de anaerobiosis (ausencia de O₂) el cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolium (TTC) actúa como aceptor de H, formándose el rojo de trifeniltetrazoliumformazan (TPF). Esto se puede explicar con la siguiente reacción:



Materiales y métodos

Reactivos

- ACETONA O ALCOHOL METÁLICO GRADO REACTIVO
- CARBONATO DE CALCIO

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

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

SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE ROJO DE TRIFENILTETRAZOLIUMFORMAZAN (TPF)

Pesar 100 mg de TPF y disolver en 80 mL de acetona grado reactivo, después de esto, aforar a 100 mL con acetona grado reactivo, la concentración final de la solución será 1000 µg de TPF/mL de acetona.

PREPARACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE TPF

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

Procedimiento

Se pesan 2 gramos de suelo, previamente ajustada su CRA al 40%, en tubos de ensayo de 16 x 150 mm por triplicado, y se adicionan 67 mg de CaCO₃, 1 mL de solución de TTC y 2.5 mL de agua destilada.

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

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

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

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

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

92
$$\text{Actividad deshidrogenasa} = \frac{(\text{TPF})(40)}{P_{\text{muestra}}}$$

TPF = concentración de TPF en μg / mL.

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

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

Evaluación de microbiológica de suelos y abonos orgánicos sólidos

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

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

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

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

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

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

MÉTODO COMÚN DE SIEMBRA MICROBIOLÓGICA

Materiales y métodos

PREPARACIÓN DE INÓCULO

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

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

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

SIEMBRA

1. Sembrar las diluciones predeterminadas anteriormente según el grupo microbiano a estudiar. En el caso de la siembra por el método *de viables*, se realizará por triplicado y se sembrará 1 mL de la dilución. En este caso se debe añadir el medio de cultivo con una temperatura que lo soporte la mejilla del microbiólogo. Una vez añadido el medio se agita la placa horizontalmente 5 veces a la derecha y cinco veces a la izquierda, teniendo cuidado de forma que no se derrame el medio fundido.

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

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

94

Cuenta viable de bacterias totales

Para la cuantificación de bacterias totales se deben preparar diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), como se explicó en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in² durante 20 min o a 20 lb/in² durante 15 min.

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

Medio extracto de suelo (Zuberer, 1986)

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos para: 1000 mL de medio

- pH: 6.8–7.0
- Agar: 15.0 g
- Glucosa: 1.0 g
- K_2HPO_4 : 0.5 g
- Extracto de suelo: 100.0 mL
- H₂O destilada: 900 mL

Procedimiento

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

1. Se tamiza el suelo con malla 20.
2. Se agrega agua destilada relación 1:1 (suelo: agua).
3. Esterilizar la mezcla por 20 min a 15 lb/in².
4. Se filtra en embudo con papel filtro y algodón.
5. Se agrega CaCO₃ (es opcional) 0.5 g/L.

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

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

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

REACTIVOS PARA 1000 ML

- K₂HPO₄: 0.5 g
- NO₃×NH₄O: 15 g
- Carboximetil celulosa: 1.25 g
- Agar: 20 g
- Extracto de suelo⁶: 100 mL
- H₂O: 900 mL

Procedimiento

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

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

AGAR NUTRITIVO

Materiales y métodos

REACTIVOS PARA: 1000 mL

- Agar nutritivo: 20 g
- H₂O destilada: 1000 mL

Procedimiento

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

AGAR NUTRITIVO

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

Materiales y métodos

REACTIVOS PARA 1000 ML

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

Procedimiento

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

AGAR SOYA TRIPTICASA (MARTIN, 1975)

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

Materiales y métodos

REACTIVOS PARA 1000 ML

- Caldo soya tripticasa: 3 g

- Agar: 15 g
- Agua :1000 mL

Procedimiento

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

LECHE PEPTONADA

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

Materiales y métodos

REACTIVOS PARA 1000 ML

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

97

Procedimiento

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

AGAR CUENTA EN PLACA

Materiales y métodos

REACTIVOS PARA 1000 ML

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

Procedimiento

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

TINCIÓN GRAM

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

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

Reactivos

- Alcohol cetona
- Safranina
- Cristal violeta
- Lugol

98

Procedimiento

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

Cuenta viable de actinomicetos

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

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

menos diluciones (10^{-1} y 10^{-2}), en caso de que en la dilución 10^{-2} la abundancia sea incontable, se puede preparar una dilución más, como se explicó en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in² durante 20 min o a 20 lb/in² durante 15 min.

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

MEDIO CZAPECK DOX

Materiales y métodos

- Agar de Czapeck Dox 50 g/L

Procedimiento

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

99

MEDIO CASEÍNA AGAR

Materiales y métodos

REACTIVOS PARA: 1000 mL PH 7.0

- Almidón soluble: 10 g
- Caseína: 1 g
- KH_2PO_4 : 0.5 g
- Agar: 10 g
- H_2O destilada: 1000 mL

Procedimiento

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

AGAR DE ALMIDÓN Y CASEÍNA

Materiales y métodos

REACTIVOS PARA 1000 ML

- Agar: 15 g
- Almidón: 10 g

- Caseína (libre de vitaminas): 0.3 g
- KNO_3 : 2.0 g
- NaCl : 2.0 g
- K_2HPO_4 : 2.0 g
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 0.05 g
- CaCO_3 : 0.02 g
- $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 0.01 g
- Agua: 1000 mL

Procedimiento

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

Cuenta viable de propágulos de hongos

En los medios de cultivo para cuantificación de hongos en muestras de suelo y abonos orgánicos, se deben preparar diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), como se explicó en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in² durante 20 min o a 20 lb/in² durante 15 min.

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

MEDIO MARTIN

Reactivos para: 1000 mL pH 5.5-6.0

- K_2HPO_4 : 1.0 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g
- Peptona: 5.0 g
- Dextrosa: 10 g
- Rosa de Bengala al 1%: 3.3 mL
- Agar bacteriológico: 20 g
- H_2O : 1000 mL
- Estreptomina: 30 mg/L

La estreptomina es termolábil y se esteriliza por filtración con una membrana de 0.22 μm de tamaño de poro, se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recomienda preparar una solución madre de 100 mg de estreptomina en 10 μL de agua

Solución de rosa de bengala 1%

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

Procedimiento

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

AGAR DE PAPA DEXTROSA

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

101

Materiales y métodos

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

Procedimiento para la infusión de papa

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

Procedimiento

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

Cuenta viable de levaduras

Las levaduras son hongos que se desarrollan formando agregados

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

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

En los medios de cultivo para cuantificación de levaduras en muestras de suelo y abonos orgánicos, se deben preparar diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), como se explico en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in² durante 20 min o a 20 lb/in² durante 15 min.

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

102

AGAR CZAPEK PROPIONATO DE SODIO

Materiales y métodos

REACTIVOS PARA 100 ML

- Propionato de sodio: 3.5 g
- Sacarosa: 30 g
- Nitrato de sodio (NaNO_3): 2.0 g
- Fosfato bipotásico (K_2HPO_4): 1.0 g
- Cloruro de potasio (KCl): 0.5 g
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$): 0.5 g
- Sulfato de fierro (FeSO_4): 0.01 g
- Agar: 15 g
- Agua destilada: 100 mL

Procedimiento

Mezclar todos los componentes en 80 mL de agua, menos el FeSO_4 , mezcle bien y homogenice, agregue el FeSO_4 afore a 100 mL con agua destilada. Esterilice, deje enfriar a temperatura ambiente, ajuste el pH a 3.5 con una solución estéril de ácido láctico al 10%. Use inmediatamente. Vierta el medio en las cajas de Petri, ya que solidifique siembre. El medio puede ser almacenado sin acidificar hasta su uso.

AGAR GLUCOSA PEPTONA EXTRACTO DE LEVADURA

Materiales y métodos

1000 mL

- Glucosa: 5.0 g
- Peptona: 1.0 g
- Extracto de levadura: 2.0 g
- Nitrato de amonio (NH_4NO_3): 1.0 g
- Fosfato dipotásico (K_2HPO_4): 1.0 g
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$): 0.5 g
- Cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$): 0.01 g
- Bilis de buey bacteriológica: 5.0 g
- Propionato de sodio: 1.0 g
- Agar: 20.0 g
- Agua destilada: 940 mL

Procedimiento

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

103

MEDIO DE LIPOMYCES

Materiales y métodos

REACTIVOS PARA 1000 mL

- Glucosa: 5.0 g
- Timina: 0.5 g
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4): 1.0 g
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$): 0.5 g
- Cloruro férrico (FeCl_3): 0.01 g
- Agar purificado: 10.0 g
- Agua destilada: 940 mL

Procedimiento

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

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

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

Medio para evaluar grupos fisiológicos

En los medios de cultivo para cuantificación de bacterias y hongos degradadores de grupos fisiológicos como celulosa, quitina, lignina y pectina entre otros en muestras de suelo y abonos orgánicos, se deben preparar diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}), como se explico en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in² durante 20 min o a 20 lb/in² durante 15 min.

104

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

MEDIO MÍNIMO

Materiales y equipo

REACTIVOS PARA: 1000 mL

- Agar: 18 g
- NaNO₃: 3.00 g
- K₂HPO₄ × 3H₂O: 1.31 g
- MgSO₄ × 7H₂O: 0.50 g
- KCl: 0.50 g
- FeSO₄ × 7H₂O: 0.01 g

Procedimiento

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

Si se desean cuantificar los organismos degradadores de lignina

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

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

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

Método para solubilizadores de fósforo

En los medios de cultivo para cuantificación de bacterias y hongos solubilizadores de fósforo en muestras de suelo y abonos orgánicos, se deben preparar diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}), como se explicó en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in² durante 20 min o a 20 lb/in² durante 15 min.

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

MEDIO RAMOS CALLAO

REACTIVOS PARA: 1000 mL pH 7.0

- Extracto de levadura: 2 g
- Glucosa: 20 g
- Fosfato tricálcico: 2 g
- H₂O destilada: 1000 mL
- Agar: 22 g

Procedimiento

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

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

Hacer aclaración respecto a qué microbiota es la predominante.

Método para fijadores de nitrógeno

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

106

En los medios de cultivo para cuantificación de bacterias fijadoras de nitrógeno en muestras de suelo y abonos orgánicos, se deben preparar diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}), como se explicó en el apartado anterior. Los medios de cultivo se esterilizan a 15 lb/in² durante 20 min o a 20 lb/in² durante 15 min.

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

MEDIO WATANABE

Soluciones madre para preparar el medio Watanabe

SOLUCIÓN I 1000 mL

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

SOLUCIÓN II 1000 mL

- $FeSO_4 \times 7H_2O$: 0.8 g

- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 4.0 g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 0.1180 g
- $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$: 20 mg
- EDTA ácido: 0.800 g
- Solución I: 4 mL
- H_2O destilada: 996 mL

SOLUCIÓN III 1000 mL

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

Medio Watanabe para fijadores de nitrógeno

REACTIVOS PARA 1000 ML

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

107

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

INDICADOR AZUL DE BROMOTIMOL AL 1%

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

Procedimiento

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

MEDIO SELECTIVO HAGEDORN Y HOLT

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

Materiales y métodos

REACTIVOS PARA 1000 ML

- Caldo soya tripticasa: 4.0 g

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

Procedimiento

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

MEDIO HALÓFILO

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

108

Materiales y métodos

1000 mL

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

Procedimiento

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

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

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

Información del análisis

Bacterias y actinomicetos

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

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

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

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

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

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

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

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

s = desviación estándar de la muestra

n = número de repeticiones

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

Hongos

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

ENSAYO *IN VITRO* DE ACTIVIDAD SUPRESIVA CONTRA FITOPATÓGENOS

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

110

Materiales y métodos

MEDIO PAPA DEXTROSA AGAR (PDA)

Lavar perfectamente 200 g de papas; estas se pelan y se cortan en cubitos de 1 cm por lado, se ponen en un recipiente con agua y se hierven por cinco minutos, se separan las papas cocidas del caldo y este se cuele y se vuelve a poner en el recipiente anterior; luego se agrega 15 g de agar-agar y se agita constantemente para evitar la formación de grumos, después de disuelto el agar se agregan 20 g de dextrosa y se calienta hasta que suelte el hervor. El medio se esteriliza a 15 lb/in² durante 20 min o a 20 lb/in² durante 15 min.

Procedimiento

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

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

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

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

Cuadro 1. Criterio para evaluar efecto sobre el hongo

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

HONGOS MICORRÍCIDO-ARBUSCULARES

Extracción de esporas de hongos micorrízico-arbusculares de suelo

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

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

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

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

Material

1. Cubeta de 2–5 L de capacidad.
2. Juego de tamices de 38, 106, 250 y 500 μm de apertura de malla.
3. Pizeta.
4. Cajas de Petri.
5. Suelo.

Procedimiento

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CLARIFICACIÓN-TINCIÓN

Materiales y métodos

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

Procedimiento

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

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

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

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

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

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

115

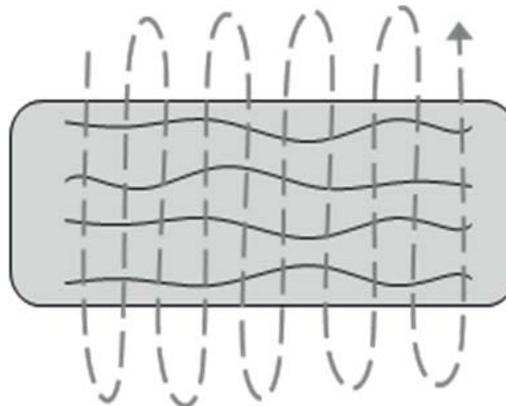


Figura 4. Representación esquematizada del montaje de raíces y de la dirección de observación sugeridas para el método Mcgonigle y cols. (1990).

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

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

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

116



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

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

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

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

ESTIMACIÓN DE LA COLONIZACIÓN

Materiales y métodos

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

Procedimiento

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

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

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

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

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

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

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

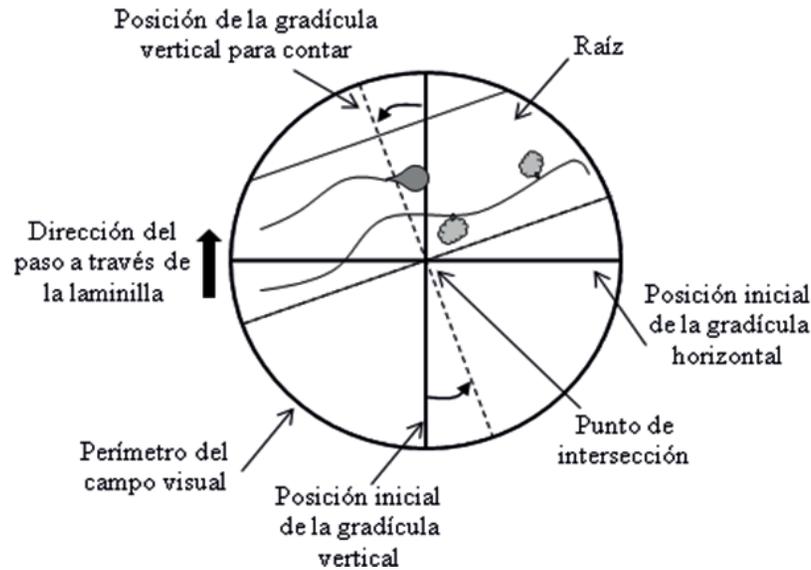


Figura 6. Esquema que muestra una intersección magnificada gradícula-raíz cuando la raíz no está perfectamente alineada con el eje horizontal.

118

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

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

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

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

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

DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA INMUNOREACTIVA (GLOMALINA) POR ELISA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Materiales y métodos

ÁCIDO CLORHÍDRICO 1 M

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

ÁCIDO CLORHÍDRICO 0.1 M

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

HIDRÓXIDO DE SODIO 10 M

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

HIDRÓXIDO DE SODIO 0.1 M

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

CITRATO DE SODIO 20 mM

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

CITRATO DE SODIO 50 mM

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

BUFFER FOSFATO ALCALINO (PBS) 1X

Pese 8.06 g de NaCl, 0.22 g de KCl, 1.15 g de Na_2HPO_4 y 0.20 g de KH_2PO_4 , agregue 500 mL de agua destilada, ajuste el pH a 7.4 con HCl 1 M o NaOH 10 M (según sea necesario). Una vez ajustado el pH, afore a 1 L con agua destilada. Esterilice en autoclave y almacene

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

BUFFER DIETANOLAMINA

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

Procedimiento

EXTRACCIÓN DE LA GLOMALINA

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

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

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

122

PURIFICACIÓN DE LA GLOMALINA

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

ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

La glomalina extraída se resuspende en un buffer fosfato salino (PBS) a pH 7.4. Se toma una alícuota de 50 µL del extracto, se coloca en las placas para ELISA y se deja secar toda la noche. Posteriormente se incuba con el anticuerpo monoclonal específico para glomalina MAb32B11, desarrollado a partir de esporas de *Glomus intraradices*, disuelto en el buffer PBS en relación 1:3 por una hora. Después se incuba una hora con el anticuerpo IgM, una vez cumplido este plazo, se incuba una hora con la enzima fosfatasa alcalina a pH 9.4. Por último, se disuelve una tableta (5 mg) de sustrato para fosfatasa alcalina en buffer dietanolamina, y esta solución se agrega a la placa,

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

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

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

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

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

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

EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL DE SUELO

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

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

contaminarse con ácidos húmicos del suelo. La ruptura celular se logra con fuerte agitación de las muestras en un regulador de lisis, el cual contiene altas concentraciones de detergente, sales, o perlas de vidrio; también se recomienda congelar con N₂ líquido y triturar con mortero, adicionalmente otros métodos emplean enzimas lisosimas.

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

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

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

124

Reactivos

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

- Ácido Etilendiamintetraacético (EDTA) 0.5M pH 8.0: adicionar 186.1 g de EDTA en 800 mL de H₂O. Agitar vigorosamente y ajustar el pH a 8.0 con NaOH (20 g aproximadamente). Esterilizar en autoclave.
- Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1) pH 8: mezclar cantidades equivalentes de fenol y cloroformo y 1/24 de volumen de alcohol isoamílico. Equilibrar la mezcla con Tris-HCl 0.1 M pH 8. Almacenar la mezcla equilibrada con Tris-HCl 0.01 M pH 8.0 a 4 °C en un frasco de vidrio ámbar.
- NaCl 5 M: disolver 292.2 g de NaCl en 800 mL de H₂O. Ajustar el volumen a 1 L. Esterilizar en autoclave.
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10%: disolver 100 g de SDS en 900 ml de H₂O. Calentar a 68 °C para ayudar a la disolución. Ajustar el pH a 8 por adición de gotas de HCl concentrado. Ajustar el volumen a 1 L.
- Tris 1 M: disolver 12.1 g de Tris base en 800 mL de H₂O. Ajustar el pH 8 por de HCl concentrado.
- Bromuro de etidio (10 mg/mL): adicionar 1 g de bromuro de etidio a 100 mL H₂O. Agitar por varias horas para asegurar una adecuada disolución. Almacenar en un frasco ámbar a 4 °C.

- Regulador 6X: preparar una solución que contenga 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% xilen cianol, 30% glicerol en agua.
- TAE Tris-acetato: 50 X, 242 g de Tris base, 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de 0.5 M de EDTA pH 8.
- CaCl₂ 1 M: Disolver 54 g de CaCl₂·6H₂O en 200 mL de H₂O. Esterilizar la solución por membrana con filtro de 0.22 mm. Almacenar a -20 °C.
- CTAB 10%: disolver 4.1 g NaCl en 80 mL de agua y lentamente adicionar 10 g de CTAB con calentamiento y agitación. Ajustar el volumen a 100 mL con agua y almacenar a 4 °C.
- Regulador de fosfato de sodio (0.1 M): para un regulador a pH 8. Mezclar 93.2 mL de NaHPO₄ 1 M y 6.8 mL de NaH₂PO₄ 1 M. Ajustar a 1 L. Esterilizar en autoclave.
- Regulador de lisis: 100 mM Tris HCl pH 8.5, 50 mM EDTA pH 8.0, 50 mM NaCl, 10% p/v SDS
- Nitrógeno líquido.
- Cloruro de benzilo.

125

Procedimiento

1. Congelar con N₂ líquido una muestra de suelo de 3–5 g y triturar en mortero hasta obtener un polvo fino. Transferir las muestras a un tubo de polipropileno de 50 mL. Adicionar 10 mL de regulador de lisis y mezclar con vortex por un minuto.

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

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

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

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

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

Materiales y métodos

- Agarosa.
- Regulador de corrida TAE 1X (Tris base, ácido acético glacial, EDTA).
- Bromuro de etidio (10 mg/mL): adicionar 1 g de bromuro de etidio a 100 mL H₂O. Agitar por varias horas para asegurar una adecuada disolución. Almacenar en un frasco ámbar a 4 °C.
- Regulador de carga azul de bromofenol 6X.
- Marcador de peso molecular.
- Solución saturada de NaI.

126

Procedimiento

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

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

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

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

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

EXTRACCIÓN DE RNA DE SUELO

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

127

Materiales y métodos

- TPM: preparar una solución que contenga Tris-HCl pH 7.5 50 mM, polivinilpirrolidona 1.7% y 10 mM $MgCl_2$.
- TN 150: preparar una solución con Tris-HCl 10 mM pH 8 y 150 mM NaCl.
- TMC: preparar una solución con Tris-HCl 10 mM pH 7.5, $MgCl_2$ 5 mM, CsCl 0.1 mM.
- TE: preparar una solución con Tris-HCl pH 8 y EDTA 1 mM.
- Albumina Sérica de Bovino (BSA) 10%.
- Complejo vanadil ribonucleosido VRC 200 mM.
- Acetato de sodio 3 M.
- Botellas de 50 mL estériles para homogeneizador celular.
- Tubos de policarbonato de 16 mL estériles.

Procedimiento:

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

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

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

128

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

AMPLIFICACIÓN DEL DNA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

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

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

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

Materiales y métodos

TAQ DNA POLIMERASA

DESOXINUCLEÓTIDOS TRIFOSFATO (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Solución 2 mM de cada desoxinucleótido.

REGULADOR DE REACCIÓN DE PCR 10X

Preparar una solución que contenga Tris-HCl 100 mM pH 8.5, MgCl₂ 20 mM y 500 mM de KCl.

OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS PARA CADA GRUPO MICROBIANO

Procedimiento

1. La mezcla de PCR tiene un volumen final de 25 µL y contiene Tris-HCl 10 mM pH 8.5, MgCl₂ 1.5 mM, 0.5 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 0.5 µM de cada oligonucleótido, 0.5 U de *Taq* polimerasa y 1 µL del DNA total o 2.5 µL de la dilución (1:50) de un DNA (10–50 ng).

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

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

Secuencia de oligonucleótidos	Código	Referencia
5' TCCGTAGGTGAACCTG 3'	ITS1	White y cols. (1990)
GCTGCGTTGTCATCG	ITS2	
TGCCAGCAGCCGGTA	16S1	Widmer y cols. (1998)
GACGGCGGTGTGTACAA	16S2	
AGGGTCATTGGAACTGGG	BacF	Kuske y cols. (1998)
CGTGTGTAGCCAGGTCATA	BacR	

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

Cuadro 4. Materiales de reacción de PCR.

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

AMPLIFICACIÓN ALEATORIA DE DNA POLIMÓRFICO (RAPDs)

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

130

Materiales y métodos

ENZIMA TAQ DNA POLIMERASA

0.5 U de la enzima.

DESOXINUCLEÓTIDO TRIFOSFATO (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Solución 0.5 mM de cada desoxinucleótido.

OLIGONUCLEÓTIDOS

Solución 0.5 μ M de cada oligonucleótido.

DNA TOTAL

2.5 μ L de DNA total o 5 μ L de la dilución (1:50) de DNA de 50 ng.

Procedimiento

1. La mezcla de reacción de RAPD tiene un volumen final de 25 μ L contiene Tris-HCl 10 mM pH 8.5, MgCl₂ 1.5 mM, 0.5 mM de cada desoxioligonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5 μ M

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

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

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

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

Cuadro 6. Materiales de reacción para RAPD.

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

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

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN

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

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

Materiales y métodos

MEZCLA DEL PCR

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

MEZCLA DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

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

Procedimiento

AMPLIFICACIÓN POR PCR ANIDADO

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

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

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

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

se realiza por 35 ciclos con un volumen de reacción de 100 μL con 2 μL del primer PCR.

RFLP

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

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

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

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

134

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

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

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

Materiales y métodos

En el DGGE, las condiciones desnaturizantes son creadas por la combinación de temperatura, entre 50–65 °C y un gradiente lineal desnaturizante formado con urea y formamida. Una solución de 100% desnaturizante consiste en urea 7 M y 40% de formamida. Los geles contienen, 8% (p/v) de poliacrilamina en TAE 1X pH 8.0 (acrilamida, bisacrilamida 37.5:1), el gradiente por lo general va de 30 a 55 % desnaturizante de urea 7M y formamida desionizada 40%. TEMED, persulfato de amonio al 10%, regulador de corrida azul de bromofenol 6X, TAE 1X, ácido acético al 10%, formaldehído al 37%, agua grado Milli-Q, AgNO₃ 0.1%, Na₂CO₃ 3%, Na₂S₂O₃×5H₂O 2 mg/L.

Reactivos para DGGE:

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

Pesar 38.9 g de Acrilamida y 1.07 g de Bis-acrilamida, disolver en 500 mL de agua destilada, aforar a 1000 mL con agua destilada, filtrar con membrana a 0.45 µm y almacenar a 4 °C.

PERSULFATO DE AMONIO AL 10%

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

SOLUCIÓN DE TINCIÓN

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

SOLUCIÓN FIJADORA Y DE PARO

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

SOLUCIÓN DE REVELADO

Disuelva 1.5 mL de formaldehído al 37% en 200 mL de agua desionizada, agregue 200 µL de Tiosulfato de sodio pentahidratado (Na₂S₂O₃×5H₂O) a una concentración de 10 mg/mL, y por último adicione 30 g de carbonato de sodio, aforar a 1000 mL con agua desionizada.

Procedimiento

PCR

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

Cuadro 7. Secuencia de oligonucleótidos para DGGE.

Oligonucleótido	Código	Referencia
5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3' ATTACCGCGGCTGCTGG	P1	Muyzer y cols. (1993)
5' CGCCCCGCCGCGCGGGCGGGC GGGGCGGGGCACGGGGGGCCTA	P2	
CGGGAGGCAGCAG 3'	P3	

136

2.La mezcla de PCR contiene: KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8.5 100 mM, MgCl₂ 2 mM, 0.4 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U de *Taq* polimerasa y 50 ng de DNA en un volumen de 50 µL.

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

GRADIENTE

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

TINCIÓN CON PLATA

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

2.Tinción con AgNO₃ al 0.1% por 30 min con agitación suave. Lavar con agua Milli-Q por 10 s.

3.Revelador de la tinción contiene NaCO₃, formaldehído, Na₂S₂O₃×5H₂O por 2–5 min.

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

5.Capturar la imagen del gel.

GLOSARIO DE UNIDADES

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

Cantidad base	Unidad Base	Expresión en términos de unidades básicas del SI (BIPM, 2006)
	microlitro por mililitro	mL/mL
	Milimolar	mM
	Normalidad	N
	Molaridad	M
	Micromolar	mM
	Unidades	U
	gramos por metro cuadrado	g/m ²
Velocidad	revoluciones por minuto	rpm
	oscilaciones por minuto	ppm
Presión	libra por pulgada cuadrada	lb/in ²
	Gravedad	<i>g</i>
Crecimiento microbiano	Unidades formadoras de colonia por gramo	UFC/g
	Unidades formadoras de colonia por mililitro	UFC/mL
Potencial eléctrico	Voltios	volts
Densidad	gramos por centímetro cúbico	g/cm ³

BIBLIOGRAFÍA

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

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

Alef K. y D. Kleiner. 1986b. Arginine ammonification in soils samples. *In: The application of enzymatic and microbiological methods in soil analysis. Veroff Landwirtsch-Chem. Bundesanstalt Linz/Donau*, 18: 163–168.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Jenkinson D. S., y D. S. Powlson. 1980. Measurement of microbial

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Molecular and Cellular Biochemistry 231: 179– 185.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Shaffer, B. T., F. Widmer, L. A. Porteous y R. J. Seidler. 2000. Temporal and spatial distribution of the *nifH* gene of N₂ fixing bacteria in forest and clearcuts in western Oregon. *Microbial Ecology* 39: 12–21.

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

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

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

Sikora, L. J. y D. E. Stott. 1996. Soil organic carbon and nitrogen. *In: "Methods for assessing soil quality"*, SSSA Special Publication

49, Soil Science Society of America, 677 S. Segoe Rd, Madison, WI 53711, USA, 157–167 pp.

Sims G. K. 1990. Biological degradation of soil. In. advances in soil science, 11: 289–330.

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

Smith S. E. y D. J. Read. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3^d ed. Great Britain. USA. Academic Press. 787 p.

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

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

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

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

Ueda, T., Y. Suga, N. Yahiro y T. Matsuguchi. 1995. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Journal of Bacteriology* 177:1414–1417.

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

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

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

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

Molecular Biology Reporter 20: 379–390.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE SUELOS Y ABONOS ORGÁNICOS

Editado por Fundación Produce Sinaloa, A.C, siendo el coordinador del área de Divulgación José Nedel Sánchez Valencia, se terminó de Río Piaxtla #35 Pte. Col. Guadalupe C.P. 20220 Culiacán, Sinaloa, México en el mes de julio de 2014.

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

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

Agradecimientos:

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

A la Fundación Produce Sinaloa A.C., por su valioso apoyo en la redacción de estilo y el cuidado en el proceso de edición.

Al INAPI Sinaloa, por el apoyo económico para la publicación de este libro. A los miembros del comité de arbitraje por su revisión y sugerencias y aportaciones a la obra.

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

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

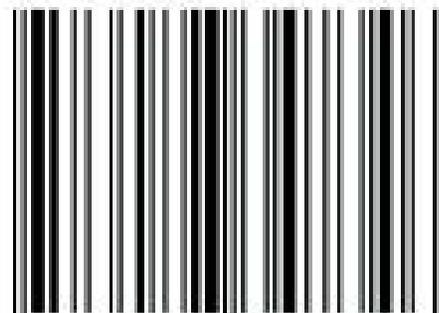


TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE SUELOS Y ABONOS ORGÁNICOS

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



ISBN 978-607-8347-34-6



9 786078 347346 >