T
689

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

03853

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

"Raíces-suelo-microorganismos en el proceso de agregación de un suelo arenoso en el Valle de México"

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Presenta:

Iván Pável Moreno Espíndola

Comité tutoral:

Director: Dr. Fernando de León González
Dra. María de Jesús Ferrara Guerrero
Dr. Facundo Rivera Becerril

México, D.F. Octubre 2007

ÍNDICE GENERAL

	Página
PREFACIO	**5**
RESUMEN	**6**
ABSTRACT	**7**
1. INTRODUCCIÓN	**8**
1.1 Antecedentes	**8**
1.2 Marco de referencia	**9**
1.3 Problemática estudiada	**13**
1.3.1 Ubicación del problema	**14**
1.3.2 Factores biológicos	**15**
1.4 Impacto	**15**
1.5 Hipótesis	**16**
1.6 Objetivos	**16**
2. RAÍCES Y HONGOS MICORRÍZICO ARBUSCULARES: "Role of root-hairs and hyphae in adhesion of sand particles"	**18**
3. COMUNIDAD BACTERIANA Y FÚNGICA EN SUELO RIZOSFÉRICO, NO RIZOSFÉRICO Y MACROAGREGADOS: "Biomasa y actividad exoenzimática microbiana en un suelo arenoso"	**25**
4. EFECTO RIZOSFERA: "Diversidad genética y metabólica de la microflora asociada a un suelo rizosférico arenoso"	**43**
5. CONCLUSIONES	**57**
6. REFERENCIAS GENERALES	**59**
Anexo 1. Determinación de biomasa bacteriana.	**62**
Anexo 2. Medios de cultivo para la determinación del NMP de bacterias con la capacidad para reciclar el N_2.	**64**
Anexo 3. Jarra de anaerobiosis para la cuantificación de potenciales exoenzimáticos de la comunidad bacteriana y fúngica.	67

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CAPÍTULO 2

Cuadro 1. Variables físicas del suelo (A), micrometría de pelos absorbentes, hifas y partículas de arena (B), y variables de la colonización micorrízica arbuscular (C). **Pag. 21**

Figura 1. Proporción relativa de agregados en cuatro especies vegetales creciendo en un suelo arenoso. **Pag. 21**

Figura 2. Pelos absorbentes reteniendo partículas de arena en (2a) maíz y (2b) pasto Bermuda. **Pag. 22**

Fugira 3. Hifas teñidas con azul de algodón reteniendo partículas de arena en un segmento de raíz de amaranto. **Pag. 22**

Figura 4. Regresión lineal entre el número de hifas externas en secciones de raíz (1 cm) y la masa de macroagregados (2-5 mm) en cuatro especies vegetales. **Pag. 22**

Figura 5. Regresión lineal entre colonización micorrízica arbuscular y la estabilidad de macroagregados (2-5 mm) en cuatro muestras de cuatro especies vegetales. **Pag. 22**

CAPÍTULO 3

Cuadro 1. Biomasa bacteriana en suelo rizosférico (sr), no rizosférico (snr) y macroagregados (ag) de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso. **Pag. 31**

Figura 1. Bacterias presentes en la rizosfera de *Heliantus annuus* L. **Pag. 31**

Cuadro 2. NMP bacterias ml^{-1} con capacidad para reciclar el N en suelo rizosférico (sr), no rizosférico (snr) y macroagregados (ag). La respiración de NO_3^-, oxidación y fermentación de la glucosa se representan como pruebas positivas o negativas. **Pag. 32**

Figura 2. Actividad exoenzimática **bacteriana** en suelo rizosférico (sr), no rizosférico (snr) y macroagregados (2-5 mm) (ag), de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso, en condiciones de microaerobiosis (i), y de aerobiosis (ii). Resultados expresados en porcentaje de cada actividad respecto al número total de UFC. A, amaranto; P, pasto Bermuda; M, maíz; G, girasol. **Pag. 33**

Figura 3. Actividad exoenzimática **fúngica** en suelo rizosférico (sr), no rizosférico (snr) y macroagregados (2-5 mm) (ag), de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso, en condiciones de microaerobiosis (i), y de aerobiosis (ii). Resultados expresados en porcentaje de cada actividad respecto al número total de UFC. A, amaranto; P, pasto Bermuda; M, maíz; G, girasol. **Pag. 34**

CAPÍTULO 4

Cuadro 1. Carbono de la biomasa microbiana (C_{mic}) y actividad deshidrogenasa en la rizosfera de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso del valle de México. Los valores seguidos de diferente letra indican diferencias significativas ($P<0.05$). **Pag. 48**

Figura 1. Perfiles de DGGE de las comunidades bacteriana y fúngica en suelos rizosféricos de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso del Valle de México. Maíz (1), girasol (2), pasto Bermuda (3) y amaranto (4). Gradientes de desnaturalizaión (urea y formamida) (45-65% (7%) 16S rDNA y 35%-60% (8%)) 18S rDNA). **Pag. 49**

Figura 2. Análisis de cluster (Método de Ward; Coeficiente de Similaridad de Dice) de la comunidad bacteriana (B) y fúngica (F) a partir del patrón de bandas generado mediante PCR-DGGE en el suelo rizosférico de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso del Valle de México. Maíz (1), girasol (2), pasto Bermuda (3) y amaranto (4). **Pag. 50**

Cuadro 2. Riqueza (S) e índice de diversidad de Shannon (*H'*) en lás comunidades bacterianas y fúngicas de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso del Valle de México medidas mediante DGGE **Pag. 50**

PREFACIO

La presente comunicación idónea de resultados comprende el estudio del papel de las raíces de cuatro especies vegetales y de la comunidad microbiana (bacterias y hongos), en el proceso de agregación de un suelo arenoso del sur del Valle de México. Los resultados que se presentan conforman el trabajo de investigación de Maestría denominado **"RAÍCES-SUELO-MICROORGANISMOS EN EL PROCESO DE AGREGACIÓN DE UN SUELO ARENOSO EN EL VALLE DE MÉXICO".** El estudio de los procesos biológicos no puede desarrollarse sin considerar la diversidad de factores que inciden en ellos, sin embargo, abordarlos en una manera gradual puede permitirnos comprender mejor dichos procesos.

Los resultados de esta investigación confirman la importancia de los factores biológicos en la estructura del suelo; una parte de estos se encuentra publicada en la revista Soil Biology and Biochemistry (Capítulo 2). Los resultados concernientes al papel de los grupos bacterianos presentes en el suelo, el potencial exoenzimático de las comunidades fúngica y bacteriana, así como su diversidad genética, se presentan en los capítulos 3 y 4. En el tercer capítulo se consideran tres ambientes edáficos: suelo rizosférico, no rizosférico y macroagregados (2-5 mm). El cuarto capítulo se enfoca en la rizosfera de las especies vegetales debido a que en ella se presentaron tanto la mayor biomasa bacteriana como el más alto potencial exoenzimático. Cabe mencionar que dentro de este apartado se incluyen evaluaciones moleculares de la diversidad microbiana, trabajo que fue desarrollado en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CEBAS-CSIC), en Murcia, España.

RESUMEN

El Valle de México tiene características biológicas, geográficas y edafológicas que hacen posible la existencia de ecosistemas naturales y agroecosistemas en su territorio. De acuerdo con el uso del suelo y las actividades de la población, el Valle se divide en área de desarrollo urbano y suelo de conservación. Este último comprende algunos bosques y además en él se desarrollan la mayoría de las actividades agropecuarias y forestales, sin embargo, estas áreas presentan suelos de textura arenosa, susceptibles a procesos de erosión hídrica y eólica, como consecuencia de su inestabilidad estructural. Por ello, estudiar el proceso de formación de agregados en estos suelos resulta necesario para la generación de conocimientos que permitan su mejor manejo y aprovechamiento. La formación de macro y microagregados generalmente depende de la presencia y calidad de las arcillas, pero en suelos arenosos este proceso también está determinado por otros factores. Los microorganismos del suelo, en estrecha relación con las raíces de las especies vegetales, participan en el proceso de agregación de los suelos arenosos y en los ciclos biogeoquímicos que tienen lugar. En el presente trabajo se estudió la estructura de un suelo arenoso y la influencia ejercida por los hongos micorrízico-arbusculares, saprobios y grupos bacterianos asociados a tres especies de plantas cultivadas, *Amaranthus hypochondriacus* L., *Zea mays* L., *Helianthus annuus* L. y un pasto invasivo (*Cynodon dactylon*). Los resultados muestran que los pelos absorbentes de las raíces son más eficientes que las hifas de los HMA y saprobios en la retención de partículas de arena. La comunidad bacteriana presenta una elevada actividad asociada al ciclo del N favoreciendo la fertilidad del suelo. Los potenciales exoenzimáticos muestran una relación sintrófica entre la comunidad bacteriana y fúngica en el uso de diversos sustratos; estos potenciales presentan respuestas distintas en relación con la disponibilidad de oxígeno. Finalmente, análisis moleculares de los segmentos 16S y 18S rDNA permitieron determinar la diversidad bacteriana y fúngica presente en la rizosfera.

Palabras clave: Agregación, *Amaranthus hypochondriacus,* bacterias rizosféricas, *Cynodon dactylon,* diversidad, enzimas, *Helianthus annuus,* micorriza arbuscular, suelos arenosos, *Zea mays*.

ABSTRACT

The Valley of Mexico presents natural and agricultural ecosystems. The government programs distinguish the urban area and the Conservation Soil Area (CSA). CSA includes temperate forests (*Pinus-Quercus*) and agricultural land. Soils were formed from volcanic ash depositions and the sandy soil is the dominant texture which is very prone to rain and eolian erosion as a result of its structural instability. Under this context, the study of soil aggregation is necessary in order to produce scientific information relevant to improve cropping systems incorporating soil conservation objectives. The formation of micro and macro-aggregates depends on quantity and quality of clays, but on sandy soils these process is controlled by biological factors. Soil microorganisms associated to plant roots promote the soil aggregation and the dynamic of biogeochemical cycles. In the present work we study: (a) the influence of root-hairs and hyphae (vesicular-arbuscular mycorrhizae, VAM, and saprophytic fungi) on sand particles enmeshment; (b) biomass and enzymatic activities of microbial groups living in soil sampled from root-zones of four plant species (*Amaranthus hypochondriacus* L., *Zea mays* L., *Helianthus annuus* L. and the invasive grass *Cynodon dactylon* L.); and (c) the molecular pattern of microbial diversity in soil. The results showed that root hairs were more abundant and efficient that fungi hyphae in adhesion and enmeshment of sand particles. The bacterial community had a high enzymatic activity associated to the nitrogen cycle in soil. The exoenzymatic potentials showed by bacterial and fungal communities suggested the existence of a syntrophyc relation in the process of organic matter mineralization which could be useful for plant nutrition under sandy soils. The pattern of enzimatic activities changed when oxygen concentration was modified. Molecular analyses of the segments 16S and 18S rDNA allowed to asses the diversity of bacterial and fungal communities living in the rhizosphere.

Key words: Sandy soil aggregation, soil microbial biomass, soil enzymatic activity, vesicular-arbuscular mycorrhizae (VAM), soil DNA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El suelo es fundamental para la producción de los cultivos y al mismo tiempo es un ambiente susceptible de sufrir efectos negativos debido a las actividades agrícolas. Es un sistema complejo y diverso formado por tres fases (orgánico-mineral, hídrica y gaseosa) (Porta *et al.*, 1999), y su matriz contiene una biodiversidad amplia de macro y microorganismos. Las propiedades físicas y químicas del suelo se ven afectadas por la actividad biológica que se desarrolla en él, y a su vez, la estructura y el estado nutrimental, afectan la dinámica de las poblaciones y la actividad biológica en el mismo (Linderman, 1992). La estructura de los suelos está dada por la agrupación de sus partículas. Esta condición permite procesos de flujo hídrico, crecimiento radical, intercambio catiónico e intercambio gaseoso, entre otros procesos.

El suelo está compuesto por estratos u horizontes en los que interactúan los materiales y organismos que lo integran. Los minerales que lo componen se clasifican en tres grandes grupos: arenas (granos duros de diversos tamaños), limos (partículas finas e intemperizables) y arcillas (partículas finas compuestas por silicatos). De la proporción que cada uno de estos materiales tenga en un suelo se deriva la textura del mismo, la cual está determinada por los minerales que hayan intervenido en los procesos geológicos de formación (Rucks *et al.*, 2004). Los minerales más comunes se derivan de rocas ígneas, sedimentarias y metamórficas.

La textura interviene de manera directa en la productividad del suelo, favoreciendo o limitando los procesos biológicos y geológicos que en éste tienen lugar. Los suelos de origen volcánico que se presentan en el sur del Valle de México tienen problemas de erosión eólica e hídrica debido a su estructura inestable y a los cambios en su uso, de vegetación natural a agricultura (SMA D.F., 2005). La mayoría de estos suelos se componen de partículas de arena depositadas como resultado de la actividad volcánica. Al ocurrir el cambio de vegetación natural a uso agrícola, el suelo se torna más frágil ante los eventos climáticos y el proceso erosivo se ve favorecido por el sistema de labranza convencional basado en el uso de instrumentos de disco (arado y rastra).

La formación de agregados y su estabilización son procesos en los que interviene la naturaleza mineral del suelo, especialmente con las partículas de arcilla, las que actúan como cementantes de otras partículas minerales de diferente tamaño y composición

química (Domínguez y Schifter, 2003). Los agregados forman un edificio estructural basado en micro (<250 μm) y macroagregados (>250 μm) (Oades, 1993). De esta organización resulta una combinación de partículas y poros de distinta dimensión, cuya estabilidad depende de la fuerza de los enlaces en los distintos niveles de organización. La materia orgánica en sus diferentes fracciones (particulada y no particulada, humificada y no humificada), participa en los enlaces entre las partículas y contribuye a mejorar la estructura edáfica (Six *et al.*, 2004). En la naturaleza, la estructura del suelo está sometida a diferentes presiones físicas. La acción de las gotas de lluvia, por ejemplo, provoca la ruptura de los enlaces de las capas más superficiales, separando las partículas y reorganizándolas (Domínguez y Schifter, 2003). Ello da lugar a capas de costras que se forman por la reorganización selectiva de partículas de arcilla y/o de limo. Un suelo con una pobre agregación sufrirá con mayor fuerza la acción erosiva de eventos naturales (lluvia, temperatura) y de prácticas de cultivo (principalmente aradura).

El papel de las arcillas en la agregación de los suelos resulta preponderante; sin embargo, existen suelos en los que su textura está conformada básicamente por arena. Un suelo arenoso tiende a carecer de macro y microagregados debido a la falta del elemento cementante, la arcilla, hecho que contribuye a su inestabilidad estructural. La ausencia de macro y micro agregados estables, en combinación con sistemas de producción inadecuados, plantean problemas serios tanto para la conservación del recurso suelo, como para las actividades agrícolas. Estos problemas se reflejan en la pérdida de suelo (erosión), compactación, baja retención de humedad, bajos índices de producción y disminución de la población de macro y microorganismos.

El estudio del proceso de formación de agregados, es decir, de la formación de la estructura del suelo, es fundamental para la búsqueda de estrategias que se opongan a la erosión de este recurso y por lo tanto que fortalezcan las actividades agrícolas y que puedan ser aplicadas en la recuperación de áreas naturales degradadas.

1.2 Marco de referencia

El concepto del suelo como un *"sustrato inerte"* que tiene como función principal servir de mero soporte físico a la planta, ha evolucionado desde hace poco más de 20 años

(Thomas, 1990). Con base en tal concepción, se desarrollaron sistemas de producción centrados en la labranza convencional, en el aporte externo de insumos (fertilizantes, principalmente), en el establecimiento de monocultivos extensivos y en el desconocimiento del papel de los microorganismos como parte fundamental del agroecosistema (Restrepo, 2000).

Como resultado de esto, el estudio de los procesos que tienen lugar en el suelo centró su atención en factores meramente productivos hasta el auge de la agricultura sustentable u orgánica, que abrió la puerta a visiones multidisciplinarias del problema agrícola y ambiental. El conocimiento de los procesos biológicos que tienen lugar en un sistema agrícola se ha fincado como la base de otra concepción del recurso suelo considerándolo como un sistema dinámico en el que participan factores geológicos, químicos, biológicos, físicos y culturales (Nannipieri *et al.*, 2003).

Bajo esta concepción, el suelo se ve influenciado primeramente por su origen, es decir, el tipo de mineral del cual se formó inicialmente (roca madre o deposiciones) y la interacción de éste con otros factores geológicos y climáticos. Existen suelos como los que se presentan en buena parte del territorio mexicano, que tienen su origen en erupciones volcánicas, como es el caso del suelo bajo estudio en este proyecto de investigación. Estos suelos son esencialmente de textura arenosa, por lo que su estructura es frágil, quedando frecuentemente a merced de procesos erosivos por la acción del viento, el agua y los sistemas productivos que en ellos se practican. En un reporte previo se demostró que la adición de materia orgánica al suelo arenoso de Tulyehualco (Xochimilco, D. F.), incrementó la formación de macroagregados pero no su estabilidad (De León-González *et al.*, 2000). Más recientemente, De León-González *et al.* (2006) reportaron que las raíces de maíz tienen una gran capacidad para adherir el suelo arenoso y se planteó que en sitios cultivados es éste el principal mecanismo para mantener el suelo en forma estructurada. En el trabajo antes citado se estudió el efecto de las raíces en la estructura edáfica después de la cosecha. Los datos aportados en el mismo indican la importancia de mantener las raíces de los cultivos en el suelo después de la cosecha, puesto que favorecen la conservación de la estructura resultante de la acción de las raíces.

En este contexto, el eje de los procesos de estabilización del suelo arenoso ocurre en la rizosfera. Esta región fue descrita por primera vez por Lorenz Hiltner en 1904 (citado en

Prescott *et al.*, 1999). En la rizosfera es donde se concentra el proceso de formación de agregados y los procesos de intercambio de sustancias entre las raíces y la solución del suelo (Miller y Jastrow, 1992). La rizosfera es definida como la fase del suelo en la que los minerales y los microorganismos se encuentran en estrecha relación con las raíces de las plantas. Linderman (1992) la describe como la parte en la que interactúan las raíces de las plantas, los minerales y los microorganismos a través de diversos procesos y señales químicas complejas. Las poblaciones microbianas del suelo responden a la liberación de materiales orgánicos cerca de la raíz de la planta aumentando su número y cambiando las características de la comunidad microbiana. La rizosfera es particularmente importante en suelos que presentan un perfil somero o de aquellos que se caracterizan por su inestabilidad estructural, como ocurre en el suelo arenoso estudiado en el presente trabajo.

Para reducir el impacto de los procesos erosivos es necesario que el suelo tenga una estructura estable y para ello una dinámica biológica en equilibrio y un manejo adecuado son fundamentales. Hablar de estructura del suelo implica la formación de agregados. Éstos son conglomerados de minerales, materiales orgánicos y microorganismos, que generalmente se forman gracias a la actividad de las arcillas. En su estructura se forman poros por los que se suceden procesos de intercambio gaseoso, flujo hídrico y movilidad de sales minerales nutritivas, así como de microorganismos.

En suelos arenosos caracterizados por su fragilidad estructural el agua puede entrar en los poros de la capa arable, favoreciendo escurrimientos de mayor volumen y con ello aumentando el riesgo de erosión. En el suelo arenoso bajo estudio la compactación del suelo y los cambios en la dinámica del agua se traducen en un menor crecimiento vegetal y menores rendimientos, como ha sido probado para el cultivo de amaranto establecido (De León-González *et al.*, 1997).

Debido a la presencia de componentes orgánicos y minerales, los suelos son ricos en nutrimentos. Las raíces de las plantas cultivadas o silvestres también aportan nutrimentos y otras sustancias que son aprovechados por una amplia gama de microorganismos, entre los que se incluyen algunos azúcares, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, nucleótidos y enzimas (Marschner *et al.*, 2001). Estos microorganismos, específicamente los hongos y las bacterias, contribuyen con la

manutención de la fertilidad del suelo. Hasta finales del siglo pasado se reconocía que el estudio de los microorganismos del suelo y sus interacciones alcanzaba apenas el 10% (Nannipieri *et al.*, 2003). A pesar de este retraso en la investigación, la relación entre el suelo en su parte mineral, las plantas (específicamente la rizosfera) y los microorganismos, se cuenta con avances considerables (Garbeva *et al.*, 2004).

Las plantas son la fuente principal de materia orgánica primaria de la que dependen los microorganismos lo que hace que guarden una estrecha relación entre sí. Se conocen relaciones en las que los microorganismos se asocian simbióticamente con las plantas como la micorriza arbuscular (MA), y otras en las que se estimula el crecimiento vegetal a través de la producción de fitohormonas, gracias a las denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR´s) (Linderman, 1992). Otros grupos bacterianos aportan nitrógeno ya sea en el interior de nódulos radicales o bien como fijadores libres (Prescott *et al.*, 1999).

Como puede apreciarse, la relación entre los microorganismos, el suelo y las raíces de las plantas, implica procesos benéficos para las actividades agrícolas y de conservación. En la presente investigación el papel de los hongos micorrízico-arbusculares (HMA) y la comunidad bacteriana resulta vital al estar fuertemente relacionado con la estabilidad y la formación de agregados en los suelos.

Existen trabajos en los que se ha evaluado el papel de la MA, tanto en la nutrición y resistencia de los cultivos a factores adversos, como en la estabilidad del ambiente edáfico. Las hifas de los hongos unen las partículas del suelo formando un entramado (Tisdall y Oades, 1982) que proporciona estabilidad a los agregados ante la acción mecánica de la lluvia. Se ha centrado la atención en el papel del micelio fúngico como estabilizador, considerando además el papel de los hongos saprobios en este proceso (Abbott *et al.*, 1992). Asimismo, a partir de los trabajos de Wright y Upadhyaya (1996) se ha descubierto que además del efecto de la red de hifas, los HMA producen una glicoproteína, la glomalina, que puede actuar favoreciendo la estabilidad de agregados asociados a pastos y leguminosas (Rillig *et al.*, 2002). Está bien establecido que la presencia del micelio es un factor que promueve la estabilidad del suelo y conduce a un mayor éxito en el establecimiento de las plantas. Sin embargo, en suelos de pradera bajo cero labranza, al estudiar el mismo factor se sugirió que la relación entre micelio y glomalina no es la única que participa en la agregación (Borie *et al.*, 2000). El papel de

las bacterias en el suelo ha sido estudiado a partir de aquellas que son capaces de proveer a la planta de nitrógeno asimilable como sucede con los géneros *Rhizobium* y *Frankia* (Prescott *et al.*, 1999). En otros casos como en el de los miembros del género *Pseudomonas* que habitan en la rizosfera, se ha estudiado su capacidad de inducir una respuesta de defensa en las plantas contra microorganismos patógenos (Atlas y Bartha, 2006). En el presente trabajo se espera evidenciar la importancia de algunos grupos bacterianos que participan en la mineralización de la materia orgánica del suelo pues estos inciden en la fertilidad del mismo. La presencia de estos microorganismos se relaciona con la producción de exopolisacáridos que pueden actuar como cementantes en el proceso de agregación (Alami *et al.*, 2000), así como favorecer la colonización micorrízica (Koide y Mosse, 2004).

Como se ha mostrado, existen evidencias del papel activo de los microorganismos en los sistemas agrícolas. En el caso de los HMA, como en el de las bacterias, poco se conoce sobre el papel que pueden jugar en la agregación de los suelos arenosos de México. Su participación, así como la interacción de estos con las especies cultivadas bajo estudio son los ejes del presente trabajo.

1.3 Problemática estudiada

La investigación aborda el problema de la formación de agregados en la rizosfera de plantas cultivadas en un suelo arenoso. En el caso de estos suelos se espera que la agregación esté determinada por factores biológicos es decir, por las raíces de los cultivos establecidos y los microorganismos del suelo.

El proceso de agregación es fundamental puesto que impacta en la productividad del suelo y en la conservación de este recurso. Baste mencionar que en México más del 80% del territorio se encuentra bajo procesos de degradación y erosión, donde el 23.2% sufre erosión eólica debido a la ausencia de biomasa y estructura edáfica (INEGI, 2004). El 59% de la superficie del Distrito Federal está amenazada por procesos erosivos, mismos que se han intentado frenar a partir de la denominación de suelo de conservación (SC) para esas áreas (SMA D.F., 2005).

Anteriormente se ha establecido la relación que existe entre los factores mineral, microbiológico y radical en la formación de agregados (Sollins *et al.*, 1996). Por ello, en el presente trabajo se utilizaron tres especies cultivadas y una especie de pasto

invasivo de la zona, para abordar esta problemática. Estas especies son *Amaranthus hypochondriacus* L. (amaranto), *Zea mays* L. (maíz), *Helianthus annuus* L. (girasol) y *Cynodon dactylon* L. (pasto Bermuda), elegidas en función de que su establecimiento es muy frecuente en la zona de estudio, de que sus raíces favorecen el proceso de agregación (De León-González *et al.*, 2006) y de que representan cultivos tradicionales de alto valor nutrimental. Por estas razones la importancia del presente proyecto radica en la posibilidad de conocer el beneficio de la biología del suelo en la estructura del suelo.

1.3.1 Ubicación del problema

El trabajo se inscribe en el marco del manejo de SC del Distrito Federal, el cual posee en más de la mitad de su territorio características climáticas, topográficas y edafológicas que hacen posible la existencia de diversos ecosistemas (SMA D.F., 2005). Desde la perspectiva del medio ambiente, la vegetación natural del D.F. constituye el principal elemento de estabilización de los suelos y de la conservación de los ciclos hidrológico y biogeoquímicos, así como un medio para la captura de carbono y retención de partículas suspendidas.

Desde la óptica socioeconómica, los recursos que se ubican en el SC aportan materias primas para la subsistencia de los pueblos y comunidades rurales locales, pues en ellos se ubican suelos con aptitud para el desarrollo de actividades agrícolas, pecuarias y acuícolas. Además, son espacios en los que se pueden desarrollar actividades productivas sustentables, así como establecer sitios para el turismo o recreación.

El SC ocupa parte del territorio de las delegaciones Álvaro Obregón, Cuajimalpa de Morelos, Gustavo A. Madero, Iztapalapa, La Magdalena Contreras, Milpa Alta, Tláhuac, Tlalpan y Xochimilco. Se estima que la superficie considerada como SC es de 87,204 ha, que corresponde a poco más del 59% del área total del D.F.

La sección más grande del SC abarca una superficie de 87,204 ha y se extiende por toda la Sierra del Chichinautzin, la Sierra de las Cruces, la Sierra del Ajusco, el Cerro de la Estrella y la Sierra de Santa Catarina, así como en las planicies lacustres de Xochimilco-Tláhuac y Chalco. Es en esta zona en la que se encuentra el sitio de trabajo de la presente investigación.

Una vez establecida la importancia del SC en el D.F. resulta necesario puntualizar los niveles de trabajo de la investigación que son los siguientes:

- El primero de ellos es ecológico, ya que la pérdida del recurso afecta el crecimiento de la vegetación nativa y de las plantas cultivadas.
- El segundo nivel es económico, puesto que un suelo pobre y frágil representa baja productividad y por lo tanto pérdidas económicas para los agricultores.
- El tercer nivel es tecnológico, ya que las prácticas de manejo del suelo no siempre son las adecuadas puesto que no se tienen en cuenta las características de cada sistema.

1.3.2 Factores biológicos

Los factores que intervienen en el problema son:

Los cultivos. Es un factor tecnológico ya que está determinado por la elección del productor y su establecimiento en el suelo bajo estudio. Particularmente interviene en cuanto a su sistema radical y la capacidad de éste para mantener unidas las partículas del suelo arenoso.

El suelo. Es el factor en torno al cual gira este estudio, específicamente en la rizosfera donde ocurre el proceso de agregación.

Hongos micorrízico arbusculares (HMA). Es uno de los factores que se presume está involucrado en la formación de agregados. Particularmente interviene en cuanto a su presencia en el suelo y en el interior de las raíces, así como en la secreción de posibles sustancias cementantes.

Bacterias. Es otro de los factores que se presume está involucrado en la agregación. Particularmente interviene en cuanto a su papel en los ciclos de los nutrimentos; cabe recordar que las fracciones de materia orgánica y su mineralización están ligadas a la formación de agregados en primer orden de acuerdo a la teoría jerárquica de la agregación (Six *et al.*, 2004).

1.4 Impacto

El presente trabajo busca aportar datos e inferencias que enriquezcan el conocimiento que se tiene acerca de la agregación de un suelo arenoso, el cual es un proceso biológico y edáfico. La relevancia de ello puede ubicarse en el marco del manejo de

recursos y el diseño de modelos productivos específicos adaptados a las necesidades del SC del D.F. y otras zonas con la misma problemática.

El tratamiento de los problemas desde una perspectiva integral plantea retos e impactos que contribuyen de manera sustancial a la comprensión de un fenómeno. El problema de la agregación de suelos arenosos pudiera ser en un primer momento, materia de ciencia básica, sin embargo, el hecho de estudiarlo desde el punto de vista biológico y agronómico permitirá aportar elementos para el diseño de sistemas de cultivo mejor adaptados a las condiciones del SC del D.F.

Por lo anterior, el objeto de estudio del presente trabajo de investigación consistió en elucidar la participación de bacterias, hongos (HMA y saprófitos) y de las raíces en el proceso de agregación de un suelo arenoso del sur del Valle de México.

1.5 Hipótesis

- El proceso de agregación de suelos arenosos de origen volcánico es favorecido por las raíces de plantas gramíneas como el maíz y el pasto Bermuda en mayor grado que por las del amaranto y el girasol. Esto debido a las características morfológicas de las raíces.
- Los HMA y las bacterias asociados a las raíces de maíz, pasto Bermuda, amaranto y girasol, favorecen la agregación de las partículas de suelos arenosos.
- La asociación raíces-suelo-microorganismos es determinante para el mejoramiento de la estructura de suelos con bajo contenido de arcilla (suelos arenosos).

1.6 Objetivos

Objetivo general:

Comparar el efecto de cuatro especies vegetales (maíz, pasto Bermuda, amaranto y girasol), en función de la agregación y estructura de un suelo arenoso en el Valle de México.

Objetivos particulares:

- Evaluar la cantidad de suelo retenido por los sistemas radicales de las cuatro especies vegetales (maíz, amaranto, girasol y pasto Bermuda).
- Evaluar la proporción y estabilidad de los agregados.
- Cuantificar la colonización micorrízica en las raíces, y las esporas de hongos micorrízico arbusculares presentes en el suelo.
- Determinar la presencia de diferentes grupos bacterianos y fúngicos en las raíces, en los agregados y en el suelo rizosférico y no rizosférico, involucrados en el reciclamiento de iones inorgánicos nitrogenados y otras moléculas involucradas en los ciclos del carbono y fósforo.

Los resultados de los tres primeros objetivos particulares dieron lugar a una publicación en la revista Soil Biology and Biochemistry.

ELSEVIER

Soil Biology & Biochemistry 39 (2007) 2520–2526

Soil Biology & Biochemistry

www.elsevier.com/locate/soilbio

Role of root-hairs and hyphae in adhesion of sand particles

Iván P. Moreno-Espíndola[a], Facundo Rivera-Becerril[b], María de Jesús Ferrara-Guerrero[b], Fernando De León-González[c,*]

[a]*Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960 México D.F., México*

[b]*Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960 México D.F., México*

[c]*Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960 México D.F., México*

Received 25 August 2006; received in revised form 3 April 2007; accepted 23 April 2007
Available online 4 June 2007

Abstract

The aggregation process in sandy soils depends on biological activity. We reported here results obtained from one sample time of: (a) adhesion of sand particles by root hairs and fungal hyphae, examined on root sections of four plant species (amaranth, *Amaranthus hypochondriacus* L.; Bermuda grass, *Cynodon dactylon* L.; maize, *Zea mays* L. and sunflower, *Helianthus annuus* L.) grown at field for 3 months; (b) root-adhering soil (RAS), root biomass (RB), and dry and water stable-aggregate fractions obtained from root:soil monoliths; and (c) arbuscular mycorrhizal colonization. Microscope observations on fine roots (< 1 mm) showed that root hairs and hyphae contributed simultaneously, but not in the same proportion, to enmeshment of sand particles (20–150 μm). Hyphae contribution was considerably fewer than that of root-hairs. Maize and Bermuda grass had a higher root-hair density but a lower amount of external hyphae than those of amaranth and sunflower. Root-hairs of Bermuda grass and maize held approximately three times more sand particles than those of amaranth and sunflower (20 and 7 mm^{-1} of root section, respectively). These results were consistent with the higher RAS:RB ratio of Bermuda grass and maize (302 and 257, respectively), than that of amaranth and sunflower (89 and 159). Intensity of mycorrhizal colonization in the whole root system was higher in maize, Bermuda grass and sunflower (range of 22.7–25%) as compared to that of amaranth (6.8%). *A. hypochondriacus*, considered as a non-mycorrhizal plant species, showed typical structures (vesicles, hyphae and arbuscules) in the root system. Results emphasized the preponderant role of root hairs (of grasses and dicotyledon species) in the process of soil adhesion by roots under sandy conditions (pumice and feldspath particles) and semi-arid climate.
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi; Rhizosphere; Root-hairs; Sand particle binding; Valley of Mexico

1. Introduction

Under sandy soils the absence of clay mineral limits the formation of stable aggregates, facilitating soil erosion by wind and water runoff. The understanding of biological processes in sandy soil aggregation is crucial to recommend sustainable crop systems oriented to control the negative effects of soil erosion (Miller and Jastrow, 1992; Bethlenfalvay and Barea, 1994). In this context, studies on soil binding based on field soil samples are necessary to document the hyphae and root contributions to soil aggregation (Degens, 1997). Contribution of hyphae in aggregation of well-structured soils was described by Tisdall (1994) and Tisdall et al. (1997), and verified for a broad range of soil types (Andrade et al., 1998; Piotrowski et al., 2004). The role of hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and non-AMF in sandy soil aggregation has been reported by Goodchild and Myers (1987), Degens et al. (1996) and Othman et al. (2004). Soil binding by hyphae involves cross-linking and sand particle enmeshment (Degens, 1997). Because large lengths of hyphae are bonded to the sand particle surfaces, the influence of

*Corresponding author. Tel.: +52 55 54 83 7230; fax: +52 55 54 83 7238.
E-mail address: fdeleon@correo.xoc.uam.mx (F. De León-González).

0038-0717/$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.soilbio.2007.04.021

hyphae on soil stabilization into aggregates depends on tensile strengths of the hyphae cross linkages. Larger are the sand particles more hyphae length is required to stabilize a set of sand particles into macroaggregates. This is also true for microaggregates binding by hyphae under soils with higher clay content (Degens, 1997). Hypbae from non-mycorrhizal fungi also contribute to soil aggregation. The presence of fresh organic matter in the soil favours proliferation of saprophytic hyphae which can continue to grow under soil water deficits, as normally occurs in sandy soil (Degens, 1997).

Among root–soil stabilization, rhizosheaths formation is referred to as an outstanding mechanism consisting of sand particle coatings which cover the entire length of roots of many of the indigenous grasses (Goodchild and Myers, 1987). Rhizosheaths are shaped by the enmeshment of soil particles by root-hairs (Bristow et al., 1985); mucilages exuded by roots, in association with soil drying–wetting cycles, aid to stabilize them (Gregory, 2000). Rhizosheaths are mainly formed in sandy soil conditions (Duell and Peacock, 1985) and increased sand content resulted in higher root-hair density in grass species (Bailey and Scholes, 1997). These former authors reported differences in rhizosheath formation due to plant species. Watt et al. (1994) also reported that a decrease in soil water content caused a higher growth of maize root-hairs and rhizosheath stability. Several works (Bristow et al., 1985; North and Nobel, 1997) have reported that rhizosheaths reduced the soil resistance of water-flow towards roots. In arid conditions it has been confirmed that rhizosheaths become an habitat for diazotrophic bacteria (Wullstein et al., 1979; Othman et al., 2004). Although many studies document the rhizosheaths and their role in plant–soil water relationships, no reports were found about their specific involvement in sand particle entanglement, contrasting this situation with the multiple studies concerning hyphae contribution to sand particle binding and stabilizing into aggregates (Degens, 1997).

In a former study we found differences in the mass of soil adhered to by roots of three plant species (amaranth, common bean and maize; De León-González et al., 2006). Additionally, field observations made by the authors revealed that *C. dactylon* develops robust rhizosheaths on the entire root length. The aim of this work was to know the contribution of roots and hyphae in soil adhesion under sandy soil condition. Two hypotheses were tested: (a) sand particle binding is a result of root hairs and fungal hyphae contributions and (b) differences in intensity of sand particle binding are due to plant species.

2. Materials and methods

2.1. Soil

The site of study is situated in Tulyehualco (Mexico D.F., 19°15′N, 99°13′W, 2280 m, altitude). The soil (Entisol; Typic Ustifluvents; Soil Survey Staff, 1999) was originated by volcanic ash depositions; its texture is composed by 70, 140 and 790 g kg^{-1} of clay, silt and sand, respectively. Annual rainfall (567 mm) is concentrated in summer months (June–October); mean monthly temperature is 17.9 °C (De León-González et al., 2006).

2.2. Plant species

Seedlings of amaranth, maize and sunflower were transplanted (9 June 2005) as monocultures to field plots (9 m^2), under direct seeding (1 year of no-tillage with crop residues restitution). Plants of the three cultivated species were under grain filling when sampling was done. Bermuda grass grew spontaneously; weeds were manually controlled. Amaranth (domesticated in the valley of Mexico), maize and sunflower are three crop species well adapted to drought conditions. Bermuda grass in one of the most invasive plant species around the world, tolerant to drought and low temperatures; it is considered as a beneficial plant from a soil conservation point of view (Simmonds, 1979).

2.3. Extraction of root–soil monoliths

Root–soil monoliths were extracted on 9 September, 2005. Five plants per species were cut at the stalks base. A PVC cylinder (25.5 cm diameter; and 37.5 cm length) was introduced into the soil (25 cm depth) in the centre of each stalk. Cylinder with root:soil monolith was extracted removing the external soil. Root:soil monoliths were retired from PVC cylinder, manually pulled from the stalks, stored in plastic bags and transported to the laboratory. Monoliths were air-dried at laboratory temperature (22 °C) for 2 weeks.

2.4. Dry aggregate fractions

The root-adhering soil (RAS) was separated from the roots employing a dissection needle, progressing from the monolith base toward the upper side, trying to avoid soil pulverization and damage of root enmeshment. Root biomass (RB) was weighed and the soil separated from roots was passed through a column of sieves (Kemper and Rosenau, 1986), with manual agitation (60 spins). Seven soil aggregate fractions were obtained and weighed: <0.04, 0.04, 0.25, 0.50, 1, 2 and >5 mm; data were expressed in g 100 g^{-1} of total RAS mass. The RAS:RB ratio was calculated.

2.5. Water-stable macroaggregates (%WSA)

The stability test was performed in a sample of 2–5 mm aggregates taken from the fractions separated from root–soil monoliths. A pre-wetting was applied to prevent aggregate explosion due to rapid air expulsion. Five g of aggregates were placed for 30 min on a sand surface, re-wetted under −300 kPa and immersed for 10 min in an Erlenmeyer flask

where 50 mL of ethanol were added. Once the ethanol was removed, 150 mL of distilled water were added and a manual agitation (20 spins) was applied. Water was removed and aggregates were dried for 48 h and passed through a 2 mm sieve. Stable aggregate mass was weighed. This procedure combines two treatments proposed by Le Bissonnais (1996) for measurement of aggregate stability (slow wetting and mechanical breakdown by shaking after pre-wetting). This combination was well adapted to the very low stability of aggregates under study.

2.6. Macroaggregate porosity

Five aggregates (2–5 mm, air-dried) per plant species were observed under stereoscopic microscope (11 ×; Olympus® SZ-CTV). An image per aggregate was acquired (Image Pro® analysis system) and segmented in white–black colours. Voids corresponded to white colour and their integral area was obtained with the area measurement function of the image analysis system. Results of porosity were expressed as cm^2 of voids $100\,cm^{-2}$ soil.

2.7. Sand particles odhered to by hair-roots and hyphae

Three sections of dry roots (1 cm length, < 1 mm diameter) per species were obtained from root–soil monoliths before their disruption. Root sections were cut without abundant particle detachment. *C. dactylon* roots were more easily cutting; finer was the root more difficult was the cutting procedure. Root seetions were immersed for 10 min in a cotton blue solution (10%), and observed under a stereoscopic microscope (11x). For each root section an image (1 × 1 mm, frame) was acquired and saved. Hyphae were identified by their straight trajectories and shorter width than root hairs. In each image, the width and length of rizosheaths, root-hairs and hyphae were measured. Sand particles adhered to by root hairs and hyphae were counted and measured on 2D-images utilizing the image analyser mentioned above.

2.8. Evaluation of mycorrhizal colonization

Mycorrhizal colonization was assessed on fresh root subsamples from three plants per species (sampled on 9 September 2005) which were water-washed and stored at 4 °C. Roots were digested with KOH (10%) and stained with trypan blue in lactoglycerol (0.05%) (Phillips and Hayman, 1970). Thirty root sections (1 cm length) per plant were processed. Mycorrhizal colonization (M%) and abundance of arbuscules (A%) in the root system were calculated (Trouvelot et al., 1986). Data were processed with the Mycocalc program (www.dijon.inra.fr/mychintec/).

2.9. Statistical analysis

Normal distribution of data was verified. General lineal model (GLM) was carried out considering the effect of plant species on the set of experimental variables. Means were compared by Tukey test ($P<0.05$). GLM and regression analysis were done with SAS® program.

3. Results

3.1. Root-adhering soil: root biomass ratio (RAS:RB)

The amounts of RAS are shown in Table 1; statistical differences by plant species were not found for this variable. In contrast, the ratio RAS:RB of Bermuda grass and maize was three times higher than that of amaranth, and almost twice than that of sunflower (Table 1). The highest RAS:RB ratio for Bermuda grass (Table 1) confirms the efficiency of grasses to adhere to soil particles (Tisdall and Oades, 1979; Gijsman, 1996).

3.2. Dry and water stable aggregates, and aggregate porosity

The proportion of soil mass from the seven aggregate sizes is shown in Fig. 1. The highest soil mass in the range of 0.04–0.25 mm is consistent with the sandy nature of soil and their structural instability. The dominant sand fractions of the soil (0.04–0.25 mm) were not affected by plant species and minor changes were found for macroaggregate sizes (0.50, 1.0, 2.0 and > 2 mm). In general, soil particle distribution was not affected by plant species at the plant stage of sampling date (3 months after seeding). Mean values of WSA sampled from maize, sunflower and Bermuda grass were higher than those of amaranth (Table 1). Macroaggregates from amaranth soil samples had the highest porosity as compared to other three species (Table 1).

3.3. Root and rhizosheoth width, and density and length of root-hairs

Root and rhizosheath data are presented in Table 1. The three cultivated plant species had similar root width (120–150 μm). Bermuda grass presented the largest root and rhizosheath width (Table 1). Regression relationship between root and rhizosheath width was significant ($P<0.05$; rhizosheath = 194.2 + 0.5(root width); $R^2 = 28.1$).

For Bermuda grass and maize plants (3 month aged) the density of root-hairs was very close and duplicated that of amaranth and sunflower (Table 1; $P<0.01$). The length of root-hairs of Bermuda grass and maize was approximately 2.5 times of those observed in amaranth and sunflower (3 month aged; Table 1). The length of root hairs also showed differences among plant species. The ratio of the length of root-hairs of maize and Bermuda grass in relation to those of amaranth and sunflower was > 3:1 (Table 1). The width of root-hairs was comparable for the four plant species (Table 1).

Table 1
Soil physical variables (A), micrometry of root-hairs, hyphae and sand particles (B), and arbuscular mycorrhizal variables (C)

Variable	Amaranth	Bermuda grass	Maize	Sunflower
A				
Root adhering soil (RAS, g)	4197a	5146a	4968a	4287a
Root biomass (RB, g)	48.3a	19.8b	22.1b	27.6b
RAS/RB	88.6b	302.4a	257a	158.6ab
Water-stable aggregates (g 100 g^{-1})	53.1b	64.3a	66.8a	66.5a
Aggregate porosity (cm 100 cm^{-2})	19.7a	12.6b	14.6ab	15.3ab
B				
Root diameter (μm)	118b	261a	139b	151b
Rhizosheath diameter (μm)	272ab	379a	288ab	207b
Root hairs in 1 mm of root	8.8b	24.3a	21.6a	11.8b
Length of root hairs (μm)	62b	228a	198a	73b
Width of root hairs (μm)	6.7a	8.8a	9.4a	7.2a
Sand particles in root hairs (in 1 mm)	7.7b	21.6a	21.8a	5.9b
Size of sand particles (min)[a] in root hairs (μm)	18b	32a	32a	11b
Size of sand particles (max)[b] in root hairs (μm)	64b	162a	146a	34b
External hyphae in 1 cm of root	3.2a	0.4c	1.3b	3.1a
Length of external hyphae (μm)	507a	162b	459a	394a
Width of external hyphae (μm)	5a	1.4c	3.7b	4.9ab
Sand particles in hyphae (in 1 mm of root)	0.5a	0.2b	0.5a	0.5a
Size of sand particles (min)[a] in hyphae (μm)	36a	19b	39a	39a
Size of sand particles (max)[b] in hyphae (μm)	134a	75b	138a	124ab
C				
Mycorrhizal colonization in the root system (M%)	6.8b	23.5ab	25a	22.7ab
Abundance of arbuscules in the root system (A%)	0.3a	3.4a	1.2a	3.3a

[a]Data corresponding to minimum grain size observed in 1 mm root sections.
[b]Data corresponding to maximum grain size observed in 1 mm root sections. For each variable letters are indicative of statistical differences ($P<0.05$).

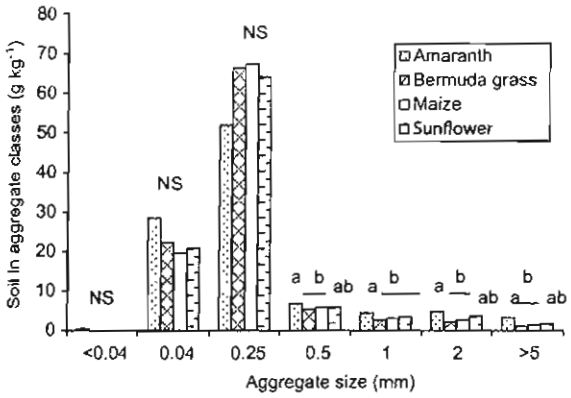


Fig 1. Relative proportion of aggregates in four plant species grown in a sandy soil. Letters above bars correspond to statistical groups (Tukey, $P<0.05$).

3.4. Sand particles adhered to by root-hairs

Root-hairs of maize and Bermuda grass attached three times more sand particles than those of amaranth and sunflower (Table 1). Figs. 2a and b show the contact between root-hairs of maize and Bermuda grass, and sand particles. In relation to the size of particles adhered to by roots, Bermuda grass and maize attached larger sand particles as compared to amaranth and sunflower ($P<0.05$). The size of fine sand particles adhered to by root-hairs of Bermuda grass and maize was 2.5 times higher than that of amaranth and sunflower (Table 1). Similarly, the sand particles with maximal size adhered to by root-hairs of Bermuda grass and maize were larger than those of amaranth and sunflower (Table 1).

3.5. Density, length and width of hyphae

Inversely to results found for root-hairs, hyphae density of amaranth and sunflower was 2.5 times higher than that of maize and Bermuda grass (Table 1). Hyphae of amaranth, sunflower and maize were longer than those of Bermuda grass (Table 1). Hyphae of amaranth were thicker than those of three other plant species.

3.6. Adhesion of sand particles by external hyphae

The range of the number of sand particles adhered to by hyphae was 0.2–0.5 mm^{-1}, which was lower than that of root hairs (6–22 mm^{-1}; Table 1). The size of sand particles adhered to by external hyphae (Fig. 3) was also affected by plant species (Table 1). The hyphae in roots of amaranth, sunflower and maize, adhered to larger sand particles as compared to those in Bermuda grass. The linear relationship between external hyphae abundance and proportion of macroaggregates (2–5 mm) was significant ($P<0.01$; Fig. 4). External hyphae may correspond to mycorrhizal or

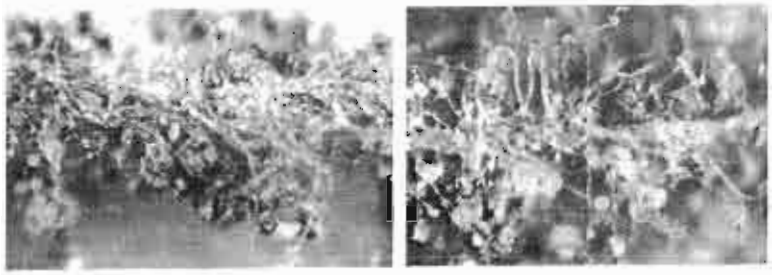


Fig 2. Root-hairs adhering sand particles. (2a) Maize (frame width: 1.33 mm) and (2b) Bermuda grass (frame width: 1.27 mm).

Fig 3. Hyphae stained with cotton blue and adhering sand particles in the root system of amaranth (frame width: 1.23 mm).

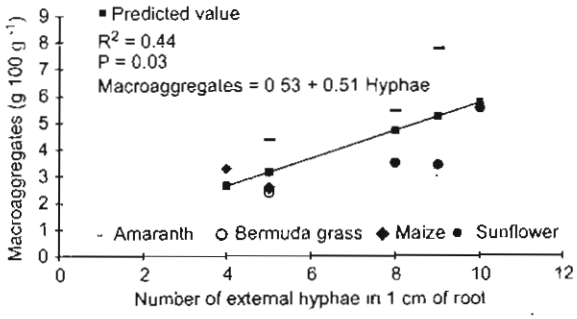


Fig 4. Linear relationship between number of external hyphae in root sections (1 cm) and macroaggregate mass (2–5 mm) in four plant species growing in a sandy soil.

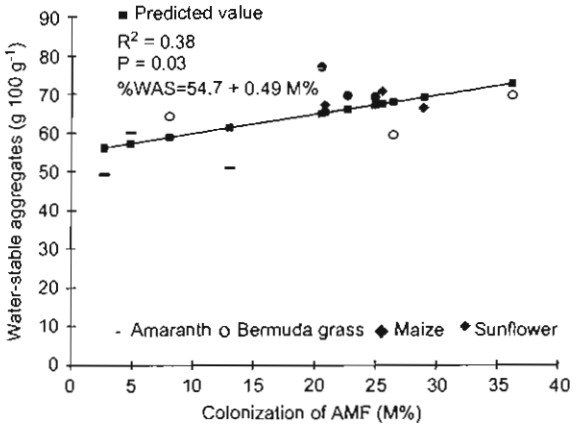


Fig 5. Linear relationship between AMF colonization and water-stable aggregates (2–5 mm) of four plant soil samples.

saprophytic fungi. The plant species that did not present external hyphae in two of the three plants was Bermuda grass, which had the highest root-hair density (Table 1). However, the significance of these results is limited if is considered that hyphae density can change rapidly, and data reported here corresponded to only one sampling date. Additionally, each plant species can be colonized by different fungi species (Abbott et al., 1992).

3.7. Root colonization of AMF

Intensity of mycorrhizal colonization in the whole root system (M%) was higher (23–25%) in maize, Bermuda grass and sunflower as compared to that of amaranth which showed only a 6.8% (Table 1). No differences were found for arbuscule abundanee in the root system of the four plant species (3 months aged, Table 1). *A. hypochondriacus* is considered as non-mycorrhizal, however, in this study the three analysed plants showed typical structures of AM (vesicles, hyphae) in the root system and values for M% were 2.6%, 4.8% and 13%, respectively. Only one plant presented arbuscules, but at very low levels (A% = 1.17). On the other hand, a linear relationship between M% and WSA was significant ($P<0.01$; Fig. 5).

4. Discussion

The first hypothesis related to simultaneous contribution of root-hairs and fungal hyphae to binding sand particles was confirmed by data presented here. Enmeshment of soil particles was much more important by root hairs than by hyphae (a ratio of 40:1 under maize, and 100:1 under Bermuda grass; Table 1). The very high root-hair density and the high number of sand particles adhered to by them are two factors that can explain the efficiency (assessed by RAS/RB ratio) of both species to adhere to soil under field conditions.

The second hypothesis concerning the effect of plant species on soil binding mechanisms was only partially

probed. Differences in root-hairs density, external and internal hyphae densities and abundance of sand particles in root and hyphae variables caused by plant species were found. However, it must be considered that the differences in root growth patterns can impose changes in the dynamics of root-hair density, and also in their longevity, and that of fungal hyphae. These facts could affect the intensity of soil binding mechanisms reported here. A study considering several sampling times must guarantee conclusive results about the impact of plant species on the soil adhesion mechanism.

Rhizosheath was robust in the two monocotyledon species as compared to amaranth and sunflower. Duell and Peacock (1985), Watt et al. (1994) and Czarnes et al. (2000) reported the importance of rhizosheaths for soil adhesion of grass species growing under sandy conditions. Results attained in the present study, with plants grown during 3 months, showed that root-hairs density and length were higher in maize and Bermuda grass than those of amaranth and sunflower. Bermuda grass is a perennial species whose major longevity can help to cumulate sand particles over its rhizosheaths, resulting in a higher stabilized soil mass as compared to the other annual plant species grown for 3 months.

Size range of sand particles attached by hyphae was similar than that of root-hairs (20–150 μm). This is coincident with a former study where 100 μm sand particle binding by hyphae was reported (Degens, 1997). Mean values of root-hair density reported here were higher than those reported for African grasses *Anthephora pubescens*, *Digitaria eriantha* and *Eragrostis pallens* (7, 1 and 10 mm^{-1} of root, respectively, under a soil texture similar to our study, 80 g of sand 100 g^{-1}) (Bailey and Scholes, 1997).

Another finding was the lower abundance of external hyphae in the two species with high root-hair density (Bermuda grass and maize). Root hairs may be a restriction factor to external hyphae colonization. The few external hyphae colonizing roots of maize and Bermuda grass could correspond to AMF or to saprophytic fungi (Abbott et al., 1992).

According to data directly measured on the root sections obtained from rhizosphere of plants grown at field during 3 months, hyphae (AM and saprophytic fungi) seemed to have a minor participation in the aggregation and stabilization of the sandy soil. In contrast, the regression analysis between mycelium and aggregation and stabilization variables resulted in a positive correlation, which is coincident with that reported by Tisdall et al. (1997), Kabir and Koide (2000), and Rillig et al. (2002).

Levels of mycorrhizal colonization in the whole root system of maize, Bermuda grass and sunflower ranged from 23% to 25%. Genus *Amaranthus* has mostly been considered as non-mycorrhizal; however, Shanker et al. (1991) and Takaaki et al. (1998) observed AMF colonization in some *Amaranthus* species. In our study mycorrhizal structures (internal hyphae and vesicles) were present in amaranth roots ($M\% = 6.8$) growing under field conditions; however, arbuscules were observed at very low levels in only one root system. Semi-arid conditions in the valley of Mexico may favour AM symbiosis in amaranth as suggested previously by Shanker et al. (1991) and Quilambo (2003).

5. Conclusions

Soil binding by root-hairs was the main mechanism in sandy soil adhesion. Hyphae (saprophytic and AMF) soil binding was a minor mechanism in this process. Roots of maize and Bermuda grass (3 months aged) showed a higher efficiency to adhere to soil than those of amaranth and sunflower. This efficiency was based on high abundance (20–25 root-hairs in each mm of root section), long root-hairs (200 μm), and high quantity of sand particle binding (>20 sand particle mm^{-1} of root section). The four plant species under study exhibited AMF colonization.

Acknowledgements

The authors are grateful to German D. Mendoza Martinez (UAM-Xochimilco) for reviewing the final paper, and to Hector Castillo Juarez (UAM-Xochimilco) for assistance on statistical analysis. They recognize the intellectual inputs of the two anonymous reviewers of SBB. CONACYT (Mexico) financed this research (P-39918Z) and also the M.Sc. program of I.P. Moreno-Espíndola.

References

Abbott, L.K., Robson, A.D., Jasper, D.A., Gazey, C., 1992. What is the role of VA mycorrhizal hyphae in soil? In: Read, D.J., Lewis, D.H., Fitter, A.H., Alexander, I.J. (Eds.), Mycorrhizas in Ecosystems. CAB International, Wallingford, pp. 37–41.

Andrade, G., Mihara, K.L., Linderman, R.G., Bethlenfalvay, G.J., 1998. Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. Plant and Soil 202, 89–96.

Bailey, C., Scholes, M., 1997. Rhizosheath occurrence in South African grasses. South African Journal of Botany 63, 484–490.

Bristow, C.E., Campbell, G.S., Wullstein, L.H., Neilson, R., 1985. Water uptake and storage by rhizosheaths of *Oryzopsis hymenoides*: a numerical simulation. Physiologia Plantarum 65, 228–232.

Bethlenfalvay, G.J., Barea, J.M., 1994. Mycorrhizae in sustainable agriculture. I. Effects on seed yield and soil aggregation. American Journal of Alternative Agriculture 9, 157–161.

Czarnes, S., Dexter, A.R., Bartoli, F., 2000. Wetting and drying cycles in the maize rhizosphere under controlled conditions. Mechanics of the root-adhering soil. Plant and Soil 221, 253–271.

De León-González, F., Celada, T.E., Hidalgo-Moreno, C.I., Etchevers-Barra, J.D., Gutiérrez-Castorena, M.C., Flores-Macias, A., 2006. Root–soil adhesion in a volcanic sandy soil of Mexico. Soil and Tillage Research 90, 77–83.

Degens, B.P., Sparling, G.P., Abbott, L.K., 1996. Increasing the length of hyphae in a sandy soil increases the amount of water-stable aggregates. Applied Soil Ecology 3, 149–159.

Degens, B.P., 1997. Macro-aggregation of soils by biological bonding and binding mechanisms and the factors affecting these: a review. Australian Journal of Soil Research 35, 431–459.

Duell, R.W., Peacock, G.R., 1985. Rhizosheaths on mesophytic grasses. Crop Science 25, 880–883.

Gijsman, A.J., 1996. Soil aggregate stability and soil organic matter fractions under agropastoral systems established in native savanna. Australian Journal of Soil Research 34, 891–907.

Gregory, P.J., 2000. Physical changes in the rhizosphere and their significance for plant-soil interactions. Acta Agricola Hungarica 48, 107–112.

Goodchild, D.J., Myers, L.F., 1987. Rhizosheaths, a neglected phenomenon in Australian agriculture. Australian Journal of Agricultural Research 38, 559–563.

Kabir, Z., Koide, R.T., 2000. The effect of dandelion or a cover crop on mycorrhiza inoculum potential, soil aggregation and yield of maize. Agriculture Ecosystems and Environment 78, 167–174.

Kemper, D.W., Rosenau, R.C., 1986. Aggregate stability and size distribution In: Kute, A. (Ed.), Methods of Soil Analysis, Part 1, Physical and Mineralogical Methods. American Society of Agronomy, New York, pp. 425–442.

Le Bissonais, Y., 1996. Aggregate stability and assessment of soil crustability and erodability: I. Theory and methodology. European Journal of Soil Science 47, 245–437.

Miller, R.M., Jastrow, J.D., 1992. The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. Special Publication Number 54. American Society of Agronomy, Madison, pp. 29–42.

North, G.B., Nobel, P.S., 1997. Drought-induced changes in soil contact and hydraulic conductivity for roots of *Opuntia ficus-indica* with and without rhizosheaths. Plant and Soil 191, 249–258.

Othman, A.A., Amer, W.M., Fayez, M., Hegazi, N.A., 2004. Rhizosheath of Sinai desert plants is a potential repository for associative diazotrophs. Microbiological Research 159, 285–293.

Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55, 158–161.

Piotrowski, J.S., Denich, T., Klironomos, J.N., Graham, J.M., Rillig, M.C., 2004. The effects of arbuscular mycorrhizas on soil aggregation depend on the interaction between plant and fungal species. New Phytologist 164, 365–373.

Quilambo, O.A., 2003. The vesicular–arbuscular mycorrhizal symbiosis African Journal of Biotechnology 2, 539–546

Rillig, C.M., Wright, F.S., Eviner, T.V., 2002 The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five species. Plant and Soil 238, 325–333.

Shanker, N.A., Mathew, J., Varma, A., 1991. Occurrence of vesicular–arbuscular mycorrhizae with Amaranthaceae in soils of the Indian semiarid region. Biology and Fertility of Soils 11, 140–144.

Summonds, N.W., 1979. Evolution of crop plants. Longman, London.

Soil Survey Staff, 1999. Soil taxonomy, second ed Natural Resources Conservation Service, Washington, 869pp.

Takaaki, I., Matsumoto, I., Shrestha, Y.H., Wamocho, L.S., Kadoya, K., 1998. Observation of vesicular-arbuscular mycorrhizal formation in the roots of some seasonal weeds proliferated in citrus orchards. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 67, 556–558.

Tisdall, J.M., 1994. Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. Plant and Soil 159, 115–121.

Tisdall, J.M., Smith, S.E., Rengasamy, P., 1997. Aggregation of soil by fungal hyphae. Australian Journal of Soil Research 35, 55–60.

Tisdall, J.M., Oades, J.M., 1979. Stabilisation of soil aggregates by the root systems of ryegrass. Australian Journal of Soil Research 17, 429–441.

Trouvelot, A., Kough, J.L., Gianinazzi-Pearson, V., 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système radiculaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. (Eds.), The Mycorrhizae, Physiology and Genetics. INRA Presse, Paris, pp. 217–221.

Watt, M., McCully, M.E., Canny, M.J., 1994. Formation and stabilisation of maize rhizosheaths: effect of soil water content. Plant Physiology 106, 179–186.

Wullstein, L.H., Bruening, M.L., Bollen, W.B., 1979. Nitrogen fixation associated with sand grain root sheaths (rhizosheaths) of certain xeric grasses. Physiologia Plantarum 46, 1–4.

3. COMUNIDAD BACTERIANA Y FÚNGICA EN SUELO RIZOSFÉRICO, NO RIZOSFÉRICO Y MACROAGREGADOS:

"Biomasa y actividad exoenzimática microbiana en un suelo arenoso"

RESUMEN

Los microorganismos del suelo son fundamentales para el reciclamiento de los nutrimentos y el desarrollo vegetal. La diversidad de funciones que pueden realizar en torno a nutrimentos como el C, N y P está definida por el microambiente del suelo en el que habitan, así como por las condiciones ambientales como la disponibilidad de O_2. En el presente estudio se evaluó la biomasa bacteriana, la presencia de grupos bacterianos funcionales relacionados al ciclo del N, y el potencial exoenzimático de bacterias y hongos en suelo rizosférico, no rizosférico y macroagrgados, de cuatro especies vegetales (amaranto, pasto Bermuda, maíz y girasol), establecidas en un suelo arenoso. Los resultados muestran una relación sintrófica en cuanto al uso de sustratos para su metabolismo, entre las comunidades bacteriana y fúngica. La mayor biomasa bacteriana estuvo presente en el suelo rizosférico de las cuatro especies vegetales. La potencialidad exoenzimática que presentaron bacterias y hongos está relacionada con los ciclos biogeoquímicos de macronutrientes y varía de acuerdo con la disponibilidad de O_2. El tipo de suelo (rizosférico, no rizosférico o macrogregados), afecta el volumen celular bacteriano ($P=0.06$). El reciclamiento de las sustancias nitrogenadas de importancia para los productores primarios es bien realizado por la microbiota presente en el suelo.

Palabras clave: Biomasa bacteriana, grupos funcionales, hongos, macroagregados, potencial enzimático, suelo rizosférico.

1. Introducción

La importancia de los microorganismos en los procesos dinámicos del suelo radica en parte en su abundancia (biomasa) y su capacidad para interactuar con otros componentes del sistema (Alami *et al.*, 2000). Así, se ha investigado el papel de microorganismos como hongos y bacterias rizosféricas en la formación de agregados

estables (Degens, 1997), y la continuidad de los ciclos biogeoquímicos del C, N y P (Chèneby *et al.*, 2004). Los grupos bacterianos asociados al ciclo del C y del N destacan tanto por su importancia para la productividad de sistemas agrícolas, como para el mantenimiento de ecosistemas forestales y el ambiente en general (Cerón y Melgarejo, 2005). Estos microorganismos interactúan con las raíces de las plantas, con las partículas minerales y sustancias orgánicas del suelo. La mineralización de la materia orgánica y la secreción de sustancias mucilaginosas (principalmente polisacáridos), son actividades que las bacterias realizan en beneficio de la estructura física y bioquímica del suelo. Los mucílagos producidos por las bacterias se han asociado a la formación de microagregados (Oades, 1993). El papel de las bacterias en la formación y estabilidad de los agregados se ha estudiado en la masa total del suelo (Alami *et al.*, 2000). Se ha reportado también que el papel de las bacterias rizosféricas en la agregación y la composición de sus comunidades varía de acuerdo con las características de cada especie vegetal a la que se asocian (Alvey *et al.*, 2003).

Por otra parte, las bacterias interactúan con otros microorganismos del suelo como los hongos micorrízico arbusculares (HMA) favoreciendo la asociación simbiótica de éstos con las especies vegetales (Roesti *et al.*, 2005). Las bacterias producen enzimas extracelulares e intracelulares con una elevada actividad metabólica; de esta capacidad se desprende su importancia como componentes fundamentales en la dinámica y calidad edáfica (Cerón y Melgarejo, 2005). El intercambio de señales químicas y nutrimentos ocurre de manera destacada en la rizosfera (Linderman, 1992). En sistemas agrícolas el papel de las bacterias asociado a los procesos de mineralización resulta importante pues la disponibilidad de nutrimentos como el N en formas asimilables por las plantas, se ve influenciada por los tipos fisiológicos presentes (Schloter *et al.*, 2003). El conocimiento de estos procesos puede aportar elementos para la determinación de sistemas de fertilización que disminuyan las pérdidas y los problemas de contaminación edáfica (Kim *et al.*, 2006), así como para caracterizar las comunidades bacterianas en ciertos suelos. Se ha analizado la composición y función de las comunidades bacterianas rizosféricas y del suelo adyacente, en los que se han identificado modelos de asociación y tipos bacterianos que actúan en función de condiciones específicas (Cook *et al.*, 2006; Philippot *et al.*, 2006; Raynaud *et al.*, 2006).

En el presente trabajo fue determinada la producción de biomasa bacteriana, los grupos funcionales bacterianos y el potencial exoenzimático de bacterias y hongos presentes en la rizosfera, en el suelo no rizosférico y en macroagregados (2-5 mm) de cuatro especies vegetales (*Amaranthus hypochondriacus* L., *Zea mays* L., *Helianthus annuus* L. y *Cynodon dactylon,* un pasto invasivo. El estudio se llevó a cabo en un suelo arenoso ubicado al sur del Valle de México. Con este trabajo se pretende iniciar la caracterización de las comunidades bacterianas, particularmente aquellas relacionadas con el ciclo biogeoquímico del N, así como su potencial para mineralizar la materia orgánica (MO). En estos suelos los microorganismos influyen no solamente en las necesidades del sistema agrícola, sino que también participan en la estabilización del suelo a partir de la formación de agregados y en el aporte de minerales en formas asimilables para las plantas que a su vez actúan como cobertura contra la erosión (Moreno-Espíndola *et al.*, 2007).

2. Materiales y métodos

2.1 Sitio de estudio

El trabajo se desarrolló en Tulyehualco (México, D.F.), en el año de 2005. El suelo (Entisol; Typic Ustifluvents), es de origen volcánico, compuesto por 70, 140 y 790 g kg^{-1} de arcilla, limo y arena, respectivamente.

2.3 Diseño experimental

Se establecieron cuatro especies vegetales *A. hypochondriacus* (amaranto), *C. dactylon* (pasto Bermuda), *Z. mays* (maíz) y *H. annuus* (girasol); en una parcela experimental, mediante un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones.

2.3 Muestreo

Se tomaron cinco muestras por especie vegetal mediante el sistema de monolitos, consistente en el empleo de un cilindro de PVC (25.5 cm de diámetro por 37.5 cm de largo), para extraer una masa de suelo conteniendo el entramado radical y el suelo rizosférico (USDA, 1999). A partir de los monolitos se obtuvieron submuestras con una jeringa estéril sin punta para los análisis bacterianos correspondientes en suelo rizosférico y macroagregados. El suelo no rizosférico se extrajo de la parte adyacente al

monolito. Las submuestras para los análisis microbiológicos fueron obtenidas de monolitos elegidos al azar por especie vegetal. Se tomaron 5 g de suelo con raíces, agregados y suelo no rizosférico, por muestra. Las muestras se conservaron en frascos de vidrio estériles con 18 ml de gliceraldehido al 20%, y se congelaron a -18°C hasta su procesamiento. Las muestras para determinación de la biomasa bacteriana se preservaron en frascos de vidrio estériles con 18 ml de formaldehído al 2% saturado con borato y se almacenaron en oscuridad a 5°C.

2.4 Biomasa

La biomasa bacteriana total de suelo rizosférico, no rizosférico y agregados fue calculada por la técnica de conteo directo/biovolumen por microscopía de epifluorescencia. Se tomó 1 ml por cada muestra (tipo de suelo y especie vegetal) preservada en formaldehído al 2 %, el cual fue colocado en un frasco estéril con 9 ml de solución Tween 80 (1/100); se dejó reposar por 10 min y se ultrasonicó (SONICS Vibra cell™) con una punta de 8 mm de diámetro; amplitud 40, durante 2 min, pulsación 5``. De la muestra ultrasonicada se tomaron 250 µl y se colocaron en un frasco con 10 ml de agua destilada con 0.005 g de NaN_3; finalmente fue agitada en un vórtex para obtener una suspensión. A continuación se tomaron alícuotas de 2 ml diluídas 4000 veces, a las que se les adicionó 0.7 ml de fluorocromo DAPI (4´6´-diamidino-2-fenilindol) a una concentración final de 0.5 µg ml^{-1} (Ronald, 1993). Las muestras fueron homogeneizadas y conservadas a 4°C por 12 h en oscuridad. Posteriormente se filtraron 2 ml a través de membranas negras de policarbonato Nucleopore de 0.2 µm de diámetro de poro, y fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus Bimax 50 (Evelyn *et al.*, 1993); se contaron 20 campos al azar por filtro, para obtener una representatividad estadística en cuanto al número de células. El biovolumen fue calculado a partir de una serie de fotografías tomadas con un sistema de microfotografía PM30 (Olympus) y proyectadas sobre una pantalla (van Wambeke, 1988), para el cálculo de la biomasa (fg C cm^2 de suelo). Se utilizó un factor de conversión de biovolumen:carbono de 1.7×10^{-13} propuesto por Torreton (1992), de acuerdo con los cálculos reportados para comunidades bacterianas heterótrofas aerobias. En el caso de las bacterias provenientes del suelo rizosférico de maíz y

girasol se utilizó el factor 2.2×10^{-13} debido a su gran tamaño. El biovolumen se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$N = n \times d \times \text{superficie de observación} \times \frac{1}{v} \times \frac{10}{9}$$

Donde N = número total de bacterias; n = media del número de bacterias por campo; d = dilución dentro de la torrecilla de filtración; v = volumen filtrado; 10/9 = corrección debida al formaldehido.

$$\text{Biovolumen de los bacilos} = p\left(L\frac{w^2}{4} - \frac{w^3}{12}\right) / \text{factor de agrandamiento}$$

$$\text{Biovolumen de los cocos} = p \times \frac{w^3}{6} / \text{factor de agrandamiento}$$

$$\text{Volumen medio} = \frac{?\ \text{de cada célula}}{\text{No. de células medidas}}$$

Para calcular la biomasa se aplicó la siguiente fórmula:

Biomasa fg C cm^3 = conteo directo/ml x volumen medio x factor de conversión

2.5 Grupos funcionales bacterianos

Para evidenciar y cuantificar los grupos bacterianos funcionales presentes en el suelo rizosférico, no rizosférico y macroagregados se utilizó el método de unidades formadoras de colonias (UFC) y serie de diluciones decimales en tubos de Hungate gasificados con 4% de O_2 (Prescott *et al.*, 1999). Se utilizaron medios de cultivo específicos para cada grupo funcional en condiciones de baja presencia de oxígeno (pO_2 4% balanceado con N_2) (Ferrara-Guerrero *et al.*, 1993). Por otra parte, se observó la capacidad de respirar NO_3^-, oxidar y fermentar glucosa (Hugh y Leifson, 1953). Los medios líquidos para bacterias oxidadoras de NH_4^+ y NO_2^- fueron enriquecidos con soluciones de oligoelementos y vitaminas (Balch *et al.*, 1979). El tiempo de incubación fue de 25 y 45 días, respectivamente, a temperatura ambiente y dentro de jarras de anaerobiosis (Bioxon), bajo atmósfera con la mezcla específica de pO_2 4% balanceado con N_2. Las siembras se realizaron por triplicado. Para fijadoras de N_2 se utilizó un medio semisólido (2 g de agar l^{-1}) libre de nitrógeno combinado (Ferrara-Guerrero *et al.*, 1993). El tiempo de incubación fue de 15 días. La estimación del número más probable

(NMP) se hizo con base en la tabla estadística propuesta por Loyer y Hamilton (1984). Para verificar la fermentación de glucosa se utilizó el mismo medio que para la oxidación pero con menor cantidad de agar bacteriológico (2.5 g/l) y en condiciones de anaerobiosis.

2.6 Actividad exoenzimática

Se realizó en placas de cultivo con medios específicos para cada actividad exoenzimática bacteriana y fúngica a partir de una submuestra de 2 cm^3 de suelo por muestra. Actividades: a) Esculinasa (peptona 1 g l^{-1}; esculina 1 ml l^{-1}; $FeSO_4$ 1 g l^{-1}; agar bacteriológico (ab) 20 g l^{-1}; medio base dulce (mbd) a pH 7). b) Fosfatasa (Na-p-nitrofenilfosfato 2 g l^{-1}; Tris-HCL 50 ml l^{-1}; ab 20 g l^{-1}; mbd a pH 7). c) Quitinasa (quitina molida 1 g l^{-1}; ab 20 g l^{-1}; mbd a pH 7). d) Amilasa (almidón soluble 1.5 g l^{-1}; agar 20 g l^{-1}; mbd a pH 7). e) Proteasa (agar nutritivo 20 g l^{-1}; mbd a pH 7.0). f) ADNasa (medio ADNasa (Bioxon) 47.2 g l^{-1}; NaCl 20 g l^{-1}; ab 20 g l^{-1}; mbd a pH 7). Medio base dulce utilizado en todos las pruebas exoenzimáticas (mbd): Na_2HPO_4 $12H_2O$ 3.5 g l^{-1}; KH_2PO_4 0.98 g l^{-1}; $MgSO_4$ $7H_2O$; 0.03 g l^{-1}; NH_4Cl 5.0 g l^{-1}; solución de oligoelementos 0.2 ml l^{-1}. Solución de oligoelementos (g l^{-1}): EDTA monobásico 50 g l^{-1}; $ZnSO_4$ $7H_2O$ 2.2 g l^{-1}; $CuCl_2$ $2H_2O$ 5.5 g l^{-1}; $MnCl_2$ $4H_2O$ 5 g l^{-1}; $FeSO_4$ $7H_2O$ 4.7 g l^{-1}; $CuSO_4$ $5H_2O$ 1.5 g l^{-1}; $CaCl_2$ $6H_2O$ 1.6 g l^{-1}. La cuantificación de bacterias y hongos productores de exoenzimas se realizó con base en las UFC y series de diluciones decimales (Prescott *et al.*, 1999), en condiciones de baja presencia de oxígeno, utilizando pO_2 4% balanceado con N_2 y en condiciones de aerobiosis (pO_2 21%) (Ferrara-Guerrero *et al.*, 1993). La siembra se realizó por duplicado y el tiempo de incubación fue de 10 días.

2.7 Análisis estadístico

Los resultados en cuanto a biomasa, grupos funcionales y potencial exoenzimático fueron sometidos a un ANDEVA de una vía, comparando el efecto tanto de las especies vegetales, como de los suelos (rizosférico, no rizosférico y macroagregados). Se realizaron correlaciones de Pearson entre los potenciales exoenzimáticos. Se utilizó el programa estadístico SAS.

3. Resultados

3.1 Biomasa

La media de biomasa bacteriana en los tres tipos de suelo fue de 0.457 mg C m^2. En el suelo rizosférico de maíz y girasol la biomasa bacteriana fue más elevada debido a que el volumen celular fue mayor (Cuadro 1). En todos los casos el suelo rizosférico presentó la mayor biomasa bacteriana. Al realizar un ANDEVA se observó que el volumen celular medio depende del tipo de suelo (P=0.06). Los mayores volúmenes celulares fueron encontrados en el suelo rizosférico de maíz y girasol, el menor volumen celular se encontró en el suelo no rizosférico de pasto Bermuda (Cuadro 1). Las formas bacterianas que prevalecieron fueron cocos y bacilos.

Cuadro 1. Biomasa bacteriana en suelo rizosférico (sr), no rizosférico (snr) y macroagregados (ag) de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso.

Cultivo	Volumen celular medio (μm^3)	Conteo directo (c˜l/ml)	Biomasa (mgC m^2)
sr			
Amaranto	0.129	7.69×10^8	0.82
Pasto Bermuda	0.203	3.80×10^8	0.64
Ma'z	0.712	2.84×10^8	1.29
Girasol	0.732	4.53×10^8	2.12
snr			
Amaranto	0.110	3.19×10^8	0.36
Pasto Bermuda	0.027	3.91×10^8	0.09
Ma'z	0.103	3.54×10^8	0.30
Girasol	0.179	4.07×10^8	0.60
ag			
Amaranto	0.105	3.18×10^8	0.28
Pasto Bermuda	0.201	3.54×10^8	0.59
Ma'z	0.162	3.09×10^8	0.41
Girasol	0.165	3.60×10^8	0.49

Figura 1. Bacterias presentes en la rizosfera de *Heliantus annuus*.

Estadísticamente la biomasa bacteriana en la rizosfera fue significativamente superior (P<0.05) que en el suelo no rizosférico y los macroagregados.

3.2 Tipos fisiológicos bacterianos

En los suelos de las cuatro especies vegetales se detectaron poblaciones bacterianas con actividad fijadora de N_2, amonificantes y nitrificantes (Cuadro 2). Un ANDEVA mostró que sólo existieron diferencias significativas en cuanto a la amonificación

atribuible a la especie vegetal; el maíz y el amaranto fueron las especies asociadas a una mayor potencialidad bacteriana para amonificar el suelo ($P<0.05$). En el caso de las fijadoras de N_2 el NMP más alto se observó en suelo rizosférico de amaranto; por su parte, el NMP más elevado de las oxidadoras de NH_4^+ estuvo presente en suelo rizosférico de pasto Bermuda, suelo no rizosférico de amaranto, pasto Bermuda y girasol, y en macroagregados de pasto Bermuda, maíz y girasol (Cuadro 2).

Cuadro 2. NMP ml^{-1} de bacterias con capacidad para reciclar el N en suelo rizosférico (sr), no rizosférico (snr) y macroagregados (ag). La respiración de NO_3^-, oxidación y fermentación de la glucosa se representan como pruebas positivas o negativas.

			NITRIFICANTES				
Cultivo	Fij N_2	Amonificantes	Ox. NH_4^+	Ox. NO_2^-	Resp NO_3^-	Ox. Glucosa	Fer. Glucosa
sr							
Amaranto	5.49×10^8	5.49×10^8	2.31×10^7	5.49×10^8	+	+	+
Pasto Bermuda	1.38×10^2	1.74×10^3	5.49×10^8	5.49×10^8	+	+	+
Maíz	5.49×10^6	5.49×10^8	2.63×10^4	5.49×10^9	+	+	–
Girasol	2.12×10^2	5.49×10^4	5.49×10^7	5.49×10^8	+	+	–
snr							
Amaranto	1.07×10^6	5.49×10^8	5.49×10^8	5.49×10^8	+	+	+
Pasto Bermuda	4.59×10^3	2.63×10^3	5.49×10^8	5.49×10^8	+	+	+
Maíz	7.34×10^3	5.49×10^8	1.07×10^0	5.49×10^6	+	+	–
Girasol	1.68×10^4	1.07×10^6	5.49×10^8	5.49×10^8	+	+	+
ag							
Amaranto	3.68×10^2	5.49×10^8	2.63×10^4	5.49×10^8	+	+	+
Pasto Bermuda	1.02×10^4	2.20×10^4	5.49×10^8	5.49×10^8	+	+	+
Maíz	1.05×10^2	5.49×10^8	5.49×10^8	5.49×10^8	+	+	–
Girasol	5.59×10^1	1.46×10^6	5.49×10^8	5.49×10^8	+	+	+

El NMP de bacterias oxidadoras de NO_2^- fue el mismo en todas las muestras. Por otra parte, se observó una respuesta positiva en todos los casos en lo que concierne a la respiración de NO_3^-. En cuanto a la oxidación de glucosa todas las muestras fueron positivas; la fermentación de glucosa sólo fue negativa en suelo rizosférico de maíz y girasol, suelo no rizosférico de maíz, así como en los macroagregados de maíz (Cuadro 2).

3.3 Potencial exoenzimático bacteriano y fúngico

Los resultados mostraron la existencia de comunidades bacterianas y fúngicas heterótrofas. En ambas comunidades se presentaron actividades de degradación ligadas a los ciclos del C, N y P (Figs. 2 y 3). Como puede apreciarse, la disponibilidad de oxígeno (4% ó 21%), afectó los potenciales exoenzimáticos, particularmente en la comunidad fúngica del suelo no rizosférico y macroagregados del maíz (Fig. 3).

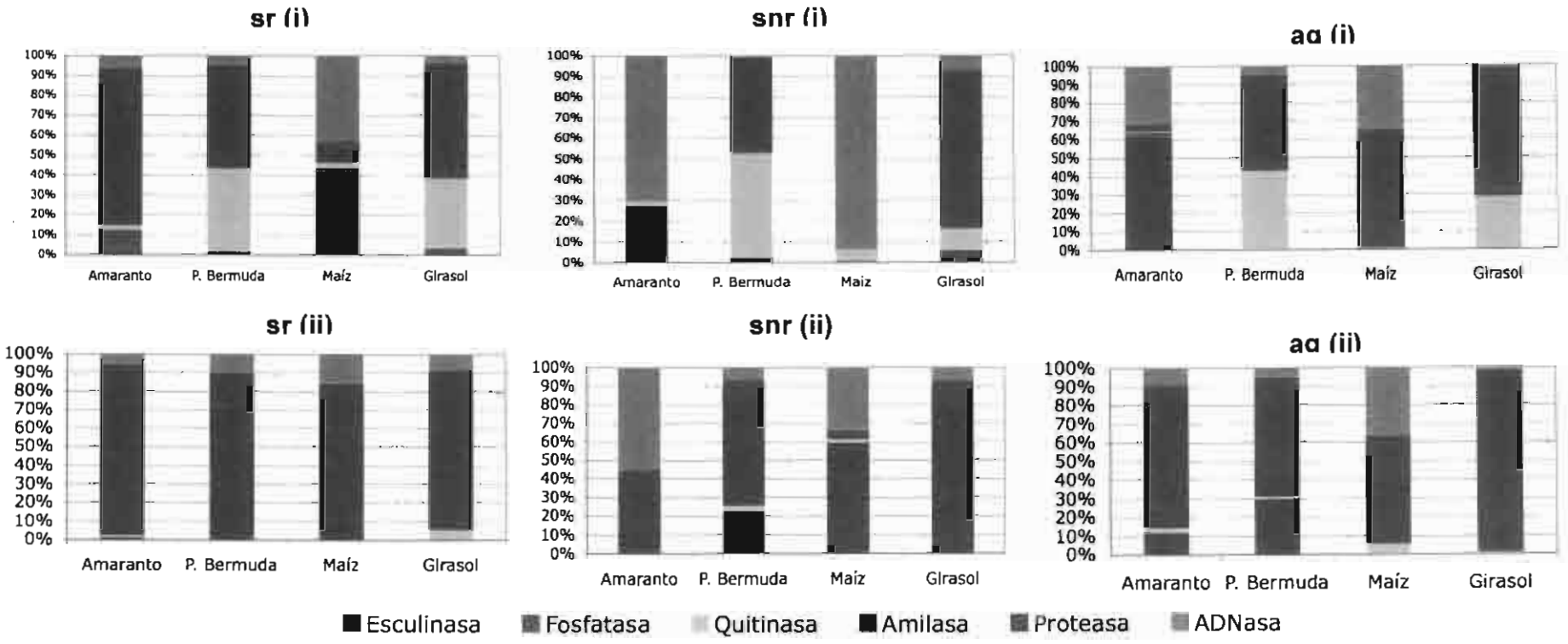


Figura 2. Actividad exoenzimática **bacteriana** en suelo rizosférico (sr), no rizosférico (snr) y macroagregados (2-5 mm) (ag), de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso, en condiciones de microaerobiosis (i), y de aerobiosis (ii). Resultados expresados en porcentaje de cada actividad con respecto al número total de UFC. A, amaranto; P, pasto Bermuda; M, maíz; G, girasol.

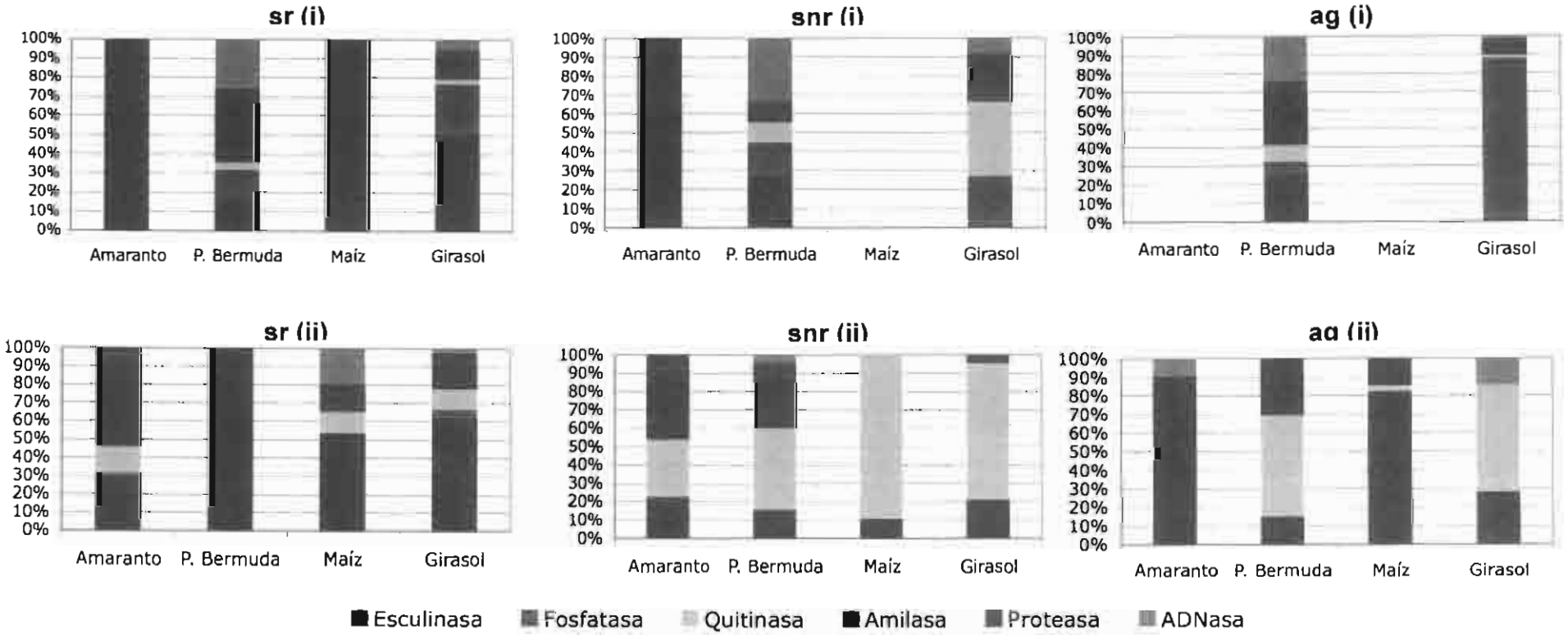


Figura 3. Actividad exoenzimática **fúngica** en suelo rizosférico (sr), no rizosférico (snr) y macroagregados (2-5 mm) (ag), de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso, en condiciones de microaerobiosis (i), y de aerobiosis (ii). Resultados expresados en porcentaje de cada actividad con respecto al número total de UFC. A, amaranto; P, pasto Bermuda; M, maíz; G, girasol.

Las bacterias presentaron potencial para al menos cinco actividades exoenzimáticas distintas en la rizosfera de cada especie vegetal en condiciones de microaerobiosis, mientras que en aerobiosis la variedad de actividades potenciales disminuyó (particularmente en el caso de la fosfatasa y la quitinasa) (Fig. 2). La comunidad fúngica de la rizosfera por el contrario, presentó mayor diversidad de actividades exoenzimáticas en condiciones de aerobiosis (Fig. 3). En el caso del suelo no rizosférico las bacterias realizaron predominantemente actividades ligadas a la liberación de compuestos nitrogenados (proteasa y ADNasa) en condiciones de microaerobiosis; a mayor disponibilidad de O_2, predominaron en esta comunidad actividades ligadas a la hidrólisis de hidratos de carbono de alto peso molecular (esculina y almidón). En suelo no rizosférico (snr) de maíz en condiciones de microaerobiosis, la comunidad fúngica no mostró potencial exoenzimático alguno; en el de amaranto sólo mostró actividad amilolítica y en los dos casos restantes presentó potencialidad para producir todas las exoenzimas (Fig. 3). En condiciones de aerobiosis la comunidad microbiana fúngica del suelo no rizosférico mostraron actividades exoenzimáticas asociadas a la hidrólisis de moléculas carbonadas (quitina, esculina y amidón) (Fig. 3). En los macroagregados la comunidad bacteriana presentó potencialidad para degradar compuestos nitrogenados y carbonados de alto peso molecular en las dos condiciones de disponibilidad de O_2. Por su parte, la comunidad fúngica en los macroagregados sólo presentó actividades en pasto Bermuda y girasol en condiciones de microaerobiosis, mientras que en aerobiosis mostró potenciales ligados a la hidrólisis de compuestos carbonados (esculina, quitina y almidón). La actividad fosfatasa se presentó con mayor frecuencia en la comunidad fúngica; en microaerobiosis, particularmente en suelo y macroagregados de girasol (se observaron valores de hasta el 85% del total de los potenciales exoenzimáticos en sus macroaagregados). En condiciones de aerobiosis esta actividad disminuyó significativamente en ambas comunidades microbianas (Figs. 2 y 3).

No se detectaron diferencias significativas en cuanto a los potenciales exoenzimáticos bacteriano y fúngico atribuibles al tipo de suelo (sr, snr o ag). Las correlaciones de Pearson permitieron determinar que la especie vegetal mostró una relación con el potencial de producción de fosfatasa fúngica ($R=0.58$, $P=0.04$). La producción de

quitinasa bacteriana mostró relación con la capacidad de hidrolizar el ADN por parte de las bacterias (R=-0.62, P=0.03), esculinasa fúngica (R=0.78, P=0.01) y ADNasa fúngica (R=0.86, P=0.01). El potencial proteolítico bacteriano se correlacionó con la potencialidad de producir esculinasa (R=0.69, P=0.01) y la ADNasa (R=0.78, P=0.02) de la misma comunidad microbiana. La potencialidad para producir ADNasas y proteasas fúngicas se correlacionaron también (R=0.58, P=0.04). Por otra parte, se identificó una correlación entre el NMP de bacterias fijadoras de N_2 con el potencial de producción de fosfatasa bacteriana (R=0.93, P=0.01). Asímismo, el NMP de bacterias con la capacidad de amonificar se correlacionó con el potencial quitinasa bacteriano (R=0.86, P=0.01), ADNasa bacteriano (R=0.73, P=0.01), así como con los potenciales fúngicos de esculinasa (R=0.67, P=0.01), fosfatasa (R=0.60, P=0.01) y ADNasa (R=0.69, P=0.01). La disponibilidad de O_2 afectó significativamente (P=0.05) el potencial amilolítico bacteriano en el suelo rizosférico, los potenciales fúngicos proteolíticos y de hidrólisis de la quitina en suelo no rizosférico, así como el potencial para degradar esculina en los macroagregados, siendo estas potencialidades menores en baja presencia de O_2.

4. Discusión

La biomasa bacteriana presente en el suelo rizosférico fue 1.5 a 2 veces mayor que en macroagregados y en suelo no rizosférico, respectivamente (Cuadro1), resultado consistente con la naturaleza de la rizosfera, donde existe una alta concentración de C orgánico, compuestos nitrogenados y otras sustancias que favorecen el crecimiento microbiano y un mayor biovolumen (Atlas y Bartha, 2006). La diferencia en cuanto a la influencia de la rizosfera respecto al suelo adyacente, sobre la microflora edáfica ya ha sido reportada por Gorban y Clegg en 1996, lo que además puede significar una mayor diversidad en cuanto a los potenciales metabólicos de dicha comunidad. El efecto de la rizosfera sobre el crecimiento y actividad microbiana se han reportado de manera más evidente en suelos arenosos que en arcillosos (Curl y Truelove, 1986), lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio. El aporte de C por los exudados radicales y las bajas concentraciones de O_2 favorecen la síntesis de enzimas desnitrificantes como las reductasas de NO_2^- y NO_3^- (Atlas y Bartha, 2006) y por lo tanto

la actividad y crecimiento de estas bacterias (Højberg *et al.*, 1996). El efecto marginalmente significativo del suelo respecto al volumen celular puede apreciarse en el tamaño de las células bacterianas observado en los macroagregados, más pequeñas que en los suelos rizosférico y no rizosférico. Sin embargo en condiciones de crecimiento óptimo las bacterias de los macroagregados presentan un amplio potencial exoenzimático. Los tipos fisiológicos y actividad exoenzimática, muestran una elevada actividad heterótrofa y sugieren que la fertilidad del suelo arenoso bajo estudio tiene un fuerte basamento microbiano. La mayoría de los fijadores libres de N_2 a nivel edáfico son heterótrofos (Evans y Burris, 1992); entre ellos se encuentran miembros de *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* spp., *Derxia* spp., *Bacillus* y *Pseudomonas*. Estas bacterias alcanzan tamaños muy grandes semejantes a los de algunas levaduras (Prescott *et al.*, 1999); es posible que algunas especies de estos géneros pudieran estar presentes, de acuerdo a los resultados de biomasa bacteriana en maíz y girasol.

Cuando la textura del suelo favorece una condición aerobia, aumenta la actividad amonificante, sin embargo esta actividad fue desarrollada en todos los suelos en condiciones de baja oxigenación (pO_2 4%), particularmente en aquellos asociados a los cultivos de amaranto y maíz (Cuadro 2), en los que la porosidad de sus macroagregados se ha reportado (Moreno-Espíndola *et al.*, 2007) con valores entre 19.7 y 14.6 cm 100 cm^2 de espacio poroso. Bacterias heterótrofas anaerobias facultativas como *Pseudomonas, Bacillus* o *Micrococcus* se pueden encargar de este proceso (Holt *et al.*, 1994), ya que son capaces de utilizar el nitrato en le metabolismo respiratorio y de fermentar la glucosa, capacidad a la que también presentan una respuesta positiva en todos los suelos (Cuadro 2). Los potenciales enzimáticos asociados a la degradación de moléculas nitrogenadas (proteasa y ADNasa), observados en estas comunidades fueron en general más altos que en aquellas asociadas a pasto Bermuda y girasol.

Los potenciales enzimáticos bacterianos y fúngicos, mostraron que tienen la capacidad de hidrolizar compuestos orgánicos de cadena larga y garantizar con esto su reciclamiento. Las figuras 2 y 3, así como el cuadro 2, sugieren un sintrofismo entre la comunidad fúngica y bacteriana ya que existe una elevada asociación entre la actividad metabólica de bacterias y hongos para hidrolizar los compuestos nitrogenados,

carbonados y fosfatados en ambas condiciones de disponibilidad de O_2. La degradación de hidratos de carbono como la quitina, esculina y almidón por parte de los hongos es predominante en el suelo rizosférico y no rizosférico. Los hongos metabolizan polímeros de alto peso molecular (abundantes en los restos vegetales, particularmente en el suelo con baja actividad de labranza como es el caso de este estudio) y en condiciones de aerobiosis presentan una mayor capacidad (Fig. 3), mientras que las bacterias lo hacen con compuestos de bajo peso molecular. En general, en los resultados se aprecia que la actividad exoenzimática fúngica es relativamente mayor en el suelo rizosférico y no rizosférico que en los macrogregados, quizás debido a que éstos tienden a localizarse más lejos de la fuente de materia orgánica que se concentra en la rizosfera (Prescott *et al.*, 1999). La rizosfera puede ser un sitio de baja concentración de O_2, ya que las raíces y los microorganismos aeróbicos lo consumen rápidamente (Woldendrop, 1962; Klemedtsson *et al.*, 1987; Højberg y Sørensen, 1993), sin embargo y como lo muestran las figuras 2 y 3, las comunidades bacteriana y fúngica son capaces de producir exoenzimas en un intervalo de 2 a 21% de pO_2. A pesar de que la disponibilidad de fósforo para las plantas se atribuye en buena medida a los procesos de mineralización que realizan las bacterias, en los resultados se observa que es mayor este potencial por parte de los hongos en condiciones de baja oxigenación.

Aparentemente la comunidad microbiana del suelo es capaz de equilibrar y ajustar su actividad exoenzimática a variaciones en la disponibilidad de O_2 que se pueden presentar en los microhábitats del mismo (Sessitsch *et al.*, 2001). Esto se observa en la asociación entre las actividades metabólicas de la población bacteriana y fúngica, en cuanto a la hidrólisis de los compuestos orgánicos y la síntesis de iones nitrogenados (Cuadro 2; Figs. 2 y 3). Los potenciales exoenzimáticos varían de acuerdo con la disponibilidad de O_2; por ejemplo, la potencialidad de hidrolizar la quitina es mayor por parte de la población bacteriana que por la comunidad fúngica en condiciones de baja oxigenación, mientras que en aerobiosis los resultados son inversos. La comunidad fúngica mostró una actividad exoenzimática más relacionada con el ciclo del carbono (producción de esculinasa y amilasa), contrariamente a lo observado en las comunidades bacterianas en las que predomina la relación con el ciclo del N. La potencialidad para producir fosfatasa y ADNasa se asocia con la degradación de ácidos

nucleicos, mostrando que estas comunidades microbianas (tanto hongos como bacterias) están relacionadas también con el reciclamiento del fósforo en el sistema.

5. Conclusiones

Los resultados de las actividades exoenzimáticas muestran que en el suelo arenoso los procesos de mineralización de la materia orgánica por parte de las comunidades bacteriana y fúngica están bien acoplados y ligados a los ciclos del C, N y P. Dichas actividades presentaron diferencias en cada especie vegetal, particularmente en el suelo rizosférico. Estas diferencias se observan en el efecto de la rizosfera sobre la comunidad bacteriana debido a la producción de una mayor biomasa total que en suelo no rizosférico y en los macroagregados. En las condiciones del estudio se observó que el reciclamiento de las sustancias nitrogenadas de importancia para los productores primarios (iones NH_4^+ y NO_3^-), está garantizado por la actividad de la microbiota presente en el suelo. Las variaciones en cuanto a la expresión de potenciales enzimáticos en función de la disponibilidad de O_2 muestran que la comunidad microbiana del suelo estudiado es capaz de dar continuidad a los ciclos biogeoquímicos en las condiciones que se presentan en los diferentes microhábitats del suelo.

5. Referencias

Alami, Y, Achouak, W, Marol, Ch., Heulin. T. 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. Applied Environmental Microbiology 66, 3393–3398.

Alvey, S., Yang, C.-H., Buerkert, A., Crowley, D.E. 2003. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in West African soils. Biology Fertility Soils 37, 73–82.

Atlas, M.R., Bartha, R. 2006. Ecología microbiana y microbiología ambiental. (Eds.) Capella, I., Ayerra, S. Pearson Educación, Madrid. pp. 383-481.

Balch, W.E., Fox, G. E., Magrum, L.J., Woese, C.R., Wolfe, R.S. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. Microbiological Reviews 43, 260-296.

Cerón, R.L.E., Melgarejo, M.L.M. 2005. Enzimas del suelo: indicadores de salud y calidad. Acta Biológica Colombiana 10 (1), 5-17.

Chèneby, D., Perrez, S., Devroe, C., Hallet, S., Couton, Y., Bizouard, F., Iuretig, G., Germon, J.C., Philippot, L. 2004. Denitrifying bacteria in bulk and maize rhizospheric soil: diversity and N_2O-reducing abilities. Canadian Journal Microbiology 50, 469–474.

Cook, K.L., Garland, J.L., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Levine, L.H., Sayler, G.S. 2006. Effect of microbial species richness on community stability and community function in a model plant-based wastewater processing system. Microbial Ecology 52, 725–737.

Curl, E.A., Truelove, B. 1986. The riziosphere. En: Bommer, D.F.R., Sabey, B.R., Vaadia, Y., Thomas, G.W., van Vleck, L.D. (Eds.). Advances series in agricultural sciences, 15. Springer-Verlag. Berlin. pp. 280.

Degens, B.P. 1997. Macro-aggregation of soils by biological bonding and binding mechanisms and the factors affecting these: a review. Australian Journal Soil Research 35, 431–459.

Evans, H.J., Burris, R.H. 1992. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. En: Stacey, G., Burris, R.H., Evans, H.J. (Eds.). Biological nitrogen fixation. Chapman & Hall, Inc. Nueva York pp. 1-43.

Evelyn, B. S., Caron, A. D., Sherr, F. B. 1993. Staining protist for visualization via epifluorescence microscopy. En: Kemp, P., Sherr, F., Sherr, E., Code, J. (Eds.) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Florida pp.9-18.

Ferrara-Guerrero, M.J., Marty, D.G., Bianchi, A. 1993. Isolation and enumeration of aerobic and microaerophilic bacteria in acuatic habitats. En: Kemp, P., Sherr, F., Sherr, E., Code, J. (Eds.) Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewis Florida pp. 9-18.

Gorban, G.R.; Clegg, S. 1996. A conceptual model for nutrient availability in the mineral soil-root system. Canadian Journal Soil Science 76, 125-131.

Holt, G.J., Krieg, R.N., Sheath, A.H.P., Staley, T.J., Williams, T.S. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edition. Williams & Wilkins.

Hugh, R., Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentatitve versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. Journal Bacteriology 66, 24-26.

HØjberg, O., SØrensen, J. 1993. Microgradients of microbial oxygen consumption in a barley rhizosphere model system. Applied Environmental Microbiology 59, 431-437.

HØjberg, O., Binnerup, S.J., SØrensen, J. 1996. Potential rates of ammonium oxidation, nitrate oxidation, nitrate reduction and denitrification in the young barley rhizosphere. Soil Biology Biochemistry 28, 47-54.

Kim, J.-S., Dungan, S.R., Kwon, S.-O., Weon, H.-Y. 2006. The community composition of root-associated bacteria of the tomato plant. Journal Microbiology Biotechnology 22, 1267–1273.

Klemedtsson, L., Svensson, B.H., Rosswalt, T. 1987. Dinitrogen and nitrous oxide produced by denitrification and nitrification in soil with and without barley plants. Plant Soil 99, 303-319.

Linderman, R.G. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. En ASA Special Publication number 54. American Society of Agronomy, Madison. pp. 45-64.

Loyer, W.M., Hamilton, A.M. 1984. Interval estimation of the density of organisms using a serial-dilution experiment. Biometrics 40, 907-916.

Moreno-Espíndola, I.P., Rivera-Becerril, F., Ferrara-Guerrero, M. J., De León-González, F. 2007. Role of root-hairs and hyphae in adhesion of sand paticles. Soil Biology Biochemistry 39, 2520-2526.

Oades, J.M. 1993. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. Geoderma 56, 377–400.

Philippot, L., Kuffner, M., Chèneby, D., Depret, G., Laguerre, G., Martin-Laurent, F. 2006. Genetic structure and activity of the nitrate-reducers community in the rhizosphere of different cultivars of maize. Plant Soil 287, 177–186.

Prescott, M.L., Harley, P.J., Klein, A.D. 1999. Microbiología. McGraw-Hill. México D.F. pp.105-112.

Raynaud, X., Lata, J.-Ch., Leadley, W.P. 2006. Soil microbial loop and nutrient uptake by plants: a test using a coupled C:N model of plant–microbial interactions. Plant Soil 287, 95–116.

Roesti, D., Ineichen, K., Braissant, O., Redecker, D., Wiemken, A. 2005. Bacteria associated with spores of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. Applied Environmental Microbiology 71 (11), 6673-6679.

Ronald, P. 1993. Determination of size and morphology of acuatic bacterial by automated image analysis. En: Kemp, P., Sherr, F., Sherr, E., Code, J. (Eds.) Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewis Florida. pp.339-344.

Sessitsch, A., Weilhrter, A., Gerzabek, H.M., Kirchmann, H., Kandeler, E. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. Applied Environmental Microbiology 67, 4215-4224.

Schloter, M., Bach, H.-J., Metz, S., Sehy, U., Munch, J.C. 2003. Influence of precision farming on the microbial community structure and functions in nitrogen turnover. Agriculture Ecosystems Environment 98, 295–304.

Torreton, J.P. 1992. Importance des bactéries hétérotrophes aérobies dans une lagune eutrophe tropicale (Lagune Ebrié, Côte d'Ivoire). Biomasse, production, exportations. Col. Travaux et documents microfichés. Ed. Orstom, 86 F3 Paris.

USDA (United States Department of Agriculture). 1999. Guía para la evaluación de calidad y salud del suelo. En: www.usda.gov/

Van Wambeke, F. 1988. Numération et taille des bactéries -planctoniques au moyen de l'analyse d'images couplée à l'épifluorescence Annales de l'Institute Pasteur/Microbiologie 139, 261-272.

Woldendrop, J.W. 1962. The quantitative influence of the rhizosphere on denitrification. Plant Soil 17, 267-270.

4. EFECTO RIZOSFERA:

"Diversidad genética y metabólica de la microflora asociada a un suelo rizosférico arenoso"

RESUMEN

En los suelos arenosos del Valle de México el papel de los componentes biológicos resulta fundamental para la estabilización y fertilidad de éstos. Las especies vegetales que se cultivan en ellos influyen en la comunidad microbiana, ya que cada una ofrece distintas condiciones para el crecimiento microbiano y para sus actividades exoenzimáticas. En el presente estudio se evaluaron las diferencias en cuanto a diversidad microbiana, el contenido de C de la biomasa microbiana (C_{mic}) de las comunidades bacteriana y fúngica asociadas a la rizosfera de amaranto (*A. hypochondriacus*), pasto Bermuda (*C. dactylon*), maíz (*Z. mays*) y girasol (*H. annuus*). Los resultados mostraron que existió una asociación entre la diversidad microbiana y el contenido de C_{mic} y la actividad DH. La diversidad bacteriana encontrada fue menor en la comunidad bacteriana que en la fúngica.

Palabras clave: Carbón microbiano, deshidrogenasa, electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización (DGGE), rizosfera, 16S rDNA;18S rDNA.

1. Introducción

En el Valle de México los suelos arenosos de origen volcánico presentan condiciones de inestabilidad edáfica y susceptibilidad a la erosión hídrica y eólica debido a las condiciones climáticas, al manejo agrícola y a su fragilidad estructural (De León-González *et al.*, 2000; SMA, 2005). La comprensión de los procesos biológicos involucrados en el proceso de agregación de los suelos arenosos es crucial para el diseño de sistemas de producción y manejo, orientados al control de los efectos de la erosión (Miller y Jastrow, 1992; Bethlenfalvay y Barea, 1994). Moreno-Espíndola y colaboradores (2007) mostraron que en suelos arenosos del Valle de México, las raíces de maíz y pasto Bermuda (especies vegetales típicas de la zona), presentan una elevada retención de partículas de arena, proceso en el que resultan más eficientes los

pelos absorbentes que las hifas de hongos saprobios y micorrízico arbusculares. Las comunidades microbianas rizosféricas juegan un papel clave, ya que intervienen en el reciclamiento de los nutrimentos, en el desarrollo de las especies vegetales y en el mantenimiento de la materia orgánica, así como en la estructuración de las partículas minerales y los procesos de sucesión vegetal (Nannipieri *et al.*, 2003; Deyn *et al.*, 2004). La rizosfera puede estar influenciada por las distintas especies vegetales probablemente debido a los componentes celulares de las raíces y sus exudados (Atlas y Bartha, 2006), así como a factores propios del suelo (Ridder-Duine *et al.*, 2005). Las condiciones que ofrece cada especie vegetal pueden producir diferencias en la función y/o actividad de las comunidades microbianas, así como en su estructura (Torsvik *et al.*, 1996; Marschner *et al.*, 2001; Garbeva *et al.*, 2004). Estas diferencias se reflejan, por ejemplo, en el potencial para desarrollar actividades enzimáticas involucradas en los procesos de mineralización de nutrimentos como el N y el C (Capítulo 2), así como en la estabilidad de los macroagregados asociada a la colonización micorrízico arbuscular y a la presencia de hifas de otros hongos (2-5 mm) (Miller y Jastrow, 1992; Moreno-Espíndola *et al.*, 2007). El objetivo de este trabajo fue conocer la diversidad de la comunidad microbiana, de la rizosfera de cuatro especies vegetales (amaranto, pasto Bermuda, girasol y maíz), creciendo en un suelo arenoso. Estas diferencias se evaluaron mediante la amplificación por PCR de los segmentos 16S y 18S rDNA, seguida de una electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE) (Muyzer y Smalla, 1998; Marschner *et al.*, 2001). Asimismo, se determinó el contenido de C microbiano (C_{mic}), la actividad deshidrogenasa (DH) y los potenciales exoenzimáticos reportados en el capítulo tercero para el suelo rizosférico. Entender las interacciones entre los microorganismos de la rizosfera resulta de interés en la región del Valle de México por su valor cultural, nutricional y económico, así como por ser especies bien adaptadas a este tipo de suelos. Esta información podrá contribuir al diseño de programas de manejo y conservación de estos suelos considerando el potencial microbiano asociado a especies vegetales de importancia agrícola en la zona.

2. Materiales y métodos

2.1 Sitio de trabajo

Ubicado en Tulyehualco, México D.F. (19°15´N, 99°13´W, 2280 msnm). El suelo es de origen volcánico, formado por deposición de cenizas (Entisol; Typic Ustifluvents; Soil Survery Staff, 1999). Su textura se compone de 70, 140 y 790 g kg^{-1} de arcilla, limo y arena respectivamente. Está sujeto a una precipitación anual de 567 mm concentrados en los meses de junio a octubre; la temperatura media es de 17.9°C (De León-González *et al.*, 2006).

2.2 Parcela experimental

Se delimitaron cuatro parcelas de 9 m^2, distribuidas en bloques al azar para cada especie vegetal con cuatro repeticiones. *A. hypochondriacus* (amaranto), *Z. mays* (maíz), de alto valor nutrimental y cultural (Spehar *et al.*, 2003; Pospišil *et al.*, 2006), ambas plantas fueron domesticadas en México y están bien adaptadas a la zona; *H. annus* (girasol), de valor comercial como flor de ornato; el pasto Bermuda (*C. dactylon*) es una especie resistente a las sequías. Las semillas de amaranto, maíz y girasol se sembraron directamente en el suelo; el pasto Bermuda creció de manera espontánea y representa una alta proporción de la cobertura permanente de la región. Se trabajó bajo cero labranza y manteniendo los restos de cosecha del cultivo anterior. Las plantas se desarrollaron en condiciones de temporal.

2.3 Muestreo

Se realizó a partir de monolitos obtenidos con el empleo de un cilindro de PVC (25.5 cm de diámetro interior por 37.5 cm de largo), con el cual se extrajo una masa de suelo conteniendo el entramado radical y el suelo rizosférico (USDA, 1999) de 9 plantas por especie vegetal (tres plantas de tres parcelas distintas por especie). El suelo fue mezclado y tamizado (<2 mm), conformando muestras compuestas por cada especie vegetal. Las muestras de suelo rizosférico se tomaron con material estéril y se dividieron en dos fracciones para su conservación y posterior análisis: una primera parte fue conservada a -20°C para los análisis moleculares, en tanto que la segunda porción

se almacenó a 4°C para los análisis de carbono de la biomasa microbiana y actividad deshidrogenada.

2.4 Biomasa microbiana y actividad deshidrogenasa.

El carbono de la biomasa microbiana (C_{mic}) se determinó por el método de fumigación-extracción (Vance *et al.,* 1987). El C extraído con K_2SO_4 (0.5 M) (1:4:w/v) se cuantificó con un analizador de carbono líquido (Shimadzu TOC-V). La actividad deshidrogenasa se determinó por el método de Skujin, modificado por García *et al.* (1997). Un gramo de suelo humectado al 60% de su capacidad de campo, se trató con 0.2 ml de INT (2-*p*-iodofenil-3-*p*-nitrofenil-5-pentatetrazolio cloro) al 4% en agua destilada por 20 h a temperatura ambiente y en oscuridad. El INTF (iodo-nitrotetrazolium formazán) fue extraído con metanol (10 ml). Los tubos se agitaron manualmente durante 1 min y se filtraron (filtros Whatman 5). El INTF extraído se midió con un espectrofotómetro a 490 nm.

2.5 Extracción de ADN del suelo

Se extrajo el ADN a partir de 0.4 g de suelo por medio del paquete Fast DNA Spin Kit for Soil (BIO 101, USA), de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. La calidad y cantidad del extracto fueron verificadas en un gel de agarosa al 1% (w/v) y en un biofotómetro (Eppendorf BioPhotometer v1.20), respectivamente. Los extractos fueron purificados por precipitación con etanol (Powell y Gannon, 2002).

2.6 Amplificación de los segmentos 16S y 18S rDNA por PCR

Segmentos ribosomales se amplificaron en un termociclador (TaKaRa PCR Termal Cycler, Dice TP600) con dos pares de oligonucleótidos (TIB MOLBIOL Syntheselabor GMBH). El 16S rDNA de la comunidad bacteriana fue amplificado con los iniciadores 338f (5´-GC-pinza ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3´) (Muyzer *et al.*, 1993) y 907r (5´-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3´) (Schwieger y Tebbe, 1998). En tanto, el 18S rDNA de la comunidad fúngica fue amplificado con el par FF390 (5´-CGATAACGAACGAGACCT-3)´ y FR1r (5´-GC-pinza AICCATTCAATCGGTAIT-3´) (Vainio y Hantula, 2000). Una pinza GC fue adicionada en ambos iniciadores forward para mejorar la separación

electroforética de los amplicones (Muyzer *et al.*, 1993). La mezcla de reacción de PCR (25 µl) para ambas comunidades microbianas fue la misma: 50 ng de DNA molde, 0.2 µM de cada iniciador, 0.75 U μl^{-1} de DNA polimerasa Bio Therm™ (Gene Craft), 1 x amortiguador para DNA polimerasa, 0.1 mg ml^{-1} de albúmina sérica de bovino (BSA), 0.2 mM de la mezcla de desoxinucleótidos trifosfato dNTPs, 3 mM de $MgCl_2$ y agua destilada hasta completar los 25 µl de mezcla de PCR por muestra. El programa de termociclado para bacterias consistió en 3 min a 95°C de desnaturalización inicial, seguida de 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 57°C y 1 min a 72°C para desnaturalización, anillamiento y extensión respectivamente; se finalizó con 10 min a 72°C de extensión. El programa para hongos consistió en 8 min a 94°C de desnaturalización inicial, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 50°C y 1 min a 72°C para desnaturalización, anillamiento y extensión respectivamente; se finalizó con 10 min a 72°C de extensión. Los productos de PCR fueron verificados en un gel de agarosa al 1% (w/v) 30 min, 60 V. La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio (10 mg ml^{-1}).

2.7 Electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización (DGGE)

Las DGGE de los segmentos amplificados del 16S rDNA y 18S rDNA se realizaron por medio de DCODE ™ Universal Mutation detection System (Bio-Rad laboratories, Inc.). Para las secuencias del 16S rDNA (comunidad bacteriana) se creó un gel de poliacrilamida al 7% (30% solución; acrilamida/bis-acrilamida 37.5:1) (Protogel, National diagnostics) con un gradiente de desnaturalización vertical de 45% (2.55 M urea, 14.68% formamida) a 65% (3.57 M urea, 20.56% formamida). Para los segmentos del 18S rDNA (comunidad fúngica) se creó un gel de poliacrilamida al 8% (30% solución; acrilamida/bis-acrilamida 37.5:1) (Protogel, National diagnostics) con un gradiente de desnaturalización vertical de 35% (2.55 M urea, 14.68% formamida) a 60% (3.57 M urea, 20.56% formamida).

Ambos geles se cargaron en una solución amortiguadora 1X Tris-acetato EDTA (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA; pH 7.4) a 60°C, 60 V durante 16 h. Los geles se tiñeron con SYBR Gold (10 µl en 100 ml de tampón Tris-acetato EDTA 1 x) por 40 min.

2.8 Análisis estadístico

La normalidad de los datos fue revisada con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se realizó un ANOVA de una vía para evaluar el efecto de la especie vegetal sobre el C_{mic} y la actividad deshidrogenasa. Cuando se detectaron diferencias estadísticas significativas a $P<0.05$, se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey ($P<0.05$). Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson y posteriormente se realizó una regresión lineal y una cuadrática con variables correlacionadas. Los análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS 11.5. El análisis de los geles se llevó a cabo con el programa Quantity One® 4.5, que se basa en el coeficiente de Dice (S_D) para establecer la semejanza entre los perfiles formados por las bandas de cada muestra (intensidad y posición de la banda). Los dendógramas se construyeron con el método Ward (1963). El índice de diversidad de Shannon (H') (Shannon y Weaver, 1963) sobre los patrones de bandas de DGGE, se calculó con la ecuación $H' = - ?\ pi\ (1npi)$, donde pi es el cociente corregido de la absorbancia de cada banda respecto a la suma de todas las absorbancias en cada muestra, y la riqueza (S) fue determinada por el número de bandas del patrón de cada muestra.

3. Resultados

3.1 C_{mic} y actividad deshidrogenasa

Tanto el contenido de carbono de la biomasa microbiana como la actividad deshidrogenasa mostraron diferencias significativas entre la rizosfera de las distintas especies vegetales. En la rizosfera del amaranto se presentó el contenido más elevado de C_{mic} y la actividad deshidrogenasa más elevada, mientras que la rizosfera de maíz mostró los valores significativamente menores (Cuadro 1). Al aplicar un modelo de regresión cuadrática, el C_{mic} (constante) y la actividad deshidrogenasa (predictor), presentaron una alta correlación ($R^2=0.94$, $P=0.003$).

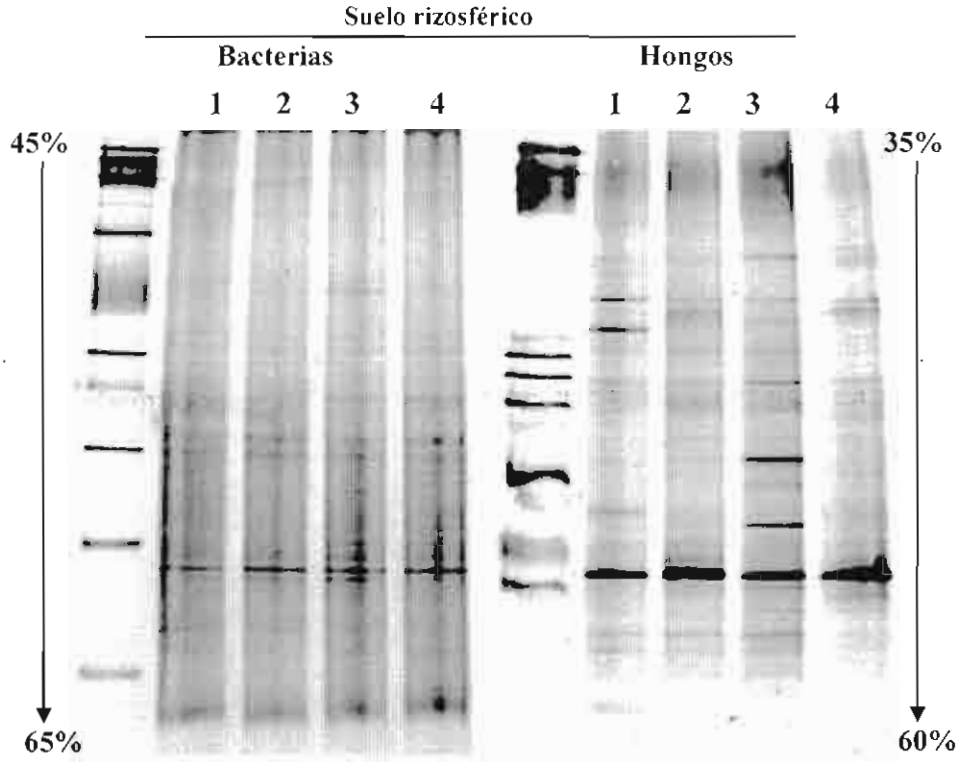
Cuadro 1. Carbono de la biomasa microbiana (C_{mic}) y actividad deshidrogenasa en la rizosfera de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso del valle de México. Los valores seguidos de diferente letra indican diferencias significativas ($P<0.05$).

Variable	Amaranto	Pasto Bermuda	Ma'z	Girasol
C_{mic}(µg C_{mic} kg^{-1} suelo)	244.97a	176.44bc	139.40c	193.25b
Actividad deshidrogenasa (µg INTF g^{-1} suelo h^{-1})	13.90a	12.17b	8.19c	13.08ab

3.2 DGGE

Los patrones de bandas obtenidos mediante la amplificación de fragmentos de los genes 16S y 18S rDNA, mostraron diferencias entre la composición de las comunidades bacteriana y fúngica en la rizosfera de cada especie vegetal (Fig. 1).

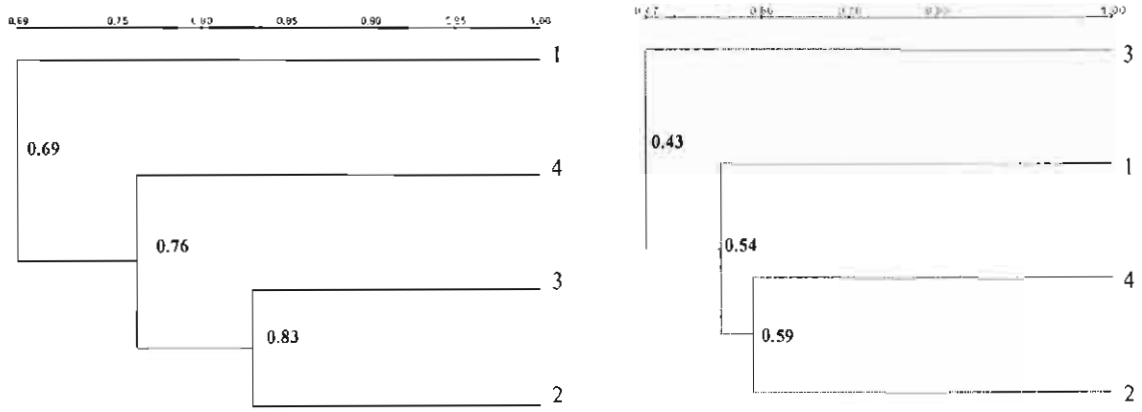
Figura 1. Perfiles de DGGE de las comunidades bacteriana y fúngica en suelo rizosférico de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso del Valle de México. Maiz (1), girasol (2), pasto Bermuda (3) y amaranto (4). Gradientes de desnaturalizaión (urea y formamida) (45-65% (7%)) 16S rDNA y (35%-60% (8%)) 18S rDNA).



El análisis de semejanza realizado con el método de Ward (1963), presentó al maíz como la planta con la rizosfera menos semejante al resto de las especies vegetales, en cuanto a su comunidad bacteriana (Fig. 2). Las especies con comunidades bacterianas más semejantes fueron el girasol y el pasto Bermuda (83% de semenjanza). Por otra parte, los perfiles observados en el caso de la comunidad fúngica mostraron mayor divergencia entre la comunidad de hongos asociada a cada especie vegetal. En el análisis de cluster de la comunidad fúngica se observó que la rizosfera del pasto Bermuda fue la menos semejante y que las más parecidas fueron las del girasol y el amaranto (Fig. 2). En general, las comunidades bacterianas son más semejantes en la

rizosfera de las cuatro plantas (69 a 83% de semejanza) que las fúngicas (43 a 59% de semejanza) (Cuadro 2). La riqueza y el índice de diversidad en cada comunidad estuvieron fuertemente correlacionados entre sí; se observó una R=0.99, P=0.002 para el caso de la comunidad bacteriana y una R=0.99, P=0.001 para la fúngica.

Figura 2. Análisis de cluster (Método de Ward; Coeficiente de Similaridad de Dice) de la comunidad bacteriana (B) y fúngica (F) a partir del patrón de bandas generado mediante PCR-DGGE en el suelo rizosférico de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso del Valle de México. Maíz (1), girasol (2), pasto Bermuda (3) y amaranto (4).



Cuadro 2. Riqueza (S) e índice de diversidad de Shannon (*H'*) en las comunidades bacterianas y fúngicas de la rizosfera de cuatro especies vegetales establecidas en un suelo arenoso del Valle de México medidas a través de DGGE .

	Variables	Amaranto	Pasto Bermuda	Maíz	Girasol
Bacterias	S	22	17	19	20
	H«	3.08	2.83	2.94	2.99
Hongos	S	19	21	16	20
	H«	2.94	3.04	2.77	2.99

4. Discusión

A. hypochondriacus presentó el mayor contenido de C_{mic}, sugiriendo que las condiciones de la rizosfera contienen materia orgánica (MO) con distintas calidades para el desarrollo de los microorganismos. Lo anterior es consistente con los resultados reportados en un trabajo previo en el que se analizó la microestructura del suelo rizosférico de las tres especies cultivadas; el amaranto mostró una mayor cantidad de raíces en descomposición respecto al girasol y maíz (De León-González *et al.*, 2006). La actividad deshidrogenasa (DH), fue mayor en relación con el C_{mic}, lo que indica una elevada actividad de transferencia energética. El C_{mic} y la DH están fuertemente relacionados (Zamora *et al.*, 2005). Los resultados del presente trabajo sugieren que la

actividad DH puede ser un indicador del contenido de C_{mic}. Asimismo, tanto éste último como la actividad DH son considerados como indicadores de la calidad del suelo debido a su relación directa con la actividad de la comunidad microbiana (Gil-Sotres *et al.*, 2005). Sin embargo, para conocer los procesos que ocurren en el suelo es recomendable contar con otros parámetros (Marschner *et al.*, 2001; Garbeva *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006). En este caso se hicieron evaluaciones referentes a potenciales exoenzimáticos relacionados con el ciclo del C, N y P. La actividad de enzimas extracelulares como la amilasa, quitinasa, esculinasa contribuyen con la disponibilidad de C en el suelo (Allison y Jastrow, 2006). Otras como la proteasa, ADNasa y fosfatasa permiten la disponibilidad de iones inorgánicos nitrogenados aprovechables por las plantas. Los potenciales exoenzimáticos observados en cada ambiente rizosférico fueron distintos por el efecto de ésta sobre la comunidad microbiana, así como por la disponibilidad de O_2 (ver Capítulo 3); por ejemplo, el efecto de la disponibilidad de O_2 pudo apreciarse en el cambio de potenciales respecto a la hidrólisis de la quitina en la comunidad fúngica. Estas transformaciones de la materia inciden en el C_{mic} del suelo; al realizar una regresión múltiple (método: Stepwise), la actividad proteolítica fue la única variable incluida en el modelo como predictora del C_{mic} con una R^2=0.92 y una significancia de P=0.02.

La riqueza y abundancia de las poblaciones microbianas no son necesariamente un reflejo de los perfiles de exoenzimáticos identificados; el perfil de diversidad revelado mediante la DGGE incluye organismos que no son cultivables y por lo tanto existe una gama amplia de potenciales por detectar (Nannipieri *et al.*, 2003), mismos que no necesariamente se expresan en las pruebas selectivas. Sin embargo, la riqueza y los índices de diversidad (*H'*), sí mostraron relación con la actividad DH y el contenido de C_{mic}. Previamente se ha reportado que en suelos bajo cero labranza la biomasa microbiana y las actividades enzimáticas son más elevadas que en condiciones de manejo convencional (Balota *et al.*, 2004). En el presente estudio el suelo lleva más de 3 años bajo cero labranza y los resultados en cuanto al potencial exoenzimático revelan la presencia de comunidades microbianas con una amplia capacidad metabólica y adaptativa a las condiciones del medio. A este respecto, se ha reportado que el sistema

de cero labranza se asocia a mayor actividad DH así como al contenido de C_{mic} (Alvear *et al.*, 2006).

5. Conclusiones

Los resultados indican la influencia de la rizosfera sobre las comunidades bacteriana y fúngica, lo que se refleja tanto en el contenido de C_{mic}, la actividad DH, los perfiles de diversidad, así como en los potenciales de reciclamiento de nutrimentos. En condiciones de laboratorio las comunidades bacteriana y fúngica presentaron potenciales exoenzimáticos asociados a los ciclos del N, C y P. La actividad DH confirma que en la rizosfera de las cuatro especies vegetales ocurre una transferencia dinámica de energía a través de la mineralización de diversos sustratos. Las diferencias en la composición de las comunidades microbianas se ven reflejadas en los perfiles de potencialidad exoenzimática identificados. En el suelo bajo estudio se encuentran poblaciones microbianas heterótrofas, con capacidad para dar continuidad a los ciclos biogeoquímicos fundamentales para el desarrollo de las especies vegetales de importancia en la región. Estudios posteriores deberán cuantificar el beneficio en términos productivos, de la presencia de las comunidades microbianas, así como evaluar el uso de éstos como inóculos para la fertilización biológica.

6. Agradecimientos

A la Fundación Carolina (España) por haber financiado la estancia en el CEBAS-CSIC mediante el Programa de Formación Permanente 2007. Al CONACYT (México), por el apoyo financiero para la investigación (P39918-Z; 2002) así como la beca para estudios de Maestría de Iván Pável Moreno Espíndola (198350; 2005).

7. Referencias

Alvear, Z.M., Pino, B.M., Castillo, R.C., Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F. 2006. Effect of non-tillage on some biological activities in a Aflisol from southern Chile. Journal Soil Science Plant Nutrition 6, 38-53.

Atlas, M.R., Bartha, R. 2006. Ecología microbiana y microbiología ambiental. (Eds.) Capella, I., Ayerra, S. Pearson Educación, Madrid. pp. 383-481.

Allison, D.S., Jastrow, D.J. 2006. Activities of extracellular enzymes in physically isolated fractions of restored grassland soils. Soil Biology Biochemistry 38, 3245–3256.

Balota, L.L., Kanashiro, M., Filho, C.A., Andrade, S.D., Dick, P.R. 2004. Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems in subtropical agro-ecosystems. Brazilian Journal Microbiology 35, 300-306.

Bethlenfalvay, G.J., Barea, J.M., 1994. Mycorrhizae in sustainable agriculture. I. Effects on seed yield and soil aggregation. American Journal of Alternative Agriculture 9, 157–161.

Costa, R., Gomes, N.C.M, Peixoto, S.R., Rumjanek, N., Berg, G., Mendonça-Haglerb, C.S.L., Smalla, K. 2006. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. Soil Biology Biochemistry 38, 2434-2447.

De León-González, F., Hernández-Serrano, M.M., Etchevers-Barra, J.D. Payán-Zelaya, F., Ordaz-Chaparro, V. 2000. Short-term compost effect on macroaggregation in a sandy soil under low rainfall in the valley of Mexico. Soil Tillage Research 56, 213-217.

De León-González, F., Celada, T.E., Hidalgo-Moreno, C.I., Etchevers-Barra, J.D., Gutiérrez-Castorena, M.C., Flores-Macías, A. 2006. Root–soil adhesion as affected by crop species in a volcanic sandy soil of Mexico. Soil Tillage Research 90, 77-83.

Deyn, G.B., Raaijmakers, C.E., Van der Putten, W.H. 2004. Plant community development is affected by nutrients and soil biota. Journal Ecology 92, 824–834.

Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. Annual Review Phytopathology 42, 243-270

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

Gil-Sotres, F., Trasar-Cepedab, C., Leiro´sa, M.C., Seoane, S. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. Soil Biology Biochemistry 37, 877–887.

Marschner, P. Yang, C.-H., Lieberei, R., Crowley, D.E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. Soil Biology Biochemistry 33, 1437-1445.

Miller, R.M., Jastrow, J.D., 1992. The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. Special Publication Number 54. American Society of Agronomy, Madison, pp. 29- 333 42.

Moreno-Espíndola, I.P., Rivera-Becerril, F., Ferrara-Guerrero, M. J., De León-González, F. 2007. Role of root-hairs and hyphae in adhesion of sand paticles. Soil Biology Biochemistry 39, 2520-2526.

Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex bacterial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analyses of polymerase chain reaction-amplified genes for 16S rRNA. Applied Environmental Microbiology 59, 695–700.

Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek Internacional Journal General Molecular Microbiology 73, 127–141.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. European Journal Soil Science 54, 655–670.

Pospišil, A., Pospišil, M., Varga, B., Svecnjak Z. 2006. Grain yield and protein concentration of two amaranth species (*Amaranthus* spp.) as influenced by the nitrogen fertilization. European Journal Agronomy 25. 250–253.

Powell, R., Gannon, F. 2002. Purification of DNA by phenol extraction and ethanol precipitation. Oxford University Press. 17, 1-2.

Prescott, M.L., Harley, P.J., Klein, A.D. 1999. Microbiología. McGraw-Hill. México D.F. pp.105-112.

Ridder-Duine, A.S., Kowalchuk, A.G., Gunnewiek, K.P.J.A., Smant, W., van Veen, A.J.,

de Boer, W. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. Soil Biology Biochemistry 37, 349–357.

Schwieger, F., Tebbe, C.C. 1998. A new approach to utilize PCR single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene based bacterial community analysis. Applied Environment Microbiology 64, 4870–4876.

Shannon, C.E., Weaver, W. 1963. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

SMA (Secretaría del Medio Ambiente) D.F. 2005. Comisión de Recursos Naturales, Suelo de Conservación en: http://www.sma.df.gob.mx/

Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W.T., Forney, L. 1998. Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by bacterial communities. Applied Environmental Microbiology 64, 1220–1225.

Soil Survey Staff, 1999. Soil taxonomy. Natural Resources. Conservation Service, Washington, 869 pp. 357.

Spehar, C.R., Teixeira, D.L., Lara, W.A.R.C., Lemus, E.E.A. 2003. Amaranto BRS Alegria: alternativa para diversificar os sistemas de produção. Pesquisa Agropecuária Brasileira 38, 659-663.

Torsvik, V.L., Sørheim, R., Goksoyr, J. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. Journal Industrial Microbiology 17, 170–178.

USDA (United States Department of Agriculture). 1999. Guía para la evaluación de calidad y salud del suelo. En: http://www.usda.gov/

Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. Soil Biology Biochemistry 19, 703–707.

Vainio, E.J., Hantula, J. 2000. Direct analysis of woodinhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. Mycology Research 104, 927–936.

Ward, J.H., 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. Journal American Statistical Association 58, 236–244.

Zamora, F., Mogollón, P.J., Rodríguez, N. 2005. Microbial biomass and enzyme activity changes induced by crop rotations in a soil under vegetable production at the Falcon

state, Venezuela. Multiciencias 5, 62-70.

5. CONCLUSIONES

Las relaciones entre plantas, partículas minerales del suelo y microorganismos implican interacciones biológicas, químicas y físicas (relaciones bióticas y abióticas). Cada una impacta directamente en los componentes que en ella participan, al mismo tiempo que supone parte de otros procesos que ocurren simultáneamente (Chenu y Stotzky, 2002). El proceso de formación de agregados en las condiciones de un suelo arenoso ocurre en parte, por la suma de factores como las características de las raíces de las plantas que crecen sobre éste, la asociación de las plantas con hongos micorrízico arbusculares y la presencia de otros microorganismos (bacterias y hongos saprobios). La consideración de los componentes bióticos en la formación de agregados, en el marco de la conceptualización de este proceso como jerárquico, establece la existencia de mecanismos diferenciados (Six *et al.*, 2004). Entre estos destacan tres que atañen a la presente investigación: las hifas de los hongos, las especies vegetales presentes y el tipo de labranza. Los resultados sugieren la actuación de dos mecanismos en el caso del suelo estudiado: el atrapamiento de partículas de arena mediado por pelos absorbentes y por hifas de hongos saprobios o micorrízicos. El mecanismo de adhesión de partículas de arena mediado por pelos absorbentes mostró ser más eficaz debido a su abundancia y tamaño, y guardó una relación con la biomasa radical total, en función del número de partículas de arena a las que se asociaron. Sin embargo, la presencia de hifas y el porcentaje de colonización micorrízica radical presentaron relaciones lineales significativas con respecto a la proporción relativa de macroagregados (2-5 mm) y de la estabilidad de los mismos. Estos resultados son consistentes con lo planteado por otros autores quienes sugieren que los mecanismos de formación de agregados dependen del tamaño de estos. De acuerdo con ello, la presencia de hifas se relaciona con la formación de agregados >2 mm, como fue observado en el presente estudio. En términos generales los resultados mostraron la acción de mecanismos diferenciados que funcionan al mismo tiempo, mismos que se van sucediendo y sumando dando lugar a procesos como la estabilización del suelo por medio de la formación de distintas fracciones de agregados.

Por otra parte, la actividad bactriana y fúngica relacionada con la mineralización de la materia orgánica, es, en términos potenciales, otro de los factores que puede favorecer el proceso de agregación. Los microorganismos del suelo, cuya diversidad fue evidenciada a través de los análisis moleculares, intervienen en los ciclos del N, C y P, presentan biomasa diferenciada de acuerdo a las condiciones físicas y nutrimentales que la rizosfera les ofrece. Aunque estas actividades suceden tanto en el suelo adyacente a la rizosfera como en los agregados, su dinámica es mayor cuando se encuentran en contacto directo con las raíces de las plantas.

Los beneficios que las interacciones entre raíces, suelo y microorganismos tengan para la estabilización del suelo, así como sobre el desarrollo de especies vegetales de interés, deberán ser estudiados a mayor profundidad y considerando evaluaciones en campo. El presente trabajo ofrece una visión de relaciones lineales que se dan entre componentes del suelo, correlaciones, potenciales, cuantificaciones que en suma, sugieren que en el suelo arenoso bajo estudio la comunidad microbiana y las especies vegetales que se establecen influyen en la estabilización y fertilidad del suelo.

6. REFERENCIAS GENERALES

Abbott, L.K., Robson, A.D., Jasper, D.A., Gazey, C., 1992. What is the role of VA mycorrhizal hyphae in soil? In: Read, D.J., Lewis, D.H., Fitter, A.H., Alexander, I.J. (Eds.), Mycorrhizas in Ecosystems. CAB International, Wallingford, pp. 37–41.

Alami, Y., Achouak, W., Marol, Ch., Heulin, T. 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. Applied Environmental Microbiology 66, 3393-3398.

Atlas, M.R., Bartha, R. 2006. Ecología microbiana y microbiología ambiental. (Eds.) Capella, I., Ayerra, S. Pearson Educación, Madrid. pp. 383-481.

Bearden, B.N., Petersen, L., 2000. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of a vertisol. Plant Soil 218, 173–183.

Borie, R.F., Rubio, R., Morales, A., Castillo, C. 2000. Relación entre densidad de hifas de hongos micorrizógenos arbusculares y producción de glomalina con las características físicas y químicas de suelos bajo cero labranza. Revista Chilena de Historia Natural 73, 749-756.

Chenu, C., Stotzky, G. 2002. Interacions between microorganism and soil particles: an overview. Eds. P. M. Huang, J.-M. Bollag y N. Senesi. Jhon Wiley & Sons, Ltd. pp.8-9.

De León-González, F., Payán, Z.F., Pérez, J.G., Nava, R.V., Jaime, M.A. 1997. Área foliar, longitud de raíces y producción de grano de *Amaranthus hypochondriacus* en un suelo compactado. Agro Sur 24, 170-179.

De León-González, F., Hernández-Serrano, M.M., Etchevers, J.D., Payán-Zelaya, F., Ordaz-Chaparro, V. 2000. Short-term compost effect on macroaggregation in a sandy soil under low rainfall condition. Soil Tillage Research 56, 213-217.

De León-González, F., Celada, T.E., Hidalgo-Moreno, C.I., Etchevers-Barra, J.D., Gutiérrez-Castorena, M.C., Flores-Macías, A. 2006. Root–soil adhesion as affected by crop species in a volcanic sandy soil of Mexico. Soil Tillage Research 90, 77-83.

Domínguez, J.M., Schifter, I. 2003. Las arcillas: el barro noble. Colección: La Ciencia para Todos. Fondo de Cultura Económica. México D.F. pp.13-50.

Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease

suppressiveness. Annual Review Phytopathology 42, 243-270.

INEGI (Instituto Nacional de Geografía e Informática). 2004. Diccionario de términos edafológicos en: http://www.inegi.gob/

Koide, T.R., Mosse, B. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. Mycorrhiza 14, 145–163.

Linderman, R.G. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. En: ASA Special Publication number 54. American Society of Agronomy, Madison. pp.45-64.

Marschner, P. Yang, C.-H., Lieberei, R., Crowley, D.E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. Soil Biology Biochemistry 33, 1437-1445.

Miller, R.M., Jastrow, J.D., 1992. The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. En: ASA Special Publication Number 54. American Society of Agronomy, Madison. pp. 29-42.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. European Journal Soil Science 54, 655–670.

Oades, J.M. 1993. The role of biology in the formation, stabilization y degradation of soil structure. Geoderma 56, 377-400.

Porta, J., López-Acevedo, M., Roquero, C. 1999. Edafología (para la agricultura y el medio ambiente). McGraw-Hill. Barcelona. pp.17-54.

Prescott, M.L., Harley, P.J., Klein, A.D. 1999. Microbiología. McGraw-Hill. México D.F. pp.105-112.

Restrepo, R.J. 2000. Agricultura orgánica, una teoría y una práctica. Fundación Juquira Candiru. Cali. pp. 127-143.

Rillig, C.M., Wright, F.S., Eviner, T.V., 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five species. Plant Soil 238, 325–333.

Rucks, L., García, F., Kaplán, A., Ponce de León, J., Hill, M. 2004. Propiedades físicas del suelo. Agronomía Universidad de la República de Uruguay. Montevideo. pp. 22-65.

Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., Denef, K. 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. Soil Tillage Research 79, 7-31.

SMA (Secretaría del Medio Ambiente) D.F. 2005. Comisión de Recursos Naturales, Suelo de Conservación en: http://www.sma.df.gob.mx/

Sollins, P., Oman, P., Caldwel, B.A. 1996. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. Geoderma 74, 65-105.

Thomas, E.W. 1990. Sustainability: Striking a balance between economic and ecological constraints. En: Thomas, E.W.(Ed.) Sustainable agriculture in California: A research symposium. Sacramento. pp.135-172.

Tisdall, J.M., Oades, J.M., 1982. Organic matter and water stable aggregates in soils. Journal Soil Research 35, 55-60.

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

ANEXO 1

Determinación de la biomasa bacteriana (Conteo directo biovolumen).

1. La muestra (1 ml de muestra con 9 ml de formaldehído al 2 % saturado con borato de sodio), se almacenó a 5°C.

2. La muestra se homogeniza con un vortex (por 1 min).

3. Se toma 1 ml de la muestra y se coloca en un frasco de 10ml estéril y se le adicionan 9 ml de tween 80 (1/100) El reactivo tween se prepara con 0.1 ml de solución en 100 ml de agua destilada. Se deja reposar por 20 minutos y se coloca en un baño maría con hielo para someterla al ultrasonido a una amplitud del 40 y una pulsación de 5" por 2 minutos (2 veces).

4. De la muestra ultrasonicada se toman 250 µl y se colocan en un frasco estéril y se le adicionan 10 ml de agua destilada (200 ml de agua destilada con 0.69 ml de gliceraldehído y 0.005 g de ácido de sodio).

5. Se toman 3 ml de la muestra diluida y se coloca en un tubo, se le agrega 15 gotas de DAPI (.07 ml) a una concentración de 5µg/ml, se homogeniza en un vortex y se almacena a 4°C en la oscuridad por 12 horas.

6. Pasadas las 12 horas se filtra 1ml sobre una membrana nucleopore negra de 0.2 µm de ø poro, se lava con 3 ml de agua destilada estéril y se monta en el porta objetos para posterior revisión. La torre de filtración es flameada primero y se coloca la parte interior en el matráz. Sobre la parte interior se coloca una base (filtro blanco con la cara menos rugosa hacia arriba). Después se coloca el la membrana teñida por la técnica Ingerland black, colocada en caja de Petri, refrigerada por 48 h, enjuagada luego 2 veces con agua destilada estéril y previamente almacenada.

7. La membrana se coloca tal como se obtiene de la caja sobre el filtro blanco con 2 gotas de agua destilada para que se pegue. Después se coloca la parte flameada y se le pone la pinza. Se agrega 1 ml de muestra teñida, se deja filtrar y antes de que se seque se algregan 3 ml de agua destilada filtrada, antes de que se seque se detiene el proceso.

8. La membrana se coloca sobre un portaobjetos con dos gotas de aceite, se pone la membrana, se agrega otra gota de aceite y se pone el cubre objetos. Las burbujas deben eliminarse.

9. Los sobrantes van a la botella, el material usado debe esterilizarse en sucio y luego lavarse, el contenido también va a la botella.

Preparación de Reactivos:

⇒ Tween 80 (1/100): Se coloca 0.1 ml de tween 80 en 100 ml de agua destilada estéril.

⇒ Agua destilada con ácido de Sodio:

200 ml de agua destilada,

0.69 ml de formaldehído y

0.005 g de ácida de sodio.

⇒ DAPI: 500 µl en 100 ml de agua destilada = 5µg/ml = se colocan 0.7 ml por muestra, el equivalente a 15 gotas.

Numero de diluciones

1ml de este muestra en 9 ml de tween 80 ⟶ 1/100

250 µl en 10 ml de agua de mar artificial con ácida de sodio ⟶ 1/4000

⇒ Membrana nucleopore 0.2 µm

Con esta técnica se tiñe el DNA de bacterias heterótrofas vivas hasta antes de la tinción. A diferencia de otros fluorocromos como los que tiñen clorofilas y permiten apreciar organismos autótrofos.

ANEXO 2

Medios de cultivo utilizados para la determinación del NMP de bacterias con la capacidad para reciclar el N_2.

a) Medio de cultivo para bacterias fijadoras de N_2 (g/l)

- Succinato de Na 0.5
- $MgSO_4 . 7H_2O$ 0.2
- $CaCl_2$ 0.02
- $Na_2MoO_4 . H_2O$ 0.002
- $MnSO_4$ 0.002
- H_3BO_3 0.003
- Agar bacteriológico 2.0

pH 7.0

b) Caldo marino peptonado (para bacterias amonificantes) (g/l)

- Peptona 5.0
- K_2HPO_4 1.0
- KH_2PO_4 1.0
- $MgSO_4 . 7H_2O$ 0.5

pH 7 o 7.5

c) Medio de cultivo para bacterias oxidadoras de NH_4^+

- $(NH_4)_2SO_4$ 200.0 mg
- $NaHCO_3$ 250.0 mg
- K_2HPO_4 50.0 mg
- Sol. De oligoelementos 0.09 x tubo después de inocular
- Sol. De vitminas 0.018 x tubo después de inocular
- Agua destilada 1000.0 ml

pH 8.5 con KOH al 5%

d) Medio de cultivo para bacterias oxidadoras de NO_2^-

- $NaNO_2$ 100.0 mg
- $NaHCO_3$ 50.0 mg
- K_2HPO_4 25.0 mg
- Sol. De oligoelementos 0.09 x tubo después de inocular
- Sol. De vitminas 0.018 x tubo después de inocular
- Agua destilada 1000.0 ml

pH 8.5 con KOH al 5%

e) Medio de cultivo para bacterias reductoras de NO_3^-

- Nitrato Borth 9 g
- NaCl 20 g
- Agua destilada 1000.0 ml

pH 7.0

f) Medio de cultivo para bacteria oxidadoras de glucosa

- Medio de Hugh y Leifson 9.8 g
- NaCl 15.0 g
- Glucosa 10.0 g
- Agar bacteriológico 4.2 g
- Agar 7.0 g
- Agua destilada 1000.0 ml

pH 7.1

g) Medio de cultivo para bacteria fermentadoras de glucosa

- Medio de Hugh y Leifson 9.8 g
- NaCl 15.0 g
- Glucosa 10.0 g
- Agar bacteriológico 1.5 g
- Agar 7.0 g
- Agua destilada 1000.0 ml

pH 7.1

h) Solución de oligoelementos de Balch (1979)

- Ácido nitriloacético 1.5 g
- $MgCl_2 . 6H_2O$ 2.5 g
- NaCl 1.0 g
- $MnCl_2 . 4H_2O$ 0.06 g
- $FeCl_2 . 4H_2O$ 100.0 mg
- $CoCl_2 . 6H_2O$ 100.0 mg
- $CaCl_2 . 2H_2O$ 100.0 mg
- $ZnCl_2$ 100.0 mg
- $CuCl_2 . 2H_2O$ 10.0 mg
- $AlCl_2$ 10.0 mg
- H_3BO_3 10.0 mg

- $Na_2MoO_4 . 2H_2O$ 10.0 mg
- Agua destilada 1000.0 ml

pH 6.5 con KOH 10M

i) Solución de vitaminas de Balch

- D-Biotina (vit. H) 0.010 g
- Ácido fólico 0.010 g
- Riboflavina (B2) 0.025 g
- Tiamina HCL (B1) 0.025 g
- Piridoxina HCL (B6) 0.050 g
- DL Pantotenato de calico o D ácido pantotéico 0.025 g
- Ácido nicotínico (vit. PP) 0.025 g
- Cianocobalamina (B12) 0.0005 g
- Ácido p-aminobenzóico 0.025 g
- Ácido lipóico 0.025 g
- Agua destilada 100 ml

j) Reactivo de Griess (g/l)

Nitratos A
- Ácido sulfanílico 8.0
- Ácido acético (5N, 1 parte de ác. acético glacial por 2.5 partes de agua) 1000.0

Nitratos B
- Dimethyl-a-naphthalamina 5.0
- Ácido acético (5) 1000.0

* polvo de zinc (para reducción de nitratos)

k) Reactivo de Nessler (g/l)

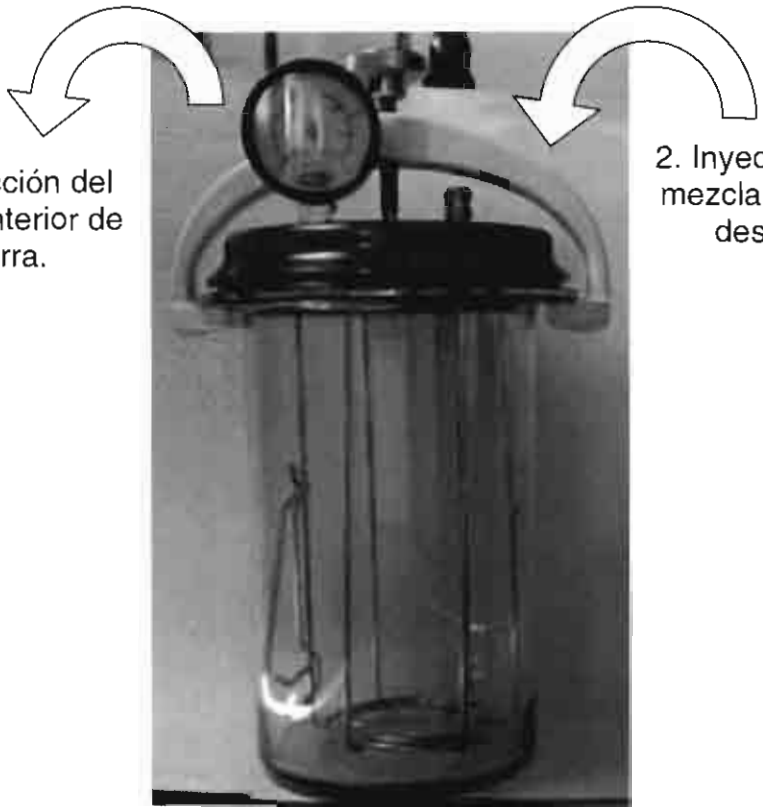
Solución A
- Yoduro mercúrico 50.0
- Yoduro potásico 36.5
- Agua destilada 1000.0 ml

Solución B
- Hidróxido de potasio 150.0
- Agua destilada 1000.0 ml

ANEXO 3

Jarra de anaerobiosis utilizada para la cuantificación de los potenciales exoenzimáticos de la comunidad bacteriana y fúngica.

Para generar las condiciones de baja oxigenación se utilizaron jarras de anaerobiosis Bixon, en las cuales es posible extraer el aire de si interior e inyectar la mezcla de gases deseada. En el presente trabajo se utilizó una mezcla de pO_2 4% balanceado con nitrógeno.



Jarra de anaerobiosis Bixon utilizada para la evaluación de la potencialidad bacteriana para respirar NO_3^-, oxidar glucosa, así como para cuantificar el potencial exoenzimático de las comunidades bacteriana y fúngica en condiciones de baja oxigenacion.