

Fundación

PROINPA

www.proinpa.org

Manual de Laboratorio de Microbiología Agrícola





Manual **de Laboratorio de Microbiología Agrícola**

Mayra Claros Magnus
Noel Ortuño Castro

Octubre 2016
Cochabamba - Bolivia

2016 **Manual de Laboratorio
de Microbiología Agrícola**

Depósito Legal: 2-1-5173-16

Autores:

Mayra Claros Magnus
Noel Ortuño Castro

Comité Revisor:

Giovanna Plata
Carmen Luz Villarroel

Edición y Producción

Gustavo Saravia
Samantha Cabrera

Contenido

1. Introducción	5
2. Facilidades de Laboratorio para la Microbiología de Suelo	9
A. NORMAS BÁSICAS DE LABORATORIO	9
1. Normas de seguridad	9
1.1. Procedimientos generales	9
1.2. Procedimientos en microbiología	10
3. Muestreo de Microorganismos del Suelo	13
4. Procesado de Muestras para Microbiología	16
4.1 Diluciones	16
4.2. Siembra de las diluciones en un medio sólido	17
5. Cuantificación de Microorganismos	18
5.1. Determinación del número de células viables	18
5.2. Cuantificación de bacterias con la cámara de Petroff-Hauser	18
5.3. Cuantificación de conidias de hongos con la cámara de Petroff-Hauser	19
6. Análisis Cualitativo de Microorganismos	20
6.1. Tinción de Gram	20
6.2. Observación al microscopio de actinomicetos y hongos sobre cubre objeto	21
7. Análisis Cuantitativo de la Microflora del Suelo	23
7.1. Bacterias totales	23
7.2. Hongos totales	24
8. Poblaciones Microbianas por su Hábitat en la Planta	25
8.1. Microorganismos de la rizósfera	25
8.2. Microorganismos del rizoplano	26
8.3. Microorganismos endófitos	26
8.4. Bacterias aerobias mesófilas	28
8.5. Bacterias anaerobias mesófilas	29
8.6. Bacterias heterótrofos	30
9. Otras Poblaciones del Suelo: Actinomicetos y Levaduras	32
9.1. Actinomicetos	32
9.2. Levaduras del suelo	33
10. Hongos del Suelo Simbiontes y Promotores de Crecimiento:	
Micorrizas (MA) y <i>Trichoderma</i>	35
10.1. Micorrizas Arbusculares (MA)	35
10.2. <i>Trichoderma</i> sp.	38

10.3. Otros hongos benéficos del suelo: Beauveria	41
11. Bacterias del Suelo: Simbiontes y Promotoras de Crecimiento	45
11.1. Rizobias	45
11.2. <i>Bacillus</i> sp.	46
12. Funciones de los Microorganismos en el Suelo	48
12.1. Fijación de Nitrógeno en el suelo	48
12.2. Solubilización de fosfatos	51
12.3. Reducción de nitratos	53
13. Otras Funciones de los Microorganismos del Suelo	54
13.1. Hidrólisis de almidón	54
13.2. Producción de CO ₂ por microorganismos	54
13.3. Producción de Ácido Indol Acético (AIA)	55
13.4. Prueba de Voges-Proskauer	57
13.5. Prueba de lecitinas	57
13.6. Fermentación y producción de gas a partir de glucose	58
13.7. Crecimiento a 50°C	58
13.8. Crecimiento al 7% de NaCl	58
13.9. Prueba de crecimiento en anaerobiosis	59
14. La Mesofauna del Suelo	60
Referencias Bibliográficas	62
Anexos	65
Anexo 1. Levadura-Manitol-Agar (LMA)	66
Anexo 2. Tripteina Soya Agar (TSA)	66
Anexo 3. Papa Dextrosa Agar (PDA)	66
Anexo 4. Medio Plate Count para Bacterias	67
Anexo 5. TSN Agar (Tryptona Sulfito Neomicina Agar)	67
Anexo 6. Medio Glicerina - Asparaginato de Conn	67
Anexo 7. Medio Glucosa Triptona Extracto de Carne (TGE)	68
Anexo 8. Medio de Rennie	68
Anexo 9. Medio de Burk	69
Anexo 9-1. Medio Mineral sin Nitrógeno	70
Anexo 10. National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium (NBRIP):	70
Anexo 11. Medio Nitrato-motilidad	71
Anexo 12. Reactivos para Reducción de Nitratos	71
Anexo 13. Agar Almidón para prueba de Hidrólisis de Almidón	72
Anexo 14. Solución de Salkowsky	72
Anexo 15. Voges-Proskauer Medio para Identificar <i>Bacillus</i>	72
Anexo 16. Caldo Base Rojo Fenol	73
Anexo 17. Caldo Tioglicolato para Anaerobiosis	73
Anexo 18. Medio Cloranfenicol-Rosa de Bengala	74

1 ■ Introducción

Los microorganismos son los seres más numerosos que existen en el planeta; son organismos ancestrales que han colonizado exitosamente cada nicho ecológico posible. Los microorganismos se encuentran prácticamente en todos los ecosistemas, desde los polos, en ambientes bajo el punto de congelación y muy secos, hasta los trópicos con temperaturas altas y con elevada precipitación pluvial. Su presencia y actividad es esencial para la salud y funcionamiento adecuado de todos los ecosistemas (Olembo, 1991).

Los microorganismos han desarrollado una gran capacidad para cumplir una infinidad de funciones debido a su gran versatilidad bioquímica, basada en la posibilidad de llevar a cabo una enorme cantidad de tipos de reacciones: oxidaciones, reducciones y precipitaciones, sobre los elementos componentes de lo que llamamos vida y que de manera directa o indirecta gobiernan todos los procesos en la tierra (Atlas, 1984).

Para la agricultura, el suelo es un hábitat complejo donde un gran número de poblaciones microbianas interactúan con los diversos sustratos, estando muchas de estas poblaciones asociadas a las raíces de las plantas en la zona rizosférica (Reyes *et al.*, 2006). Para mejorar la productividad se han utilizado agroquímicos en forma intensiva, lo cual trajo consecuencias funestas para el medio ambiente y la salud; eso ha motivado a mejorar la comprensión de las actividades simbióticas que se establecen en el suelo entre la microbiota, las plantas y las cadenas tróficas del suelo, los microorganismos deben ser entendidos como asociaciones microbianas que interactúan entre sí (Barea *et al.*, 2005).

En los microambientes están asentadas poblaciones microbianas asociadas a la presencia de los exudados radicales y que participan en la

formación de microagregados rizosféricos ricos en metabolitos microbianos principalmente del tipo aminoácidos y polisacáridos (Caesar-TonThat *et al.*, 2007). Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (RPCP) son bacterias benéficas que se presentan como una alternativa a los fertilizantes químicos y plaguicidas (Kloepper y Beauchamp, 1992). Estas poblaciones microbianas rizosféricas son capaces de ejercer efectos específicos sobre el crecimiento vegetal como la producción de fitohormonas, disolución y mineralización de los fosfatos, fijación asimbiótica del Nitrógeno atmosférico y producción de sideróforos y antibióticos (Vessey, 2003).

En general, la competencia por nutrientes genera en la rizósfera interacciones microbianas acordes al metabolismo de la planta debido a la liberación de sustancias difusantes, secreciones, lisados, gases y mucílagos (Benizri *et al.*, 2001). Asimismo, el establecimiento de poblaciones competitivas de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas dependen principalmente de aspectos puntuales como la colonización rizosférica de la planta, dada por la liberación de sus exudados radicales, y la capacidad de respuesta genética y quimioatrayente del microorganismo hacia la rizósfera (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2003).

La mayoría de las plantas naturalmente propagadas crecen en campos o en macetas, estos suelos son colonizados por las comunidades endofíticas de bacterias, que abarcan una gran variedad de especies y géneros. Estas bacterias no patógenas forman relaciones con sus anfitriones: unas beneficiosas, otras neutras, y algunas perjudiciales. Estas asociaciones pueden aumentar el crecimiento de las plantas, acelerar el desarrollo o mejorar la resistencia al estrés ambiental. (Sturz A. V. *et al.*, 2000).

Los indicadores biológicos integran gran cantidad de factores que afectan la calidad del suelo como la abundancia y subproductos de micro y macroorganismos, incluidos bacterias, hongos, nematodos, lombrices, anélidos y artrópodos. Incluyen funciones como la tasa de respiración del suelo, ergosterol y otros subproductos de los hongos, tasas de descomposición de los residuos vegetales, Nitrógeno y Carbono de la biomasa microbiana (SQI, 1996; Karlen *et al.*, 1997).

El análisis del valor sobre la importancia de la diversidad microbiológica del suelo aporta conocimientos para tomar decisiones o emitir recomendaciones en favor de la conservación del suelo cuando hay perturbaciones en el ambiente. Medir la abundancia relativa de la microbiota del suelo, permite identificar aquellas especies que por su escasa representatividad en la comunidad son más sensibles a las perturbaciones ambientales. Además, identificar un cambio en la diversidad, ya sea en el número de especies, en la distribución de la abundancia de las especies o en la dominancia, nos alerta acerca de procesos empobrecedores que son afectados por el cambio climático (Magurran, 1988).

Hoy en día, los biofertilizantes son considerados como un componente del manejo integrado de la nutrición vegetal y han sido definidos como sustancias que contienen microorganismos vivos que al aplicarse a las semillas, superficie de las plantas o al suelo, colonizan la rizósfera o el interior de la planta y promueven su crecimiento aumentando la disponibilidad de los nutrientes y la sanidad vegetal en la planta hospedera (Vessey, 2003).

El manejo inapropiado de los suelos en pendiente y la continua degradación de los mismos por los efectos climáticos y edáficos, la baja disponibilidad de Nitrógeno y Fósforo, principalmente, y los problemas de contaminación de los suelos, aguas y alimentos por el uso excesivo de agroquímicos exigen una gestión agrícola en términos de sostenibilidad. Por lo tanto, la evaluación de microorganismos promotores del crecimiento de plantas, entre ellos bacterias fijadoras de Nitrógeno y/o con capacidad disolvente de fosfatos inorgánicos representa una opción para el manejo sostenible de estos agroecosistemas. El manejo de las poblaciones de bacterias y hongos en el suelo son fundamentales para la sostenibilidad de los sistemas de producción.

El presente manual permitirá poner a disposición técnicas microbiológicas apropiadas de trabajo que ayuden en los avances de estudios de los microorganismos y los servicios ambientales de la agricultura en Bolivia.

Los protocolos son prácticos y de fácil entendimiento. A través de este manual se pretende guiar a los investigadores, técnicos y estudiantes en procesos y técnicas microbiológicas, experimentando e interpretando los resultados. Otro propósito es generar conocimiento y avances biotecnológicos para desarrollar nuevos bioproductos de beneficio para el agro en Bolivia.

2. Facilidades de Laboratorio para la Microbiología de Suelo

A. NORMAS BÁSICAS DE LABORATORIO

1. Normas de seguridad

El trabajo de laboratorio requiere ciertas normas básicas de seguridad, unas que son obligatorias y otras que son específicas o están relacionadas a un determinado trabajo.

1.1. Procedimientos generales, normas básicas de seguridad

- Todos los operarios del laboratorio deben conocer y cumplir las normas de seguridad establecidas.
- Cada operario deberá colocar todos los objetos personales (libros, mochilas, etc.) en la zona asignada para ese propósito.
- A fin de preservar la limpieza dentro del mismo evitando elementos contaminantes que se pueden traer del exterior, siempre deberá usar una bata de laboratorio de manga larga y abotonada, la cual se debe quitar al abandonar el mismo.
- Lavarse las manos con jabón antiséptico y secarse con papel toalla, antes y después de las actividades rutinarias. Tener las manos limpias y sin joyas (reloj, anillos, pulseras, etc.), en caso de tener cabello largo sujetarlo adecuadamente.
- Todas las áreas del laboratorio deben estar ordenadas y mantener el libre acceso a las instalaciones. Se deben limpiar y desinfectar diariamente los mesones de trabajo, no depositar encima ropa u objetos personales. Los pisos deben mantenerse limpios y lavados, una vez por semana, con una solución germicida y después de cualquier derrame.
- Todas las áreas de trabajo deben estar debidamente identificadas con el tipo de trabajo que se realiza y el riesgo que representa al operario.
- Los reactivos deberán estar almacenados de acuerdo a sus características, tomando especial cuidado de tener el espacio indicado para los ácidos con sus respectivas instrucciones de seguridad (si son inflamables y/o su grado de toxicidad). Asimismo, cada reactivo deberá tener las indicaciones para su

manipuleo (uso de lentes, barbijo, campana de extracción de gases, etc.) y sobre todo las acciones a tomar en caso de emergencia.

- Los operarios deben ser capacitados para el uso de equipos inflamables, manipulándolos con precaución, no dejando material inflamable cerca y evitando el posible contacto con tejidos.
- En caso de existir hornillas a gas, se deberá tener el suficiente espacio para el manipuleo y al final de la jornada cerrar las llaves de paso.
- Todos los operarios deben conocer el lugar donde se encuentra el extintor de incendios, así como el plano de evacuación en caso de emergencias.
- Está prohibido ingerir y/o almacenar cualquier tipo de alimento o bebida dentro del laboratorio. Así como fumar y/o aplicarse cosméticos.
- Todos los equipos deben tener a simple vista las instrucciones de uso (tipo de voltaje, modo de encendido, etc.).
- Ningún equipo, material, medios o cultivos microbianos, pueden retirarse del laboratorio, éstos deben ser desinfectados o esterilizados si se requieren trasladar.
- Después de usar, los materiales de laboratorio deben ser lavados adecuadamente y colocados en su lugar; asimismo los equipos (microscopios, balanzas analíticas, autoclave, etc.) y el lugar de trabajo (mesones, suelo, etc.) deben ser limpiados.
- Se debe disponer de un botiquín de primeros auxilios.
- Cuando el operario sufra alguna quemadura o herida debe acudir al botiquín del laboratorio y si es de gravedad ir a un centro de salud.
- En el caso de derrame de cultivos o rotura de recipientes con cultivos activos, se debe conservar la calma, con ayuda de guantes, colocar toallas de papel sobre el material derramado para evitar su dispersión y sobre ellas aplicar abundante solución desinfectante.

1.2. Procedimientos en microbiología

- La mayoría de los procedimientos de trabajo en microbiología requieren condiciones asépticas para lo cual se necesita equipo adecuado y de preferencia se asignará un ambiente cerrado para la cámara de flujo laminar con luz UV.
- Todos los materiales que van a ser utilizados se deben esterilizar. Para ello es indispensable el uso de autoclaves a vapor (vertical u horizontal), de manera estándar; autoclavar a 121° C y 15 libras de presión durante 20 minutos.
- Todos los objetos sucios o contaminados deben ser depositados en recipientes destinados a ese fin. Autoclavar todos los objetos de vidrio que hayan tenido contacto con algún tipo de muestra microbiológica, después lavar muy bien con jabón, desinfectante, lavandina, etc. y nuevamente autoclavar para su uso.

- Para la extracción de cultivos microbianos utilizar pipetas mecánicas o automáticas, micropipetas o cualquier otro dispositivo para ese propósito, no pipetear oralmente bajo ninguna circunstancia.
- Se debe tener mucho cuidado en el manipuleo de microorganismos para evitar contaminación entre ellos.
- Entre las recomendaciones básicas de trabajo con microorganismos se encuentran: manejar el asa de siembra tomándola del mango como si fuera un lápiz; sostener la tapa del tubo de ensayo con el dedo meñique de la otra mano sin que éste toque ninguna superficie. Realizar toda operación cerca del mechero Bunsen; flamear la boca del tubo de ensayo cuando se retira la tapa y antes de cerrar.
- El asa de siembra se esteriliza con la llama de un mechero hasta que quede incandescente (al rojo vivo) (Figura 1).
- Las pipetas se esterilizan en papel de forma individual, las placas Petri se las empaquetan en grupos de dos o tres con la base hacia arriba.

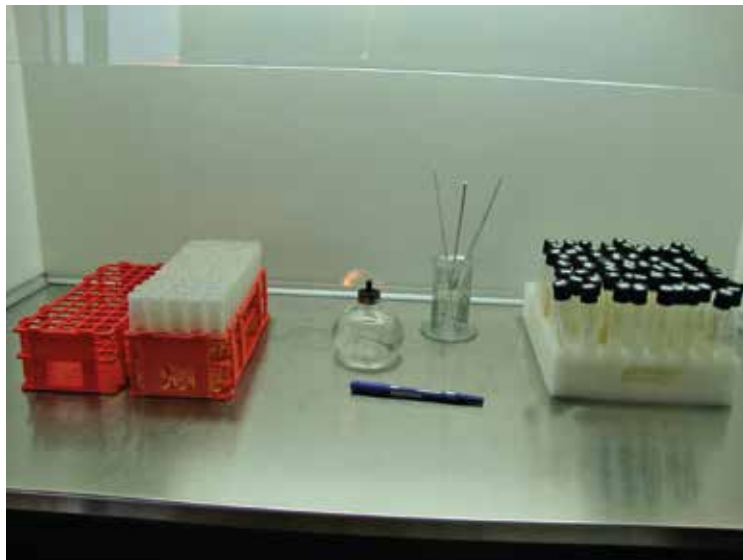


Figura 1. Materiales estériles dentro de la Cámara de Flujo laminar.

-Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo para el trabajo de microbiología pueden ser líquidos, sólidos y semisólidos y pueden ser dispensados en diferentes materiales de vidrio, entre los más comunes, las placas Petri, tubos de ensayo y matraces.

De forma general, para la preparación de medios de cultivo se disuelven todos los componentes en agua destilada. Cuando se trata de medio semisólido y sólido, se debe llevar el medio hasta casi punto de ebullición para permitir que el agar se funda, posteriormente el medio se dispensa en tubos de ensayo, matraces, o frascos, los cuales se tapan y se esterilizan durante 20 min a 120° C y 15 libras de presión.

Cuando se requiere incorporar compuestos termolábiles (vitaminas o antibióticos), se debe realizar la esterilización por “filtración” (usando filtro bacteriológico). La solución filtrada será añadida al medio de cultivo cuando éste alcance una temperatura menor a 37° C. Los medios de cultivo ya preparados, deben ser conservados a 4° C.

3 Muestreo de Microorganismos del Suelo

En el suelo, los microorganismos se encuentran distribuidos de una manera heterogénea y para tener una muestra representativa de la comunidad microbiana es necesario tomar submuestras para formar una muestra compuesta, de una determinada parcela de cultivo.

El protocolo que se utiliza en el laboratorio de Microbiología Agrícola es una adaptación de Weaver *et al.* (1994).

Para la obtención de muestras compuestas se debe considerar que la actividad microbiológica se da alrededor de las raíces, por lo que la muestra deberá ser tomada entre los 0 y 30 cm de profundidad, pero esto depende del tipo de suelo, clima y vegetación del lugar, por lo cual se debe tomar submuestras de toda el área a muestrear.

En caso de que la muestra sea de un suelo natural no perturbado, de preferencia se debe eliminar la capa superficial hasta 5 cm y posteriormente tomar la muestra.

Protocolo 1:

Materiales de muestreo:

- Solución de alcohol etílico al 70%
 - Agua
 - Detergente
 - Pala de metal / Sacabocados de Inox
 - Recipientes y bolsas de plástico
 - Varillas de metal o madera de 10-15 cm de largo
 - Cintas de color
 - Hielera
 - Hielo seco
 - Cinta de embalaje
 - Hipoclorito de sodio (lavandina)
 - Marcadores indelebles
- Las herramientas a ser utilizadas deben ser lavadas con detergente y agua para luego ser desinfectadas con alcohol etílico al 70% o con hipoclorito de sodio al 1,3% antes de llegar al área de muestreo.

- El área de muestreo debe ser delimitada horizontalmente con las varillas de metal, cada una con una cinta de color para identificarlas.
- Con otra cinta y con las varillas se traza una “W” sobre la superficie a muestrear delimitando así el lugar exacto donde se debe muestrear (Figura 2).
- Se recomienda tomar submuestras por punto de muestreo, tratando de que todas sean del mismo volumen (Figura 3).



Figura 2. Marcado del lugar de muestreo en W.



Figura 3. Toma de submuestras de suelo.



- La muestra compuesta debe ser almacenada en una bolsa estéril, con todos los datos posibles de identificación. Éstas deben ser transportadas al laboratorio en una conservadora con hielo y mantenerse a 4° C.
- Entre colecta y colecta todo el material utilizado debe ser limpiado y esterilizado con un paño empapado en alcohol para evitar la contaminación entre muestras (Figura 4).



Figura 4. Desinfección de herramientas

- Para colectas de suelo asociadas con raíces, excavar un hoyo al pie de la planta, retirar las raíces teniendo cuidado de dejar la mayor cantidad de suelo adherido a éstas y almacenar en bolsas estériles cerradas e identificadas (Figura 5).



Figura 5. Colecta de suelo asociado a las raíces.

- Los datos que se requieren para la identificación de las muestras son: lugar de muestreo, localidad, nombre del agricultor, cultivo y fecha.
- Las muestras identificadas se deben transportar lo más pronto posible al laboratorio de análisis. Si el lugar de muestreo es muy distante, las bolsas deben ser guardadas en una conservadora (Figura 6).
- No es recomendable que las muestras tengan más de 48 horas guardadas antes de llegar al laboratorio.
- Se recomienda realizar pruebas físico-químicas al suelo, muchas veces son importantes para correlacionarlas con las poblaciones microbianas.



Figura 6. Transporte de muestras al laboratorio, mejor si contiene una botella con hielo para refrigerar la caja.

4. ■ Procesado de Muestras para Microbiología

Una vez que las muestras llegan al laboratorio deben ser procesadas a la brevedad posible.

4.1 Diluciones

A fin de facilitar el procesado y la lectura de poblaciones microbianas, es necesario realizar diluciones seriadas.

Para este propósito se comienza de una suspensión concentrada (1:10) la cual se va diluyendo en serie con un factor de dilución de 10. Se deberá obtener 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, etc. Esta serie de diluciones son muy importantes en el aislamiento de microorganismos, porque facilitan su aislamiento y caracterización (Madigan y Martinko, 2004).

Protocolo 2:

- Pesar 10 g de suelo.
- En cámara de flujo en un matraz estéril mezclar los 10 g de suelo con 90 ml de solución salina al 0,85% (1:10).
- Extraer 1 ml de esta dilución y mezclar en un tubo con 9 ml de solución salina (1:100), agitar con la ayuda de un vortex, para disponer de una muestra homogénea.
- Nuevamente extraer 1 ml de esta dilución y nuevamente homogeneizar con 9 ml de solución salina (1:1000) y así sucesivamente hasta obtener una dilución 10^6 (Figura 7).

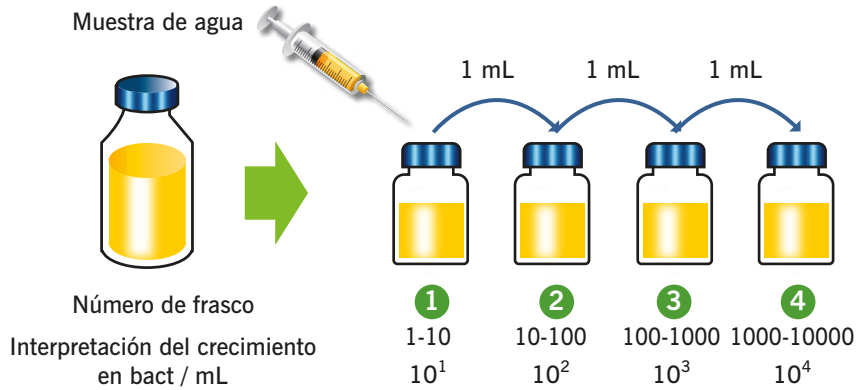


Figura 7. Método de diluciones seriadas para recuento en placa de colonias (Fuente: Tortora *et al.*, 2007).

4.2. Siembra de las diluciones en un medio sólido

Las diluciones que se obtienen en el proceso de dilución pueden ser sembradas de dos maneras:

- Siembra por vertido en placa:** Se coloca 1 ml de la dilución en una placa Petri estéril y se adiciona medio de cultivo estéril a una temperatura de 45°C, se homogeniza bien haciendo movimientos de izquierda a derecha y de derecha a izquierda de la misma manera de arriba hacia abajo. Se incuba la placa para luego hacer el recuento de colonias. Esta siembra requiere una dilución adicional.
- Siembra por extensión:** la siembra se realiza con ayuda de una espátula de Drigalski (Figura 8), se deposita 100 μ l de dilución en la placa Petri con medio de cultivo y se siembra con la espátula. Se incuba la placa para luego hacer el recuento de colonias. En esta siembra se adiciona un factor de dilución.



Figura 8. Siembra por extensión.

5 ■ Cuantificación de Microorganismos

5.1. Determinación del número de células viables

Para determinar el número de células viables se utilizan las placas Petri donde crecieron las colonias de 30 a 300. A partir de este número de colonias se calcula el número de unidades formadoras de colonias (UFC), que es el inverso de la dilución (Figura 9).

El resultado se expresa en número de unidades formadoras de colonia por ml o por g (ufc/ml o ufc/g).



Figura 9. Unidades Formadoras de Colonia en diluciones (ufc) 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .

$$\text{Número de colonias por placa} \times \text{Factor de dilución}^* \\ \text{UFC/g} = \text{ml de la muestra sembrada}$$

*Factor de dilución = Inversa de la dilución.

5.2. Cuantificación de bacterias con la cámara de Petroff-Hauser

Este recuento es el más utilizado en los laboratorios de microbiología. Es un recuento total de las células individuales de una población microbiana presente en el medio de cultivo a través de un microscopio con la cámara de Petroff-Hauser.

Esta cámara tiene una profundidad de 0,02 mm; un área de 1 mm², dividida en un retículo de 25 cuadrados grandes. Cada cuadrado grande está subdividido a su vez en 16 cuadrados pequeños (4 x 4), es decir que la muestra se distribuye en 400 celdillas (16 x 25).

La ventaja de este método es que es económico y rápido de realizar.

La desventaja de este método es que no se distinguen las células viables de las inviables.

Protocolo 3:

- Partir de un medio de cultivo bacteriano.
- Hacer diluciones del cultivo bacteriano.
- Montar la dilución 10^3 hasta que se tenga entre 3-8 células por cuadro pequeño.
- Una vez dispensada entre el portaobjeto y el cubre objeto (Figura 10), dejar reposar la muestra. En bacterias móviles, hay que inmovilizarlas previamente, con una mezcla de alcohol y agua.
- Contar el número de células en varias celdillas (normalmente en 16, equivalentes a uno de los cuadros grandes).
- Registrar el número “n” de células observadas en las 16 celdillas. Después, contar hasta 10 cuadros grandes y realizar un promedio.
- La densidad celular o número de células/ml es: $n \times 1,25 \times 10^6$.

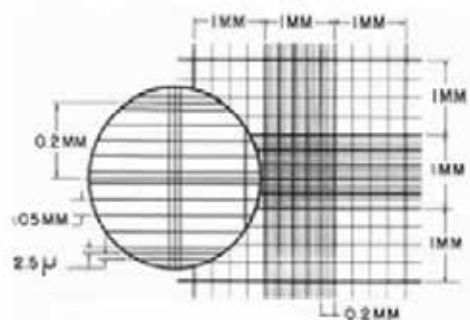


Figura 10. Recuento microscópico directo con la cámara de Petroff Hauser

5.3. Cuantificación de conidias de hongos con la cámara de Petroff-Hauser

- Para el conteo de conidias colocar 1 gramo del sustrato conteniendo el hongo y a éste adicionar 9 ml de agua destilada (10^1).
- Hacer diluciones.
- Montar la dilución 10^3 hasta obtener entre 3 y 8 células por cuadro pequeño (Figura 11).
- Aplicar la fórmula general: Número de conidias/ml = Suma de los 5 C.S. x 5000 (C.S. = Cuadrados Secundarios y 50000 es Constante).

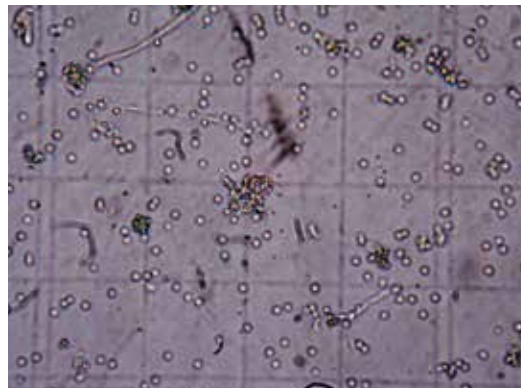


Figura 11. Esporas de *Trichoderma* sp.

6 ■ Análisis Cualitativo de Microorganismos

6.1. Tinción de Gram

Este tipo de tinción permite diferenciar las bacterias Gram negativas de las Gram positivas y sirve para identificar géneros bacterianos.

Protocolo 4:

- Se trabaja con cultivos de 24 a 48 horas de siembra.
- Realizar una extensión con el asa de siembra esterilizada, para ello se toma una pequeña gota de cada uno de los cultivos y se extiende en un portaobjetos limpio. Si el cultivo procede de un medio sólido, se coloca una gota de agua en el portaobjetos y se mezcla con una pequeña porción de la muestra hasta formar una suspensión homogénea, extendiéndola con el fin de obtener una fina película. Posteriormente, se deja secar al aire o en la parte alta de la llama del mechero, pero no se debe eliminar el líquido calentando el portaobjetos a la llama debido a que las células pueden distorsionarse.
- Fijar la muestra. La fijación tiene como finalidad coagular el protoplasma de las células y hacer que se adhieran al portaobjetos, siendo el calor el método más utilizado para la fijación, aunque pueden utilizarse otros agentes, como el alcohol (metanol) u otros compuestos químicos. La fijación con calor se recomienda cuando se trabaja con muestras de un cultivo sólido; en muestras obtenidas de un cultivo líquido es mejor hacer la fijación con metanol ya que se retienen en el portaobjetos un mayor número de células.

Fijación de la muestra. **a) fijación por calor.** La fijación por calor se realiza pasando varias veces la preparación seca a través de la llama de un mechero, con la extensión hacia arriba. El calor desnaturaliza las proteínas y suele matar al microorganismo. **b) fijación con metanol.**

- Teñir durante un minuto con la solución cristal violeta. El cristal violeta penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas) y las tiñe de morado (Figuras 12 y 13).
- Lavar el exceso de colorante con agua destilada.

- Cubrir la extensión con una solución diluida de lugol (yodo), que actuará como mordiente, durante un minuto. El lugol entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta.
- Lavar con agua el exceso de lugol.
- Para decolorar, agregar una mezcla de alcohol-acetona (solución de 70% de alcohol al 95% con 30% de acetona), cubriendo la preparación y dejando actuar durante 15 segundos. Este proceso se realiza varias veces hasta que el decolorante es cristalino.
- Lavar con agua abundante para eliminar el decolorante.
- Colorear con safranina durante un minuto. La safranina, es una coloración de contraste que se utiliza para poner de manifiesto las bacterias Gram negativas, dando como resultado células de color rojo. En caso de haber presencia de bacterias Gram positivas éstas no se ven afectadas por la safranina ya que se mantienen teñidas de morado.
- Lavar con agua y dejar que la preparación se seque.
- Examinar las preparaciones al microscopio. Las bacterias Gram positivas (Figura 12) aparecerán coloreadas de violeta, mientras que las Gram negativas se observan de color rojo (Figura 13).

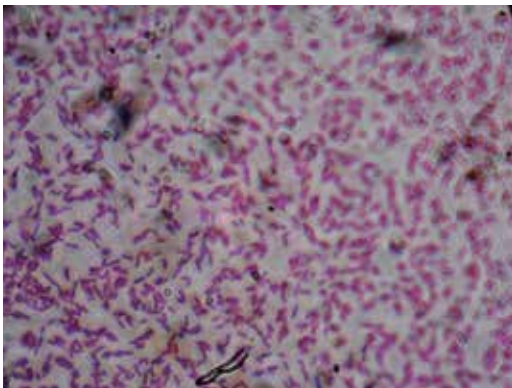


Figura 12. Bacterias Gram positivas.



Figura 13. Bacterias Gram negativas.

6.2. Observación al microscopio de actinomicetos y hongos sobre cubre objeto

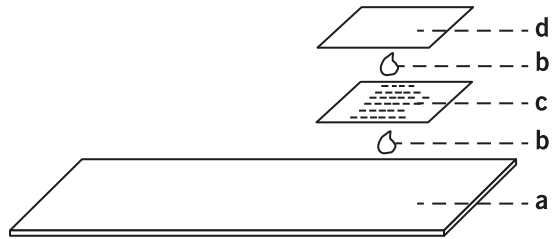
Los actinomicetos y los hongos pertenecen a dos grupos filogenéticos distintos, es decir los procariotas (o más precisamente las bacterias) y los eucariotas, respectivamente. No obstante, ambos tipos de organismos comparten un modo de crecimiento filamentoso. Además, en ambos grupos se encuentran esporas que son características para la identificación (Figura 14).

Protocolo 5:

- Preparar en condiciones de esterilidad y con 24 horas de anticipación placas Petri conteniendo medio de cultivo LMA (anexo 1).
- En una Cámara de Flujo Laminar con un asa estéril, transferir muestras con el actinomiceto en varios puntos de la placa Petri.
- En cada punto de inoculación colocar un cubre objeto estéril insertándolo con un ángulo de 45°.
- Incubar las placas durante 72 horas a 30°C.
- Para la inspección microscópica, dispensar una gota de solución de cristal violeta en un portaobjeto, sobre esta gota, con la ayuda de una pinza colocar el cubre objeto donde creció el actinomiceto (Figura 14).
- Nuevamente dispensar otra gota de cristal violeta encima del cubre objeto.
- Finalmente colocar un cubre objeto limpio encima del montaje, evitando la formación de burbujas.
- Observar al microscopio con un aumento de 400X.



A



B

Figura 14. A) Cultivo B) Tinción del cultivo. (a) Porta objeto; (b) Solución de colorante; (c) Cubre objeto con crecimiento bacteriano; (d) Cubre objeto limpio.

7 ■ Análisis Cuantitativo de la Microflora del Suelo

Se considera la población total de bacterias y hongos del suelo aislados en un medio específico para cada uno, esto permitirá finalmente establecer la diversidad que existe de cada grupo en una muestra determinada.

7.1. Bacterias totales

El procedimiento empleado (APHA, 1998), se realiza para la estimación de bacterias mesófilas en muestras de suelo, también se puede aplicar esta técnica para analizar las poblaciones totales de bacterias en humus, bioles, compost y otros similares o relacionados.

Protocolo 6:

Preparar con 24 horas de anticipación todo en condiciones de esterilidad, placas Petri con el medio de cultivo Tripteina Soya Agar (TSA) (Anexo 2), agua peptonada al 0,1%, pipetas, tubos de ensayo, matraces de 100 ml y puntas de micropipetas.

- Pesar 10 g de suelo de la rizósfera.
- Bajo una cámara de flujo, agregar a un matraz con 90 ml de agua peptonada estéril al 0,1%. Agitar vigorosamente por dos minutos (dilución 10^{-1}).
- Hacer diluciones hasta 10^{-6} en tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada y 1 ml de la dilución anterior.
- Sembrar 1 ml de cada dilución en las placas con medio TSA incubarlas por 48 horas a 37°C .
- Identificar debidamente todas las placas
- Cuantificar las colonias en placas Petri que contengan entre 30 - 300 colonias (Figura 15).
- Expresar los resultados en UFC/g de suelo seco.



Figura 15. Colonias de bacterias totales.

7.2. Hongos totales

Esta metodología permite conocer la cantidad total de hongos de manera individual en las muestras de suelo, considerando que la microflora es sensible a ligeros cambios del ambiente del suelo (Rosales *et al.*, 2008). Se aplica la metodología recomendada por Merck (1994).

Protocolo 7:

- Preparar con 24 horas de anticipación todo el material en condiciones de esterilidad, placas Petri con el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), agua peptonada al 0,1%, pipetas, tubos de ensayo, matraces de 100 ml y puntas de micropipetas.
- Pesar 10 g de suelo proveniente de la rizósfera.
- En la cámara de flujo laminar, agregar el suelo a un matraz conteniendo 90 ml de agua peptonada estéril al 0,1% (dilución 10^{-1}). Agitar vigorosamente por dos minutos.
- Hacer diluciones hasta 10^{-6} en tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada y 1ml de la dilución anterior.
- Sembrar 1 ml de cada dilución en las placas con medio PDA (Anexo 3) e incubarlas a 37°C por 48 horas.
- Identificar las placas.
- La cuantificación se debe realizar en la placa que contenga de 30 a 300 colonias (Figura 16).
- Expresar los resultados en UFC/g de suelo seco.



Figura 16. Hongos totales.

8 Poblaciones Microbianas por su Hábitat en la Planta

8.1. Microorganismos de la rizósfera

Protocolo 8:

- Preparar con 24 horas de anticipación todo el material en condiciones de esterilidad: placas Petri con medio de cultivo Plate Count (Anexo 4), agua peptonada al 0,1%, pipetas, tubos de ensayo, matraces de 100 ml y puntas de micropipetas.
- Pesar 10 g de rizósfera.
- Agregar la muestra a un matraz con 90 ml de agua peptonada estéril al 0,1%. Agitar vigorosamente por dos minutos (dilución 10^{-1}). Realizar esta acción dentro de una cámara de flujo laminar.
- Hacer diluciones hasta 10^{-6} en tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada y 1 ml de la dilución anterior.
- Sembrar 1 ml de cada dilución en las placas con medio Plate Count e incubarlas a 37°C por 48 horas.
- Identificar las placas.
- Hacer el recuento de colonias en placas que contengan de 30 a 300 colonias (Figura 17).
- Expresar los resultados en UFC/g de suelo seco.

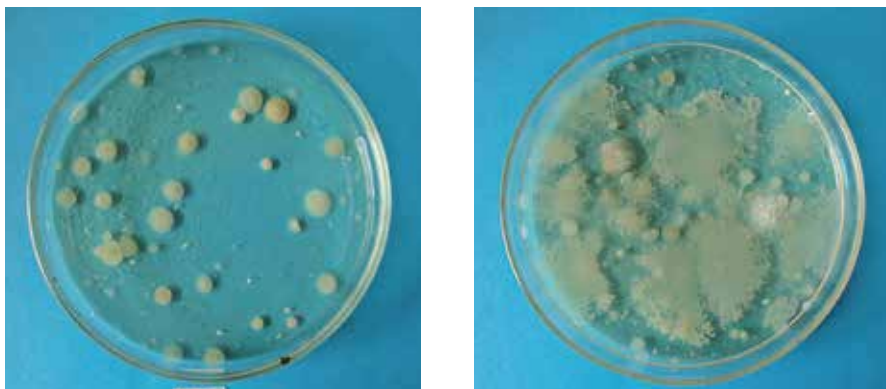


Figura 17. Colonias bacterianas aisladas de la rizósfera.

8.2. Microorganismos del rizoplano

Protocolo 9:

- Preparar con 24 horas de anticipación todo el material en condiciones de Esterilidad: placas Petri con medio de cultivo TSA (Anexo 2), agua peptonada al 0,1%, pipetas, tubos de ensayo, matraces de 100 ml y puntas de micropipetas.
- Pesar 10 g de raíces.
- Dentro de una cámara de flujo laminar, agregar las raíces a un matraz con 90 ml de agua peptonada esteril al 0,1% agitar gentilmente con la mano 3 a 4 veces.
- En otro matraz recuperar las raíces y adicionar 90 ml de agua peptonada esteril con 4 g de perlas de vidrio esteriles (diámetro 2 mm) y agitar en agitador orbital por 20 min.
- Hacer diluciones hasta 10^{-6} en tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada y 1ml de la dilución anterior.
- Sembrar 1 ml de cada dilución en las placas con medio TSA e incubarlas a 37°C por 48 horas.
- Identificar debidamente todas las placas.
- Hacer el recuento de colonias en placas que contengan entre 30 - 300 colonias (Figura 18).
- Expresar los resultados en UFC/g de suelo seco.



Figura 18. Bacterias aisladas del Rizoplano.

8.3. Microorganismos endófitos

Los microorganismos endófitos comprenden a los hongos y bacterias que viven en el interior de células o tejidos de plantas superiores, sin causar daño (Quispel, 1992). En general, los microorganismos endófitos pueden localizarse en espacios intracelulares, intercelulares o en el tejido vascular (Reinhold-Hurek *et al*, 1998).

Protocolo 10:

- Preparar con 24 horas de anticipación todo el material en condiciones de esterilidad: placas Petri con medio de cultivo TSA (Anexo 2), solución salina al 0,85%, pipetas, tubos de ensayo, matraces de 100 y 250 ml y puntas de micropipetas.
- Lavar el material vegetal fresco con agua de grifo para quitar cualquier suciedad suelo adherido.
- Pesar 10 g de material vegetal sea éste de la parte aérea, raíz o semilla (Figura 19).
- Cortar el material en segmentos de 5-8 cm luego colocarlo en un matraz estéril de 250 ml. Trabajar dentro de una cámara de flujo laminar.
- Agregar 90 ml de solución salina para lavar y quitar cualquier resto que no sea material vegetal.
- Desinfectar la superficie con etanol al 70% por un minuto en agitación y posteriormente enjuagar con agua destilada estéril.
- Realizar una segunda desinfección con Hipoclorito de Sodio al 1,3% y dejar en agitación por 15 minutos (Figura 20).
- Realizar 4 a 6 enjuagues con agua destilada estéril hasta que se pierda el olor a Hipoclorito.
- Colocar el material en un mortero estéril y macerar con la solución salina.
- Recuperar el material en un matraz estéril de 250 ml.
- Adicionar 60 ml de solución salina.
- Hacer diluciones seriadas.

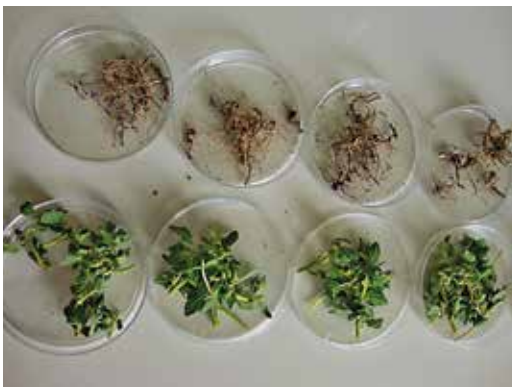


Figura 19. Bacterias aisladas del Rizoplano.



Figura 20. Esterilización superficial de raíces u otros tejidos.

- Sembrar en el medio de cultivo TSA.
- Incubar de 24-72 horas a 28°C.
- Expresar los resultados en UFC/g de material vegetal (Figuras 21, 22 y 23)



Figura 21. Bacterias endófitas de hoja, tallo y raíz.



Figura 22. *Trichoderma* spp. endófito.



Figura 23. Bacterias endófitas de semillas de cebada.

8.4. Bacterias aerobias mesófilas

El procedimiento empleado APHA (1998), se realiza para la estimación de bacterias mesófilas en muestras de suelo, humus, bioles, compost y otros relacionados.

Al grupo de organismos mesófilos aeróbicos pertenecen una gran variedad de microorganismos, están incluidos todos aquellos microorganismos capaces de desarrollarse entre 20 y 37°C, que son los extremos de las temperaturas a las cuales suele realizarse este recuento.

Protocolo 11:

- Preparar 24 horas de anticipación todo el material en condiciones de esterilidad: placas Petri con el medio de cultivo Plate Count (Anexo 4), solución salina al 0,85%, pipetas, tubos de ensayo, matraces de 100 ml y puntas de micropipetas.
- Pesar 10 g de la muestra suelo, humus, bioles, compost y otros relacionados.
- Dentro de una cámara de flujo laminar poner los 10 g de suelo en un matraz con 90 ml de solución salina al 0,85%. Agitar vigorosamente por 2 minutos.
- Tomar 1 ml de la suspensión y transferir a un tubo con 9 ml de solución salina al 0,85% y llegar a la dilución 10^{-6} .
- Con la ayuda de una espátula de Drigalsky sembrar 100 μ l de las diluciones dos por dilución en las placas que contienen el medio Plate Count.
- Incubar a 28°C por 48 horas.
- Hacer el recuento de colonias en placas que contengan entre 30 - 300 colonias.
- Expresar los resultados en UFC/g de suelo seco (Figura 24).



Figura 24. Bacterias aerobias mesófilas.

8.5. Bacterias anaerobias mesófilas

Merck (1994), recomienda la siguiente metodología para el recuento de bacterias anaerobias mesófilas, son bacterias que crecen en una temperatura promedio entre 25-37°C y en ausencia de oxígeno. Se encuentran en suelos inundados o con alta humedad.

Protocolo 12:

- Preparar con 24 horas de anticipación todo el material en condiciones de esterilidad: placas Petri con el medio de cultivo Agar Triptona Sulfito Neomicina (TSN) (Anexo 5), solución salina al 0,85%, pipetas, tubos de ensayo, matraces de 100 ml y puntas de micropipetas.

- Pesar 10 g de suelo que esté en condiciones de anaerobiosis.
- Dentro una cámara de flujo laminar poner 10 g de suelo en un matraz con 90 ml de solución salina al 0,85%. Agitar vigorosamente por 2 minutos.
- Tomar 1 ml de la suspensión y transferir a un tubo con 9 ml de solución salina al 0,85%, hacer una dilución para llegar a 10^{-3} .
- Con la ayuda de una espátula de Drigalsky sembrar $100 \mu\text{l}$ de las diluciones dos por dilución en las placas con el medio TSN.
- Dejar solidificar. Invertir las placas e introducirlas en una cubeta de anaerobiosis.
- Incubar a 35°C por 24 horas.
- Hacer el recuento de colonias en placas que contengan entre 30 - 300 colonias.
- Expresar los resultados en UFC/g de suelo seco (Figura 25).

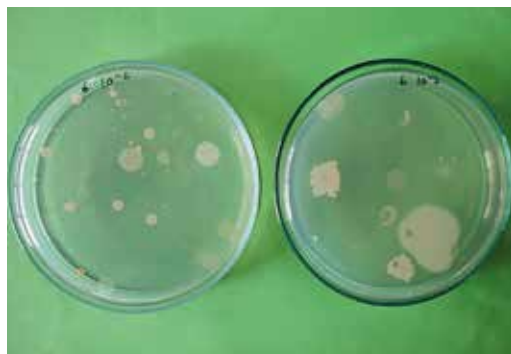


Figura 25. Bacterias anaerobias mesófilas.

8.6. Bacterias heterótrofas

Pour plate method (9215B), es un procedimiento del Standard Methods (2000), para la estimación del número de bacterias heterotróficas viables en agua.

Las bacterias heterótrofas obtienen el dióxido de carbono de sustancias orgánicas como carbohidratos y proteínas. La mayoría de las bacterias son heterótrofas y muchas se encuentran en la naturaleza y hasta en el agua potable, jugando un papel vital en el reciclaje natural de sustancias.

Protocolo 13:

- Se deberá preparar con 24 horas de anticipación todo en condiciones de esterilidad, placas Petri con el medio de cultivo Plate Count (Anexo 4), solución salina al 0,85%, pipetas, tubos de ensayo, matraces de 100 ml y puntas de micropipetas.
- Medir 10 ml de muestra de agua.
- Centro una cámara de flujo laminar, colocar 10 ml de muestra en un matraz con 90 ml de agua peptonada. Homogenizar.
- Tomar 1 ml de la suspensión y transferir a un tubo con 9 ml de solución salina al 0,85% y llegar a la dilución 10^{-5} .

- Con la ayuda de una espátula de Drigalsky sembrar 100 μl de las diluciones dos por dilución en las placas conteniendo el medio de cultivo.
- Incubar a 35°C por 48 horas.
- Contar las colonias en las placas que contengan entre 30 - 300 colonias.
- Expresar los resultados en UFC/ml (Figura 26).

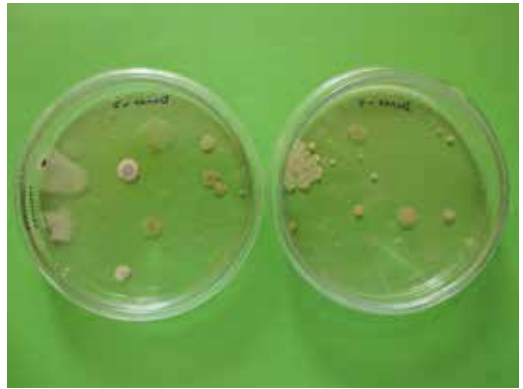


Figura 26. Bacterias Heterótrofas.

9 Otras Poblaciones del Suelo: ■ Actinomicetos y Levaduras

9.1. Actinomicetos

Los actinomicetos son un grupo heterogéneo de bacterias filamentosas parecidas superficialmente a los hongos. El crecimiento característico es un micelio ramificado que tiende a fragmentarse en elementos bacterianos. Muchos actinomicetos llevan vida libre, particularmente en el suelo.

Se nutren de compuestos orgánicos (heterótrofos) estando ampliamente distribuidos no solamente en la cubierta edáfica, aunque también alcanzan el horizonte C, sus conidios, pueden alcanzar profundidades mayores que las bacterias, por lavado o por acción de riegos intensivos. Lógicamente abundan sobre los materiales orgánicos que aporta la naturaleza o el hombre a su superficie, al ser capaces de descomponer una gran cantidad de substratos carbonados. Es de especial interés su habilidad para degradar compuestos altamente recalcitrantes tales como quitina, celulosa y hemicelulosa, en condiciones de pH del medio particularmente alcalinas, lo que hace que los actinomicetos sean además de especializados, muy activos en nuestro ámbito de suelos mediterráneos.

Se proponen dos métodos para el aislamiento de actinomicetos, los mismos que son de aplicación sencilla y permiten la selección de estos microorganismos con base a su capacidad metabólica o a su propiedad física de crecimiento filamentososo.

Protocolo 14 a):

- **Medio de Glicerina-Asparaginato de Conn**
- Preparar con 24 horas de anticipación el medio de cultivo de Conn (Anexo 6) con cicloheximida, esterilizar y dispensar en placas Petri en una cámara de flujo laminar
- Pesar 10 g de suelo y realizar diluciones hasta 10^{-5} .
- Sembrar con la ayuda de una espátula de Drigalski 0,1 ml de estas diluciones en medio Conn.



Figura 27. Colonias de actinomicetos.

- Incubar a 30°C durante 72-96 horas (Figura 27).

Nota: Si no se cuenta con el medio Conn este puede ser reemplazado con el medio para aislamiento de actinomicetos (ADA) (no disponible en este documento) o el medio Arginina Reducida-Almidón-Sales (ARAS) (no disponible en este documento).

Protocolo 14 b):

- Aislamiento de actinomicetos utilizando la separación por filtro

- Preparar con 24 horas de anticipación el medio Levadura Manitol Agar (LMA) (Anexo 1) esterilizar y dispensar en placas Petri en condiciones asépticas.
- Preparar filtros de nitrocelulosa (Millipore, diámetro 90 mm; porosidad 0,22 o 0,45 μm), humectar la membrana con agua destilada y esterilizarlos.
- Pesar 10 g de suelo y realizar diluciones hasta la 10^{-5} .
- En la superficie de un medio LMA, colocar un filtro Millipore estéril.
- Dispensar 0,1 ml de las diluciones en cada filtro Millipore.
- Con la ayuda de una espátula de Drigalsky distribuir la suspensión celular teniendo cuidado de no distribuirla ni al borde ni al interior del filtro.
- Incubar a 30°C durante 96 horas.
- Quitar el filtro, utilizando pinzas estériles.
- Incubar el cultivo sin filtro a 30°C durante 72 horas.

9.2. Levaduras del suelo

Las levaduras son hongos unicelulares, cuya presencia en los suelos queda poco estudiada. Se sabe que varias levaduras ascomicetas y basidiomicetas existen en el suelo, pero se estima que sus poblaciones son bastante escasas. Los géneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus* y *Blastomyces*, entre otros, se encuentran en los suelos.

La mayoría de las levaduras del suelo son saprófitas, es decir que contribuyen a la mineralización de los residuos orgánicos. Varios grupos de levaduras son encontrados en la rizósfera, mientras que otros colonizan la superficie o el interior de la roca y contribuyen a su meteorización.

Estos microorganismos sintetizan sustancias antimicrobiales y útiles para el crecimiento de las plantas a partir de aminoácidos y azúcares secretados por bacterias fototróficas, materia orgánica y raíces de las plantas.

Las sustancias bioactivas, como hormonas y enzimas, producidas por las levaduras, promueven la división celular activa. Sus secreciones son sustratos útiles para

Microorganismos Eficaces como bacterias ácido lácticas y actinomicetos. A veces suelen estar unidos entre sí formando cadenas, producen enzimas capaces de descomponer diversos sustratos, principalmente los azúcares.

Las levaduras son hongos que tienen la capacidad de crecer en los medios utilizados para el cultivo selectivo de hongos del suelo. Por eso, a menudo resulta difícil utilizar medios de cultivo que permitan sólo el crecimiento de levaduras. Aquí se propone el uso de un medio con pH ácido para inhibir las bacterias y con propionato de sodio para tratar de reducir la velocidad de crecimiento de los hongos.

Protocolo 15:

- Preparar con 24 horas de anticipación el medio Levadura Manitol Agar (LMA) (anexo 1) acidificado y un medio Cloranfenicol-Rosa de Bengala (anexo 18), esterilizarlo y dispensarlo en placas Petri en condiciones de esterilidad.
- Pesar 10 g de suelo y realizar diluciones hasta la dilución 10^{-5} .
- Sembrar con la ayuda de una espátula de Drigralski 0,1 ml por duplicado de cada dilución en ambos medios.
- Incubar a 28°C durante 10 días. Teniendo cuidado de conservar en obscuridad el medio Rosa Bengala (Figura 28).



Figura 28. Levaduras observadas al microscopio.

10. Hongos del Suelo Simbiontes y Promotores de Crecimiento: Micorrizas (Ma) y *Trichoderma* sp.

10.1. Micorrizas Arbusculares (MA)

Las micorrizas arbusculares se encuentran asociadas a las raíces la mayoría de las plantas terrestres, tanto cultivadas como silvestres, y cierto tipo de hongos. Rivera (2003), indica que las micorrizas son microorganismos que mejoran la nutrición de la planta, aumentan la superficie de absorción de agua y la capacidad para obtener nutrientes.

10.1.1. Método para procesar muestras de raíces

Para la observación de micorrizas se realizan los siguientes pasos (Sánchez *et al.*, 2009):

Protocolo 16:

- Lavar las muestras de raíz con agua de grifo.
- Cortarlas y colocarlas en tubos de ensayo.
- Añadir una solución de KOH al 10% hasta cubrir todas las raíces.
- Calentarlas en estufa a 90°C durante 10 minutos.
- Lavar con bastante agua de grifo.
- Adicionar la solución de tinta al 5% en vinagre a las raíces en los tubos de ensayo, nuevamente teniendo cuidado de cubrir toda la superficie de las raíces.
- Llevar a baño María a 90°C por espacio de 15 minutos.
- Reposar por el lapso de 20 minutos.
- Lavar con abundante agua de grifo.
- Cortar las raíces más finas en segmentos de aproximadamente un centímetro de longitud
- Colocar 20 segmentos sobre un portaobjeto con una gota de agua y cubrir con otra placa de vidrio (Figura 29-30).
- Observar al estereoscopio con el objetivo 40X, hacer las lecturas dividiendo los segmentos de un centímetro en tres en sentido horizontal (Figura 31).



Figura 30. Raíces teñidas para la diferenciación de micelio interno de micorrizas.

Figura 29. Montaje de raíces teñidas para cuantificar la colonización por hifas de micorrizas.

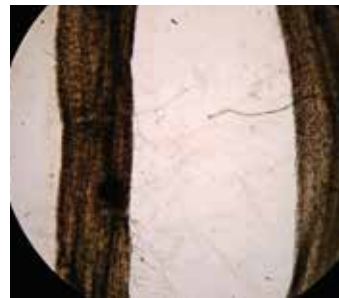
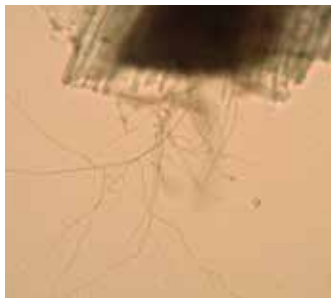


Figura 31. Micelio externo de micorrizas asociadas a la raíz.

La determinación de la frecuencia de colonización de las micorrizas (MA) se realiza con la siguiente fórmula:

$$\%FMA = \frac{\text{Número de segmentos colonizados}}{\text{Número de segmentos totales observados}} \times 100$$

Donde: %FMA = Frecuencia de Micorrizas Arbusculares.

10.1.2. Método para la extracción de esporas del suelo (Sánchez *et al.*, 2009).

Protocolo 17:

- Pesar 20 g de suelo en duplicado.
- Pasar por un tamiz de 2 mm.
- Dejar secar una de las muestras de suelo por 48 horas en una mufla con el fin de estimar la humedad del suelo.

- La otra muestra, lavar con abundante agua de grifo con la ayuda de tamices superpuestos, de 450 μm , 120 μm y 40 μm (Figura 32).
- Con ayuda de una piseta, recoger cuidadosamente el material que queda sobre el tamiz de 40 μm , en tubos Falcon para centrífuga de 50 ml.
- El volumen del tubo con muestra y agua no debe sobrepasar los 30 ml.
- Enrazar los tubos a 45 ml con solución de sacarosa al 70%.
- Agitar cada tubo con ayuda de una espátula de punta fina.
- Centrifugar con ángulo libre a 3200 rpm por 6 minutos. Esto para la separación en tres fases: agua - sacarosa - suelo.
- Filtrar el sobrenadante con papel filtro común y lavar cuidadosamente con una piseta.
- Colocar en una caja Petri cuadrículada.
- Realizar el conteo de esporas con la ayuda de un estereoscopio (Figura 33).



Figura 32. Aislamiento de esporas de micorrizas de muestras de suelo.



Figura 33. Esporas vistas con la ayuda de un estereoscopio (10x).

Normalmente el conteo se expresa en número de esporas de HMA/100 gramos de suelo seco (Sieverding, 1984). La fórmula que se emplea es la siguiente:

$$\text{Número de esporas} = \frac{\text{Esporas contadas}}{\text{Peso muestra} \div f} \times 100$$

Donde Peso muestra = peso de la muestra de donde se extrajeron las esporas;

P_i = Peso inicial de la muestra usada para determinar humedad;

P_f = Peso final de la muestra usada para determinar humedad.

10.2. *Trichoderma* sp.

Trichoderma es un hongo promotor de crecimiento de plantas y antagonista de patógenos de suelo, actúa como organismo benéfico, impidiendo el desarrollo de hongos que causan enfermedades en las plantas. Este hongo anaerobio se encuentra naturalmente en el suelo y se caracteriza por no tener un estado sexual determinado. Generalmente se ubica en sitios que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, como residuos de cultivos. Su importancia radica principalmente en que ataca, parasita y desplaza hongos patogénicos que producen enfermedades en las plantas (Moore, 1996).

10.2.1. Aislamiento de *Trichoderma* sp. con trampas de arroz

El protocolo utilizado es el propuesto por Pérez Consuegra (2004).

Protocolo 18:

- Colectar suelos de diferentes localidades (1 kg por muestra).
- Desinfectar el arroz común con hipoclorito al 1,5% dejándolo remojar por una hora.
- Enjuagar con abundante agua de grifo. Escurrir y embolsar el arroz.
- autoclavar por 30 minutos.
- Para su conservación refrigerar a 4°C.
- Autoclavar/esterilizar envases de plástico con tapas cortadas, para poder colocar una gasa y hacer de estos envases la trampa para *Trichoderma* sp. (Figura 34).
- En condiciones de esterilidad en Cámara de Flujo vaciar el arroz en los envases trampa.
- Colocar las muestras de suelo en bolsas plásticas y éstas a su vez en bandejas (el suelo deberá estar a capacidad de campo) (Figura 35).
- A temperatura ambiente colocar las trampas con la gasa en contacto con la muestra de suelo.
- Observar diariamente para ver el desarrollo de *Trichoderma* sp. sobre la gasa.



Figura 34. Trampas con arroz estéril para la captura de *Trichoderma*.



Figura 35. Trampas para capturar *Trichoderma* de muestra de suelo.

- Seleccionar las colonias de color verde, realizar montajes y observarlos al microscopio para determinar si se trata de *Trichoderma* sp.
- Dentro una cámara de flujo laminar sembrar los aislados de *Trichoderma* sp. en medio PDA (Anexo 3) para su purificación y aislamiento.

10.2.2. Aislamiento de *Trichoderma* sp. en ambiente controlado

Protocolo 19 a):

- Desinfectar arroz común con hipoclorito al 1,5% dejándolo remojar por una hora.
- Enjuagar con abundante agua de grifo. Escurrir y embolsar el arroz.
- Autoclavar por 30 minutos.
- Para su conservación refrigerar a 4°C.
- Autoclavar/esterilizar envases de plástico 17x17 cm con tapas herméticas.
- En condiciones de esterilidad en cámara de flujo colocar una capa de sustrato en la base de los envases, sobre éste colocar la gasa estéril y una capa de arroz estéril.
- Incubar a 27°C.
- Observar diariamente para ver el desarrollo de *Trichoderma* sp. sobre la gasa.
- Seleccionar las colonias de color verde montar al microscopio para determinar si es *Trichoderma* sp.
- Dentro una cámara de flujo laminar sembrar los aislados de *Trichoderma* sp. en medio PDA para su purificación y aislamiento.
- Incubar a 27°C.
- Las cepas puras conservarlas en tubos con PDA (Anexo 3) inclinado a 4°C.

Protocolo 19 b):

- Desinfectar arroz común con hipoclorito al 1,5% dejándolo remojar por una hora.
- Enjuagar con abundante agua de grifo. Escurrir y embolsar el arroz.
- Autoclavar por 30 minutos.
- Para su conservación refrigerar a 4°C.
- Autoclavar/esterilizar envases de plástico 17x17 cm con tapas herméticas.
- Escoger de cada una de las muestras la mayor cantidad de raíces posible.
- Lavarlas con agua de grifo.
- En cámara de flujo laminar esterilizarlas con alcohol al 70% por 1 min.

- En vasos de precipitado estériles colocar las raíces y desinfectarlas con hipoclorito de sodio al 1,3% por 15 min en agitación.
- Enjuagar las raíces con agua destilada estéril hasta que pierda el olor a hipoclorito.
- Vaciar el arroz en los envases de plástico y sobre éste disponer las raíces desinfectadas con la ayuda de una pinza estéril (Figura 36).
- Incubar a 27°C de 5 a 7 días haciendo observaciones diarias.
- Seleccionar las colonias de color verde montar al microscopio para determinar si se trata de *Trichoderma* sp. (Figura 37).
- Dentro una cámara de flujo laminar sembrar los aislados de *Trichoderma* sp. en medio PDA para su purificación y aislamiento (Figura 38).
- Incubar a 27°C.
- Las cepas puras conservarlas en tubos con PDA (Anexo 3) inclinado a 4°C.



Figura 36. Proceso de introducción de raíces desinfectas en arroz estéril dentro de los envases asépticos.

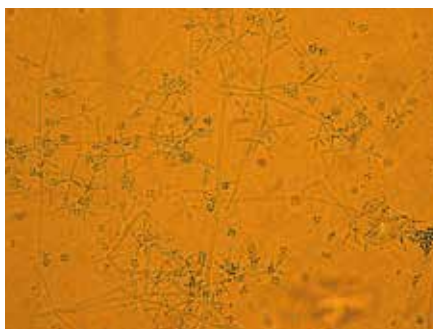


Figura 37. Estructuras de *Trichoderma* spp. visto al microscopio (100x).



Figura 38. Procedimiento de purificación de *Trichoderma* sp.

10.3. Otros hongos benéficos del suelo: *Beauveria*

Beauveria es un hongo deuteromiceto que crece de forma natural en los suelos de todo el mundo. Su poder entomopatógeno le hace capaz de parasitar a insectos de diferentes especies, causando la conocida enfermedad blanca de la muscardina. Pertenece a los hongos entomopatógenos y actualmente es utilizado como insecticida biológico o bioplaguicida controlando un gran número de parásitos de las plantas como son las orugas, las termitas, las moscas blancas, los áfidos, los escarabajos o los tisanópteros

B. bassiana es parásito facultativo, el cual posee conidias que constituyen la unidad infectiva del hongo. El proceso infectivo que lleva al insecto atacado por el hongo a morir se cumple en tres fases: 1) Fase de adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto. 2) Penetración dentro el hemocele de hifas al cuerpo del hospedero dura de 3 a 4 días. La penetración del hongo al hospedante ocurre a través de la cutícula o por vía oral. Cuando la penetración se da por la cutícula intervienen lipasas, quitinasas y proteasas. El tubo germinativo de la conidia invade directamente, produciendo apresorios que penetran la epicutícula, dando lugar a cuerpos hifales, los cuales se desarrollan en el hemocele y circulan en la hemolinfa (Castillo, 2001). 3) Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto.

10.3.1. Aislamiento de *Beauveria bassiana* de gorgojos parasitados

Material biológico

- Población del gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*).
- Muestras recolectadas en campo de insectos con síntomas de contaminación con *B. bassiana* (Figura 39).



Figura 39. Insectos parasitados por *B. bassiana*.

Protocolo 20:

- En cámara de flujo laminar y en condiciones estériles, remojar el insecto en hipoclorito de sodio al 0,5% durante 5 minutos.
- Enjuagar tres veces con agua destilada estéril.
- Colocar papel de filtro en una caja Petri y agregar agua destilada .
- Poner un porta objetos en el medio y sobre éste el insecto ya desinfectado (Figura 40).
- Incubar durante 7 días a temperatura ambiente.
- Observar el crecimiento del hongo.

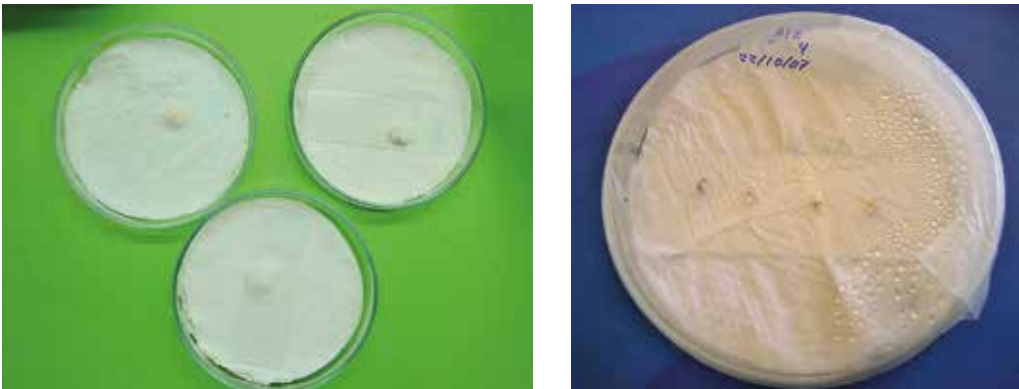


Figura 40. Cámara húmeda conteniendo insectos parasitados.

10.3.2. Siembra de aislados de *Beauveria bassiana*

Protocolo 21:

- Preparar con 24 horas de anticipación el medio PDA (Anexo 3) esterilizarlo y dispensarlo en placas Petri en condiciones de esterilidad.
- En condiciones asépticas dentro una cámara de flujo laminar, dispensar en tubos eppendorf 500 μ l de agua destilada con Tween 0,2%.
- Con una aguja de metal, tomar una pequeña cantidad del aislado y verter en el tubo de eppendorf. Para cada aislado, flamear la aguja de metal para no contaminar.
- Agitar en Vortex.
- Sembrar con 100 μ l de solución con la ayuda de una espátula de Drigalski.
- Cerrar y sellar la caja Petri con parafilm.
- Identificar.
- Incubar a 20°C por espacio de una semana.

10.3.3. Purificación de los aislados de *Beauveria* sp.

Protocolo 22:

- Después de cinco días revisar los aislados sembrados. Descartar los que no se activan y purificar los activados (Figura 42).
- Preparar con 24 horas de anticipación el medio PDA (Anexo 3), esterilizarlo y dispensarlo en placas Petri en condiciones de esterilidad.
- En condiciones de asepsia dentro una cámara de flujo laminar purificar los aislados. Existen dos métodos para hacerlo según la disposición del aislado en la placa Petri. El primero, consiste en raspar con mucho cuidado las hifas con un asa, pasándolas directamente en cajas Petri con PDA. El segundo, consiste en cortar pedacitos de hongo con la ayuda de un bisturí y pasarlos luego a un nuevo medio.
- Este procedimiento se realiza cada 3-5 días, en 6 oportunidades hasta la completa purificación del hongo (Figura 41).



Figura 41. (A) Aislamiento de *Beauveria* (B) *Beauveria* purificada.

10.3.4. Técnica para la identificación de *Beauveria bassiana*

Para el estudio de los hongos entomopatógenos necesariamente se debe realizar una correcta identificación de la especie con la que se está trabajando.

Esta caracterización se basa en la descripción de la colonia (macroscópica) así como de las estructuras del hongo (microscópica).

Protocolo 23:

- Contar con el hongo purificado libre de todo contaminante.
- En un porta objetos colocar una gota de azul de algodón.
- Tocar levemente la superficie de una colonia en desarrollo con una cinta adhesiva transparente y pegarla sobre la gota de 'azul de algodón'.

- Observar al microscopio.
- Clasificar de acuerdo a las características morfológicas con la ayuda de descriptores disponibles en la literatura científica.

10.3.5. Multiplicación masiva de *Beauveria bassiana*

Protocolo 24:

- Remojar arroz en agua con hipoclorito de sodio al 1,5% durante 1½ horas.
- Dispensar en bolsas de polipropileno.
- Autoclavar por 15 min a 121°C.
- Sembrar el hongo cortando 3 porciones de 0,5 cm del aislado en medio sólido, dispersar mecánicamente realizando una buena mezcla.
- Incubar a 20°C por una semana (Figura 42).



Figura 42. Desarrollo del hongo sobre arroz.

11 Bacterias del Suelo: Simbiontes y Promotoras de Crecimiento

11.1. Rizobias

La fijación biológica de Nitrógeno es la conversión enzimática de Nitrógeno gaseoso a Amonio (NH_4); es una característica exclusiva de procariontes y se encuentra distribuida en muchos géneros de bacterias (Young, 1992). Además de las bacterias fijadoras de Nitrógeno en vida libre, existen bacterias del suelo que se asocian a plantas, en particular, un grupo de éstas (de los géneros *Rhizobium* y otros relacionados) se asocian a leguminosas (Martínez & Hernández, 1999).

Protocolo 25:

- Preparar con 24 horas de anticipación el medio de cultivo agar levadura manitol agar con rojo congo (LMA-RC) (Anexo 1) esterilizar y dispensar en placas Petri en condiciones de esterilidad.
- Seleccionar raíces que contengan nódulos de buen tamaño (mayores a 3 mm) teniendo cuidado de descartar los tejidos oscuro o necrosados (Figura 43).
- Lavar las raíces con agua de grifo para eliminar toda la tierra posible.
- Dentro una cámara de flujo laminar desinfectar los nódulos con alcohol al 70% por 1 minuto en un recipiente estéril (Figura 44).



Figura 43. Rizobias en raíces.



Figura 44. Aislamiento de rizobias a partir de nódulos radiculares.

- Pasar los nódulos a otro recipiente estéril con hipoclorito de sodio al 1,3%
- Agitar por 15 min.
- Enjuagar los nódulos con agua destilada estéril hasta que se pierda el olor a hipoclorito más o menos 6 veces.
- Disponer los nódulos en placas Petri estériles y agregar una gota de agua destilada estéril a cada uno.
- Con una bagueta (una por cada nódulo) proceder a la maceración del nódulo.
- Sembrar el macerado en placas Petri con medio LMA-RC por estrías paralelas.
- Incubar las placas a 28°C por 3 - 10 días (Según sea *Rhizobium* sp. o *Bradyrhizobium* sp.).
- Realizar un seguimiento a las placas para elegir las colonias de las posibles rizobias. Las placas elegidas deberán ser re-aisladas 2 a 3 veces en placas Petri para luego, cuando éstas presenten un crecimiento homogéneo, almacenarlas en tubos de ensayo con medio LMA.

11.2. *Bacillus* sp.

Bacillus es un género de bacterias Gram positivas en forma de bastón. El género *Bacillus* pertenece a la División Firmicutes. Son aerobios estrictos o anaerobios facultativos. En condiciones estresantes forman una endospora de situación central, que no deforma la estructura de la célula a diferencia de las endoesporas clostridiales. Dicha forma esporulada es resistente a las temperaturas altas.

Para este ensayo se aplica la metodología APHA (1975) y Merck (1994).

Protocolo 26:

- Preparar con 24 horas de anticipación el medio Agar Glucosa Triptona Extracto de carne (TGE) (Anexo 7), esterilizar y dispensar en placas Petri dentro una cámara de flujo laminar.
- Pesar 10 g de suelo.
- Por las características que presenta el género *Bacillus* la manera más práctica de realizar el aislamiento de éstos es hacer un tratamiento térmico que consiste en calentar la dilución (10^{-1}) por 15 minutos en baño María a 80°C. Quedarán sólo las esporas bacterianas.
- Realizar diluciones hasta obtener una concentración 10^{-5} .
- Con la ayuda de una espátula Drigalski sembrar en las placas Petri 0,1 ml de las diluciones (10^{-2}) hasta (10^{-5}).

- Incubar a 28°C por 48 horas (Figura 45).
- Hacer una tinción de Gram y confirmar que sean Gram positivos. Paralelamente sembrar, por estría, hasta obtener cultivos puros.

Caracterización de la colonia de *Bacillus subtilis*

Las colonias del género *B. subtilis* se caracterizan por ser blanquecinas mucosas o secas, con bordes irregulares (Figura 45). Algunas colonias se presentan más compactas y otras más dispersas, dado que el microorganismo es mótil y pueden hallarse colonias muy invasivas. Son bacterias Gram positivas por lo que una tinción es muy útil para su identificación, se observan bastones largos y bien coloreados. Es un microorganismo que se caracteriza principalmente por la formación de endosporas que son estructuras de resistencia.

Bacillus subtilis es un microorganismo autóctono del suelo, que a diferencia de *Escherichia coli*, prospera en la naturaleza, donde se encuentra ampliamente distribuido en diversos hábitats, debido a que forma endosporas, permitiéndole un amplio rango de temperaturas, la capacidad de moverse, tener altas velocidades de crecimiento, producir enzimas hidrolíticas extracelulares y una variedad de antibióticos.

Es una de las 40 especies reconocidas del género *Bacillus*, su identificación es sencilla: forma esporas termoresistentes, es catalasa y Voges-Proskauer positivo (Anexo 14), su crecimiento en agar anaeróbico (agar nutritivo) es negativo y la hidrólisis del almidón es positiva (Slepecky y Hemphill, 1992).



Figura 45. Colonias características de *Bacillus* spp.

12. Funciones de los Microorganismos en el Suelo

12.1. Fijación de Nitrógeno en el suelo

La fijación de Nitrógeno es la utilización de N_2 (forma gaseosa) como fuente de Nitrógeno. Solamente algunos microorganismos (aeróbicos y otros anaeróbicos) tienen la capacidad de fijar Nitrógeno. Algunas bacterias fijadoras de Nitrógeno son de vida libre, es decir que no requieren una planta huésped para llevar a cabo este proceso, al contrario de las bacterias fijadoras de Nitrógeno simbióticas, que sólo pueden llevar a cabo este proceso en asociación con algunas plantas a través del proceso de simbiosis.

Entre las bacterias capaces de fijar Nitrógeno de vida libre se encuentran: *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Klebsiella*, *Bacillus polymyxa*, *Azospirillum lipoferum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, y *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Para el aislamiento de estas bacterias, se utiliza el medio de Rennie (Anexo 8). Este medio tiene la característica de contener poco Nitrógeno de manera que las bacterias que se desarrollan bajo este medio tienen la capacidad de reducir el Nitrógeno gaseoso (N_2) para producir Amonio (NH_{4+}), que después sirve para la biosíntesis de aminoácidos.

12.1.1. Determinación de bacterias fijadoras de Nitrógeno (bacterias microaerófilas)

Entre las bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre, se conocen unas que son microaerófilas, es decir, que llevan a cabo la fijación en atmósfera que no contiene más del 1-2% de oxígeno. Entre éstas, por ejemplo, se conocen *Azospirillum* y *Herbaspirillum*. Por otro lado, otras bacterias como *Azotobacter* logran fijar el Nitrógeno bajo concentraciones de oxígeno normales.

Protocolo 27:

- Colectar muestras de plantas en bolsas de polietileno. Las muestras obtenidas se transportan inmediatamente al laboratorio.
- Con 24 horas de anticipación preparar medio semisólido Rennie (Anexo 8) en viales de cultivo.

- Seleccionar las raíces de las plantas y lavar con agua de grifo para eliminar residuos de suelo.
- Dentro una cámara de flujo laminar enjuagar las raíces con agua destilada estéril y esterilizarlas con alcohol etílico al 70%.
- Enjuagar con agua destilada estéril para eliminar el alcohol.
- Cortar las raíces con un bisturí estéril en piezas pequeñas (0,5 cm).
- Colocar las raíces en los viales con el medio Rennie.
- Incubar durante 6 días a 30°C sin movimiento.
- Observar que en el medio se forma un velo y después una película (Figura 46).
- Recuperar las bacterias con una pipeta o un asa de inocular.
- Hacer diluciones seriadas.
- Sembrar por extensión en medio Rennie sólido e incubar por 48 horas a 30°C.
- Purificar de manera convencional en el mismo medio.
- Es posible que algunas bacterias fijen el Nitrógeno únicamente en medio semi-sólido, y no en medio sólido (es decir que logran fijar el Nitrógeno únicamente bajo condiciones microaerófilas). Para purificar éstas, será necesario purificar las bacterias de la película en medio de cultivo sólido general, y evaluar cada colonia individual para su capacidad de crecer en medio semi-sólido con poco o sin Nitrógeno.
- El crecimiento en medio de Rennie u otro medio deficiente en Nitrógeno no representa una prueba definitiva de la capacidad bacteriana para fijar Nitrógeno.

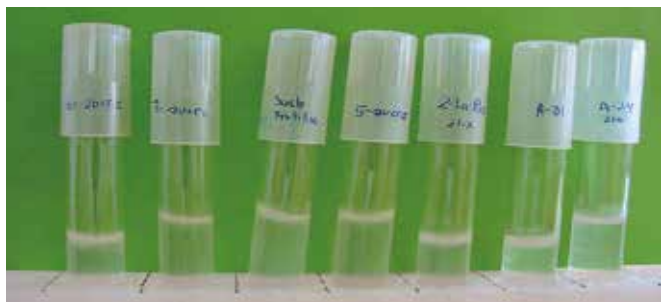


Figura 46. Medio Rennie semi-sólido con la formación del velo bacteriano.

12.1.2. Aislamiento de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre (*Azotobacter*)

Los *Azotobacter* son bacterias heterotróficas y aeróbicas que fijan Nitrógeno en forma libre. Son muy comunes en el agua, el suelo y la superficie de las plantas, tanto de sus

partes aéreas como de sus raíces. Los *Azotobacter* son bacterias Gram negativas, con sensibilidad a pH ácidos, alto contenido de sales y temperaturas superiores a 35°C. No son considerados como buenos competidores para la utilización de las fuentes de carbono y otros nutrientes en los suelos. Tienen capacidad para fijar hasta 10 mg de Nitrógeno por cada g de carbohidrato utilizado.

Protocolo 28 a):

- Colocar una muestra de suelo de 30-50 g en un mortero de porcelana.
- Añadir 5 ml de una solución acuosa de glucosa al 20%.
- Añadir 0,5 g de CaCO_3 , para conseguir un pH alcalino.
- Añadir 0,12 ml de una solución acuosa de K_2HPO_4 al 10%.
- Añadir 0,12 ml de una solución acuosa de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 10%.
- Añadir agua hasta formar una pasta.
- Transferir la pasta de suelo a una caja Petri teniendo cuidado de no llegar al borde y extenderla para conseguir una superficie lisa, tapar (Figura 47).
- Incubar a 28°C durante 3-7 días.
- Observar la presencia de colonias brillantes y mucosas de *Azotobacter*.



Figura 47. Pasta de suelo con colonias de *Azotobacter* sp.

Protocolo 28 b):

Cultivo de *Azotobacter* por siembra de granos de suelo

- Preparar con 24 horas el medio Burk (Anexo 9) y dispensar en placas Petri en condiciones de asepsia.
- En cámara de flujo laminar con una espátula estéril, extraer granos de suelo al nivel de las colonias de *Azotobacter* en la pasta de suelo (Figura 48).
- Depositar los granos de suelo en la superficie del medio de Burk.
- Incubar a 28°C.



Figura 48. Colonias de *Azotobacter* sp.

- Repetir este procedimiento hasta obtener un cultivo puro.
- Realizar una Tinción de Gram y observar la morfología al microscopio para verificar la presencia de *Azotobacter* spp. de características Gram negativas.
- Una vez obtenidos los aislamientos se deben guardar en cuñas con medio mineral sin Nitrógeno (Anexo 9-1) a 4°C para su mantenimiento por un período máximo de seis meses.

12.2. Solubilización de fosfatos

El Fósforo después del Nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos. En el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas (Alexander, 1980).

Debido a la poca movilidad del Fósforo en el suelo y a su baja concentración en la solución del suelo, fertilizantes con Fósforo son aplicados a suelos agrícolas. El resultado de la acumulación de gran cantidad de Fósforo total en el suelo, es de 20-80% en forma orgánica (CIP, 2008).

Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Peix *et al.*, 2001). Por lo tanto, se considera que la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de Fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo, es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutrientes disponibles para las plantas (Illmer y Schinner, 1992).

La disponibilidad de Fósforo en el suelo depende principalmente de la actividad microbiana. La solubilización de fosfato mineral y orgánico se produce por la capacidad que presentan las PGPR (rizobacteria promotora del crecimiento vegetal) de producir fosfatasas (mineralización) o por solubilización de fosfatos inorgánicos no disponibles con ácidos orgánicos (CIP, 2008).

La metodología de solubilizadores de fosfatos se tomó en base al protocolo utilizado por Nautiyal (1999).

Protocolo 29:

- Lavar todo el material de laboratorio con una solución al 10% de HCl y después enjuagar para evitar la presencia de Fósforo soluble.
- Preparar medio de cultivo NBRIP (Anexo 10) pH 7 con 24 horas de anticipación.

- Pesar 2 g de suelo húmedo.
- En la cámara de flujo laminar colocar los 2 g de suelo en matraces estériles a los que se les agregarán 48 ml de medio de cultivo NBRIP pH 7,0 estéril. Tapar con algodón y una capucha de aluminio.
- Incubar a 28°C durante 7 días en oscuridad y en agitación a 150 rpm.
- Con un día de anterioridad preparar NBRIP Agar pH 7,0 esterilizar y cuando éste alcance una temperatura de 60°C agregar el fungicida para los hongos y el antibiótico para las bacterias.
- Dispensar en placas Petri estériles, guardar a 4°C hasta su uso.
- Luego de 7 días, realizar diluciones seriadas con solución salina al 0,85%.
- Con la ayuda de una espátula Drigalsky sembrar 0,1 μ l en condiciones de esterilidad.
- Incubar a 28°C durante 4-5 días.
- Se marcarán como positivos los microorganismos que presenten un halo transparente alrededor de la colonia lo que indica la zona de solubilización de Fósforo (Figura 49).

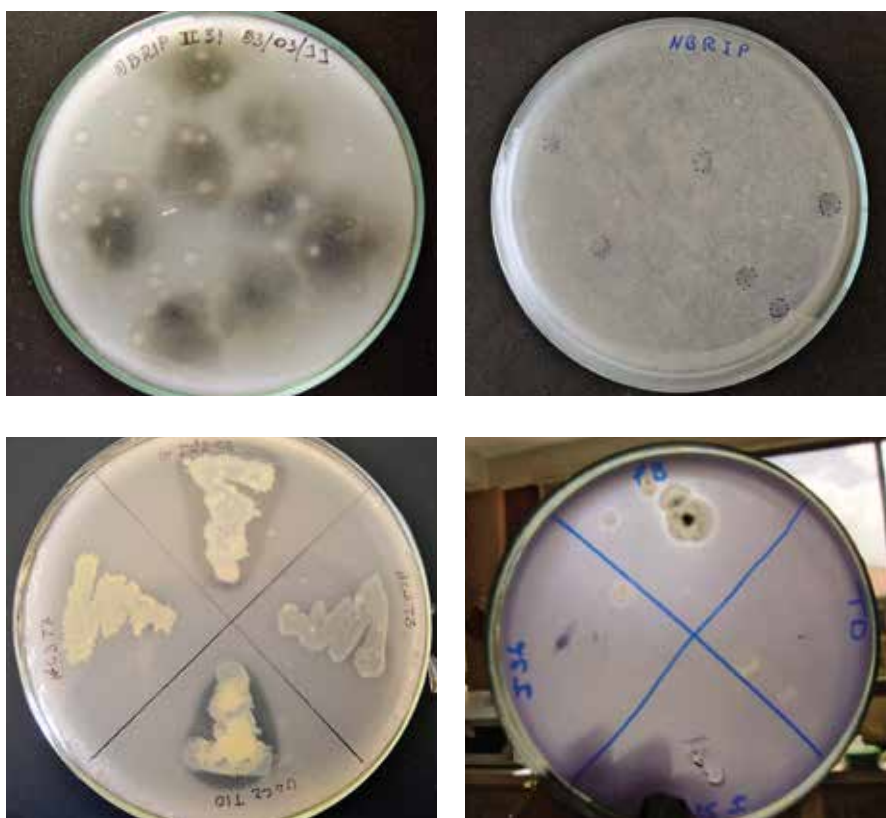


Figura 49. Microorganismos solubilizadores de Fósforo.

12.3. Reducción de nitratos

Algunos microorganismos de suelo tienen la capacidad de reducir los nitratos en nitritos o gas N_2 libre. Para determinar esta capacidad se sigue el siguiente protocolo.

Protocolo 30.

- Utilizar el medio semisólido para reducción de nitratos (APHA AWWA WPCF, 1998) (Anexo 11).
- Incubar por 48 horas y proceder a revelar añadiendo los reactivos A y B de Griess-Ilosvay en cantidades iguales (1 ml aprox.) (Anexo 12), el nitrito procedente de la reducción de células, se detecta gracias a los componentes de los reactivos utilizados que son alfa-naftol y ácido sulfanílico.
- Un cambio de color (rojo) dentro de un margen de 30 segundos, indica un resultado positivo.
- Si no cambia de color, agregar directamente al tubo una alícuota (unos 20 mg) de polvo de zinc puro, la aparición de una coloración rosada o roja confirma la negatividad de la reacción; en caso de que esto no suceda, significa que los nitratos han sido reducidos a N_2 gaseoso, es decir, se ha producido una desnitrificación (Figura 50).



Figura 50. Reducción de Nitratos a Nitritos.

13. Otras Funciones de los Microorganismos del Suelo

13.1. Hidrólisis de almidón

Los microorganismos excretan amilasas que hidrolizan polímeros hasta oligosacáridos o monosacáridos que pueden usarse como sustratos para crecer. La hidrólisis de almidón se evalúa siguiendo el protocolo siguiente.

Protocolo 31:

- Preparar medio agar almidón (FDA-BAM, 2001) (Anexo 13).
- Sembrar la bacteria e incubar por 48 horas.
- Revelar las placas con lugol o yodo sublimado que al unirse con el almidón intacto forma un complejo púrpura.
- Las cepas positivas se reconocen por la presencia de un halo transparente a su alrededor (Figura 51).



Figura 51. Hidrólisis del almidón.

13.2. Producción de CO₂ por microorganismos

El suelo desempeña un importante papel en el ciclo del Carbono y puede representar una fuente importante de CO₂ y de otros gases de efecto invernadero a la atmósfera. La cantidad total de C que contiene el suelo es dos a tres veces superior al del CO₂ atmosférico (Pérez-Batallón *et al.*, 1998). En el suelo, este gas se produce, fundamentalmente, a través del metabolismo de la microflora, microfauna y de las raíces de las plantas, siendo la descomposición microbiana de compuestos orgánicos el proceso más importante que lo genera. Durante la descomposición una parte del Carbono es devuelto a la atmósfera en forma de CO₂, mientras que otra se transforma en otros compuestos más sencillos o se almacena en las propias estructuras microbianas.

La actividad microbiana es regulada por las actividades físicas y químicas del suelo, por la composición de los materiales orgánicos y por la naturaleza de las comunidades microbianas (Alvarez-Solis, 1997).

Para un mejor aprovechamiento de las interacciones biológicas en el suelo es muy importante conocer la respuesta que presentan las poblaciones microbianas a los cambios en el uso del suelo y los factores edáficos que influyen en su actividad.

Este protocolo se realiza de acuerdo a la metodología seguida por Anderson (1982).

Protocolo 32:

- Usar recipientes con tapa hermética de 250 g de capacidad.
- Tamizar 25 g de cada muestra de suelo.
- Añadir por muestra 0,5 ml de solución de glucosa al 25%.
- Colocar en cada frasco sobre el suelo en estudio un pequeño vial conteniendo 3,5 ml de solución NaOH 1N, inmediatamente cerrar el frasco sellándolo con parafilm.
- Se deberá contar con frascos vacíos sin suelo, éstos son los blancos o testigos.
- Incubar a 28°C por 24 horas.
- Transcurrido el tiempo titular con HCl 0,25N (Figura 52).
- Para titular se deberá agregar 3,5 ml de BaCl₂ y fenoftaleína.
- Calcular con la siguiente fórmula:

$$\text{-Vol. NaOH convertido en Na}_2\text{CO}_3 \text{ (ml) = gasto HCl}_{\text{blanco}} \text{ (ml) - gasto HCl}_{\text{sistema}} \text{ (ml)}$$

$$\text{-CO}_2 \text{ (mg) = Vol. NaOH convertido en Na}_2\text{CO}_3 \text{ (ml) x N}_{\text{HCl}} \text{ x 22}$$

Donde:

-N: Normalidad del HCl



Figura 52. Evaluación de la respiración de los microorganismos de suelo.

13.3. Producción de Ácido Indol Acético (AIA)

El Ácido Indol Acético es una fitohormona que actúa a nivel de los ápices, entre sus efectos se encuentra: La inhibición del desarrollo de las yemas axiales, dando origen a un fenómeno que se conoce como dominancia apical, promueve el fototropismo positivo y estimula el desarrollo de raíces laterales y adventicias. En general, se ha

comprobado que muchas bacterias PGPR que promueven el crecimiento vegetal también producen ácido indol acético lo que nos puede indicar que el AIA es una característica importante para poder evaluar posibles bacterias PGPR.

Para esta prueba es muy importante considerar que el AIA es un metabolito secundario producido por algunas bacterias en el periodo estacionario de crecimiento, por esta razón el tiempo de incubación del caldo va a depender de la curva de crecimiento del microorganismo, se tendrá que dejar el tiempo suficiente para asegurarse que llegue a la fase estacionaria.

Para la determinación de bacterias endófitas productoras de ácido indol acético se utilizó la metodología propuesta por Naik y Sakthivel (2005), adaptada a cada tipo de microorganismo.

Protocolo 33:

- Reactivar los microorganismos a ser evaluados.
- Preparar para cada microorganismo su medio líquido específico y suplementarlo con 5mM de L-Triptofano.
- Incubar aproximadamente por 5 - 7 días a 28°C.
- Emplear controles positivos con cepas productoras de AIA y controles negativos.
- Con 24 horas de anterioridad preparar la solución Salkowski (Anexo 14).
- Tomar una alícuota de 100 μ l del caldo bacteriano respectivo y adicionar 400 μ l del reactivo de Salkowski.
- Homogenizar con cuidado.
- Incubar en oscuridad durante 30 minutos.
- Se reporta como positivo si el medio vira a tonos rojizos (Figura 53).

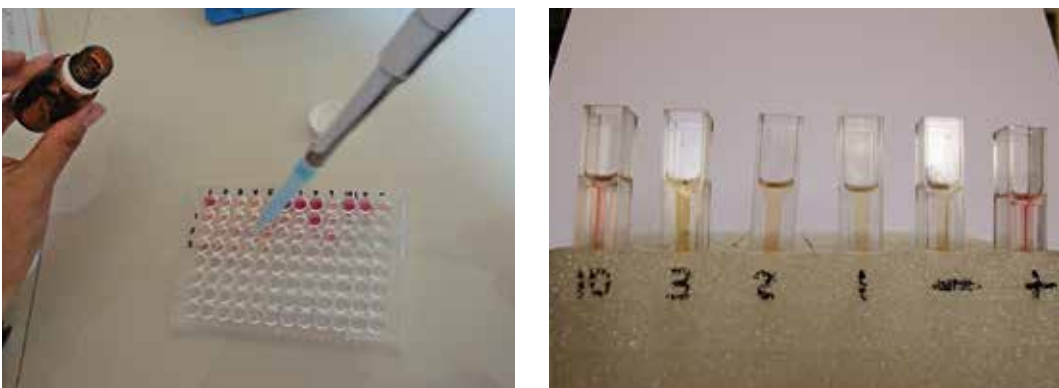


Figura 53. Revelado de AIA, en placa o en cubetas, el tono más oscuro indica mayor concentración de la fitohormona.

13.4. Prueba de Voges-Proskauer

Las especies que llevan a cabo la fermentación de butanodiol de la glucosa, acumulan acetoina en el medio. La prueba de Voges-Proskauer (Anexo 15) sirve para comprobar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoina) a partir de la fermentación (butilenglicólica) de la glucosa. Las bacterias se incuban en 1 ml de medio Voges Proskauer modificado (BAM FDA, 2001) por 48 horas después de las cuales se procede a revelar añadiendo 0,2 ml del reactivo A (hidróxido de potasio) y 0,6 ml del reactivo B (alfa naftol). Si la prueba es positiva, antes de cinco minutos aparece un color rosado-violáceo, más o menos intenso, que se inicia en la parte superior del tubo. Si la prueba es negativa no aparece ninguna coloración rojiza (Figura 54).



Figura 54. Prueba de Voges-Proskauer.

13.5. Prueba de lecitinasa

La lecitinasa es una enzima que actúa sobre la lecitina presente en la yema de huevo. Se siembra 2 microlitros de cada caldo TGE (Anexo 7) que contiene cada uno diferentes cepas a probar incubadas previamente 24 horas en agar Mossel suplementado con 10% de yema de huevo estéril por 48 horas a 28°C. Esta prueba es muy importante ya que permite diferenciar a la especie *Bacillus cereus* que es patógena para humanos e insectos. *B. cereus* es manitol negativa y por lo tanto las colonias que se observan son rojizas, adicionalmente es lecitinasa positiva, lo que da como resultado la aparición de un precipitado blanco alrededor de las colonias. Otras colonias de *Bacillus* como el *Bacillus subtilis* es manitol positiva y lecitinasa negativa, lo que le da un aspecto amarillo y sin precipitados alrededor de las colonias (Figura 55).



Figura 55. Colonias bacterianas con reacción a lecitinasa, la cepa rosada corresponde a *B. cereus*.

13.6. Fermentación y producción de gas a partir de glucosa

Se siembra las cepas en Caldo Base Rojo Fenol (Anexo 16) (BAM FDA, 2001), suplementado con 10% de glucosa, añadida por filtración al medio, también se coloca una campana de Durham para ver producción de gas, se incuba por 48 horas a 28°C. La prueba de fermentación es positiva cuando el medio vira a color amarillo (Figura 56) y para producción de gas cuando hay formación de burbujas en la campana.



Figura 56. Prueba de fermentación y producción de gas a partir de glucosa.

13.7. Crecimiento a 50°C

En placas con medio TGE (Anexo 7) se siembran las cepas en estudio y se incuban por máximo de 48 horas a 50°C, se procede a evaluar si hay o no crecimiento (Figura 57).



Figura 57. Placa con crecimiento a 50°C.

13.8. Crecimiento al 7% de NaCl

En placas con medio TGE (Anexo 7) suplementado con 7% de Cloruro de Sodio se siembran las cepas a probar, se incuban por 48 horas a 28°C, tiempo después se evalúa si hay o no crecimiento (Figura 58).



Figura 58. Colonias aisladas en agar TGE +7% de NaCl.

13.9. Prueba de crecimiento en anaerobiosis

Se siembran las cepas a probar en Caldo Tioglicolato (anexo 17) que es un medio semisólido en tubos; después de sembrar las cepas se coloca una capa de agar agua al 2% encima del medio con mucho cuidado, vertiéndolo por las paredes, para poder generar la anaerobiosis completa. Incubar por 48 horas a 28°C y evaluar si hubo crecimiento. Si el crecimiento es muy uniforme en todo el medio la prueba dará positivo (Figura 59).



Figura 59. Prueba de anaerobiosis: tubo negativo (izq.)
tubo positivo (der.).

14. La Mesofauna del Suelo

El estado de las propiedades dinámicas del suelo como contenido de materia orgánica, diversidad de organismos, o productos microbianos en un tiempo particular constituye la salud del suelo (Romig *et al.*, 1995).

La calidad debe interpretarse como la utilidad del suelo para un propósito específico en una escala amplia de tiempo (Carter, 1996).

El término calidad del suelo se empezó a utilizar al reconocer las siguientes funciones:

- 1.- Promover la productividad del sistema sin perder sus propiedades físicas, químicas y biológicas (productividad biológica sostenible).
- 2.- Atenuar contaminantes ambientales y patógenos (calidad ambiental).
- 3.- Favorecer la salud de plantas, animales y humanos (Karlen *et al.*, 1997). Al desarrollar este concepto, también se ha considerado que el suelo es el sustrato básico para las plantas; capta, retiene y emite agua; y es un filtro ambiental efectivo.

Los servicios ecosistémicos que brinda el suelo son el resultado de diversos procesos en los cuales los invertebrados juegan un rol preponderante. La fauna del suelo influye en el tipo de humus que se forma, en las propiedades físicas y químicas que adquiere el suelo, en la tasa de descomposición de la materia orgánica y en el ciclado de nutrientes. Los artrópodos se mueven a través del suelo en respuesta a cambios en un gradiente de humedad y de temperatura (Merchant & Crossley, 1970), por tal motivo estos métodos extraen sólo organismos activos y de buena movilidad.

La mesofauna está conformada por animales cuyo tamaño de cuerpo oscila entre 0,2 y 2,0 mm y cuya abundancia no puede ser evaluada con exactitud por medio de la selección manual del suelo. *Enchytraeidae*, *Acari* (ácaros), *Collembola* (colémbolos), *Protura*, *Paupoda* y otros nematodos son típicos representantes de la mesofauna.

Protocolo 34:

Se utiliza el principio de fototropismo negativo, entonces los micro artrópodos que se encuentran en el sustrato, migrarán hacia abajo escapando de la luz, para eso:

- Habilitar focos de 60 watts con embudos colectores como equipo extractor de mesofauna (Figura 60).
- Pesar 200 g de muestra de suelo.
- Preparar alcohol al 40% y dispensarlo en 30 cc por vaso, uno por muestra.
- Montar las muestras teniendo cuidado de no hacer caer tierra en los colectores.
- Colectar después de 48 horas.
- Identificar la mesofauna (nematodos, micro ácaros, colémbolas, etc.) (Figura 61) con la ayuda de un estereoscopio.
- Calcular el índice de diversidad con el índice de Shanon y Wyber:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Donde:

- S - número de especies (la riqueza de especies).
- P_i - proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos (es decir, la abundancia relativa de la especie i): $\frac{n_i}{N}$
- n_i - número de individuos de la especie i .
- N - número de todos los individuos de todas las especies.



Figura 60.
Extractor de
microfauna.



Figura 61. (A) Colémbola, (B) Ácaro y (C) Nematodo.

Referencias Bibliográficas

- Alexander, M. 1980. Transformaciones microbianas del Fósforo. (p. 355-371). En: Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor. México. 491 pp.
- Álvarez Solís J. y M. Anzueto-Martinez. 2004. Actividad microbiana del suelo bajo diferentes sistemas de producción de maíz en los altos de Chiapas, México, en <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2004/ene-feb/art-2.pdf>. Consultado 04/11/13.
- Anderson, J. 1982. Soil Respiration. En: A.L. Page, R.M. Miller y D.R. Kenney (Eds). Methods of Soil Analysis. Part II. Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. American Society of Agronomy. Number 9. Madison, Wisconsin, USA. 831-871.
- APHA, AWWA, WPCF. 1975. Standard Methods for Examination of Water and Waste Water. 14 ed. Washington DC.
- APHA, AWW, WPCF. 1998. Standard Methods for Examination of water and Waste Water. 20 ed. Washington DC.
- Arias, M. 2004. Hongos Antagonistas o micopatógenos en: Guía de insumos Biológicos para el Manejo Integrado de Plagas. Corporación para Desarrollo de Insumos y Servicios Agroecológicos Harmonia. 59-62.
- Atlas, R.M. 1984. Diversity of microbial communities. In: K.C. Marshall (ed.). Plenum Press, New York, USA. Advances in Microbial Ecology 7: 1-47.
- Bacilio-Jiménez, M., S. Aguilar-Flores, E. Ventura-Zapata, E. Pérez-Campos, E. Bouquelet y E. Zenteno. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. Plant and Soil 249: 271-277.
- Barea, J.M., M.J. Pozo, R. Azcón y C. Azcón-Aguilar. 2005. Microbial cooperation in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 56(417): 1761-1778.
- Benzing, A. 2001. Agricultura orgánica: fundamentos para la región andina. Editorial Neckar-Verlag, Alemania. 628 pp.
- Butt, T. M.; Goettel, M. S.; B. Papierok. 1999. Directory of specialists involved in the development of fungi as biocontrol agents. Colin Butt Design & Print, Warley, West Midlands.
- Caesar-TonThat, T.C., A.J. Caesar, J.F. Gaskin, U.M. Sainju y W.J. Busscher. 2007. Taxonomic diversity of predominant culturable bacteria associated with microaggregates from two different agroecosystems and their ability to aggregate soil in vitro. Applied Soil Ecology 36(1): 10-21.
- Carter, T.R. 1996. Assessing climate change adaptations: the IPCC guidelines. In: Adapting to Climate Change: An International Perspective [Smith, J., N. Bhatti, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1988. The legume-Rhizobium symbiosis: Evaluation, selection and agronomic management. Cali. United Nations Development Programme (UNDP). 172 pp.

- CIP (Centro Internacional de la Papa). 2008. Protocolos de trabajo con bacterias PGPR. Lima Perú. 47-50.
- Castillo, J. E., 2001. Evaluación agroeconómica de insecticidas para el control de insectos plaga del suelo (*Scaptocoris talpa* (Hemíptera: Cydnidae) y *Agriotes* spp; *Conoderus* spp. (Coleóptero: Elateridae)) en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*); Concepción, Escuintla, Guatemala. Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Dobbelaere, S., J. Vanderleyden y Y. Okon. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22(2): 107-149.
- Elliott μ L, E.A. Des Jardin. 1999. Comparison of media and diluents for enumeration of aerobic bacteria from Bermuda grass golf course putting greens. *Journal of Microbiological Methods* 34:193-202.
- Halder, A K & PK Chakrabarty. 1993. Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.* 38:325-330.
- Harrison, MJ. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 2005, 59:19-42.
- Hirsch CF, D.L. Christensen. 1983. Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 46:925-929.
- Illmer, P & F Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24:389-395.
- Karlen, D.L., Mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F., G.E. Schuman. 1997. Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation. *Soil Science Society of America Journal* 61, 4 – 10.
- Kloepper, J. y Ch. Beauchamp. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 38: 1219-1232.
- Lucy, M., E. Reed y B. R. Glick. 2004. Applications of free living growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86(1): 1-25.
- Madigan MT, Martinko JM, J. Parker. 2004. *Brock Biología de los microorganismos*, 10 ed. Pearson Educación, Madrid.
- Magurran, A. E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey, 179 pp. Merck, 1994. *Manual de Medios de Cultivo*. E. Merck, Darmstadt, Alemania. 364 pp.
- Martínez, E. & G. Hernández. (Eds.) 1999. *Highlights of Nitrogen Fixation Research*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, E.U.A.
- Merck N. 1994. *Manual de Medios de Cultivo*. E. Merck, Darmstadt, Alemania. Acumedia. Rose Bengal chloramphenicol Agar. 364 pp.
- Moore, E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. Fourth edition. Prentice Hall. New Jersey. 574 pp.
- Naik, P. R. and N. Sakthivel. 2006. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Research in Microbiology* 157: 538-546.
- Nautiyal, C.S. 1999. A method for selection and characterization of rhizosphere-competent bacteria of chickpea. *Curr. Microbiol.* 34, 12–17.

- Olembo, R. 1991. Importance of microorganisms and invertebrates as components of biodiversity. In: D.L. Hawksworth (ed.). The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agriculture. Redwood Press, Melksham, UK. 7-15
- Peix, A; AA Rivas-Boyer; PF Mateos; C Rodríguez-Barrueco; E Martínez-Molina & E Velazquez. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. Soil Biol. Biochem. 33:103-110.
- Pérez Consuegra, N. 2004. Manejo Ecológico de Plagas. Editorial MINREX. La Habana, Cuba.
- P. Pérez-Batallón, G. Ouro, A. Merino y F. Macías. 1998. Descomposición de materia orgánica, biomasa microbiana y emisión de CO₂ en un suelo forestal bajo diferentes manejos selvícolas.
- Quispel, A. 1992. A search for signals in endophytic microorganisms, p. 471-491. In Verma, D. P. S. (ed.), Molecular signals in plant-microbe communications, CRC press. Boca Raton.
- Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends Microbiol. 6:139-144.
- Reyes, I., A. Valery y Z. Valdúz. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. Plant and Soil 287(1-2): 69-75.
- Slepecky RA, H.E. Hemphill. 1992. The Genus Bacillus-Nonmedical Cap. Pag. En The Prokaryotes 2a. Edición. Ed. Dworkin M, Schleifer KH y Stackebrandt, Springer Verlag, New York, EUA.
- S. Q. I. 1996. Indicators for Soil Quality Evaluation. Natural Resources Conservation, Service. Soil Quality Institute. Agricultural Research Service, U.S.D.A., Auburn (Alabama).
- Strobel, G. A., and D. M. Long. 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. ASM News 64:263-268.
- Sturz A. V., Christie B. R. and Nowak, J. 2000. Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production Critical Reviews in Plant Sciences Prince Edward Island- Canada. 19(1):1-30.
- Tate III, R.L. 1995. Soil microbiology. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Tortora, G., Funke, B & C. Case. 2007. Introducción a la microbiología (9 Ed). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Vessey, K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255: 571-586.
- Waver, R.W., S. Angle, P. Bottoqueley, D., S. Smith, A. Tabatabai, A. Wollum. 1994. Microbiological and biochemical properties. Ed: Soil Science Society of America. En: Methods of soil analysis Part II. SSSA, USA. 1-14
- Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: Stacey, Burns, y Evans (Eds.). Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall, New York, U.S.A. 43-86

Anexos

ANEXO 1. LEVADURA-MANITOL-AGAR (LMA)

Manitol	10,00 g
Extracto de levadura	0,50 g
K ₂ HPO ₄	0,50 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,10 g
NaCl	0,20 g
Agar	15,00 g
Agua destilada	1000 ml
Colorantes*	
pH	6.8

*Colorantes:

Rojo congo al 0,0025 %	10 µl/l de LMA
Azul de Bromotimol 0,5% en alcohol al 70%	5 µl/l de LMA

ANEXO 2. TRIPTEINA SOYA AGAR (TSA)

Trypteina Soya Agar	40 g/l
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar a 121° C y 15 lb de presión, durante 15 min.

ANEXO 3. PAPA DEXTROSA AGAR (PDA)

Papa Dextrosa Agar	39 g/l
Agua destilada	1000 ml
pH	5,6 +/- 0,1

Esterilizar a 121° C y 15 lb de presión, durante 15 min.

ANEXO 4. MEDIO PLATE COUNT PARA BACTERIAS

Triptona	5,0 g
Extracto de carne	2,5 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7,0

Esterilizar a 121° C y 15 lb de presión durante 15 min.

ANEXO 5. TSN AGAR (TRIPTONA SULFITO NEOMICINA AGAR)

Peptona de caseína	15,0 g
Extracto de Levadura	10,0 g
Sulfito sódico	1,0 g
Citrato de Hierro III	0,5 g
Polimixina B sulfato	0,02 g
Neomicina Sulfato	0,05 g
Agar	13,5 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7,2 ± 0,2

Esterilizar en autoclave (121°C x 10 min) verter en placas.

ANEXO 6. MEDIO GLICERINA - ASPARAGINATO DE CONN

Glicerol	10 ml
Asparaginato de sodio	1 g
Dipotasio de fosfato	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7,0

Autoclavar durante 20 min a 121°C

Nota: Para inhibir el crecimiento de hongos, después del autoclavado se añade 50 mg/l de cicloheximida esterilizada por filtración.

ANEXO 7. MEDIO GLUCOSA TRIPTONA EXTRACTO DE CARNE (TGE)

Triptona	5,0 g
Extracto de carne	3,0 g
D-Glucosa	1,0 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7,0 +/- 0,1

Esterilizar a 121° C y 15 lb durante 15 min.

ANEXO 8. MEDIO DE RENNIE

Solución I

Dipotasio de fosfato	0,9 g
Monopotasio de fosfato	0,22 g
Cloruro de Sodio	0,11 g
Na ₂ Fe EDTA	0,031 g
Molibdato de Sodio	0,027 g
Extracto de levadura	0,11 g
Manitol	5,55 g
Sacarosa	5,55 g
Lactato de Sodio	0,55 g
Agua destilada	1000 ml

Solución II

Sulfato de Magnesio	1 ml
Cloruro de Calcio	0,3 ml
Agua destilada	500 ml

Solución stock de biotina y ácido para-amino benzoico

Biotina	1 mg
Ácido para amino benzoico	2 mg
Agua destilada	1000 ml

Nota: Esterilizar en autoclave (20 min a 121°C) ambas soluciones por separado, enfriar y mezclar.

Adicionar biotina (5 $\mu\text{g/l}$) y ácido para amino benzoico (PABA) (10 $\mu\text{g/l}$).

Para preparar el medio sólido. Agregar 15 g de Agar en 900 ml de solución I. Para preparar medio semi sólido, adicionar 1,8 g de Agar a 900 ml de la solución I.

ANEXO 9. MEDIO DE BURK

Solución A

Glucosa	20 g
Cloruro de sodio	0,4 g
Sulfato de magnesio	0,4 g
Sulfato de calcio	0,1 g
Molibdato de sodio	0,02 g
Sulfato ferroso	0,006 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Solución B Tampón de fosfato, 0,005M (pH7,1)

Dipotasio de fosfato	1,28 g
Monopotasio de fosfato	0,32 g
Agua destilada	1000 ml

Autoclavar las soluciones A y B por separado durante 20 min a 121°C , enfriar a 45°C y mezclar.

ANEXO 9. MEDIO MINERAL SIN NITRÓGENO

K_2HPO_4	0,655 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,02 g
$CaCl_2$	0,01 g
Cl_3Fe (0,1% en solución)	3,4 g
$NaMoO_4(H_2O)$	0,0108 g
KH_2PO_4	0,15 g
Manitol	10 g
Agar	15,0 g
Sacarosa	10 g
Azul de Bromotimol (sol. al 5% en etanol 70 %)	5 ml
Agua destilada	1000 ml
pH	7,0

Esterilizar a 121° C y 15 lb de presión durante 15 min.

ANEXO 10. NATIONAL BOTANICAL RESEARCH INSTITUTE'S PHOSPHATE GROWTH MEDIUM (NBRIP):

Glucosa	10,0 g
$Ca_3(PO_4)_2$	5,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
KCl	0,2 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua Destilada	1000 ml
pH	7,0

Esterilizar a 121° C y 15 lb durante 15 min.

ANEXO 11. MEDIO NITRATO-MOTILIDAD

Extracto de Carne	3,0 g
Fosfato Disodio	2,5 g
Agar	3,0 g
Extracto de Carne	3,0 g
Fosfato Disodio	2,5 g
Agar	3,0 g
Extracto de Carne	3,0 g
Fosfato Disodio	2,5 g
Agar	3,0 g
Extracto de Carne	3,0 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7,4

Esterilizar a 121° C y 15 lb de presión durante 15 min.

ANEXO 12. REACTIVOS PARA REDUCCIÓN DE NITRATOS

Solución A:

Ácido Sulfanílico	2,0 g
Ácido Acético Glacial	60,0 ml
Agua destilada	150,0 ml

Solución B:

α - Naphtol	1,0 g
Alcohol Absoluto	200 ml

Añadir 0,2 ml de Solución A seguido por 0,2 ml de Solución B a un cultivo de 24 o 48 horas. La presencia de un color anaranjado indica que la prueba es positiva. Si no aparece ningún color se debe añadir un poco de polvo de zinc, si al añadir el polvo cambia de color la reacción es negativa.

ANEXO 13. AGAR ALMIDÓN PARA PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

Extracto de carne	3 g
Almidón	10 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 ml

ANEXO 14. SOLUCIÓN DE SALKOWSKY

2% de FeCl_3 0,05M en 35% de Ácido Perclórico.

ANEXO 15. VOGES-PROSKAUER MEDIO PARA IDENTIFICAR *BACILLUS*

A.	Medio de cultivo
Proteosa de Peptona	7 g
NaCl	5 g
Dextrosa	5 g
Agua destilada	1000 ml

Dispensar el caldo 5 μl en tubos. pH 6,5+/- 0,2. Esterilizar a 121° C y 15 lb de presión durante 15 min.

B. Reactivo de VOGES-PROSKAUER

Solución 1

α - Naphtol	5 g
Alcohol absoluto	100 ml

Solución 2

Hidróxido de Potasio	40 g
Enrazar con agua destilada a	100 ml

Transferir 1 ml del cultivo de 48 horas a otro tubo y añadir 0,2 ml de la solución 2 seguidamente por 0,6 ml de la solución 1 seguir el orden. Mezclar después de añadir los reactivos. Se lee después de 30 minutos.

ANEXO 16. CALDO BASE ROJO FENOL

Proteosa de peptona	10 g
NaCl	5 g
Extracto de carne	1 g
Rojo fenol (7,2 μ l of 0,25% solución de rojo fenol)	0,018 g
Agua destilada	1000 ml
Carbohidrato*	

*Utilizar caldo base rojo fenol y añadir de 5-10% del carbohidrato (glucosa), se puede añadir antes de autoclavar o después por filtración para observar formación de gas se coloca en campana de Durham.

Esterilizar a 121° C y 15 lb de presión, durante 15 min.

ANEXO 17. CALDO TIOGLICOLATO PARA ANAEROBIOSIS

L-cistina	0,5 g
Agar (granulado)	0,75 g
NaCl	2,5 g
Dextrosa	5 g
Extracto de levadura	5 g
Triptona	15 g
Tioglicolato sódico o ácido tioglicólico	0,5 g
Resazurina, solución sódica (1:1000), fresca	1 ml
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Calentar el medio al microondas hasta que se disuelva y distribuir en tubos aproximadamente 10 ml por tubo, es un medio semisólido.

Prueba: Inocular las bacterias a probar en cada tubo y colocar agar al 2% a 45°C por las paredes del tubo para formar un tapón de agar que garantice la anaerobiosis.

Esterilizar a 121° C y 15 lb de presión, durante 15 min.

ANEXO 18. MEDIO CLORANFENICOL-ROSA DE BENGALA

Peptona	5 g
Glucosa	10 g
Dipotasio de fosfato (K_2HPO_4)	1 g
Sulfato de Magnesio ($Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$)	0,5 g
Rosa de Bengala	0,05 g
Cloranfenicol	0,05 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7,2

Primero disolver la peptona, el dipotasio de fosfato y el sulfato de magnesio. Después añadir la Rosa de Bengala y Cloranfenicol.

Autoclavar por 20 min 121°C a 15 lb de presión .

Nota: El colorante Rosa Bengala se añade para inhibir la mayoría de las bacterias, además de retardar el crecimiento de los hongos, lo que facilita la visualización de las colonias de levaduras. El Cloranfenicol es un antibiótico termoestable que también contribuye a la inhibición de las bacterias.

Este medio con pH neutro sirve para el aislamiento de levaduras y hongos de suelo. A veces puede resultar preferible utilizar un medio con pH neutro para evitar inhibir algunas clases particulares de hongos.

