



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ASPECTOS BIOQUIMICOS Y MICROBIOLOGICOS
DE UN SUELO FORESTAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ORIENTACION: BIOQUIMICO MICROBIOLOGICO

P R E S E N T A :

DIANA DOMINGUEZ DURAN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MEXICO UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

TESIS 1979

NO. M.C. 104

FECHA

REC

ASPECTOS BIQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS

INSTITUTO FORESTAL



1 1 2 1 2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

INSTITUTO FORESTAL

LIBRERÍA

	JURADO	ASIGNADO
PRESIDENTE		Prof. Alfredo Echegaray Alemán
VOCAL		Profra. Rosa Ma Ramírez Gama
SECRETARIO		Prof. Jorge Soto Soria
1er SUPLENTE		Prof. Sergio Palacios Mayorga
2do SUPLENTE		Profra. Beatriz Luna Millan

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Microbiología Experimental
Facultad de Química

SUSTENTANTE:

Diana Domínguez Durán

ASESOR:

M. en C. Alfredo Echegaray Alemán

A la Vida, que me ha dado la oportunidad
de conocerla y valorarla a través de mi
experiencia y estudio diarios, necesitan
do de personas como mi madre, hermanos,
amigos y profesores para comprenderla.

Quiero en este verso
expresar lo que siento
calma, pasión y miedo
dejando la oración
para otro momento.

INDICE

	Página.
INTRODUCCION.....	1
GENERALIDADES.....	3
MATERIAL Y METODOS	21
RESULTADOS Y DISCUSION.....	50
CONCLUSIONES.....	65
BIBLIOGRAFIA.....	67

I N T R O D U C C I O N

El presente trabajo se refiere a un estudio sobre actividad bioquímica y microbiológica de un suelo forestal procedente del Desierto de los Leones ubicado en el Distrito Federal.

Las referencias bibliográficas que se tienen sobre estas características de suelos forestales proceden de diferentes países, no existiendo datos de estas propiedades en suelos de México, esto señala la necesidad de efectuar estos estudios, ya que de un suelo a otro sus características cambian debido a las condiciones fisicoquímicas y biológicas que prevalecen.

El análisis de actividad bioquímica tiene como fundamento la cuantificación de enzimas exógenas, y de microorganismos con actividad enzimática específica, obteniendo con esto un panorama general del proceso de degradación del material orgánico vegetal caído al suelo.

Desde el punto de vista ecológico del suelo el papel principal de la microflora y fauna del suelo es el de funcionar como transformadores a través de reacciones de oxidación-reducción. Los productores autótrofos y los consumidores heterótrofos devuelven al suelo sus productos metabólicos y sus cuerpos en forma de materia orgánica muerta. La microflora del suelo que oxida o reduce esta materia orgánica libera nutrientes y coproductos orgánicos como el Humus que son utilizados por las plantas y por una enorme variedad de animales saprófagos y carnívoros.

Este proceso incluye también la mineralización de elementos como el nitrógeno, las actividades simbióticas de la microflora y en cuanto a la fauna la fragmentación mecánica de los residuos vegetales, su mezclado, la formación de agregados etc. Todos estos procesos se combinan para mantener la fertilidad del suelo. Las comunidades de la microflora y fauna del suelo son estructuralmente y funcionalmente muy complejas.

Este trabajo comprende a una pequeña zona del suelo forestal mexicano y uno de sus propósitos es el de iniciar su estudio, para contribuir al conocimiento de su fertilidad y así saber como actuar en el mejoramiento y conservación de los suelos forestales, esto último como una prevención a un futuro desequilibrio ecológico ya sea en forma natural o por la presencia del hombre en estos suelos.

I GENERALIDADES

La presencia de enzimas extracelulares en el suelo se debe a - el rompimiento y muerte de las células microbianas o a la secreción - de enzimas por células vivas, ya sean microbianas o vegetales, estas - últimas procedentes de residuos de plantas o de las raíces, así como - también de animales del suelo. Para el estudio de la actividad de - las enzimas en el suelo varios investigadores establecieron que el - suelo puede ser considerado como una entidad biológica o tejido (101). Sin embargo las enzimas no han podido ser aisladas de este "tejido es- - pecial" con facilidad como sucede en los tejidos vivos y esto se debe a que las enzimas tienden a unirse fuertemente a la arcilla y constitu- - yentes húmicos. Para distinguir con certeza la actividad catalítica - debida a material inorgánico de la actividad catalítica intracelular, se han usado inhibidores que detengan la actividad microbiana y no da- - ñen a las enzimas extracelulares, sin cambiar las propiedades físicas y químicas del suelo. A la fecha no se ha encontrado un inhibidor - ideal, el más usado es el tolueno, pero con esta substancia se presen- - ta cierta actividad microbiana después de un cierto tiempo de incuba- - ción, otra forma de eliminar la actividad microbiana es por radiacio- - nes de alta energía.

Se ha tratado de encontrar una relación entre la actividad en- - zimática y número de microorganismos en el suelo o con el tipo de - planta, pero su interpretación ha sido difícil ya que el suelo es un - complejo de factores que interaccionan para dar las características - del suelo. Aunque se ha logrado relacionar en forma general ciertos - factores, por ejemplo la cantidad de enzimas en la rizosfera es diferen- - te del suelo distante de la rizosfera. Todos los microorganismos pro- - ducen enzimas extracelulares, la mayoría de estas enzimas rompen molé- -

culas de alto peso molecular. Al estudiar Aspergillus oryzae (16) se ha visto que las enzimas son liberadas con cierta secuencia, primero las carbohidrasas y fosfatasa luego proteasas y esterases y finalmente catalasas, unas son liberadas en la fase inicial del crecimiento y otras en la fase estacionaria o en la fase de declinación. Phaff - (75) determinó que las amilasas, celulasas, pectinasas son liberadas por bacterias y hongos. Se observó que las fosfatasa alcalinas son excretadas por Bacillus subtilis bajo ciertas condiciones (11). Por otro lado Jacquet (49) estableció que un gran número de bacterias liberan fosfatasa.

Daragan, Suschova y Katznelson (18) relacionaron diferentes actividades de las enzimas de los microorganismos. Geller y Dobrotovorskaya (26) sugirieron que la acumulación de fosfatasa es debida a la actividad de microorganismos. Kiss y Peterfi (34) concluyeron que la alfa glucosidasa, betagalactosidasa, amilasa e inulasa son producidas por microorganismos, pero la invertasa es liberada por plantas. Hofmann y colaboradores (40) señalan que las enzimas extracelulares o libres provienen exclusivamente de microorganismos. Balicka y Trzebinski (4) establecieron que las actividades enzimáticas in vitro de los microorganismos son altamente adaptativas por el hecho de añadir substratos.

Muchos investigadores consideran que en la rizosfera existe una gran actividad enzimática, pero no saben a quien atribuirselo, si a las raíces de las plantas, microorganismos o a los residuos de plantas. Con respecto a la fauna del suelo Kiss (55) estableció que el Lumbricus terrestris contribuye a la actividad de la invertasa. Se han estudiado algunos aspectos sobre la catálisis inorgánica, como el

caso de la descomposición de peróxido de hidrógeno, hidrólisis de ésteres por intercambio de iones, hidrólisis de glicerofosfato por cerio, torio, lantano, descarboxilación de ácidos acéticos por ciclo - dextrinas (88).

Debido a que las enzimas se encuentran unidas a las partículas de arcilla es difícil aislarlas, la primera enzima que se logró aislar, fue la ureasa obtenida por Briggs y Segal en 1963 (7). Como las enzimas en el suelo se encuentran en un medio muy especial, la mayoría - de las reacciones ocurren en una interfase líquido-sólido, estos aspectos fisicoquímicos fueron estudiados recientemente (69) encontrándose características muy especiales. La mayoría de las proteínas - liberadas en suelo son rápidamente absorbidas por las partículas de arcilla ocurriendo esto a diferentes pH. Hay complejos enzimáticos - proteolíticos que son absorbidos y conservan su capacidad, hidrolizando a las proteínas absorbidas a la arcilla (88) y esto es debido a - que ningún microorganismo puede actuar, sobre una proteína adherida a las partículas.

En cuanto a la velocidad de reacción se encontró que las enzimas extracelulares de Pseudomonas y Flavobacterium hidrolizan más rápidamente que una solución de lisozima (88). Kroll y Kramer (60) no encontraron alguna influencia de la adsorción de proteínas, en la actividad de las fosfatasas, para el caso de invertasa se encontró mayor activación siempre y cuando se agregara sacarosa. Glastyan y Hubner (28,47) separadamente observaron una considerable inactivación de invertasa, amilasa, ureasa, y peroxidasa añadidas al suelo, así como - carbohidrasas. Haig (35) encontró que la localización de la actividad enzimática mayor sobre las partículas de suelo, principalmente - activada esterásica, correspondía a la fracción arcillosa.

Los análisis de enzimas extracelulares del suelo no han tenido una buena aplicación práctica, se han querido establecer índices biológicos, para así tener una referencia de la fertilidad del suelo.

Los métodos usados para medir la actividad enzimática, no reproducen con exactitud, las condiciones que prevalecen en el suelo, ya sean físicas, químicas y biológicas, como son humedad, pH, tamaño de la partícula, contenido microbiano etc... es por esto que la mayoría de los investigadores, no han encontrado una relación estable, sin embargo Hofmann (41) establece una relación entre la actividad enzimática y productividad, siendo esta relación directamente proporcional a la actividad biológica en general.

Para medir la actividad enzimática se pone el sustrato adecuado, un inhibidor de la actividad microbiana, el suelo por analizar, un amortiguador adecuado y después de un cierto tiempo de incubación, uno o más productos de la reacción o parte del sustrato remanente son medidos por métodos químicos apropiados.

Glastyan (27) hizo un estudio de cinética enzimática en el suelo, de una gran variedad de enzimas estableciendo que no hay asimilación de los productos de reacción enzimática por los microorganismos del suelo y que la autólisis de las células microbianas durante el tiempo de incubación, no incrementa la actividad enzimática, es por esto que el tolueno a pesar de que causa lisis microbiana y no es un inhibidor eficaz se usa en forma común en las técnicas para medir actividad enzimática. Beck (5) estableció que el efecto inhibitor del tolueno dependía del pretratamiento y contenido de humedad de un suelo en particular. Se considera que las bacterias gram positivas y -

Streptomyces son más resistentes al tolueno que las gram negativas, también se ha encontrado que el tolueno sirve como precursor alimenticio para ciertos microorganismos como son Pseudomonas y Achromobacter.

En este trabajo se utilizó como inhibidor el tolueno, ya que es el que menos cambia las propiedades del suelo y además el tiempo de incubación con el suelo no fue mayor de 24 hrs. para que fuera empleado como precursor de carbono en cantidad significativa. Swingle y Branson (96) establecieron que el tolueno al 0.1% es preferido como precursor de carbono microbiano en comparación con otros hidrocarburos, Hoffmann (42) indicó que el tolueno es adecuado para los propósitos de análisis enzimático. Otros inactivadores químicos son el fenol, timol, cloroformo, éter, pero tienen más inconvenientes que el tolueno. Scherrer (85) estableció que la radiación ultravioleta disminuye la actividad enzimática. Dommergues (20) estudió las radiaciones infrarojas. Quizas las radiaciones más adecuadas, son la radiación de energía ionizante, los rayos X y rayos gama. Vela (100) estudió el efecto de los rayos gama sobre los microorganismos del ciclo de nitrógeno y observó disminución de la fijación de nitrógeno, y un aumento en la actividad ureásica. En si las radiaciones esterilizan, pero cambian ligeramente las propiedades fisicoquímicas del suelo.

La actividad enzimática extracelular permanece por un determinado tiempo, es por esto que al almacenar la muestra de suelo se corre el riesgo de que baje la actividad enzimática. Diferentes investigadores han examinado la influencia del desecamiento de la muestra sobre el contenido de enzimas, Jackman y Black (50) establecen que la actividad fitásica es mayor en el suelo con su humedad natural que en

suelo secado. Geller y Dobrotovrska (25) notaron una reducción en la actividad de la fosfatasa después de secar en la muestra. Ross (81) - quién investigó la influencia del secado y refrigeración en las muestras de suelo, también encontró menos actividad en invertasa y amilasa principalmente por el secado.

Los métodos más usados para la esterilización como son vapor - sobrecalentado y altas temperaturas, son aplicados en el caso del suelo pero con mayor tiempo de exposición, es por esto que la inactivación de las enzimas requiere mayor temperatura a los 60 o 70°C se logra inactivación, pero con probabilidades de una reactivación, a los 180°C se logra la inactivación completa.

Las enzimas investigadas en este trabajo fueron 5 y son: la ureasa, fosfatasa, deshidrogenasa, amilasa y celulasa.

DESHIDROGENASAS

Estas fueron primeramente investigadas por Lenhard (62). Stevenson y Katznelson (91). Stevenson (92). Schaefer (86). Kozolov y Mikhailova (56). Kozolov (57). Hirte (39). Glastyan (29). Casida (10). Peterson (74). La determinación de la actividad deshidrogenásica en el suelo nos da una idea de la actividad biológica existente en la población microbiana y por esta razón no se usan agentes bacteriostáticos o esterilizantes ya que la deshidrogenasa libre en el suelo es rara. La prueba es generalmente llevada en condiciones anaerobicas, aunque como Casida (10) indica que el oxígeno en realidad no afecta el proceso.

No se ha diseñado una técnica para comprobar la actividad deshidrogenésica en cajas petri, pero se ha visto que al añadir metabolitos específicos el número total de microorganismos aumenta. Varios investigadores han establecido inhibidores, activadores y substratos específicos para la deshidrogenasa (88) entre los inhibidores esta el cloroformo, y como factores negativos el pH elevado de suelo salinos, como activadores la coenzima uno.

FOSFATASA

Los primeros investigadores de este tipo de enzima son Rogers (79). Skujins (87). Vlasyuk (102). Kroll (59). Overbeck y Babenzien (71). Drobnikova (21). En el caso de las fosfatasas Rotini (83) en 1932 señaló su presencia, en 1942 Rogers (79) lo demuestra y sugiere que provienen de las raíces de las plantas. Mortland y Gieseking (66) indicaron que la arcilla inhibe la actividad fosfatásica y que esta inhibición es proporcional a la capacidad de intercambio de cationes de la arcilla. En el caso de las fosfatasas su actividad puede ser medida en base a los productos obtenidos, por ejemplo si se usa como sustrato fenil fosfato se puede medir el fenol o el fosfato inorgánico, los primeros que usaron este sustrato fueron Kroll y Kramer (59) quienes midieron el fenol liberado, a continuación se describen algunos de los sustratos utilizados por diferentes investigadores.

SUBSTRATO	PRODUCTO CUANTIFICADO	INVESTIGADOR
Fenil Fosfato	Fenol	Kroll y Kramer
Fenolftaleinfosfato	Fenol	Krasilnikov y Krotelev.
Fenil Fosfato	Fosfato	Drobnikova
Glicerofosfato	Glicerol	Kiss y Peterfi
Glicerofosfato	Glicerofosfato	Skujins.

Drobnikova (21) estudió la actividad de la fosfatasa con respecto al pH, Vlasyuk (102) en lo relativo al efecto de la rizosfera.- Se han originado varias controversias sobre el pH óptimo de actividad de las fosfatasas, pero lo que sucede es que hay diferentes tipos de fosfatasas, que actúan a diferentes valores de pH en un mismo suelo.

Kelling (53) reportó una relación positiva entre la actividad fosfatásica alcalina y los niveles de nitrógeno y carbono en el suelo. La adición de fertilizantes orgánicos y minerales incrementa la actividad, en tanto que con fertilizantes que contienen fósforo disminuye, ya que la disponibilidad de fósforo es la que limita la actividad, - (88). En ciertos suelos los hongos son los que más contribuyen a esta actividad, en otros las bacterias y actinomicetos, Drobnikova (21) y Burangulova-Khazierov (9) concluyeron que la actividad de las fosfatasas depende del tipo de partículas y propiedades fisicoquímicas del suelo. Ramirez-Martínez (76) examinaron con detalle los factores involucrados, encontrando variaciones en la actividad fosfatásica debido a la manera de coleccionar y almacenar la muestra, bajo diferentes condiciones de humedad y desecamiento, y no encontraron relación entre el número microbiano y la actividad fosfatásica.

AMILASAS

Entre los investigadores que la han estudiado tenemos a Drobnikova (21). Glastyan (28). Ross (80). Hofmann y Hoffmann (43). - Overbeck y Bebensien (71). Peterson (73).

Con respecto a la actividad de las amilasas se ha observado - que hay una proporción directa con el contenido de materia orgánica y con la capacidad de intercambio catiónico (88). Se ha notado también un incremento de la actividad al añadir cloruro de sodio, siendo evidente que los suelos en general contienen más beta amilasas que alfa-amilasas (43). Para determinar su actividad es necesario medir los azúcares reductores producidos al incubar suelo y almidón soluble. - La actividad máxima de la amilasa parece estar a un pH de 5.5 a 6.0. - Se estipula que las amilasas son producidas en forma adaptativa al medio (43).

CELULASAS

Sorensen (89) y Markus (64) han estudiado este tipo de enzimas. Las celulasas tienen una vital importancia en la disponibilidad de - fuentes de carbono en el suelo. Sorensen fue el primero que sugirió la presencia de celulasas extracelulares. Por otro lado se deben utilizar los métodos más adecuados para su análisis, para ello Markus, - estableció que hay diferencias marcadas entre un suelo tratado con tolueno y uno no tratado.

UREASA.

Ha sido descrita por Rotini (83). Glastyan (28) Conrad (14).- McLaren (68). Kuprevich (61). Vasienko (99). Novogradkaya (70). - Glastyan y Tayupa (30). La actividad ureásica parece estar correlacionada con el número de microorganismos y se incrementa con la cantidad de materia orgánica, tipo de rizosfera y clase de plantas, su actividad máxima se encuentra en un pH de 6.5 a 7.0. En suelos alcalinos y ricos en carbonatos baja su actividad. Se ha visto que el tolueno incrementa su actividad ya sea por el crecimiento de microorganismos o por la lisis de los mismos.

Entre las enzimas más estudiadas según reportes de bibliografía se encuentran las Lipasas, Glucosidasas, beta fructofuranosidasas, Liasas, Fitasas, Nucleotidasas, Acetil esterases, catalasas.

Algunos de los métodos de cuantificación de microorganismos en el suelo se basan en la técnica de dilución la cual se aplica a tubos o cajas petri, conteniendo medios de cultivo específicos. Los suelos forestales generalmente tienen un alto contenido de materia orgánica que esta relacionada con el número de microorganismos encontrados, en ellos son muy abundantes bacterias, actinomicetos y hongos.

M. Goodfellow (31) encontró en este tipo de suelo, que las diferencias en cuanto al número total de bacterias no variaba significativamente de un horizonte a otro y según Gray el 15% de bacterias son capaces de producir colonias en cajas petri, lo que indica que la cuantificación de bacterias en cajas petri es incorrecta. Mary J. Cobb (13) estudio dos tipos de suelo forestal, uno con vegetación de abeto

y otro con arboles de hojas deciduas, estableciendo que en el suelo - con abeto el contenido de bacterias disminuye al aumentar la humedad - y que los actinomicetos y hongos disminuyen con menor humedad. En - cambio en el suelo de Bosque de hojas deciduas las bacterias dismi - nuyen si la humedad bajaba, en los actinomicetos no hay relación esta - ble y para los hongos, la relación es directamente proporcional. Esta investigadora también estableció que la refrigeración (no especi - ficando cuanto tiempo fue refrigerada la muestra) ocasionaba en ambos - suelos un incremento en las bacterias, disminuyendo después a un va - lor permanente, observándose que los suelos que exhiben este incremen - to son los que están sujetos a condiciones climáticas frías. Por otro lado no encontró una relación estable entre el número de microorganismos y la concentración de iones hidrógeno sin embargo Jensen (52) dice que hay una relación positiva entre el pH del suelo y el número de bacterias y actinomicetos. Cobb menciona que Bokor encontró una relación directa entre el número de bacterias y contenido de materia orgánica, siempre y cuando la concentración de iones hidrógeno permanezca constante. Cobb no estableció alguna relación del número bacteriano con la temperatura del suelo, en lo referente a la profundidad encontró menor cantidad en el subsuelo que en el suelo superior debido a diferencias físicas, química y nutricionales. Ambos suelos el de vegetación de abeto y el de hojas deciduas tienen igual contenido orgánico y más o menos el mismo contenido de humedad en la parte de subsuelo también encontró que hay un cambio más drástico en número de microorganismos y propiedades fisicoquímicas del suelo superior con vegetación de abeto a su subsuelo que en el suelo forestal de hojas deciduas a su subsuelo.

Entre los subsuelos de los dos tipos de suelo (abeto y hojas deciduas) no se encontró relación alguna entre el número bacteriano. Ciertos factores afecta de igual manera a los 4 horizontes como es la temperatura. Respecto a capacidad de campo no es la misma ya que a mayor capacidad de campo mayor contenido de materia orgánica. De los 4 horizontes estudiados el que menos exhibe paralelismo con los demás es el subsuelo forestal de hojas deciduas, esto se atribuye a la concentración de hidrógeno y no a la cantidad de humedad o a la influencia de las plantas superiores y a la capacidad de alimentación de las bacterias.

De acuerdo a S.C. Vandecaveye y H. Katznelson (98) la relación carbono nitrógeno del suelo tiene un efecto directo sobre la calidad e intensidad de actividad microbiana ya que la vegetación y tipos de microbios del suelo influyen sobre esta relación.

Como el suelo de transición de turba-podzol tiene un gran contenido de materia orgánica, podemos relacionarlo de cierta manera con el suelo forestal. En los suelos de Transición de Turba-podzol se encontraron microorganismos pectinolíticos, no encontrándose celulóliticos, observándose que la mayoría de los microorganismos necesitan extracto de levadura para su crecimiento. En la parte final de la transición hay un incremento de la capacidad de campo y el pH con disminución de hongos, también se observó en ciertos casos que los hongos disminuyen sin que haya cambio en el pH del suelo (45). Según Gray y Raylos (1935) hay predominancia de bacterias en suelos ácidos. Jensen estableció que los actinomicetos se encuentran en poca cantidad en suelos ácidos. En los suelos de transición el crecimiento de bacterias gram negativas no tuvo relación con los factores del suelo,

se encontraron *Bacillus* que no redujeron los nitratos y *Pseudomonas* - que si reducian nitratos a nitritos sin producción de gas. Al comparar el suelo de transición y un suelo de cultivo se encontró que en el - suelo de cultivo los microorganismos requieran menos extracto de levau dura y más extracto de suelo para su desarrollo. En el suelo de tranu sición las *Pseudomonas* tenían la mayor actividad proteolítica y *Bacilu* llus la actividad amilolítica.

En el estudio de los actinomicetos se ha encontrado que forman el 20 al 30% del total de microorganismos en la mayoría de los suelos.

En suelos ácidos tipo podzol y suelos neutros tipo mull, los - actinomicetos disminuyen con la profundidad menos ráu pidamente que bacu terias y hongos y son ligeramente más numerosos en los horizontes más profundos, resistiendo más la acidez del suelo. Según C.T. Croke. y F.E. Chase (15). La microflora del suelo forestal es diferente a lau de su mantillo y se asemeja a la del suelo de pradera, según Stout - (95), analizó cuatro tipos de suelos y encontró diferencias entre - ellos sugiriendo que había una relación con el contenido de materia - orgánica y propiedades específicas como es la alta salinidad, que la - dominancia de bacterias fermentadoras se relaciona con el tipo de sueu lo, no encontró relación del pH salvo en condiciones de extrema aciu dez, estableció que no hay una misma flora bacteriana en un mismo tiu po de suelo, variando en cantidad y calidad, que el origen e historia de la vegetación es decisiva en el carácter taxonómico y fisiológico-bacteriano. Las bacterias del género *Bacillus* dominan en los suelos-forestales y de pradera, según J.D. Stout y el incremento de gram neu gativos y de fermentadores aeróbicos esta asociado con un medio amu biente más favorable.

Las relaciones numéricas entre bacterias, actinomicetos y hongos es similar en la mayoría de los suelos, en el mismo horizonte hay variación cuantitativa de los microorganismos cuanto más profundo es y además diferencias en horizontes del mismo origen genético con diferente morfología Razumov y Remezov (77). MalChevkaia (63) estableció que en suelos con alto contenido orgánico, la microflora es muy variable y es difícil que exista un tipo de flora microbiana específica. - En suelos forestales en Canada, Timonin (97) encontró que en ciertos casos había mayor cantidad de actinomicetos en el horizonte B que en el horizonte A.

Se sabe que la caída del mantillo es importante para el ciclo-nutricional en los suelos forestales. Es obvio que la destrucción de sustancias orgánicas componentes de los tejidos vegetales depende del número de especies y actividad bioquímica de su microflora.

L. Steubing (90) hizo estudios sobre el número y la actividad de microorganismos en suelos boscosos, el estudio de la descomposición de la celulosa lo hizo en condiciones ambientales definidas y encontró que las celulosa metabolizada depende de la influencia ambiental, así como de la temperatura, humedad, aereación y principalmente por la presencia de otros carbohidratos, y la alta cantidad de carbohidratos y poco contenido de nitrógeno, tienen un efecto retardado en la descomposición de celulosa. También encontró que los hongos son capaces de oxidar la vanilina o ácido vanílico.

Por otro lado M. Goddfellow y D. Dawson (32) estudiaron el mantillo de un suelo forestal y no encontraron relación entre la distribución de las bacterias y los factores ambientales, además encontra-

ron bacterias resistentes, a la acidez y la presencia de estreptomycetos acidófilos y neutrofilos, estos últimos disminuyen en las capas inferiores del mantillo o sea la capa que esta en contacto con el suelo mineral.

Niah y Nasami (48) estudiaron los microorganismos de suelos forestales con diferente vegetación, encontrando características, parecidas a las reportadas por Stout, como son la predominancia de Pseudomonas en pastizales, Bacillus en suelo forestal de pino, entre las características que ellos encontraron, es que la mayoría de la microflora es resistente al cristal violeta, estos resultados sugieren que los suelos forestales con diferente vegetación pueden ser caracterizados microbiológicamente en términos de composición de microflora, contrario a lo que dice Malchevkaia (63). También establecieron que el contenido de humedad no lleva un paralelismo con la cantidad de microorganismos y que el número de bacterias en los suelos estudiados por ellos es comparable al de otros suelos forestales.

En resumen en el caso de los microorganismos de suelo forestal no se ha encontrado alguna relación directa y clara, con algún factor que nos de la clave de comportamiento de los microorganismos y el por que de su presencia, en el aspecto cuantitativo.

Por lo que respecta a las características fisicoquímicas, el suelo forestal en general presenta un pH ácido un gran contenido de materia orgánica, una textura con un alto porcentaje de arcilla, una alta capacidad de intercambio cationico y en general contiene una suficiente aereación, baja temperatura.

Con respecto a los productos metabólicos uno de los más importantes es el CO_2 resultante de la descomposición de la materia orgánica por la microflora heterotrófica del suelo y su producción ha sido utilizada como una medida de la actividad microbiana total. La velocidad y cantidad de CO_2 producido depende del número y tipos de microorganismos presentes en el suelo y de la naturaleza y cantidad de carbono oxidable agregado. Es influenciada por la temperatura, aereación y pH del suelo y su producción es una función compleja de la actividad microbiana.

II MATERIAL Y METODOS

1) MUESTREO DEL SUELO

Las muestras de suelo forestal fueron colectadas en el Desierto de los Leones ubicado en el D.F., con una vegetación de Pinus sp., Cupressus sp., Taxodium sp., Juniperus sp., y sauces del género Salix sp., El clima se caracteriza por ser templado y la temperatura media anual es aproximadamente de 11°C, siendo mayo el mes más caliente con 13°C. La precipitación pluvial anual es de 1300 mm, esta se acumula básicamente en verano (mayo a octubre inclusive). Julio es el mes más lluvioso con 250 mm y Diciembre el más seco con 8 mm. - (3). Para la colección de las muestras primero se eliminó la capa de mantillo y se procedió a tomar la muestra del horizonte mineral (horizonte A) a una profundidad de 0-20 cm y del horizonte B de 20-40 cm.- Las muestras de suelo fueron tomadas del mismo sitio en diferentes épocas del año, correspondientes a los meses de mayo y agosto de 1978 y enero de 1979. Dichas muestras fueron colectadas en bolsas de plástico y guardadas en refrigeración a 4°C. Para el análisis enzimático y determinación de humedad, el suelo fue procesado a las 24 hrs. de haber sido tomada la muestra, procediéndose a tamizar con la humedad natural a través de un tamiz del número 20. Para la determinación de las características Microbiológicas el suelo fue tamizado y guardado en refrigeración procesandose en el lapso de 3 semanas. En el caso de las propiedades Fisicoquímicas (excepto la humedad), el suelo fue secado a temperatura ambiente y después tamizado.

2) REACTIVOS

2.1.- Ureasas 2.1.1.- Solución amortiguadora de Ac. cítrico citrato -

de potasio con pH 6.7.

Ac. cítrico monohidratado	3.469 gr
Citrato de potasio	27.450 gr
Agua destilada cbp	100 ml

2.1.2.- Solución de NaOH al 27%

2.1.3.- Solución de fenol: 62.5 gr de fenol se disuelven en una mínima cantidad de metanol, agregar 18.5 ml de acetona y alcohol étilico cbp 100 ml.

2.1.4.- Solución de fenolato: Es una solución 1:1 de NaOH al 27% y solución de fenol (2.1.3).

2.2.- Fosfatasas

2.2.1.- Amortiguador de Boratos con pH 9.4

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	28.4 gr
Agua destilada	1000 ml
NaOH IN	82 ml

2.2.2.- Reactivo de Gibbs.

Cloruro de 2,6-dibromoquinona 0.125 gr
 Alcohol etílico de 96% 10 ml
 Guardar en un frasco oscuro en refrigeración.

2.2.3.- Solución patrón de fenol.

Fenol	1.0 gr
HCl 0.1N	1000 ml

2.3.- Celulasa

2.3.1.- Solución amortiguadora de acetato de sodio

- Ac acético con pH 5.9.

Ac. Acético glacial (99%) 0.35 ml ←

Acetato de sodio anhidro 7.66 gr

2.4.- Amilasa

2.4.1.- Solución amortiguadora de fosfatos con

pH 5.5

Acido acético 0.5 M

 Na_2HPO_4 0.5 M2.5.- Reactivo de Griess

2.5.1.- Se disuelven 0.6 gr de ácido sulfanílico en -
70 ml de agua caliente, se añaden 20 ml de HCl -
concentrado y se completa a 100 ml con agua des-
tilada.

2.5.2.- 0.6 gr de alfa naftilamina son disueltos en 20-
ml de agua destilada conteniendo 1 ml de HCl -
concentrado, aforar a 100 ml con agua destilada.

2.5.3.- 16.4 gr de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en cbp 100
ml de agua destilada.

Se guardan separadamente y se mezclan en partes iguales al -
usarse.

2.6.- Mezcla para determinar la presencia de microorganismos desnitrificantes.

MnSO ₄	10 gr
Zn metálico en polvo	2 gr
Ac. Sulfanílico	4 gr
Alfa naftilamina	2 gr

Estas sustancias son mezcladas en mortero, para después agregar 100 gr de BaSO₄ y 75 gr de ácido cítrico. Esta mezcla se guarda en frasco ámbar.

2.7.- Solución de cloruro mercuríco

HgCl ₂	15 gr
HCl concentrado	20 ml
Agua destilada cbp	100 ml

2.8.- Solución de Nessler; para determinar la presencia de microorganismos amonificantes.

Disolver 45.5 gr de yoduro de potasio en una mínima cantidad de agua destilada, pasar la solución a un matraz aforado de 1 lt. y agregar 112 gr de hidróxido de potasio y llevar a un volumen de 800 ml. Mezclar bien, dejar que se enfríe para diluir a 1 lt.

2.9.- Reactivo A de Nelson Somogy

Disolver 12.5 gr de Na₂CO₃ anhidro, 12.5 gr de Tartrato Sódico Potásico, 100 gr de Na₂SO₄ anhidro, 10 gr de NaHCO₃ en 350 ml de agua destilada y diluir a 500 ml con agua destilada.

2.10.- Reactivo B de Nelson Somogy

Disolver 7.5 gr de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua destilada y aña
dir una gota de H_2SO_4 concentrado.

2.11.- Reactivo de Arsenomolibdato.

Disolver 25 gr de $\text{Mo}_7\text{O}_{24} (\text{NH}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 450 ml de agua destilaa
da, agregar 21 ml de H_2SO_4 concentrado. Disolver 3 gr de $\text{AsO}_4\text{HNa}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
en 25 ml de agua destilada y añadirse al molibdato ácido. Guardece -
24 hrs. a 37°C en botella de color azul, el reactivo debe ser amarillo
y no ha de tener tonalidad verde.

3) MEDIOS DE CULTIVO

3.1.- MEDIO DE CULTIVO PARA CELULOLITICOS MODIFICADO (Hankin 1971)

$\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ----- 2 gr	H_3BO_3 ----- 10 microgramos
KH_2PO_4 ----- 4 gr	MnSO_4 ----- 10 microgramos
Na_2HPO_4 ----- 6 gr	ZnSO_4 ----- 10 microgramos
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 1 mg	CuSO_4 ----- 50 microgramos
MgSO_4 ----- 200 mg	MoO_3 ----- 10 microgramos
CaCl_2 ----- 1 mg	Clorhidrato de tiamina - 10 microgramos
Carboxy metil celulosa ----- 1 %	Adenina----- 4 mg

Primero se disuelven las sustancias en poca agua destilada, - luego se añade la carboxy metil celulosa, se disuelve y se agrega al medio 20 gr de agar, ya disuelto se lleva a un volumen de 1 lt. con - agua destilada. Se esteriliza en autoclave a 120°C por 20 minutos.

3.2.- MEDIO DE CULTIVO PARA AMILOLITICOS (Harrigan 1966)

Agar nutriente - almidón

Peptona----- 10 gr	Agar----- 20 gr
Extracto de carne 3 gr	Almidón soluble al 0.2 %
Cloruro de sodio 5 gr	Agua destilada cbp 1000 ml

Disolver el almidón en el agar nutriente fundido pH 7.0, reparar en tubos en cantidades de 10 - 12 ml. Esterilizar a 120°C, 20 minutos.

3.3.- MEDIO DE CULTIVO PARA PROTEOLITICOS

Agar gelatina de Frazier (Harrigan 1966)

Gelatina ----- 0.4 gr

Agar nutriente ----- 100 ml

Agreagar la gelatina al agar nutriente y calentar hasta que se disuelva la gelatina, pH 7.2, colocar 10 - 12 ml del medio en tubos, esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

3.4. MEDIO DE CULTIVO PARA LIPOLITICOS (Aaronson 1970)

$(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$ ----- 0.1 gr

HCl ----- 0.02 gr

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 0.02 gr

Extracto de Levadura ----- 0.30 gr

Tributirina ----- 5.00 gr

Agar ----- 2.00 gr

Azul de Anilina ----- 1:15000 de medio
(espíritu azul)

Agua destilada cbp ----- 100 ml

El colorante azul de anilina se disuelve en la grasa para dar una concentración final de 1 parte en peso por 15,000 de medio, y así se adiciona al medio. Se disuelven las sustancias en el agua se añade la grasa, se agita bien, se reparte en tubos en cantidad de 10 - 12 ml, se esteriliza a 120°C por 20 minutos.

3.5.- MEDIO DE CULTIVO PARA PECTINOLITICOS (Cuppels y Kelman 1974)

CaCl ₂ al 10%	_____	3 ml
Agar	_____	1.5 gr
Sol de NaOH In	_____	4.5 ml
NaNO ₃	_____	1.0 gr
Polipectato de sodio	_____	15.0 gr
Sol. alcohólica de Cristal Violeta al 0.0759%	_____	1.0 ml

Los primeros 4 reactivos se adicionan a 300 ml de agua hirviente. se mezcla perfectamente, se adiciona lentamente el polipectato y la solución de cristal violeta, luego se agregan otros 200 ml de agua caliente se reparte en tubos con 10 - 12 ml de medio y se esterilizan en autoclave a 120°C, 20 minutos pH 7.0.

3.6.- MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS NITRIFICANTES (Black 1965)

Nitrosomas		Nitrobacter			
NH ₄) ₂ SO ₄	_____	0.5 gr	KNO ₂	_____	0.006 gr
K ₂ HPO ₄	_____	1.0 gr	K ₂ KPO ₄	_____	1.0 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	_____	0.03gr	NaCl	_____	0.3 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	_____	0.3 gr	MgSO ₄ .7H ₂ O	_____	0.1 gr
NaCl	_____	0.30gr	FeSO ₄ .7H ₂ O	_____	0.03 gr
CaCO ₃	_____	7.5 gr	CaCO ₃	_____	1.0 gr
Agua destilada			CaCl ₂	_____	0.3 gr
cbp	_____	1000 ml	Agua destilada		
pH 7.0			cbp	_____	1000 ml
			pH 7.0		

Disolver las sales en el agua y repartir en tubos de cultivo - conteniendo 3 ml. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

3.7.- MEDIO DE CULTIVO PARA DESNITRIFICANTES (Focht y Joseph 1973)

Caldo nutriente Difco

Extracto de carne	-----	3 gr
Bacto peptona	-----	5 gr
Agua destilada cbp	-----	1000 ml

A 5 ml de caldo se le añaden 9 mM de nitrato de potasio y se ajusta el pH a 6.8 - 7.0. Se reparte el medio en tubos de cultivo con tapón de rosca de plástico, conteniendo 6 ml. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

3.8.- MEDIO DE CULTIVO PARA AMONIFICANTES (22)

$K_2 HPO_4$	-----	3.0 gr
$MgSO_4$	-----	0.2 gr
$CaSO_4$	-----	0.01gr
KCl	-----	0.2 gr
NaCl	-----	0.2 gr
Gelatina	-----	10.0 gr
Agua destilada cbp	-----	1000 ml pH 7.0

Se disuelven las sales, se agrega la gelatina disolviendola en baño maría. Esterilizar a 120°C 20 minutos.

3.9.- MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS (Bunt y Rovira 1955)

Medio Modificado de Extracto de suelo agar

$K_2 HPO_4$	-----	0.4 gr
$NH_4)_2 HPO_4$	-----	0.5 gr
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	-----	0.05 gr
$MgCl_2$	-----	0.1 gr

FeCl ₃ _____	0.01	gr
CaCl ₂ _____	0.1	gr
Peptona _____	1.0	gr
Extracto de suelo* _____	250	ml
Agar _____	20	gr
Agua de llave _____	750	ml

Se disuelven las sales por calentamiento, se añade el agar y se esteriliza a 120°C por 20 minutos.

*Preparación del extracto de suelo.- 1Kg de suelo tamizado en- 1 lt. de agua destilada, se autoclavea a llave de vapor sin presión y se filtra a través de papel filtro de poro fino.

3.10.- MEDIO DE CULTIVO PARA ACTINOMICETOS

Dextrosa nitrato agar (Black 1965)

Dextrosa _____	1.0	gr
K ₂ HPO ₄ _____	0.1	gr
NaNO ₃ _____	0.1	gr
KCl _____	0.1	gr
MgSO ₄ .7H ₂ O _____	0.1	gr
Agar _____	15	gr
Agua destilada cbp _____	1000	ml

Se disuelven las sales en agua destilada por calentamiento, se añade el agar, se lleva a 1000 ml con agua destilada, un pH 7.0, se esteriliza en autoclave a 120°C por 20 minutos.

3.11.- MEDIO DE CULTIVO PARA HONGOS

Estreptomycina-rosa de bengala. (Martín 1950)

KH_2PO_4 -----	1.0 gr
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0.5 gr
Peptona -----	5.0 gr
Dextrosa -----	10.0 gr
Rosa de bengala -----	0.033 g
Agar -----	20.0 gr
Agua destilada cpb -----	1000 ml

Preparación de la estreptomycina: Pesar 0.4 gr de estreptomycina en 100 ml de agua destilada, esterilizar, a través de un filtro millipore al medio fundido y estéril se le añade 1 ml de esta solución de estreptomycina, el medio de cultivo deberá estar a 45°C, antes de añadir el antibiótico.

3.12.- MEDIO DE CULTIVO: Lipman L-G para Azotobacter (22)

K_2HPO_4 -----	0.1 gr
KH_2PO_4 -----	0.4 gr
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0.2 gr
CaCl_2 -----	0.02 gr
$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -----	0.002gr
FeCl_2 -----	0.01 gr
Sacarosa -----	10.0 gr
CaCO_3 -----	1.0 gr
Agar -----	20.0 gr
Solución alcohólica de azul de bromotimol al 05%	5.0 ml
Agua destilada cbp	1000 ml

pH 6.7 - 7.0 Esterilizar en autoclave a 120°C por 20 minutos.

M E T O D O S

ANALISIS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA

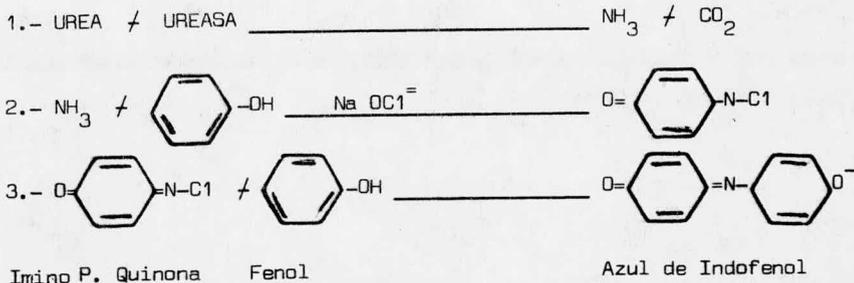
I.- TECNICA DEL AZUL DE INDOFENOL PARA DETERMINACION DE UREASA (72)

Se colocan 20 gr de suelo tamizado (en un tamiz de 3 mm) en un matraz se le agregan 2 ml de tolueno y se deja reposar 15 minutos para que el tolueno penetre perfectamente en el suelo.

A continuación se agregan 20 ml de una solución amortiguadora de ácido cítrico - citrato de potasio de pH 6.7 y 10 ml de una solución acuosa de urea al 10%, se agita el matraz y se incuba 6 horas a una temperatura de 37°C, el testigo se prepara de la misma manera y al mismo tiempo sustituyendo la urea por 10 ml de agua destilada.

Después de la incubación se agita el matraz y su contenido esvaciado a un matraz volumétrico de 100 ml y se afora con agua destilada con la capa de tolueno arriba, enseguida se filtra en papel Whatman del No 5, el filtrado puede ser incoloro o presentar un color café dependiendo del contenido de materia orgánica, este color es eliminado al hacer la lectura con el testigo.

Se determina el amoníaco liberado en el filtrado por espectrofotometría en referencia a una curva patrón realizada con sulfato de amonio. La reacción química realizada en esta técnica es la de Berthelot;



Para desarrollar el color se toma 1 ml de filtrado más 9 ml - de agua destilada más 5 ml de fenolato y 3 ml de NaClO_3 conteniendo - .09% de cloro activo, se deja reposar 20 min y luego se afora a 50 ml con agua destilada y se lee a 630 nm en una espectro fotometro marca-Zeiss PM. 2A.

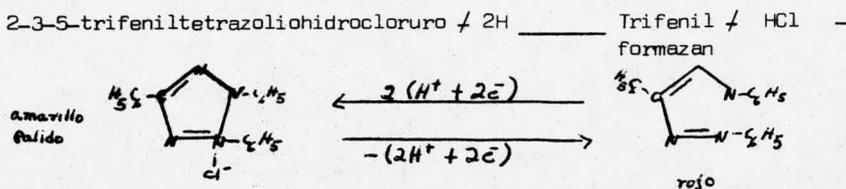
II.- TECNICA PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DESHIDROGENASICA (10)

Se pesan 20 gr de suelo tamizado se le agregan 0.2 gr de CaCO_3 se mezcla bien se separa en 3 porciones de 6 gr cada una y se coloca en 3 tubos de 16 X 150 mm.

A cada tubo se le añade 1 ml de solución acuosa de clorhidrato de 2,3,5, trifenol tetrazolio al 3% y 2.5 ml de agua destilada o en su defecto 2.5 ml de solución acuosa de DL Alanina 0.02M. Esta cantidad de líquido añadido deberá saturar el suelo a manera que aparezca un poco de líquido libre en la superficie del suelo. Se mezcla bien y se incuba por 24 hrs. a 37°C .

El trifenilformazan liberado es extraído con metanol añadiendo se en porciones a cada tubo, se filtra y el filtrado es aforado a 100 ml con metanol, se lee entonces a 485 nm con metanol como blanco. La concentración se encuentra interpolando en una curva patrón hecha a base de 2,3,5, trifenil formazan disuelto en metanol.

La formación de 10 mg de trifenilformazan necesita de 150.3 microlitros de H_2 . La reacción (5) es la siguiente:

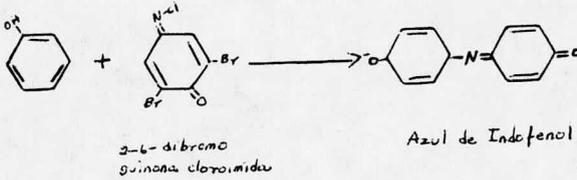
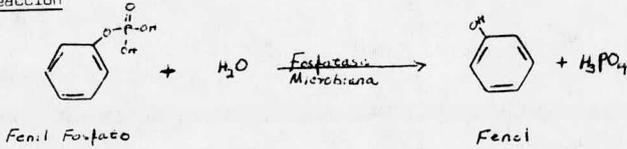


III.- TECNICA PARA DETERMINAR FOSFATASAS (58)

5 gr de suelo tamizado son colocados en un matraz Erlenmeyer de 150 ml, se agregan 2.5 ml de tolueno y se agita el matraz durante 15 minutos. Enseguida se añaden 20 ml de una solución acuosa de fenil fosfato de sodio al 0.5% se ajusta el pH a 7.0 y la mezcla se incuba durante 2 hrs. a 37°C.

Se agrega 100 ml de solución acuosa de alumbre de potasio al 0.3% y se filtra. Se toma una alícuota del filtrado de 0.5 a 2.0 ml. Se coloca en un matraz aforado de 25 ml, se añaden 5 ml de amortiguador de boratos de un pH 9.4 y 4 gotas del reactivo de Gibbs, se afora con agua destilada y se espera 30 minutos para su lectura a 660 nm. La concentración se interpola en una curva patrón de fenol.

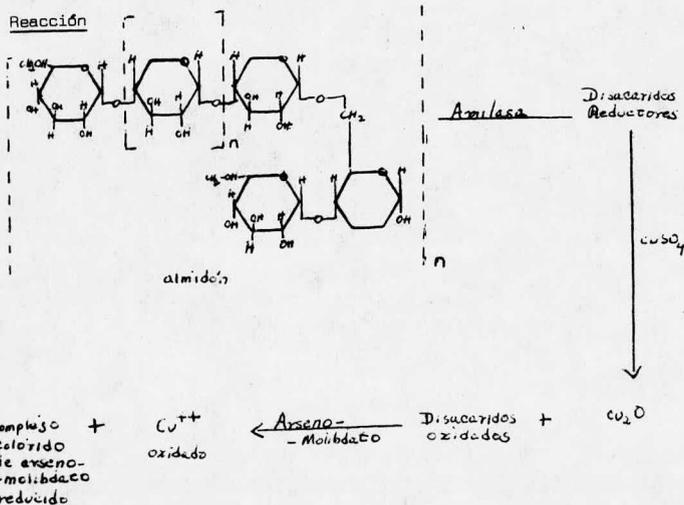
Reacción



V.- TECNICA PARA DETERMINAR AMILASAS (B1)

Se colocan 10 gr de suelo tamizado en un matraz de 250 ml, se agregan 2.5 de tolueno y se agita 15 minutos luego se añaden 20 ml de amortiguador de fosfatos a un pH de 5.5 y 20 ml de una solución re- cien preparada de almidón. Después de 24 hrs. de incubación, se filtra en papel Whatman # 12, se toma una alícuota del filtrado y se determinan azúcares por la técnica de Nelson Somogyi.

Reacción



IV.- TECNICA PARA DETERMINAR CELULASA (72)

Se pesan 5 gr de suelo tamizado y se colocan en un frasco de - 50 ml se añade 0.15 ml de tolueno, se agita durante 15 minutos, enseguida se le agrega 10 ml de solución amortiguadora de acetatos a un pH de 5.9 más 10 ml de una solución acuosa al 1% de carboxi metil celulosa. El frasco se incuba por 24 hrs. a 30°C.

Después de la incubación se añaden 50 ml de agua destilada, se filtra en papel Whatman # 30, el volumen del filtrado es aforado con agua destilada a 100 ml. El contenido de azúcares reductores es determinado por el método de Nelson Somogy. Los controles consisten de suelo sin carboxy metil celulosa, y una muestra de suelo autoclaveada conteniendo carboxy metil celulosa.

Por lo que respecta al método de Nelson Somogy se efectúa lo siguiente: Se prepara el reactivo de cobre alcalino mezclando 12.5 ml de reactivo A de Nelson con 0.5 ml de reactivo B de Nelson. La solución de azúcar para la curva patrón contiene 10 mg de glucosa en 100 ml de agua destilada. De la muestra por analizar se toma de 1 ml a 2 ml añadiendo 1 ml del reactivo de cobre alcalino mezclándose bien, esta mezcla se pone en un baño de agua caliente durante 20 minutos, enseguida se enfría hasta 25°C y se adiciona 1 ml del reactivo arseno molidato, se mezcla bien durante 5 minutos para disolver el Cu_2O precipitado y reducir el arsenomolibdato, luego se añaden 7 ml de agua destilada. Se lee a 540 nm ajustando la lectura con el blanco.

Curva Patrón de Sulfato de Amonio (ureasa)

densidad
óptica

0.3

0.2

0.1

0

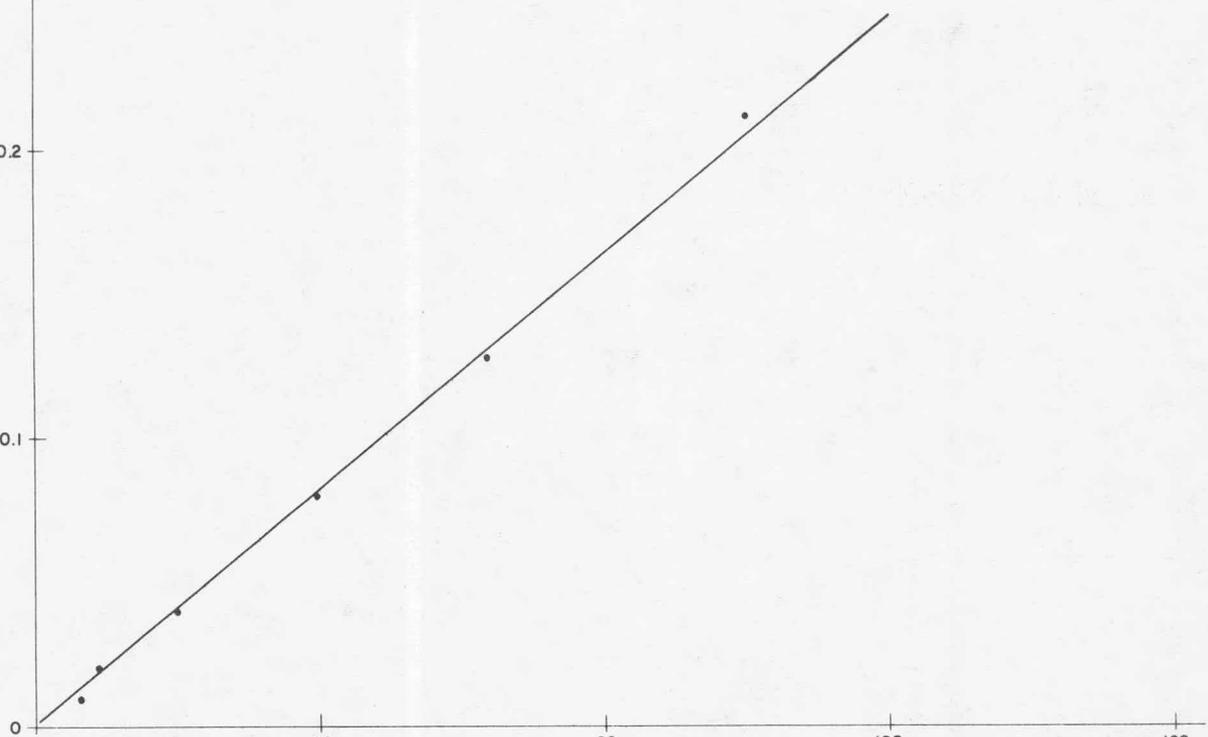
40

80

120

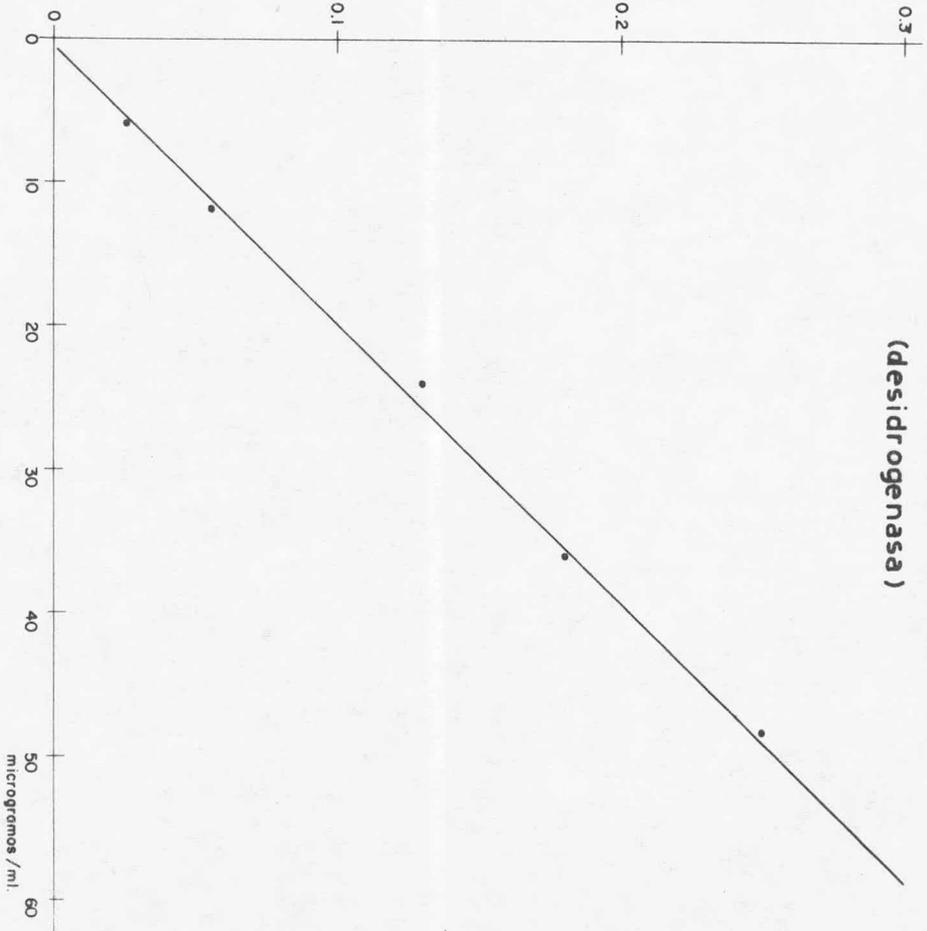
160

microgramos/ml.



densidad
óptica:

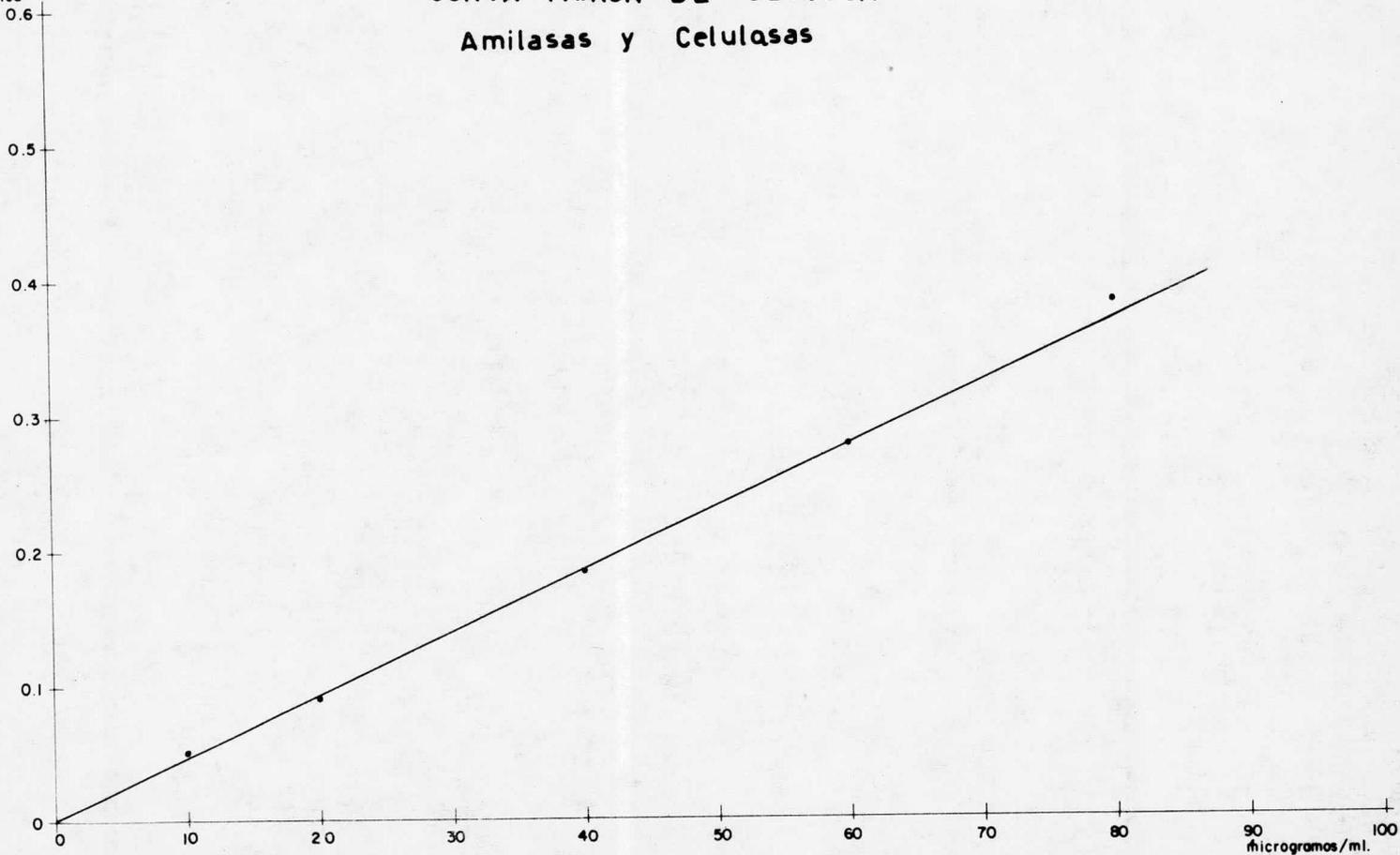
Curva Patrón de Formazán (desidrogenasa)



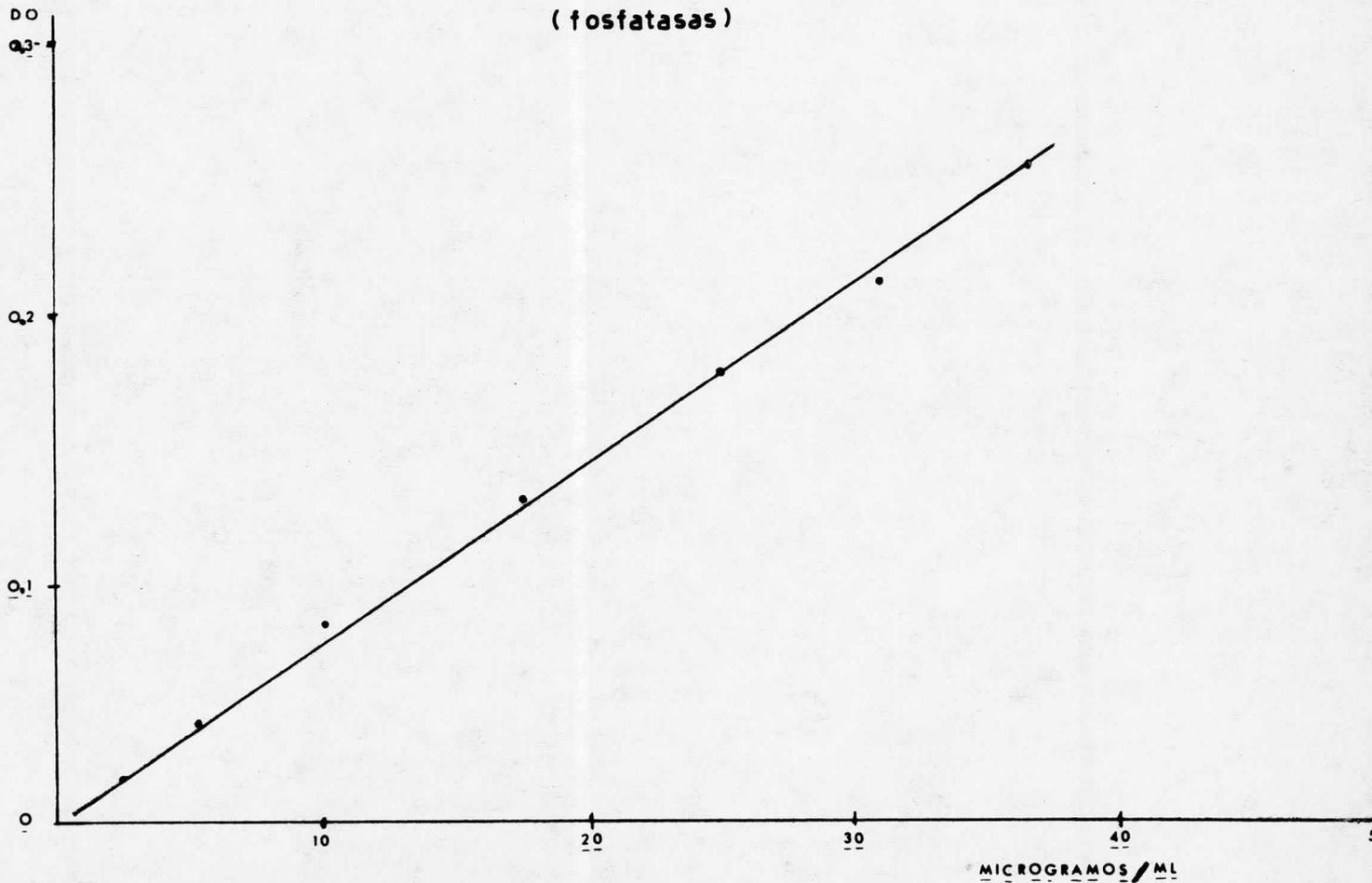
densidad
óptica

CURVA PATRON DE GLUCOSA

Amilasas y Celulasas



Curva Patrón de Fenol
(fosfatasas)



ANALISIS MICROBIOLÓGICOS

CUANTIFICACION DE FLORA MICROBIANA TOTAL.

Para la cuantificación de bacterias se utilizó el método de dilución de suelo en cajas de petri conteniendo el medio de cultivo modificado de extracto de suelo agar (Bunt y Rovira 1955).

Para Hongos se usó el método de dilución de suelo con siembra en cajas de petri conteniendo el medio estreptomycina rosa de belgala, (Martin 1950).

Para actinomicetos se usó el medio de glucosa nitrato agar, (Black 1965).

Las cajas de petri fueron incubadas en la estufa a una temperatura de 28°C a 30°C procediéndose a hacer la cuantificación de bacterias a los 8 días, actinomicetos a los 8 días y los hongos a los 7 días. La cuantificación de bacterias, hongos y actinomicetos se hizo en forma visual o por medio del contador de colonias.

CUANTIFICACION DE FLORA MICROBIANA CON ACTIVIDAD BIOQUIMICA ESPECIFICA.

Se utilizó el método de diluciones decrecientes del suelo. Para esto se inocularon 5 tubos para cada una de las diluciones, empleándose para cada inoculación 1 ml de las diluciones de suelo, incubando los tubos a una temperatura de 28 a 30°C, el tiempo de incubación fue variable de acuerdo con el grupo microbiano específico a determinar, al final del período de incubación, la cuantificación se hizo

zo de acuerdo con el método de McCrady.

Los grupos microbianos cuantificados por el método descrito en el párrafo anterior son: amonificantes, nitrificantes, desnitrificantes. En el caso de celulóliticos, lipóliticos, proteólíticos, amilóliticos y pectinolíticos fueron cuantificados en cajas petri con medios sólidos y semi-sólidos.

CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS CELULOLITICOS

La técnica se basa en la cuantificación de microorganismos, en caja de petri conteniendo un medio de cultivo especial, el cual lleva carboxy metil celulosa al 1% como fuente de carbono y sales minerales como macro y micro nutrimentos más extractos de levadura (Hankin (36)). Al utilizar este medio no se observó el desarrollo de los microorganismos celulóliticos, por esta razón se probó otro medio muy parecido, el cual emplea celulosa tratada con ácido fosfórico al 85% (Aaronson-1970), en lugar de la carboxy metil celulosa y además contiene clorhidrato de tiamina y adenina. Este medio tampoco dió los resultados de seados y además presenta el problema de la solubilización de la celulosa, la cual no se distribuye de manera homogénea en el medio. Por todos los problemas antes expuestos con los medios de cultivo, se optó por modificar el medio de Hankin, al suprimir el extracto de levadura y dejando como única fuente de carbono a la carboxy metil celulosa, sustancia que además no presenta problema de solubilidad en agua y añadir al medio de cultivo clorhidrato de tiamina y adenina.

Para señalar en este medio la presencia de microorganismos celulóliticos se usó como agente precipitante de la carboxy metil celulosa no degradada en el medio de cultivo al Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio.

CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS LIPOLITICOS
(Aaronson 1970)

El medio de cultivo contiene tributirina como fuente de energía, además de sales minerales. Después de hacer las correspondientes diluciones del suelo se inoculan en este medio especial para lipolíticos (3.4) y se incuban las cajas de petri a 28°C en la oscuridad de 2 a 7 días, en nuestro caso a los 4 días se pudo observar la lipólisis por el desarrollo de colonias con un halo de el color azul, debido a la reacción entre los ácidos grasos libres y el colorante agregado al medio.

Reacción

Grasa / Lipasa microbiana _____ $n(R-COOH)$ / glicerol
ac. graso

base débil del colorante / ácido graso _____ Complejo colorido
(azul espíritu) azul

CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS PROTEOLITICOS

La técnica se basa en utilizar un medio de cultivo especial - llamado agar gelatina de Frazier (38). Después de la incubación a - 28°C-30°C se agrega a las placas una solución acuosa de cloruro mercúrico. La gelatina hidrolizada aparece como zona clara alrededor de - la colonia proteolítica. En nuestro caso se observaron a los 4 días - de incubación.

Reacción

Gelatina / Proteasa $\xrightarrow{H_2O}$ Polipeptidos

Gelatina / $HgCl_2$ _____ Gelatina precipitada

CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS AMILOLITICOS

La técnica se basa en emplear un medio de cultivo que contenga almidón al 2% agar nutriente. Después del crecimiento se añade a las cajas una solución de lugol, las colonias capaces de hidrolizar al almidón son indicadas por la ausencia de color azul alrededor de las mismas. Esto se observó a los días de incubación a 37°C.

Reacción

Almidón / Lugol _____ Complejo colorido
azul

CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS PECTINOLITICOS

La cuantificación se lleva acabo después de haber incubado 72- horas a una temperatura de 28°C-30°C el medio de Cuppels Kelmann inoculado con diluciones de suelo. Las colonias que se consideraron pectinolíticas son aquellas que presentaron hundimiento en el medio.

CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS NITRIFICANTES

La nitrificación se lleva acabo por dos tipos de microorganismos, los cuales requieren de diferente medio de cultivo, uno que contiene como fuente de N_2 sulfato de amonio y otro que emplea nitrito de sodio.

Para demostrar la presencia del primer grupo (Nitrosomonas) debe encontrarse la prueba positiva para nitrito (2) pero una prueba negativa no es evidencia de que no hay Nitrosomonas, para el segundo grupo una prueba negativa para NO_2^- indica presencia de Nitrobacter.

Los medios de cultivo se inocularon con las diluciones de suelo y se colocaron en la estufa de cultivo a 28°C y 30°C . Después de un mes de incubación se agregaron a cada tubo 3 gotas del reactivo de Griess, un color rojo-púrpura indica presencia de NO_2^- . Para ver si hay NO_3^- se agrega ZnCuMnO_2 un color rojizo indica su presencia.

CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS DENITRIFICANTES

Esta cuantificación se hace usando caldo nutriente difco con nitrato de potasio. Después de una incubación de 15 días se hizo una prueba para nitratos, usando la mezcla citada (2.6), para la prueba se añade a cada tubo mas gotas de ácido acético glacial y una pequeña cantidad de la mezcla, la ausencia de color indica que todo el nitrato fue desnitrificado hacia N_2 o N_2O o reducido a NO_2^- .

Al no incluir en la mezcla Zn y MnSO_4 y haber presencia de color rojo indica que el nitrato paso a nitrito y la ausencia indica que el nitrato paso a N_2 o N_2O o que el NO_3^- quedo intacto, para poder diferenciar, se agrega Zn en polvo, un color rojo indicará que el nitrato paso a N_2 o N_2O .

CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS AMONIFICANTES.

Esta cuantificación se basa en un medio con gelatina y sales minerales. De las diluciones del suelo problema se inocularon 5 tubos por cada dilución, que contenían el medio citado, con 1 ml de las diluciones 10^{-1} hasta 10^{-10} . Después de la incubación a 28°C por 15 días, se toman 3 gotas de cada tubo inoculado y se agregan 2 gotas del Reactivo de Nessler, una coloración amarillo huevo se tomará como positiva.

CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO (AZOTOBACTER)

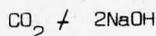
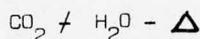
Se utilizó el metodo de siembra en placa usando como medio de cultivo el de Lipman L-G. Las características de las colonias desarrolladas en este medio son colonias transparentes, mucoides. Para mayor seguridad de la cuantificación se efectuó la identificación microscópica de dichas colonias, haciendo un frotis y tiñendolo con la coloración de Gram.

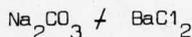
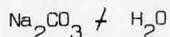
ACTIVIDAD BIOQUIMICA TOTAL DEL SUELO

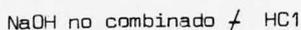
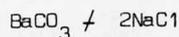
La prueba consiste en medir el CO_2 producido al agregar al suelo forestal una fuente energética en forma de glucosa al 1% (22). La cuantificación del CO_2 se hizo en base a las siguientes reacciones químicas.

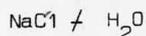
Materia orgánica
del suelo

Descomposición
microbiana









La técnica en si consiste en poner 50 gr de suelo 0.5 gr de - glucosa, humedecer el suelo al 50% de su capacidad de campo y colocarlo en un frasco de vidrio con boca ancha y tapón de rosca, dentro se coloca en frasco más chico conteniendo solución acuosa de NaOH 1.0N.- Se incuba el frasco a 28°C-30°C junto a un testigo, se cuantifica el CO_2 producido a diferentes períodos de tiempo. Una titulación testigo del suelo sin la fuente energética y sometido a las mismas condiciones nos proporciona el valor de referencia del cual el CO_2 puede ser calculado.

ANALISIS FISICOQUIMICOS DEL SUELO

pH.- La medición del pH se hizo con un potenciómetro marca Cole Parmer Digi-sense Phmeter. Se pesaron 50 gr de suelo y se agregan 125 ml de agua destilada para tener una dilución 1:2.5 se agita durante 5 minutos y se lee.

Color.- Se comparó el color del suelo con muestra seca y húmeda en la tablas de Munsell.

Humedad.- Se efectuó por gravimetría o sea por diferencias de peso seco a peso húmedo, secando la muestra de suelo en una estufa a 105°C hasta peso constante.

Textura.- Se utilizó el Metodo del Hidrómetro de Bouyoucos (22).

Materia Orgánica.- Se basó en la técnica de Walkley y Black - (51).

N₂ Total.- Se usó el metodo de Kjeldhal modificado. (51).

III RESULTADOS Y DISCUSION

Al analizar los resultados ciertas relaciones fueron establecidas en cuanto a la actividad de enzimas y microorganismos.

Si analizamos la actividad enzimática con respecto a la humedad y concentración de iones hidrógeno, en el suelo, encontramos que la actividad varió en forma irregular no pudiéndose encontrar una relación, con el medio ambiente que prevalecía cuando se tomaron las muestras, pero se observó en general una máxima actividad en el mes de agosto, cuando en el suelo el pH era neutro y con mayor contenido de humedad, que en las otras muestras. Ciertas enzimas como la amilasa y deshidrogenasa presentaron la misma concentración, en mayor y en enero, esto se puede deber a la acción constante de los microorganismos autóctonos entre otras cosas. (Tabla No 1)

Al estudiar por separado la actividad de las enzimas se observa en el caso de ureasa mayor actividad en agosto y un poco menor en enero, al comparar la actividad de la muestra de mayo hay una diferencia notable, que tal vez se pueda atribuir a un pH más alcalino y a un bajo contenido de humedad del suelo. Si comparamos nuestros resultados con los de un suelo forestal con vegetación roble-pino (72) se nota que en nuestro suelo en el mes de agosto hay una gran actividad ureásica ya que se liberaron 0.402 mg de nitrógeno/gr de suelo en 6 hrs. y en el suelo con vegetación roble-pino se encontró en el mismo mes una liberación de 0.334 mg de nitrógeno/gr de suelo en 24 hrs. Este mismo fenómeno se observa al comparar la actividad ureásica de nuestras muestras de enero y mayo con las demás muestras tomadas a diferentes tiempos y analizadas en el suelo forestal con vegetación de-

pino-roble. Por lo cual se podría concluir que en nuestro suelo si hay una cierta relación entre la actividad ureásica y el número de microorganismos, pero como la ureasa extracelular es adsorbida por las partículas de arcilla y materias orgánica humificada (67) presentando actividad ureásica, esta enzima no esta necesariamente relacionada con el número, peso o actividad de microorganismos urolíticos viables en el instante de la determinación de la actividad ureásica. McGarity (67) encontró baja correlación positiva entre la actividad ureásica y la concentración de iones hidrógeno, ($r = + 0.202$), no se observa esta relación en nuestros datos, también encontró una correlación ($r = + 0.502$) entre la actividad ureásica y el carbón orgánico.

En cuanto a la actividad amilolítica se observa que es la menos afectada al variar la humedad y el pH aunque existe una variación pequeña, ya que en forma general todas las actividades bioquímicas estan correlacionadas significativamente con el contenido de carbón orgánico y humedad. (81). Por otro lado esta actividad amilolítica parece estar más relacionada con la composición que con la cantidad de materia orgánica (81). Es necesario hacer un análisis de las variaciones de esta actividad entre un tipo de vegetación y otro. Si comparamos los datos de esta actividad hechos en suelos forestales con una vegetación roble-roble negro y roble-pino con los nuestros se observa que para el primer suelo hay una similitud en la actividad (72), sobre todo al comparar la muestra del mes de agosto en la primera sucesión con nuestra muestra del mes de mayo y enero del horizonte A. Lo cual indica que no hay una relación aparente entre la actividad amilolítica, la época del año y tipo de vegetación y si una posible relación con el número y tipo de microorganismos.

Ross (82). establece que las variaciones de esta actividad amilolfti ca se pueden explicar en base a las variaciones en carbon orgánico, - contenido de arcilla y otros factores asociados con el tipo de suelo.

Respecto a las deshidrogenasas se encontró poca cantidad de es ta enzima en las 3 muestras de suelo tomadas a diferentes tiempos, es te dato es diferente a lo encontrado en un suelo forestal por L.E. - Casida (10) quien reporta cantidades mayores de esta enzima. Varios investigadores que han estudiado esta enzima han establecido que su - cuantificación da un aspecto cuantitativo de la actividad microbiana- en el suelo (88), si nos basáramos en este resultado, entonces la - actividad microbiana de nuestro suelo en estudio sería baja, lo cual- no concuerda con el número de microorganismos encontrado. Esto se - puede deber a que el producto formado es rápidamente metabolizado por los microorganismos y por esto se encuentra en pequeña cantidad al fi nal del período de incubación. También se puede atribuir a que las - condiciones del método no fueron favorables a la actividad deshidroge násica por las características del suelo como son la gran cantidad - de materia orgánica, tamaño de partícula que influye en la adsorción- de proteínas como las enzimas. Es conocido que ciertas enzimas son - más efectivas al estar adsorbidas a las partículas de suelo (88) . - pero nada se sabe de las enzimas del tipo de deshidrogenasas. Otra + posible explicación a la baja actividad encontrada, es que haya cons- tantes oxidoreducciones por factores químicos y no biológicos.

Al determinar la actividad celulásica se observó poca activi- dad en mayo en la muestra de suelo del horizonte A y en el horizonte- B no fue posible encontrarla, en las otras dos muestras tomadas en - enero y agosto la actividad aumenta, el hecho de que la actividad celula

sica fuera pequeña en las 3 muestras se puede deber a la presencia de otros carbohidratos de más fácil degradación microbiológica como son los almidones. De hecho la actividad celulásica deberá ser mayor en el mantillo que en el suelo, ya que el mantillo es un sustrato muy rico en celulosa. Al comparar los datos obtenidos con los reportados en suelos forestales con vegetación roble-pino y roble-roble negro, se observa una baja actividad en el nuestro, salvo una similitud en los meses de diciembre y febrero en la segunda sucesión y clima estando, por lo cual no se encuentra relación alguna con la época del año ni con el número de microorganismos y si posiblemente con el tipo de vegetación. Esto podría deberse a que los microorganismos del suelo forestal producen esta enzima en condiciones de adaptación, al faltar fuente de energía procedente del mantillo en donde se encuentran en mayor cantidad los microorganismos que generan en forma natural la celulasa.

Por lo que concierne a las fosfatasa se observa que tanto en las muestras del mes de mayo y de agosto no hay una gran diferencias de actividad, a pesar de los diferentes valores de pH del suelo, esto se debe a que las fosfatasa presentan actividad a diferentes valores de pH, posiblemente se trata de diferentes fosfatasa que por su diferente secuencia de aminoácidos que las forman actúan a diferentes valores de pH. Hay pocos trabajos relacionados con el estudio de las fosfatasa, por lo que es difícil sacar una conclusión de nuestro estudio, por lo que se necesitaría realizar, más estudios ya sea aislamiento de la enzima o su relación con factores fisicoquímicos.

Por lo que concierne a la profundidad del suelo se encuentra una relación inversamente proporcional a la actividad enzimática en

todas las enzimas analizadas en este trabajo, probablemente debido a menos contenido microbiano en el horizonte más profundo.

En cuanto al análisis cuantitativo de microorganismos encontrados en el mes de agosto (tabla # 4) y comparando la cantidad de hongos presentes en nuestro suelo con otros suelos forestales con vegetación tipo abeto y hoja deciduas (13) se nota una gran diferencia, esto se puede explicar por las condiciones propias de nuestro suelo como es un pH neutro y la gran cantidad de materia orgánica presente Steubing (90) señala que la cantidad de materia orgánica esta relacionada directamente con el desarrollo de microorganismos heterótrofos. La cantidad de bacterias encontradas es parecida a la de los hongos, si se compara con otros suelos forestales se observan diferencias cuantitativas entre hongos y bacterias, esto nos hace pensar que en nuestro suelo hay un equilibrio entre bacterias y hongos, y que aunado a otros factores, este equilibrio influye sobre la concentración de iones hidrógeno en nuestro suelo. Por otro lado las actinomicetos se encuentran en una cantidad menor con respecto a los hongos y bacterias de nuestro suelo, concordando este dato, con diferentes suelos forestales. Al hacer una comparación cuantitativa de actinomicetos de nuestro suelo con actinomicetos de suelos forestales que tienen vegetación de abetos y hojas dicuidias, se observa una mayor cantidad en nuestro suelo, no pudiéndose encontrar una relación aparente de su número con la vegetación.

Al cuantificar los grupos de actividad bioquímica específica (tabla 2) se observa una gran cantidad de celulóliticos a pesar de que no encontramos una gran actividad de celulasa, esto tal vez se deba a que los microorganismos al crecer en un medio de cultivo especí-

fico de laboratorio son obligados a generar la celulosa, ya que se trata de una enzima de naturaleza adaptativa. Por lo que respecta a los pectinolíticos su número es pequeño comparado a los celololíticos y parece ser difícil su cuantificación, ya que en ciertos suelos forestales se les ha encontrado en pequeña cantidad (45). En lo referente a los proteolíticos y amilolíticos, se puede observar un ligero paralelismo en su cantidad. Si en posteriores trabajos se analiza este paralelismo con otros factores fisicoquímicos y biológicos, tal vez se encuentre una relación directa con el equilibrio carbono-nitrógeno del suelo. Los que contribuyen a fuentes de energía mayores como son los lipolíticos fueron encontrados en baja proporción, debido tal vez a la presencia de fuentes de energía mayores como son los lipolíticos, fueron encontrados en baja proporción, debido tal vez a la presencia de fuentes de energía más accesibles, en el suelo como son los carbohidratos, la celulosa y una pequeña cantidad de su sustrato específico en el suelo. Al analizar los microorganismos que intervienen en el ciclo del nitrógeno, (tabla No. 3) se observa una mayor cantidad de amonificantes que nitrificantes, lo cual concuerda con el hecho de que a mayor contenido de materia orgánica nitrogenada, mayor número de heterotróficos, que son en sí los que efectúan la amonificación. Por lo que se refiere a los desnitrificantes, y como estos últimos son aeróbicos se puede decir que en este suelo con gran contenido de materia orgánica existe la suficiente aereación para que haya menor cantidad de desnitrificantes, por lo tanto hay una relación directa entre nitrificantes y aereación, que se verá modificada por los cambios en las características del suelo.

Respecto a los fijadores libres de nitrógeno atmosférico como es Azotobacter sp. se encontraron en poca cantidad en este suelo, para poder explicar este fenómeno, es necesario estudiar la relación que existe entre el complejo enzimático de fijación y otros factores del suelo.

Al observar la curva de producción de CO_2 se nota que en el horizonte superior hay mayor producción de CO_2 que en el horizonte inferior, debido a la mayor cantidad de microorganismos del horizonte superior. Y como respuesta a la adición de glucosa se observa claramente el fenómeno de activación, el que se manifiesta durante el período de incubación.

En resumen y concordando con otros investigadores (18) no se encuentra una relación directa de la actividad enzimática, con el número de microorganismos, ni con la estación del año, sino que la actividad nos da índices generales de la actividad biológica.

Por lo que respecta a las características fisicoquímicas estas concuerdan en su mayoría con las reportadas en los distintos suelos forestales. Encontrándose varias relaciones entre el contenido orgánico y las características biológicas ya mencionadas, al igual que la humedad y el pH.

TABLA 1 ACTIVIDAD ENXIMATICA EN EL SUELO *

Profundidad del suelo	Fecha de muestreo	Ureasa mg de N ₂ por 100 gr de suelo/6 hrs.	Amilasa mg de Azúcares reductores por 100-gr de suelo/24 hrs.	Celulasa mg de Azúcares reductores por 100 gr de suelo/24 hrs.	Fosfatasa mg de fenol por 100 gr de suelo/2 hrs.	Deshidrogenasa mg de formazan por 100 gr de suelo/24 hrs.
0 - 20	Mayo/78	22.20	60.0	8.0	149.0	10.0
20 - 40	Mayo/78	7.70	20.0	-----	57.7	4.9
0 - 20	Agosto/78	40.20	198.0	30.0	143.3	18.0
20 - 40	Agosto/78	7.80	52.0	12.0	21.2	4.9
0 - 20	Enero /79	42.00	55.6	20.0	62.5	9.2
20 - 40	Enero /79	10.50	30.8	12.0	46.6	4.2

* Nota: Se analizó el suelo con su humedad natural reportándose la actividad en suelo húmedo.

TABLA 2 MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD BIOQUIMICA ESPECIFICA. *

Profundidad del suelo en cm.	Número de Amilolíticos por gr de suelo seco.	Número de Celulolíticos por gr de suelo seco.	Número de Proteolíticos por gr de suelo seco.	Número de Lipolíticos por gr de suelo seco.	Número de Pectinolíticos por gr de suelo seco.
0 - 20	10,000,000	9,090,909	7,045,454	81,818	36,300
20 - 40	3,043,478	2,391,304	3,913,043	26,087	10,860

* Nota: Este análisis se hizo sobre la muestra de agosto. 1978.

TABLA 3 CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS DEL CICLO DE NITROGENO DEL SUELO *

Profundidad del suelo - en cm.	Microorganismos Amonificantes por gr de suelo-seco.	Microorganismos Nitrosomonas sp. por gr de suelo-seco.	Nitrificantes Nitrobacter sp. por gr de suelo-seco.	Microorganismos fijados de N_2 libre Azotobacter sp. por gr de suelo-seco.	Microorganismos desnitrificantes por gr de suelo-seco.	Microorganismos que Reducen el NO_3^- a NO_2^- .
0 - 20	1,363,636	15,909	20,454	1,590	13,181	90
20 - 40	2,880,608	652	3,043	44	4,782	44

* Nota; Este análisis se hizo sobre la muestra de agosto de 1978.

TABLA 4 CUANTIFICACION DE LA MICROFLORA TOTAL DEL SUELO: *

Profundidad del suelo en cm.	Número de Bacterias por gramo de suelo-seco.	Número de Actinomicetos por gramo de suelo seco.	Número de Hongos por gramo de suelo seco.
0 - 20	9,545,454	909,091	9,090,909
20 - 40	2,391,304	97,826	3,260,869

* Nota: Este análisis se hizo sobre la muestra de agosto. 1978

Tabla 5 DETERMINACIONES FISICOQUIMICAS DEL SUELO

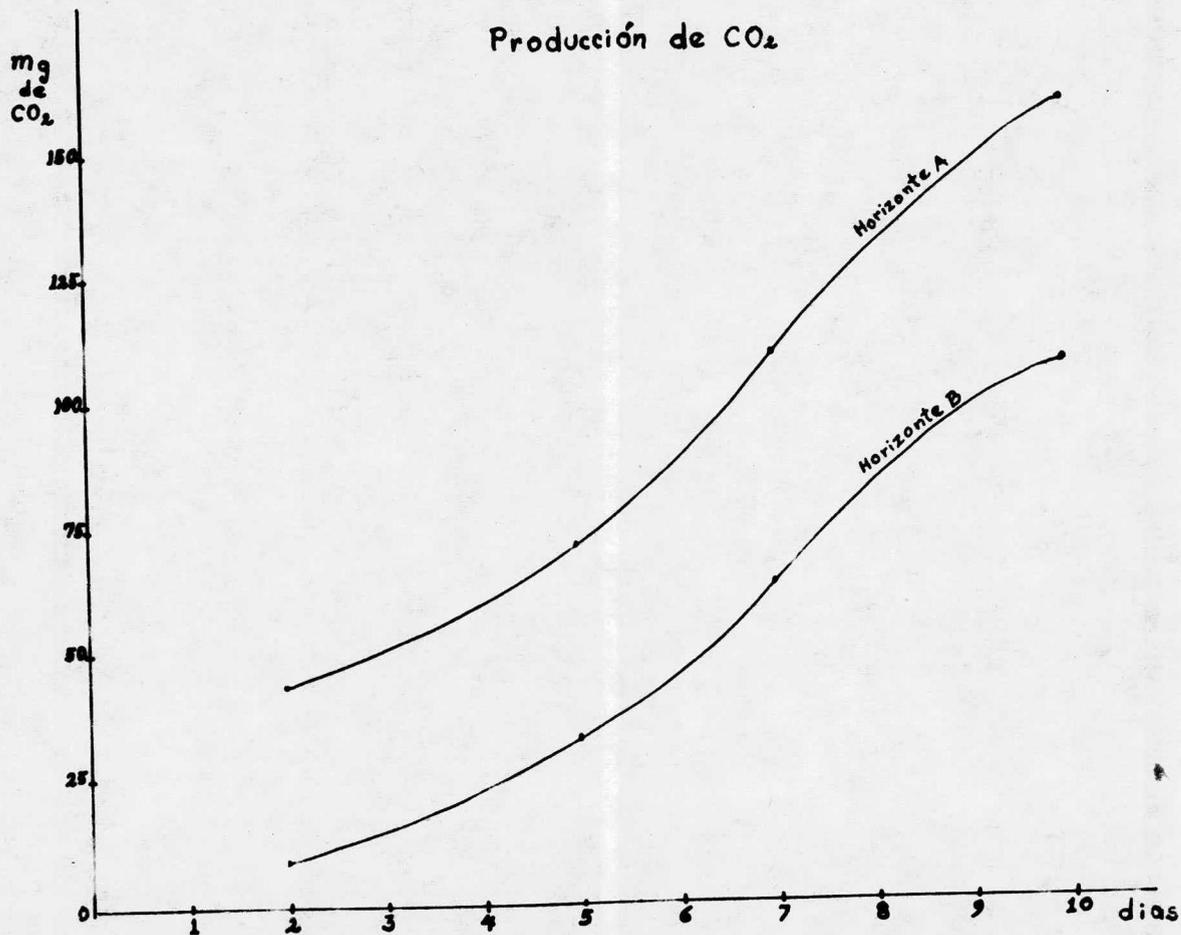
Profundidad del suelo - en cm.	Fecha de muestreo	Color suelo seco.	Color suelo húmedo.	pH 1:2.5	Materia Orgánica	Nitrógeno total (%)	Textura	Porcentaje de humedad.
0 - 20	Mayo/78	10YR 3/3 café obs <u>u</u> curo.	10YR 2/1 negro.	7.95	-----	0.43	Migajón Arenoso.	20
20 - 40	Mayo/78	10YR 5/3 café.	10YR 2/2 muy café oscuro.	7.90	-----	0.29	Migajón Arenoso.	15
0 - 20	Agosto/78	10YR 3/3 café obs <u>u</u> curo.	10YR 2/1 negro.	7.00	21.9	0.63	Migajón Arenoso	78
20 - 40	Agosto/78	10YR 5/3 café.	10YR 2/2 café obs <u>u</u> curo.	7.15	9.2	0.21	Migajón Arenoso.	54
0 - 20	Enero/79	10YR 3/3 café obs <u>u</u> curo.	10YR 2/1 negro.	6.95	-----	0.99	Migajón Arenoso.	62
20 - 50	Enero/79	10YR 5/3 café	10YR 2/2 muy café oscuro.	7.00	-----	0.32	Migajón Arenoso.	38

TABLA 6 PRODUCCION DE CO₂ *

HORIZONTE	DIAS	CONCENTRACION/mgm- CO ₂ (acumulativo)
A	2	44.0
A	5	70.4
A	7	112.2
A	10	158.6
B	2	8.8
B	5	33.0
B	7	67.0
B	10	105.4

* Nota: Se uso la muestra de agosto de 1978.

Producción de CO₂



CONCLUSION

Siendo el suelo un sistema tan complejo se puede concluir que para encontrar relaciones entre la actividad enzimática y el número de microorganismos es necesario estudiar ciertos factores fisicoquímicos presentes en el suelo como son la absorción de las enzimas en las partículas de suelo y por consecuencia el tamaño de estas, la concentración de iones hidrógeno, la capacidad de intercambio catiónico, fenómenos de antagonismo, la degradación de las enzimas por microorganismos, la concentración del sustrato específico la inhibición por sustancias afines, tipo de material orgánico etc. En conjunto son un complejo de factores que nos limitan el entendimiento de las relaciones que existen en el suelo. Para resolver este problema es necesario efectuar, e implementar mejores metodologías de estudio.

En nuestro trabajo se encontró que en lo referente a la actividad enzimática de amilasa y celulasa existen en forma general una relación entre dichas actividades y la cantidad de microorganismos presentes en el suelo respecto a la actividad de la deshidrogenasa que en una enzima endógena no se encontró relación, entre ella y la actividad microbiana del suelo.

La cuantificación de microorganismos de actividad bioquímica específica no se pudo relacionar con actividad biológica debido a la extrema variabilidad de los resultados.

La determinación de índices de actividad biológica de un suelo no es un proceso fácil de definir, ya que es el resultado neto de numerosos procesos que acontecen en el suelo.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- AARONSON S. (1970) *Experimental Microbial Ecology*. Academic Press Inc New N.Y. USA. págs. 94-95.
- 2.- ALEXANDER M. (1977) *Introduction to Soil Microbiology* John Wiley & Sons. Inc. New York N.Y. USA.
- 3.- ARTEAGA R.E. (1975) ESTUDIOS DE METODOLOGIA PARA EL AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION DE LEVADURAS EN SUELOS FORESTALES Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM.
- 4.- BALICKA N. and TRZBINSKI M. (1956) *Acta Microbial. Polon.*, 5, - 377.
- 5.- BECK T. and POSCHENRIEDER H. (1963) *Plant Soil* 18, 346.
- 6.- BLACK C.A. Editor (1965) *METHODS OF SOIL ANALYSIS PART 2 CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL PROPERTIES*. Number 9 in The Series Agronomy - American Society of Agronomy Madison Wisconsin USA.
- 7.- BRIGGS M.H. and L. SEGAL. (1963). *Life Sci.*, 69.
- 8.- BUNT J.S. and ROVIRA A.D. (1955) *MICROBIOLOGICAL STUDIES OF SOME SUBANTARCTIC SOILS*. *Jour. Soil Sci.* Vol 6:11 9-128.
- 9.- BURANGULOVA F.N. and KHAZIERV F. kh. (1965) *Agrokem Telajtan* 14, 101.

- 10.- CASIDA I.E., KLEIN D.A. and SANTORO THOMAS (1964) SOIL DESHIDRO-
GENASE ACTIVITY. *Soil Science*, Vol 98: 371-376.
- 11.- CASHEL M. and FREESE E. (1964) *Biochem Biophys. Res. Commun*, -
16, 541.
- 12.- CHERONIS, N.D. and STEIN H. (1956) TETRAZOLIUM SALTS AS CHEMICAL
REAGENTS. *J. Chem. Educ.* Vol 33:120.
- 13.- COBB MARY J, (1931) A QUANTITATIVE STUDY OF THE MICROORGANIC PO-
PULATION OF A HELMOCK AND A DECIDUOUS FOREST SOIL. *Soil Science*,
Vol XXXIII, No 5: 325-345.
- 14.- CONRAD J.P. (1940) *Soil Sci.* 49, 253.
- 15.- CORKE C.T. and CHASE F.E. (1964) COMPARATIVE STUDIES OF ACTINOMY-
CETES POPULATIONS IN ACID PODZOLIC AND NEUTRAL MULL FOREST SOILS.
Soil Sci., Society Proceedings. Vol. 28:68-70.
- 16.- CREWTER W.G. and LENNOX F.C. (1953) *Australian J. Biol. Sci.* -
Vol 6:410.
- 17.- CUPPELS D. and KELMAN A. (1974) EVALUATION OF SELECTIVE MEDIA /
FOR ISOLATION OF SOFT ROT BACTERIA FROM AND PLANT TISSUE.
Phitopathlogy. Vol. 64:468-475.
- 18.- DARAGAN A. Yu., SUSCHOVA and KATZNELSON, (1963) *Tr. Bot. Inst.* -
Akad. Nauk SSSR, 3(14): 160.

- 19.- DAZZO FRANK B., PAUL II SMITH and HUBBELL D. (1974).
CHANGES THE RHIZOSPHERE EFFECT OF MILLET ASSOCIATED WITH SPRINKLER IRRIGATION WITH ANIMAL WASTES. J. Environ, Quality Vol. 3 - No 3: 270-273.
- 20.- DOMMERGUES Y. (1960) Agron. Trop. (nogent-sur-marne), 15:381.
- 21.- DROBNIKOVA (1961) Folin Microbiol. (Prague), 6:260.
- 22.- ECHEGARAY A.A. (1975) Practicas de Microbiologia Agrícola Facultad de Química UNAM. México D.F.
- 23.- ESTERMANN, E.F., G.H. PETERSON, and A.D. McLAREN, Soil Sci. Soc. Am. Proc., 23, 31 (1959).
- 24.- FOCHT D.D. and JOSPEH H. (1973) AN IMPROVED METHOD FOR THE ENUMERATION OF DENITRIFYING BACTERIA. Soil Science Society American - Proceedings. Vol 37: 698-699.
- 25.- GELLER I.A. and DOBROTOVORSKAYA O.M. (1960) Visn. Siskogospodar Nauki, 3 (1), 38.
- 26.- GELLER I.A. and DOBROTOVORSKAYA E.M. (1961) Tr. Inst. Mikrobiol-Akad. Nauk SSSR, Vol II: 215.
- 27.- GLASTYAN A. Sh. (1963) Dokl. Akad. Nauk. Arm. SSR, 36:225.
- 28.- GLASTYAN A. Sh. (1965) Pochvovedenie, 2:68.

- 29.- GLASTYAN A.Sh. (1964) Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 156:166.
- 30.- GLASTYAN A.Sh. and TSYUPA G.P. (1959) Izv. Akad. Nauk. Arm. SSR., Biol, Nauki, 12 (10): 83.
- 31.- GOODFELLOW M. (1968) PROPERTIES AND COMPOSITION OF THE BACTERIA-FLORA OF A PINE FOREST SOIL. Soil Science. Vol 19 Num 1: 154.
- 32.- GODFELLOW M. and DAWSON D. (1978) QUALITATIVE AND QUANTITATIVE - STUDIES OF BACTERIA COLONIZING PICEA STHENSTIS LITTER. Soil Biol. Biochem. Vol 10: 303-307.
- 33.- GRAY P.H.H. and THORNTON H.G. (1928) Zentr. Bacteriol. Parasitenk., Abt II: 73,74.
- 34.- GRAY P.H.H. and TAYLOR C.B. (1935) A MICROBIOLOGICAL STUDY OF - PODSOL SOIL PROFILES II. Laurentian Soils Canad. J. Res. C. 13:- 251-255.
- 35.- HAIG A.D. (1955) Tesis, Univ., Calif. Davis.
- 36.- HANKIN L., ZUCKER M. and SANDS D.C. (1971) IMPROVED SOLID MEDIUM FOR THE DETECTION AND ENUMERATION OF PECTOLYTIC: BACTERIA Applied. Microbiology. Vol 22: 205-209.
- 37.- HANKIN L., SAND DAVID G. and HILL DAVID E. (1974) RELATION OF LAND USE TO SOME DEGRADATIVE ENZYMATIC ACTIVITIES OF SOIL BACTERIA. Soil Science. Vol 118 No 1: 38-44.

- 38.- HARRIGAN W.F. and McCANCE M.E. (1966) Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press Inc. London England.
- 39.- HIRTE W. (1963) Zentr. Bacteriol, Parasitenk. Abt II, 116:478.
- 40.- HOFMANN E. (1963) in Recent Progress in Microbiology, Vol VIII - Univ. Toronto Press, p. 216.
- 41.- HOFMANN E. and HOFFMANN G. (1955) Z. Pflanzenernaehr. Dueng Boden., 70: 9.
- 42.- HOFFMANN B. (1959) Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenk 85:97.
- 43.- HOFMANN Z. and HOFMANN G. (1955) Z. Pflanzenernaehr. Dueng Bodenk., 70:97.
- 44.- HOFMANN VON E.D. and HOFFMANN G.G. (1966) DIE BESTIMMUNG DER BIOLOGISCHEN TATIGKEIT IN BODEN MIT ENZYMMETHODEN, in advances in Enzymology. Vol 28:365-388. Interscience Publishers John Wiley and Sons. New York, N.Y. U.S.A.
- 45.- HOLDING A.J. and FRANKLIN D.A. and WARRING R. (1965). THE MICROFLORA OF PEAT-PODZOL TRANSITIONS. Journal of Soil Science. Vol 16 No 1:44-59.
- 46.- HOLM ESTHER and JENSEN VAGN (1972) AEROBIC CHEMOORGANOTROPHIC BACTERIA OF A DANISH BEECH FOREST. Oikos 23:248-260.

- 47.- HUBNER G. (1956) *Wiss Z. (Laipzig)*, 6:425.
- 48.- ICHIO NIOH and MASAMI ASA (1972) MICROORGANISMS IN THE FOREST - SOILS WITH DIFFERENT VEGETATION. *Soil Science and Plant Nutrition*. Vol 18 No 4: 129-132.
- 49.- JACQUET VILLETTE and RICHOV R. (1956) *Rev. Immunol.* 20:191.
- 50.- JACKMAN R.H. and BLACK C.A. *Soil Sci.*, 73:117, 167.
- 51.- JACKSON M.L. (1958) *Soil Chemical Analysis*. Prentice Hall Inc. - New. Yersey. U.S.A.
- 52.- JENSEN H.L. (1930) ACTINOMYCETES IN DANISH SOILS. *Soil Sci.* Vol. XXX No 1: 59-77.
- 53.- KELLING J. CAMUS A., SAVIGNAC G., DAUCHEZ P., and PLANET (1960)- *Compt. Rend.*, 46:647.
- 54.- KISS S. and PETERFI S. (1961) *Studii Cercetari, Biol.* 12 (2): - 209.
- 55.- KISS I. (1957) *Agrokem Talajtan* 6, 65.
- 56.- KOZLOV K.A. and MIKHILOVA E.N. (1965) *Pochvovedenie* (2); 58.
- 57.- KOZLOV K. (1964) *Folia Microbiol. (Prague)*, 9 (3); 145.

- 58.- KRAMER M. and G. YERDEI (1959) APPLICATION OF THE METHOD OF PHOSPHATASE ACTIVITY DETERMINATION IN AGRICULTURAL CHEMISTRY Soviet - Soil Sci. Vol 9:1100-1103.
- 59.- KROLL L., KRAMER M., and E. LORENIEZ (1955) Agrochem. Talajtan 4:173.
- 60.- KROLL L. and KRAMER M., (1955) Naturwiss 42: 157.
- 61.- KUPREVICH V.F. (1951) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 79:863.
- 62.- LENHARD B. (1956) Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk 73:1.
- 63.- MAL'CHEVKAIA N.I. (1935) MICROBIOLOGICAL CHARACTERS OF CERTAIN TYPES OF FOREST SOILS. Pedology (Russian) 3:225-239.
- 64.- MARKUS L. (1955) Agrochem. Talajtan, 4:207.
- 65.- MARTIN J.P. (1950) USE OF ACID ROSE BENGAL AND STREPTOMYCIN IN THE PLATE METHOD FOR ESTIMATING SOIL FUNGI. Soil Sci. Vol 69:215-233.
- 66.- MORTLAND M.N. and GIESEKING J.E. (1952) Soil Sci. Soc. Am. Proc., 16:10.
- 67.- MCGARITY J.W. and MYENS M.G. (1967) A SURVEY OF UREASE ACTIVITY IN SOILS OF NORTHERN NEW SOUTH WALES. Plant and Soil Vol 27:217-238.

- 68.- McLAREN A.D., RESHETKO L., and HUBER W. (1957) Soil Sci. Vol -
83:497.
- 69.- McLAREN A.D. and SKUJINS (1967) Ecology of Soil Bacteria Liver-
pool Univ. Press. England.
- 70.- NOVOGRUDKAYA E.D. (1963) Agrobiologiya 880.
- 71.- OVERBECK J. and BABENZIEN H.D. (1963) Naturwiss 50: 571.
- 72.- PANCHOLY S.K. and RICE E.L. (1973) SOIL ENZYMES IN RELATION TO -
OLD FIELD SUCCESSION: Amilases, Celulase, Invertase, Dehidrogena-
se, Urease. Soil Sci. Soc. Am. Proc. Vol 37: 47-51.
- 73.- PETERSON N.V. (1961) Mikrobiol. Zh. Akad. Nauk Ukr. RSR. 23 (6):5.
- 74.- PETERSON N.V. (1965) Mikrobiol. Zh. Akad. Nauk Ukr. RSR.
27 (4): 18.
- 75.- PHAFF H.J. (1959) in Handbuch der Pflanzenphysiologie, Vol XI -
Springer, Berlin, p. 76.
- 76.- RAMIREZ - MARTINEZ and McLAREN A.D. (1966) Enzymologia 31:23.
- 77.- RAZUMDY A.S. and REMEZOV N.P. (1928) DISTRIBUTION OF MICROORGA--
NISMS IN THE PROFILES OF PODZOL SOIL. Jour. ALL Ross Cong. Bot,-
1928:210.

- 78.- REMACLE J. (1971) SUCCESSION IN THE OAK LITTER MICROFLORA IN FOREST AT MESNIL EGLISE BELGIUM. *Oikos* 22:411-413.
- 79.- ROGERS H.T. (1942) *Soil Sci.* Vol 54:439.
- 80.- ROSS D.J. (1965) *J. Soil Sci.*, 16:86.
- 81.- ROSS D.J. (1966) A SURVEY OF THE ACTIVITIES OF ENZYMES HYDROLYZING SUCROSE AND STARCH IN SOILS UNDER PASTURE *J. Soil Sci.*, Vol-17:1-15.
- 82.- ROSS D.J. (1973) SOME ENZYME AND RESPIRATORY ACTIVITY OF TROPICAL SOILS FROM NEW HEBRIDES. *Soil Biol. Biochem.* Vol 5 págs. 559-567.
- 83.- ROTINI O.T. (1933) in *Atti Della Soc. Italiana per il Progresso delle Scienze*, XXI Riunions, Roma, Vol II.
- 84.- ROTUELA GOPALS and Cowling E.B. (1966).
SIMPLE CULTURAL TEST FOR RELATIVE CELLULOYTIC ACTIVITY OF FUNGI.
Applied Microbiology Vol 14 No 4:892-898.
- 85.- SCHARER K. (1928) *Z. Pflanzenernaehr. Dueng Bodenk.*, 12:323.
- 86.- SCHAEFER. T. (1963) *Ann. Inst. Pasteur*, 105:326.

- 87.- SKUJINS J.J. (1962) CHARACTERIZATION OF PHOSPHATASE IN A TERRESTRIAL SOIL STERILIZED WITH AN ELECTRON BEAM. *Enzymology*. Vol 25:123-125.
- 88.- SKUJINS J.J. (1967) Enzymes in Soil in *Soil Biochemistry* Edited by McLaren A.D. and Peterson C.H. págs 371-407 Marcel Dekker, Inc., New York N.Y. U.S.A.
- 89.- SORENSEN H. (1957) *Acta agr, Scand, Suppl.*, 1:1.
- 90.- STEUBING L. (1970) STUDIES OF THE NUMBER AND ACTIVITY OF MICROORGANISMS IN WOODLAND SOILS, IN ANALYSIS OF TEMPERATE FOREST ECOSYSTEMS. Edited by Reichle E. Springer Verlag New York U.S.A. págs 131-146.
- 91.- STEVENSON I.L. and KATZNELSON, (1958) *Bacterial Proc.*, Vol 58:10.
- 92.- STEVENSON I.L. (1959) *Can J. Microbiol.*, 5:229.
- 93.- STEVENSON I.L. (1962) *Can J. Microbiol.*, 9:501.
- 94.- STOUT J.D. (1958) BIOLOGICAL STUDIES OF SOME TUSsock GRASSLAND SOILS. *N.Z.J. Agric. Res. Núm.* 1:9430957.
- 95.- STOUT J.D. (1961) A BACTERIAL SURVEY OF SOME NEW ZEALAND FORESTLAND, PEATS. *N.Z.J. Agric. Res.* Vol 4:1-30.
- 96.- SWINGLE-BRANSON. (1964) Tesis, Kansas State Univ., Manhattan, Kan.

- 97.- TIMONIN MI. (1935) THE MICROORGANISMS IN PROFILES OF CERTAIN VIRGIN SOILS IN MANITOBA. *Canad. J. Res. C.* 13, 32-46.
- 98.- VANDECAVEYE S.C. and KATZNELSON H. (1940) MICROBIAL ACTIVITIES IN SOIL: MICROBIAL NUMBERS AND NATURE OF ORGANIC MATTER. *Soil Sci.* Vol, 50:295-311.
- 99.- VASILENKO E.S. (1962) *Pochvovedenie* (11): 61.
- 100.- VELA G.R. (1964) Tesis Univ. Texas Austin.
- 101.- Visotskii G.N. (1902) *Lesoprom. Vestn.* 29:504.
- 102.- VLASYUK P.A., DOBROTOVORSKAYA K.M. and CORKIENKO, (1957). *Dokl. Vses. Akad. Selskokhoz, Nauk*, 22(3):14.
- 103.- VOLZ M.G. (1977) DENITRIFYING BACTERIA CAN BE ENUMERATED OF NITRITE BROTH *Soil Science. Soc. AM. J.* Vol 41:544-551.