

**COMUNIDAD BACTERIANA CULTIVABLE ASOCIADA
A LA RIZOCORAZA DE *Amaranthus hypochondriacus*
Cultivable Bacterial Community from the Rhizosphere of *Amaranthus hypochondriacus***

**Iván Pável Moreno-Espíndola¹, María Jesús Ferrara-Guerrero^{2‡}, Fernando De León-González³,
Facundo Rivera-Becerril² y Diego González-Halphen⁴**

RESUMEN

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) es tolerante a las condiciones de semiaridez y se adapta a los suelos arenosos de la región central del Valle de México. A pesar de su importancia agronómica, poco se conoce sobre las interacciones suelo-planta-microbiota en esta especie vegetal. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los cambios fenotípicos de la comunidad bacteriana en función de los caracteres fisiológicos y bioquímicos, y su contribución al enriquecimiento nutricional, en la rizocoraza de amaranto cultivado en un suelo arenoso del Valle de México. Se tomaron muestras de suelo de rizocoraza en cuatro épocas del cultivo (siembra, floración, cosecha y postcosecha); se purificaron y caracterizaron 38 aislados bacterianos considerando 8 pruebas fisiológicas y 34 bioquímicas. Los resultados revelaron un elevado potencial heterótrofo de la comunidad bacteriana. Un análisis de conglomerados y de distancia euclidiana de Ward, considerando las pruebas fisiológicas y bioquímicas aplicadas, separó los aislados en tres fenones, un par y un aislado solo; con base en dichos análisis y su comparación con las descripciones del Manual de Bergey, los aislados bacterianos podrían pertenecer a las familias Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Streptomycetaceae. En relación a su capacidad degradativa, los aislados bacterianos procedentes de

cosecha y postcosecha mostraron una mayor producción de enzimas extracelulares DNAsas, quitinasas, fosfatasas y esculinasas. Finalmente, se resaltó el potencial biotecnológico agrícola de los aislados bacterianos procedentes de la rizocoraza de amaranto.

Palabras clave: bacterias heterótrofas, enzimas extracelulares, suelo arenoso, fisiología bacteriana.

SUMMARY

Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) is a plant species that tolerates the semiarid conditions prevailing in sandy soils in the central Valley Mexico region. In spite of its agronomic relevance, there is a lack of information about the soil-plant-microbe interactions in this plant species. The aim of this research was to study the phenotypic changes of the bacterial community considering physiological and biochemical traits, as well as its contribution to the delivery of available nutrients, in the rhizosphere of amaranth cultivated in a sandy soil in the Valley of Mexico. Rhizosphere soil samples were extracted at four stages of the crop plant (seeding, flowering, harvest and postharvest); 38 bacterial isolates were purified and characterized following 8 physiological and 34 biochemical tests. The results revealed high heterotrophic potential in the bacterial community. A cluster analysis and the index of similarity and Euclidean distance of Ward considering all physiological and biochemical applied tests, grouped the 38 isolates in 3 phenons, one pair and one isolate alone. This analysis and its comparison with general descriptions contained in the Bergey's Manual revealed that bacterial isolates belong to the Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Streptomycetaceae Families. In relation to their capacity of degradation, the bacterial isolates from harvest and postharvest stages showed the highest production of the extracellular enzymes DNase, chitinase, phosphatase and esculinase. Finally,

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, ² Depto. El Hombre y su Ambiente, ³ Depto. de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México D.F., México.

[‡] Autor responsable (fgmd6735@correo.xoc.uam.mx)

⁴ Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., México.

the potential for agricultural biotechnology of bacterial isolates from the rhizosphere of amaranth is emphasized.

Index words: *extracellular enzymes, bacterial physiology, heterotrophic bacteria, sandy soil.*

INTRODUCCIÓN

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), planta cultivada por los Aztecas en Mesoamérica desde la época precolombina, no se ha estudiado lo suficiente a pesar de las cualidades alimenticias que se le reconocen. Las diferentes especies del género *Amaranthus* tienen la capacidad de adaptarse a diversos entornos bajo presiones ambientales como salinidad, baja humedad, altas temperaturas y presencia de insectos (Bressani, 2003). *A. hypochondriacus*, una de las especies cultivadas del género *Amaranthus*, es originario de México, tolera las condiciones de semiaridez, características de la región central del Valle de México. A pesar de su importancia agronómica, se conoce muy poco sobre los aspectos biológicos del cultivo como es el caso de la microbiota con la que se asocian sus raíces.

Los microorganismos del suelo son fundamentales en los agroecosistemas debido a que participan en la formación de la estructura edáfica (Caesar-TonThat *et al.*, 2007) y en la descomposición de la materia orgánica (MO) por medio de la producción de enzimas extracelulares (Gil-Sotres *et al.*, 2005; Allison y Jastrow, 2006). Dichas funciones favorecen el crecimiento vegetal (Garbeva *et al.*, 2004) al aumentar la disponibilidad de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo (Kohler *et al.*, 2007), además de participar en la degradación de sustancias tóxicas (plaguicidas, herbicidas, hidrocarburos) (Elsas *et al.*, 1997; Abed *et al.*, 2002; Garbeva *et al.*, 2004; López y Dias, 2004; Solyanikova y Golovleva, 2004; Nwaogu *et al.*, 2008). En el ambiente edáfico, la región de la rizosfera concentra la mayor proporción de los microorganismos activos, los cuales utilizan los compuestos mucilaginosos (azúcares solubles, antibióticos, ácidos orgánicos y compuestos volátiles) exudados por las células radicales (McCully, 2005; Lesuffleur *et al.*, 2007). Dentro de la rizosfera se incluyen micro hábitats particulares como la rizocoraza que es una estructura muy resistente y frecuente en plantas establecidas en suelos arenosos; las rizocorazas están formadas por una densa capa de granos de arena y limo alrededor de las raíces finas de las plantas, sujetadas

principalmente por los pelos radicales absorbentes (McCully, 1999). Las rizocorazas se han encontrado principalmente en raíces de gramíneas (Read y Gregory, 1997; Haling *et al.*, 2010) y más recientemente en *A. hypochondriacus* y *Helianthus annuus* (girasol) (Moreno-Espíndola *et al.*, 2007). La unión estrecha entre las raíces y las partículas del suelo favorece la concentración de compuestos orgánicos exudados por la planta así como el aumento de la actividad microbiana, especialmente las bacterias que colonizan la coraza (Toal *et al.*, 2000; McCully, 2005). En la rizocoraza existe una red de interacciones de señales químicas que enlazan las raíces con la microbiota asociada (Mathesius, 2003).

La importancia de los índices de producción de enzimas extracelulares (IME), radica en el papel que juegan las poblaciones microbianas en la liberación al suelo de nutrientes disponibles, útiles para otros organismos (Cerón y Melgarejo, 2005; Roesti *et al.*, 2005); dicha participación es mediada por la producción de enzimas intra y extracelulares (Schimel y Weintraub, 2003; Raynaud *et al.*, 2006). La identificación de las enzimas que puede producir una bacteria permite conocer su perfil degradativo, el cual estará en relación con las rizodeposiciones (Alami *et al.*, 2000; Nannipieri *et al.*, 2003).

Los suelos de la zona montañosa del sur del Valle de México son poco intemperizados y se caracterizan por un alto contenido de minerales de pómez y feldespatos (De León-González *et al.*, 2007); son propensos a la erosión, lo cual afecta la producción de amaranto, maíz, nopal y flores en la región. En estos suelos los componentes biológicos como la comunidad microbiana y las raíces de las plantas cultivadas participan activamente en la formación de macroagregados estables (de 2 a 5 mm) (De León-González *et al.*, 2006). Moreno-Espíndola *et al.* (2007), reportaron que la presencia de rizocorazas favorecen la estructura de suelos inestables.

Los microorganismos juegan un papel clave en los procesos que se llevan a cabo en los ecosistemas, incluyendo la adquisición de nutrientes, los ciclos del carbono y del nitrógeno, y la formación de suelo, por lo que tienen una influencia directa o indirecta sobre la productividad, diversidad y composición de la comunidad vegetal. Debido a lo anterior, la agricultura actual plantea el uso de biofertilizantes como una herramienta para el desarrollo agrícola sostenible (Terry y Leyva, 2006; Fernández *et al.*, 2006; Philippot *et al.*, 2006). El estudio

de la comunidad microbiana asociada a *A. hypochondriacus* en suelos arenosos del centro de México con problemas de estabilidad estructural, generará información valiosa para el diseño de estrategias de manejo tanto del cultivo, como del potencial biotecnológico de las bacterias asociadas. El uso de inóculos bacterianos para producir biofertilizantes debe partir de la identificación de las capacidades metabólicas de los microorganismos naturalmente asociados a la planta de interés y del suelo en el que se establecen (Uribe *et al.*, 2010). El objetivo del presente trabajo fue estudiar los cambios fenotípicos de la comunidad bacteriana en relación con los caracteres fisiológicos y bioquímicos y su contribución al enriquecimiento nutricional de los suelos de rizocoraza de *A. hypochondriacus*, en diferentes etapas: siembra, floración, cosecha y postcosecha, en un suelo arenoso del Valle de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Sitio de Estudio y Características del Suelo

El sitio experimental se ubica en Tulyehualco, México D. F. (19° 15' N, 99° 13' O, 2280 msnm). El suelo se clasifica como Udic Ustifluent (Soil Survey Staff, 2003) o Eutri-Tephric Fluvisol (Segura *et al.*, 2005); se compone de 70, 140 y 790 g kg⁻¹ de arcilla, limo y arena, respectivamente; y presenta baja estabilidad estructural (De León-González *et al.*, 2007). El clima es templado, con una precipitación anual de 537 mm; la temperatura media es de 17.3 °C. El suelo se ha trabajado bajo labranza mínima en los cinco años previos, realizando el deshierbe con azadón. Las parcelas experimentales tuvieron una superficie de 9 m² (4 parcelas en total). Las semillas de amaranto se sembraron directamente en la parcela durante julio de 2008; las plantas se desarrollaron en condiciones de temporal. Se aplicó una dosis única de fertilización (80-40-00, N-P-K) en la época de floración. Se obtuvieron dos monolitos de suelo-raíces de amaranto mediante un cilindro de PVC (25.5 cm de diámetro interior por 37.5 cm de largo) en cuatro épocas: en el momento de la siembra (testigo), en la floración, durante la cosecha y la postcosecha (0, 45, 90 y 120 días después de la siembra, respectivamente). Se tomaron muestras de suelo adherido a la rizocoraza de las plantas de amaranto con una aguja de disección estéril. El suelo

de rizocoraza de los dos monolitos obtenidos en cada época de cultivo, se dividió en nueve muestras de 5 g cada una. Todas las muestras se preservaron en 45 mL de glicerol al 20%, a -18°C en oscuridad.

Aislamiento y Purificación Bacteriana

Para el aislamiento de las bacterias se tomó una alícuota de 1 mL de la suspensión de suelo de cada una de las muestras preservadas en glicerol al 20%, previamente homogeneizada. La purificación se realizó por el método de serie de cinco diluciones decimales en agar nutritivo (AN) y en agar extracto de suelo (AS) (Hamaki *et al.*, 2005). La temperatura de incubación fue de 27 °C y el tiempo de incubación de los cultivos fue de 24 h en AN y de 72 h en AS. De un total de 320 colonias obtenidas, se eligieron 38 colonias bacterianas completamente al azar abarcando las cuatro épocas de muestreo y los dos medios de cultivo. Cada aislado bacteriano se resembró de tres a cinco veces hasta purificarlo; su pureza se confirmó al analizar las características coloniales respecto a la forma celular con un microscopio en contraste de fase 100x (Olympus Bimax 50) y por la respuesta a la tinción de Gram (Prescott *et al.*, 1999). Asimismo, se observó la presencia de cuerpos intrusivos, cápsula, formación de esporas y el metabolismo respiratorio (oxidación y fermentación de glucosa, reducción de sulfatos, reducción de nitratos, actividad catalasa y citocromo-oxidasa) (Hugh y Leifson, 1953; Kovacs, 1956; Meynell y Meynell, 1979; MacFaddin, 2003).

Producción de Enzimas Extracelulares

La capacidad de producción de enzimas extracelulares se evaluó en medios de cultivo específicos en placa (Lányi, 1987). Se probó la producción de ocho enzimas extracelulares (g L⁻¹): a) Esculinasa: peptona 1; esculina 1 mL L⁻¹; FeSO₄ 1; agar bacteriológico (ab) 20; medio base dulce (mbd), 1 L, a pH 7; b) Fosfatasa: Na-p-nitrofenilfosfato 2; Tris-HCL 50 mL L⁻¹; ab 20; mbd 1 L, a pH 7; c) Quitinasa: quitina molida 1; ab 20; mbd 1 L, a pH 7; d) Amilasa: almidón soluble 1.5; agar 20; mbd 1 L, a pH 7; e) DNAsa: medio DNAsa (Bioxon) 47.2; ab 20; mbd 1 L, pH 7; f) Lipasa: polisorbato 80 10 mL L⁻¹; CaCl₂ 0.1; mbd 100 mL; pH 7; g) Gelatinasa: medio gelatinasa (Bioxon) 11; mbd 1000 mL; pH 7; h) Lecitinasa: mbd 500 mL; yema

de huevo 50 mL. La formulación del medio base dulce (mbd) utilizado en todas las pruebas exoenzimáticas fue (g L⁻¹): Na₂HPO₄ 12H₂O 3.5; KH₂PO₄ 0.98; MgSO₄ 7H₂O 0.03; NH₄Cl 5.0; solución de oligoelementos 0.2 mL L⁻¹. La solución de oligoelementos consistió de (g L⁻¹): EDTA monobásico 50; ZnSO₄ 7H₂O 2.2; CuCl₂ 2H₂O 5.5; MnCl₂ 4H₂O 5; FeSO₄ 7H₂O 4.7; CuSO₄ 5H₂O 1.5; CaCl₂ 6H₂O 1.6. Para cada enzima extracelular se realizaron cultivos en placa por triplicado, incubados a 27 °C por 48 h. A partir de los resultados positivos de estas pruebas se calculó el índice medio de producción de las mismas (IME), el cual indica la proporción de aislados bacterianos que participan en la hidrólisis de la materia orgánica (MO) presente en la rizocoraza (Ferrara-Guerrero, 1993), empleando la Ecuación 1:

$$IME = \sum \frac{RP}{Ne} \quad (1)$$

donde:

RP = frecuencia de respuestas positivas a la producción de cada enzima extracelular

Ne = número de enzimas probadas

Caracteres Nutricionales de los Aislados Bacterianos

Esta parte del análisis fenotípico se basó en las capacidades nutricionales de cada aislado bacteriano con base en la utilización de compuestos orgánicos simples como única fuente de carbono y energía. Para cada aislado bacteriano se probaron veintiséis sustratos orgánicos de acuerdo a lo propuesto por Stanier *et al.* (1966): a) aminoácidos: serina, glutamato, prolina, triptófano, arginina, ornitina, alanina y metionina, b) carbohidratos: arabinosa, glucosa, ribosa, sacarosa, gluconato y almidón, c) ácidos orgánicos: malonato, succinato, fumarato, adipato, lactato y citrato, d) ácidos grasos: acetato, propionato y capronato y e) alcoholes: manitol, sorbitol y glicerol. Cada prueba se realizó por triplicado y se incluyó un testigo que únicamente contenía el sustrato sin inocular. Las pruebas se realizaron con medio mineral base dulce y la fuente de carbono a una concentración final de 0.1%, con excepción de los azúcares donde fue de 0.2%. Cada tubo de prueba se inoculó con 0.5 mL del cultivo bacteriano, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días; el crecimiento microbiano se verificó visualmente. Con los resultados

de esta prueba se calculó el índice medio de utilización (IMU) de los compuestos orgánicos, que indica la cantidad de sustratos utilizados por cada aislado bacteriano (promedio de utilización de sustratos de una familia química, de un compuesto o del total de compuestos probados). La Ecuación 2 para calcular el IMU fue:

$$IMU = \sum \frac{p}{N} \quad (2)$$

donde:

p = porcentaje de utilización de cada compuesto (suma de los compuestos utilizados entre el número total de compuestos probados)

N = número total de compuestos probados para cada familia química

Análisis Estadístico

Para identificar los diferentes fenotipos bacterianos presentes en la rizocoraza del amaranto a lo largo del estudio, se empleó un método de análisis multivariado de conglomerados estableciendo la distancia euclidiana y el logaritmo de Ward. Para ello se empleó el programa STATISTICA 8.0®. Los resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas se trabajaron en lenguaje binario.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los treinta y ocho aislados bacterianos procedentes de la rizocoraza de amaranto, caracterizados en el presente estudio (Cuadro 1, Figura 1), mostraron una capacidad elevada para hidrolizar hidratos de carbono de alto peso molecular, lípidos y proteínas de los tejidos vegetales y animales en descomposición presentes en el suelo (Cuadro 2 y 3). En general, la forma celular predominante en los aislados bacterianos fue bacilar; únicamente dos de ellos presentaron forma filamentososa (AN1E1 y AS2E1b). En el 86% de los aislados se observó la formación de espora, ninguno presentó cápsula y en el 44% se encontraron cuerpos intrusivos. El 86.8% de los aislados fueron Gram positivo y el restante 13.2% Gram negativo.

Con excepción de los aislados AS1E1, AS5E1a, AN5E2 y AN3E4b, todos presentaron respuesta positiva a la oxidación de glucosa en condiciones aerobias; salvo

Cuadro 1. Nomenclatura de 38 aislados bacterianos obtenidos de rizocorazas de *Amaranthus hypochondriacus* establecido en un suelo arenoso pomáceo del sur del Valle de México.

Clave	Medio de cultivo	Época	Clave	Medio de cultivo	Época
AN1E1	Agar nutritivo	Siembra	AN1E3	Agar nutritivo	Cosecha
AN2E1	Agar nutritivo	Siembra	AN2E3	Agar nutritivo	Cosecha
AN3E1a	Agar nutritivo	Siembra	AN3E3a	Agar nutritivo	Cosecha
AN4E1a	Agar nutritivo	Siembra	AN4E3	Agar nutritivo	Cosecha
AN5E1b	Agar nutritivo	Siembra	AN5E3	Agar nutritivo	Cosecha
AS1E1	Agar suelo	Siembra	AS1E3	Agar suelo	Cosecha
AS2E1b	Agar suelo	Siembra	AS2E3	Agar suelo	Cosecha
AS4E1b	Agar suelo	Siembra	AS3E3	Agar suelo	Cosecha
AS5E1a	Agar suelo	Siembra	AS4E3	Agar suelo	Cosecha
AN1E2	Agar nutritivo	Floración	AN1E4b	Agar nutritivo	Postcosecha
AN2E2	Agar nutritivo	Floración	AN2E4b	Agar nutritivo	Postcosecha
AN3E2	Agar nutritivo	Floración	AN3E4b	Agar nutritivo	Postcosecha
AN4E2	Agar nutritivo	Floración	AN4E4b	Agar nutritivo	Postcosecha
AN5E2	Agar nutritivo	Floración	AN5E4a	Agar nutritivo	Postcosecha
AS1E2	Agar suelo	Floración	AS1E4	Agar suelo	Postcosecha
AS2E2b	Agar suelo	Floración	AS2E4	Agar suelo	Postcosecha
AS3E2a	Agar suelo	Floración	AS3E4	Agar suelo	Postcosecha
AS4E2a	Agar suelo	Floración	AS4E4a	Agar suelo	Postcosecha
AS5E2a	Agar suelo	Floración	AS5E4	Agar suelo	Postcosecha

los aislados AN3E1a, AN4E2, AN1E3 y AN5E3, el resto fueron capaces de fermentar la glucosa en condiciones anaerobias. El aislado AN5E4a no oxida ni fermenta la glucosa. Sólo los aislados AN1E1 y AS2E1b mostraron respuesta negativa a la reducción de nitratos; el 94.7% de ellos mostraron actividad desnitrificante (Cuadro 2) y ninguno redujo los sulfatos. Todos los aislados produjeron la enzima catalasa y únicamente el aislado AN4E2 resultó negativo a la producción de citocromo-oxidasa. Estos resultados sugieren la presencia en los suelos rizocorázicos de una comunidad bacteriana aerobia facultativa, lo cual corresponde a lo reportado por Prescott *et al.* (1999) y Koneman (2001). Para las bacterias del género *Bacillus*, comunes en los microambientes de la rizosfera, el oxígeno no es un factor limitante (Branda *et al.*, 2001). La diversidad metabólica de los aislados les permite una amplia adaptación a las variaciones de oxigenación que pueda haber en la rizocoraza durante las diferentes etapas del cultivo. La textura arenosa de estos suelos y la no saturación de los poros por agua permiten la presencia de O₂ y muy probablemente se favorezca la presencia de heterótrofos anaerobios facultativos como *Pseudomonas*, *Bacillus* o *Micrococcus* capaces de reducir los nitratos (Holt *et al.*, 1994) hasta óxidos nitroso y nítrico. Todos los aislados fueron capaces de emplear succinato como única

fueron capaces de fermentar la glucosa en condiciones anaerobias. El aislado AN5E4a no oxida ni fermenta la glucosa. Sólo los aislados AN1E1 y AS2E1b mostraron respuesta negativa a la reducción de nitratos; el 94.7% de ellos mostraron actividad desnitrificante (Cuadro 2) y ninguno redujo los sulfatos. Todos los aislados produjeron la enzima catalasa y únicamente el aislado AN4E2 resultó negativo a la producción de citocromo-oxidasa. Estos resultados sugieren la presencia en los suelos rizocorázicos de una comunidad bacteriana aerobia facultativa, lo cual corresponde a lo reportado por Prescott *et al.* (1999) y Koneman (2001). Para las bacterias del género *Bacillus*, comunes en los microambientes de la rizosfera, el oxígeno no es un factor limitante (Branda *et al.*, 2001). La diversidad metabólica de los aislados les permite una amplia adaptación a las variaciones de oxigenación que pueda haber en la rizocoraza durante las diferentes etapas del cultivo. La textura arenosa de estos suelos y la no saturación de los poros por agua permiten la presencia de O₂ y muy probablemente se favorezca la presencia de heterótrofos anaerobios facultativos como *Pseudomonas*, *Bacillus* o *Micrococcus* capaces de reducir los nitratos (Holt *et al.*, 1994) hasta óxidos nitroso y nítrico. Todos los aislados fueron capaces de emplear succinato como única

fueron capaces de fermentar la glucosa en condiciones anaerobias. El aislado AN5E4a no oxida ni fermenta la glucosa. Sólo los aislados AN1E1 y AS2E1b mostraron respuesta negativa a la reducción de nitratos; el 94.7% de ellos mostraron actividad desnitrificante (Cuadro 2) y ninguno redujo los sulfatos. Todos los aislados produjeron la enzima catalasa y únicamente el aislado AN4E2 resultó negativo a la producción de citocromo-oxidasa. Estos resultados sugieren la presencia en los suelos rizocorázicos de una comunidad bacteriana aerobia facultativa, lo cual corresponde a lo reportado por Prescott *et al.* (1999) y Koneman (2001). Para las bacterias del género *Bacillus*, comunes en los microambientes de la rizosfera, el oxígeno no es un factor limitante (Branda *et al.*, 2001). La diversidad metabólica de los aislados les permite una amplia adaptación a las variaciones de oxigenación que pueda haber en la rizocoraza durante las diferentes etapas del cultivo. La textura arenosa de estos suelos y la no saturación de los poros por agua permiten la presencia de O₂ y muy probablemente se favorezca la presencia de heterótrofos anaerobios facultativos como *Pseudomonas*, *Bacillus* o *Micrococcus* capaces de reducir los nitratos (Holt *et al.*, 1994) hasta óxidos nitroso y nítrico. Todos los aislados fueron capaces de emplear succinato como única

fueron capaces de fermentar la glucosa en condiciones anaerobias. El aislado AN5E4a no oxida ni fermenta la glucosa. Sólo los aislados AN1E1 y AS2E1b mostraron respuesta negativa a la reducción de nitratos; el 94.7% de ellos mostraron actividad desnitrificante (Cuadro 2) y ninguno redujo los sulfatos. Todos los aislados produjeron la enzima catalasa y únicamente el aislado AN4E2 resultó negativo a la producción de citocromo-oxidasa. Estos resultados sugieren la presencia en los suelos rizocorázicos de una comunidad bacteriana aerobia facultativa, lo cual corresponde a lo reportado por Prescott *et al.* (1999) y Koneman (2001). Para las bacterias del género *Bacillus*, comunes en los microambientes de la rizosfera, el oxígeno no es un factor limitante (Branda *et al.*, 2001). La diversidad metabólica de los aislados les permite una amplia adaptación a las variaciones de oxigenación que pueda haber en la rizocoraza durante las diferentes etapas del cultivo. La textura arenosa de estos suelos y la no saturación de los poros por agua permiten la presencia de O₂ y muy probablemente se favorezca la presencia de heterótrofos anaerobios facultativos como *Pseudomonas*, *Bacillus* o *Micrococcus* capaces de reducir los nitratos (Holt *et al.*, 1994) hasta óxidos nitroso y nítrico. Todos los aislados fueron capaces de emplear succinato como única

fueron capaces de fermentar la glucosa en condiciones anaerobias. El aislado AN5E4a no oxida ni fermenta la glucosa. Sólo los aislados AN1E1 y AS2E1b mostraron respuesta negativa a la reducción de nitratos; el 94.7% de ellos mostraron actividad desnitrificante (Cuadro 2) y ninguno redujo los sulfatos. Todos los aislados produjeron la enzima catalasa y únicamente el aislado AN4E2 resultó negativo a la producción de citocromo-oxidasa. Estos resultados sugieren la presencia en los suelos rizocorázicos de una comunidad bacteriana aerobia facultativa, lo cual corresponde a lo reportado por Prescott *et al.* (1999) y Koneman (2001). Para las bacterias del género *Bacillus*, comunes en los microambientes de la rizosfera, el oxígeno no es un factor limitante (Branda *et al.*, 2001). La diversidad metabólica de los aislados les permite una amplia adaptación a las variaciones de oxigenación que pueda haber en la rizocoraza durante las diferentes etapas del cultivo. La textura arenosa de estos suelos y la no saturación de los poros por agua permiten la presencia de O₂ y muy probablemente se favorezca la presencia de heterótrofos anaerobios facultativos como *Pseudomonas*, *Bacillus* o *Micrococcus* capaces de reducir los nitratos (Holt *et al.*, 1994) hasta óxidos nitroso y nítrico. Todos los aislados fueron capaces de emplear succinato como única

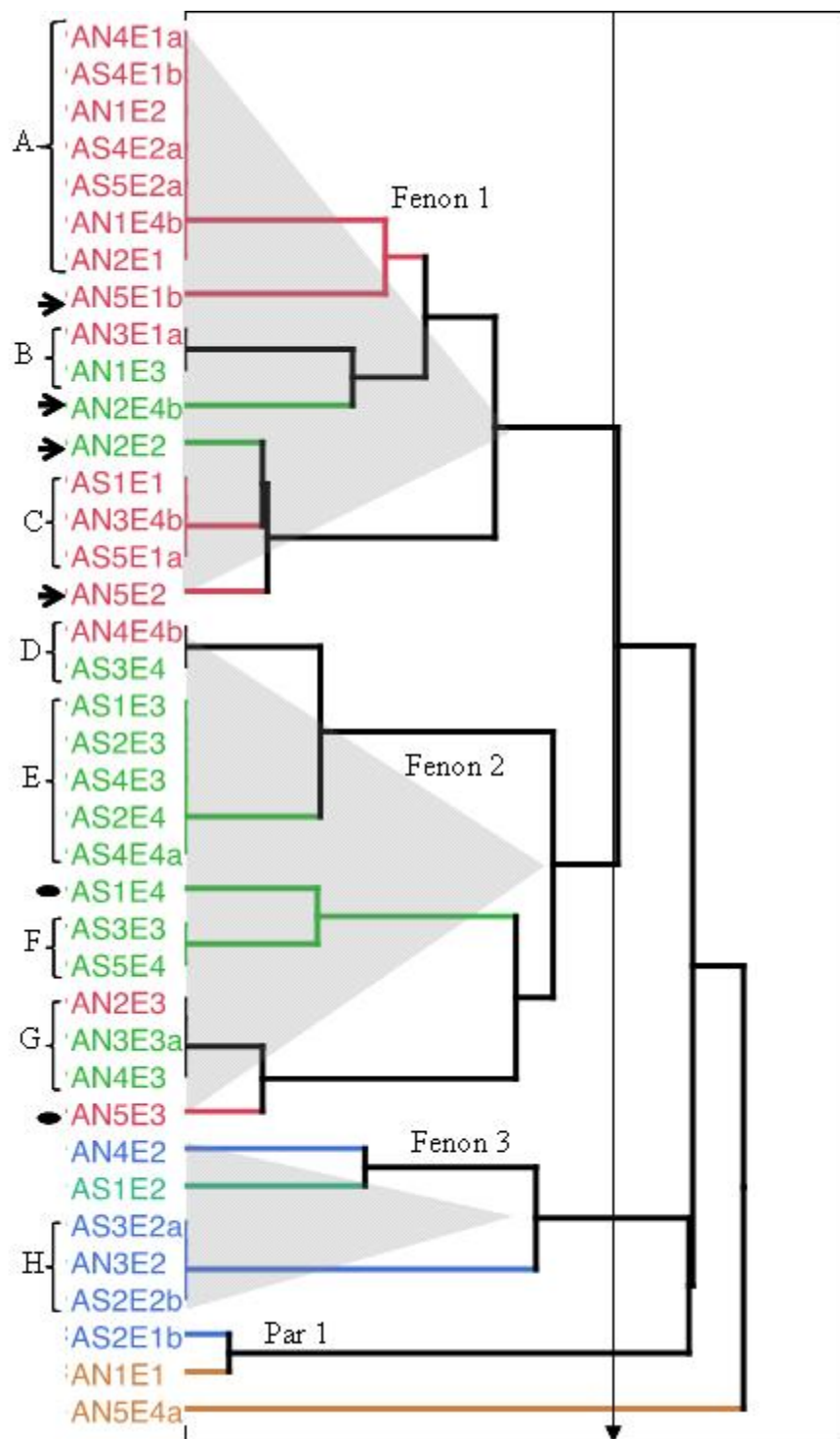


Figura 1. Análisis de Cluster (distancia euclidiana de 0.5, método de Ward), de 38 aislados bacterianos procedentes de la rizocoraza de *Amaranthus hypochondriacus* de acuerdo a su índice de similitud. Se consideraron 16 pruebas morfológicas, 8 pruebas fisiológicas y 34 pruebas bioquímicas. Nomenclatura de los aislados: AN = agar nutritivo; AS = agar extracto de suelo; E = época.

Cuadro 2. Respuesta de los aislados bacterianos al metabolismo respiratorio, a la producción de enzimas extracelulares y al uso de nutrimentos orgánicos pertenecientes a distintas familias químicas como única fuente de carbono y energía.

Aislado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38						
Metabolismo respiratorio																																												
Oxidación de glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-					
Fermentación de glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-					
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+				
Respiración de sulfatos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
Citocromo-oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+					
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Enzimas extracelulares																																												
DNAsa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+				
Quitinasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-			
Fosfatasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Tweenasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-		
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Esculinasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Amilasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lecitinasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Nutrimentos																																												
Serina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Glutamato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Prolina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triptófano	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Alanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metionina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gluconato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Malonato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Succinato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fumarato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adipato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lactato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Acetato	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propionato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Capronato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Aislados que conforman el Fenon 1, del 1 a 16 (AN4E1a, AS4E1b, AN1E2, AS4E2a, AS5E2a, AN1E4b, AN2E1, AN5E1b, AN3E1a, AN1E3, AN2E4b, AN2E2, AS1E1, AN3E4b, AS5E1a y AN5E2, respectivamente); Fenon 2, aislados del 17 al 30 (AN4E4b, AS3E4, AS1E3, AS2E3, AS4E3, AS2E4, AS4E4a, AS1E4, AS3E3, AS5E4, AN2E3, AN3E3a, AN4E3 y AN5E3, respectivamente); Fenon 3, aislados del 31 al 35 (AN4E2, AS1E2, AS3E2a, AN3E2 y AS2E2b, respectivamente); Par 1, aislados 36 y 37 (ASE1b y AN1E1) y aislado 38 (AN5E4a).

y 34 bioquímicas, agrupó a una distancia euclidiana de 0.5 a los 38 aislados bacterianos en tres fenones, un par y un aislado sin agrupar (Figura 1):

a) En el fenon 1 se agruparon 16 de los 38 aislados (AN4E1a, AS4E1b, AN1E2, AS4E2a, AS5E2a, AN1E4b, AN2E1, AN5E1b, AN3E1a, AN1E3, AN2E4b, AN2E2, AS1E1, AN3E4b, AS5E1a y AN5E2), todos bacilos Gram positivo con la menor capacidad degradativa (IME de 48%), pero con una alta capacidad de utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos simples como única fuente de carbono y energía (IMU de 86%) (Cuadro 2 y 3). Dentro del fenon se observan tres grupos, en ellos los subgrupos A, B y C se agruparon a una distancia euclidiana de cero a siete, dos y tres aislados respectivamente, ya que sus respuestas a las pruebas fisiológicas aplicadas fueron idénticas (Figura 1), por lo que podrían pertenecer a una misma especie. El aislado AN2E4b se separa del subgrupo B ya que es el único que presenta cuerpos intrusivos, utiliza la metionina y junto con AN5E2 del subgrupo C, produce fosfatasa. Éste último, junto con AN5E1b, AN2E2

y AN5E2, se agrupan a una distancia euclidiana mayor con estos subgrupos sugiriendo que se trata de especies distintas que comparten ciertos caracteres bioquímicos con los otros aislados. Este fenon se conforma principalmente por aislados provenientes de la época de siembra.

b) El fenon 2 reúne 14 aislados (AN4E4b, AS3E4, AS1E3, AS2E3, AS4E3, AS2E4, AS4E4a, AS1E4, AS3E3, AS5E4, AN2E3, AN3E3a, AN4E3 y AN5E3), bacilos Gram positivo, con mayor capacidad degradativa que los agrupados en el fenon 1 (IME de 74%) pero con un valor del IMU ligeramente menor (81%) (Cuadro 2 y 3). Dentro de este fenon se observan cuatro agrupaciones (D, E, F y G) con distancia euclidiana de 0 que podrían pertenecer a la misma especie (Figura 1). El aislado AN5E3, junto con el par formado por AS3E3 y AS5E4 (subgrupo F), producen fosfatasa; este subgrupo se destaca por mostrar el IME más elevado (87.5%). El aislado AS1E4 se separa de este par ya que es el único que no fermenta glucosa. Este fenon está integrado por aislados obtenidos durante la cosecha

Cuadro 3. Índice medio de actividad exoenzimática (IME) e índice medio de utilización de compuestos orgánicos (IMU) por fenon, par o aislado.

Aislado	IME	IMU	Aislado	IME	IMU
----- % -----			----- % -----		
AN4E1a	50	89	AS4E3	75	77
AS4E1b	50	89	AS2E4	75	77
AN1E2	50	89	AS4E4a	75	77
AS4E2a	50	89	AS1E4	63	85
AS5E2a	50	89	AS3E3	88	77
AN1E4b	50	89	AS5E4	88	77
AN2E1	50	89	AN2E3	75	89
AN5E1b	50	81	AN3E3a	75	89
AN3E1a	50	85	AN4E3	75	89
AN1E3	50	85	AN5E3	75	89
AN2E4b	63	85	FENON 2	74	81
AN2E2	38	85	AN4E2	75	77
AS1E1	38	85	AS1E2	63	73
AN3E4b	38	85	AS3E2a	63	92
AS5E1a	38	85	AN3E2	63	92
AN5E2	50	85	AS2E2b	63	92
FENON 1	48	86	FENON 3	65	85
AN4E4b	63	77	AS2E1b	63	96
AS3E4	63	77	AN1E1	63	100
AS1E3	75	77	PAR 1	63	98
AS2E3	75	77	AN4E4a	50	46

y postcosecha, épocas en las que se observaron altos valores de producción de fosfatasa, enzima involucrada en la liberación de fósforo asimilable.

c) Fenon 3 agrupa cinco aislados (AN4E2, AS1E2, AS3E2a, AN3E2 y AS2E2b). Los bacilos Gram negativos, con un valor de IME menor que el fenon 2 (65%) y un IMU de 85% semejante al fenon 1 (Cuadro 2 y 3). Dentro de este fenon se observaron dos subgrupos formados por el par (AN4E2 y AS1E2) con mayor IMU (68.7%), mientras que los pertenecientes al subgrupo H se distinguen por producir una menor cantidad de enzimas extracelulares y tener una forma colonial plana y de textura mucosa. El fenon se formó por aislados provenientes de la época de floración (Figura 2).

d) En el par se reunieron los aislados AS2E1b y AN1E1 que son filamentos Gram positivo esporulados, sin cuerpos intrusivos que forman colonias de textura suave y forma irregular de color gris; olor característico a “tierra mojada”. Oxidan y fermentan la glucosa y no producen fosfatasa ni esculinasa (Cuadro 2 y 3). El valor del IME fue similar al fenon 3 (63%), pero a diferencia de los demás aislados, en este par se unieron los aislados capaces de utilizar todas las familias químicas probadas como fuente de carbono para su crecimiento (IMU de 98%) (Cuadro 2 y 3). Ambos aislados provienen de la época de siembra.

e) El aislado AN5E4a no se agrupó con ningún otro aislado, es un bacilo Gram positivo no esporulado y a diferencia del par 1, no fermenta ni oxida la glucosa, produce DNAsa, y no produce quitinasa ni lipasa (Cuadro 2 y 3). Su IME fue de 50% y el valor del IMU fue el más bajo (46%) (Cuadro 2 y 3), ya que no utiliza la mayor parte de los aminoácidos probados, ni la arabinosa y ribosa. Se aisló durante la época de postcosecha.

Debido al contacto estrecho entre las raíces y las partículas minerales del suelo, es muy probable que en las rizocorazas exista una mayor cantidad de rizodeposiciones constituidas por exudados, mucílagos y gomas, así como por estructuras celulares liberadas por las raíces al suelo y fácilmente metabolizables por los microorganismos para la obtención de energía, en comparación con el suelo adyacente que no está sujetado por los pelos absorbentes. Los altos valores del IMU observados en la mayoría de los aislados, indican que los sustratos de bajo peso molecular probados como única fuente de carbono pueden ser similares a los exudados radicales (Cuadro 3).

Durante las diferentes etapas del cultivo de amaranto ocurren cambios fisiológicos y metabólicos en las comunidades microbianas asociadas a la raíz. En este sentido, las variaciones de los valores del IME e IMU

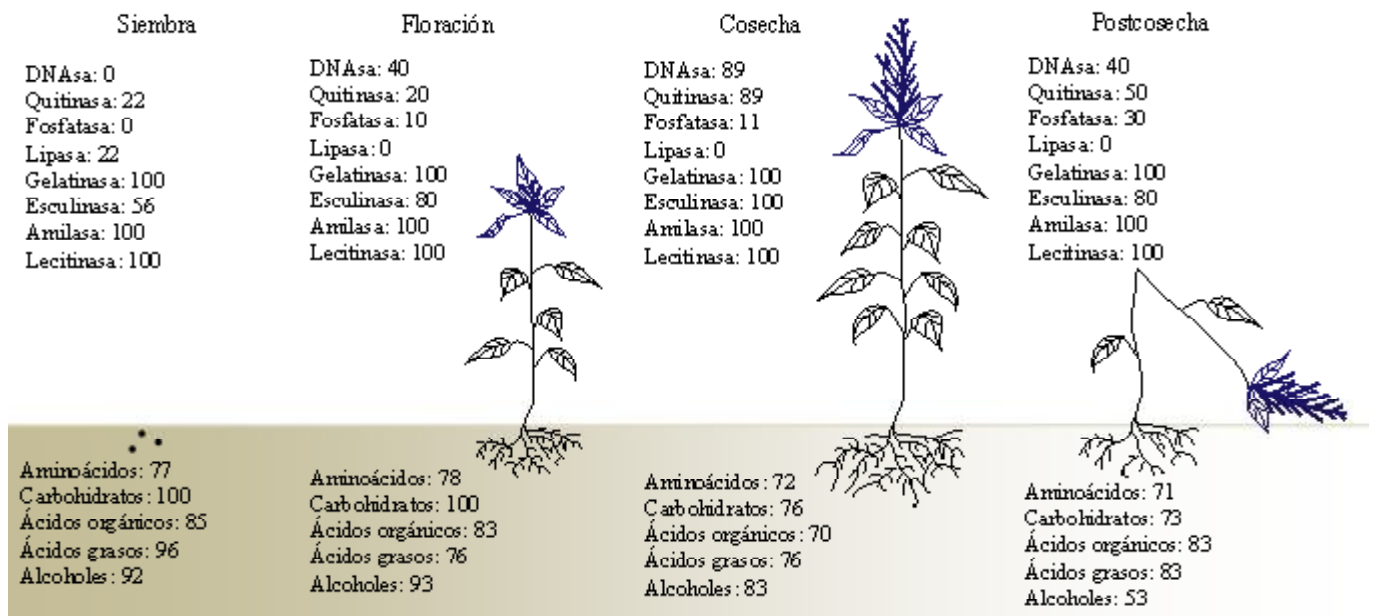


Figura 2. Porcentaje de producción de enzimas extracelulares y de uso de nutrientes pertenecientes a diferentes familias químicas como única fuente de energía por los 38 aislados bacterianos procedentes de la rizocoraza de *A. hypochondriacus* durante cada una de las cuatro épocas consideradas en el estudio.

durante las tres épocas (floración, cosecha y postcosecha) pueden deberse a que los compuestos exudados por las raíces transforman las condiciones físicas y químicas del suelo modificando la calidad y cantidad de los sustratos disponibles (Kandeler *et al.*, 2002; Marschner y Baumann, 2003; Marschner *et al.*, 2004). Los resultados coinciden con Perry *et al.* (2006), quienes reportaron que los exudados radicales determinan la composición de las comunidades microbianas y sus actividades, además, que un mismo exudado es capaz de actuar como antimicrobiano o favorecer la disponibilidad de algún nutriente dependiendo de su concentración y de la microbiota con la que interactúe. En los suelos, muchos de los sustratos disponibles son de elevado peso molecular (lignina, celulosa, sustancias húmicas), por lo que el papel de las enzimas extracelulares es de particular importancia; una vez que la hidrólisis de los polímeros ocurre, las células bacterianas absorben del exterior una serie de monómeros como la glucosa para su metabolismo.

Existen pocos trabajos dirigidos al estudio de las comunidades microbianas de la rizosfera. Oyeyiola (2010), realizó un estudio sobre la comunidad bacteriana de la rizosfera de *A. hybridus* en un suelo arenoso de composición similar al suelo estudiado (arena: 88.1%, limo: 5.77% y arcilla: 10.13%); sus resultados reportan la presencia de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, así como un aumento en la densidad bacteriana entre los 70 y 90 días de la siembra, equivalente al periodo de cosecha en este estudio. De acuerdo con el análisis fenético realizado y con las características morfológicas y fisiológicas señaladas en el Manual de Bergey (Holt *et al.*, 1994) para la familia Bacillaceae, la mayoría de los aislados obtenidos de la rizosfera de *A. hypochondriacus* pueden pertenecer a dicha familia. Los subgrupos observados en los fenones 1 y 2 sugieren la presencia de al menos cinco especies de *Bacillus*. Las bacterias aerobias Gram positivo formadoras de esporas del género *Bacillus* han sido reportadas en un amplio número de suelos sujetos a diversas condiciones climáticas (Garbeva *et al.*, 2003); los *Bacillus* poseen un potencial solubilizador de fósforo (Villegas y Fortin, 2002) y por lo tanto se les reconoce como promotores del crecimiento vegetal (Kloepper, 1994). En este estudio sólo cinco de los 38 aislados produjeron fosfatasa, pero todos produjeron lecitinasa, enzima extracelular asociada a

la hidrólisis de fosfolípidos (Cuadro 2). Oyeyiola (2010), reportó la presencia de *B. subtilis*, agente de control biológico contra *Fusarium oxysporum*, con actividad solubilizadora de fosfatos y producción de amilasas y celulasas (Swain y Ray, 2009) y *B. cereus*, saprobio, productor de antibióticos y promotor del crecimiento vegetal (Kloepper, 1994; Vilain *et al.*, 2006).

Los aislados Gram negativos del fenon 3 tienen características morfológicas y fisiológicas semejantes a bacterias de las familias Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae (Holt *et al.*, 1994). Los géneros *Enterobacter* y *Pseudomonas* se han reportado como promotores del crecimiento vegetal (Chelius y Triplett, 2000), ya que ambos producen auxinas (Vázquez *et al.*, 2000; Schütz *et al.*, 2003).

Los aislados agrupados en el par presentan características morfológicas y fisiológicas semejantes a las de la familia Streptomycetaceae de acuerdo al Manual de Bergey (Holt *et al.*, 1994). Dentro de esta familia, los *Streptomyces* son microorganismos heterótrofos que participan en la degradación de la MO (Mokni-Tlili *et al.*, 2009). Ambos aislados se obtuvieron en la época de siembra, caracterizada por la presencia de los residuos más recalcitrantes de la cosecha anterior (tallos y raíces), ambiente que favorece el desarrollo de *Streptomyces*; suelen ser más frecuentes en las temporadas de estiaje cuando en el suelo ya se han metabolizado los compuestos orgánicos más lábiles (Porta *et al.*, 2003; Atlas y Bartha, 2006). La posibilidad de que los miembros del par pertenezcan a este género también se basa en su aislamiento en medio AS que, de acuerdo con Hamaki *et al.* (2005), es un sustrato idóneo, además de que son los únicos que producen enzimas extracelulares capaces de hidrolizar aceites hidrogenados poliglicolizados (lipasa).

Estudios subsecuentes deben enfocarse en la identificación molecular (por ejemplo, en el análisis del segmento 16S rDNA) para determinar con certeza la identidad de los aislados. Adicionalmente, deberá probarse el potencial de los aislados como solubilizadores de fósforo, promotores del crecimiento vegetal y antagonistas fitopatógenos. Los treinta y ocho aislados bacterianos muestran características que los hacen potencialmente útiles como biofertilizantes y aceleradores de la degradación de la MO por lo que pueden ser estudiados para el desarrollo de estrategias de manejo agroecológico.

CONCLUSIONES

Los tipos fisiológicos de la comunidad bacteriana cultivable en agar nutritivo y agar suelo asociada a las rizocorazas de *A. hypochondriacus* juegan un papel relevante en la disponibilidad de nutrientes para la micro y macrobiota que habita en estos suelos y para las plantas cultivadas, por su fuerte potencial para producir enzimas extracelulares en todas las etapas del cultivo. Los aislados bacterianos se agruparon en tres fenones, un par y un aislado solo, que podrían pertenecer a las familias Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Streptomycetaceae. La época de siembra se caracterizó por la presencia de bacterias de la familia Streptomycetaceae; en dicha época, la producción de enzimas extracelulares fue menor pero se observó el uso de una amplia gama de fuentes de carbono. En la siembra y floración se identificaron los aislados bacterianos con mayor capacidad para usar fuentes de carbono de bajo peso molecular. En la cosecha y postcosecha se observó la mayor diversidad de tipos fisiológicos bacterianos con alto potencial degradativo ya que produjeron siete de las ocho enzimas extracelulares probadas. La distribución de las bacterias y sus tipos fisiológicos en las diferentes épocas sugieren que existe un efecto de las rizodeposiciones sobre la comunidad bacteriana que deberá ser estudiado. Asimismo, la manera en la que se distribuyen los perfiles de actividad exoenzimática y de uso de fuentes de carbono en cada época pueden emplearse para el diseño de sistemas de fertilización biológicos en los que la aplicación de una determinada cepa o de un consorcio microbiano se realice de manera más precisa y sistematizada.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT (México) por el financiamiento a la presente investigación y por la beca otorgada a Iván Pável Moreno Espíndola (CVU: 171655) para realizar estudios en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana.

LITERATURA CITADA

- Abed, R. M. M., N. M. D. Safi, J. Köster, D. Beer, Y. El-Nahhal, J. Rullkötter, and F. Garcia. 2002. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1674-1683.
- Alami, Y., W. Achouak, Ch. Marol, and T. Heulin. 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3393-3398.
- Allison, S. D. and J. D. Jastrow. 2006. Activities of extracellular enzymes in physically isolated fractions of restored grassland soils. *Soil Biol. Biochem.* 38: 3245-3256.
- Atlas, R. M. y R. Bartha. 2006. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Educación España. Madrid, España.
- Branda, S. S., J. E. González-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick, and R. Kolter. 2001. Fruiting body formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11621-11626.
- Bressani, R. 2003. Amaranth. pp. 166-173. *In*: B. Caballero, P. Finglas, and L. Trugo (eds.). Encyclopedia of food sciences and nutrition. Academic Press. New York, NY, USA.
- Caesar-TonThat, T. C., A. J. Caesar, J. F. Gaskin, U. M. Sainju, and 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*. *Appl. Soil Ecol.* 36: 10-21.
- Cerón R., L. E., L. M. Melgarejo M. 2005. Enzimas del suelo: indicadores de salud y calidad. *Acta Biol. Colomb.* 10: 5-17.
- Chelius, M. K. and E. W. Triplett. 2000. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 783-787.
- De León-González, F., E. Celada-Tornel, C. I. Hidalgo-Moreno, J. D. Etchevers-Barra, M. C. Gutiérrez-Castorena, y A. Flores-Macías. 2006. Root-soil adhesion as affected by crop species in a volcanic sandy soil of Mexico. *Soil Tillage Res.* 90: 77-83.
- De León-González, F., M. C. Gutiérrez-Castorena, M. C. A. González-Chávez, y H. Castillo-Juárez. 2007. Root-aggregation in a pumiceous sandy soil. *Geoderma* 142: 308-317.
- Fernández, F., J. M. Dell'Amico y P. Rodríguez. 2006. Efectividad de algunos tipos de inoculantes micorrizicos a base de *Glomus hoi-like* en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. var Amalia). *Cultivos Tropicales* 27: 25-30.
- Ferrara-Guerrero, M. J. 1993. Distribution des bactéries microaérophiles dans les sédiments de lagunes côtières Méditerranéennes. Comparaison avec la distribution des bactéries aérobies et anaérobies. Étude des potentialités métaboliques. Tesis Doctoral. Université de Aix-en-Provence II. France.
- Garbeva, P., J. A. van Veen, and J. D. van Elsas. 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbiol. Ecol.* 45: 302-316.
- Garbeva, P., J. A. van Veen, and J. D. van Elsas. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 243-270.
- Gil-Sotres, F., C. Trasar-Cepeda, M. C. Leirós, and S. Seoane. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.* 37: 877-887.
- Hamaki, T., M. Suzuki, R. Fudou, Y. Jojima, T. Kajiura, A. Tabuchi, K. Sen, and H. Shibai. 2005. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 485-492.

- Haling, R. E., A. E. Richardson, R. A. Culvenor, H. Lambers, and R. J. Simpson. 2010. Root morphology, root-hair development and rhizosheath formation on perennial grass seedlings is influenced by soil acidity. *Plant Soil* 335: 457-468.
- Holt, J. G., D. H. Bergey, and R. S. Breed. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, MD, USA.
- Hugh, R. and E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 66: 24-26.
- Kandeler, E., P. Marschner, D. Tschierko, T. S. Gahoonia, and N. E. Nielsen. 2002. Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. *Plant Soil* 238: 301-312.
- Kloepper, J. W. 1994. Plant growth promoting rhizobacteria (other system). pp. 135-166. In: Y. Okon, (ed.). *Azospirillum/Plant Association*. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Kohler, J., F. Caravaca, L. Carrasco, and A. Roldán. 2007. Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Appl. Soil Ecol.* 35: 480-487.
- Koneman, E. W. 2001. *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas color*. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by oxidasa reaction. *Nature* 178: 703.
- Lányi, B. 1987. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. pp. 1-67. In: R. R. Colwell and R. Grigorova (eds.). *Methods in microbiology*, vol. 19. Academic Press. Orlando, FL, USA.
- Lesuffleur, F., F. Paynel, M. P. Bataillé, E. Le Deunff, and J. B. Cliquet. 2007. Root amino acid exudation: measurement of high efflux rates of glycine and serine from six different plant species. *Plant Soil* 294: 235-246.
- López de Andrade, S. A. e A. P. Dias da Silveira. 2004. Biomassa e atividade microbianas do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. *Pesq. Agropec. Bras.* 39: 1191-1198.
- MacFaddin, J. F. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Marschner, P. and K. Baumann. 2003. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonisation in split-root maize. *Plant Soil* 251: 279-289.
- Marschner, P., D. Crowley, and C. H. Yang. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil* 261: 199-208.
- Mathesius, U. 2003. Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes – the *Rhizobium*-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. *Plant Soil* 255: 105-119.
- McCully, M. E. 1999. Roots in soil: Unearthing the complexities of roots and their rhizospheres. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 50: 695-718.
- McCully, M. 2005. The rhizosphere: the key functional unit in plant/soil/microbial interactions in the field. Implications for the understanding of allelopathic effects. Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy, "Establishing the Scientific Base". Wagga Wagga, New South Wales, Australia.
- Meynell, G. G. and E. Meynell. 1979. *Theory and practice in experimental bacteriology*. Cambridge University Press. Londres.
- Mokni-Tlili, S., B. Hafedh, H. Abdennaceur, and G. Ali. 2009. Studies on the ecology of actinomycetes in an agricultural soil amended with organic residues: II. Assessment of enzymatic activities of *Actinomycetales* isolates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 2251-2259.
- Moreno-Espindola, I. P., F. Rivera-Becerril, M. J. Ferrara-Guerrero, and F. De León-González. 2007. Role of root-hairs and hyphae in adhesion of sand particles. *Soil Biol. Biochem.* 39: 2520-2526.
- Nannipieri, P., J. Ascher, M. T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara, and G. Renella. 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54: 655-670.
- Nwaogu, L. A., G. O. C. Onyeze, and R. N. Nwabueze. 2008. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *African J. Biotech.* 7: 1939-1943.
- Oyeyiola, G. P. 2010. Rhizosphere bacterial flora of *Amaranthus hybridus*. *Res. J. Microbiol.* 5: 137-143.
- Perry, L. G., T. L. Weir, B. Prithiviraj, M. W. Paschke, and J. M. Vivanco. 2006. Root exudation and rhizosphere biology: multiple functions of a plant secondary metabolite. pp. 403-420. In: F. Baluška, S. Mancuso, and D. Volkmann (eds.). *Communication in plants*. Springer-Verlag. Berlin, Germany.
- Philippot, L., M. Kuffner, D. Chèneby, G. Depret, G. Laguerre, and F. Martin-Laurent. 2006. Genetic structure and activity of the nitrate-reducers community in the rhizosphere of different cultivars of maize. *Plant Soil* 287: 177-186.
- Porta C., J., M. López-Acevedo y C. Roquero. 2003. *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Mundi-Prensa. Barcelona, España.
- Prescott, M. L., P. J. Harley, and A. D. Klein. 1999. *Microbiología*. McGraw-Hill. México D. F.
- Raynaud, X., J. C. Lata, and W. P. Leadley. 2006. Soil microbial loop and nutrient uptake by plants: a test using a coupled C:N model of plant-microbial interactions. *Plant Soil* 287: 95-116.
- Read, D. B. and P. J. Gregory. 1997. Surface tension and viscosity of axenic maize and lupin root mucilages. *New Phytol.* 137: 623-628.
- Roesti, D., K. Ineichen, O. Braissant, D. Redecker, A. Wiemken, and M. Aragno. 2005. Bacteria associated with spores of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6673-6679.
- Segura C., M. A., M. C. Gutiérrez C., C. A. Ortiz S. y P. Sánchez G. 2005. Régimen de humedad y clasificación de suelos pomáceos del Valle de Puebla-Tlaxcala. *Terra Latinoamericana* 23: 13-20.
- Schimel, P. J. and M. N. Weintraub. 2003. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biol. Biochem.* 35: 549-563.
- Schütz, A., R. Golbik, K. Tittmann, D. I. Svergun, M. H. Koch, G. Hübner, and S. König. 2003. Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic acid pathway. *Eur. J. Biochem.* 270: 2322-2331.
- Soil Survey Staff. 2003. *Soil taxonomy*. USDA Natural Resources Conservation Service. Washington, DC, USA.
- Solyanikova, I. P. and L. A. Golovleva. 2004. Bacterial degradation of chlorophenols: pathway, biochemica, and genetic aspects. *J. Environ. Sci. Health B.* 39: 333-351.

- Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271.
- Swain, M. R. and R. C. Ray. 2009. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiol. Res.* 164: 121-130.
- Terry, E. y A. Leyva. 2006. Evaluación agrobiológica de la inoculación micorrizas-rizobacterias en tomate. *Agron. Costarricense* 30: 65-73.
- Toal, M. E., C. K. Yeomans, K. Killham, and A. A. Meharg. 2000. A review of rhizosphere carbon flow modelling. *Plant Soil* 222: 263-281.
- Uribe, D., J. Sánchez-Nieves y J. Vanegas. 2010. Role of microbial biofertilizers in the development of a sustainable agriculture in the tropics. *Soil biology and agriculture in the tropics*. pp. 235- 250. *In*: P. Dion (ed.). *Soil biology and agriculture in the tropics*. Springer-Verlag. Berlin, Germany.
- Elsas, J. D. van, J. K. Jansson, and J. T. Trevors. 1997. *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker. New York, NY, USA.
- Vázquez, M. M., S. César, R. Azcón, and J. M. Barea. 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Appl. Soil Ecol.* 15: 261-272.
- Vilain, S., Y. Luo, M. B. Hildreth, and V. S. Brozel. 2006. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4970-4977.
- Villegas, J. and J. A. Fortin. 2002. Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO_3^- as nitrogen source. *Can. J. Bot.* 80: 571-576.