

DIVERSIDAD METABÓLICA FUNCIONAL DE COMUNIDADES MICROBIANAS ASOCIADAS A SUELO RIZOSFÉRICO DE MAÍZ (*Zea mays* L.) RAZAS AMARILLO-ZAMORANO Y JALA

FUNCTIONAL METABOLIC DIVERSITY IN MICROBIAL COMMUNITIES ASSOCIATED TO RHIZOSPHERE SOIL OF MAIZE (*Zea mays* L.) AMARILLO-ZAMORANO AND JALA CULTIVARS

**Arteaga-Garibay, R. I.^{1*}, Gómez-Estrada M. M.¹, Martínez-Peña, M. D.¹;
Cadena-Zamudio, J.D.¹; Avendaño-Arrazate C. H.²**

¹Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Boulevard de la Biodiversidad 400, Rancho las Cruces. C.P. 47600, Tepatitlán de Morelos, Jalisco. México. ²Campo Experimental Rosario Izapa Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 18 Carretera Tapachula Cacahoatán. CP.30870 Tuxtla Chico Chiapas México.

***Autor de correspondencia:** arteaga.ramon@inifap.gob.mx.

RESUMEN

La información sobre la diversidad funcional (potencial metabólico) es esencial para la comprensión del papel de las comunidades microbianas en diferentes entornos. La metodología de Biolog System[®] se introdujo en los estudios ecológicos para estimar el potencial metabólico de las comunidades microbianas, la cual se pueden determinar mediante la estimación de un índice de diversidad funcional, que permite establecer comparaciones entre comunidades distintas y seguir la evolución de una comunidad en específico frente a las variaciones de las condiciones ambientales. En el presente este estudio, se analizaron muestras de suelo de la rizósfera de maíz (*Zea mays* L.) razas amarillo-zamorano y Jala, en diferentes etapas de cultivo. La caracterización funcional se fundamentó en la determinación del perfil fisiológico de la comunidad microbiana, en la cual se determina su comportamiento metabólico contra un conjunto de sustratos y fuentes de carbono con el fin de establecer un patrón característico de respuesta *in vitro* y perfil fisiológico a nivel de comunidad que ofrece la ventaja de que no requiere el aislamiento de cultivos axénicos. Los análisis de la diversidad metabólica funcional mediante la estimación del AWCD y el índice de Shannon-Weaver como indicadores útiles que evidenciaron que existen cambios en la diversidad funcional de las comunidades microbianas tanto en las diferentes etapas del cultivo como en las diferentes razas de maíz evaluadas.

Palabras Clave: Functional diversity, Microbial communities, Rhizosphere.

ABSTRACT

Information about functional diversity (metabolic potential) is essential to understand the role of microbial communities in different environments. The Biolog System[®] methodology was introduced into ecological studies to estimate the metabolic potential of microbial communities, which can be determined through the estimation of an index of functional diversity, allowing to establish comparisons between different communities and following



the evolution of a specific community when facing the variations of environmental conditions. In this study, samples from the soil of maize (*Zea mays* L.) rhizosphere cultivars Amarillo-Zamorano and Jala were analyzed, in different cultivation stages. The functional characterization was founded on determining the physiological profile of the microbial community, in which its metabolic behavior is determined against a set of substrates and carbon sources with the aim of establishing a characteristic response pattern *in vitro* and physiological profile at the level of community that offer the advantage of not requiring the isolation of axenic crops. The analyses of functional metabolic diversity through estimation of the AWCD and the Shannon-Weaver Index, served as useful indicators that evidenced that there are changes in the functional diversity of microbial communities, both in the different stages of the cultivation and in the different cultivars of maize evaluated.

Keyword: functional diversity, microbial communities, rhizosphere.

INTRODUCCIÓN

La comunidad microbiana es definida como un “ensamblaje” de poblaciones de microorganismos que interactúan entre ellas, así como con el ambiente espacial y temporal. Dichas interacciones le confieren atributos mediante los cuales puede ser caracterizada (Atlas y Bartha., 2002, Begon *et al.*, 2006). En los últimos años se ha utilizado el análisis funcional como indicador de la diversidad y estructura de las comunidades microbianas, a través del uso de diferentes fuentes de carbono para establecer un perfil metabólico de los microorganismos y su comportamiento (Garland *et al.*, 1991, Zak *et al.*, 1994, Bending *et al.*, 2004). La diversidad funcional se puede generalizar como el conjunto de características de los organismos que influyen en las propiedades del ecosistema (Hernández *et al.*, 2006, Frac *et al.*, 2012). Esta definición sugiere que un ecosistema con una alta diversidad funcional opera más eficientemente en términos de productividad, resiliencia y resistencia (Tilman, 2001), ya que el estudio de la diversidad funcional de los microorganismos en su totalidad y no de forma individual, permite enfatizar en el sinergismo de las especies (Ricotta *et al.*, 2005). Además la estructura de las comunidades microbianas puede ser determinada al definir las capacidades metabólicas de los microorganismos y sus consecuencias biogeoquímicas (heterótrofos, nitrificadores, desnitrificadores, entre otros) y/o participación en procesos del ecosistema (descomposición, biodegradación, oxidación, entre otros) (Post *et al.*, 1982, Fornara *et al.*, 2013). La caracterización funcional se fundamenta en la determinación del perfil fisiológico de la comunidad, en la cual los microorganismos son enfrentados contra un conjunto de sustratos y fuentes de carbono con el fin de establecer un patrón característico de respuesta *in vitro* y perfil fisiológico a nivel de comunidad, lo cual presenta la ventaja de que no requiere el aislamiento de cultivos axénicos (Zak *et al.*, 1994, Frac *et al.*, 2012), y la diversidad funcional de comunidades microbianas se puede conocer mediante la estimación de un índice de diversidad funcional, el cual permite establecer comparaciones entre comunidades distintas y/o seguir la evolución de una comunidad en específico frente a las variaciones de parámetros ambientales. El índice más utilizado para estimar la diversidad funcio-

nal de comunidades microbianas es el Índice de Shannon-Weaver, que se calcula a partir de datos cuantitativos obtenidos del perfil fisiológico de la comunidad (Buyer *et al.*, 1997; Diaz-Borrego *et al.*, 2007). La diversidad funcional de un suelo puede ser estudiada mediante el análisis de los perfiles fisiológicos a nivel comunidad, que reflejen la capacidad de dicha comunidad microbiana para utilizar la batería de sustratos de carbono en condiciones de cultivo controladas. Las placas Biolog® EcoPlates™ pueden ser utilizadas para la determinación de los perfiles fisiológicos de las comunidades terrestres. (Stevens *et al.*, 2004). El objetivo principal de este estudio fue determinar los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas en la rizósfera de dos razas de maíz (*Zea mays* L.) en diferentes etapas del cultivo obtenidos mediante el sistema Biolog®

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de suelo rizosférico se recolectaron en una parcela situada en Tepatitlán, Jalisco, México (AL: 20.873966, LT: -102.789430), se cultivaron en época de temporal (agosto-octubre 2013 y 2014 respectivamente) las variedades Pioneer, Amarillo zamorano. La recolecta se realizó en dos etapas A) T0, sin cultivo de maíz y durante el llenado de la mazorca R4 y R6. Y otra parcela en el municipio de Jala en el Estado de Nayarit, México (AL: 21.083968, LT: -104.420365). Se hicieron dos levantamientos de muestras en los años 2013 y 2014, en las etapas de desarrollo fonológico durante el llenado de la mazorca (R4 y R6) en los dos años, y una muestra sin cultivo (T0). En ambos casos se realizó el levantamiento de muestras de suelo con un nucleador. La muestra de suelo rizosférico fue colectada a 10 cm

de distancia de la orilla de la planta hacia afuera, con una profundidad de 30 cm. Se eliminó la capa superior de 5 cm aproximadamente para desechar la vegetación. En total se tomaron 25 muestras de acuerdo al protocolo de colecta cinco soles (Hernández-Ibáñez *et al.*, 2015). Las características fisicoquímicas evaluadas para el suelo de maíz amarillo zamorano fueron; tipo de suelo: franco arcilloso, capacidad de campo: 34.5%, densidad aparente: 1.20 g cm³, pH (1:2 agua): neutro con 6.77, materia orgánica: 1.66%, nitrógeno inorgánico: 21.7 mg kg⁻¹, fósforo (Bray): 100 mg kg⁻¹, hierro: 28.5 mg kg⁻¹, manganeso: 46.7 mg kg⁻¹, con aplicaciones de nitrógeno (46N-00-009 comerciales. En tanto que para la raza Jala las características fisicoquímicas fueron; suelo franco, capacidad de campo: 39 %, densidad aparente: 0.94 g cm³, pH (1:2 agua): neutro con 6.97, materia orgánica: 3.08%, nitrógeno inorgánico: 12 mg kg⁻¹, fósforo (Bray): 120 mg kg⁻¹, hierro: 94.1 mg kg⁻¹, manganeso: 12.9 mg kg⁻¹. No se aplicó fertilizante ni otro compuesto en los años de recolecta.

Determinación de los perfiles fisiológicos a nivel comunidad

Para determinar los perfiles fisiológicos a nivel comunidad se utilizaron microplacas Biolog[®] EcoPlate[™] según Epelde *et al.* (2008), que contienen tres series de 31 fuentes de nutrientes potencialmente asimilables por las bacterias, de los cuales por lo

menos nueve pueden ser considerados como exudados radiculares de las plantas (Petchey *et al.*, 2002). Se pesó el equivalente a 1 g de cada muestra de suelo rizosférico y se mezcló en 9 ml de solución salina fisiológica al 0.85% para obtener una solución 1:10. A partir de ésta se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una dilución 1:10 000. Se inocularon 150 µl de la última dilución en cada pozo de la placa EcoPlate[™] e incubaron a 25±2 °C durante 160 h. Las reacciones positivas para la utilización de los sustratos se evidenció por el desarrollo de un color purpura en los pocillos. Se realizaron lecturas de la densidad óptica cada 24 h a 590 nm en espectrofotómetro para microplacas Multiskan[™] GO Thermo Inc.

Estimación de la Diversidad Funcional y actividad metabólica

Con los datos obtenidos de la medición de las densidades ópticas (DO) se calculó el promedio del desarrollo del color por pozo (AWCD por sus siglas en inglés) y el índice de Shannon-Weaver mediante la formula:

$$H = -\sum p_i (\ln p_i)$$

donde *H* es el índice de diversidad Shannon-Weaver, *p_i* es la actividad de cada sustrato (*DO_i*) entre la suma de las actividades de todos los sustratos ($\sum DO_i$)[8]. La actividad metabólica fue estimada mediante la sumatoria de las (*DO_i*) de los sustratos agrupados en seis grupos de acuerdo a la fuente de carbono probada y expresada en porcentaje de actividad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Perfiles fisiológicos de comunidad microbiana

Un total de 31 fuentes de carbono fueron probadas para construir los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas con los sustratos utilizados por las muestras de rizosfera en las diferentes etapas de ambas razas de maíz. El AWCD aportó información sobre todos los cambios globales en la abundancia microbiana total y/o actividad metabólica en respuesta a los cambios en el ecosistema. En los resultados obtenidos para el promedio del desarrollo del color (AWCD), se observó un incremento a medida que avanzó el tiempo de incubación de las muestras. El desarrollo del color fue mas rápido en las etapas R6 para ambos

suelos, mientras que en las etapas R4 y T0 fue mas lento (Figura 1), lo que significa mayor abundancia microbiana total en la etapa final del cultivo (R6).

Diversidad Funcional y actividad metabólica

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos del cálculo del índice de Shannon-Weaver (*H*) como indicador de

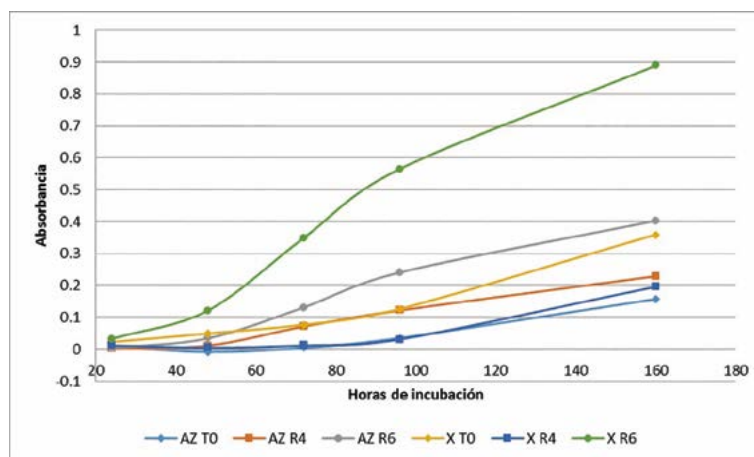


Figura 1. Desarrollo del color (AWCD) en las muestras de las tres etapas y dos razas de *Zea mays* L. evaluadas.

la diversidad funcional de las comunidades microbianas presentes en las muestras de suelo rizosférico evaluadas; un H menor a 2 se considera baja diversidad, H de 2-3 diversidad normal y H mayor a 3 como diversidad alta. (Borglin *et al.*, 2012) De

acuerdo a los resultados se observó que las comunidades microbianas presentes en el suelo del cultivo de la raza Xala indicaron mayor diversidad funcional que en las comunidades de la raza Amarillo Zamorano. Sin embargo, en ambos se observaron patrones similares entre las diferentes etapas; debido a que existe mayor diversidad funcional en las etapas inicial y final del cultivo (T0 y R6) la cual se ve disminuida durante la etapa de desarrollo del mismo (R4). La diferencia en la diversidad metabólica entre las etapas puede ser atribuida a la presencia de mayor cantidad de materia orgánica de las plantas y raíces residuales que permanecen en el suelo después de la cosecha en la etapa T0, así como el aumento de exudados radiculares en la etapa final del cultivo (R6). Baudoni *et al.* (2003) indicó que los exudados radiculares estimulan la proliferación bacteriana e incrementan la actividad microbiana y las comunidades. El índice calculado para los tiempos de incubación de 72 h y 96 h mostraron resultados similares con las lecturas obtenidas; es decir, presenta patrones similares de aumento o disminución del índice de Shannon-Weaver en las diferentes etapas, por lo que se seleccionaron los resultados obtenidos a las 72 h para estimar el porcentaje de las actividades metabólicas en las diferentes etapas para ambas tipos de maíz (Figura 2).

Para estimar la diversidad de la actividad metabólica de las comunidades microbianas presentes en las muestras de suelo evaluadas los resultados se agruparon en seis categorías

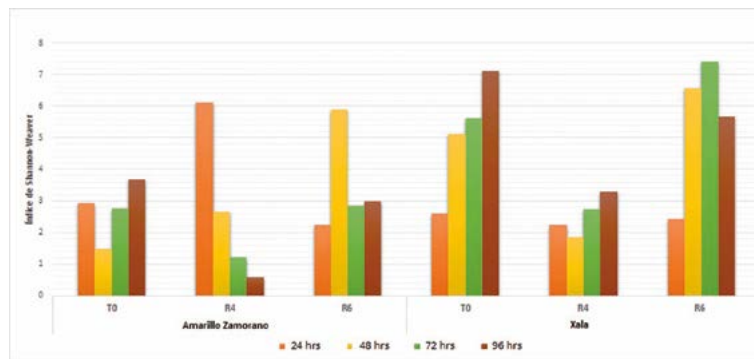


Figura 2. Índice de Shannon-Weaver de los sustratos metabolizados en las Eco-Plate de Biolog para dos razas de *Zea mays* L.

de acuerdo a las fuentes de carbono, tales como, carbohidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, polímeros, misceláneos y aminos/amidas. Los resultados mostraron que los grupos metabolizados en mayor porcentaje fueron los carbohidratos (CHOS) (20-30%), aminoácidos (20-25%) y ácidos carboxílicos (15-20%), mientras que el grupo menos metabolizado fue el de aminos/amidas que presentó de 0-10% de actividad (Figura 3). Los datos sugieren que la composición de las comunidades microbianas cambia con respecto a la etapa del cultivo y al tipo de suelo evaluado, lo cual se refleja en los cambios de las actividades metabólicas. Los perfiles fisiológicos obtenidos del Biolog[®] aportan información de la diversidad metabólica/funcional de las comunidades edáficas que puede ser empleada para potenciar las prácticas agrarias que permitan mantener la funcionalidad de los ecosistemas a través de la conservación de su biodiversidad, especialmente la biodiversidad edáfica (Blumenstein *et al.*, 2015).

El análisis funcional de comunidades microbianas involucra la caracterización de patrones y procesos que permiten predecir la estabilidad del ecosistema ante perturbaciones y esclarecer las interacciones entre los organismos que lo componen y el ambiente, que permite obtener una relación de tipo diversidad-función (Garland *et al.*, 1991; Laine *et al.*, 1997; Atanasova *et al.*, 2010). Debido a que el suelo realiza numerosas funciones de importancia como la producción de biomasa, descomposición de materia orgánica, reciclaje de nutrientes, depuración del agua, detoxificación de contaminantes, reservorio genético, etcétera, es esencial poner énfasis en la remediación de suelos contaminados y así garantizar la sostenibilidad del

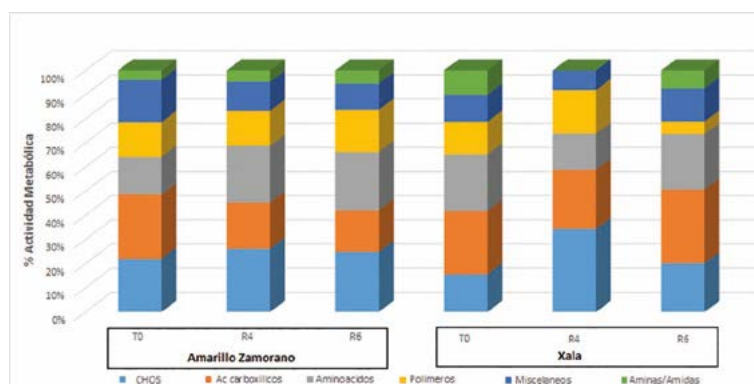


Figura 3. Comparación de la actividad metabólica funcional de las comunidades microbianas de suelo rizosférico de dos razas de *Zea mays* L.

ecosistema del suelo. (Li *et al.*, 201); y los indicadores biológicos de la calidad del suelo, en especial aquellos relacionados con la actividad y biodiversidad de las comunidades microbianas, presentan un enorme potencial como herramienta monitorizadora de la eficacia de un proceso fitorremediador.

CONCLUSIONES

En el presente estudio los análisis de la diversidad metabólica funcional mediante la estimación del AWCD y el índice de Shannon-Weaver como indicadores útiles que evidenciaron que existen cambios en la diversidad funcional de las comunidades microbianas tanto en las diferentes etapas del cultivo como en las diferentes razas de maíz evaluadas.

LITERATURA CITADA

- Atanasova L., Druzhinina I.S. 2010. Global nutrient profiling by Phenotype MicroArrays: a tool complementing genomic and proteomic studies in conidial fungi. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 11, 151–168. doi: 10.1631/jzus.B1000007
- Atlas R., Bartha R. 2002. *Ecología microbiana y Microbiología Ambiental*. 4ta Edición. España, Addison Wesley. 677 pp.
- Baudoin E., Benziri E., Guckert A. 2003. Impact of artificial root exudates on bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 35, 1183–1192.
- Begon M., Townsend C.R., Harper J.L. 2006. *ECOLOGY: From Individuals to Ecosystems*. 4th Edition. Blackwell Publ. Ltd. USA. 737 pp.
- Bending G.D., Turner M.K., Rayns F., Marx M.C., Wood M. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1785–1792.
- Blumenstein K., Macaya-Sanz D., Martín J.A., Albrechtsen B.R., Witzell J. 2015. Phenotype MicroArrays as a complementary tool to next generation sequencing for characterization of tree endophytes. *Front. Microbiol.* 6:1033. doi: 10.3389/fmicb.2015.01033
- Borglin S., Joyner D., Deangelis K.M., Et A. 2012. Application of phenotypic microarrays to environmental microbiology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 41–48.
- Buyer J., Drinkwater L. 1997. Comparison of Substrate Utilization assay and Fatty acids analysis of soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 30:3-11.
- Díaz-Borrego L., Dupont J., Cantini L., Soto L. 2007a. Diversidad funcional de las bacterias presentes en un suelo cultivado con guayaba (*Psidium guajava* L.). *Ciencia* 15(4): 388 – 397.
- Epelde L., Becerril J.M., Hernández-Alisa J., Barrutia O., Garbisu C. 2008. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Appl Soil Ecol* 39:299-310.
- Fornara D.A., Banin L., Crawley M.J. 2013. Multi-nutrient vs. nitrogen-only effects on carbon sequestration in grassland soils. *Glob Chang Biol* 19: 3848– 3857.
- Fraç M., Oszust K., Lipiec J. 2012. Community Level Physiological Profiles (CLPP), Characterization and Microbial Activity of Soil Amended with Dairy Sewage Sludge. *Sensors* 12: 3253-3268.
- Garland J.L., Mills A.L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol* 7: 2351–2359.
- Garland J., Mills A. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied Environmental Microbiology* 57:2351–2359.
- Greetham D. 2014. Phenotype microarray technology and its application in industrial biotechnology. *Biotechn. Lett.* 36, 1153-1160 doi: 10.1007/s10529- 014-1481-x
- Hernández C.L., Ramos J., López-Hernández D. 2006. Características de la comunidad microbiana y evaluación de algunos parámetros bioquímicos en dos sistemas de producción contrastantes en el estado Amazonas, Venezuela. *Agrobiológica* 3(5):15–21.
- Hernández-Ibáñez A.M., Arteaga-Garibay R.I., Martínez-Peña M.D., Zaldívar-López H.A., Aragón-Cuevas F., y Avendaño-Arrazate C.H. 2015. Guía para toma de muestras de suelo rizosférico para análisis microbiológico. Folleto Técnico No. 1. Centro Nacional de Recursos Genéticos, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. 40 pp.
- Laine, M., H. Haario y K. Joergensen. 1997. Microbial functional activity during composting of chlorophenol-contaminated sawmill soil. *Journal of Microbiological Methods* 30:21-32.
- Li L.J., Zeng D.H., Yu Z.Y., Fan Z.P., Mao R. 2010. Soil microbial properties under N and P additions in a semi-arid, sandy grassland. *Biol Fert Soils* 46(6):653–658
- Petchey O.L., K.J. Gaston. 2002. Functional diversity (FD), species richness and community composition. *Ecology Letters* 5:402– 411.
- Post W.M., Emanuel W.R., Zinke P.J., Stangenberger A.G. 1982. Soil carbon pools and world life zones. *Nature* 298: 156–159.
- Ricotta C. 2005. A note on functional diversity measures. *Basic Applied Ecology* 6:479-486.
- Stevens C.J., Dise N.B., Mountford J.D. 2004. Impacts of nitrogen deposition on the species richness of grasslands. *Science* 303: 1676–1679.
- Tilman D., Lehman C., Thomson K. 1997. Plant diversity and productivity, theoretical considerations. *Proceedings of Natural Academy Science* 94: 1857-1861.
- Zak J., Willing M., Moorhead D., Wildman H. 1994. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry* 26:1101-1108.

