



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGIA

INTERACCIÓN MINERALES-MICROORGANISMOS- METALES PESADOS EN ANTROSOLES DE ORIGEN VOLCÁNICO

TANIA GONZÁLEZ VARGAS

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis, titulada: **Interacción minerales-microorganismos-metales pesados en Antrosoles de origen volcánico**, realizada por la alumna: **Tania González Vargas**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:


Dra. MA. DEL CARMEN GUTIERREZ CASTORENA

ASESOR:


Dr. JULIÁN DELGADILLO MARTÍNEZ

ASESOR:


Dr. EFRAÍN R. ÁNGELES CERVANTES

ASESOR:


M. C. PATRICIO SÁNCHEZ GUZMÁN

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre 2014

RESUMEN
**INTERACCIÓN MINERALES-MICROORGANISMOS-METALES PESADOS EN
ANTROSOLES DE ORIGEN VOLCÁNICO**

Tania González Vargas

El uso de aguas residuales, en suelos agrícolas, es una práctica común a nivel internacional y cuestionada por el aporte de metales pesados y/o microorganismos patógenos. Los suelos del distrito de riego Los Insurgentes, en Teoloyucan, Estado de México, son clasificados como Anthrosols por su irrigación con aguas residuales e intensa actividad antrópica; asimismo, son muy reactivos por sus propiedades edáficas y materiales amorfos. El objetivo de este estudio fue evaluar la interacción metales pesados-microorganismos y la distribución *in situ* de bacterias en la zona rizosférica de maíz, pasto forrajero y alfalfa. Análisis físicos, químicos y biológicos, fueron determinados. Secciones delgadas se tiñeron con calcofluor white M2R y a través de una cámara digital de alta resolución y un microscopio óptico con epifluorescencia se obtuvieron 216 imágenes secuenciales (con resolución espectral de 200 nm). Los resultados indican que el Cd ocurre en concentraciones que superan los límites permisibles. El pH y la humedad explican el tamaño de las poblaciones de bacterias y en hongos es sólo la humedad. Los microorganismos solubilizadores de fosfatos se asocian principalmente con niveles de pH alcalino. La resistencia de bacterias aisladas de la rizósfera a metales pesados fue baja debido a que no existe presión selectiva por alta contaminación. En tanto, la nanocartografía permite el análisis geoespacial *in situ* de la distribución de bacterias y su relación con los componentes del suelo en diferentes cultivos. En maíz se asocian con las cavidades y fisuras de los minerales bajo condiciones de drenaje pobre, y en alfalfa con la raíz y materia orgánica. Finalmente, esta técnica puede evaluar procesos de manera más específica de la actividad microbiana a diferentes escalas y profundidades del suelo.

Palabras clave: *rizósfera, resistencia a metales pesados, nanocartografía, análisis espacial, microscopía de fluorescencia.*

ABSTRACT
MINERALS-MICROORGANISM-HEAVY METALS INTERACTION IN
ANTHROSOLS FROM VOLCANIC ORIGIN
Tania González Vargas

The use of wastewater in agricultural soils is a common practice used in many countries, and questioned by the contribution of heavy metals and/or pathogens. The soils under irrigation in the district Los Insurgentes in Teoloyucan, State of Mexico, were classified as Anthrosols for its irrigation with wastewater and intense human activity; also, they are very reactive for their edaphic properties and amorphous materials. The objective of this study was to evaluate the heavy metal-microorganisms interaction and *in situ* distribution of bacteria in the rhizosphere zone of maize, grass, and alfalfa. Physical, chemical, and biological analysis were determined. Thin sections were stained with calcofluor white M2R and through a high-resolution digital camera and an optical microscope with epifluorescence 216 sequential images were obtained (with spectral resolution of 200 nm). The results indicate that Cd occurs in concentrations above the allowable limits. The pH and moisture explain the size of populations of bacteria, and in the case of fungi only moisture was important. The phosphate solubilizing microorganisms are mainly associated with alkaline pH. Resistance of bacteria isolated from the rhizosphere to heavy metals was low because there is not a selective pressure for high pollution. Meanwhile, nanocartography allows geospatial analysis of *in situ* distribution of bacteria, and their relationship of these with soil components in different crops. In maize, bacteria are associated with cavities and fissures of minerals under conditions of poor drainage, and alfalfa they are associated with root and organic matter. Finally, this technique allow process more specifically assess microbial activity at different scales and soil depths.

Key words: *rhizosphere, heavy metals resistance, spatial analysis, microscopy fluorescence.*

El conocimiento bien se podría representar como un recorrido en forma de espiral, gracias al cual aspiramos a alcanzar la comprensión del mundo. Inicia desde el centro, que significa de donde empezamos a adquirir conocimientos y habilidades. Entre mayor sea la amplitud de este, mayor será nuestro aprendizaje adquirido; en breve, representa crecimiento y evolución.



A menudo me he sentido atraída por la escala minimalista en el sentido de cómo funcionan las cosas a un nivel microscópico y molecular... pero más normal resulta que la mayoría de las personas alguna vez hemos pensado que el suelo es un sistema inerte, estático y hasta aburrido; no obstante, en algo tan común como es el suelo ocurre vasta complejidad, interacciones, y balance que mantiene vida en constante movimiento; a la misma escala diminuta que nadie puede ver y que por ello, pasa desapercibida ante nuestros ojos. Gracias a mi estancia en esta institución he descubierto que el suelo no sirve sólo para pisarse, que va más allá, que significa sustento, futuro y **vida**. *T.G.V.*

“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas” *Marie Curie*.

Dedicatoria

A Dios, porque dentro de su grandeza, me ha permitido alcanzar una meta en mi camino de vida.

A mis padres, por todo su amor incondicional que me han brindado durante todo este tiempo. A mi mamá por su ejemplo de lucha y motivación; a mi papá por todo su apoyo. Ojalá puedan estar conmigo mucho más tiempo y disfrutar más momentos de dicha como este. Aunque no se los diga, les tengo un gran cariño y amor, por favor, siempre téngalo presente. Es en gran parte, gracias a ustedes que he llegado a este punto de mi vida.

A mis hermanos, ojalá siempre haya una luz de esperanza en su camino, que nunca se den por vencidos y que la lucha del día a día no sea una carga pesada para ustedes, más bien, que cada amanecer sea una oportunidad para ser mejores seres humanos.

A todos mis familiares, abuelos, tías, primas, simplemente por estar ahí. Gracias

A Vicente López, por seguir apoyándome, por brindarme palabras de aliento cuando me siento desanimada.

¡A mi México!, porque dentro de todos los problemas sociales, económicos, políticos, etc., eres un maravilloso lugar, con suma grandeza, con gente que aún lucha por ser mejor. Anhele que las cosas mejoren y que mi país, mi hermoso país, algún día brille con todo su esplendor. A las vidas que se han perdido por la lucha social, por ese valor y fortaleza que todos necesitamos para sacar a nuestro país adelante.

A ti....

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo financiero para este logro académico y profesional.

A todos los miembros del jurado:

A la Dra. Ma. del Carmen Gutiérrez Castorena con quien he tenido fortuna de trabajar, por su amabilidad y disposición para escuchar ideas y sugerencias, por su esfuerzo de hacernos mejores estudiantes, pero sobre todo mejores personas. Le agradezco muchísimo querer tomar este proyecto y sobre todo por la darme confianza para poder transmitir mis ideas. Gracias totales.

Al Dr. Efraín Ángeles Cervantes, quien conozco desde hace varios años. Muchas gracias por atender este proyecto y apoyarme desde que me conoce.

Al Dr. Julián Delgado Martínez por abrirme las puertas del laboratorio de Microbiología e igual tomar este proyecto, por su minuciosa revisión y por todas las ideas para su mejora, fue sin duda fundamental para el análisis microbiológico de esta investigación.

Al M. en C. Patricio Sánchez Guzmán por el soporte en todo momento durante la realización de este trabajo, por esa visión crítica que sueles que me motiva para hacer mejor las cosas que hago. Sabes que te aprecio mucho y que fue un placer convivir contigo en estos poco más de 2 años y por el tiempo que ya teníamos de conocernos. Pero sobre todo más que ser mi asesor, por ser mi amigo.

Al Dr. Jesús Pérez Moreno por aceptar ser revisor de este trabajo. Y de manera personal, por aquella ocasión que lo llegue a escuchar en un evento y despertó inquietud acerca del objetivo de la vida, me alentó, sin quererlo, a ser mejor y a disfrutar un poco más.

Quisiera extender un agradecimiento muy especial al Dr. Carlos Alberto Ortiz Solorio, por brindarme la maravillosa oportunidad de asistir a un Congreso Latinoamericano, aun sin ser parte de mi consejo. Fue una experiencia fabulosa poder visitar otro país y además del conocimiento y aprendizaje adquirido fue una vivencia personal inolvidable. No tengo palabras para agradecerle ese gran gesto que tuvo hacia mí. Gracias de todo corazón.

Asimismo, otro agradecimiento importante Al Dr. Edgar Vladimir Gutiérrez-Castorena, por todo el tiempo dedicado a esta investigación. Gracias por sus palabras de aliento y motivación que fueron para mi muy valiosas, ya que me dieron mucha confianza para poder continuar.

A Aldo, quien durante este año ha estado conmigo para darme ánimos y fuerzas cuando más las necesito, por esa alegría que te caracteriza y me suele contagiar, por soportar mis malos momentos y hacer amenos los restantes. Gracias por todo lo que me has brindado de manera incondicional. Te quiero mucho mi cielo.

A Dianita, porque a pesar de la distancia, hemos logrado mantener nuestra linda amistad, por siempre tener un espacio para escucharme. ¡Te quiero mucho amiga!

A mis compañeros con quienes he tenido la oportunidad de seguir frecuentando y contar con ellos: Andrea, Cecy, Adriana, Juan, Osvaldo, Sacni, Sandra, Mariana, Jesús y Ericka.

A Giovanna por ser atenta conmigo, por esa manera especial de ser y por tu amistad; a Cesar por ser un buen compañero y amigo.

A Juan Carlos, ¡manto! Gracias por apoyarme desde que entre al colegio, en las labores académicas y cuando odie SIG jiji me enseñaste un poco de lo que tú sabías. Pero sobre todo por ser mi amigo fiel, porque, desde que te conozco, siempre has tenido disposición para apoyarme y escucharme.

A Enrique, por resolver todas mis dudas y sacarme de apuros en más de una ocasión. A Humberto Martínez, por todos los instantes amenos. A ustedes por aquellos momentos de “convivencia”, por su amistad y apoyo... y ustedes.... ya saben... los estimo mucho jiji.

A Steinger, por estar ahí cuando pase por situaciones complicadas, nunca olvidare que gracias a ti pude sobrellevarlas. Gracias por tu tiempo, tus consejos y tú amistad.

A Naybi, por todos aquellos momentos en los que nos escuchábamos la una a la otra, por tus consejos y por estar ahí cuando me hacía falta con quien hablar, muchas gracias amiga.

A Luis Alberto, por aquellas amenas charlas, por tu manera de ser y por siempre ver con alegría la vida.

A mis compañeros Lupita, Steph, Esmeralda, Angélica, Liz, Carlos, Jonathan, Arturo, Juan Pablo, Liliana, Karla, Magda, por su excelente compañía y por hacer más amenos los tiempos difíciles.

A Carmelita Bojorguez Bautista, por siempre estar al pendiente de lo que pude necesitar durante mi estancia en el Colegio, por su enorme eficiencia, por tener siempre la disposición para apoyarme, y procurar mi bienestar. No se que hubiera hecho sin usted. ¡Muchas gracias!

A mis amigos laboratoristas de génesis, Pedro, Mario, Juan y Laura. Por su siempre disposición de ayudarme en lo que pudiera requerir. Asimismo, al maestro Jaime Cruz y Wences por su apoyo en análisis químico.

A mis compañeros de microbiología, por haberme aceptado como un miembro más de su área y siempre tener disposición por apoyarme o brindarme un consejo para realizar mejor mis actividades: Jessy, Azucena, Vivian, Vicky, Alejandra, Deysi, Brigsania, Itzel, Claudia, Yadira, Cristina, Gilberto, David, Apolinar, Lucio, Raúl, Salvador; a Rosarito, Edmundo, Lorenzo. Dr. Almaraz y Dr. Alarcón, Finalmente al Dr. Ronald Ferrera Cerrato, por aceptarme en su laboratorio.

A mis compañeros de química y microbiología, Ariadna, Isabel, Miriam, Stefani, Alex y Alfredo.

Al Colegio de Postgraduados, por permitir mi formación dentro de sus instalaciones, por todo el soporte brindado. Y de manera general a todo el personal académico, administrativo, de intendencia.

Cada persona contribuye de cierta manera, la que le es posible, y viene hacia ti para dejar una huella en el pensamiento, el alma, el corazón, la razón y en la visión de la vida. Nadie se cruza en la vida de alguien por casualidad, todos tenemos un papel que desempeñar en la vida de alguien más.

Sinceramente

Gracias

Tania González Vargas

CONTENIDO

	Pág.
CAPITULO 1.Introducción general.....	1
CAPITULO 2. Revisión de literatura.....	4
2.1. Minerales.....	4
2.1.1. Minerales amorfos.....	5
2.2. Irrigación con aguas residuales.....	7
2.2.1. Acumulación de metales pesados en suelo.....	8
2.2.2. Efecto de la adición de aguas residuales sobre los microorganismos del suelo.....	10
2.2.3 Supervivencia de microorganismos patógenos en condiciones agrícolas.....	13
2.3. Resistencia a metales pesados de bacterias aisladas de suelos irrigados con aguas residuales.....	16
2.4. Micromorfología de suelos.....	18
2.5. Microscopia de fluorescencia.....	20
2.5.1. Principios de microscopia de fluorescencia.....	20
2.5.2. Tinción de bacterias en secciones delgadas.....	20
2.6. Distribución espacial de bacterias en el suelo.....	22
2.7. Fisiología de microorganismos.....	25
2.7.1. Solubilización de fosfatos.....	25
2.8. Geomicrobiología.....	27
2.9. Referencias.....	30
CAPITULO 3. Objetivos e hipótesis	
3.1 Objetivo General.....	36
3.1.1. Objetivos específicos.....	36
3.2 Hipótesis.....	36
CAPITULO 4. Interacción microorganismos-metales pesados en la rizósfera de cultivos en Antrosoles irrigados con aguas residuales	
4.1. Resumen.....	38
4.2. Introducción.....	39
4.3. Materiales y métodos.....	42
4.3.1. Zona de estudio.....	42
4.3.2. Muestreo de suelos.....	43
4.3.3. Análisis de laboratorio.....	44
4.3.4. Análisis estadístico.....	44
4.4. Resultados y discusión.....	45

4.4.1. Propiedades edáficas de la zona rizósferica.....	45
4.4.2. Metales pesados totales.....	45
4.4.3. Tamaño de la población de bacterias aeróbicas y hongos.....	46
4.4.4. Microorganismos solubilizadores de fosfatos.....	48
4.4.5. Resistencia a metales pesados.....	50
4.5. Conclusiones.....	52
4.6. Referencias.....	58

CAPITULO 5. Distribución espacial de bacterias en secciones delgadas de suelo

5.1. Resumen.....	62
5.2. Introducción.....	63
5.3. Materiales y métodos.....	66
5.3.1. Colecta de muestra inalterada de suelo.....	66
5.3.1.1 Zona de estudio.....	66
5.3.1.2. Muestreo.....	66
5.3.2. Elaboración de secciones delgadas.....	67
5.3.3. Microscopia.....	67
5.3.3.1 Fluorescencia y campo claro.....	67
5.3.4. Imágenes digitales secuenciales.....	68
5.3.5. Georreferenciación y proyección de imágenes individuales.....	68
5.4. Resultados y discusión.....	70
5.4.1 Mosaico digital.....	70
5.4.2. Distribución de colonias bacterianas en los componentes del suelo.....	71
5.4.2.1. Tierras negras con relación al cultivo de maíz.....	71
5.4.2.2. Tierras lamas con relación al cultivo de alfalfa.....	74
5.5. Conclusiones.....	77
Conclusiones finales.....	86

Índice de Figuras

	Pág.
<i>Figura 2.1.</i> Producción de secciones delgadas y su visualización (Nunan <i>et al.</i> , 2001).....	19
<i>Figura 2.2</i> Diagrama que ilustra la interacción de bacterias y hongos con partículas minerales en agregados del suelo (Then y Orchard, 1995).....	25
<i>Figura 2.3.</i> Mecanismos involucrados en la detoxificación y transformación de metales incluyendo los mecanismos que restringen la entrada a la célula (Gadd, 2010).....	28
<i>Figura 4.1.</i> Localización de la zona de estudio (Reséndiz-Paz <i>et al.</i> (2013).....	42
<i>Figura 4.2.</i> Concentración de metales pesados totales en tierras lamas y negras en diferentes cultivos.....	55
<i>Figura 4.3</i> Tamaño de las poblaciones de bacterias aeróbicas, hongos y microorganismos solubilizadores de fosfatos en tierras lamas y negras del distrito de riego los Insurgentes.....	56

<i>Figura 4.4.</i> Porcentaje de bacterias tolerantes a metales pesados aisladas de la rizósfera de maíz, pasto forrajero y alfalfa cultivadas en tierras lamas y negras del distrito de riego los Insurgentes, Teoloyuacan, Estado de México.....	57
<i>Figura 5.1.a</i> Colecta de muestra, elaboración de la sección y microscopia de fluorescencia.....	69
<i>Figura 5.1.b.</i> Georreferenciación y proyección de imágenes individuales.....	69
<i>Figura 5.2.</i> Mosaicos digitales de 1cm ² compuestos de 216 imágenes.....	81
<i>Figura 5.3</i> Comunidades microbianas en minerales. Maíz-tierras negras.....	82
<i>Figura 5.4</i> Comunidades microbianas en materia orgánica dentro de los agregados. Maíz-tierras-negras.....	83
<i>Figura 5.5.</i> Colonias bacterianas en materia orgánica con grado de descomposición avanzado y que forma parte de la estructura basal del suelo.....	84

Índice de cuadros

Pág.

<i>Cuadro 4. 1.</i> Propiedades de los horizontes superficiales de dos clases de Tierras bajo cultivos de alfalfa, pasto forrajero y maíz del Distrito de Riego Los Insurgentes.....	54
<i>Cuadro 2.</i> Proporción de la población de bacterias resistentes a metales pesados aislados de la rizósfera de maíz, pasto forrajero y alfalfa en tierras lamas y negras del Distrito de Riego los Insurgentes.....	54

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Desde décadas pasadas se ha presentado una creciente preocupación con respecto a la crisis del agua. El agua es cada vez más escasa en zonas con clima seco y hay importantes implicaciones políticas en algunas regiones para regular su escasez, por lo que el reuso de las aguas residuales representa una opción bastante extendida para el riego agrícola, pues tiene la ventaja de reaprovechar los nutrimentos en los cultivos y evitar la contaminación de cuerpos de agua superficial (Blumenthal *et al.*, 2000; Jiménez-Cisneros *et al.*, 2005).

Sin embargo, ésta práctica no está exenta de problemas y si no se maneja adecuada, puede resultar en la contaminación de acuíferos someros. Los contaminantes potenciales incluyen componentes químicos orgánicos e inorgánicos, metales pesados y patógenos (Gallegos *et al.*, 1999). La acumulación de metales pesados en el suelo es una forma de degradación que afecta negativamente la producción agrícola, el uso del suelo y la calidad del agua (Bech *et al.*, 2008), y por su carácter no biodegradable, pueden resultar peligrosos para la salud (Prieto-Méndez *et al.*, 2009) e inclusive para los microorganismos autóctonos del suelo.

La concentración de metales pesados disponibles en el suelo depende del contenido original, su textura, contenido de materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico (Zamora *et al.*, 2008) sobre todo en las fracciones coloidales, en materiales inorgánicos como orgánicos, mejor representados por las arcillas y el humus (Ortiz-Solorio, 2010).

En México, el rápido crecimiento en la población urbana ha incrementado la demanda por el agua, la disposición de enormes volúmenes de aguas residuales e incremento en el uso de éstas para la irrigación agrícola. Particularmente, en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) se asienta la zona urbana más grande del país, la cual genera problemas en cuanto al manejo de las aguas residuales (Jiménez-Cisneros *et al.*, 2005).

Del total del agua generada en la ciudad sólo un porcentaje es tratada y la restante sale del valle sin tratar y se emplea para el riego del Valle de Tula (Mezquital), Teoloyucan y Zumpango (Downs *et al.*, 1999; Jiménez *et al.*, 2005). En el año de 1976 el distrito de riego Los Insurgentes en Teoloyucan, Estado de México se estableció con el fin de utilizar las aguas residuales provenientes de la ciudad de México (Reséndiz-Paz, 2012). La actividad agrícola y formación de suelos en este distrito ha sido muy intensa por lo que actualmente los suelos se clasifican como Antrosoles.

Por otra parte, los suelos del Valle de México tienen altos contenidos de sílice amorfa, lo cual denota la influencia de la Faja Volcánica Transmexicana en la deposición de materiales de origen volcánico (Gutiérrez-Castorena y Ortiz-Solorio, 1992; Segura *et al.*, 2000). Reséndiz-Paz (2012) registró en el distrito de riego Los Insurgentes, la presencia de óxidos de hierro en formas cristalinas, como hematita y goethita, además de alófono, mineral que se considera amorfo o no cristalizado.

Rivera-Vargas (2013) encontró que en el distrito de riego Los Insurgentes, los metales pesados no se encuentran biodisponibles y lo atribuye a la formación de complejos con la materia orgánica y los minerales amorfos. Esta clase de minerales tienen alta área superficial específica, lo que los hace eficientes sorbentes de cationes (Schwertmann y Taylor, 1989; Wada, 1989) lo que evita su lixiviación y disponibilidad (Zamora *et al.*, 2008). No obstante, la relación de metales pesados con arcillas amorfas no ha sido estudiada en zonas de irrigación con aguas residuales, a pesar de su activa participación en el secuestro de metales pesados.

En adición, los microorganismos toman un papel importante al interactuar con metales y minerales en ambientes naturales, alterando su estado físico y químico y en contraparte los metales y minerales también pueden afectar el crecimiento, actividad y supervivencia microbiana (Gadd, 2010). Esta dinámica es objeto de estudio de la geomicrobiología. A pesar

de la importancia del estudio de estas interacciones no existen estudios que evalúen la cantidad de microorganismos que se encuentran en el suelo después de la irrigación con aguas residuales y su relación con el ambiente edáfico.

Asimismo, es ampliamente reconocido que el ambiente edáfico influye la disponibilidad de nutrientes, competencia, riesgo de predación y sobrevivencia (Franklin y Mills, 2007). Por lo que resulta contradictorio obviar parámetros edáficos cuando se desea analizar comunidades microbianas que son aisladas de este ambiente. Es importante, por tanto, considerar estos parámetros para explicar tendencias, diversidad o tamaño de poblaciones microbianas. Esto hará posible la identificación de factores clave que puedan estar relacionadas directamente sobre estas poblaciones (Giller *et al.*, 2009).

CAPITULO 2. REVISION DE LITERATURA

2. 1 Minerales

Los minerales cubren cerca de la mitad del volumen de muchos suelos. Estos proveen soporte físico, crean una interfase adecuada entre aire y agua que hace posible el crecimiento de las plantas. La intemperización de los minerales libera nutrientes para las plantas, los cuales son retenidos por otros minerales a través de la adsorción, el intercambio catiónico y la precipitación. Los minerales pueden adsorber muchos contaminantes orgánicos e inorgánicos, promoviendo su degradación, atenuando su movimiento dentro del suelo, o previniendo su translocación en plantas y la introducción dentro de éstos a través de la cadena trófica (Schulze, 2002).

Klein y Hurlbut (1993) definen a un mineral como un cuerpo natural sólido con composición química definida y arreglo atómico altamente ordenado. Los minerales, de acuerdo a su origen, se clasifican en primarios y secundarios. Los primarios se forman a partir del enfriamiento y solidificación del material magmático, los secundarios, del intemperismo químico de los minerales primarios menos resistentes (Ortiz-Solorio, 2010).

Otra clasificación más extensa es la que se refiere a la dependencia del anión o grupo aniónico dominante: i) elementos nativos, ii) sulfuros, iii) sulfosales, iv) óxidos e hidróxidos, v) haluros, vi) carbonatos, vii) nitratos, viii) boratos, ix) fosfatos, x) sulfatos y xi) silicatos (Schulze, 2002).

Por otra parte, existe una clase especial de minerales, los denominados minerales amorfos, debido a que tienen una estructura cristalina pobremente desarrollada. Estos se originan a través de la deposición e intemperismo de materiales volcánicos. La ocurrencia de suelos con este tipo de materiales se asemeja mucho a la distribución global de volcanes activos y a los recientemente extintos (Takahashi y Shoji, 2003). Las condiciones ambientales

específicas de estos sitios, como resultado de la localización y manejo, dan una combinación única de factores en procesos de formación de suelo (Rivera-Vargas, 2013).

2.1.1 Minerales amorfos

Las arcillas amorfas son minerales no cristalinos, y se les denomina de rango corto porque no exhiben rasgos distintivos de patrones de difracción en rayos X. Quizá el grupo más importante de este tipo de arcillas es el alófono (Tan, 2011); sin embargo, también se encuentran dentro de este grupo a la imogolita, ferrihidrita y ópalo.

El alófono y la imogolita son aluminosilicatos pobremente cristalizados caracterizados por un tamaño de partícula pequeño, alta área superficial específica y carga permanente o variable. Éstos han sido mayormente asociados con suelos derivados de cenizas volcánicas. La composición química es relativamente estable en imogolita pero extremadamente variable en alófono, el cual puede contener cantidades significantes de Fe en adición a Al y Si (Harsch *et al.*, 2002).

La imogolita es un silicato de aluminio identificado en muchos suelos derivados de cenizas volcánicas y otros depósitos piroclásticos intemperizados. (Cradwick *et al.*, 1972). La fórmula de la imogolita es $\text{Al}_2\text{SiO}_3(\text{OH})_4$ y exhibe corto, mediano y largo rango. El rango corto se refiere a la relación entre las unidades estructurales tales como los octaedros Al-O y tetraedros de Si-O y su yuxtaposición sobre las distancias cortas. El aluminio solo se presenta en la coordinación octaédrica y la sílice tetraédrica es altamente polimerizada. Además, su alta superficie específica, características inusuales de carga superficial y morfología única conduce a propiedades físicas y químicas que pueden afectar profundamente el comportamiento del suelo (Harsch *et al.*, 2002).

El alófono y la imogolita pueden reaccionar fuertemente con agua, cationes metálicos, aniones, varias moléculas orgánicas y otras partículas minerales que afectan la estructura y resistencia del suelo, la productividad y movilidad de contaminantes (Harsch *et al.*, 2002).

La ferrihidrita pertenece al grupo de los oxihidróxidos férricos y está caracterizada por su alta dispersión, pobre cristalinidad y baja estabilidad. Es un componente que puede ser fácilmente transformado a goethita (αFeOOH) y hematita ($\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$) (Drits *et al.*, 1993). El promedio de tamaño de partícula de la ferrihidrita es inusualmente pequeño ($\sim 30 \text{ \AA}$). Debido a su alta reactividad y alta área superficial específica ($>200 \text{ m}^2$) es un buen adsorbente (Zhao *et al.*, 1994).

En tanto, la sílice opalina es comúnmente encontrada en suelos jóvenes formados sobre cenizas volcánicas. La formación de la sílice opalina es favorecida por la rápida intemperización de vidrio volcánico, un pronunciado periodo de desecación o concentración de solutos, y baja actividad del Al el cual previene la formación minerales aluminosilicatados. La sílice opalina es a menudo asociada con la presencia de altas concentraciones de materia orgánica (horizontes A de Andisoles), o ácidos orgánicos solubles (horizontes E de Spodosoles) (Shoji *et al.*, 1993).

Los minerales amorfos tienen una alta área superficial específica, que los hace eficientes sorbentes de cationes tales como Al, Cu, Pb, V, Zn, Co, Cr y Ni (Schwertmann y Taylor, 1989; Wada, 1989) con lo cual se evita su lixiviación y disponibilidad (Zamora *et al.*, 2008). Aunque no existe una secuencia completa de afinidad de adsorción de metales pesados a las superficies de aluminosilicatos de rango corto, los grupos aluminol de la gibsita exhiben la siguiente secuencia (en orden de disminución de afinidad): $\text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$; mientras que los grupos silanol del sílice siguen el orden: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} = \text{Cd}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$. Estos datos indican que los metales Pb, Cu, Co y Zn son comúnmente sorbidos selectivamente (sobre el grupo de cationes 2A) a las superficies de

alófano e imogolita, y la naturaleza precisa de la secuencia de selectividad dependerá de la relación molar Si/Al (Harsch *et al.*, 2002).

Un estudio más reciente llevado a cabo por Reséndiz-Paz (2012) en el distrito de riego Los Insurgentes determinó la presencia de óxidos de hierro en formas cristalinas, como la hematita y goethita; además, reportó un índice $Alox/Siox \geq 1$, lo cual demuestra la presencia de alofano. En tanto, Rivera-Vargas (2013) determinó la clasificación de amorfos para tierras negras y lamas en tres tipos de cultivo. Para tierras negras, en alfalfa y pasto forrajero, alofano-ópalo, y en maíz imogolita-ópalo; en tanto, para tierras lamas encontró que para maíz y alfalfa existe ópalo y para pasto forrajero imogolita-ópalo. Además, determinó que existe fuerte interacción entre la materia orgánica y las arcillas amorfas en donde los metales pesados son secuestrados, lo que genera menos disponibilidad para los microorganismos y los cultivos.

2.2 Irrigación con aguas residuales

La tendencia de reutilización del agua puede deberse a una actitud conservacionista y sanitaria, acorde a un pensamiento de protección al ambiente, donde países como Alemania, Australia, Canadá, España y Estados Unidos, le dan un tratamiento primario y luego la reciclan en pequeñas cantidades, aminorando la falta de este recurso. En otros países como Brasil, Chile, India, Israel, Marruecos, México y Perú, reutilizan el agua residual en el desarrollo local o regional, empleándola principalmente, en actividades agropecuarias (Acosta-Álvarez, 2007).

A nivel mundial, después de la República Popular de China, México es el segundo país que más agua residual emplea para el riego de grandes extensiones agrícolas; aproximadamente 350,000 ha en donde se cultivan especies vegetales de consumo básico (Acosta-Álvarez, 2007; Veliz *et al.*, 2009). Particularmente, en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM)

se asienta la zona urbana más grande del país, la cual genera problemas de desalojo de las aguas residuales (Jiménez-Cisneros *et al.*, 2005).

La ciudad genera un promedio anual de $237 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de aguas residuales; las cuales están compuestas por una mezcla de aguas residuales domésticas, municipales, industriales y de precipitación pluvial. Un porcentaje es tratado para re-uso en el interior de la ciudad, la restante sale del valle sin tratar y se emplea para el riego del Valle de Tula (Mezquital), Teoloyucan y Zumpango (Downs *et al.*, 1999; Jiménez-Cisneros *et al.*, 2005). El distrito de riego Los Insurgentes se localiza en la periferia de la Laguna de Zumpango y sus suelos se formaron por rellenos a partir de minerales que fueron dragados de la Laguna (sedimentos lacustres) o del Canal de Santo Tomás.

Además del uso de aguas residuales ya sea por inundación o por irrigación frecuente (Reséndiz-Paz, 2012), también se está incorporando materiales orgánicos (estiércol) e inorgánicos (yeso comercial). Este tipo de prácticas también está incrementando de manera importante la acumulación de fosfatos disponibles, para el caso de tierras negras, Rivera Vargas, 2013 reportó $133.98 \text{ mg kg}^{-1}$, y para el caso de tierras lamas registró un intervalo entre 93.6 y 272.6 mg kg^{-1} .

2.2.1 Acumulación de metales pesados en el suelo

El suelo en general actúa como una barrera protectora de otros medios más sensibles (hidrológicos y biológicos), filtrando, descomponiendo, neutralizando o almacenando contaminantes; evitando en gran parte su biodisponibilidad. Esta capacidad depuradora depende de los contenidos de materia orgánica, carbonatos y oxihidróxidos de hierro y manganeso, de la proporción y tipo de minerales de arcilla, de la capacidad de intercambio catiónico, pH y conductividad eléctrica, textura, permeabilidad y actividad microbiana (Galán y Romero, 2008).

Aunque el uso de aguas residuales en la agricultura aumenta el ingreso de materia orgánica y nutrimentos a los suelos cultivados, también puede traer efectos ambientales nocivos que deterioran la calidad del suelo. Su uso sin un tratamiento previo puede ocasionar problemas debido al alto contenido de sales, contaminación con metales pesados y la existencia de algunos microorganismos patógenos (Bech *et al.*, 2008; Scheierling *et al.*, 2010; Nayek *et al.*, 2010).

La presencia de metales pesados concierne un serio problema, ya que cuando es alcanzada la acumulación excesiva se pueden presentar efectos adversos en el crecimiento y desarrollo de las plantas y también entrar a la cadena trófica (Paradelo *et al.*, 2009). Al respecto, Siebe, (1994) determinó en Feozems del Valle del Mezquital, Hidalgo, concentraciones totales de 1.55 mg kg⁻¹ para Cd; 41 mg kg⁻¹ para Cu; de 50 mg kg⁻¹ para Pb; y 161 mg kg⁻¹ para Zn; mientras que para Vertisoles las siguientes concentraciones: Cd (0.78 mg kg⁻¹), Cu (33 mg kg⁻¹), Pb (40 mg kg⁻¹) y para Zn (119 mg kg⁻¹). En Feozems se aprecia mayor contenido de metales pesados, probablemente por mayor concentración de materia orgánica que es un fuerte adsorbente de estos elementos.

Para la misma zona, pero más recientemente, Acosta-Álvarez (2010) para suelos del Valle del Mezquital, reportó concentraciones totales de 21-96 mg kg⁻¹ para Cu, 26-57 mg kg⁻¹ para Ni, 8-86 mg kg⁻¹ para Pb y de 66-391 mg kg⁻¹ para Zn. Se observa una tendencia al aumento de las concentraciones de metales pesados con respecto a lo reportado por Siebe 14 años antes.

En Beijing, China, en una zona irrigada con aguas residuales Khan *et al.* (2008) encontraron concentraciones de Cd de 0.84 mg kg⁻¹; Cu de 32.8 mg kg⁻¹; Ni de 24.9 mg kg⁻¹; Pb de 49.4 mg kg⁻¹ y Zn de 157 mg kg⁻¹. Mapanda *et al.* (2005), en suelos tropicales arenosos y areno-arcillosos de Zimbabwe irrigados con aguas residuales reportaron las siguientes concentraciones de metales pesados: Cd (0.5 a 3.4 mg kg⁻¹), Cu (7-145 mg kg⁻¹), Ni (<0.01 a 21 mg kg⁻¹), Pb (4-59 mg kg⁻¹) y para Zn (14 a 228 mg kg⁻¹).

2.2.2 Efecto de la adición de aguas residuales sobre los microorganismos del suelo

El número, especies y actividades de los microorganismos en el suelo son influenciados por la cantidad de materia orgánica, especies vegetales, cantidades de enmiendas orgánicas aplicadas, textura pH, humedad, aireación, cantidades de sales y otros factores. Por lo anterior, ciertos organismos activos en algún microambiente en particular están mejor adaptados a las condiciones presentes o son los competidores más exitosos (Martin y Fotch, 1977).

Las aguas residuales, al presentar un alto contenido de materia orgánica y nutrientes, pueden estimular el crecimiento microbiano en el suelo en corto tiempo, pero los impactos a largo plazo, a través de su uso en la irrigación, pueden ser perjudiciales para los microorganismos y sus funciones ecosistémicas, debido a la acumulación de los constituyentes del agua, incluidos los metales pesados, las sales y toxinas potenciales procedentes de hospitales y de la actividad industrial (Roesner *et al.*, 2010; Waithira, 2010).

Los suelos naturalmente contienen una amplia diversidad de elementos metálicos los cuales pueden estar presentes en concentraciones variables y en diferentes especies químicas. No obstante, cuando aumenta su concentración constituye una compleja ruptura del equilibrio ecológico. Algunos metales no tienen relevancia biológica, mientras que otros, aunque son esenciales elementos traza, se pueden convertir en tóxicos bajo una cierta concentración (Waithira, 2010).

La biota del suelo debe permanentemente regular sus actividades para hacer disponibles los metales esenciales y tomarlos solo en las concentraciones requeridas, o bien excluir o detoxificar las formas detrimentales o aquellas que se encuentren en niveles críticos. Por lo anterior, los microorganismos exhiben alta adaptabilidad fisiológica (Kamal *et al.*, 2010), debido a que muestran amplia variedad de propiedades que pueden generar cambios en la

especiación de metales, en su toxicidad y movilidad, así como la formación, disolución o degradación (Gadd, 2010).

Sin embargo, en lo referente a la relación entre metales pesados y los efectos a corto y largo plazo de la irrigación con aguas residuales sobre los microorganismos autóctonos del suelo, la información es escasa. Asimismo, los impactos son difíciles de predecir debido al constante cambio y heterogeneidad de los químicos que la componen. Con base en características metabólicas, fisiológicas, tamaño y estructura de comunidades microbianas se ha encontrado que la microbiota nativa del suelo, después de la irrigación con aguas residuales, muestran una tendencia hacia la adaptabilidad, a pesar de la considerable carga de contaminantes y otro tipo de microorganismos, algunos de ellos clasificados como patógenos (Waithira, 2010)

Al respecto Malkawi y Mohammad (2003) evaluaron el efecto la irrigación con aguas residuales y agua potable en campos de cultivos forrajeros sobre la supervivencia de los microorganismos del suelo y la acumulación de bacterias de origen fecal. Estos autores encontraron que la sobrevivencia y número de bacterias coliformes totales y aeróbicas tuvieron un conteo más alto, después de que la muestra fue tomada pocas horas después de la irrigación. También observaron que el número de bacterias heterótrofas en la muestra del suelo de la capa superficial fue mayor que en la capa más profunda debido a que en la superficie se presenta mayor contenido de materia orgánica y arcillas.

Investigaciones recientes han determinado que el uso de aguas residuales en suelos, disminuye la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares (AMF) (Alguacil *et al.*, 2012), por la entrada adicional de nutrimentos en el agua residual. Otros estudios han apuntado que los cambios en las propiedades del suelo son los factores que influyen la estructura de las comunidades de micorrizas en sistemas de agricultura debido a los diferentes requerimientos de los hongos por C, N o P (Jumpponen *et al.*, 2005; Alguacil *et al.*, 2012).

Asimismo se ha reportado que las actividades enzimáticas como la fosfatasa alcalina, la ureasa, deshidrogenasa, proteasa y β -glucosidasa fueron significativamente más altas en suelos irrigados con aguas residuales. Los efectos benéficos registrados sobre la biomasa microbiana y los relacionados con sus actividades pueden ser atribuidos a la incorporación de nutrimentos y materia orgánica de fácil descomposición (Jumpponen *et al.*, 2005; Alguacil *et al.*, 2012).

En Vertisoles y Leptosoles del Valle de Mezquital en la zona Central de México, Ortega-Larrocea *et al.* (2007) observaron incremento en la abundancia de esporas en irrigación de 5 a 65 años y mejor balance nutrimental del suelo, lo que favoreció el crecimiento de micorrizas arbusculares. Estos autores afirman que la esporulación está relacionada con la disponibilidad de nutrientes, la cual es deficiente en suelos irrigados en periodos cortos de tiempo; por lo que, el óptimo periodo de riego se encuentra entre 35 y 65 años, pero después de 65 años la abundancia de esporas disminuye debido a la toxicidad causada por la acumulación de metales pesados.

Por otra parte, Xu *et al.* (2012) determinaron la influencia de la irrigación con aguas residuales sobre la cantidad y distribución de microorganismos en el suelo; así como, la relación entre el contenido de nutrientes y la cantidad de diferentes microorganismos. Los resultados muestran que la cantidad de bacterias se incrementó significativamente en 50.39%; mientras que los actinomicetos y hongos fueron disminuidos en 39.78 y 79.55%.

En la zona de estudio, no existen investigaciones dirigidas a estudiar el impacto de la irrigación con aguas residuales sobre la microflora del suelo a pesar de que representa un sitio con características especiales a nivel mundial por el tipo de materiales edáficos que presenta (minerales amorfos), alta cantidad de materia orgánica que se adiciona a los suelos como parte de su manejo (Reséndiz-Paz, 2012; Rivera Vargas, 2013), lo que influye en la distribución, concentración y disponibilidad de metales pesados.

2.2.3 Supervivencia de microorganismos patógenos en condiciones agrícolas

El riego con aguas residuales domésticas no tratadas representa un serio riesgo, pues constituyen una importante fuente de agentes patógenos como bacterias, virus, protozoarios y helmintos (lombrices) que causan infecciones gastrointestinales en los seres humanos. También contienen toxinas químicas muy peligrosas que provienen de fuentes industriales (Veliz-Lorenzo *et al.*, 2009); por lo que la principal limitación a cualquier proyecto de uso de aguas residuales es el riesgo a la salud pública.

Las aguas residuales, especialmente las domésticas, contienen patógenos que pueden causar propagación de enfermedades cuando no se manejan de manera adecuada. Entre estos riesgos se incluyen la contaminación de alimentos por organismos patógenos y vectores de enfermedades que son atraídos por actividades agrícolas y son responsables de enfermedades (Waithira, 2010).

Los suelos agrícolas, componente esencial de los ecosistemas, son considerados como un gran filtro natural, ya que tienen la capacidad de remover microorganismos patógenos provenientes de las aguas residuales (Malkawi y Mohammad, 2003). La sobrevivencia de éstos en el suelo depende de la temperatura, humedad, pH, composición y presencia de otros microorganismos (WHO, 2006; García-Orenes *et al.*, 2007).

De manera general, existen dos enfoques acerca de la sobrevivencia de patógenos en el suelo después de la irrigación con aguas residuales. En primera instancia, el que considera que los factores ambientales y las propiedades del suelo, así como la microbiota nativa son capaces de regular los microorganismos patógenos que entran al suelo a través de las aguas residuales.

Por ejemplo, las altas temperaturas conducen a la rápida mortandad mientras que temperaturas bajas conducen a la sobrevivencia prolongada. En tanto, la acidez extrema y la alcalinidad, (pH < 6.0 o pH > 8.0) tienden a ser desfavorables para la mayoría de las bacterias

en el suelo, mientras que los pH neutros generalmente favorecen el crecimiento y sobrevivencia de las bacterias entéricas. Los organismos patógenos *Erysipelothrix spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *S. fecalis* y *Mycobacterium* sobreviven mejor en suelos con un pH entre 6.0 y 7.0 y la mejor tasa de inactivación es encontrada en suelos ácidos. Asimismo, la radiación solar directa, conduce a la inactivación rápida de patógenos a través de la desecación y exposición a la radiación ultravioleta (FAO, 1997; WHO, 2006).

Por otra parte, las actividades antagonistas de las poblaciones saprofíticas del suelo son importantes en el control patógeno o de microorganismos que provocan enfermedades. La microflora natural se adapta a metabolizar casi cualquier sustancia orgánica, la cual gradualmente ataca los patógenos después de que las aguas residuales son aplicadas en la superficie del suelo, por lo que numerosos procesos ambientales y del suelo se activan para destruir algún agente patógeno que puede estar presente. (Martin y Focht, 1977; WHO, 2006).

Asimismo, se ha reportado que algunos factores fomentan el desarrollo de microorganismos patógenos. A saber, los suelos arcillosos y con materia orgánica permiten la supervivencia de patógenos (FAO, 1997). La materia orgánica del suelo mejora la sobrevivencia de coliformes, debido a que esta es importante para la retención de agua, formación y estabilización de agregados y formación de microhábitats; en tanto, las arcillas influyen la actividad microbiana por el cambio en las características físicas y químicas del hábitat microbiano (Estrada *et al.*, 2004).

El otro enfoque es que la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1989) afirma que casi todos los patógenos excretados pueden sobrevivir en el suelo por un tiempo suficientemente largo para presentar riesgos a los agricultores. Gerba (1975) establece que la supervivencia de microorganismos patógenos es menor de 2 a 3 meses. Por lo que, la FAO (1997) recomienda tomar medidas para interrumpir el ciclo de infección.

Si bien, los patógenos sobreviven en la superficie de los cultivos por un periodo de tiempo corto debido a que no están protegidos de los rayos solares y sufren pérdidas de humedad; aun así representan un riesgo potencial a los manejadores de los cultivos y consumidores, especialmente cuando los tiempos de supervivencia son más largos que los ciclos de crecimiento de los cultivos. Además, la contaminación frecuente del suelo por el agua residual y heces fecales cancela los efectos adversos de los factores ambientales, permitiendo a los patógenos permanecer viables en el suelo por dos meses o más especialmente en zonas húmedas y protegidas de la luz (WHO, 1989).

No obstante, un aspecto clave que se necesita considerar cuando se evalúa el riesgo, es la extensa variabilidad en la capacidad de los patógenos para sobrevivir en ambientes externos (especialmente en suelo, aire y agua). Las enfermedades bacterianas del hombre que son comúnmente consideradas peligrosas en el uso de aguas residuales son fiebre tifoidea y paratifoidea, cólera, disentería, gastroenteritis e ictericia leptospiral (Martin y Focht, 1977).

Malkawi y Mohammad (2003) determinaron una concentración de coliformes totales de 2.1×10^2 a 4.2×10^3 UFC g^{-1} suelo seco, mientras que fecales fueron de 1.2×10^2 a 4.2×10^2 UFC g^{-1} suelo seco en un suelo de naturaleza árida irrigado con aguas residuales. En tanto, García *et al.* (2007) encontraron una concentración de 2×10^7 UFC g^{-1} suelo seco. Al-Nakshabandi *et al.* (1997) obtuvieron presencia de coliformes (3.3×10^2 a 4.6×10^4 por 100 mL), principalmente en la superficie del suelo debido al efecto de filtración del suelo. Además, indican que este contenido no se incrementa con 5 años continuos de irrigación porque estos organismos no pueden persistir por un largo tiempo en el suelo, dado que tales suelos no proveen un ambiente adecuado para su desarrollo. No obstante, es importante recalcar que esta situación es diferente si se modifican las condiciones del suelo y ambiente.

Para el caso de las aguas residuales del Distrito de Riego Los Insurgentes, Castañeda *et al.* (1999) afirmaron que el conteo de coliformes fecales sobrepasa los límites máximos permisibles para las aguas residuales del Distrito de Riego los Insurgentes y por otra parte no se presentó diferencia significativa entre los meses de muestreo (7, 667 y 6, 133 de coliformes totales y fecales respectivamente para junio; 18, 666 800 y 12, 000 000 para coliformes totales y fecales en octubre). Asimismo, aseguran que la calidad del agua residual no es apta para riego agrícola.

De manera adicional, estos autores determinaron el conteo de coliformes totales y fecales en los suelos irrigados con estas aguas residuales de 87, 400 para el mes de octubre a 1, 360 000 en el mes de abril; cifras que se encuentran por encima del límite máximo permisible, lo que representa un grave riesgo de contaminación para los productos de cultivo y de infección para la población que trabaja la tierra, así como para los habitantes de la región.

2.3 Resistencia a metales pesados de bacterias aisladas de suelos irrigados con aguas residuales

Los suelos normalmente contienen bajas concentraciones de metales pesados; sin embargo, en áreas donde residuos industriales y municipales son aplicados a los suelos como fertilizantes, las concentraciones pueden ser más altas. Niveles excesivos de metales pesados puede ser peligrosos para el hombre, animales y plantas (Díaz, 2004). La sobrevivencia de los microorganismos en suelos contaminados depende de sus propiedades fisiológicas y/o adaptación incluyendo cambios morfológicos en las células, así como las modificaciones ambientales (Wuertz y Mergeay, 1997).

La capacidad de los microorganismos para sobrevivir y reproducirse en un hábitat contaminado por metales pesados depende de su adaptación metabólica o genética. En la naturaleza, ambos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente en mayor o menor medida, lo

que conduce a la adaptación de comunidades microbianas al estrés ambiental (Bahig *et al.*, 2008). Con frecuencia se ha observado la presencia de bacterias, algas y hongos resistentes a metales pesados provenientes de hábitats contaminados y esta resistencia es a menudo asociada con uno o múltiples fármacos, componentes fenólicos y plaguicidas (Abdul y Asma, 2011).

Un estudio llevado a cabo por Ansari y Malik (2007) reveló que las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de bacterias aisladas de suelos agrícolas irrigados con aguas residuales industriales en la India fueron las siguientes: para Hg^{2+} de $32 \mu\text{g mL}^{-1}$, Cd^{2+} de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, Zn^{2+} y Cu^{2+} de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ y Pb^{2+} de $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para el caso de aguas residuales provenientes del Río Almendares, en Cuba, Martínez *et al.* (2010) determinaron la presencia de 23 cepas bacterianas que corresponden a los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Neisseria*, los cuales fueron evaluados para la resistencia microbiana (hasta 78 , 223.2 y $310.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ para Cr^{6+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} respectivamente).

Estos autores indicaron que las cepas correspondientes a los géneros identificados, presentaron en su totalidad resistencia a las concentraciones probadas para Pb^{2+} y Cr^{6+} . Un comportamiento diferente se presentó frente al Cd^{2+} en donde el género *Micrococcus* fue el más resistente y en orden descendente los restantes géneros (*Pseudomonas* > *Staphylococcus* > *Acinetobacter* > *Bacillus* > *Neisseria*).

Malik y Aleem (2011), en la India, aislaron 48 especies de *Pseudomonas spp.* de suelos irrigados con aguas residuales y 91.6% de éstas fueron resistentes contra Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} y Cr^{6+} ; además, observaron una concentración mínima inhibitoria de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para Hg^{2+} y $3, 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para otros metales. Ahemad y Malik (2012) aislaron un total de 34 bacterias de suelos agrícolas irrigados con agua residual contaminada con metales pesados y encontraron *Pseudomonas* (23 especies aisladas), *Bacillus* (5 especies aisladas) y *Staphylococcus* (6 aisladas). Además, las cepas de *Pseudomonas* SN7, SN28, SN30 fueron

seleccionadas debido a que exhibían co-resistencia contra Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} y Cr^{6+} en adición a Zn^{2+} y con valores altos en la concentración mínima inhibitoria para cada metal. Los resultados anteriores, sugieren que la resistencia bacteriana a metales puede ser usada para la bioremediación de metales pesados.

En tanto, se ha reportado que los hongos exhiben considerable tolerancia a metales pesados y se vuelven organismos dominantes en hábitats contaminados. Iram *et al.* (2012) reportaron cepas de hongos aisladas de suelos agrícolas irrigados con aguas residuales industriales en Pakistán, entre estas se encuentran: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. vesicolor*, *Scopulariopsis sp.*, *Curvularia sp.*, *Helminthosporium sp.*, *Humicola grisea sp.*, *Nannizzia sp.*, y *Fusarium*. De las anteriores destacan *A. niger* y *A. flavus*, las cuales mostraron una CMI de 800-1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a Cr^{6+} y Pb^{2+} y *Fusarium* presentó una CMI de 1, 000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos metales.

2.4 Micromorfología de suelos

La micromorfología es una rama de la edafología que se relaciona con la descripción, interpretación y principalmente con la medición de los componentes, rasgos y el arreglo de los constituyentes (fábrica) de los suelos a un nivel microscópico. La micromorfología de suelos ofrece datos exactos *in situ* de la zona de estudio, a través de muestras inalteradas y resulta muy útil para observar y valorar el grado de perturbación o efectos ecológicos sobre un sitio en particular (Bullock *et al.*, 2004).

El lado descriptivo de la micromorfología es indispensable por varias razones: (i) para registrar con detalle las características de los suelos ya sea a nivel de un grano de cuarzo, de un arreglo estructural o de un rasgo debido a un proceso en particular; (ii) para establecer las bases en la reconstrucción de los procesos que han ocurrido o que se están desarrollando en los suelos

(iii) para proporcionar bases sólidas en la clasificación de los suelos ya sea con propósitos generales o específicos; (iv) para comparar las propiedades de diferentes suelos dentro de un orden, un suborden o un gran grupo o aun a niveles inferiores del sistema de clasificación tales como las series de suelos y (v) para apoyar a otros análisis y para escoger de manera selectiva a los análisis mineralógicos, químicos y físicos, que deban realizarse (Bullock *et al.*, 2004).

Por otra parte, uno de los mayores problemas en microbiología del suelo es la examinación de la distribución de microorganismos en suelos naturales y su relación con la fracción mineral y orgánica del suelo. La técnica de preparación de secciones de suelos embebidas en una resina (Figura 2.1), provee la oportunidad del estudio de muestras inalteradas. En ese sentido se utiliza lo que se conoce como microscopia de fluorescencia a través de la tinción con fluorocromos para identificar a las bacterias en secciones delgadas, los cuales pueden parecer más adecuados para las tinciones con iluminación incidente.

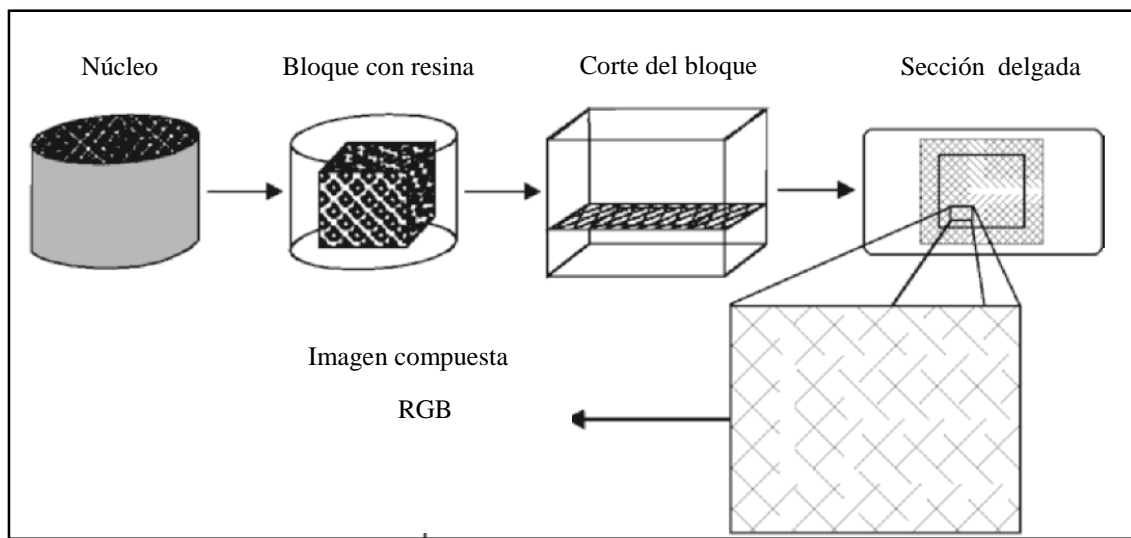


Figura 2. 1. Producción de secciones delgadas y su visualización (Frank y Mills 2007).

2.5 Microscopia de fluorescencia

2.5.1. Principios de microscopia de fluorescencia

Cuando se absorbe un fotón de energía, el electrón de la molécula fluorescente es excitado desde un estado basal de energía a uno alto y vibracional. El electrón energizado luego regresa a su estado de energía basal con una pérdida de energía vibracional hacia el ambiente. Durante el retorno de la molécula hacia su estado basal, un fotón de longitud de onda larga es emitido, esto es referido como fluorescencia (Li *et al.*, 2004).

Dos tipos de fluorescencia son importantes en la Ciencia de la Tierra:

Fluorescencia Primaria o Autofluorescencia. El espécimen exhibe el fenómeno de fluorescencia sin un pre-tratamiento; ejemplos bien conocidos de minerales son fluorita, calcita, yeso, etc. En micromorfología del suelo, la fluorescencia primaria de celulosa es el diagnóstico más utilizado para los residuos de plantas secos.

Fluorescencia secundaria. Ciertos materiales al ser impregnados con colorantes fluorescentes exhiben una fluorescencia secundaria cuando sean irradiados; tales colorantes son llamados fluorocromos (Stoops, 2003).

2.5.2 Tinción de bacterias en secciones delgadas

Para la tinción de elementos específicos en sección delgada se usan los fluorocromos, los cuales son colorantes que pueden ser clasificados en dos grupos de acuerdo con sus características funcionales. El primer grupo tiñe específicamente componentes celulares tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos o la membrana celular. El segundo grupo de fluorocromos no fluoresce por sí mismo, pero puede volverse fluorescente como el resultado de un proceso metabólico celular (Li *et al.*, 2004).

De los fluorocromos más utilizados para tinción de microorganismos en sección delgada se encuentra el naranja de acridina y el calcoflúor; el primero, se considera como un colorante de naturaleza básica (catiónico) y el segundo ácido (aniónico). El naranja de acridina es uno de los colorantes más estudiados y más comúnmente empleado para la tinción de ácidos nucleicos de microorganismos. En tanto, el calcoflúor rodea las estructuras de polisacáridos de las superficies de células microbianas (Li *et al.*, 2004).

Al respecto, Postma y Altemüller (1990) reportan que el color de las bacterias teñidas con naranja de acridina fue débilmente verde a una concentración baja de este colorante (0.05 g L^{-1}) e intensamente rojo a una concentración alta (1 g L^{-1}); mientras que el color del suelo varía de anaranjado a rojo. Otra característica es que el DNA fluoresce de color amarillo-verde y el RNA aparece de color naranja a rojo (Molecular Probes, 2003). Muchos de los efectos de impregnación con naranja de acridina, desaparecen después del montaje en resinas poliéster.

Por otro lado, las células bacterianas también son teñidas de una coloración azul brillante con calcoflúor, mientras que el suelo no absorbe el fluorocromo. La resina poliéster no tiene influencia negativa en la intensidad de impregnación (Postma y Altemüller, 1990). Es posible realizar contratinciones en el suelo utilizando naranja de acridina y calcoflúor y encontraron un alto contraste entre la matriz del suelo y las bacterias (Postma y Altemüller, 1990).

Ahora bien, la autofluorescencia de la resina interfiere en gran medida con la visualización de células bacterianas teñidas en secciones delgadas; sin embargo, la fluorescencia de la resina puede reducirse con la disminución del espesor de la sección delgada (Altemüller y van Vliet-Lanoë, 1990). Tippkötter y Ritz (1996), aseguran que un grosor de entre 15 y 20 μm es generalmente adecuado para estudios biológicos. Asimismo, Li *et al.* (2004) mencionan que el grosor ideal para tinción de microorganismos en sección delgada es de 15 μm . Este espesor

produce una buena imagen no solo para reducir la fluorescencia fuera de foco del espécimen, sino también minimiza la autofluorescencia de la resina.

En cuanto a la duración de la fluorescencia, Chen y Koopman (1997) realizaron un conteo de microorganismos en muestras de agua, con aplicación de naranja de acridina y reportaron que la tinción de cerca de 90% de los microorganismos permanece después de 1 día, almacenando las muestras a 4° C. Asimismo, estos mismos autores aseguran que el uso de muestras preteñidas con cualquier fluorocromo con afinidad a ácidos nucleicos, debe ser limitado a un día. En tanto, para el caso del clacofluór este tiene un periodo de duración de fluorescencia de nueve meses con un almacenamiento a temperatura ambiente (Postma y Altemüller, 1990).

2.6 Distribución espacial de bacterias en el suelo

El suelo es un sistema heterogéneo donde el comportamiento de los microorganismos es afectado por su microambiente inmediato (Li *et al.*, 2004). Debido a que éstos pueden reaccionar sólo se relacionan en su ambiente local, todas las interacciones son intrínsecamente espaciales. Este microambiente afecta la captura de nutrientes, competencia, riesgo de predación y sobrevivencia. Por el contrario, los individuos pueden influenciar sólo las condiciones en su área inmediata adyacente. Para los microorganismos el ambiente local es restringido ya que éstos son muy pequeños, usualmente una bacteria mide $<2\mu$ (Franklin y Mills, 2007).

La distribución de los microhabitats en el suelo probablemente involucra una variedad de tamaños de franjas colonizadas, y se piensa que la localización de las fuentes de nutrientes es uno de los principales factores que determinan la distribución de las bacterias en el suelo (Franklin y Mills, 2007); y por otra parte, los agregados del suelo pueden ser microhábitats básicos, en donde la distribución de microorganismos puede estar cercanamente relacionada con

la estructura y composición de los agregados (Li *et al.*, 2004). En particular, las prácticas de manejo agrícola han mostrado reducir la heterogeneidad en las características del suelo, lo cual puede influenciar la comunidad microbiana y el ciclaje de nutrientes (Franklin y Mills, 2007).

El análisis cuantitativo de la variabilidad espacial de bacterias en el suelo requiere la localización de células bacterianas para ser medidas con precisión a diferentes escalas (Nunan *et al.*, 2001). El problema para determinarla, es que generalmente se cuantifican a partir de muestras alteradas por lo que no se puede conocer la distribución de bacterias en el suelo y la relación que tienen con otros componentes del mismo (Li *et al.*, 2004).

Las secciones delgadas, al elaborarse a partir de muestras de suelos inalterados, pueden utilizarse para estudiar la distribución espacial de las bacterias *in situ*. Esta técnica usa resina para impregnar y endurecer al suelo por lo que es posible observar bajo el microscopio la matriz del suelo, su estructura y su relación con los microorganismos (Li *et al.*, 2004). Asimismo, las técnicas de imágenes en microscopía proveen una manera directa de caracterizar la distribución de los microorganismos. Para lograr este fin, la microscopía de fluorescencia es una de las técnicas comúnmente usadas. Esta técnica ha sido utilizada para caracterizar las poblaciones autóctonas y monitorear la distribución de microorganismos introducidos al suelo (Li *et al.*, 2003).

No obstante, a pesar de la importancia del conocimiento de la variabilidad espacial en la microbiología ambiental, los estudios que específicamente consideran la escala espacial cuando examinan los patrones de distribución microorganismos, son aún escasos. A menudo, cuando los ecólogos microbianos publican documentos describiendo la variación o distribución espacial de bacterias en el ambiente, ellos sólo reportan resultados de estudios monitoreando la distribución individual a microescala (Franklin y Mills, 2007); lo cual requiere altas

magnificaciones de microscopio. El área de visualización de los campos son muy pequeños (típicamente $\sim 0.01 \text{ mm}^2$) (Nunan *et al.*, 2001).

Por lo anterior, es necesaria la adquisición de imágenes de campos contiguos para ser unidos a través de mosaicos, lo que permite la generación precisa de imágenes de calidad y con definición suficiente para ser cuantificadas a diferentes escalas (Nunan *et al.*, 2001); además, de lograr mejor visualización de los procesos que ocurren en el suelo y para el caso de los microorganismos, un mejor entendimiento de su dinámica en éstos.

El tamaño de la microescala depende del nivel en el que los microorganismos interactúan con su microhábitat y los métodos de medición empleados para cuantificarla deberán denotar conocimiento de las escalas de estas interacciones, las cuales tienden a ocurrir en pocos micrómetros (Nunan *et al.*, 2003).

Theng y Orchard (1995) propusieron un diagrama (Figura 2.2) que muestra la interacción de bacterias y hongos con las partículas minerales en los agregados del suelo. Las células bacterianas con una cubierta de polisacáridos extracelulares (EPS) son envueltos por partículas de arcillas. El espacio poroso donde las arcillas y las bacterias interactúan, puede estar relativamente enriquecido en materia orgánica. Las hifas de hongos están adheridas a las superficies externas de los agregados. Partículas de arcillas se adhieren a la superficie de la célula a través de puentes de cationes polivalentes, aunque algunos pueden ser unidos por interacciones electrostáticas.

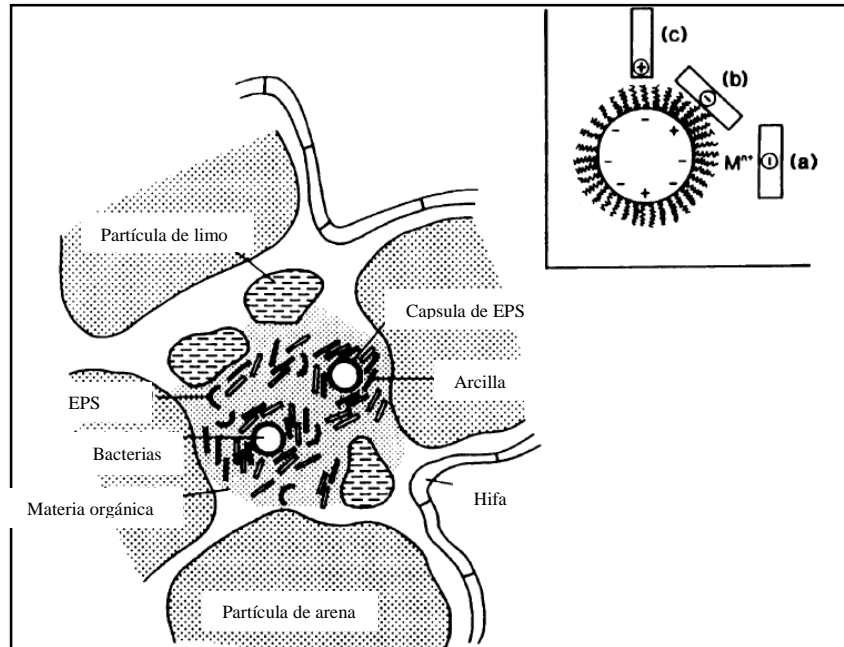


Figura 2.2. Diagrama que ilustra la interacción de bacterias y hongos con partículas minerales en agregados del suelo (Theng y Orchard, 1995). En a) se muestra la unión a través de cationes polivalentes Mn^{+2} . b) y c) representan interacciones electrostáticas. (EPS=exopolisacáridos).

2.7 Fisiología de microorganismos

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal se caracterizan por su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas, a través de mecanismos de tipo directo o indirecto. La estimulación directa puede incluir fijación de nitrógeno, producción de hormonas, reducción de niveles de etileno en el suelo, solubilización de fosfatos y secreción de sideróforos, entre otros (Aguado *et al.*, 2012).

2.7.1 Solubilización de fosfatos. La solubilización de fosfatos es aceptada como la actividad más importante dentro de las múltiples propiedades de los microorganismos del suelo. Esta promueve el crecimiento de la planta y su nutrición (Vassilev *et al.*, 2006).

El fósforo inorgánico puede presentarse en formas solubles e insolubles en la naturaleza; la forma inorgánica más común es ortofosfato (H_3PO_4). Como una especie aniónica, la concentración de fosfato está controlada por su solubilidad bajo la presencia de un catión

alcalino tal como Ca^{2+} o Mg^{2+} o en la presencia de cationes metálicos como Fe^{2+} , Fe^{3+} , o Al^{3+} , a un pH apropiado (Ehrlich y Newman, 2009).

Muchos de los componentes tienen alto peso molecular los cuales deben ser biotransformados a fosfatos solubles iónicos (HPO_4^{2-} H_2PO_4^-), o a fosfatos orgánicos de bajo peso molecular para ser asimilados por la célula; sin embargo, en sitios contaminados, son liberadas grandes cantidades de fosfatos xenobióticos, los cuales son usados como plaguicidas, aditivos de detergentes o antibióticos. Estos componentes de C-P son generalmente resistentes a la hidrólisis química y a la biodegradación (Rodríguez y Fraga, 1999).

La solubilización de fosfatos toma lugar a través de varios procesos microbianos. Esta actividad está determinada por la capacidad de los microorganismos para liberar metabolitos tales como ácidos orgánicos (grupos hidroxilos y carboxilos) e inorgánicos (ácidos sulfhídrico, nítrico y carbónico) que a través de sus grupos radicales quelan el catión que se encuentra ligado al fosfato y transformado a formas solubles. Otro mecanismo involucrado en la solubilización de fosfatos es la extrusión de protones (Rodríguez Fraga, 1999; Khan *et al.*, 2009). La mineralización microbiana de fósforo orgánico está fuertemente influenciada por parámetros ambientales; de hecho, la alcalinidad moderada favorece la mineralización del fósforo orgánico (Rodríguez y Fraga, 1999).

Entre los microorganismos ectorizosféricos, más efectivos reportados en la solubilización de fosfatos, se encuentran: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Enterobacter* y hongos como *Penicillium* y *Aspergillus* (Khan *et al.*, 2009). Asimismo, también se han reportado algunos géneros de bacterias como *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Erwinia* y algunas levaduras que son comunes en la rizósfera (Vassilev *et al.*, 2006).

2.8 Geomicrobiología

La geomicrobiología puede ser definida como el estudio del papel de los microorganismos en los procesos geológicos (Gadd, 2010). Dentro de los tópicos claves de esta disciplina se encuentran el ciclaje biogeoquímico de elementos, formación e intemperización de minerales, y las transformaciones químicas de metales, metaloides y elementos radioactivos (Ehrlich, 1996).

Los microorganismos interactúan con metales y minerales en ambientes naturales y artificiales, alterando sus estados físicos y químicos; en contraparte, los minerales y metales también son capaces de afectar la actividad, crecimiento y sobrevivencia microbiana. Las actividades metabólicas generales de todos los microorganismos afectan la distribución de los metales y su biodisponibilidad, debido a su necesidad metabólica y la existencia de mecanismos bioquímicos para la acumulación celular (Gadd, 2010).

Adicionalmente, algunos procesos microbianos importantes pueden ser influenciados por los minerales, incluyendo la generación de energía, la adquisición de nutrientes, la adhesión celular y la formación de biofilms. Los nutrimentos esenciales pueden ser adquiridos por encima de los niveles ambientales circundantes de las superficies minerales (Gadd, 2010).

Contaminantes ambientales, incluidos los metales, pueden ser sorbidos a las superficies de los metales y estos pueden ser desplazados por la actividad microbiológica. Los microorganismos son capaces de llevar a cabo la precipitación de metales y minerales ya sea por producción de metabolitos, cambio en las condiciones físicas y químicas de su microambiente y por liberación indirecta de sustancias que precipitan los metales (Figura 2.3).

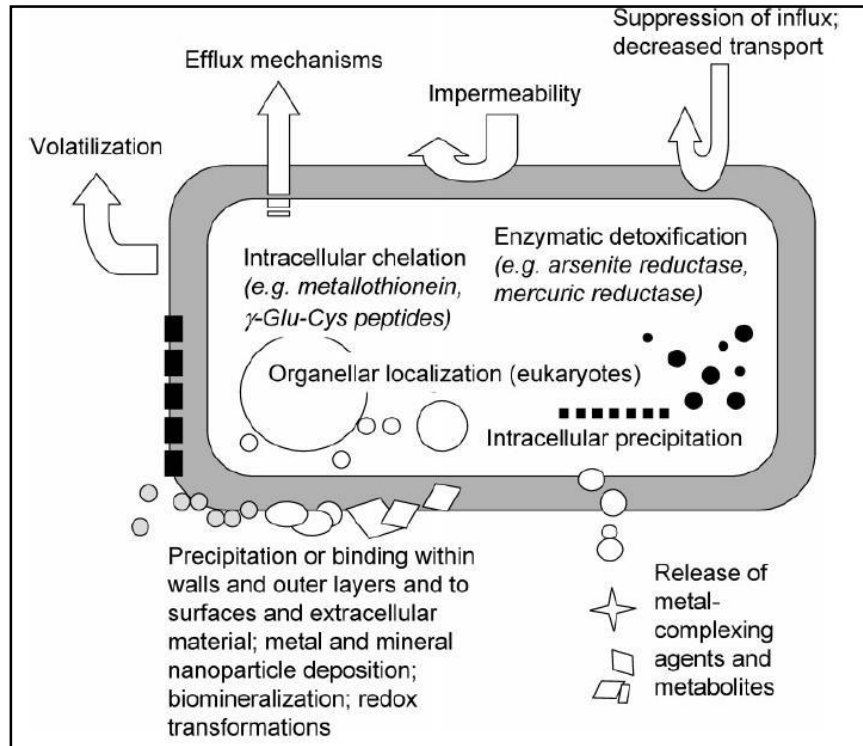


Figura 2.3. Mecanismos involucrados en la detoxificación y transformación de metales, incluyendo los mecanismos que restringen la entrada a la célula (Gadd, 2010).

La interacción metal-mineral-microorganismo son clave importante dentro del marco de la geomicrobiología y los procesos de biomineralización microbiana. El término biomineralización representa los procesos colectivos por los cuales los organismos forman minerales (Gadd, 2010). Tales interacciones son especialmente importantes en la denominada “zona crítica” terrestre, definida como el ambiente en el cual se desarrollan complejas interacciones entre las rocas, suelo, agua, aire y microorganismos vivos que regulan el hábitat natural y determinan la disponibilidad de recursos que sostienen la vida. No obstante, no existen estudios que aborden la relación directa entre los minerales, la actividad microbiana y la concentración de metales pesados en suelos especialmente Antrosoles irrigados con aguas residuales.

Los estudios más cercanos al tema han sido realizados por Dendooven *et al.* (2010) quienes determinaron la dinámica del C y N en suelos del Lago de Texcoco, zona en la cual fueron depositados residuos provenientes de aguas residuales. Esta zona se caracteriza por altas concentraciones de sales, pH elevadamente alcalinos y presencia de minerales tales como sílice amorfa, esmectitas, caolinita y cristobalita. Las características anteriores catalogan al suelo como un microecosistema único. Los resultados más sobresalientes reportados por estos autores son que las condiciones hipersalinas no inhiben completamente la actividad de las bacterias en el ciclo de nitrógeno.

Por otro lado, el papel de minerales alofánicos en la protección de la materia orgánica contra el ataque biológico fue demostrado en estudios donde la mineralización fue medida en suelos alofánicos, sin alofáno y suelos no alofánicos mejorados con alofáno. En cada uno de estos estudios, la mineralización de estos sustratos fue reducida por la presencia del alofáno. La formación de complejos Al-M.O. ha sido postulada como que provee un mecanismo de estabilización de la M.O. contra el ataque biológico (Baldock y Skjemstad, 2000).

Los componentes del silicio en la forma de arcillas (aluminosilicatos), pueden ejercer un efecto en los microorganismos del suelo ya que pueden estimular o inhibir el metabolismo microbiano, dependiendo de las condiciones. Los efectos de las arcillas son mayormente indirectos; es decir, las arcillas tienen a modificar el hábitat microbiano fisicoquímicamente, promoviendo así una respuesta fisiológica por los microorganismos (Baldock y Skjemstad, 2000; Estrada *et al.*, 2004).

Entre los efectos beneficiosos, las arcillas pueden amortiguar el ambiente del suelo y ayudar a mantener un pH favorable que promueva el crecimiento y el metabolismo de algunos microorganismos, que de otra manera puede ser disminuido o detenidos si el pH se vuelve desfavorable. Por el contrario, las arcillas pueden suprimir el crecimiento microbiano y el

metabolismos por absorción de los nutrientes orgánicos, haciéndolos menos disponibles para los microorganismos. Asimismo, las arcillas pueden también absorber antibióticos microbianos, responsables de hacerlos menos activos (Ehrlich y Newman 2009).

En el caso de los óxidos metálicos de rango corto de hierro y aluminio, especialmente sus nanopartículas, son los componentes más reactivos de suelos ácidos y neutros. Estos juegan un papel significativo en la influencia del comportamiento del suelo, por ejemplo: en la catálisis mineral de formación de sustancias húmicas, la influencia de la estabilidad enzimática y actividad microbiana, y junto con las actividades microbianas en transformaciones de metales y minerales (Huang *et al.*, 2005).

2. 9 Referencias

- Abdul, M., Asma, A., 2011. Incidencia de metal y resistencia antibiótica en *Pseudomonas spp.* from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environmental Monitoring and Assessment* 178, 293-308.
- Acosta-Alvarez, M.M. 2007. Determinación de metales pesados en suelos agrícolas del Valle del Mezquital, Hgo. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 91p.
- Aguado-Santacruz, G., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., Preciado-Ortiz, R.E., 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35, 9-21.
- Ahemad, M., Malik, A., 2012. Bioaccumulation of Heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. *Journal Bacteriology* 2, 12-21.
- Alguacil, M.M, Lozano, Z., Campoy, M.J., Roldán A., 2012. Phosphorus fertilization management modifies the biodiversity of AM fungi in a tropical savanna forage system. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1114–1122.
- Al-Nakshabandi, G.A., Saqqar, M.M., Shatanawi, M.R., Fayyad, M., Al-Horani, H., 1997. Some environmental problems associated with the use of treated wastewater for irrigation in Jordan. *Agricultural Water Management* 34, 81-94.
- Altemüller, H.J., Van Vliet-Lanoe, B., 1990. Soil thin section fluorescence microscopy. In Douglas L.A. Ed. *Soil micromorfology: a basic and applied science*. Elsevier, Amsterdam. pp 565- 579.
- Bahig, A.E., Aly, E.A., Khaled, A.A., Amel, K.A., 2008. Isolation, characterization and application of bacterial population from agricultural soil at Sohag Province, Egypt. *Malasyan Journal of Microbiology* 4, 42-50.

- Baldock, J.A., Skjemstad, J.O., 2000. Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack. *Organic Geochemistry* 31, 697-710.
- Bech, J., Tume, P., Longan, L., Reverter, F., Bech, J., Tume, L., Tempio, M., 2008. Concentration of Cd, Cu, Pb, Al, and Fe in soils of Monaresa, NE Spain. *Environmental Monitoring Assessment* 145, 257-266.
- Blumenthal, U.J., Mara, D., Peasey, A., Ruiz-Palacios, G., Stott, R., 2000. Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. *Bulletin of the World Health Organization* 78, 1104-1116.
- Bullock, P., Jongerius, A., Tursina, T., Fedoroff N. y Stoops G. 2004. Manual para la descripción micromorfológica de suelos. Trad. al español por Ma. C. Gutiérrez C. y C.A. Ortiz S. 1a edición. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México, México. pp. 154.
- Castañeda, M.T., Rosales, J.C., Flores, E., Hernández-Pérez, T., 1999. Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de impacto ambiental en aguas residuales-pluviales y en suelos agrícolas irrigados con ellas. *Información Tecnológica* 3, 35-39.
- Chen, J., Koopman, B., 1997. Effect of Fluorochromes on Bacterial Surface Properties and Interaction with Granular Media. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3941-3945.
- Cradwick, P.D.G., Farmer, V.C., Rusell, J.D., Masson, C.R., Wada, K., Yoshinaga, N., 1972. Imogolite, a Hydrated Aluminium Silicate of Tubular Structure. *Nature physical science* 240, 187-189.
- Dendooven, L., Alcántara-Hernández, R., Valenzuela-Encinas, C., Luna-Guido, M., Pérez-Guevara, R.M., 2010. Dynamics of carbon and nitrogen in an extreme alkaline saline soil: A review. *Soil Biology and Biochemistry* 42,865-877.
- Díaz, E., 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology* 7, 173-180.
- Drits, V.A., Sakharov, A.L., Salyn, A.L., Manceau, A., 1993. Structural model for ferrihydrite. *Clay Minerals* 28, 185-207.
- Downs, J.; Cifuentes-García, E., Mel, I., 1999. Risk Screening for Exposure to Groundwater Pollution in a Wastewater Irrigation District of the Mexico City Region. *Environmental Health Perspectives* 107, 553-561.
- Ehrlich, H., 1996. How microbes influence mineral growth and dissolution. *Chemical Geology* 132, 5-9.
- Ehrlich, H., Newman, D., 2009. *Geomicrobiology*. CRC Press, Taylor & Francis Group. 5th ed. U.S.A. 630p.
- Estrada, I.B., Aller, A., Aller, F., Gómez, X., Morán, A., 2004. The survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. *Biosource Technology* 93, 191-198.
- FAO., 1997. Quality control of wastewater for irrigated crop production. FAO Corporate Document Repository. Water reports.
- Franklin, R.B., Mills, A.L., 2007. The importance of microbial distribution in space and spatial scale to microbial ecology. In: *The Spatial Distribution of Microbes in the Environment*. Franklin, R.B. and Mills, A.L. (Eds.). Springer. Netherlands. 333p.
- Gadd, G., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609-643.

- Galán, H. E., Romero, B. A., 2008. Contaminación de suelos por metales pesados. *Macla. Revista de la Sociedad Española de Mineralogía* 10, 48-60.
- Gallegos, E., Warren, A., Robles, E., Campoy, E., Calderon, A., Sainzs, M.G., Bonilla P., Escolero O., 1999. The effects of wastewater irrigation on groundwater quality in Mexico. *Water Science Technology* 40, 45-52.
- García-Orenes, F., Roldán, A., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Navarro-Pedreño, J., Gómez, I., Mataix-Beneyto, J., 2007. Effect of irrigation on the survival of coliforms in three semiarid soils after amendment with sewage sludge. *Waste Management* 27, 1815-1819.
- Gerba, C.P., Wallis, C., Melnick, J.L., 1975. Fate of wastewater bacteria and viruses in soil. *Journal Irrigation Drainage Division* 101, 157-174.
- Giller, K., Witter, E., McGrath, S., 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 2031-2037.
- Gutiérrez-Castorena, Ma. C., Ortiz-Solorio, C.A., 1992. Caracterización del tepetate blanco en Texcoco, México: *Terra* 10, 202-209.
- Harsh, J.; Chorover, J.; Nizeyimana, E., 2002. Allophane and Imogolite. In Dixon, J.B., Weed, S.B. (Eds.), *Minerals in soil environments*, Soil Science Society of America, Book Series: No. 1. Madison, WI, USA. pp. 379-438.
- Huang, P.M.; Wang, M.K., Chiu, C.Y., 2005. Soil mineral-organic matter-microbe interactions: Impacts on biogeochemical processes and biodiversity in soils. *Pedobiologia* 49, 609-635.
- Iram, S.; Parveen, K.; Usman, J.; Nasir, K.; Akhtar, N.; Arouj, S., Ahmad, I., 2012. Heavy metal tolerance of filamentous fungal strains isolated from soil irrigated with industrial wastewater. *Biologija* 58, 107-116.
- Jiménez B.C., Mazari H.M., Domínguez M. R., Cifuentes, E. G., 2005. El agua en el Valle de México. In: Jiménez B.L. Marin (Eds). *El agua en México vista desde la Academia*. Academia Mexicana de Ciencias. Edición digital 15-32.
- Jumpponen, A., Mulder, C.P.H., Huss-Danell, K., Högberg, P., 2005. Winners and losers in herbaceous plant communities insights from foliar carbon isotope composition in monocultures and mixtures. *Journal of Ecology* 93, 1136-1147.
- Kamal, S., Prasad, R., Varma, A., 2010. Soil Microbial Diversity in Relation to Heavy Metals. In Sherameti, I., Varma, A., (Eds). *Soil Heavy Metals*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 31-64.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y.M., Huang, Y.Z., Zhu, Y.G., 2008. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental Pollution* 152, 686-692.
- Khan, A., Jilani, G., Akhtar, M., Naqvi, S., Rasheed, M., 2009. Phosphorous solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanism and their role in Crop Production. *Journal Agricultural Biological Science*. 1, 48-58.
- Klein, C., Hurlbut, Jr. C.S. 1993. *Manual of mineralogy* (after James D. Dana). 21st ed. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Li, Y., Dick, W.A., Tuovinen, O.H., 2003. Evaluation of fluorochromes for imaging bacteria in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 737-744.
- Li, Y., Dick, W.A., Touvinen, O.H., 2004. Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganism-a review. *Biological Fertility Soils* 39, 301-311.

- Malkawi, H., Mohammad, M., 2003. Survival and accumulation of microorganisms in soils irrigated with secondary treated wastewater. *Journal Basic Microbiological* 43, 47-55
- Martin, J., Focht, D., 1977. Biological Properties of Soils. Eds. Elliott, L.F., Stevenson, F.J., Frink, C.R., Hill, R.R., Hortenstine, C.C., Kilmer, V.J., Monke, E.J., Viets Jr., F.G., In *Soils for Management of Organic Wastes and Waste Waters*. Soil Science Society of America. Madison. Wisconsin, USA. pp. 113-169.
- Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M.E., Salgado, I., Olivares, S., Lima, L., Rodríguez, D., 2010. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almedares. *CENIC. Ciencias biológicas* 41, 1-10.
- Mapanda, F., Mangwayana, E.M., Nyamangara, J., Giller, K.E., 2005. The effect of long term irrigation using wastewater on heavy metal contents of soils under vegetables in Harare, Zimbabwe. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 107, 151-165.
- Molecular Probes., 2003. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Web edition <http://www.probes.com/handbook>. Molecular Probes. Eugene, Oreg.
- Nayek, S., Gupta, S., Saha, R.N., 2010. Metal accumulation and its effects in relation to biochemical response of vegetables irrigated with metal contaminated water and wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 178, 588-595.
- Nunan, N., Ritz, K., Crabb, D., Harris, K., Wu, K., Crawford, J.W., Young, I., 2001. Quantification of the in situ distribución of soil bacteria by large-scale imaging of thin sections of undisturbed soil. *Fems Microbiology Ecology* 36, 67-77.
- Nunan, N., Wu, K., Young, I., Crawford, J., Ritz, K., 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 203-215.
- Ortega-Larrocea, M.P., Siebe, C., Estrada, A., Webster, R., 2007. Mycorrhizal inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi in soils irrigated with wastewater for various lengths of time, as affected by heavy metals and available P. *Applied Soil Ecology* 37, 129-138.
- Ortiz-Solorio, C.A., 2010. Edafología. Universidad Autónoma Chapingo. 8ª edición. 334p.
- Paradelo, R., Moldes, A.B., Rodríguez, M., Barral, M.T., 2009. Magnetic susceptibility as an indicator of heavy metal contamination in compost. *Waste Management and Research* 27, 46-51.
- Postma, J., Altemüller, H.J., 1990. Bacteria in thin soil sections stained with the fluorescent brightener calcofluor White M2R. *Soil Biology and Biochemistry*. 22, 89-96.
- Prieto-Méndez, J., González-Ramírez, C.A., Román-Gutiérrez, A.D., Prieto-García, F., 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y aguas. *Tropical and Subtropical Agroecosystem* 10, 29-44
- Reséndiz-Paz, M.L. 2012. Impacto de las prácticas antrópicas en los suelos del distrito de riego “Los Insurgentes” México. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Rivera-Vargas, G. 2013. Relación de los materiales amorfos silíceos amorfos y metales pesados con la estabilidad de agregados en suelos irrigados con aguas residuales. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Tesis de maestría.
- Rodríguez H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17, 319-339.

- Roesner, L., Qian, Y., Criswell, M., Stromberger, M., Klein, S., 2010. Long-Term Effects of Landscape Irrigation using household graywater. Literature and Synthesis. The Water Environment Research Foundation. Virginia, USA. 872p.
- Scheierling, S., Bartone, C., Mara, D., Drechsel, P., 2010. Improving Wastewater Use in Agriculture. An Emerging Priority. Policy Research Working Paper 5412. 197p.
- Schulze, D., 2002. An introduction to soil mineralogy. In Dixon, J.B., Weed, S.B. (Eds.), Minerals in soil environments, Soil Science Society of America, Book Series: No. 1. Madison, WI, USA. pp. 1-35.
- Schwertmann, U., Taylor, R.M., 1989. Iron oxides. In Dixon, J.B., Weed, S.B., (Eds.), Minerals in soil environments, Soil Science Society of America, Book Series: No. 1. Madison, WI, USA. pp. 379-438.
- Segura, C. M. A., M. C., Gutiérrez C., C. A., Ortiz S., D. J., Gómez D., 2000. Suelos arcillosos de la zona oriente del Estado de México. Terra 18, 35-44.
- Shoji, S., Dahlgren, R., Nanzyo, M., 1993. Classification of volcanic soil. In: Volcanic ash soils-genesis, properties and utilization. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, The Netherlands. 287p.
- Siebe, C., 1994. Acumulación y disponibilidad de metales pesados en suelos regados con aguas residuales en el distrito de riego 03, Tula, Hidalgo, México. Revista Contaminación Ambiental 10, 15-21.
- Stoops, G., 2003. Interpretation of Micromorphological Features of Soils and Regoliths. Soil Society of America, Inc. USA. 184p.
- Takahashi, T., Shoji, S., 2003. Distribution of classification of volcanic ash soils. Global Environment Research 6, 83-97.
- Theng, B.K.G., Orchanrd, V.A., 1995. Interactions of clays with microorganisms and bacterial survival in soil: a physicochemical perspective. In Huang, P.M., Berthelin, J.; Bollag, J.M.; McGill, W.B. and Page, A.L. (Eds). Environmental Impact of Soil Component Interactions. Vol. 2. Metals, Other Inorganics, and Microbial Activities. CRC Press/Lewis, Boca Raton, USA, pp. 123-143.
- Tippkötter, R., Ritz, K., 1996. Evaluation of polyester, epoxy and acrylic resins for suitability in preparation of soil thin sections for in situ biological studies. Geoderma 69, 31-57.
- Twyman, R.M., 2005. Sample dissolution for elemental analysis: Wet digestion. In Worsfold P.; Townshend, A. and Poole, C. (Eds). Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition), Volume 8. Elsevier Science, London, UK. pp 146-153.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Nikolaeva, I., 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. Applications in Environmental Microbiology 71, 137-144.
- Veliz-Lorenzo, E., Llanes-Ocaña, J.G., Asela-Fernández, L., Bataller-Venta, M., 2009. Reúso de aguas residuales domésticas para riego agrícola. Valoración crítica. Revista CENIC Ciencias Biológicas 40, 35-44.
- Wada, K., 1989. Allophane and imogolite. In Dixon, J.B., Weed, S.B. (Eds.), Minerals in soil environments, Soil Science Society of America, Book Series: No. 1. Madison, WI, USA. pp. 1051-1088.
- Waithira, M., 2010. Effect of sewage wastewater irrigation in soil biodiversity and heavy metals accumulation in soils and selected crops.
- WHO., 1989. Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. World Health Organization. Technical Report Series 778p.

- WHO., 2006. WHO guidelines for the use of wastewater, excreta and greywater. Vol. II Wastewater use in agriculture. 196 p.
- Wuertz, S., Mergeay, M. 1997. The impact of heavy metals on soil microbial communities and their activities. In: Van Elsas J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H., (eds). *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp. 607-639.
- Xu, D., Zhang, C., Qu, S., Ma, X., GAO M., 2012. Characterization of microorganism in the soils with sewage irrigations. *African Journal of Microbiology Research* 6, 7168-7175.
- Zamora, F., Rodríguez, N., Torres, D., Yendis H., 2008. Efecto del riego con aguas residuales sobre propiedades químicas de suelos de la planicie de Coro, Estado Falcón. *Bioagro* 20, 193-199.
- Zhao, J., Huggins, F.E., Feng, Z., Huffman, G., 1994. Ferrihydrite: Surface structure and its effects on phase transformation. *Clays and Clay Minerals* 6, 737-746.

CAPITULO 3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivo general

Analizar las relaciones minerales-microorganismos-metales pesados-propiedades edáficas en Antrosoles de origen volcánico en cultivos de maíz, pasto y alfalfa en dos tipos de tierras y determinar la distribución espacial *in situ* de colonias bacterianas en condiciones contrastantes en suelo rizósferico del distrito de riego los Insurgentes, Teoloyucan, Estado de México.

3.1.1 Objetivos específicos

- a. Relacionar la concentración de metales pesados totales con diferentes propiedades edáficas de cultivos de maíz, pasto y alfalfa en tierras lamas y negras.
- b. Cuantificar poblaciones de bacterias aeróbicas y hongos, así como microorganismos solubilizadores de fosfatos de suelo rizósferico de maíz, pasto y alfalfa de tierras lamas y negras.
- c. Evaluar el efecto de la presencia de metales pesados sobre la resistencia de microorganismos aislados de suelo rizósferico de maíz, pasto y alfalfa en tierras lamas y negras.
- d. Determinar la distribución y sitios preferenciales para las comunidades bacterianas en dos sitios contrastantes.

3.2 Hipótesis

- a) Debido a la alta reactividad de los suelos, la disponibilidad de metales pesados es baja, lo que no restringe el desarrollo de microorganismos.
- b) Los microorganismos son más abundantes en tierras negras que en lamas debido a su tamaño de partícula retención de humedad y contenido de materia orgánica.

c) Los microorganismos de suelos irrigados con aguas negras no presentan alta resistencia a metales pesados debido la baja concentración de éstos.

d) Los microorganismos se agrupan en minerales con materia orgánica, primero como un microhábitat y segundo como un medio de nutrición más que relacionarse con la raíz.

CAPITULO 4

INTERACCIÓN MICROORGANISMOS-METALES PESADOS EN LA RIZOSFERA DE CULTIVOS EN ANTROSOLES IRRIGADOS CON AGUAS RESIDUALES

4.1 Resumen

La interacción entre los microorganismos y metales pesados (MP) en la rizósfera de cultivos irrigados con aguas residuales fue analizada en Antrosoles con alta actividad biológica. El estudio se realizó en el distrito de riego Los Insurgentes en Teoloyucan, Estado de México. Muestras de suelo de la zona rizosférica de maíz (*Zea mays*), pasto forrajero (*Lolium multiflorum*) y alfalfa (*Medicago sativa*) fueron colectadas en dos clases de tierra: negra (textura arcillosa, pobre drenaje) y lama (textura franco y buen drenaje), ambas con diferente pH y altos contenidos de materia orgánica (MO) y fosfatos solubles. Análisis físicos, químicos, biológicos y la concentración de MP totales fue determinada. El Cd es el único metal pesado que supera los límites permisibles; sin embargo, hay asociaciones entre MP, clase de tierra, tipo de cultivo o propiedad edáfica. Las interacciones son: Cd-(alfalfa, tierras lama- pH ligeramente ácido); Cu-(tierras negras-pH alcalino), Zn- (pasto, tierras lamas -pH ácido y MO) y Pb- (tipo de cultivos-clases de tierra). Con el análisis estadístico entre las propiedades edáficas y tamaño de las poblaciones de microorganismos se encontró que en bacterias el pH y humedad explican su comportamiento heterogéneo y en hongos es sólo la humedad. Asimismo, destaca la presencia de microorganismos solubilizadores de fosfatos sobre todo en alfalfa-tierra negra y maíz-tierra lama (1×10^4 UFC g^{-1} suelo seco), en suelos extremadamente ricos en P disponible a pesar de la alta reactividad de los suelos. La resistencia de las bacterias a MP, por tipo de cultivo fue: alfalfa >maíz> pasto, pero fue baja comparada con otros estudios, debido a que no existe presión selectiva por contaminación.

Palabras clave: *propiedades edáficas, tamaño de poblaciones aeróbicas, microorganismos solubilizadores de fosfatos, resistencia a metales pesados.*

Tania González-Vargas, Ma. del Carmen Gutiérrez-Castorena, Julián Delgadillo-Martínez, Efraín R. Ángeles-Cervantes, Patricio Sánchez-Guzmán. Interacción microorganismos-metales pesados en la rizósfera de cultivos en Antrosoles irrigados con aguas residuales. XX Congreso Latinoamericano y XVI Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, que se llevó a cabo del 9 al 15 de Noviembre de 2014, en la Ciudad del Cusco, Perú.

4.2 Introducción

El uso de aguas residuales, en suelos agrícolas, es una práctica común a nivel internacional (Hamilton *et al.*, 2007; Acosta-Álvarez, 2007) y cuestionada por el aporte de metales pesados (MP) y/o microorganismos patógenos. Algunos autores reportan que las aguas residuales no contaminan (Mapanda *et al.*, 2005; Ansari y Malik, 2007); mientras que otros indican que pueden tener concentraciones de MP que superan los límites permisibles (Nayek, 2010).

La zona metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) genera un promedio anual de $237 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de aguas residuales, parte de las cuales, son utilizadas para la agricultura desde 1890 (CONAGUA; 2011), sobre todo en el Valle del Mezquital (Chávez *et al.*, 2011). En ese Valle se localiza el mayor distrito de riego con aguas residuales a nivel mundial con 90 mil ha (Hamilton *et al.*, 2007), y ha sido sujeto a numerosas investigaciones en cuanto a la contaminación de sus suelos por MP; sin embargo, los resultados son contrastantes.

Siebe (1994) y Acosta-Álvarez (2007) mencionan que no hay contaminación de metales pesados; no obstante, Cajuste *et al.* (1991) reportaron en algunos suelos presencia de Pb y Cr en concentraciones que pueden ser un riesgo para la salud. Ramírez *et al.* (2002) analizando el Hg, Cu y Cr total y Pb, Cd y Cu disponibles encontraron incrementos en su concentración sin superar todavía los límites permisibles. Muchos de estos MP están asociados con la fracción orgánica del suelo, sobre todo el Pb (71 %) (Flores *et al.*, 1997), o bien, pueden traslocarse al

cultivo de alfalfa, como el Zn, o almacenarse en los granos de trigo, como el Cd y Ni (Vázquez-Alarcón *et al.*, 2001).

En la región, hay otros distritos de riego que han merecido menos atención a pesar de encontrarse a menos de 20 km de la Ciudad de México. El distrito Los Insurgentes, en Teoloyucan, Estado de México, es uno de ellos. Tiene una superficie de 30, 000 ha y mayor actividad antrópica y biológica por lo que los suelos se clasifican como Terric Hydragric Anthrosols incluso Hortic (Reséndiz *et al.*, 2013). Estos suelos contrastan con los Feozems y Vertisoles del Valle de Mezquital (Siebe, 1994), por lo que la relación entre MP-propiedades edáficas debe de ser diferente, no sólo por su origen al ser materiales de origen volcánico sino por la intensidad de manejo.

En este distrito, los productores reconocen dos clases de tierras: negras y lamas, en donde cultivan maíz, pasto forrajero y alfalfa. Rivera-Vargas (2013) reportó que en tierras negras, con cultivo de alfalfa, se presentan la mayor concentración de Zn disponible; no obstante, la interacción de los MP en la rizósfera de las diferentes clases de tierra y tipos de cultivos se conoce poco a pesar de la importancia del distrito de riego en la producción de forraje.

Otro de los problemas que se genera con el uso de las aguas residuales en los suelos agrícolas es la contaminación biológica (Al-Nakshabandi *et al.*, 1997), en especial con microorganismos patógenos (Duran y Jiménez, 2014). Incluso algunas bacterias están bien adaptadas a sitios contaminados con aguas residuales (Bahig *et al.*, 2008). Sin embargo, en estos distritos de riego no se ha determinado la abundancia de microorganismos, sus funciones y mucho menos sus interacciones con MP. En otros países, por ejemplo en Aridisoles irrigados con aguas residuales, se ha encontrado una tendencia al aumento de las poblaciones microbianas (Ahemad y Malik, 2011). En Antrosoles, de Teoloyucan se espera una mayor cantidad de microorganismos y una interacción más compleja con los MP debido a las condiciones edáficas

particulares que pueden favorecer su crecimiento (altos contenidos de MO, humedad y nutrimentos). Además, es necesario analizar el papel de los microorganismos en la solubilización de fosfatos, ya que hay un alto contenido de P disponible a pesar de la alta reactividad de los suelos (Rivera- Vargas, 2013).

Los microorganismos afectan la distribución de los MP y su biodisponibilidad por sus necesidades metabólicas (Gadd, 2010) y generan mecanismos específicos de resistencia a metales pesados (Lima e Silva *et al.*, 2012), por la presión selectiva (Nonnoi *et al.*, 2012). En consecuencia, la sobrevivencia de los microorganismos depende las propiedades bioquímicas intrínsecas y estructurales de éstos, incluyendo cambios morfológicos de las células (Bahig *et al.*, 2008). Giller *et al.* (2009) menciona que la mayoría de estos estudios obvian métodos estandarizados o fallan al omitir datos de importantes propiedades del suelo y concluyen que sin esta información es imposible identificar factores clave que presenten alta relación con las poblaciones microbianas.

La fuerte influencia antrópica y biológica desde hace 40 años en los suelos de Teoloyucan (Reséndiz *et al.*, 2013), la irrigación con aguas residuales y la presencia de minerales amorfos (Gutiérrez *et al.*, 2005) que son altamente reactivos (Wada, 1989), hacen que estos suelos sean únicos a nivel internacional y un interesante modelo para comprender la interacción de los microorganismos con MP en la rizósfera de diferentes tipos de cultivos.

Por lo anterior, las hipótesis planteadas son las siguientes: i) los microorganismos no presentan restricciones en su crecimiento, debido a la baja concentración de metales pesados; ii) los microorganismos son más abundantes en tierras negras que en lamas debido a su tamaño de partícula fino, retención de humedad y contenido de materia orgánica y iii) las bacterias no presentan alta resistencia debido a que no existen concentraciones altas de metales pesados.

Los objetivos de este trabajo fueron 1) determinar la concentración de metales pesados, y 2) relacionar el tamaño de la población de bacterias aeróbicas y hongos con algunas propiedades edáficas, 3) evaluar la resistencia de las bacterias a metales pesados, y 4) relacionar la concentración de fósforo disponible con la presencia de bacterias solubilizadoras de fosfatos en dos clases de tierras y en tres tipos de cultivos (maíz, pasto forrajero y alfalfa) en el distrito de riego Los Insurgentes, Teoloyucan, Estado de México.

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1. Zona de estudio

El presente estudio fue llevado a cabo en un valle agrícola de 450 ha localizado dentro del distrito de riego Los Insurgentes, el cual se encuentra en la periferia de la Laguna de Zumpango, Municipio de Teoloyucan, Estado de México (Figura 4.1).

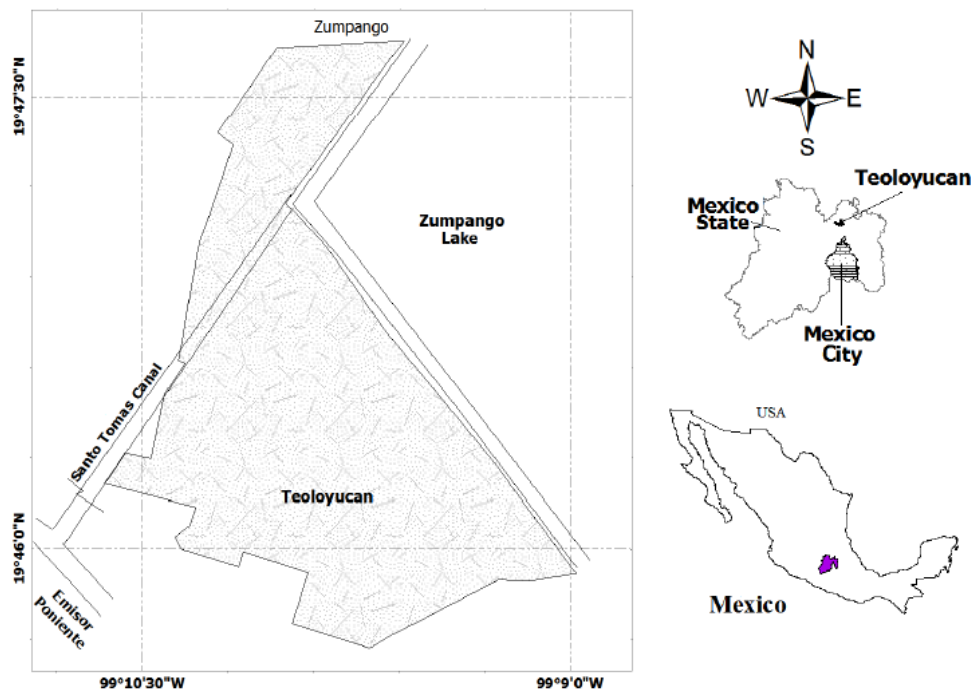


Figura 4.1 Localización de la zona de estudio (Tomado de Reséndiz-Paz *et al.* (2013).

El clima predominante en esta zona es C(Wo)(w) que corresponde a clima templado con menos de 5% de incidencia de lluvias durante el invierno; cuenta con una temperatura promedio de 15°C con temperaturas mínimas en el periodo de invierno de 5°C y niveles máximos de 30°C en el verano.

La precipitación media anual oscila entre 600 y 700 mm, la cual se distribuye principalmente en el período mayo-octubre. El territorio del Municipio de Teoloyucan pertenece orográficamente a la Provincia del Eje Neovolcánico y está localizado en la subprovincia Lagos y Volcanes Anáhuac.

Los suelos originales de la zona de estudio eran Vertisoles y Feozems (Plan Municipal de Desarrollo Urbano de Teoloyucan, 2004); sin embargo, en los 70s fueron sepultados con diferentes sedimentos dragados de los canales de riego y la laguna de Zumpango. Por el grosor de los sedimentos y la irrigación con aguas residuales, los suelos se clasifican actualmente como Terric Hydragric Anthrosols, incluso algunos se designan como Horticos por su alta actividad biológica (Reséndiz *et al.*, 2013). Además, los productores dividen a estos suelos en dos clases de tierras de acuerdo con su color y origen: negras formadas a partir de sedimentos lacustres y lamas, desarrolladas a partir de sedimentos aluviales.

4.3.2. Muestreo de suelos

Del mapa de clases de tierras generado por Reséndiz *et al.* (2013) se seleccionaron dos áreas representativas y tres tipos de cultivos. En las áreas cultivadas de cada clase de tierra se colectaron nueve muestras en la zona rizosférica: tres en maíz, tres en pasto y tres en alfalfa, de 0-20 cm de profundidad y se realizaron muestras compuestas por cultivo. Al final se obtuvieron tres muestras por tipo de tierra que representan a cada uno de los cultivos.

4.3.3. Análisis de laboratorio

Los siguientes parámetros físicos y químicos del suelo se determinaron de acuerdo con Van Reeuwijk (2002): textura (método de la pipeta), retención de humedad, pH (relación suelo: agua 1:2.5), materia orgánica (método de Walkley-Black), fósforo extractable con NaHCO_3 y con ácido cítrico y capacidad de intercambio catiónico (extracción con NH_4OAc 1M).

Los MP totales se obtuvieron mediante digestión ácida con HNO_3 y HClO_4 (4:1) (McLean y Bledsoe 1992; Twyman, 2005) y las lecturas de Cd, Cu, Ni, Pb y Zn se realizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica.

El tamaño de la población de bacterias aeróbicas y hongos, así como de microorganismos solubilizadores de fosfatos se determinaron mediante el método de cuenta viable en placa y su valor se reportó en UFC por gramo de suelo seco. La resistencia a MP de bacterias aisladas de la rizósfera de maíz, pasto forrajero y alfalfa se obtuvo mediante el método de siembra en placa (Malik y Jaiswal 2000; Aleem *et al.*, 2003) utilizando concentraciones crecientes de CdSO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, NaAsO_2 , $\text{Ni}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, y ZnSO_4 . Los datos se expresaron como porcentaje de microorganismos tolerantes a cada concentración del metal.

4.3.4 Análisis estadístico

Los datos de propiedades edáficas (físicas, químicas) y concentración de MP totales se sometieron a análisis de correlación y regresión lineal para determinar cuáles de estas propiedades determinaban el tamaño de las poblaciones microbianas. A los datos de concentración de MP totales y el tamaño de las poblaciones microbianas con respecto a cada clase y tipo de cultivo se les aplicó una prueba t de Student para observar diferencias significativas con una $p < 0.05$.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Propiedades edáficas de la zona rizosférica

Las tierras negras tienen contenidos altos de MO (2.68-4.4%) y de fósforo disponible ($221.1 \pm 185.7 \text{ mg kg}^{-1}$). Además, presentan un elevado contenido de humedad (hasta 38.6%), textura arcillosa y alta CIC (hasta $41.82 \pm 15.31 \text{ cmol kg}^{-1}$); el drenaje es pobre que generan condiciones reductoras. Por su parte, las tierras lamas tienen una textura franco arcillosa hasta franco limosa, contenidos altos de MO (2.47-3.32% con un valor extremo en el pastizal 11.65%) y de fosfatos ($276 \pm 110 \text{ mg kg}^{-1}$). La capacidad de retención de humedad es mayor (hasta 47.5%), pero la CIC disminuye (hasta de $23.14 \pm 3.95 \text{ cmol kg}^{-1}$); bien drenado. Las propiedades edáficas de los suelos estudiados se reportan a detalle en el Cuadro 4. 1.

4.4.2 Metales pesados totales

Las concentraciones de MP determinadas fueron: Cd (0.8-4.43 mg kg^{-1}), Cu (14.63-56.65 mg kg^{-1}), Ni (21.9-24.26 mg kg^{-1}), Pb (18.97-26.03 mg kg^{-1}) y Zn (46.47-73.96 mg kg^{-1}) (Figura 4.2). De acuerdo con Denneman y Robberse (1990) y el Estándar de Países Bajos (1994) estos valores en la zona rizosférica no representan un problema de contaminación para los cultivos. Sin embargo, cuando se utilizan criterios más estrictos como los propuestos por SEPA (1995) para la producción agrícola y salud humana y por Lindsay (1979), entonces se puede indicar que los suelos están contaminados por Cd, pues se encuentra en concentraciones mayores a 0.6 mg kg^{-1} . Con el análisis estadístico de los MP, tipos de cultivos y clases de tierras se encontró que hay diferencias entre ellos ($p < 0.05$) como se reporta en la Figura 4.2.

La mayor concentración de Cd ocurre en alfalfa cultivada en TLs, las cuales tienen un pH de 6.13, condiciones donde se presenta la mayor adsorción con la fase sólida del suelo (Christensen, 1984). En cambio el Cu, aunque se ha indicado que tienen alta afinidad con la MO

(Kabata-Pendias, 2001), no tiene ninguna relación con ésta pero si con el pH. Este metal presentó las concentraciones más altas a pH alcalinos, en TN, al ser fácilmente sorbido con los componentes del suelo (Alloway, 2010).

Los valores del Pb presentan algunas diferencias significativas entre cultivo y clase de tierra. Este elemento tiene alta adsorción selectiva con la fracción inorgánica del suelo sobre todo con los materiales amorfos (Harsch *et al.*, 2002), los cuales dominan en los suelos estudiados (Rivera-Vargas, 2013). También se ha reportado que se asocia con los fosfatos o con la MO formando complejos orgánicos-Pb los cuales son muy estables (Alloway, 2010). Rivera-Vargas *et al.* (2014) considera que se está precipitando o quimio adsorbiendo por los diferentes componentes del suelo.

El Zn se relacionó con el pH y el contenido de MO, es por eso que la concentración más alta se encontró en pasto en TL con un pH más ácido (5.73) y contenido de MO más alto (11.69%). Dos mecanismos de adsorción del Zn se han reportado: uno en medio ácido relacionado con los sitios de intercambio catiónico (Kabata-Pendias, 2001) y el otro en condiciones alcalinas debido a la capacidad adsortiva (Alloway, 2008). En cuanto al tipo de cultivo, Yan *et al.* (2012) reportaron que el pasto tiene alta capacidad de captación del Zn; no obstante, el mecanismo por el cual realizan este proceso, es aún incierto. Finalmente, el Ni no presenta relación con las variables edáficas evaluadas y sus concentraciones también son bajas.

4.4.3 Tamaño de la población de bacterias aeróbicas y hongos

Los valores obtenidos para tierras lamas y negras en los diferentes tipos de cultivo se reportan en la Figura 4.3a y 4.3b. En estas se puede apreciar que las propiedades edáficas y el tipo de cultivo pueden favorecer o limitar el desarrollo de las bacterias y hongos. En tierras lamas, las propiedades edáficas provocan poblaciones de bacterias totales mayores que en tierras negras,

especialmente en el pasto donde la población de bacterias fue la mayor (3.3×10^6 UFC g^{-1} suelo seco). En los otros cultivos se observó la misma tendencia y fueron significativamente diferentes $p < 0.05$ (Figura 4.3a).

En el caso de las colonias de hongos, en las mismas condiciones edáficas, es el tipo de cultivo que determina su abundancia. Los valores más altos se encontraron en alfalfa de tierras negras y en pasto de tierras lamas (11.6×10^3 y 6.9×10^3 UFC g^{-1} suelo seco respectivamente). En estos dos cultivos la población de hongos fue estadísticamente mayor al resto ($p < 0.05$) y se encontraron poblaciones de hongos especialmente bajas en maíz (Figura 4.3b).

Con el análisis de correlación y regresión lineal entre las propiedades edáficas de las diferentes clases de tierra y tamaño de las poblaciones de microorganismos se encontró que el pH y la humedad explican el comportamiento heterogéneo en la población de bacterias; mientras que la humedad es el factor más determinante en los hongos. Si bien, la aplicación de residuos orgánicos eleva la actividad de microorganismos por el incremento de la MO (Roesner *et al.*, 2010), también la capacidad de retención de humedad y el pH representan un papel importante en la sobrevivencia y desarrollo de los mismos (Lauber *et al.*, 2009). El pH, como factor abiótico, influye en disponibilidad del carbono, nutrimentos y solubilidad de metales. Además, puede controlar factores bióticos, tales como la composición de bacterias y hongos y su viabilidad (Rousk *et al.*, 2009).

En un estudio realizado en suelos volcánicos, el crecimiento de las bacterias es favorecido a pH alcalinos (Arao, 1999); y los hongos a pH ácidos (Rousk *et al.*, 2009). Algunos de los resultados de este trabajo son contrarios a los reportados por otros autores: el máximo tamaño de población de bacterias ocurre en pHs ácidos (5.73), en pasto y los hongos en pH alcalinos (8.2), en alfalfa ambos en TL.

Las condiciones de humedad forman rasgos redoximórficos dado que los suelos son irrigados hasta inundación y presentan un drenaje restringido, sobre todo las tierras negras (Reséndiz-Paz, 2012). Estas condiciones favorecen la anaerobiosis (Reddy *et al.*, 1986), con pocos milímetros de suelo aeróbico (Tiedje *et al.*, 1984), por lo que las poblaciones microbianas aeróbicas están restringidas a la superficie e inclusive inactivarse o morir y las bacterias anaerobias facultativas presentan un papel preponderante (Inglett *et al.* 2005). De manera adicional, Jamieson *et al.* (2002) reportaron que la sobrevivencia de microorganismos patógenos es más alta en suelos orgánicos en condiciones de inundación lo cual supone un factor de riesgo para su multiplicación y dispersión.

Por otra parte, la concentración de Cd total se relacionó negativamente con el tamaño de la población de bacterias totales en cualquier tipo de suelo ($R^2 > 0.97$), y con el Cu sólo en TN ($R^2 = 0.94$); mientras que las poblaciones de hongos solo en tierras negras ($R^2 = 0.94$).

De manera general, se encontró una mayor asociación del tamaño de las poblaciones microbianas del suelo con las propiedades edáficas que con la concentración de MP totales. Giller *et al.* (2009) señalan que explicar la toxicidad a los microorganismos por efecto de los MP, obvian métodos estandarizados o fallan al omitir datos de importantes propiedades del suelo. Esto hace imposible identificar factores clave que presenten alta relación con las poblaciones microbianas.

4.4.4 Microorganismos solubilizadores de fosfatos

En todos los cultivos de TN se presentaron microorganismos solubilizadores de fosfatos; sin embargo, la mayor población ocurre en la rizósfera de alfalfa (1×10^4 UFC g^{-1} suelo seco), incluso fue 64% más alta con respecto al pasto y 100 % con el maíz. En el caso de las TL sólo en el maíz se encontraron microorganismos con esta actividad (Figura 4.3c).

Es importante indicar que los suelos presentan altos contenidos de fosfatos (de 62 a 276 mg kg⁻¹) por la fertilización con estiércol (Reséndiz *et al.*, 2013) y biosólidos a través de las aguas residuales (Fuentes *et al.*, 2008). La presencia de microorganismos solubilizadores de fosfatos posiblemente está generando que este nutrimento ocurra en contenido muy altos en forma disponible, a pesar de los altos contenidos de MO, tamaño de partícula, presencia de coloides amorfos, rasgos redoximórficos de Fe y Mn y alta CIC, que permiten su fijación y retención (Brady y Weil, 2010).

El fósforo es rápidamente inmovilizado (Sanyal *et al.*, 1991) por lo que ocurre en cantidades micromolares o menores y las bacterias utilizan varios mecanismos para solubilizarlos. La capacidad quelatante de ácidos orgánicos (Kucey, 1988), la liberación de ácidos orgánicos e inorgánicos (Khan *et al.*, 2009) y la protonización del ambiente (Rodríguez y Fraga, 1999) para disminuir el pH (Gyaneshwar *et al.*, 2002) favorecen el crecimiento de las colonias hasta de 8×10^3 y 2.7×10^6 UFC g⁻¹ suelo seco (Gyaneshwar *et al.* (1998) o hasta 3×10^6 y 3×10^5 UFC g⁻¹ (Tallapragada y Seshachala, 2012), de bacterias y hongos. Sin embargo, en la zona de estudio es en pHs alcalino, independientemente de los tipos de tierras y cultivos, donde ocurren las colonias más grandes (Figura 4.3c)

En cultivo de alfalfa, en TN, el pH es moderadamente alcalino (8.2), y ocurre la mayor población de microorganismos solubilizadores de fosfatos (10×10^3 y 2.7×10^6 UFC g⁻¹ suelo seco) y la mayor concentración de P-disponible (178 mg kg⁻¹).

Estudios más específicos para determinar la asociación microorganismos solubilizadores en la zona rizosférica y su relación con los componentes y propiedades del suelo en diferentes cultivos de manera *in-situ* son necesarios pues otros autores han reportado relaciones directas con la capacidad de solubilización y alcalinidad del suelo (Subba Rao, 1982;

Rodríguez y Fraga, 1999). Esto significa que todavía no están claramente establecidos los mecanismos de solubilización de los fosfatos por los microorganismos en ambientes alcalinos.

4.4.5. Resistencia de bacterias a metales pesados

Las bacterias aisladas de la zona rizosférica mostraron similar comportamiento por cultivo y clase de tierras cuando fueron evaluadas para Cr^{6+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+} ; en tanto que para As^{5+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} la tolerancia fue variable (Cuadro 4.2). Por ejemplo, 70% de las bacterias provenientes de la rizósfera de maíz en TL mostraron resistencia a 32 mM de As^{5+} ($2,400 \mu\text{g mL}^{-1}$) y en TN, 50% de las bacterias se adaptaron a esta concentración. Lo anterior indica que las bacterias aisladas del maíz se adaptaron mejor a la ocurrencia de este metal comparado con el pasto forrajero (Figura 4.4a y b).

El Cd^{2+} fue el metal más tóxico para las comunidades microbianas aisladas de la rizósfera de los tres cultivos al presentar la concentración más baja para todos los metales evaluados. Como ya se había mencionado, la concentración de este metal se relaciona negativamente con el tamaño de la población de bacterias. Además, las bacterias que resistieron la concentración más alta (0.3 mM o $23.8 \mu\text{g mL}^{-1}$) se encontraron en la rizósfera de alfalfa en los dos tipos de tierra (Figura 4.4 c y d), favoreciendo la presencia de bacterias tolerantes a este MP.

Jadia y Fulekar (2008) mencionan que algunas plantas interactúan fuertemente con la captura de MP principalmente por adsorción en el sistema radical, donde muchos mecanismos están disponibles para prevenir efectos tóxicos para las mismas. Existen asociaciones entre bacterias y plantas, como la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*, tiene la ventaja de integrar microorganismos que pueden influenciar la biodisponibilidad de los metales, a la vez promover el crecimiento vegetal (Nonnoi *et al.*, 2012).

Por otra parte, las poblaciones de bacterias aisladas del maíz y alfalfa de TL y la alfalfa de TN, fueron resistentes a 2mM ($130.8 \mu\text{g mL}^{-1}$) de Zn^{2+} , en porcentajes de 21.4, 8.7 y 4% respectivamente (Figura 4.4 e y f). Al tener la alfalfa raíces profundas, rizósfera activa y capacidad para absorber agua, nitratos y MP (Jadia y Fulekar, 2008), hace que sea un candidato primario para la mitigación de problemas de contaminación (Peralta *et al.*, 2004). No obstante, como cultivo forrajero, los MP se pueden acumular en su biomasa aérea e incorporarse a la cadena trófica.

Otro tipo de plantas con potencial descontaminador son los pastos al colonizar hábitats extremos, por lo que se les consideran como especies pioneras. Asimismo, son tolerantes a MP y presentan grupos de rizobacterias con importantes funciones ecológicas que promueven el crecimiento de plantas (Zhuang *et al.*, 2007). Sin embargo, en este estudio se demostró que las bacterias aisladas de la rizósfera del maíz muestran mayor tolerancia que las del pasto, lo cual es un resultado por primera vez encontrado, pero se requieren investigaciones más detalladas referentes a este tema y no se recomendaría su uso en tecnologías de limpieza de suelos al tratarse de un cultivo de consumo básico.

Ansari y Malik (2007) aseguran que en los suelos con altos niveles de contaminación explican la alta tolerancia de los microorganismos; no obstante, sus valores reportados de MP totales ($\text{Cd}-3.3 \text{ mg kg}^{-1}$, $\text{Cu}-38.6 \text{ mg kg}^{-1}$, $\text{Ni}-25.8 \text{ mg kg}^{-1}$ y $\text{Zn}-18 \text{ mg kg}^{-1}$) son ligeramente más bajos a los encontrados en Teoloyucan. En este sentido, la resistencia de las poblaciones microbianas no están relacionadas con la concentración de MP totales en el suelo, sino con otros factores edáficos.

Debido a que la concentración de Cd, Ni, Cu y Zn es baja, la resistencia a estos también fue baja, ya que no existe presión ambiental por altas concentraciones de estos elementos. En contraparte, para As, Hg y Pb, la CMI fue ligeramente más alta con respecto a otros autores.

Esta respuesta probablemente se deba a mecanismos intrínsecos de las bacterias aisladas (Lima e Silva *et al.*, 2012) y no por estrés ambiental.

4.5 Conclusiones

El Cd es el único metal pesado presente en concentraciones que superan los límites permisibles y el mayor valor se relaciona con el cultivo de alfalfa en condiciones de buen drenaje y pH ácido. La concentración de MP presentan diferencias significativas en tipo de cultivo, clase de tierra o propiedad edáfica: Cd-(alfalfa, tierras lama-pH ligeramente ácido); Cu-(tierras negras-pH alcalino), Zn-(pasto, tierras lamas-pH bajo y porcentaje de MO alto) y Pb-(tipo de cultivos-clases de tierra) lo que indica el efecto combinado de varios parámetros edáficos en la acumulación de MP.

Con respecto a la relación entre las propiedades edáficas y tamaño de las poblaciones de microorganismos se encontró que en bacterias es el pH y la humedad las explican su comportamiento heterogéneo y en los hongos es sólo la humedad.

Las poblaciones de bacterias son similares a otros valores reportados en Aridisoles de la India o Egipto, a pesar de que los suelos de Teoloyucan (aparentemente), contienen mayor contenido de MO y humedad. Esto probablemente indica la ocurrencia de otros factores limitantes para el crecimiento de los microorganismos pues en los estudiados se presentan condiciones favorables de humedad, pH y M.O para su desarrollo.

Asimismo, existe la presencia de microorganismos solubilizadores de fosfatos sobre todo en la rizósfera de alfalfa en TN y la de maíz en TL (1×10^4 UFC g⁻¹ suelo seco), lo cuales pueden estar relacionados con las altas concentraciones de fosfatos solubles a pesar de la alta reactividad de los suelos. Este parámetro se relacionó positivamente con la alcalinidad de los

suelos. Por lo anterior, es posible identificar variables edáficas que favorezcan o restrinjan el tamaño de la población o bien, la presencia de microorganismos con funciones específicas.

La resistencia de las bacterias a Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} fue baja debido a que no existe presión selectiva por altas concentraciones y para As^{5+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} , la CMI fue mayor, probablemente a mecanismos intrínsecos de las bacterias. Las bacterias aisladas de la rizósfera de alfalfa y maíz presentaron la mayor resistencia a MP.

De manera general se encontró una mayor asociación del tamaño de las poblaciones microbianas del suelo con las propiedades edáficas, más que con la concentración de MP totales.

Cuadro 4.1. Propiedades de los horizontes superficiales (media \pm D.E) de dos clases de Tierras en cultivos de alfalfa, pasto forrajero y maíz del Distrito de Riego los Insurgentes.

Clase de tierra	Cultivo	Densidad aparente (g cm ⁻³)	Humedad (%)	pH (suelo:agua 1:2.5)	MO (%)	CIC (cmoles kg ⁻¹)	P Olsen mg kg ⁻¹	P Ac. Cítrico
Lama	Maíz	1.53 (± 0.21)	47.5 (± 19)	7.3 (± 0.1)	3.3 (± 0.7)	27.8 (± 9.3)	276 (± 110.5)	842 (± 527.7)
	Pasto forrajero	1.7 (± 0.14)	33.1 (± 0.35)	5.7 (± 0.1)	11.7 (± 1.8)	29.3 (± 1)	125 (± 44.7)	632 (± 235.6)
	Alfalfa	1.6	23.8	6.1 (0.2)	2.5 (± 0.2)	17	62	407.6
Negra	Maíz	1.6 (± 0.06)	35.3 (± 9.1)	7.6 (± 0.06)	2.7 (± 0.2)	23.1 (± 4)	221 (± 185.8)	807.4 (± 536)
	Pasto forrajero	1.65 (± 0.05)	35.5 (± 6)	7.7 (± 0)	3.8 (± 0.7)	36 (± 14.79)	84 (± 23.2)	386 (± 230.5)
	Alfalfa	1.582 (± 0.07)	38.6 (± 12.6)	8.2 (± 0.1)	4.40 (± 0.7)	42 (± 15.3)	178 (± 62.8)	848 (± 234.8)

Cuadro 4.2. Proporción de la población de bacterias resistentes a metales pesados aisladas de la rizósfera de maíz, pasto forrajero y alfalfa en tierras lamas y negras del Distrito de Riego Los Insurgentes. El número entre paréntesis indica la máxima concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en la cual se encontró crecimiento bacteriano.

Metal/ Concentración	Tierras Lamas			Tierras Negras		
	% ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
Cultivo	Maíz	Pasto	Alfalfa	Maíz	Pasto	Alfalfa
As	71 (>2400)	40 (>2400)	48 (>2400)	50 (>2400)	46 (>2400)	32 (>2400)
Cd	0	10 (12.4)	4 (24.8)	25 (4.96)	9 (4.96)	4 (24.8)
Cu	7 (127)	10 (127)	78 (63.6)	13 (63.6)	27 (127.1)	4 (190.65)
Ni	36 (88.07)	70 (88.07)	44 (88.07)	13 (117.4)	36 (88.07)	32 (88.07)
Pb	21 (1036)	30 (1036)	17 (1036)	13 (1036)	36 (1036)	4 (1600)
Zn	21 (130.8)	30 (32.7)	9 (130.8)	37 (32.7)	9 (65.4)	4 (130.8)
Cr	21 (104)	30 (52)	78 (4.35)	13 (52)	9 (26)	4 (52)
Hg	21 (20)	30 (40)	17 (40)	25 (20)	18 (20)	20 (40)

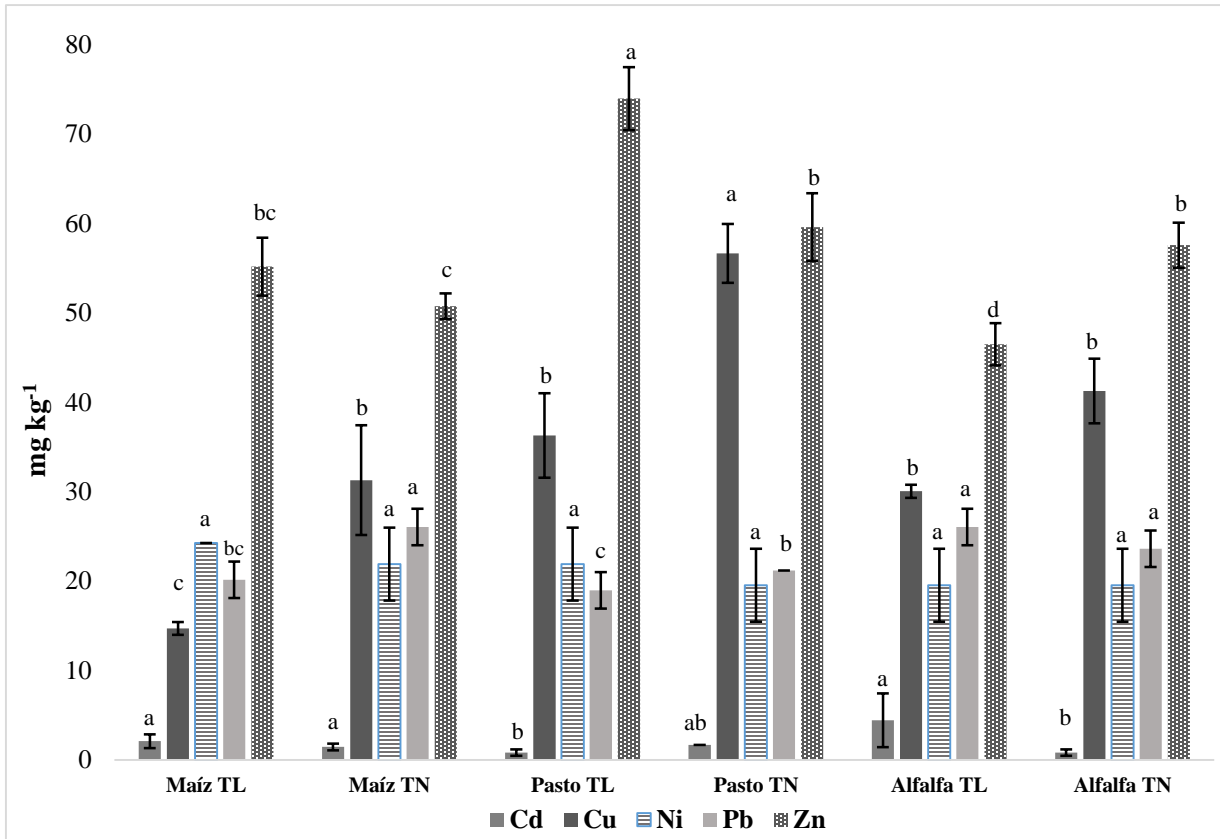


Figura 4.2. Concentración de MP totales en tierras lamas y negras en diferentes cultivos del distrito de riego Los Insurgentes. Letras diferentes indican diferencia significativa con una $p \geq 0.05$ en cada MP de acuerdo a la clase de tierra y tipo de cultivo.

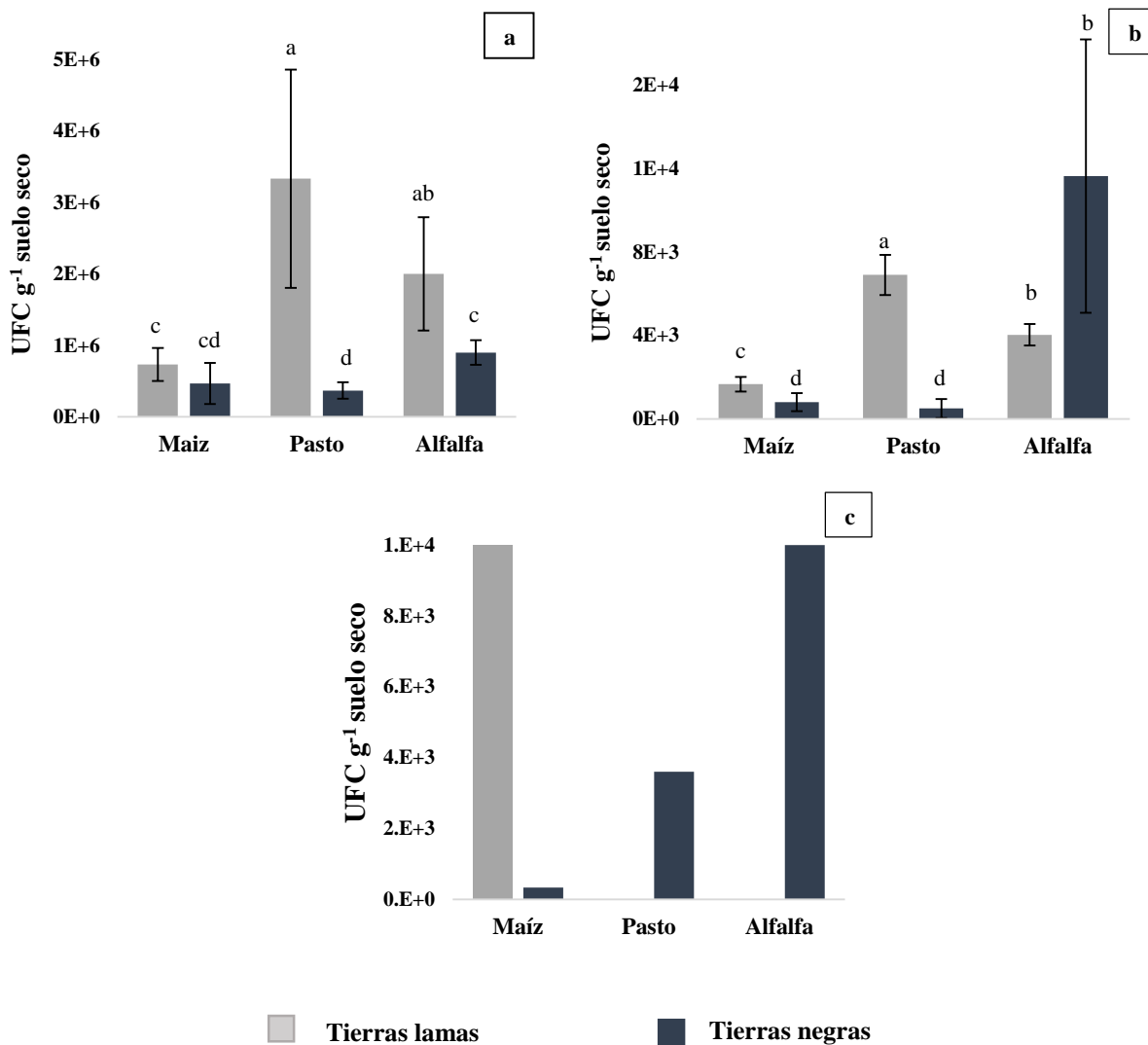


Figura 4.3. Tamaño de las poblaciones de bacterias aeróbicas (a) hongos (b) y microorganismos solubilizadores de fosfatos (c) en tierras lamas y negras del distrito de riego Los Insurgentes.

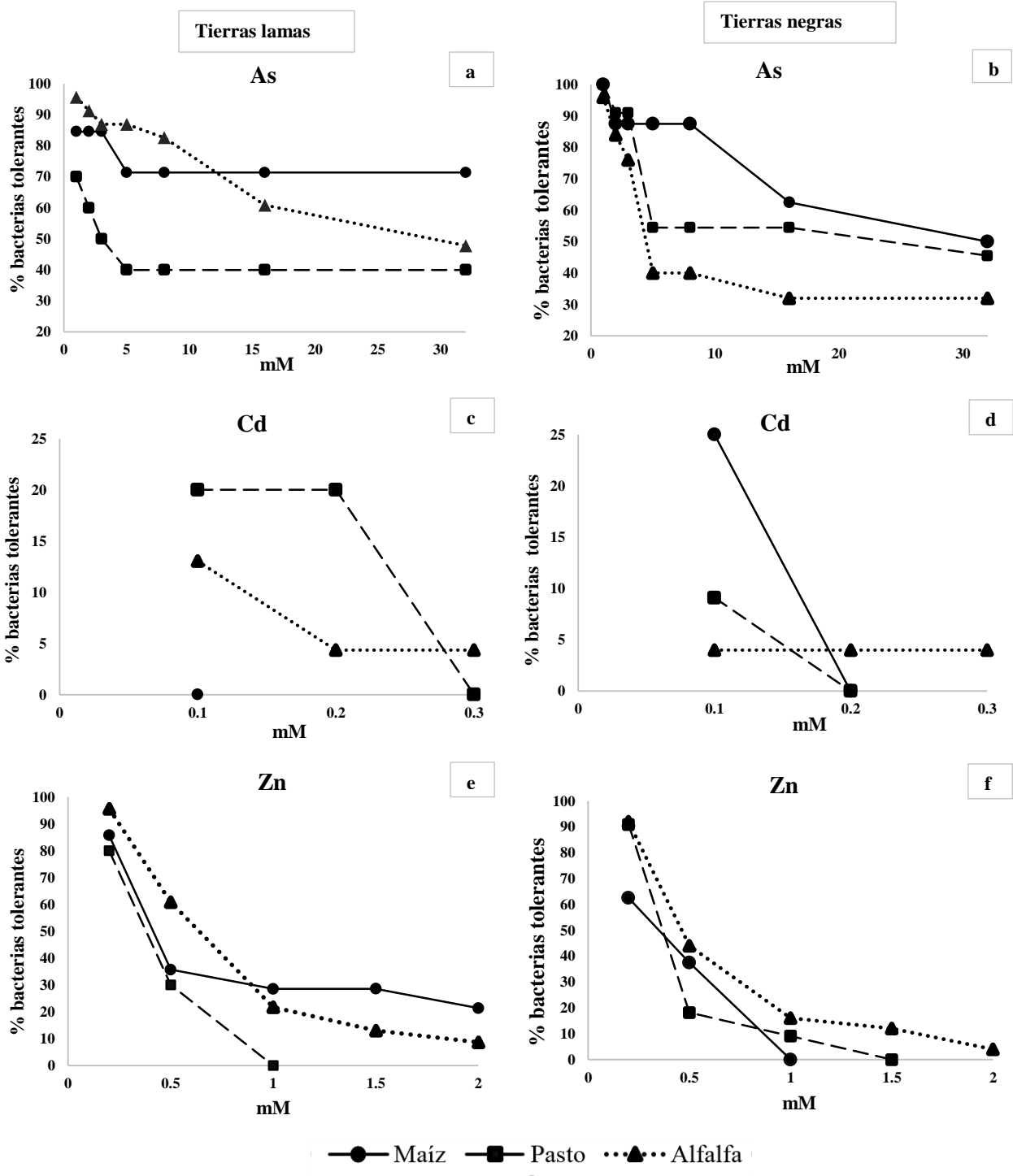


Figura 4.4. Porcentaje de bacterias aisladas tolerantes a diferentes concentraciones de MP, de la rizósfera de maíz, pasto forrajero y alfalfa cultivadas en tierras lamas y negras del Distrito de Riego Los Insurgentes, Teoloyucan, Estado de México.

4.6 Referencias

- Aleem, A., Isar, J., Mailk, A., 2003. Impact of long term application of industrial wastewater on the emergence of resistance traits in *Azobacter chroococcum* isolated from rhizospheric soil. *BioresourcesTechnology* 86, 7-13.
- Ahemad, M., Malik, A., 2011. Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. *Bacteriological Journal* 2, 12-21.
- Al-Nakshabandi, G.A., Saqqar, M.M., Shatanawi, M.R., Fayyad, M., Al-Horani, H., 1997. Some environmental problems associated with the use of treated wastewater for irrigation in Jordan. *Agricultural Water Management* 34, 81-94.
- Alloway, B.J., 2008. Zinc in soils and crop production. International Zinc Association & International Fertilizer Industry Association. Brussels, Belgium and Paris, France. p.p. 135.
- Alloway, B.J., 2010. Heavy Metals in Soils. Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability. Springer. 3rd ed. 613p.
- Ansari M.I., Malik, A., 2007. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with wastewater. *Biosource Technology* 98, 3149-3153.
- Arao, T., 1999. In situ detection of changes in soil bacterial and fungal activities by measuring ¹³C incorporation into soil phospholipid fatty acids from ¹³C. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1015-1020.
- Bahig, A.E.; Aly, E.A. Khaled, A.A., Amel, K.A., 2008. Isolation, characterization and application of bacterial population from agricultural soil at Sohag Province, Egypt. *Malasyan Journal of Microbiology* 4, 42-50.
- Brady, C.N., Weil, R.R., 2008. The nature and properties of soils. 14th edition. Upper Saddle Hall, N.J. Pearson Prentice Hall. N.J. 965p.
- Cajuste, L., Carrillo, G.R., Cota, G.E., Laird, J. R., 1991. The distribution of metals from wastewater in the Mexican Valley of Mezquital. *Water, Air and Soil Pollution* 57-58,763-771.
- Chávez, A., Maya, C., Gibson, R., Jiménez B., 2011. The removal of microorganisms and organic micropollutants from wastewater during infiltration to aquifers after irrigation of farmland in the Tula Valley. *Environmental Pollution* 159, 1354-1362.
- Christensen, T., 1984. Cadmium soil sorption at low concentrations: Effect of time, cadmium load, pH, and calcium. *Water Air and Soil Pollution* 21, 105-114.
- CNA, 2011. Infraestructura hidráulica In: Estadísticas del agua en México. Capítulo 4, México, D.F. pp 57-77.
- Durán-Álvarez, J.C., Jiménez-Cisneros, B., 2014. Beneficial and negative impacts on soil by the reuse of treated/untreated municipal wastewater for agricultural irrigation. A review of the current knowledge and future perspectives. In *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. Hernández-Soriano, M. (Ed.). Intech, Open Science.
- Denneman, P. R.J., Robberse, J. G., 1990. Ecotoxicological risk assessment as a base for development of Soil quality criteria. The NPO report. National Agency for the Environmental Protection Copenhagen. Denmark.
- Flores, L., Blas, G., Hernández, G., Alcalá, R., 1997. Distribution and Sequential extraction of some heavy metals from soils irrigated with wastewater from Mexico City. *Water, Air and Soil Pollution* 98, 105-117.

- Fuentes, B.M., de la L. Mora, Bolan, N. S., Naidu, R., 2008. Assesment of phosphorus bioavailability from organic wastes in soil. In: Chemical Bioavailability in Terrestrial Environments. Hartemink A.E., McBratney B., Naidu, R., (Eds.). Developments in Soil Science 32, 363-411.
- Gadd, G., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609-643.
- Giller, K., Witter, E., McGrath, S., 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 2031-2037.
- Gyaneshwar, P., Naresh-Kumar, G., Parekn, L.J., 1998. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *World Journal Microbiology Biotechnology* 14,669-673.
- Gyaneshwar, P., Naresh-Kumar, G., Parekn, L.J., Poole, P.S., 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* 245, 83-93.
- Gutiérrez-Castorena, M.C., Stoops, G., Ortiz S., C.A., Ávila, G.L., 2005. Amorphous silica materials in soils and sediments of the Ex-lago de Texcoco, México: an explanation for its subsidence. *Catena* 60, 205-226.
- Hamilton, A.J., Stagnitti, F., Xiong, X., Kreidi, S., Benje, K., Maher, P., 2007. Wastewater Irrigation: The State of Play. *Vadose Zone. Soil Science Society of America* 6, 823-840.
- Harsh, J., Chorover, J., Nizeyimana, E., 2002. Allophane and Imogolite. In Dixon, J.B., Weed, S.B., (Eds.). *Minerals in soil environments*, Soil Science Society of America, Book Series. No. 1. Madison, WI, USA. pp. 379-438.
- Inglett, P., Reddy, K., Corstanje, R., 2005. Anaerobic Soils. In: Hillel, D. (ed). *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Florida, USA. Elsevier.
- Jadia, C.D., Fulekar, M.H., 2008. Phytotoxicity and remediation of heavy metals by Alfalfa (*Medicago sativa*) in soil-vermicompost media. *Advances in Natural and Applied Sciences* 2, 141-151.
- Jamieson, R.C., Gordon, R.J., Sharples, K.E., Stratton, G.W., Madani, A., 2002. Movement and persistence of fecal bacteria in agricultural soils and Surface drainage water: A review. *Canadian Biosystems Engineering* 44, 1.1-1.9.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. 3th edition. CRC Press, Boca Raton, FL. 331p.
- Khan, A., Jilani, G., Akhtar, M., Naqvi, S., Rasheed, M., 2009. Phosphorous solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanism and their role in Crop Production. *Journal Agricultural Biological Science* 1, 48-58.
- Kucey R.M.N., 1988. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. *Canadian Journal Soil Science* 68, 261-270.
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-Based Assesment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5111-5120.
- Lima da Silva, A., de Carvalho, M. A., Ribeiro de Souza, S. A. L. A., Teixeira Dias, P. M., Silva-Filho, R. G., da Saramago, C. S., de Meirelles, B., de Melo, C. A., Hofer, E., 2012. Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology* 43, 1620-1631.
- Lindsay, W.L., 1979. *Chemical equilibria in soils*. John Willey and Sons. New York.
- Malik, A., Jaiswal, R., 2000. Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. *World Journal Microbiological Biotechnology* 16,177-182.

- Malik, A., Aleem, A., 2011. Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas spp.* from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environment monitoring assessment* 178, 293-308
- Malkawi, H., Mohammad, M., 2003. Survival and accumulation of microorganisms in soils irrigated with secondary treated wastewater. *Journal Basic Microbiological* 43, 47-55.
- Mapanda, F., Mangwayana, E.M., Nyamangara, J., Giller, K.E., 2005. The effect of long term irrigation using wastewater on heavy metal contents of soils under vegetables in Harare, Zimbabwe. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 107, 151-165.
- McLean, J. E., Bledsoe, B.E., 1992. Behavior of Metals in Soils. Ground Water Issue. EPA. 25p.
- Ministry of Housing, Netherlands, 1994. Physical planning and Environmental Conservation. Report HSE 94.02.
- Nayek, S., Gupta, S., Saha, R.N., 2010. Metal accumulation and its effects in relation to biochemical response of vegetables irrigated with metal contaminated water and wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 178, 588-595.
- Nonnoi, F., Chinnaswamy, A., García de la Torre, V., Coba de la Peña, T., Lucas, M.M., Pueyo, J.J., 2012. Metal tolerance of rhizobial strains isolated from nodules of herbaceous legumes (*Medicago spp.* and *Trifolium spp.*) growing in mercury-contaminated soils. *Applied Soil Ecology* 61:49-59.
- Peralta-Videa, J.R., de la Rosa, G., González, J.H., Gardea-Torresdey, J.L., 2004. Effects of the growth stage on the heavy metals tolerance of alfalfa plants. *Advances in Environmental Research* 8, 679-685.
- Plan Municipal de Desarrollo Urbano de Teoloyucan. 2004. Secretaría de Desarrollo Urbano y Vivienda. 234p.
- Rámirez-Fuentes, E.; Lucho-Constantino, C.; Escamilla-Silva, E.; Dendooven, L., 2002. Characteristic, and carbon and nitrogen dynamics in soil irrigated with wastewater for different lengths of time. *Bioresource Technology*. 85:179-187.
- Reddy, K.R., Feijtel, T.C., Patrick, W.H., 1986. Effect of soil redox conditions on microbial oxidation of organic matter. In: *The Role of Organic Matter in Modern Agriculture*. Chen, Y., Avnimelech, Y., (Eds.). Martinnus Nujhoff Publications 117-156p.
- Reséndiz-Paz, M.L., Gutiérrez-Castorena, M.C., Gutiérrez-Castorena, E. V., Ortiz-Solorio, C.A., Cajuste-Bontemps, L., Sánchez-Guzmán, P., 2013. Local Knowledge and Management of Anthrosols in the Valley of Mexico. *Geoderma* 193-194, 41-51.
- Rivera-Vargas, G. 2013. Relación de los materiales amorfos silíceos amorfos y metales pesados con la estabilidad de agregados en suelos irrigados con aguas residuales. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Thesis of Msc. 63p.
- Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17, 319-339.
- Roesner, L., Qian, Y., Criswell, M., Stromberger, M., Klein, S., 2010. Long-Term Effects of Landscape Irrigation using household gray water. Literature and Synthesis. The Water Environment Research Foundation. Virginia, USA. 872p.
- Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth., 2009. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*. 75, 1589-1596.
- Sanyal, S.K., De Datta, S.K., 1991. Chemistry of phosphorus transformations in soil. *Advances in Soil Science* 16, 1-120.

- SEPA. 1995. State environmental protection administration of China. Environmental Quality Standard for Soils GB15618-1995, SEPA, Beijing, China.
- Siebe, C., 1994. Acumulación y disponibilidad de metales pesados en suelos regados con aguas residuales en el distrito de riego 03, Tula, Hidalgo, México. *Revista Contaminación Ambiental* 10, 15-21.
- Subba Rao, N.S., 1982. Advances in Agricultural Microbiology. *In*: Subba Rao, N.S. (Ed.). Oxford and IBH Publ. Co. pp 229-305.
- Tallapragada, P., Seshachala, U., 2012. Phosphate-solubilizing microbes and their occurrence in the rhizospheres of *Piper betel* in Karnataka, India. *Turkish Journal Biology*. 36, 25-35.
- Tiddje, J.M., Sextone A.J., Parkin T.B., Revsbech, N.P., 1984. Anaerobic processes in soil. *Plant and Soil* 76, 197-212.
- Twyman, R.M., 2005. Sample dissolution for elemental analysis: Wet digestion. *In*. Worsfold P., Townshend, A., Poole, C., (Eds). *Encyclopedia of Analytical Science (2ed Edition)*, Volume 8. Elsevier Ltd, London, UK. pp 146-153.
- Van Reeuwijk, L.P., 2002. Procedimientos para análisis de suelos. Trad, al español por Gutiérrez Castorena., C.A., Tavarez E., Ortiz- Solorio., Colegio de Postgraduados. Montecillo. Estado de México. 120 p.
- Vazquez-Alarcón, A., Justin-Cajuste, L., Siebe-Grabach, C., Alcántar-González, G., de la Isla de Bauer, M.L., 2001. Cadmio, níquel y plomo en agua residual, suelo y cultivos en el Valle de Mezquital, Hidalgo. *Agrociencia* 35: 267-274.
- Wada, K., 1989. Allophane and imogolite. *In*: Minerals in soil environments. Dixon, J.B., W. Boul, S., (Eds.). SSSA Book Series 1. Madison, W.I. pp. 1051-1087.
- Yan, X., Zhang, F., Zeng, X., Zhang, M., Prasad-Devkota, L., Yao, T. 2012. Relationship between heavy metal concentrations in soils and grasses of roadside farmland in Nepal. *Environmental Research and Public Health* 9, 3209-3226.
- Zhuang, X., Chen, J., Bai, Z., 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International* 3, 406-413.

CAPITULO 5

DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE BACTERIAS EN SECCIONES DELGADAS DE SUELO

5.1 RESUMEN

A pesar de la importancia del análisis espacial en la microbiología ambiental, los estudios que examinan los patrones de distribución son escasos. El análisis de una sola imagen digital de microscopio representa un área muy pequeña ($\sim 0.01 \text{ mm}^2$) lo que limita determinar la distribución real de las bacterias en el suelo. La nanocartografía en imágenes digitales compuestas fue utilizada para determinar el patrón de distribución de bacterias en la rizósfera de diferentes cultivos. Secciones delgadas (7 x 5.5 cm) de muestras inalteradas de suelos a profundidad entre 0 y 7.0 cm fueron teñidas con calcofluor white M2R. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital como plataforma de alta resolución espectral y un microscopio óptico equipado con lámpara de mercurio para epifluorescencia a 10x. El mosaico representa un centímetro cuadrado de la sección delgada integrada por 216 imágenes secuenciales, la resolución espectral fue de 200 nm. Los resultados indican que se puede nanocartografiar diferentes tamaños de colonias bacterianas y relacionarlas con los componentes del suelo en diferentes tipos de cultivos. En maíz se asocian con las cavidades y fisuras de los minerales bajo condiciones de drenaje pobre, y en alfalfa con la raíz y materia orgánica. La nanocartografía de bacterias en mosaicos digitales de secciones delgadas y microscopía de fluorescencia, permite el análisis geoespacial *in situ* de su distribución, y su relación con los componentes edáficos. Esta técnica puede evaluar procesos de manera más específica de la actividad microbiana en el suelo a diferentes escalas y profundidades.

Palabras clave: *análisis digital; micromorfología; microscopía de fluorescencia.*

Tania González-Vargas, Edgar V. Gutiérrez-Castorena, Ma. del Carmen Gutiérrez-Castorena y Julián Delgadillo-Martínez. Nanocartografía de bacterias en secciones delgadas. XX Congreso Latinoamericano y XVI Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, que se llevó a cabo del 9 al 15 de Noviembre de 2014, en la Ciudad del Cusco, Perú.

5.2 Introducción

El suelo es un sistema heterogéneo donde el comportamiento de los microorganismos es afectado por su microambiente inmediato (Li *et al.*, 2004). Este influencia la captura de nutrimentos, competencia, riesgo de predación, sobrevivencia (Franklin y Mills, 2007) la dinámica de las especies así como su diversidad genética (Grudmann, 2004). En contraste, los microorganismos pueden modificar sólo las condiciones en su área inmediata adyacente, por lo que, todas las interacciones ecológicas son intrínsecamente espaciales (Franklin y Mills, 2007).

El análisis cuantitativo de la distribución espacial de bacterias en el suelo requiere la localización de células bacterianas para ser medidas con precisión a diferentes escalas (Nunan *et al.*, 2001). Sin embargo, el estudio de la diversidad bacteriana, especialmente en suelos, presenta problemas específicos los cuales son probablemente no independientes del tamaño de la bacteria y la complejidad del hábitat edáfico (Grudmann y Gourbière, 1999). Además un factor que se debe considerar ampliamente es el manejo de las escalas, ya que las interacciones ecológicas ocurren a diferentes rangos de estas (Robertson and Gross, 1994).

Otro inconveniente es la cuantificación a partir de muestras alteradas, por lo que no se puede conocer su distribución en el suelo y la relación que tienen con otros componentes del mismo (Li *et al.*, 2004). Asimismo, el entendimiento de la interacción entre los microorganismos y la zona rizosférica es aún incompleto debido a la dificultad de estudiar procesos en el suelo bajo condiciones reales (Bais *et al.*, 2006).

Las secciones delgadas, al elaborarse a partir de muestras inalteradas de suelo, se utilizan para estudiar la distribución espacial de las bacterias *in situ*. Esta técnica usa resina para impregnar y endurecer al suelo, lo que permite observar la estructura, la relación entre los microorganismos y la matriz del suelo bajo el microscopio. Además, con la microscopía de fluorescencia se caracterizan y monitorean la distribución de las poblaciones autóctonas del suelo (Li *et al.*, 2003).

Para la tinción de bacterias en sección delgada se usan los fluorocromos (Stoops, 2003). El naranja de acridina y el calcoflúor son los más utilizados; el primero, se considera como un colorante de naturaleza básica (catiónico) y el segundo ácido (aniónico) (Li *et al.*, 2004).

El naranja de acridina es uno de los colorantes más estudiados y más comúnmente empleado para la tinción de ácidos nucleicos de microorganismos; sin embargo, se ha reportado que tiene alta afinidad por los componentes del suelo (Altemüller y van Vliet-Lanoe, 1990). En tanto, el calcoflúor rodea las estructuras de polisacáridos de las superficies de células bacterianas las cuales son teñidas de una coloración azul brillante, mientras que el suelo no absorbe el fluorocromo (Li *et al.*, 2004). La fluorescencia de la resina puede reducirse con la disminución del espesor de la sección delgada (Altemüller y van Vliet-Lanoe, 1990). Tippkötter y Ritz (1996) aseguran que un grosor de entre 15 y 20 μm son generalmente adecuados para estudios biológicos.

La distribución de los microhábitats en el suelo probablemente involucra una variedad de tamaños de franjas colonizadas. Asimismo, con frecuencia se ha mencionado que la localización de las fuentes de nutrimentos es uno de los principales factores determinantes en la variabilidad espacial de las bacterias en el suelo (Nunan *et al.*, 2001; Nunan *et al.*, 2003; Bruneau *et al.*, 2005; Franklin y Mills, 2007);

Con respecto a la relación con los componentes minerales, Kögel-Knabner *et al.* (2008) mencionan que las asociaciones arcillas y órgano-minerales son el hábitat preferido por comunidades microbianas complejas, ya que estas asociaciones ofrecen sustratos, así como alta área superficial para la adsorción y protección de los microorganismos del suelo.

La asociación entre la rizósfera y los microorganismos también ya se ha documentado previamente, los microorganismos son capaces de colonizar las superficies de las raíces debido a que el alimento está disponible en esta zona (Hiltner, 1904; Martin y Folch, 1977), además de que se presentan conjuntos de interacciones complejas entre las plantas y los microorganismos para promover el crecimiento de las mismas (Pierson *et al.*, 1998; Bais *et al.*, 2004; Bais *et al.*, 2006).

Por otra parte, los agregados del suelo pueden ser microhábitats básicos, en donde la distribución de microorganismos puede estar cercanamente relacionada con la estructura y composición de los agregados (Li *et al.*, 2004). En particular, las prácticas de manejo agrícola han mostrado reducir la heterogeneidad en las características del suelo, lo cual puede influenciar la comunidad microbiana y el ciclaje de nutrientes (Franklin y Mills, 2007).

A pesar de la importancia del análisis espacial en la microbiología ambiental, los estudios que examinan los patrones de distribución son escasos. A menudo, se publican investigaciones que describen la variación espacial de bacterias en el ambiente, en donde, sólo se reportan resultados del monitoreo de la distribución individual a microescala (Franklin y Mills, 2007), lo que requiere de altas magnificaciones del microscopio las cuales representan áreas muy pequeñas ($\sim 0.01 \text{ mm}^2$) (Nunan *et al.*, 2001). Por lo que la relación entre las comunidades bacterianas y su organización espacial dentro de la estructura del suelo no ha sido evaluada a fondo (Grundmann, 2004).

La adquisición de imágenes de campos contiguos para ser unidas a través de mosaicos permiten la generación precisa de imágenes de calidad a larga escala y con definición suficiente para ser cuantificadas a diferentes rangos de escalas (Nunan *et al.*, 2001). Además, es posible una mejor visualización de los procesos que ocurren en el suelo y para el caso de los microorganismos, un mejor entendimiento de su dinámica.

En esta investigación la creación de mosaicos de mayor tamaño (1 cm²) permiten una mayor comprensión de los microorganismos con su ambiente inmediato a diferencia de las investigaciones que abordan este tema, en las cuales, el área de visualización es de apenas algunos milímetros. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue el análisis de la distribución de bacterias en Antrosoles irrigados con aguas residuales, mediante secciones delgadas, microscopía de fluorescencia y técnicas cartográficas.

5.3 Materiales y Métodos

5.3.1. Colecta de muestra inalterada de suelo

5.3.1. Zona de estudio. El presente estudio fue llevado a cabo en un valle agrícola de 450 ha localizado dentro del distrito de irrigación Los Insurgentes, el cual se encuentra en la periferia de la Laguna de Zumpango, Municipio de Teoloyucan, Estado de México. Esta zona está comprendida entre los 19°43'11", 19°47'11" latitud norte y 99°43'15", 99°12'57" longitud oeste, a una altitud de 2250 m (Reséndiz-Paz *et al.*, 2013).

5.3.1.2. Muestreo. Del mapa de clases de tierras generado por Reséndiz *et al.* (2013) se seleccionaron dos áreas representativas y tres tipos de cultivos. En cada clase de tierra se obtuvieron tres muestras inalteradas de suelo rizosférico, en maíz, pasto y alfalfa. En total se colectaron seis muestras inalteradas de 0 a 7 cm de profundidad.

5.3.2. Elaboración de secciones delgadas

La obtención de muestras inalteradas de suelo se logra a través de cajas Kubiena las que se enterraron verticalmente y extrajeron excavando de manera cuidadosa para evitar que se alterara la muestra; éstas se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secas se les agregó resina poliéster insaturada, monómero de estireno (relación 1:12) y 1.5 ml de catalizador (Peróxido de metil-etil-cetona). Enseguida, se introdujeron a una caja de vacío a una presión de 18 libras durante tres horas, con el fin de que la resina penetre con mayor rapidez en la muestra, y logre impregnarse en todos los espacios del suelo. Concluido el paso anterior, se dejaron en gelación por 15 días para una impregnación total. Una vez, endurecidos los bloques, se realizaron cortes longitudinales cercanos a la raíz. Los bloques se colocan en portaobjetos, y las muestras se pulieron hasta alcanzar un grosor de 20 micras. Para el análisis en microscopia de fluorescencia se colocó el cubreobjetos después de la tinción.

5.3.3. Microscopia

5.3.3.1. Fluorescencia y campo claro. Tinciones vitales con CFW Sigma se llevaron a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Altemüller y Vorbach (1990) y Postma y Altemüller (1990). El análisis de las imágenes se realizó con un microscopio óptico Olympus BX51 TRF equipado con lámpara de mercurio para el uso de epifluorescencia, en el cual se realizaron capturas de fotografías en campo claro y con fluorescencia con las cuales se realizó la construcción de los mosaicos. La longitud de onda para CFW se realizó con luz UV (Li *et al.*, 2004).

5.3.4. Imágenes digitales secuenciales

En la sección delgada se seleccionó un cm^2 el cual comprendiera las raíces, agregados, materia orgánica y minerales. Posteriormente, un barrido en zigzag de manera manual fue realizado para la captura de 216 imágenes (12 imágenes por línea y 17 líneas en total). Para la captura de éstas se utilizó el software Q-capture. En la pantalla de la computadora se utilizó una plantilla de acetato la cual tenía 2 mm de traslape por cada lado, con la finalidad de disminuir errores y/o falta de información al momento de crear el mosaico. Las imágenes fueron almacenadas en formato TIFF, para permitir su georreferenciación. (Figura 5.1 a y b).

5.3.5. Georreferenciación y proyección de imágenes individuales

El proceso de georreferenciación de imágenes digitales, obtenidas a partir de una cámara digital de alta resolución instalada en un microscopio óptico, se basa bajo el siguiente principio: cada imagen con formato TIFF tiene coordenadas cartesianas preestablecidas, así todo un conjunto de imágenes secuenciales de una sección delgada reporta las mismas coordenadas cartesianas de salida.

El presente proceso de georreferenciación consiste en realizar cambios al sistema de coordenadas cartesianas de salida de la imagen digital por coordenadas secuenciales polinomiales de la sección delgada. Este sistema reside en ejecutar cambios a las imágenes originales las cuales involucran a factores como: el tamaño del campo de la imagen digital (objetivo del microscopio óptico), el porcentaje de traslape entre imágenes secuenciales (tanto sobre el eje de las X como en eje de las Y), la distancia horizontal y vertical de la imagen visible sobre pantalla y el área de la misma.

El nuevo sistema de coordenadas proyecta en las imágenes un patrón de desplazamiento horizontal y vertical, ubica a la imagen geográficamente en el sistema de coordenadas cartesiano

de la sección delgada y transforma parámetros de altura y anchura, tamaño de pixel por unidad y, área de imagen. Además, brinda parámetros reales digitales como alta resolución espectral y espacial. Al finalizar el proceso de georreferenciación de las imágenes secuenciales y de efectuar la transformación a extensión de *IMG se cuenta con la posibilidad de realizar el mosaico de la sección delgada, el cual consiste en una serie de imágenes compuestas digitales, que dependiendo de la amplitud de observación puede variar entre varios cm^2 , con una resolución espacial de micras o nanómetros cuadrados (Figura 5.1 a y b).

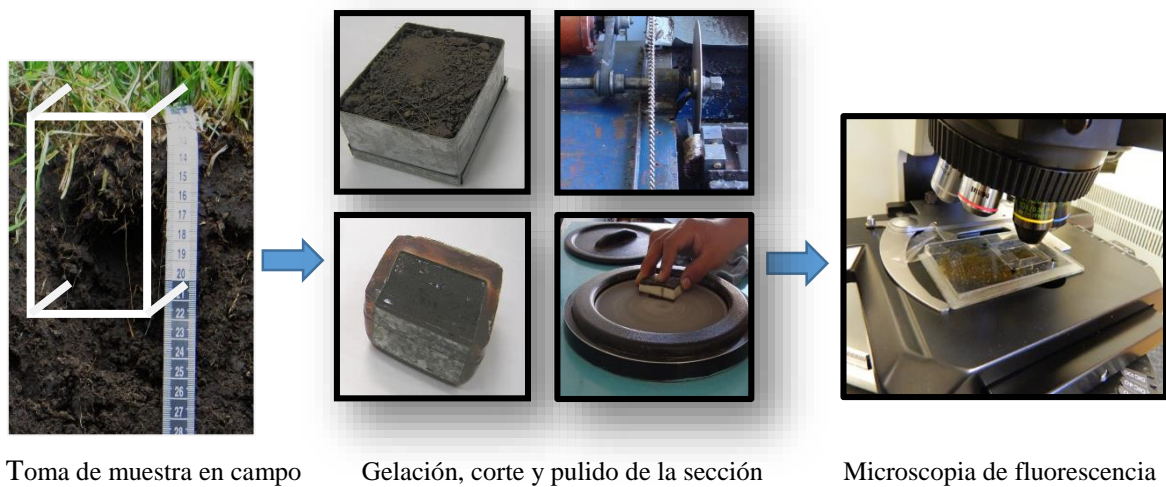


Figura 5.1a. Colecta de muestra, elaboración de la sección delgada y microscopia de fluorescencia.

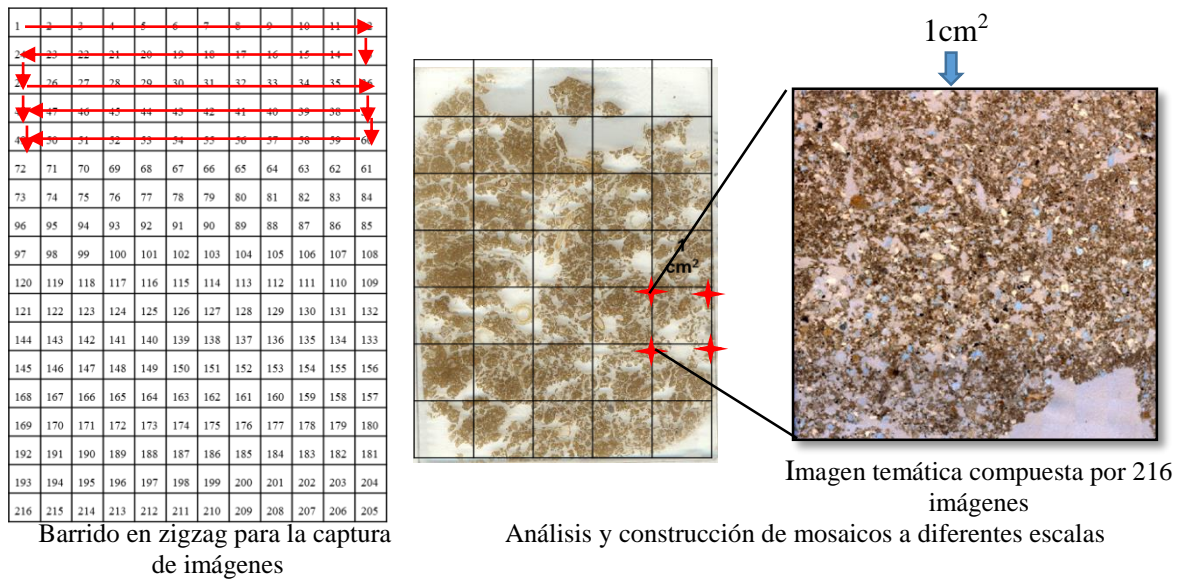


Figura 5.1b. Georreferenciación y proyección de imágenes individuales

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Mosaico digital

A partir de imágenes digitales secuenciales se generaron dos mosaicos digitales, el primero representa una imagen raster compuesta por 216 fotografías, mientras que la segunda, está constituida por polígonos vectoriales de colonias de bacterias. El área del mosaico representó 1 cm² de la sección delgada para las clases: maíz-tierra negra (TN) y alfalfa-tierra lama (TL) (Figuras 5.2 a y b). El mosaico cuenta con un área efectiva de alta resolución de 100 mm², la cual está constituida por 48,826 columnas y 46 702 filas, dando un total de 2 280 271 852 píxeles, donde el pixel representa una superficie de 0.0002 mm². Por lo anterior, el mosaico raster comprende un tamaño de 17Gb, haciendo de este, una imagen compuesta de alta resolución espectral.

Algunos autores han utilizado mosaicos digitales para el análisis espacial a escala milimétrica compuesta por 25 fotografías (5x5): Nunan *et al.* (2001) lograron procesar mosaicos con un área efectiva de 0.282 mm² (máxima capacidad de procesamiento digital). Este mosaico alcanzaba dimensiones de 3840 x 2870 píxeles (aproximadamente 33Mb) y cada píxel representaba una superficie de 0.026 μm². Los autores Nunan *et al.* (2003) lograron capturar y procesar con un microscopio controlado mecánicamente un mosaico compuesto por 400 imágenes a una amplitud de 630x, las cuales representaban un área de 4.51mm².

A pesar que el procesamiento digital de imágenes se encuentra limitado por equipo altamente sofisticado para capturar imágenes secuenciales, el área total de visualización continua siendo pequeña, por lo que es difícil la comprensión de la distribución de bacterias en su entorno edáfico. El mosaico generado en la presente investigación está constituida por una superficie mayor, por lo que es posible distinguir la relación de colonias bacterianas con los componentes órgano-mineral del suelo, como se analiza en el siguiente apartado.

5.4.2 Distribución de colonias bacterianas en componentes del suelo

5.4.2.1 Tierras negras en relación al cultivo de maíz

En tierras negras localizadas en el área de estudio donde se cultiva Maíz, las colonias de bacterias reportan una tendencia a desarrollarse en materia orgánica principalmente, además de crecer alrededor de partículas minerales y dentro de cavidades o fisuras (Figura 5.3 y 5.4).

Algunas investigaciones aseguran que la disponibilidad de nutrimentos es el factor limitante que determina la distribución espacial de las bacterias, con respecto a esto, Nunan *et al.* (2001) encontraron que a mayores profundidades los bajos niveles de nutrimentos pueden ocasionar crecimiento restringido. Las poblaciones bacterianas crecen por autoreplicación y su crecimiento conduce al desarrollo de colonias con cercana proximidad a otras. Así, en situaciones donde hay poco o nulo crecimiento, la distribución de las bacterias es más bien azarosa que agregada.

La superficie estimada de colonización bacteriana dentro de un cm^2 representó el 0.26% del área estudiada en la sección delgada de tierras lamas con respecto al cultivo de alfalfa; en tanto, la que corresponde a tierras negras con relación al cultivo de maíz 1.06%. Esto contrasta con lo reportado mediante el método en cuenta viable en placa, donde se observaron resultados contradictorios: en maíz se registró una población menor que en alfalfa (4.6×10^5 y 2×10^6 UFC g^{-1} suelo seco respectivamente). Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de cuantificar otro tipo de microorganismos, por ejemplo las bacterias anaeróbicas, las cuales posiblemente estén dominando en sitios con condiciones de anaerobiosis, como es el caso de las tierras negras.

Para el caso del tamaño de las colonias de bacterias en maíz en tierras negras se encontraron parches más pequeños que iban de 31.33 a 41.54 μm aproximadamente, los cuales representaban de 11 830 a 17 828 bacterias. Para alfalfa, en tierras lamas se obtuvieron parches más o menos del mismo tamaño (28-67 μm , 8546-34 071 bacterias aproximadamente); sin

embargo, las colonias son menos numerosas. Grundman *et al.* (2001), específicamente para bacterias nitrificantes, reportaron que sus microhábitats ocurren en parches colonizados más extensos, hasta 250 μm de diámetro, los cuales se distribuyeron de manera azarosa y ocuparon el 5.5% del volumen total del suelo. Probablemente la función de los microorganismos influya en la distribución y tamaño de las colonias.

Nunan *et al.* (2002) determinaron un intervalo de 33 a 417 conteos por imagen ($7460 \mu\text{m}^2$) en la superficie del suelo y de 1 a 300 bacterias a profundidades mayores; no obstante, el coeficiente de variación es muy alto. Esto lo atribuyen al efecto del arado, el cual modifica los patrones de distribución espacial, la dispersión de los nutrientes y los sitios favorables de colonización bacteriana.

Asimismo, estos autores reportaron que los rangos de correlación espacial generalmente muestran mosaicos o distribuciones “hot-spot”. Su información sugiere que los factores que regulan la distribución de las bacterias en el suelo opera a dos escalas: las bacterias se encuentran mayormente agregadas en pequeñas áreas y distancias; en contraste a la superficie en donde los mosaicos son más grandes y prevalentes.

En tanto, Nunan *et al.* (2003) encontraron una densidad de 0 a 104 bacterias por imagen ($100 \mu\text{m}$) en la superficie del suelo, la cual disminuye con la profundidad, lo que sugiere que la variabilidad espacial de las bacterias estuvo relacionada al estatus de nutrientes del suelo y con la cercanía de los poros. Por su parte, Bruneau *et al.* (2005) afirman que la actividad microbiana disminuye en horizontes más profundos que contienen materia orgánica de incorporación antaño. Estos autores reportaron de 200 a 1300 bacterias mm^2 , lo que equivale a 10^8 y 6.5×10^8 células por cm^{-3} respectivamente.

Por otra parte, la interacción entre los minerales y bacterias ya se ha documentado. Hisset y Gray (1976) notaron que células simples fueron comúnmente observadas en las partículas

minerales. Asimismo, Postma y Altemüller (1990) observaron que células bacterianas de 0.7 x 2 µm se encontraban junto a partículas de arcilla, alrededor de las partículas de cuarzo o en poros pequeños. No obstante, las relaciones específicas entre bacterias y superficies minerales no han sido investigadas a fondo.

Como se puede apreciar en la Figura 5.3 b-g, algunas comunidades bacterianas se encuentran dentro de las fisuras de los minerales, probablemente debido a que los minerales presentan un papel de protección contra factores ambientales y/o depredadores. Kögel-Knabner *et al.* (2008) mencionan que las asociaciones arcillas y órgano-minerales son el hábitat preferido por comunidades microbianas complejas, ya que estas asociaciones ofrecen sustratos, así como una alta área superficial para la adsorción y protección de los microorganismos del suelo. En tanto, Gadd (2010) señala que algunos nutrientes esenciales pueden ser adquiridos por encima de los niveles ambientales circundantes a partir de superficies minerales. Por otra parte, se ha reportado alta densidad celular en la fracción arcillosa del suelo (Kabir *et al.*, 2004).

Además, existen evidencias de arreglos de comunidades que producen una estructura nidada: agregados de agregados (“cluster of cluster”). Tal arreglo sugiere que la distribución de parches colonizados puede ser descrita por alguna geometría fractal (Frank y Mills, 2007). La presencia de escalas nidadas indican que los factores ambientales regulan el desarrollo de las comunidades en estos suelos y puede operar a diferentes escalas y la organización espacial de comunidades a través de la parcela puede ser altamente estructurada, incluso dentro de un hábitat heterogéneo a la escala de parcela y campo (Nunan *et al.*, 2002; Frank y Mills, 2007).

Asimismo, la distribución de microorganismos puede estar ligada fuertemente con su función metabólica. Grundman *et al.* (2001), observaron que las bacterias nitrificantes se encontraban interconectadas a través de microporos por lo que los procesos de difusión, probablemente, controlan su distribución espacial.

Los conjuntos de comunidades microbianas se distribuyen azarosamente a través de la parcela, lo que puede deberse a su variabilidad de respuesta individual y la heterogeneidad espacial asociada con las propiedades del suelo (Frank y Mills, 2003). Adicionalmente, se ha sugerido que los patrones en microescala pueden tener un efecto regulatorio en la actividad bacteriana, como resultado de la liberación difusa de sustratos y la dispersión de productos procedentes de la actividad microbiana, los cuales pueden tener efectos estimulatorios de velocidad limitada en los procesos mediados microbianamente (Frank y Mills, 2007).

La variación en la distribución de los microorganismos del suelo es sujetos a interacciones ecológicas a diferentes rangos de escalas (Robertson y Gross, 1994). Asimismo, Nunan *et al.* (2001) concluyen que el principal factor que gobierna la distribución espacial son el ambiente físico y los mecanismos por los cuales las poblaciones crecen.

5.2.2.2 Tierras lamas con relación al cultivo de alfalfa

La mayor parte de las colonias en este cultivo se distribuyeron en la periferia de la raíz seguido de materia orgánica dentro de los agregados y algunas microcolonias en minerales (Figura 5.5 y 5.6). La tendencia principal puede explicarse con el llamado “efecto rizósfera” descrito por Hiltner en 1904, el cual asume que muchos microorganismos son atraídos a los nutrientes exudados por las raíces de las plantas. Este autor observó que el número y la actividad de microorganismos incrementaban en la cercanía de raíces de las plantas.

En adición al suministro de carbono al ambiente, las raíces de las plantas, inician la comunicación cruzada con los microorganismos del suelo mediante la producción de señales que son reconocidas por los microorganismos, los cuales a su vez producen signos que inician la colonización, este fenómeno es conocido como quorum sensing (Bais *et al.*, 2004). Existe evidencia que el quorum sensing ocurre en el suelo (Pierson *et al.*, 1994) debido a que la

asociación planta-bacteria debe competir con una diversa comunidad de microorganismos para colonizar y persistir. La expresión de los rasgos necesarios para la sobrevivencia es comúnmente influenciada por la capacidad de los microorganismos a sensibilizarse y responder ante aquellos con los que compiten. De esta manera, las moléculas de señalización de las bacterias pueden modular la actividad de otra población dentro de la comunidad microbiana de la rizósfera del maíz como lo señala Pierson *et al.* (1998).

Asimismo, estas interacciones pueden influenciar positivamente el crecimiento de la planta a través de una variedad de mecanismos, incluyendo la fijación de nitrógeno atmosférico. Las bacterias pueden también interactuar positivamente con las plantas por la producción de biopelículas protectoras (Bais *et al.*, 2006).

Sin embargo, existe poca evidencia de biofilms (multicapas de consorcios de bacterias) en el suelo en suelos arables o pastizales (Nunan *et al.*, 2003). Es posible que la competición interespecies, la limitación de los nutrimentos o ambos, enmascaren el desarrollo de grandes colonias de células morfológicamente similares.

Es bien conocido que numerosas bacterias Gram negativas y positivas exudan sustancias poliméricas extracelulares (EPS) dentro de su ambiente. La formación de estas condiciones modera la química de la superficies de los sustratos subyacentes y puede ser visto como un mecanismo de adaptación que permite a los microorganismos colonizar superficies minerales altamente variables (Kögel-Knabner, 2008).

Aunque no se tienen evidencias contundentes acerca de que estos mecanismos complejos puedan suceder en los resultados obtenidos en este estudio, nosotros postulamos que la asociación de las bacterias en la rizósfera de alfalfa, puede estar modulada por estos mecanismos. Sin duda, representan un tema de investigación que podría auxiliar más en el entendimiento de la dinámica sobre esta interacción.

Ahora bien, una buena parte de los agregados del suelo (los cuales se encuentran mezclados de manera importante con materia orgánica con diferentes grados de descomposición) se encuentran colonizados, lo que puede deberse a que estos ofrecen protección y nutrimentos para las bacterias. Foster (1988) y Kilbertus (1980) mediante microfotografías electrónicas mostraron que las bacterias fueron más abundantes dentro de agregados que en grandes poros.

Al respecto, Nunan *et al.* (2003) sugieren que las condiciones ambientales en el espacio poroso pueden ser menos favorables para el desarrollo y persistencia de comunidades microbianas debido a: 1) ciclos más extremos de humedecimiento y secado, 2) lixiviación de nutrimentos necesarios para el crecimiento y 3) reducción de la protección contra los depredadores.

Postma y Altemüller (1990) afirman que no es recomendable utilizar CFW para observar actividad en la rizósfera, debido a que puede presentar confusión entre los componentes orgánicos y las bacterias. Sin embargo, en esta investigación las firmas espectrales se encuentran separadas entre las que pertenecen a materia orgánica, raíz y las comunidades bacterianas. No obstante, es altamente recomendable que en sitios con un mayor contenido de materia orgánica se utilice un fluorocromo más selectivo que nos permita diferenciar más claramente a las bacterias y evitar con ello confusión con materia orgánica.

Por otro lado, si bien la tinción de bacterias *in situ* con fluorocromo ha mostrado buenos resultados, esta técnica se ha llevado a cabo en secciones delgadas relativamente simples, donde la fracción arenosa es la dominante (70%), la materia orgánica y la actividad biológica, no son tan altas como en esta investigación. Además de que en algunos casos se utilizan sustratos por lo que se encuentran algunas variables controladas.

A pesar de las ventajas que esta metodología presenta, también existen algunos aspectos que es necesario considerar: no hay distinción entre células activas y no activas, por lo que la

significancia ambiental de una distribución es difícil de determinar y no pueden ser atribuidas funciones específicas a las bacterias. Por otro lado, las mediciones son hechas en dos dimensiones, cuando el suelo es un medio tridimensional.

Además, es un problema la carencia de una metodología que permita diferenciar las especies que se encuentran en el suelo de manera *in situ*. Hasta el momento existen técnicas que distinguen sólo un grupo específico de bacterias (FISH-flourescence *in situ* hibridization) (Eickhorst y Tippkötter, 2008); sin embargo, esta técnica es costosa y representa un paso siguiente en la caracterización del micronicho cuando se requiere estudiar especies de manera particular.

Se sabe actualmente que un entendimiento del funcionamiento del ecosistema requiere una integración de factores bióticos o abióticos. Aunque muchos trabajos se han concentrado en desarrollar técnicas que son capaces de medir la diversidad de la biología del suelo, pocos trabajos se han llevado a cabo para conectarlos con el hábitat y su función. Esto a pesar del hecho de que la estructura física del suelo comúnmente tiene un mayor impacto en la diversidad de microambientes biofísicos para los microorganismos del suelo (Young y Crawford, 2004).

5.5 Conclusiones

El tamaño de las poblaciones de bacterias reportadas mediante microcartografía supera el valor reportado en cuenta viable cuando se contabilizaron bacterias aerobias. Por lo que, es necesaria la cuantificación de bacterias aerobias y anaerobias de acuerdo al tipo de condiciones que se presenten en cada una de las zonas. Asimismo, es importante el uso de métodos más precisos de conteo *in situ* y de visualización directa. Esto representaría de manera adecuada, el conteo de microorganismos.

Las bacterias en maíz se asociaron mayormente con los minerales, posiblemente como un mecanismo de protección ante condiciones ambientales negativas, en el caso de las tierras negras, el principal factor negativo es la anaerobiosis (se explica detalladamente en el capítulo anterior). Mientras que en el caso de la alfalfa, las comunidades de bacterias parecen asociarse más a la raíz de este cultivo y a la materia orgánica presente en los agregados. Lo anterior puede explicar porque las leguminosas aportan N al suelo vía fijación simbiótica, a diferencia de las gramíneas que extraen este nutrimento. Es por ello que la rizósfera de las leguminosas suele permitir mayor desarrollo de microorganismos.

Los enfoques actuales que utilizan técnicas de biología molecular permiten aislar y determinar especies de microorganismos asociados a la rizósfera, pero no permiten la visualización directa, la relación con los microcomponentes del suelo de manera *in situ*, así como la cuantificación de bacterias en condiciones más reales.

A pesar de que se logró la tinción de comunidades bacterianas, se presentó cierta confusión con la materia orgánica. Por ello es muy recomendable probar otro tipo de fluorocromos que tiñan de manera más específica las estructuras de las bacterias. Además, un aspecto adverso, es la falta de mecanismos que realice la captura de imágenes de manera automática. En esta investigación, esta tarea se realizó de manera manual, por lo que el éxito de la creación de los mosaicos, dependió de la precisión a la cual se capturaron las imágenes. Una limitación adicional es la capacidad del hardware y software para cuales se ven aún limitados debido a la alta resolución de las imágenes.

No obstante a pesar de las limitaciones que se fueron presentando en el desarrollo de la investigación, fue posible realizar los mosaicos e identificar las colonias de bacterias a la escala que fue establecida.

La nueva metodología propuesta en esta investigación, así como el enfoque holístico, en el sentido de considerar las propiedades edáficas, permitirá una mejor comprensión de la interacción de los microorganismos del suelo con su entorno adyacente.

5. 5 Referencias

- Altemüller, H.J., van Vliet-Lanoe, B., 1990. Soil thin section fluorescence microscopy. In Douglas L.A. (ed). Soil micromorfology: a basic and applied science. Elsevier, Amsterdam. pp 565- 579.
- Bais, H.P., Park, S.W., Weir, T.L., Callaway, R.M., Vivanco, J.M., 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Science* 9, 26-36
- Bais, H.P.; Weir, T.L.; Perry, G.L.; Gilroy, S., Vivanco J.M., 2006. The role of root exudates in rizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 233-66.
- Eickhorst, T., Tippkötter, R., 2008. Detection of microorganism in undisturbed soil by combining fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and micropedological methods. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1284-1293.
- Estrada, I.B., Aller, A., Aller, F., Gómez, X., Morán, A., 2004. The survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. *Biosource Technology* 93, 191-198.
- Franklin, R.B., Mills, L., 2003. Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 335-346.
- Franklin, R.B. and Mills, A.L. 2007. The importance of microbial distribution in space and spatial scale to microbial ecology. In: *The Spatial Distribution of Microbes in the Environment*. Franklin, R.B. and Mills, A.L. (Eds.). Springer. Netherlands. p.p. 333.
- Gadd, G., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609-643.
- Grundmann, L.G. y Gourbière, F. 1999. A micro-sampling approach to improve the inventory of bacterial diversity in soil. *Applied Soil Ecology*. **13**:123-126.
- Grundmann, G. L., Deschesne, F.; Bartoli; Flandrois, J.P.; Chasse, J.L. y Kizungu, R. 2001. Spatial modeling of nitrifier microhabitats in soil. *Soil Sci. Soc. Am.* 65: 1709-1716.
- Grundmann, G.L. 2004. Spatial scales of soil bacterial diversity-the size of clone. *FEMS Microbiology Ecology* **48**:119-127.
- Hisset, R. y Gray, T.R.G. 1904. Microsites and time changes in soil microbe ecology. In: *The Role of Terrestrial and Aquatic Organism in Decomposition Process* (Anderson, J.M. and Macfadyen, A., Eds.). pp. 23-39. Blackwell, Oxford.
- Kabir, M., Chotte, J.L., Rahman, M., Bally, R. Jocteur Monrozier, L. 1994. Distribution of soil fractions and location of soil bacteria in a vertisol under cultivation and perennial raygrass. *Plant Soil* 163, 243-255.
- Kögel-Knabner, I., Guggenber, G., Kleber, M., Kandeler, E., Kalbitz, K., Scheu, S., Eusterhues, K., Leinweber, P., 2008. Organo-mineral associations in temperate soils: Integrating biology, mineralogy, and organic matter chemistry. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 61-82.

- Li, Y., Dick, W.A., Tuovinen, O.H., 2003. Evaluation of fluorochromes for imaging bacteria in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 737-744.
- Li, Y., Dick, W.A., Touvinen, O.H., 2004. Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganism-a review. *Biological Fertility Soils* 39, 301-311.
- Martin, J., Focht, D., 1977. Biological Properties of Soils. Eds. Elliott, L.F., Stevenson, F.J., Frink, C.R., Hill, R.R., Hortenstine, C.C., Kilmer, V.J., Monke, E.J., Viets Jr., F.G., In *Soils for Management of Organic Wastes and Waste Waters*. Soil Science Society of America. Madison. Wisconsin, USA. pp. 113-169.
- Nunan, N., Ritz, K., Crabb, D., Harris, K., Wu, K., Crawford, J.W., Young, I., 2001. Quantification of the in situ distribución of soil bacteria by large-scale imaging of thin sections of undisturbed soil. *Fems Microbiology Ecology*. 36:67-77.
- Nunan, N., Wu, K., Young, I., Crawford, J., Ritz, K., 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 203-215.
- Nunan, N., Wu, K., Young, I.M., Crawford, J.W., Ritz, K., 2002. *In situ* spatial patterns of soil bacterial populations, mapped at multiple scales, in an arable soil. *Microbial Ecology* 44, 296-305.
- Pierson L.S., III, Keppenne, V.D., Wood, D. W., 1994. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *Journal Bacteriology* 176, 3966-3974.
- Pierson, E.A., Wood, D. W., Cannon, J. A., Blachere, F. M., Pierson, S.L.III., 1998. Interpopulation Signaling via N-Acyl-Homoserine Lactones among Bacteria in the Wheat Rhizosphere. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 1078-1084.
- Postma, J., Altemüller. H.J., 1990. Bacteria in thin soil sections stained with the fluorescent brightener calcofluor White M2R. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 89-96.
- Reséndiz-Paz, M.L., Gutiérrez-Castorena, M.C., Gutiérrez-Castorena, E. V., Ortiz-Solorio, C.A., Cajuste-Bontemps, L., Sánchez-Guzmán, P., 2013. Local Knowledge and Management of Anthrosols in the Valley of Mexico. *Geoderma* 193-194, 41-51.
- Stoops, G. 2003. Interpretation of Micromorphological Features of Soils and Regoliths. Soil Society of America, Inc. USA. 184p.
- Tippkötter, R., Ritz, K., 1996. Evaluation of polyester, epoxy and acrylic resins for suitability in preparation of soil thin sections for in situ biological studies. *Geoderma* 69, 31-57.
- Young, I.M., Crawford, J.W., 2004. Interactions and Self-Organization in the Soil-Microbe Complex. *Science* 304, 1634-1637.

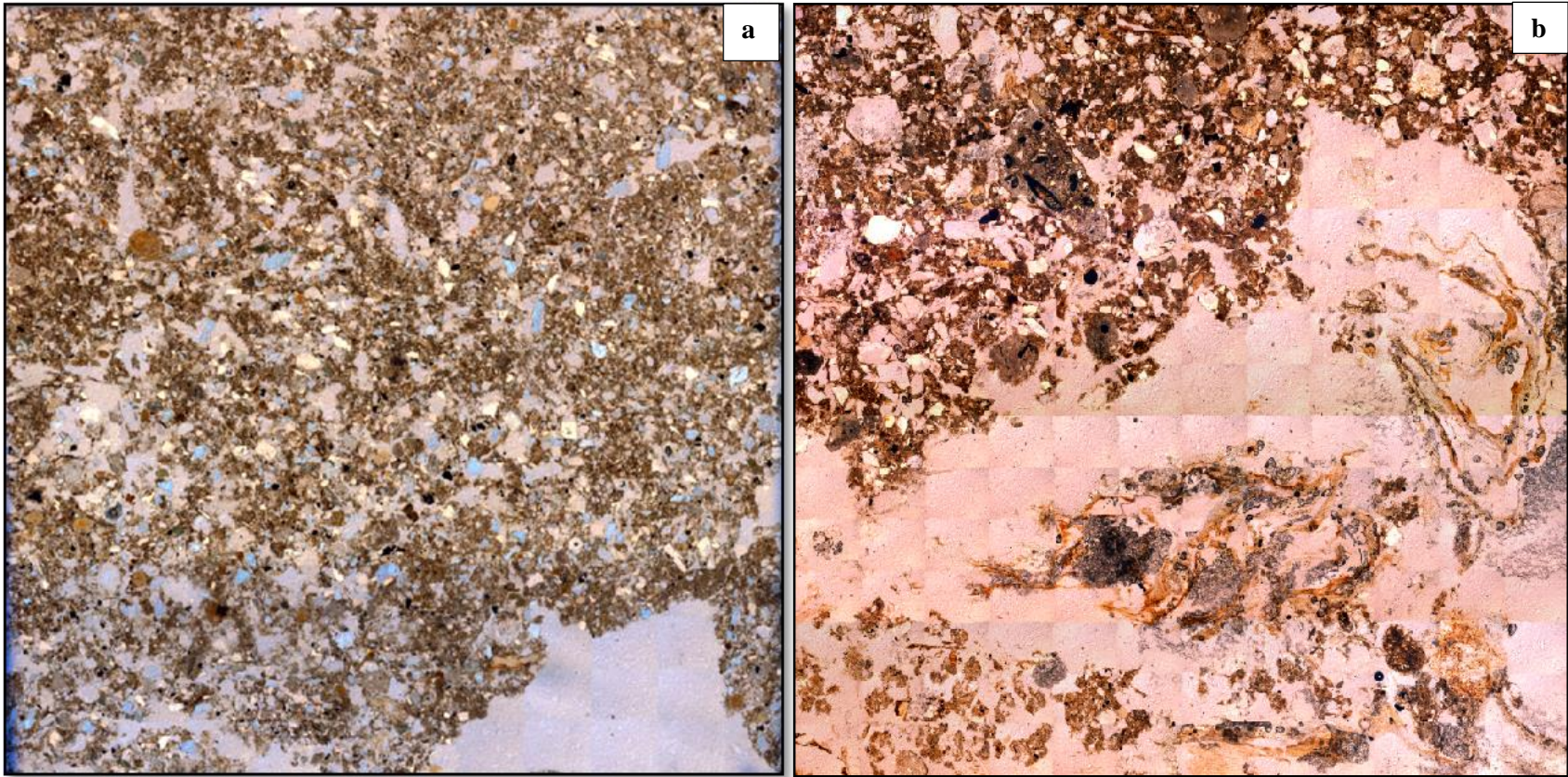


Figura 5.2. Mosaicos digitales de 1cm² compuestos de 216 imágenes. En a) maíz tierra negra y b) alfalfa tierra lama.

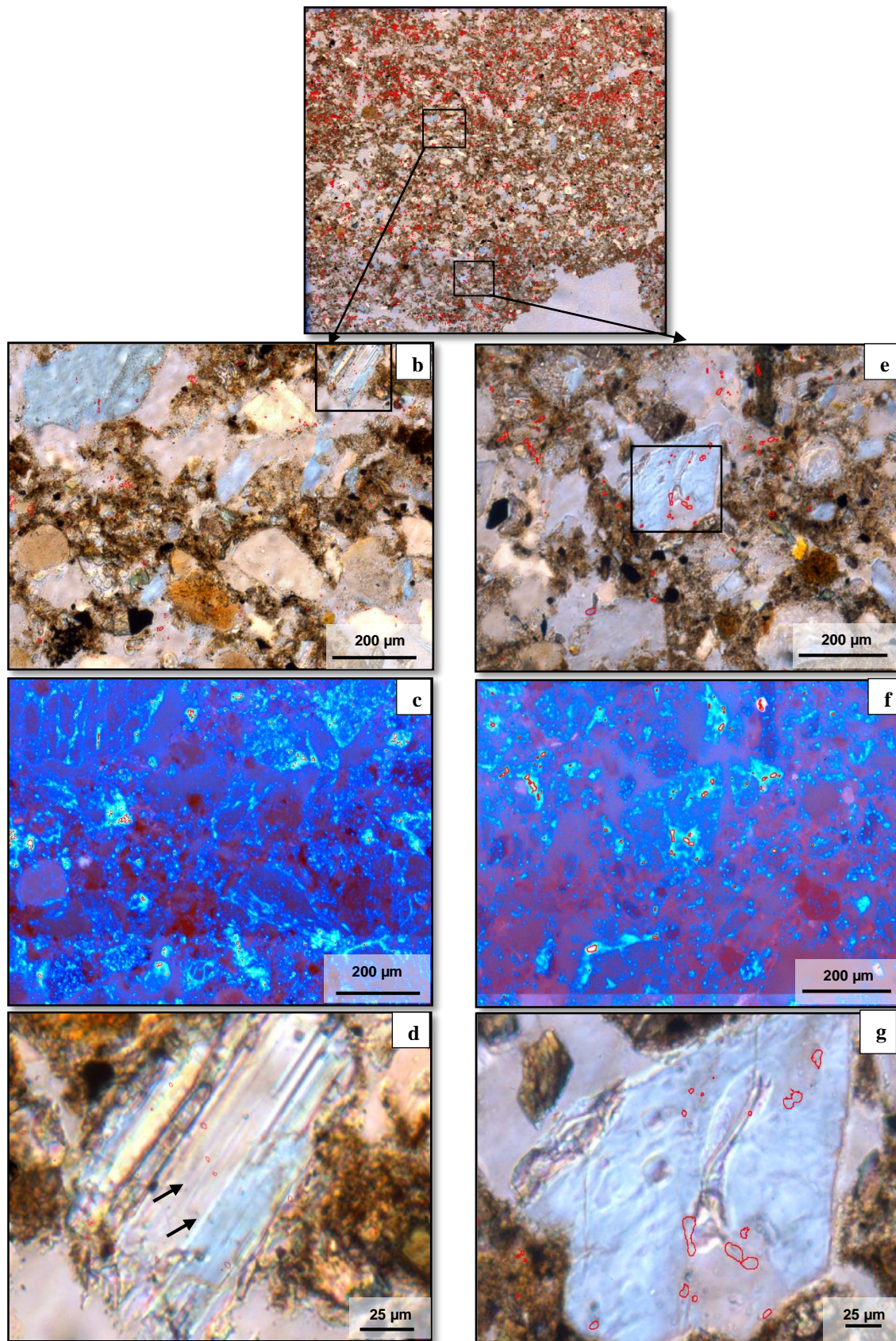


Figura 5.3. Comunidades microbianas (líneas rojas y flechas negras) en minerales. Maíz-tierras negras. Los recuadros en b y e representan una zona que se amplía en d y en g. c y d son campos con luz incidente UV (fluorescencia).

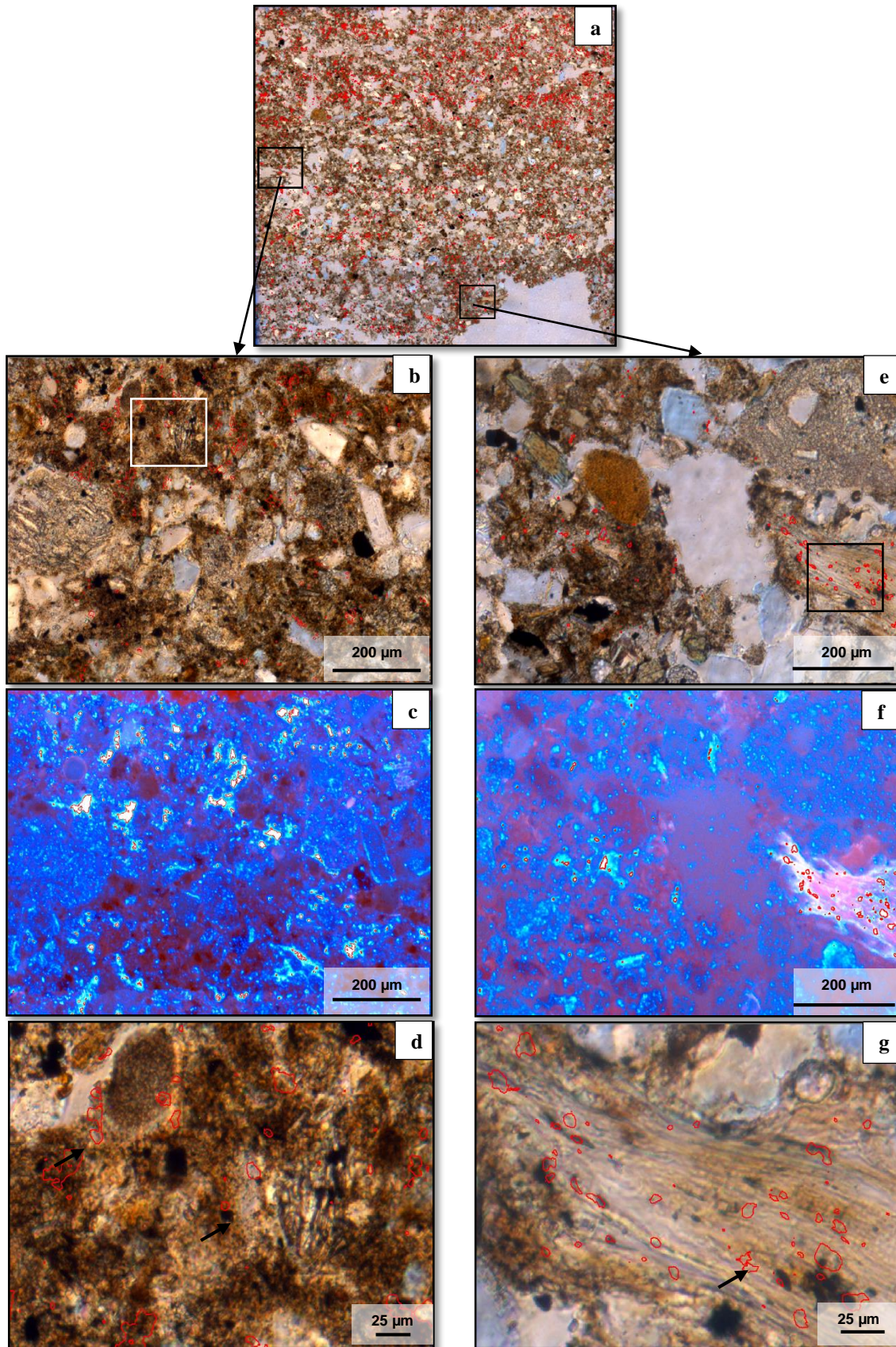


Figura 5.4. Maíz-tierras negras. Comunidades microbianas (líneas rojas y flechas negras) en materia orgánica dentro de los agregados (b,c,d). En e, f y g se muestran las comunidades en fracciones de tejido con moderado proceso de descomposición.

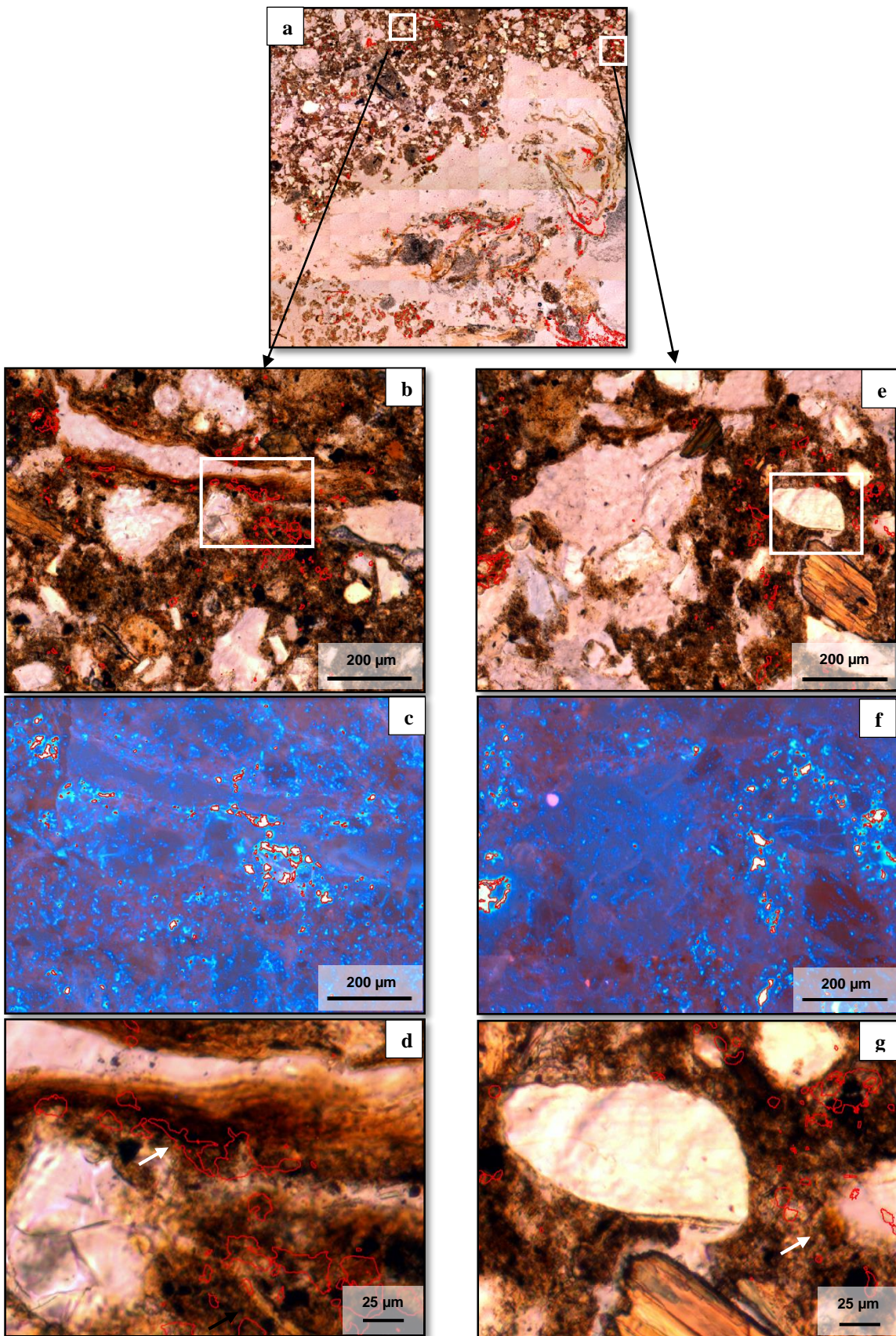


Figura 5.5. Alfalfa-tierras lamas. Colonias bacterianas (líneas rojas y flechas) en materia orgánica con grado de descomposición avanzada, la cual forma parte de la estructura basal del suelo. Los recuadros representan zonas amplificadas en d y f.

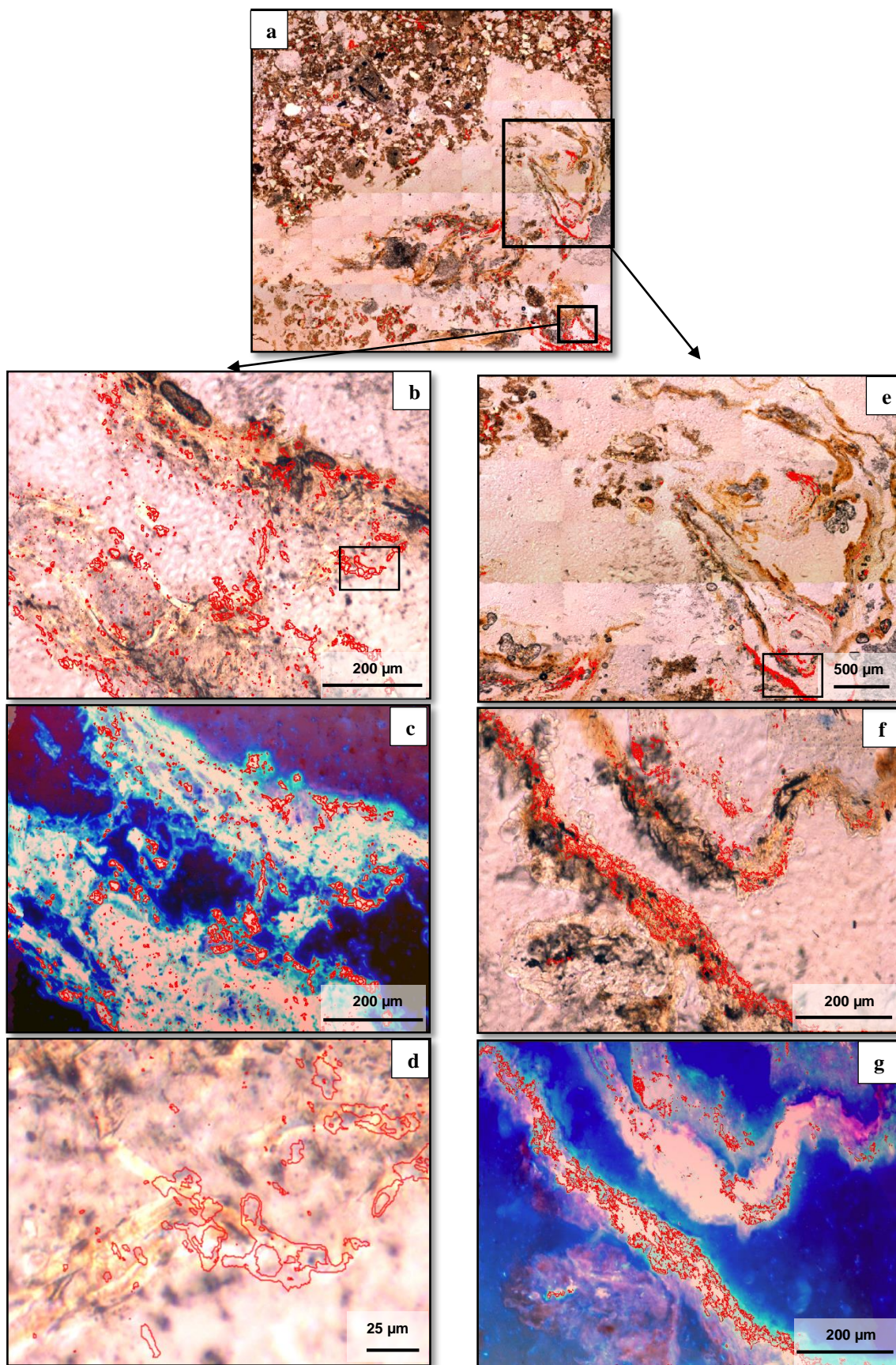


Figura 5.6. Colonias bacterianas (en rojo) que se relacionan con raíz en alfalfa en lamas. Los recuadros representan zonas amplificadas.

Conclusiones finales

Dadas las condiciones que se presentan en la zona, como son alta cantidad de materia orgánica, de fosfatos, el tamaño fino de partícula y la presencia de materiales amorfos, la concentración de metales pesados es baja en los suelos de Teoloyucan (a excepción del Cd). Lo cual no impacta de manera negativa el desarrollo de los microorganismos (sólo el Cd). En tanto, lo que si se demostró es que las propiedades de los suelos pueden tener mayores efectos.

La mayoría de la literatura establece que los suelos están contaminados, por efecto de la actividad antrópica, cuando en muchas ocasiones no se rebasan los límites permisibles. Es evidente, la alta capacidad de balance ecológico de los suelos, para contrarrestar la entrada de contaminantes al suelo vía aguas residuales. Sin embargo, es necesario regular esta práctica, porque aun así los peligros a la salud y al medio ambiente están latentes.

Por otra parte, se demostró que es posible relacionar alguna propiedad del suelo con el tamaño de poblaciones de alguna clase de microorganismos y saber si esta propiedad, afecta o beneficia el tamaño de la población. No obstante, resulta importante conocer la diversidad de los suelos. Posiblemente, además del tamaño de las poblaciones de microorganismos, también se pueda ver modificada la diversidad entre diferentes cultivos y tierras. Las propiedades de cada tipo de tierra crean micronichos específicos para cada uno de éstos.

La caracterización de microorganismos patógenos también puede ser un aspecto importante a evaluar ya que en el sitio no se ha evaluado el riesgo por contaminación biológica a pesar de la irrigación con aguas residuales por largos periodos de tiempo; asimismo, una importante contribución sería averiguar cuál es la capacidad de sobrevivencia de los microorganismos patógenos en suelos donde las poblaciones autóctonas se han establecido con anterioridad.

Asimismo, la presencia de microorganismos solubilizadores de fosfatos en sitios donde los fosfatos se encuentran en altas concentraciones, indica complejidad entre la dinámica de éstos en esta clase especial de ambiente. Estudios exhaustivos en este campo nos ayudarían a comprender más como son los mecanismos de liberación de fosfatos al ambiente y como puede ser mejorada la fertilidad en los suelos.

Por otra parte, el diseño de la metodología que se planteó en este trabajo, representa un parteaguas en la investigación de la interacción con los microorganismos y la matriz del suelo. En donde, la mayoría de las investigaciones van dirigidas a la cuantificación de microorganismos totales o al análisis espacial de los microorganismos en el orden de evaluar unos cuantos mm².

En la metodología que se plantea se propone el uso de mosaicos más grandes y de alta resolución, en donde es posible la identificación de bacterias a través de microscopia de fluorescencia, técnicas cartográficas y secciones delgadas de suelo. A través de esta técnica fue posible identificar la asociación de bacterias a algún componente del suelo. En el caso de las tierras negras con relación al cultivo de maíz, se encontró una fuerte asociación con minerales más que con materia orgánica. Para el caso de las tierras negras con respecto al cultivo de alfalfa, sucedió lo contrario, las comunidades se asociaron más a la raíz y materia orgánica.

Un paso siguiente en el enfoque de esta técnica es la evaluación de la relación cuantitativa de las comunidades bacterianas en los componentes del suelo; es decir, la determinación de porcentajes de comunidades que se encuentren ligadas a cierto material (materia orgánica, minerales, raíz, espacio poroso, etc.).

El suelo como ambiente inmediato a las bacterias, sienta las condiciones en las cuales estos se desarrollan, por lo que el conjunto de los parámetros edáficos tendrá un efecto directo

sobre el funcionamiento de las poblaciones bacterianas. El estudio de los factores edáficos y su relación con el suelo permitirá plantear factores clave dentro de la interacción microorganismo-planta-suelo.

Descubrir los factores que presentan alta relación con las comunidades microbianas, permitirá en un futuro sentar bases para el uso, conservación y manejo de los suelos agrícolas. A su vez, el entendimiento de la dinámica de los microorganismos y el suelo, conducirá al incremento de la productividad y el uso más eficiente de los recursos.