



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y ACTIVIDAD
DE LA MICROBIOTA DESNITRIFICANTE EN
SUELOS DE CHINAMPAS DE XOCHIMILCO
CONTAMINADOS CON PLAGUICIDAS
ORGANOFOSFORADOS METIL PARATION

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ANIDIA BLANCO JARVIO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Nathalie Cabirol

COMITÉ TUTOR: Dr. Francisco José Fernández Perrino
Dr. Luc Dendooven

MÉXICO, D.F. diciembre de 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 03 de octubre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **BLANCO JARVIO ANIDIA** con número de cuenta **95205045** con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y ACTIVIDAD DE LA MICROBIOTA DESNITRIFICANTE EN SUELOS DE CHINAMPAS DE XOCHIMILCO CONTAMINADOS CON PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS METIL PARATION."**, realizada bajo la dirección de la **DRA. NATHALIE CABIROL**:

Presidente: DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN
Vocal: DR. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA
Secretario: DR. LUC DENDOOVEN
Suplente: DRA. MARÍA SOLEDAD VÁSQUEZ MURRIETA
Suplente: DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de Noviembre de 2011.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente de la interesada.

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado dentro de su programa de estudios, así como el financiamiento que el posgrado me brindó para asistir a diversas reuniones académicas como fueron el 19th Worl Congress of Soil Science, Soil solutions for a changing Word efectuado en Brisbane, Australia en el 2010 y al 5th International Symposium of Interaction of soil minerals with organic components an microorganisms en Pucón, Chile en el 2008.

Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

Gracias a los miembros de mi Comité Tutorial quienes estuvieron conmigo en las buenas, pero sobre todo gracias por estar en las malas durante este proceso de aprendizaje de vida y académico, su apoyo y motivación fueron fundamentales para la culminación de esta tesis:

Dra. Nathalie Cabirol (Tutor principal)

Dr. Francisco José Fernández Perrino (Miembro del Comité Tutorial)

Dr. Luc Dendooven (Miembro del Comité Tutorial)

Agradezco a los miembros de mi jurado por sus comentarios que me han acompañado a lo largo de este proyecto:

Dra. María Soledad Vásquez Murrieta

Dr. Juan Núñez Farfán

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

A los técnicos de las diferentes instituciones donde estuve, su ayuda no sólo laboral sino personal fue lo que me impulsó para que esta tesis se concluyera, a ustedes muchas gracias:

Quim. Emilia Soledad Lucario (Inst. de Ingeniería)

Ing. Roberto Sotero Briones Méndez (Inst. de Ingeniería)

M. en I. Ernestina María Guadalupe Urquiza Moreno (Inst. de Ingeniería)

M en C. Rigoberto Vicencio Pérez Ruíz (Inst. de Ecología)

Dr. Marco Luna Guido (CINVESTAV)

A Hiram, gracias por ser mi fundamento y sustento, por la confianza que has depositado siempre en mí, porque ante cualquier circunstancia siempre sabes cómo motivarme, porque una mirada o una palabra tuya me alientan a seguir. Hiram gracias por ser el motor de mi vida, mi apoyo y mi refugio. Simplemente gracias por ser tú y estar conmigo.

A la familia Blanco-Jarvio, a mis padres les agradezco por haber construido una familia tan integrada y amorosa a la cual me da orgullo pertenecer. A Porfirio, gracias papá por ser mi máximo ejemplo de trabajo duro, confianza, honestidad y tenacidad ante cualquier circunstancia, te admiraré siempre por tu capacidad de poner siempre buena cara al mal tiempo. A Arcelia, la mayor y mejor muestra de paciencia, sencillez y ternura, gracias mamá porque desde siempre has sido y serás mi mayor confidente. A mis queridos hermanos, Indira y Aldo, gracias por todos los buenos tiempos y también por cerrar filas cuando es necesario, simplemente gracias por estar ahí siempre y en todo momento.

A la Dra. Cabirol por dirigir esta tesis y haber aceptado que participara en tu grupo de trabajo. Nathalie gracias por todo el tiempo, experiencia y conocimiento compartidos hasta el día de hoy, y por sobre todas las cosas gracias por la confianza que depositaste en mí para llevar a buen fin este proyecto.

Al Dr. Dendooven, porque te convertiste en uno de mis principales apoyos durante este proceso, nunca tendré las palabras suficientes para expresar todo lo que significó que me dedicaras siempre tu tiempo y que estuvieras al pendiente de mí, ya fuera para resolver dudas académicas o para desahogo personal. Por todo esto y más, muchas gracias.

Al Dr. Fernández Perrino quien ante las circunstancias siempre ha tenido palabras de apoyo y solidaridad. Paco muchas gracias por estar al pendiente de este

proyecto, por apoyarlo y por haberme brindado tu confianza y motivarme a continuar.

A la Dra. Rosario Iturbe Argüelles, la Dra. Rosa María Ramírez Zamora y al Mtro. Víctor Franco del Instituto de Ingeniería, a ustedes mi infinita gratitud, su apoyo en este proceso fue fundamental para que este trabajo saliera adelante, los llevaré siempre en mi corazón.

A la Dra. Elena Alvarez-Buylla quien me ha apoyado desde la licenciatura y a quien le debo en gran parte mucho de mi formación. Gracias Elena porque aún cuando ya no era tu alumna me aceptaste nuevamente y me diste un espacio para trabajar, jamás podré agradecerte lo suficiente.

Agradezco a la Dra. María de la Paz Sánchez J. quien me dio aún sin conocerme un lugar para trabajar.

A la Dra. Rocío Jetzabé Alcántara quien con su apoyo técnico, pero sobre todo con su amistad, me ha ayudado y apoyado desde el día que nos conocimos.

Al Dr. Juan Nuñez F. quien solo ha tenido palabras de aliento y motivación desde el día que lo conocí.

A Obdulia López Guerra, quien me brindó su confianza, apoyo y amistad llegando a convertirse en un importante apoyo durante todo el proceso de elaboración de este trabajo.

A Luz María Rodríguez Pérez quien me apoyó para poder presentar mis trabajos a nivel internacional, muchas gracias amiga.

A todo el personal del Posgrado en Ciencias Biológicas: Armando R., Lilia J, Lilia E, María de Jesús M., Patricia M. y Patricia O., gracias por su buena disposición a ayudar en todo momento.

Agradezco al Sr. Godoy Rufino J. L. por permitir utilizar el suelo de su chinampa para el presente estudio.

Gracias a los amigos con los que en algún momento compartí experiencias y buenos ratos durante mi estancia en el Instituto de Ingeniería: Arturo, Cecilia, Claudia, Dafne, Kathia, Paty, Sara, Ulises y Vladimir.

A las personas que me apoyaron durante mi estancia en el Instituto de Ecología, gracias por brindarme su amistad y haberme hecho sentir nuevamente parte de ustedes: Alma P., Berenice G., Rigo V., Eugenio A., Adriana G., Mary Paz S., Renato C. y Diana R.

Agradezco el apoyo recibido por la Dra. Luisa Falcón y su grupo de trabajo: Rocío, Carla, Patricia, Osiris y Antonio. Gracias por hacer que el llegar cada día a trabajar se convirtiera en una linda experiencia y de ahí naciera una hermosa amistad.

Agradezco a los integrantes de la familia Jarvio-González y anexos, en especial a mis queridos abuelitos: Basilisa y Serafín quienes tienen un corazón bondadoso y amoroso, también agradezco a Rosi, Joya, Mincho, Elo, Diego, Filo, Palomita, Pablo, Pina, Yady, Noel, Lalo y Raúl por todas las muestras de apoyo y cariño.

A la familia Blanco-Pinacho: Pedro y Josefina, gracias por el cariño siempre recibido.

A los miembros de la familia Blanco-Florido: Carlos, Estela, Carlitos y David, muchas gracias porque sé que independientemente de las circunstancias siempre estarán.

A la familia Rosales-Nanduca y anexos: Eunice, Eveir, Hugo, Carlos, Arwen, Cesar, Gina, Frida, Leo y Sarita, quienes siempre me han brindado su hospitalidad y cariño haciéndome sentir un integrante más.

A la familia Smith-Aguilar, cuyas integrantes se han convertido en una parte importante de mi vida, gracias María, Sandy y Anita por esas lindas veladas que han sido muchas veces un gran apoyo para desahogar todas las cuestiones de la vida.

A mis amigos Carlos, Marianita y Almita quienes independientemente de las distancias han estado al pendiente de mí y de este proyecto, a ustedes muchas gracias por estar siempre que se les necesita.

A los amigos que sé que al correr de los años seguirán ahí apoyando cuando se necesite y a quienes por miedo a olvidar algún nombre mencionaré con mucho cariño como: los vaguitos, los hermanitos ballena, los proca-cuates y mis vecinitas.

Gracias a la UNAM, por dejarme pertenecer a la más grande institución pública de educación superior del país, por lo que significó ser educada dentro de tu heterogénea forma de pensamiento permitiéndome formar mi propio criterio, a ti universidad

Como no te voy a querer...

3.3	Incubación anaeróbica.....	27
3.4	Análisis químicos.....	30
3.5	Análisis estadístico.....	30
3.6	Análisis moleculares.....	31
3.7	Análisis de datos moleculares	33
4.	RESULTADOS.....	34
4.1	Determinación físico-química del sitio de estudio	34
4.2	Concentración de NO ₂ ⁻ y NO ₃ ⁻	34
4.3	Emisión de N ₂ O y N ₂	35
4.4	Análisis de los patrones de bandeo de los DGGE's.....	42
4.5	Identificación de las bandas obtenidas por DGGE.....	53
5.	DISCUSIÓN.....	57
6.	CONCLUSIONES.....	61
7.	PERSPECTIVAS	62
8.	BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS.....	63
	ANEXO 1.....	72
	ANEXO 2.....	81

Índice de figuras

FIGURA 1. Mural de L. Covarrubias.....	1
FIGURA 2. Representación de los orígenes de las chinampas.	2
FIGURA 3. Ruta de desnitrificación	10
FIGURA 4. Factores determinantes en el proceso de desnitrificación	15
FIGURA 5. Muestreo compuesto	24
FIGURA 6. Microcosmos	26
FIGURA 7. Esquema del protocolo experimental	27
FIGURA 8. Esquema del muestreo por día.....	29
FIGURA 9. Gráfica de NO_3^-	36
FIGURA 10. Gráfica de NO_2^-	37
FIGURA 11. Gráfica de N_2O	38
FIGURA 12. Gráfica de N_2	39
FIGURA 13. Extracciones de DNA en gel de agarosa al 1%.....	42
FIGURA 14. PCR de <i>nosZ</i> y 16S.	42
FIGURA 15. DGGE para el gen <i>nosZ</i> en muestras sin plaguicida.....	43
FIGURA 16. DGGE para el gen <i>nosZ</i> en muestras con plaguicida.....	44
FIGURA 17. DGGE para el gen 16S rDNA en muestras sin plaguicida	45
FIGURA 18. DGGE para el gen 16S rDNA en muestras con plaguicida	46
FIGURA 19. Muestras utilizadas como referencia en los DGGE del gen <i>nosZ</i> y el 16S rDNA	47
FIGURA 20. Relación de bandas de los DGGE del gen <i>nosZ</i> en muestras sin metil parati6n (a) y con metil parati6n (b).....	48
FIGURA 21. Relaci6n de bandas de los DGGE del gen <i>nosZ</i> en muestras con y sin metil parati6n	49
FIGURA 22. Relaci6n de bandas en funci6n del tiempo de los DGGE del gen <i>nosZ</i> en muestras sin metil parati6n (a) y con metil parati6n (b).....	51
FIGURA 23. Relaci6n de bandas de los DGGE del 16S rDNA en muestras sin metil parati6n	52
FIGURA 24. Dendrograma de fragmentos del gen <i>nosZ</i>	54
FIGURA 25. Dendrograma de fragmentos del 16S.....	56

Índice de tablas

Tabla 1. Archeobacterias desnitrificantes	12
Tabla 2. Bacterias desnitrificantes ^a	13
Tabla 3. Métodos utilizados en la caracterización fisicoquímica del suelo.....	25
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes <i>nosZ</i> y 16S rDNA.....	31
Tabla 5. Programas utilizados para amplificar al gen <i>nosZ</i> y 16S rDNA.....	32
Tabla 6. Caracterización del sitio de estudio en chinampas de Xochimilco	34
Tabla 7. Efecto del tiempo de acondicionamiento aeróbico.....	40
Tabla 8. Efecto del metil paratión sobre las medias de las concentraciones de NO ₂ ⁻ y NO ₃ ⁻ y los rangos de producción de N ₂ O y N ₂	41
Tabla 9. Relación de las coincidencias más cercanas para los filotipos de las secuencias parciales de 16S rDNA.	55

Resumen

Las **chinampas** se han utilizado para la agricultura en el valle de México desde la época prehispánica. Actualmente se utilizan grandes cantidades de pesticidas para controlar las plagas, entre ellos el metil paratión, del cual se utilizan aproximadamente 0.5 kg ha^{-1} por ciclo de cultivo. Los efectos de este químico en los procesos del suelo son, sin embargo, desconocidos. La desnitrificación es un proceso respiratorio, en el cual los compuestos del nitrógeno se oxidan y son usados aceptores alternativos de nitrógeno para la producción de energía bajo condiciones de anaerobiosis. Consiste en la reducción del nitrato (NO_3^-) a dinitrógeno (N_2) mediante la liberación de gases de óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O), los cuales son productos intermediarios que tienen un enorme impacto sobre la contaminación atmosférica. El primer paso de reducción de NO_3^- a nitrito (NO_2^-) es catalizado por la nitrato reductasa, el de NO_2^- a NO por la nitrito reductasa, el NO pasa a N_2O mediante la óxido nítrico reductasa y finalmente el N_2O pasa a N_2 por la acción de la óxido nitroso reductasa.

Para entender cómo el metil paratión afecta al proceso de desnitrificación en las chinampas se prepararon microcosmos de suelo con y sin metil paratión (se adicionó la cantidad utilizada en campo), a los cuales se les añadió NO_3^- para iniciar la ruta de desnitrificación. Posteriormente se definieron diferentes tratamientos: el control (al cual sólo se le añadió agua), con cloranfenicol (para inhibir la síntesis *de novo* de las enzimas), con acetileno (para inhibir la reducción del N_2O a N_2) y con cloranfenicol + acetileno. Para cada uno de estos tratamientos se hicieron extracciones de ADN que posteriormente se amplificaron con oligonucleótidos específicos para el 16S rADN y el gen *nosZ*.

Los resultados mostraron que el suelo adicionado con metil paratión presentó un aumento significativo en la concentración de NO_2^- , la eliminación de NO_3^- y las emisiones de N_2O y N_2 . Los análisis de los genes 16S rDNA y *nosZ* mostraron que los filotipos que pertenecen al grupo de las γ -Proteobacteria son constantes y predominantes en todos los tiempos y tratamientos y, por lo tanto, deben ser los responsables directos de las dinámicas del N observadas en el presente estudio.

En cuanto a la cinética anaeróbica de desnitrificación, se observó que la concentración de NO_2^- fue mayor cuando el suelo tenía menos de 7 días de

incubación aeróbica; sin embargo, no se observó efecto en la eliminación del NO_3^- . En suelos con metil paratión, el acetileno y cloranfenicol no tuvieron efecto significativo en la eliminación de NO_3^- y en la concentración de NO_2^- ; no obstante, en suelos sin plaguicida sí se incrementó la concentración de NO_2^- con acetileno + cloranfenicol, en comparación con los otros tratamientos. El acetileno aumentó las emisiones de N_2O independientemente de la aplicación de metil paratión y/o cloranfenicol.

Los resultados del análisis de diversidad del 16S rDNA no mostraron diferencias significativas entre las comunidades bacterianas en suelos con y sin metil paratión. Sin embargo, el análisis con el gen funcional *nosZ* sí reveló variaciones en la estructura bacteriana.

Abstract

The **Chinampas** are raised garden beds used for agriculture in the southeastern part of the valley of Mexico since pre-Hispanic times. In modern times, large amounts of pesticides such as methylparathion, have been used with an unknown effect on soil processes, such as denitrification. Denitrification is a respiratory anaerobic process where nitrogen compounds are oxidized into alternative energy through the use of alternative nitrogen acceptors. This process consists in the reduction of nitrate (NO_3^-) to dinitrogen (N_2) by releasing nitric oxide gas (NO) and nitrous oxide (N_2O), which are intermediate products that have a huge impact on air pollution. The first step in reducing NO_3^- to nitrite (NO_2^-) is catalyzed by a nitrate reductase, NO_2^- is converted into NO by a nitrite reductase, NO is modified into nitric oxide through the action of a N_2O reductase and finally N_2O is converted into N_2 by a nitrous oxide reductase.

To understand how the methylparathion affects the process of denitrification in the soil microcosmos of a chinampa several treatments with and without methyl parathion (at field concentrations) were assayed, using NO_3^- to start the denitrification pathway. The treatments investigated were: negative control (where only water was added), added chloramphenicol (to inhibit *de novo* synthesis of enzymes), added acetylene (to inhibit N_2O reduction to N_2) and an added chloramphenicol + acetylene mixture. DNA was extracted from each of these treatments and the 16S rDNA and *nosZ* (codifying the nitrous oxide reductase enzyme) genes were amplified. These amplifications were run in a denaturing gradient electrophoresis and then sequenced.

These experiments revealed that the soil with methyl parathion showed a significant increase in the concentration of NO_2^- , while NO_3^- , N_2O and N_2 emissions decreased. Also, the analysis of the 16S rDNA and *nosZ* genes showed that the γ -Proteobacteria phylotypes were constant and predominant across all times and treatments investigated, suggesting that this bacterial group is directly responsible for the N dynamics observed in this study.

Regard to the kinetics of the anaerobic denitrification process, the observed NO_2^- concentration was greater when the soil analyzed had less than 7 days of aerobic incubation, while there was no effect on the elimination of NO_3^- . In soils with

methyl parathion, the acetylene and chloramphenicol treatments had no significant effect on the removal of NO_3^- and NO_2^- concentration, however, in soils without this pesticide the concentration of NO_2^- did increase in the acetylene + chloramphenicol assay in comparison with other treatments. The use of Acetylene increased N_2O emissions regardless of the application of methyl parathion and / or chloramphenicol.

The results of the analysis of the 16S rDNA diversity showed no significant differences between bacterial communities in soils with and without methyl parathion. However, the functional gene analysis *nosZ* did reveal variations in bacterial structure.

MARCO TEÓRICO

1.1 La zona de Xochimilco

1.1.1 Historia de Xochimilco y sus chinampas

El origen geológico de la cuenca de Xochimilco es de formación local y regional, corresponde a las cuencas endorreicas del Terciario y Cuaternario en el Eje Neovolcánico Transmexicano (Ramos-Bello *et al.*, 2001). La actividad volcánica de este sitio, hace aproximadamente 700,000 años, obstruyó el drenaje de la cuenca de México y favoreció la formación de varios lagos (Fig. 1), de los cuales en la actualidad sólo quedan restos de lo que fuera el Lago de Xochimilco, el cual se localiza en la zona que aún conserva el nombre (Zlonik, 2003). La palabra Xochimilco tiene origen náhuatl y significa “terreno cultivado de flores”, viene del figurativo *xóchitl* que es flor, repetido sobre el simbólico *milli* que es campo cultivado (Séjourné, 1990).



FIGURA 1. Mural de L. Covarrubias

Recreación de la gran Tenochtitlan, antes de la llegada de los conquistadores españoles en 1519.

Los primeros habitantes alrededor del lago de Xochimilco formaban parte del grupo de los chichimecas, los cuales fueron pueblos cazadores y recolectores. Posteriormente llegó y se estableció una tribu nahuatlaca denominada “los xochimilcas” (Zlonik, 2003). Este grupo indígena tuvo con el tiempo un aumento en su crecimiento poblacional, lo que provocó una mayor demanda en su producción agrícola. Este hecho los enfrentó a una fuerte presión geográfica, ya que al encontrarse rodeados por una gran superficie cubierta por agua su terreno agrícola no era suficiente. Esta problemática causó que surgiera como estrategia un sistema que permitiera la extensión de suelo de producción agrícola dentro de un ambiente lacustre (Espinosa y Mazari-Hiriart, 2006). La situación antes descrita dio origen a lo que actualmente llamamos chinampas (Fig. 2). Este nombre viene del náhuatl *chinamitl* que significa seto o cerca de cañas.



FIGURA 2. Representación de los orígenes de las chinampas.

Las chinampas son parcelas que fueron constituidas por elementos disponibles en el ambiente, como lodo y plantas acuáticas. Para definir sus bordes se utilizaron cañas entretrajadas y ahuejotes (nombre científico *Salix bonpladiana*, miembro de la familia Salicaceae). Estos últimos son un tipo de sauce, cuyas raíces se afianzaron a la estructura primaria de las cañas, entrelazándose entre sí en el fondo de los

canales y formaron una “estructura” uniforme que impidió que los bordes se desmoronaran fácilmente (Stephan-Otto y Zlotnik, 2001).

El origen antropogénico causó que los suelos fueran profundos y discontinuos, algunos autores los han clasificado como antrosoles (INECOL, 2002). Sobre este tipo de suelo, los indígenas desarrollaron un sistema de agricultura que se ha mantenido hasta nuestros días. Este consiste básicamente en realizar los cultivos en sedimentos que los chinamperos toman del fondo de los canales, posteriormente se aplican sobre las chinampas y los cultivos se mantienen con riego constante (Stephan-Otto y Zlotnik, 2001).

Este tipo de sistema de cultivo se originó desde el siglo X y tuvo su auge en los siglos XIV y XV, contribuyendo al desarrollo de la gran Tenochtitlán en el valle de México (Rojas, 1995). Posterior a la conquista española (1519-1521), la zona chinampera se vio progresivamente reducida. Sin embargo, logró sobrevivir gracias a que los españoles apreciaron que era un sistema eficiente para satisfacer al mercado urbano existente, inclusive se convirtió en la principal fuente abastecedora de vegetales y flores de la capital del Virreinato. Otros factores que permitieron mantener el sistema chinampero fue que los españoles nunca lograron intervenir completamente en la zona de concentración al sur de la ciudad (Gibson, 1964; Cordero, 2007).

1.1.2 Las chinampas de Xochimilco y su situación actual

Actualmente, Xochimilco conforma una de las 16 delegaciones del Distrito Federal. El clima es templado, con variaciones de humedad. La precipitación es de 970 mm anuales, concentrada de junio a octubre, y la temperatura media anual es de 16°C, con extremos de 9°C y 33°C (Ramos-Bello *et al.*, 2001). Esta delegación tiene una superficie total de 12, 517 ha y el 80% (10,012 ha) es área ecológica compuesta por aproximadamente 189 km de extensión de canales acuáticos (Gaceta Oficial del Distrito Federal, 2005). La zona ecológica está ubicada al nor-poniente de la delegación Xochimilco y se caracteriza por la presencia de las chinampas, las cuales se han mantenido hasta nuestros días como un arreglo particular de islotes de cultivo rodeados por el canal de Xochimilco. El sistema chinampero ha permitido la conservación de especies endémicas: se han descrito 139 especies de vertebrados, 69 plantas vasculares, más de 200 especies de algas y 212 especies de aves acuáticas y terrestres (Espinosa, 2008).

Además de su importancia agrícola y ecológica, las chinampas son consideradas zona turística, debido a que tradicionalmente los canales han sido navegables y permiten la observación de la producción hidroagrícola (Gaceta Oficial del D. F., 2005). El 11 de diciembre de 1987, la UNESCO las declaró Patrimonio de la Humanidad y posteriormente, el 7 de mayo de 1992, se estableció como zona prioritaria de preservación y conservación del equilibrio ecológico, siendo declarada como Área Natural Protegida bajo la categoría de zona sujeta a conservación ecológica, la superficie que comprende esta declaratoria son los Ejidos de Xochimilco y de San Gregorio (Diario Oficial de la Federación, 1992). La zona chinampera está catalogada dentro de los 112 humedales del país (RAMSAR, 2002).

La producción agrícola en las chinampas ha variado a través de los siglos, sin embargo los cultivos nativos mesoamericanos que se han mantenido son: alegría, amaranto, chayote, chía, chiles, chilacayote, ejote, flor de muerto (o cempasúchil), frijol, hierbas de olor, maíz (aunque está casi extinto) y quelites. Existen otros cultivos, como las hortalizas y hierbas de olor, que fueron introducidos al sistema chinampero por los españoles durante la colonia. De estos, actualmente se producen: acelga, ajo, alcachofa, albahaca, apio, betabel, brócoli, cebolla, coliflor, cilantro, col, col de Bruselas, espinaca, hierbabuena, lechuga, manzanilla, nabo, pepino, perejil, poro, rábano, romero, ruda, verdolaga y zanahoria. Las chinampas siempre se han caracterizado por la presencia de una gran cantidad de flores y en la actualidad en estas se pueden encontrar especies nativas e introducidas como son: alhelí, alcatraz, aretillo, cempasúchil, crisantemo chícharo, dalia, espuela de caballero, imperial, nube, nardo, pensamiento, pincel, violeta, etc. (Rojas, 1982; Ramos-Bello *et al.*, 2001). Estos productos se comercializan principalmente en los mercados locales y en la Central de Abastos de la Ciudad de México. Sin embargo, algunas hortalizas se venden en Yucatán y Quintana Roo (SAGARPA-DF, 2003).

Las chinampas de Xochimilco tienen una gran importancia en diferentes ámbitos, pero presentan un gran deterioro ambiental (UNESCO, 2008) provocado por: 1) la introducción de especies exóticas (como el lirio), que han afectado la diversidad endémica, 2) la sobreexplotación de recursos faunísticos y florísticos, 3) el agua que abastece a las chinampas es alimentada por plantas de tratamiento de agua residual localizadas en el Cerro de la Estrella (Sandoval, 2003), 4) los asentamientos irregulares que carecen de sistema de drenaje han propiciado la descarga de aguas crudas directamente a los canales, 5) los tiraderos a cielo abierto localizados principalmente en cañadas y cauces de arroyos, depósitos clandestinos que

provocan la formación de lixiviados tóxicos que permanecen en el subsuelo y que, eventualmente, son arrastrados por las precipitaciones hasta las planicies de las chinampas (Gaceta Oficial del Distrito Federal, 2005). Estas problemáticas han repercutido de manera directa en el sistema chinampero y han provocado que el agua esté contaminada por metales pesados, formas químicas de nitrógeno (N) y fósforo (P), agentes biológicos como virus, bacterias patógenas y parásitos, rebasando los límites establecidos por las Normas Oficiales Mexicanas correspondientes (Espinosa y Mazari-Hiriart, 2006).

Las chinampas de Xochimilco tienen un alto contenido de materia orgánica (Ramos-Bello *et al.*, 2001; Blanco-Jarvio *et al.*, 2011), lo cual supondría que no es requerida la aplicación suplementaria de fertilizantes. Sin embargo, los productores han hecho uso de fertilizantes y plaguicidas en sus cultivos, con el objetivo de un mayor rendimiento en los mismos (Espinosa y Mazari-Hiriart, 2006).

1.2 Plaguicidas

1.2.1 Generalidades

Los plaguicidas son compuestos químicos desarrollados con el propósito de eliminar, controlar o detener el crecimiento de cualquier tipo de plaga. En la agricultura se utilizan herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas y roenticidas (Ongley, 1997). Los plaguicidas se utilizan ampliamente a nivel mundial. Se prevé que el uso de estos químicos aumente globalmente 2.7 veces durante los próximos 50 años, lo que equivaldrá a 10.1×10^6 toneladas métricas anuales (Kinney *et al.*, 2005).

La fumigación con plaguicidas en la agricultura es una práctica en la cual se usan varias combinaciones químicas para reducir la amenaza de los insectos, malas hierbas y enfermedades de plantas y, por lo tanto, mejorar en términos de producción las cosechas. Existen diversas familias químicas, entre ellas, están los organofosforados que son compuestos de baja persistencia en el ambiente, pero, presentan una toxicidad muy alta (Kanekar 2004; Sánchez *et al.*, 2004; CICOPLAFEST, 2008). En las chinampas de Xochimilco y otros lugares de México los más utilizados son: paratión, malatión, metil paratión, clorpirifos y diazinón, los cuales pertenecen a la familia de los organofosforados. Este tipo de plaguicidas tienen alrededor del 38% del mercado mundial (Digrak y Kazanici, 1999; Kanekar, 2004; CICOPLAFEST 2006; Yang *et al.*, 2007).

Se ha planteado que para el funcionamiento óptimo de un plaguicida éste debería atacar su especie blanco y rápidamente convertirse en compuestos no dañinos, tales como carbono y agua (Johnsen *et al.*, 2001). Sin embargo, esto no sucede y su acumulación en el suelo y dispersión en el ambiente depende en gran medida de las propiedades físicas, químicas y biológicas del agroecosistema (Sánchez *et al.*, 2004). Si bien el uso de plaguicidas es una actividad antropogénica inevitable, ya que proveen protección a los agricultores en la inversión de semillas, fertilizantes, irrigación y mano de obra contra las plagas, su utilización ha causado efectos biológicos adversos a corto y largo plazo (Kanekar, 2004). Los plaguicidas tienen diferentes tipos de repercusión y efectos ecológicos, dependiendo de su fórmula química, concentración y sitio de aplicación: en los organismos vivos, en la

superficie terrestre y en el agua (Ongley, 1997). Por ello, están incluidos entre los microcontaminantes orgánicos.

Los efectos de los plaguicidas sobre las comunidades microbianas del suelo y en la actividad de éstas han sido poco estudiados. Sin embargo, se ha observado que en suelos de zonas templadas y perturbados químicamente la diversidad microbiana disminuye (Girvan *et al.*, 2005). También existe evidencia de degradación del plaguicida, después de un uso repetido en el suelo (Spokas *et al.*, 2006).

1.2.2 Metil paratión

El metil paratión u *O,O-dimethyl O-4 nitrophenil phosphoratioato* es un pesticida organofosforado de contacto e ingestión, con un enlace P=S y se clasifica como extremadamente tóxico para vertebrados, principalmente para mamíferos y aves, con una dosis letal media (DL₅₀) de 6 a 24 mg/kg en roedores (Isbister *et al.*, 2007). En México se utiliza para más de 70 tipos de cultivos, incluyendo vegetales, frutales y cereales. Debido a su baja persistencia en el ambiente es muy utilizado en la agricultura (CICOPLAFEST, 2006).

El uso de plaguicidas como el metil paratión puede proporcionar sustratos de carbono (C) y nitrógeno (N) a los microorganismos del suelo, debido a que al ser compuestos químicos sintéticos (xenobióticos) pueden ser susceptibles a ataques microbianos (Madigan *et al.*, 2004). No obstante, cuando la degradación de la molécula es sólo parcial, el subproducto microbiano puede ser, en algunas ocasiones, aún más tóxico que el compuesto químico original (Bollag, 1980; Madigan *et al.*, 2004).

Algunos microorganismos pueden degradar el metil paratión mediante tres diferentes procesos aeróbicos: hidrólisis, oxidación y reducción, este último también se puede realizar en ambientes anóxicos (Singh y Walker, 2006; Yang *et al.* 2007).

La hidrólisis o/y oxidación del metilparatión da origen al *p*-nitrofenol y al dialquiltiofosfato. El primero se reduce hasta ácido 3-oxoadípico, el cual se puede degradar hasta CO₂ mediante su incorporación al ciclo de Krebs (Singh y Walker, 2006). Este proceso de degradación del plaguicida se ha sido reportado en

Pseudomonas, *Serratia* y *Flavobacterium*, las cuales utilizan el *p*-nitrofenol como fuente de carbono y de fósforo (Pakala *et al.*, 2007).

Cuando existen niveles muy bajos de oxígeno, el grupo nitro del metil paratión se reduce a un grupo amino por una nitroreductasa, formando una molécula denominada aminoparatión, el cual se puede ser hidrolizar a *p*-aminofenol y después a *p*-benzoquinona (Singh y Walker, 2006). En la actualidad se sabe que bacterias del género *Bacillus* pueden realizar este proceso en condiciones de anaerobiosis (Yang *et al.*, 2007).

Otros microorganismos menos estudiados pero reportados en la degradación del metil paratión son bacterias desnitrificantes como *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Brucella*, *Ochrobactrum* y *Serratia*. (Kanekar *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Aunque la biodegradación de plaguicidas organofosforados en el suelo se ha reportado ampliamente, no lo ha sido tanto los efectos de éstos sobre los microorganismos del suelo (Digrak y Kazanici, 2001), como por ejemplo sobre las poblaciones desnitrificantes.

1.3 Desnitrificación

1.3.1 Generalidades del ciclo del N

Los ecosistemas tienen flujos de reciclaje conjuntos entre los diferentes ciclos biogeoquímicos. Sin embargo, los flujos de entrada y salida son independientes (Asner *et al.*, 1997; Baisden y Amundson, 2003). El ciclo del N se desarrolla en diferentes estratos de la tierra; su mayor reservorio es en la atmósfera, donde se localiza alrededor del 80% (Holland *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2004). A pesar de su abundancia en la atmósfera este elemento puede ser “escaso” en algunos ecosistemas.

La fijación del N requiere de una gran cantidad de energía para romper su triple enlace, por lo que sólo un número de organismos relativamente reducido pueden hacerlo. En muchos ambientes, la productividad está limitada por el pequeño aporte de compuestos de nitrógeno combinado, lo que hace muy ventajosa la fijación biológica. Es importante resaltar que aunque ésta no es la única forma de fijación (ya que también existen la lumínica, por combustión, volcánica y antropogénica) sí es de las más importantes en términos de abundancia (Madigan *et al.*, 2004). Durante su ciclo, el N se recicla, en su mayoría en formas más fácilmente disponibles, como amoníaco y nitrato. El ciclo del N consiste en una serie de reacciones redox en las que está involucrado el metabolismo energético de una gran cantidad de microorganismos. Muchas de estas reacciones se llevan a cabo por enzimas específicas, lo cual ha permitido el estudio de procesos microbianos como la asimilación de nitrato, la reducción disimilatoria de nitrato y la fijación de N (Zehr y Ward, 2002).

1.3.2 Proceso de desnitrificación

La desnitrificación constituye uno de los principales procesos del ciclo global del N. Es un proceso respiratorio en el cual los compuestos del N se oxidan y son usados aceptores alternativos de N para la producción de energía, bajo condiciones limitadas de oxígeno. Este proceso es el principal mecanismo por el cual el N del suelo y agua regresa a la atmósfera en su forma molecular (N₂), completando el

ciclo (Rice, C.W. y Tiedje J. M. (1989); Zumft, 1997). La desnitrificación es un paso de reducción de nitrato (NO_3^-) a dinitrógeno (N_2) mediante la liberación de gases de óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) (Conrad, 1996). El óxido nítrico y el óxido nitroso, productos intermediarios de la desnitrificación, tienen un enorme impacto sobre la contaminación atmosférica (Bange, 2000).

Estudios genéticos y bioquímicos han identificado siete enzimas capaces de catalizar los cuatro pasos de la vía de desnitrificación (Fig. 3).

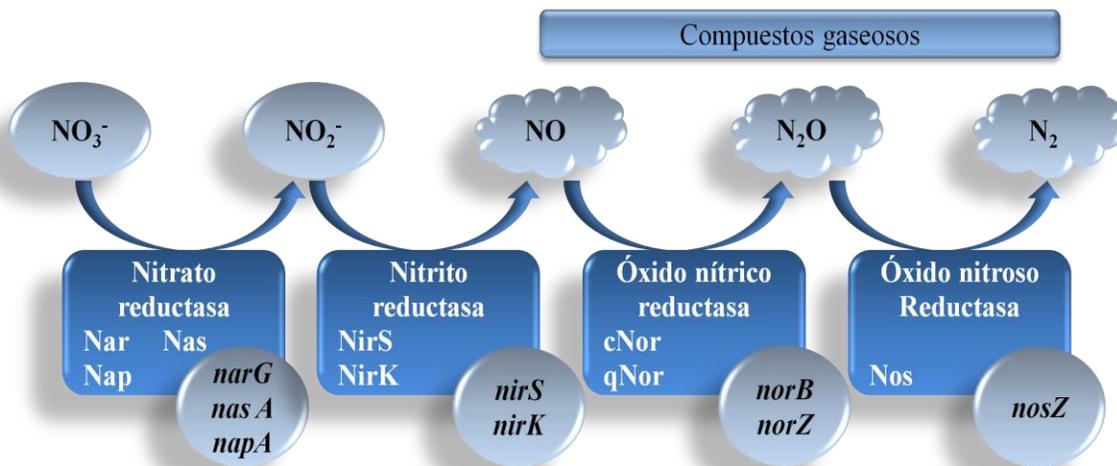


FIGURA 3. Ruta de desnitrificación

Esquema que representa, en la parte superior, los compuestos que se forman a partir de la reducción del NO_3^- , mediante la acción de diversas enzimas, representadas en las cajas azules. En los círculos inferiores se muestran los genes que codifican para la subunidad catalítica de las enzimas en cuestión.

Nitrato reductasa. La reducción en procariontas de NO_3^- a NO_2^- puede ser llevada a cabo con tres propósitos y por tres distintas nitrato reductasas (Warnecke-Eberz y Friedrich, 1992).

La enzima nitrato reductasa citoplasmática asimilatoria (Nas) tiene una función, como su nombre lo indica, de asimilación y se localiza en el citoplasma. Las bacterias utilizan el NO_3^- para su crecimiento vía la reducción asimilatoria a NO_2^- , el cual posteriormente se reduce a amonio (NH_4^+) para la formación de aminoácidos y proteínas. Se pueden identificar dos tipos de Nas, uno dependiente del NADH y constituido por dos subunidades codificadas por los genes *nasA* y *nasC*; el segundo depende de la ferredoxina o la flavodoxina y está constituido por

una única subunidad. En ambos casos contienen un cofactor de molibdeno (MGD) y un N-terminal de hierro-sulfuro (Moreno-Vivián *et al.*, 1999).

La nitrato reductasa de membrana (Nar) actúa en la respiración anaeróbica de nitrato, la conforman tres subunidades, la subunidad α catalítica (NarG) con un cofactor MGD, la subunidad soluble β (NarH) y la subunidad γ (Nar I). Las subunidades α y β se asocian en el citoplasma y se unen a la subunidad γ mediante un dominio transmembranal presente en su región C-terminal (Blasco *et al.*, 1989; Moreno-Vivián *et al.*, 1999). Los genes *narG*, *narH* y *narI* codifican las distintas subunidades; además de éstos también participa el gen *narJ*, que codifica una chaperona necesaria implicada en el proceso de maduración de la enzima (Blasco *et al.*, 1989 y 1998).

La nitrato reductasa respiratoria periplasmática (Nap), a diferencia de Nar, puede expresarse en presencia de oxígeno. La enzima Nap son heterodímeros formados por una subunidad catalítica (NapA) y un citocromo *c* con dos grupos hemo (NapB), codificadas por los genes *napA* y *napB*, respectivamente. En las subunidades estructurales, se ha identificado a la proteína NapC, que es otro citocromo *c*, con cuatro grupos hemo, unido a la membrana. La proteína NapC es la encargada de transferir electrones a la subunidad NapB (Moreno-Vivián *et al.*, 1999).

Nitrito reductasa. La generación del NO a partir de la reducción del NO_2^- es catalizada por dos tipos de nitrito reductasas periplasmáticas, que se encuentran en bacterias desnitrificantes (sin embargo, no en la misma célula). Estas enzimas no tienen ninguna relación estructural ni evolutiva (Zumft, 1997). Un tipo es la enzima NirS tipo *cd1*, que es un homodímero soluble; cada subunidad presenta un dominio de unión a un grupo hemo *c* y a un hemo *d1*, por lo que la proteína dimérica nativa lleva cuatro átomos de metal en su centro (Moura y Moura, 2001). El otro tipo es la enzima homotrimérica NirK tipo cobre, que ha sido subdividida en las categorías verde y azul, dependiendo de sus propiedades de absorbencia. Además, estas proteínas contienen dos tipos de centro de cobre, que están involucrados en la transferencia de electrones y catálisis. Cada monómero se compone de dos dominios (I y II) que se conectan, de forma que cada dominio I interacciona con el dominio II adyacente (Moura y Moura, 2001). De acuerdo con esto, la enzima contiene tres centros de cobre tipo I, los cuales están implicados en la transferencia de electrones desde un donador al sitio activo de la enzima y tres centros de cobre tipo II, que forman el sitio activo (Zumft, 1997; Bueno, 2008). Los

genes *nirK* y *nirS* codifican respectivamente para estos dos tipos de nitrito reductasas (Zumft, 1997).

Oxido nítrico reductasa. El NO pasa a N₂O mediante la óxido nítrico reductasa (Nor). Esta enzima se encuentra unida a la membrana y contiene dos subunidades, una pequeña de citocromo *c* y otra más grande de citocromo *b* (Moura y Moura, 2001). Existen dos tipos de Nor, las que reciben electrones de citocromo *c* se denominan cNor y las que reciben electrones de una quinona son qNor (Suzuki *et al.*, 2006).

Oxido nitroso reductasa. El último paso de reducción es catalizado por la óxido nitroso reductasa (Nos) que es codificada por el gen *nosZ* (Hochstein y Tomlinson, 1988; Zumft, 1997; Philippot y Hallin, 2006). Esta enzima es un homodímero, compuesto por dos subunidades que contiene cobre en su centro activo y está localizada en el periplasma (Moura y Moura, 2001).

1.3.3 Diversidad natural desnitrificante

La capacidad de los organismos para la desnitrificación ha sido observada en diversos géneros de bacterias, arqueobacterias y hongos, distribuidos en una gran cantidad de hábitats (ver tablas 1 y 2) (Noredal *et al.*, 2004). La bioquímica de la reducción desasimiladora de nitratos se ha estudiado en detalle en diversos microorganismos, entre ellos *Escherichia coli*, donde no se lleva el proceso completo y el nitrato es reducido sólo a nitrito (Zumft, 1997; Madigan *et al.*, 2004). No se tienen aún tantos estudios en hongos, pero actualmente se sabe que *Fusarium*, *Giberella*, *Trichoderma*, *Cylindrocarpon*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Hansenula* contienen especies desnitrificantes (Zumft, 1997).

Tabla 1. Arqueobacterias desnitrificantes

Phylum	Género	Descripción	Hábitat
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Halobacterium</i> <i>Haloferax</i> <i>Natronobacterium</i>	Organótrofas y halófilas	Aguas hipersalinas
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Pyrobaculum</i>	Hipertermófilos	Manantiales y zonas profundas submarinas

Tabla 2. Bacterias desnitrificantes^a

Phylum	Subdivisión ^b	Género	Habitat
<i>Gram positivas</i>		<i>Bacillus</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Agrobacterium</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Alcaligenes</i>	Suelos y aguas
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Azospirillum</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Blastobacter</i>	Aguas
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Bradyrhizovium</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Hyphomicrobium</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Nitrobacter</i>	Suelos, agua dulce y mar
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Ochrobactrum</i>	Suelos, raíces
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Paracoccus</i>	Suelos y aguas
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Rhodobacter</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Rhodopseudomonas</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Rhodoplanes</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	α	<i>Sinorhizobium</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	β	<i>Achromobacter</i>	Aguas
<i>Proteobacteria</i>	β	<i>Aquaspirillum</i>	Suelos y aguas encharcada
<i>Proteobacteria</i>	β	<i>Azoarcus</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	β	<i>Chromobacterium</i>	Suelos, aguas y alimentos
<i>Proteobacteria</i>	β	<i>Eikenella</i>	Infeciosa ^c
<i>Proteobacteria</i>	β	<i>Huphomicrobium</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	β	<i>Kingella</i>	Infeciosa ^c
<i>Proteobacteria</i>	β	<i>Neisseria</i>	Infeciosa ^c
<i>Proteobacteria</i>	β	<i>Nitrosomonas</i>	Suelos, agua dulce y residual
<i>Proteobacteria</i>	β	<i>Ralstonia</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	β	<i>Thermothrix</i>	Aguas
<i>Proteobacteria</i>	γ	<i>Alteromonas</i>	
<i>Proteobacteria</i>	γ	<i>Beggiatoa</i>	Crece en medios orgánicos
<i>Proteobacteria</i>	γ	<i>Escherichia coli</i>	Agua encharcada
<i>Proteobacteria</i>	γ	<i>Halomonas</i>	Aguas profundas
<i>Proteobacteria</i>	γ	<i>Moraxella</i>	
<i>Proteobacteria</i>	γ	<i>Morococcus</i>	
<i>Proteobacteria</i>	γ	<i>Pseudomonas</i>	Suelos
<i>Proteobacteria</i>	γ	<i>Oligella</i>	
<i>Proteobacteria</i>	γ	<i>Thiobacillus</i>	Crece en medios orgánicos
<i>Proteobacteria</i>	γ	<i>Thioploca</i>	Crece en medios orgánicos
<i>Proteobacteria</i>	ε	<i>Campylobacter</i>	
<i>Flavobacterium</i>		<i>Flavobacterium</i>	Suelos y agua
<i>Flavobacterium</i>		<i>Empedobacter</i>	Suelos y agua
<i>Sphingobacteria</i>		<i>Cytophaga</i>	Suelos y agua
<i>Sphingobacteria</i>		<i>Flexibacter</i>	Suelos y agua
<i>Sphingobacteria</i>		<i>Sphingobacterium</i>	Aguas
<i>Aquifex</i>		<i>Aquifex</i>	Volcanes

^a Madigan *et al.*, 2004^b Se refiere a grupo filogenético para el phylum *Proteobacteria*^c Bacterias patógenas que pueden afectar a los animales

Las reacciones de desnitrificación son llevadas a cabo por una heterogénea variedad filogenética de microorganismos. Se ha observado que bacterias filogenéticamente cercanas no necesariamente comparten la característica de desnitrificar; y cuando lo hacen, sus vías desnitrificantes pueden ser diferente (Tiedje, 1989; Jones *et al.*, 2008). Sin embargo, capacidades similares se pueden encontrar en bacterias no relacionadas filogenéticamente, por lo que las bacterias desnitrificantes son metabólicamente y filogenéticamente diversas (Delorme *et al.*, 2003; Madigan *et al.*, 2004). Lo anterior sugiere que los genes de desnitrificación se han sido perdido y heredado durante la evolución, indicando que la capacidad de desnitrificar ha sido consecuencia en muchos organismos de una transferencia horizontal (Jones *et al.*, 2008).

1.3.4 Factores determinantes de los procesos de desnitrificación en suelos.

En el caso de la desnitrificación por actividad bacteriana en suelos, los procesos están fuertemente influenciados por las condiciones climáticas y las características físico-químicas prevalecientes (Coyne *et al.*, 2000; Wallestein *et al.*, 2006; Sahrawat, 2008). Las chinampas de Xochimilco constituyen un “suelo” agrícola, cuyos factores determinantes en los procesos antes mencionados interactúan como un sistema abierto, dinámico y complejo que se debe tomar en cuenta en su conjunto (Fig. 4).

Agregación y humedad. La agregación del suelo es fundamental ya que es la responsable de la fijación de agentes y distribución del C y N (Six *et al.*, 2000; Bronick y Lal, 2004; Wei *et al.*, 2006). Los suelos están formados a partir de la combinación de partículas minerales con sustancias orgánicas e inorgánicas (Wei *et al.*, 2006), que crean una compleja dinámica de agregación que provoca una diferencia entre la disponibilidad o accesibilidad al sustrato (en este caso NO_3^- para la desnitrificación); esto es crucial para las bacterias (Sahrawat, 2008). La agregación del suelo influye en las variaciones en la concentración de oxígeno y humedad, debido a que ambas pueden ocupar espacios en los poros del suelo afectando de manera puntual el funcionamiento de los microorganismos, debido al requerimiento de ambientes aerobios y/o anaerobios para desarrollarse (Hansen, 2000; Six *et al.*, 2000; Bronick y Lal, 2004; Wei *et al.*, 2006). Las chinampas de Xochimilco son sitios donde los cultivos son mantenidos, casi en su totalidad, con

riego constante, lo cual podría favorecer de manera global los procesos anaeróbicos.

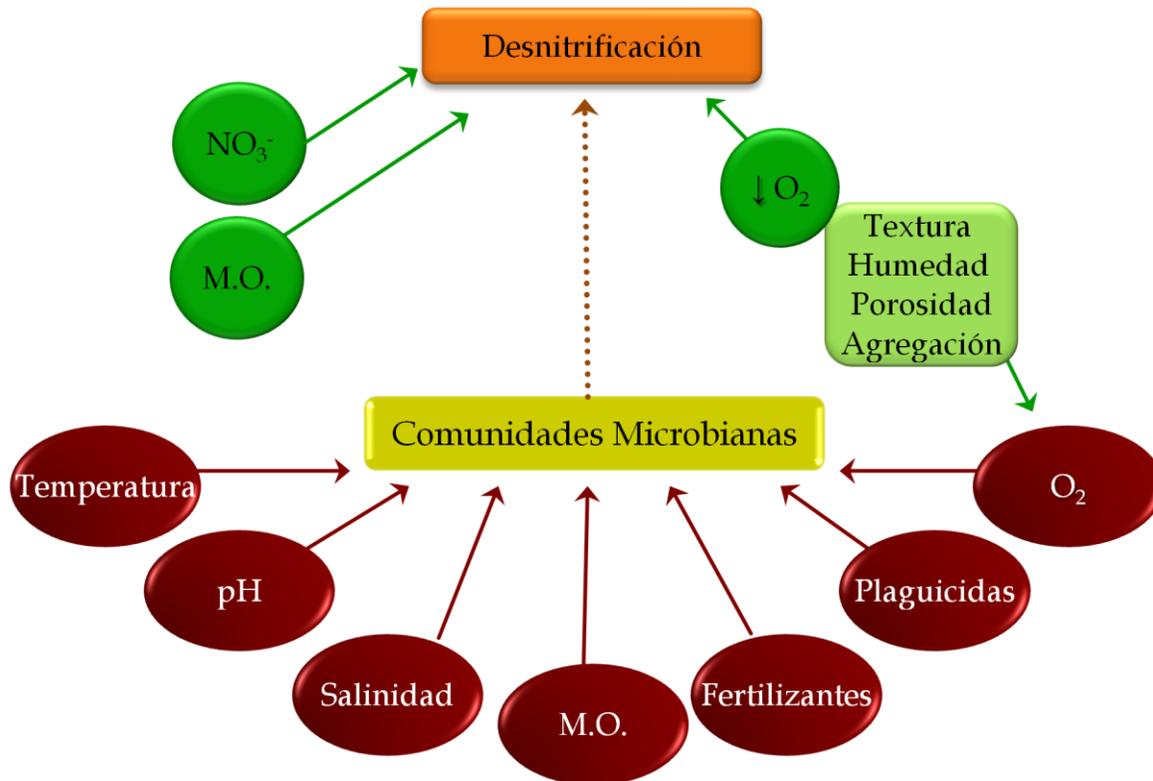


FIGURA 4. Factores determinantes en el proceso de desnitrificación

En este esquema se representan con círculos de color verde los factores determinantes para el inicio de la desnitrificación. Este proceso se lleva a cabo por diversos microorganismos, que a su vez están influenciados por diversos factores (indicados en los óvalos rojos), M.O. se refiere a materia orgánica. En la caja de color verde se indican las condiciones del suelo que influyen en la disponibilidad de oxígeno (anaerobiosis).

Textura. Es la proporción de los tamaños de los grupos de partículas que lo constituyen. Esta propiedad ayuda a determinar la facilidad de abastecimiento de los nutrientes, agua y aire (Six *et al.*, 2000).

Temperatura. Es un factor ambiental que puede afectar los procesos de los microorganismos. Diversos estudios han demostrado que los niveles de desnitrificación pueden variar en función de la temperatura asociada directamente con el clima. Un ejemplo de esto son los suelos tropicales, donde los procesos de desnitrificación son más altos en comparación con regiones templadas con rango de temperatura menor. La temperatura óptima en cultivos puros de bacterias desnitrificantes ha sido reportada dentro de la condición mesófila, con un intervalo de 25° a 35°C (Saad y Conrad, 1993; Pfenning y McMahon, 1997; Sahrawat, 2008),

Interacciones entre especies. Otros factores que afectan la diversidad y distribución de los microorganismos a diferentes escalas son interacciones de tipo selectivo u obligado, por ejemplo, la relación e interacción trófica entre las especies (como mutualismo y depredación), mediadas por los microorganismos claves o dominantes, lo que puede llevar a cambios sustanciales en la diversidad de la microbiota (Anderson, 1975; Hooper *et al.*, 2000, Coleman y Whitman, 2005).

Materia orgánica. La acumulación de materia orgánica en el suelo es la principal fuente de energía para los microorganismos, debido a que es el principal aporte de nutrientes (Six *et al.*, 2000; Bronick y Lal, 2004; Wei *et al.*, 2006). La disponibilidad de los electrones de los compuestos con C es uno de los principales factores que controlan la actividad de los organismos heterótrofos, que comprenden la mayoría de los microorganismos desnitrificantes (Knowles, 1982), mientras que para la nitrificación existen pocos heterótrofos reportados que la lleven a cabo (Sahrawat, 2008).

Oxígeno. La desnitrificación es activada con una concentración cero de oxígeno disuelto, y en este proceso el nitrato es usado como aceptor para las reacciones de desnitrificación (Knowles, 1982; Pochana y Keller, 1999). Se han hecho estudios que indican que en algunos sistemas la actividad del proceso de desnitrificación disminuye cuando la concentración de oxígeno disuelta es más alta de 0.2 mg O₂/L (Pochana y Keller, 1999). Sin embargo, existen bacterias que pueden realizar desnitrificación bajo condiciones aerobias: *Paracoccus denitrificans* reduce NO₃⁻ aún en presencia de una concentración saturada de oxígeno. También *Pseudomonas* sp. y *Microvirgula aerodenitrificans* pueden realizar desnitrificación en condiciones aerobias (Baumann *et al.*, 1996; Patureau *et al.*, 1998; Takaya *et al.*, 2003).

pH. Diversos experimentos han coincidido en que el pH óptimo para el proceso de desnitrificación se encuentra entre 7 y 8 (Simek *et al.*, 2002). Las variaciones del pH pueden afectar a la composición de las comunidades desnitrificantes en suelos (Deiglmayr *et al.*, 2004). Es complicado que se tenga el pH óptimo para los procesos de desnitrificación, ya que éste varía en función de los diferentes tipos de suelo. Sin embargo, las poblaciones desnitrificantes pueden tener un amortiguamiento y adaptarse y prevalecer sobre el pH óptimo (Shammas, 1986; Simek *et al.*, 2002).

Fertilizante y plaguicidas: en la actualidad, las actividades antropogénicas (como el uso de fertilizantes) han aumentado las emisiones de óxido nitroso a la atmósfera, debido a que proporcionan e incrementan la disponibilidad de

substratos de N y C, favoreciendo de esta manera las vías metabólicas de las comunidades bacterianas como la desnitrificación, que contribuyen con cerca del 70% de la emisión anual del N₂O a nivel mundial (Bremner y Blackmer, 1978;; Wolsing y Prieme, 2004; Enwall, 2005, Kinney *et al.*, 2005). Es importante resaltar que para el caso de plaguicidas los efectos no siempre afectan a la desnitrificación de manera positiva, ya que algunos tipos y/o concentraciones lo hacen de manera negativa, como ya se explico anteriormente (sección 1.2.2).

1.4 Gases de efecto invernadero

1.4.1 Problemática de la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera

La Tierra es un sistema dinámico, en el que los cambios ambientales globales han sido parte de su evolución. Existen dos tipos principales de cambios globales, 1) los que alteran el equilibrio de las cubiertas de la tierra (atmósfera y océanos) y se experimentan globalmente y 2) aquellos que ocurren en sitios discretos, pero que se expanden hasta constituir un cambio global (Vitousek, 1992). Ejemplos del primer tipo incluyen: cambios en la composición de la atmósfera, cambio climático, disminución en la concentración de ozono e incremento en la radiación ultravioleta. Mientras, el segundo tipo es ejemplificado por cambios en el uso de la tierra, pérdida de diversidad biológica, invasiones biológicas y cambios en la química de la atmósfera.

El N₂O, es un gas de efecto invernadero y un catalizador natural de la degradación de la estratosfera (Henry *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008). El N₂O tiene un potencial de calentamiento global de aproximadamente 300 veces más que el dióxido de carbono (CO₂) (Singh *et al.*, 1999). Además, es un catalizador natural destructivo del ozono (O₃), mediante la generación de óxido nítrico (NO) que adelgaza la capa de ozono. Esas dos características hacen que este importante gas de efecto invernadero contribuya en un 6% al calentamiento global. La producción de N₂O en la atmósfera proviene de dos fuentes: suelos y océanos,

tanto en forma natural como por el resultado de las actividades humanas (Bange, 2000).

La concentración atmosférica del N₂O se ha incrementado a través de las últimas décadas a una tasa anual del 0.2-0.3%, encontrándose actualmente una concentración de 330 ppb, aproximadamente (Conrad, 1996). Los suelos agrícolas contribuyen con el 80% del N₂O total en la atmósfera, siendo por lo tanto la fuente antropogénica más importante en la emisión de dicho gas (Koponen *et al.*, 2004).

ANTECEDENTES

Las chinampas de Xochimilco presentan una seria problemática ambiental, como por ejemplo en el uso de suelo, el cual durante los últimos años ha sido sometido a una intensiva fumigación química. Los pesticidas son importantes componentes en la agricultura moderna (CICOPLAFEST, 2008), aunque en la actualidad existe poca información sobre la afectación que causan estos compuestos a los procesos bioquímicos del suelo. Sí se sabe que la aplicación de plaguicidas puede generar efectos negativos no sólo a los organismos blanco sino también a la actividad y diversidad microbiana total del suelo (Johnsen *et al.*, 2001; Locke y Zablotowicz, 2004; IPCC, 2007).

Algunos estudios de degradación de plaguicidas en suelo después de la fumigación indican que la modificación de la microbiota altera potencialmente la dinámica de su funcionalidad, esto se puede observar, por ejemplo, en la capacidad de las bacterias para la fijación del N (Locke y Zablotowicz, 2004) y/o en la producción de gases de efecto invernadero (N_2O). El nivel de estas alteraciones depende del tipo de plaguicida, concentración, agroecosistema y biota, entre otros (Bartha *et al.*, 1967; Tu, 1969; Yeomans, 1985; Snigh, 1999; Kinney *et al.*, 2005).

Aún cuando algunos microorganismos pueden degradar el metil paratión, no siempre los sustratos obtenidos son fuentes de energía, y en ocasiones pueden ser tóxicos para la microbiota (Errampalli *et al.*, 1999) o inhibidores del crecimiento de bacterias desnitrificantes. Se ha reportado que la emisión de N_2O por las bacterias *Xantobacter autotrophicus* CECT 7064 y *Paracoccus denitrificans* ATCC 19367 fueron fuertemente inhibidas por varios plaguicidas, entre ellos el metil paratión y aldrin (Takaya *et al.*, 2003; Sáez *et al.*, 2005). Por lo tanto, la diversidad y estructura de las comunidades microbianas en suelos contaminados puede ser alterada con la aplicación de metil paratión (Zhang *et al.*, 2005) causando variaciones en las emisiones de N_2O a la atmósfera (Spokas y Wang, 2003; Spokas *et al.*, 2003 y 2006). La evidencia experimental indica, pues, que existe una alteración en la microbiota desnitrificante cuando se adiciona metil paratión. Sin embargo, aún existe poca información acerca de cómo estos pesticidas afectan al proceso completo de la desnitrificación.

El proceso microbiano respiratorio de la desnitrificación es fundamental, como ya se explicó, y está controlado por diversos factores ambientales, tales como contenido de agua, pH, difusión de O_2 , la concentración de NO_3^- y el contenido

de materia orgánica del suelo, entre otros. Lo anterior se debe considerar al momento de hacer estudios en campo y, por lo tanto, se debe estandarizar en la medida de lo posible la metodología (Firestone *et al.*, 1980). La utilización de microcosmos permite que al estudiar el efecto del metil paratión en el proceso de desnitrificación las condiciones sean controladas. Además se debe considerar que los rangos de desnitrificación y las proporciones relativas de los productos gaseosos han sido estudiados en el presente trabajo con experimentos en condiciones controladas en el laboratorio, utilizando inhibidores específicos. De esta manera, se puede determinar la persistencia de las enzimas nitrato, nitrito y oxido nitroso reductasas mediante el análisis de las dinámicas de los compuestos nitrogenados (Smith y Tiedje, 1979; Deendoven *et al.*, 1994; Murray y Knowles 1999). Este tipo de estudios proveen un mecanismo en el entendimiento de los controles sobre la producción del N₂O (Smith y Tiedje, 1979; Murray y Knowles 1999; Deendoven *et al.*, 1994). Estos inhibidores son el cloranfenicol y el acetileno (C₂H₂), el primero es utilizado para evaluar la capacidad de desnitrificación del suelo en condiciones anaerobias ya que este inhibe la síntesis *de novo* de reductasas implicadas en el proceso (Smith y Tiedje, 1979), el segundo compuesto inhibe la actividad de la oxido nitroso reductasa, al hacerlo se puede determinar la relación de N₂O a N₂ (Balderstone *et al.*, 1976). El uso combinado de cloranfenicol y C₂H₂ en concentraciones específicas permite estudiar la capacidad de desnitrificación del suelo en el muestreo (Knowles, 1982; Pell *et al.*, 1996).

En el suelo se encuentra una gran cantidad de microorganismos que son fundamentales, sin embargo su estudio es complicado ya que muchos de ellos no pueden ser cultivados en el laboratorio. El desarrollo de técnicas moleculares basadas principalmente en el análisis del gen 16S rDNA, ha sido la primera herramienta en proporcionar una guía para la exploración de la composición y estructura de las comunidades bacterianas en diversos ambientes (Noredal *et al.*, 2004; Philippot y Hallin, 2005).

Actualmente se han realizado diversos estudios de biología molecular que reportan el uso de genes desnitrificantes como marcadores moleculares de estos microorganismos (Braker *et al.*, 2000). Para realizar estos estudios moleculares en primer lugar se realiza una extracción de los ácidos nucleicos (DNA), que posteriormente se amplifica mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica es la base para análisis posteriores, como bibliotecas y huellas genéticas, las cuales permiten una aproximación importante para los

estudios de diversidad y densidad de las comunidades microbianas (Braker *et al.*, 1998; Hallin y Lindgren, 1999; Philippot y Hallin 2005).

Las técnicas de “huella”, basadas por ejemplo en PCR combinadas con la electroforesis en geles de acrilamida con gradiente de temperatura (TGGE) y/o desnaturalizantes (DGGE), dan una excelente resolución, ya que los gradientes permiten detectar en fragmentos del mismo tamaño las variaciones puntuales en las secuencias del DNA (Noredal *et al.*, 2004). Los avances en el conocimiento de la estructura de las comunidades bacterianas que ha significado el uso de la biología molecular son evidentes pero, sin embargo, es imprescindible ligar con ellos los estudios físico-químicos de dinámicas enzimáticas, para tener una integración del conocimiento generado en ambas áreas que permita estudiar a las comunidades bacterianas desde una perspectiva más completa, integrando la funcionalidad y diversidad en dimensiones de espacio-tiempo.

JUSTIFICACIÓN

Las chinampas de Xochimilco presentan una problemática ambiental severa. Un aspecto que ha recibido menos atención, pero no por eso es menos importante, es el uso del suelo, el cual durante los últimos años ha sido sometido a una intensiva fumigación con plaguicidas como el metil paratión. Como se mencionó, la desnitrificación es el principal proceso responsable de la producción de emisiones del N_2O , el cual es un importante gas de efecto invernadero y un catalizador natural de la destrucción del ozono en la estratosfera. Por lo tanto, es necesario realizar estudios relacionados con la producción de N_2O como producto del uso de plaguicidas, para tratar de mitigar el impacto de este compuesto en el calentamiento global de nuestro planeta (el cual está considerado dentro de los planes de desarrollo de la Ciudad de México, la cual se ha comprometido a alcanzar acuerdos en materia de Cambio Climático). Para ello se considerarán los efectos de los plaguicidas en las comunidades microbianas desnitrificantes del suelo y en la actividad de éstas, algo poco estudiado hasta la fecha.

Este proyecto plantea una parte de la problemática existente en las chinampas de Xochimilco, que es fundamental para integrarla a otros estudios y así plantear propuestas tangibles y reales para los habitantes de la región.

Por otro lado, y con el fin de salvaguardar nuestro patrimonio cultural y ambiental, se vuelve urgente realizar estudios enfocados a conocer la diversidad de microorganismos de los suelos de las chinampas de Xochimilco y como el uso de plaguicidas puede tener un efecto sobre ésta.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del plaguicida organofosforado metil paratión sobre la diversidad y actividad de las comunidades microbianas en suelos de las chinampas de San Gregorio Atlapulco, en la delegación de Xochimilco, México D.F.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las características físico-químicas del sitio de estudio en las chinampas de San Gregorio Atlapulco, Xochimilco.
- Evaluar la actividad enzimática mediante la realización de microcosmos con y sin metil paratión en una cinética con inhibidores específicos (cloranfenicol y C_2H_2).
- Evaluar las dinámicas de NO_3^- , NO_2^- , N_2O y N_2 durante la cinética experimental
- Identificar la diversidad microbiana desnitrificante del sitio de estudio mediante análisis del gen 16S rDNA y el gen *nosZ*.
- Determinar la microbiota desnitrificante en diferentes tiempos y tratamientos del sitio de estudio mediante técnicas de biología molecular (DGGE, secuenciación).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio y muestreo

La chinampa usada como área de estudio pertenece al ejido de San Gregorio Atlapulco y mide 150 m de largo por 30 m de ancho. Se localiza a los 19° 15' 11' de latitud N y 99° 07' 08'' de longitud W, y tiene una altitud de 2237 msnm. Su siembra anual consiste en algunas variedades de lechuga. En el presente estudio se realizaron muestreos compuestos, para lo cual la chinampa se dividió en 3 zonas de 50 m × 30 m, las cuales se consideraron réplicas y se nombraron como S1, S2 y S3. Posteriormente, cada réplica se subdividió en 9 cuadrantes de 16.5 m × 10 m y en cada uno de estos cuadrantes se tomó una muestra de suelo. Las muestras tomadas de cada cuadrante fueron mezcladas entre sí hasta obtener una muestra compuesta para cada réplica S1, S2 y S3 (Fig. 5). Posteriormente se llevaron al laboratorio.

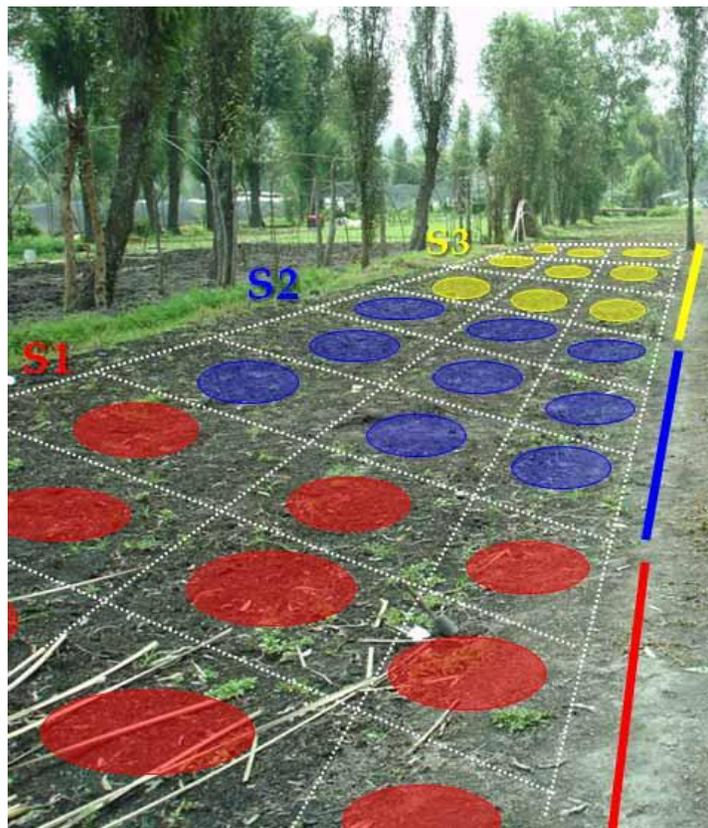


FIGURA 5. Muestreo compuesto

Con los colores rojo, azul y amarillo se representan cada una de las réplicas, los óvalos muestran los 9 cuadrantes de donde se tomaron las muestras.

En el laboratorio, cada una de las muestras compuestas (aproximadamente 12 kg por sitio) se dejó al aire libre durante siete días y se tamizó con malla No. 10 (2 mm). Posteriormente, se realizó la caracterización físico-química por triplicado para cada sitio (Tabla 3).

El pH del suelo se midió con un electrodo de vidrio sensible al ion hidrógeno, en una suspensión 1:2.5 de suelo-H₂O (Thomas, 1996). La conductividad eléctrica (CE) se determinó en el extracto de una solución saturada, en la forma descrita por Rhoades *et al.* (1989). Para determinar el CRA, el suelo se saturó de agua y se dejó reposar durante la noche permitiendo así que se escurriera el exceso de agua. El TOC del suelo se midió con un analizador de carbono orgánico total TOC-VCSH® de Shimadzu (Canby, Oregon E.U.A). Las concentraciones de NO₂⁻ y NO₃⁻ se determinaron de los extractos con K₂SO₄, mediante un método colorimétrico en un analizador automático San Plus System - Skalar®.

Tabla 3. Métodos utilizados en la caracterización fisicoquímica del suelo

Análisis	Método
Densidad real	Picnómetro ^a
Densidad aparente	Volumétrico ^a
Textura	Bouyoucos
pH	Potenciométrico ^a
CRA ¹	Gravimétrico ^a
TOC ²	Combustión seca ^b
Nitratos	colorimétrico con K ₂ SO ₄ ^c
Nitritos	colorimétrico con K ₂ SO ₄ ^c
Nitrógeno amoniacal	colorimétrico con K ₂ SO ₄ ^c
Nitrógeno total	Mediante la técnica Kjeldhal ^d

¹ Capacidad de retención de agua

² Carbono Orgánico Total

^a Según la NOM-021-RECNAT-2000

^b Con un analizador Shimadzu® según procedimiento de Nelson y Sommers, 1996

^c Cuantificado en un analizador automático San Plus System-SKALAR®

^d Con concentrados de ácido sulfúrico (H₂SO₄), sulfato de potasio (K₂SO₄) y cobre (CuSO₄) para digerir la muestra.

3.2 Incubación aeróbica

Se montaron microcosmos de la siguiente manera: se pesaron 10 g de suelo que fueron colocados en botellas serológicas de 60 ml y se ajustó el CRA al 40% (Fig. 6). Se obtuvieron 384 microcosmos, que fueron divididos en dos, a la primera mitad (192) se le añadió agua destilada (SMP) y al resto (192) agua destilada con metilparatión (CMP), con la misma concentración utilizada en el campo (1 ml x IL).



FIGURA 6. Microcosmos

Los microcosmos fueron montados y forrados con aluminio para dejarlos en condiciones de oscuridad.

Cada microcosmos se colocó en un frasco de 945 ml que contenía un recipiente con 20 ml de NaOH 1 M, que funcionó para atrapar el CO₂ emitido y así evitar una excesiva concentración en la atmósfera y en el agua destilada del fondo del frasco. Los microcosmos fueron sellados e incubados en oscuridad en condiciones aerobias a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 28 días. En los días 0, 7, 14 y 28 se tomaron de manera aleatoria 16 microcosmos de cada sitio (S1, S2 y S3) hasta obtener 48 microcosmos CMP y 48 microcosmos SMP, los cuales posteriormente se acondicionaron según cuatro tratamientos (se especifican en la parte de incubación anaerobia de la metodología). Estos tratamientos permitieron analizar el efecto del metilparatión en el proceso de desnitrificación a través del tiempo.

3.3 Incubación anaeróbica

El diseño experimental fue complejo y se encuentra esquematizado en la figura 7. A 48 sub-muestras de cada condición (24 CMP y 24 SMP) se les añadió una solución de NaNO_3 3.4 mM, a las 48 sub-muestras restantes (24 CMP y 24 SMP) se les añadió una solución de NaNO_3 3.4 mM y cloranfenicol 0.22 mM. La concentración final fue de $71.4 \text{ mgNO}_3^- \text{ N kg}^{-1}$ y de 100 mg de cloranfenicol kg^{-1} , la cual es suficiente para inhibir la síntesis de proteínas, pero no la actividad de las enzimas existentes (Murray y Knowles, 1999). Las muestras fueron ajustadas a un CRA de 100%, mezcladas homogéneamente para reducir la influencia de la difusión del NO_3^- a través de la matriz del suelo, y los recipientes fueron cerrados con un tapón de goma y, finalmente, sellados herméticamente.

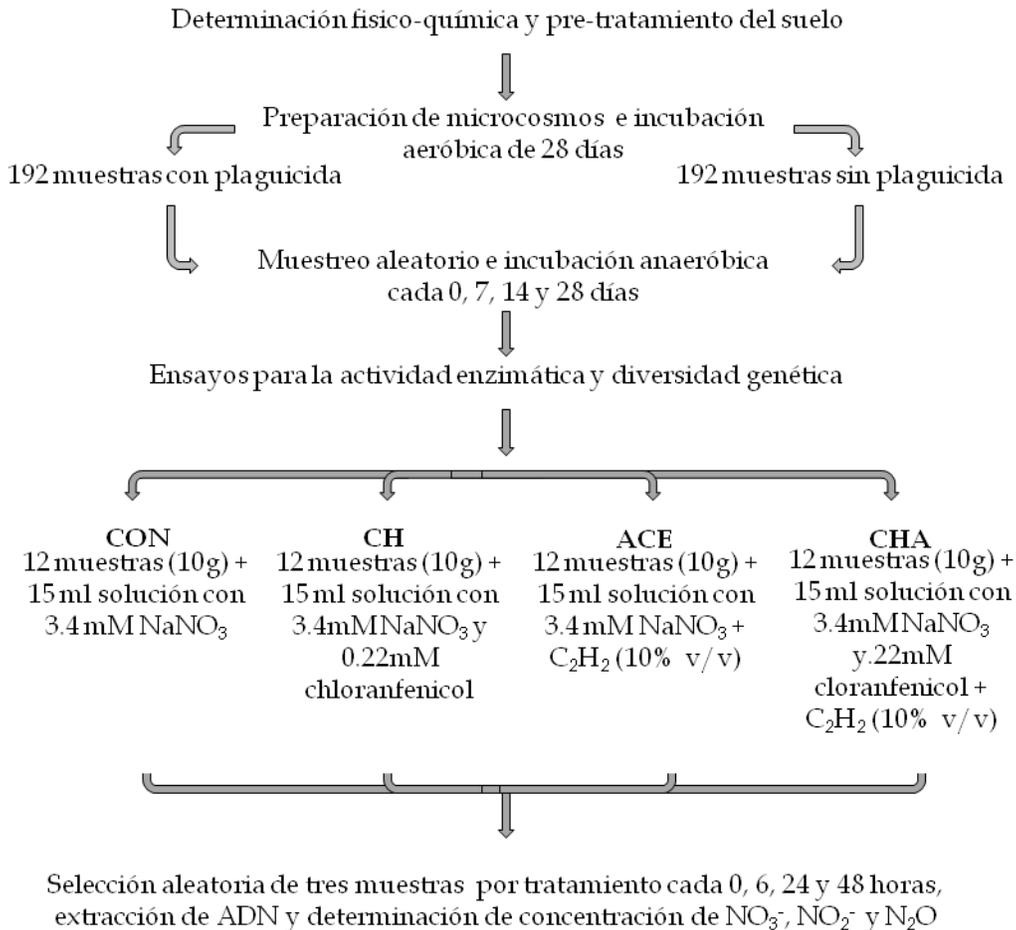


FIGURA 7. Esquema del protocolo experimental

Para crear un ambiente anaeróbico, la atmósfera de los microcosmos se desplazó con un flujo constante de N_2 durante 10 minutos (Dendooven *et al.*, 1994). Una vez purgado el aire, se tomaron (de cada condición CMP y SMP) 12 microcosmos con el tratamiento de $NaNO_3$ y 12 con $NaNO_3$ + cloranfenicol, a los cuales se les extrajeron 10 ml de la atmósfera y se reemplazaron con 10 ml de C_2H_2 (10% v/v). Finalmente se obtuvieron cuatro tratamientos en los microcosmos acondicionados de la siguiente manera:

- 1) 71.4 mg NO_3^- -N kg^{-1} , denominado **CON**
- 2) 71.4 mg NO_3^- -N kg^{-1} + 100 mg de cloranfenicol kg^{-1} , denominado **CH**
- 3) 71.4 mg NO_3^- -N kg^{-1} + 10% v/v C_2H_2 , denominado **ACE**
- 4) 71.4 mg NO_3^- -N kg^{-1} + 100 mg de cloranfenicol kg^{-1} + 10% v/v C_2H_2 , denominado **CHA**

En los análisis de las dinámicas de N se tomaron de manera aleatoria tres submuestras de cada tratamiento (CON, CH, ACE y CHA), que contemplaban los tres sitios de muestreo, a las 0, 6, 24 y 48 h (Fig. 8). Para determinar la emisión de N_2O se tomó 1 ml de la atmósfera de cada microcosmos y se midió en un cromatógrafo de captura de electrones (ECD). Las concentraciones de N_2O obtenidas se corrigieron para considerar el gas disuelto en el agua (Moraghan y Buresh, 1977).

Para determinar las concentraciones de NO_2^- y NO_3^- , éstos se extrajeron mediante la adición de 100 ml de K_2SO_4 0.5 M a cada microcosmos, posteriormente se colocaron en un agitador orbital a 180 rpm durante 30 minutos y se filtraron a través de papel filtro Whatman® N° 42. Los extractos fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis. (Dendooven *et al.*, 1994).

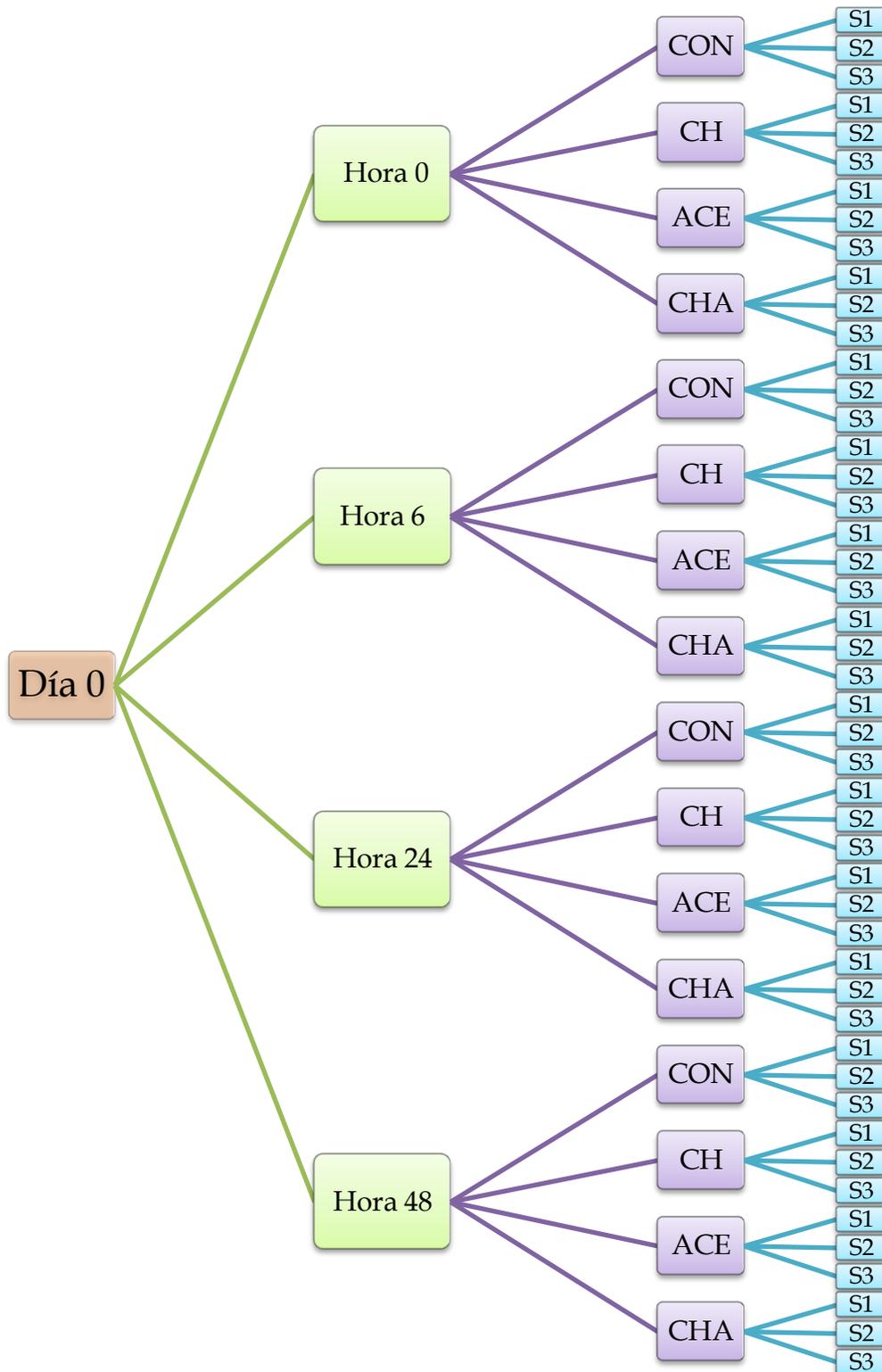


FIGURA 8. Esquema del muestreo por día

En el cuadro café se representa el día ($n=4$), los cuadros verdes son los muestreos cada 0, 6, 24 y 48 h, en color morado los tratamientos y finalmente los cuadros azules las réplicas de suelo por cada tratamiento. Son 48 sub-muestras por cada día de muestreo, que multiplicado por los cuatro días hacen un total de 192 CMP y 192 S MP muestras sacrificadas.

3.4 Análisis químicos

La cantidad de emisión de N₂O se determinó con un cromatógrafo de gases Agilent 4890D® (Agilent Technologies, Palo Alto, California, E.U.A.) equipado con un detector de captura electrónica. Una columna SG-Q (diámetro interior de 520 micras y 30 m de longitud, Agilent Technologies, Palo Alto, California, E.U.A.) fue utilizada para separar el N₂O procedente de los otros gases, con una velocidad de flujo del gas portador (N₂) de 5 ml min⁻¹. Las temperaturas de inyección, detección y el horno de la columna se fijaron en 100 °C, 225 °C y 35 °C, respectivamente. Para el procedimiento se inyectó en el cromatógrafo, con una jeringa de vidrio Hamilton® (Reno, Nevada, E.U.A.), una alícuota de 1 ml. Posteriormente, para determinar la concentración de N₂O se tomó el cálculo que integró el equipo del área de los picos de cada inyección comparado con los picos de una curva estándar preparada a partir de concentraciones conocidas, 10 y 100 ppm, de N₂O y N₂.

3.5 Análisis estadístico

Las tasas de emisión de N₂O y las tasas de producción de NO₂⁻ y NO₃⁻ se calcularon de la siguiente manera. Las emisiones de N₂O se iniciaron desde el tiempo 0 hasta el total del tiempo transcurrido mediante un modelo de regresión lineal que se vio obligado a pasar por el origen, aunque permitiendo diferentes pendientes (las tasas de producción) para cada tratamiento. Este enfoque se apoya en consideraciones teóricas, ya que no se produjo N₂O en el momento cero y el microcosmos tampoco lo contenía debido a que se lavó la atmósfera con N₂. La medición de producción de NO₂⁻ y NO₃⁻ se consideró en el inicio de la cinética mediante un modelo lineal que no se vio obligado a pasar por el origen y permitió diferentes pendientes (las tasas de producción) para cada tratamiento. La emisión de N₂ se calculó de la siguiente manera.

$$N_2 = \frac{[A - B] * 4}{5}$$

Donde **A** es la emisión de N₂O en el suelo modificado con C₂H₂ y **B** es la emisión de N₂O en el control, se multiplicó por 4 y se dividió entre 5, ya que se consideró el hecho de que se requiere un electrón más para reducir el N₂O a N₂ (Dendooven y Anderson, 1995).

Las concentraciones de NO_3^- , NO_2^- y N_2O se sometieron a un análisis unidireccional de varianza (ANOVA), utilizando PROC GLM (SAS Institute, 1989), para probar las diferencias significativas entre los tratamientos con una prueba post-hoc de Tukey. Las diferencias significativas entre los tratamientos de NO_3^- y las tasas de producción de N_2O se determinaron utilizando PROC GLM (SAS Institute, 1989). Cada punto en las cifras indica el promedio de nueve mediciones, es decir, datos de tres parcelas por triplicado ($n = 3$).

3.6 Análisis moleculares

De cada réplica de los microcosmos se tomó 1 g de suelo y se hizo una mezcla por cada tratamiento y tiempo. De esta muestra compuesta se tomaron 0.25 g de suelo y se utilizó el kit de extracción de DNA Ultra Clean Soil DNA isolation kit® (MoBio, IECSA, México). Posteriormente, estas extracciones se corrieron en geles de agarosa al 1% y el resultado capturado con el Software Quantity One® de Bio-Rad (Laboratorios Bio-Rad, Inc.). El DNA fue cuantificado en un biofotómetro a 260 nm (Eppendorf®), para después hacer amplificaciones con oligonucleótidos específicos (Tabla 4) de los genes *nosZ* y 16S rDNA mediante la técnica de PCR. Ésta fue realizada en un termociclador Mastercycler®, marca Eppendorf.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes *nosZ* y 16S rDNA

Gen	Primer	Posición	Secuencia (5'-3') ^d
<i>nosZ</i>	nosZ-F ^a	1169-1188	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG
	nosZ-R ^a	1849-1869	CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA
	nosZ-R GC ^b	1849-1869	CGGCGCGCCGCCCCGCCCCGCCCCCGTGC CCCATGTGCAGNGCRTGGCAGAA
16S rDNA	1070F ^c	1070-1085	ATGGCTGTCGTCAGC
	1392R ^c	1392-1378	ACGGGCGGTGTGTA
	1392R-GC ^b	1392-1378	ACGGGCGGTGTGTAGCCCCGCCGCGCCCC GCGCCCCGCCCCGCCGCCCCCGCCC

^a La posición de los oligonucleótidos en el gen *nosZ* se expresa con referencia a la secuencia de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 (número e acceso X65277), basado en Throbäck *et al.*, 2004

^b Oligonucleótidos con grapa

^c Oligonucleótidos basados en Ferris *et al.*, 1996

^d Secuencias de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC, V=A+C+G, N=A+C+G+T, D=A+T+G, B=T+C+G, H=A+T+C, W=A+T, S=C+G, K=T+G, M=A+C, Y=C+T, R=A+G

Las condiciones del PCR fueron determinadas tomando en consideración los tiempos de desnaturalización, alineamiento y extensión escritos en la Tabla 5. Cada reacción contuvo 1 X de amortiguador (Green go Taq buffer®), 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 100 pmol de cada oligonucleótido (*nosZ*-F y *nosZ*-R), 200 ng de DNA y 2 U de polimerasa (Go Taq Flexi DNA polymerase ® Cat. M8295). Con las condiciones descritas y después de obtener las amplificaciones, estas mismas reacciones se utilizaron como molde y se hicieron amplificaciones anidadas con un primer reverso que tiene en el extremo 5' una grapa G-C (Tabla 4), que le permitirá mantener unidas la doble cadena de ADN durante el DGGE.

Tabla 5. Programas utilizados para amplificar al gen *nosZ* y 16S rDNA

	Temperatura	Ciclos	Tiempo
<i>nosZ</i>	94 °C	1	5 min
	94 °C	30	1 min
	58 °C	30	45 s
	72 °C	30	1 min
	72 °C	1	5 min
16S rDNA	94 °C	1	5 min
	94 °C	30	40 s
	54 °C	30	40 s
	72 °C	30	30 s
	72 °C	1	5 min

Para los análisis de DGGE, las amplificaciones con grapa de cada gen fueron aplicadas en geles de acrilamida; para *nosZ* se utilizó un gradiente 45% - 60% con 6% de acrilamida: bis-acrilamida (37.5:1) durante 22 horas a 67 volts. Para 16S rDNA el gradiente fue de 60 % - 80 % con 6% de acrilamida: bis-acrilamida (37.5:1), durante 16 horas a 67 volts. Posterior a la electroforesis, los geles fueron revelados en un baño de SYBR-Gold® con una concentración 1:1000 v/v durante 1 hora. Las imágenes digitales fueron analizadas en el software Quantity One® de Bio-Rad. Posteriormente se cortaron las bandas visibles, se resuspendieron en 20 µl de agua destilada, se incubaron durante 24 h a 4°C y finalmente se realizaron amplificaciones con los oligonucleótidos específicos de *nosZ* y 16S rDNA. Los productos de PCR se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, bajo las indicaciones del fabricante, y los amplificados posteriormente se secuenciaron por el método Dideoxy chain-termination, en un secuenciador modelo ABI 373A (Applied Biosystems, Perkin-Elmer).

3.7 Análisis de datos moleculares

Una vez que fueron obtenidas las secuencias de *nosZ* y 16S rDNA, estas fueron estudiadas en un programa que determina la posible existencia de quimeras (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-bel3_interface.cgi), descartándose esa posibilidad en estas secuencias. A continuación fueron comparadas mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con las secuencias contenidas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Las secuencias de aminoácidos utilizadas para *nosZ* fueron obtenidas traduciendo la secuencia nucleotídica. Se hicieron análisis BLAST específicos a nivel de aminoácido para las secuencias parciales del gen *nosZ* y a nivel de nucleótido para el 16S rDNA. En ambos casos se eligieron secuencias ambientales, de las cuales se eligieron aquellas con un porcentaje de identidad igual o mayor al 90%. Para la construcción de los dendrogramas, las secuencias (proteínicas y nucleotídicas) fueron alineadas con el programa Seaview y posteriormente se eligió el modelo evolutivo más apropiado empleando el criterio de información de Akaike (AIC), utilizando para *nosZ* el programa ProTest versión 2.4 (Abascal *et al.*, 2007) y el programa jModelTest 0.1 (Posada *et al.*, 2008) para las secuencias de 16S rDNA.

Los alineamientos se analizaron por Máxima verosimilitud, empleando el modelo de sustitución WAG (Whelan y Goldman, 2001) para *nosZ* y el modelo GTR (General Time Reversible) para 16S rDNA con el programa en línea PhyML 3.0 (Guindon *et al.* 2010). Los árboles filogenéticos fueron trazados con el programa Tree View (Page, 1996).

Para determinar las relaciones en los patrones de bandeo derivados de la técnica de DGGE, se realizaron matrices binarias 0-1 (0 ausencia, 1 presencia), que fueron analizadas con el programa SpitsTree (Huson *et al.*, 2006), bajo un método NJ (Neighbor-joining).

RESULTADOS

4.1 Determinación físico-química del sitio de estudio

Las muestras tomadas de las chinampas de Xochimilco mantuvieron altas concentraciones de NO_3^- y carbono orgánico (Tabla 6) y un pH neutro, las cuales son condiciones determinantes de los procesos de desnitrificación. Sin embargo, se debe considerar que los ciclos biogeoquímicos son procesos dinámicos que actúan en un sistema abierto y complejo.

Tabla 6. Caracterización del sitio de estudio en chinampas de Xochimilco

Densidad		Temperatura (en el día)	CE ^a (dS m ⁻¹)	pH	Textura clasificación
Real (g/cm ³)	Aparente				
0.76	2.25	25°C	1.33	7.3	Migajón arenoso

N Total	NH ₃ ⁺	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	TOC ^b	CRA ^c %
(mg kg ⁻¹ suelo seco)					
6390	4.41	74.69	0.26	16.41	123.21

^a CE: Conductividad eléctrica
^b TOC : Carbono orgánico total
^c CRA : Capacidad de retención de agua

4.2 Concentración de NO_2^- y NO_3^-

Las cinéticas de desnitrificación, con y sin plaguicida, realizadas en suelo agrícola de las chinampas mostraron una disminución del NO_3^- en todos los tratamientos a lo largo del tiempo de estudio (Fig. 9). Sin embargo en el suelo sin metil paratión (SMP), la disminución de la concentración de NO_3^- fue similar en todos los tratamientos, sin diferencias significativas entre ellos (Tabla 7). En el caso del suelo con metil paratión (CMP), la disminución de la concentración de NO_3^- fue más lenta en el suelo acondicionado aeróbicamente durante 7 días y más rápida en el

suelo que se incubó durante 28 días. En el caso de los tratamientos control (CON), con acetileno (ACE), con cloranfenicol (CH) y con cloranfenicol + acetileno (CHA) no se observa ningún efecto significativo sobre la concentración de NO_3^- en el suelo (Tabla 7).

Durante las incubaciones anaeróbicas, en algunos tratamientos se observó un aumento del NO_2^- p a lo largo del tiempo de estudio. Sin embargo, estos incrementos no siguen un patrón claro (Fig. 10). Al hacer las observaciones de manera general, durante la incubación aeróbica se pudo determinar que la concentración de NO_2^- en el suelo SMP fue significativamente mayor en los días 0 y 7 que en los días 14 y 28 (Tabla 7). En el suelo CMP, por su parte, la concentración media de NO_2^- fue significativamente mayor en el día 7 que en los días 14 y 28, pero significativamente menor que en el inicio del experimento ($p < 0.05$). En el suelo SMP, la concentración media de NO_2^- fue mayor cuando éste contenía acetileno más cloranfenicol (para el mismo tratamiento, la concentración fue más baja en el suelo SMP que en el suelo CMP). En el suelo CMP, la concentración de NO_2^- aumentó significativamente cuando se utilizó cloranfenicol. De manera global, se observó que la concentración de NO_2^- fue significativamente mayor en el suelo CMP que en el suelo SMP ($p < 0.05$) (Tabla 8).

4.3 Emisión de N_2O y N_2

La emisión de N_2O aumentó con el tiempo, comportándose como una cinética de orden cero (Fig. 11). En las gráficas se observó que la concentración de N_2O aumentó después de 24 h en el suelo CMP tratado con acetileno. En el suelo SMP, la tasa de emisión de N_2O fue significativamente mayor en el inicio del experimento (Día 0) que en los tiempos posteriores de las incubaciones aeróbicas, días 7, 14 y 28 (Tabla 7). En el suelo CMP, la mayor tasa de emisión de N_2O se encontró a los 7 días de incubación aeróbica. La emisión de N_2O fue significativamente mayor en el suelo CMP que en el suelo SMP ($p < 0.05$) (Tabla 8).

La producción de N_2 aumentó con el tiempo, pareciéndose también a una cinética de orden cero (Fig. 10). Sin embargo, en el suelo CMP en el día 7, se observó una emisión mayor de N_2 a las 24 h. La emisión de N_2 también fue significativamente mayor en el suelo CMP que en el suelo SMP ($p < 0.05$) (Tabla 8).

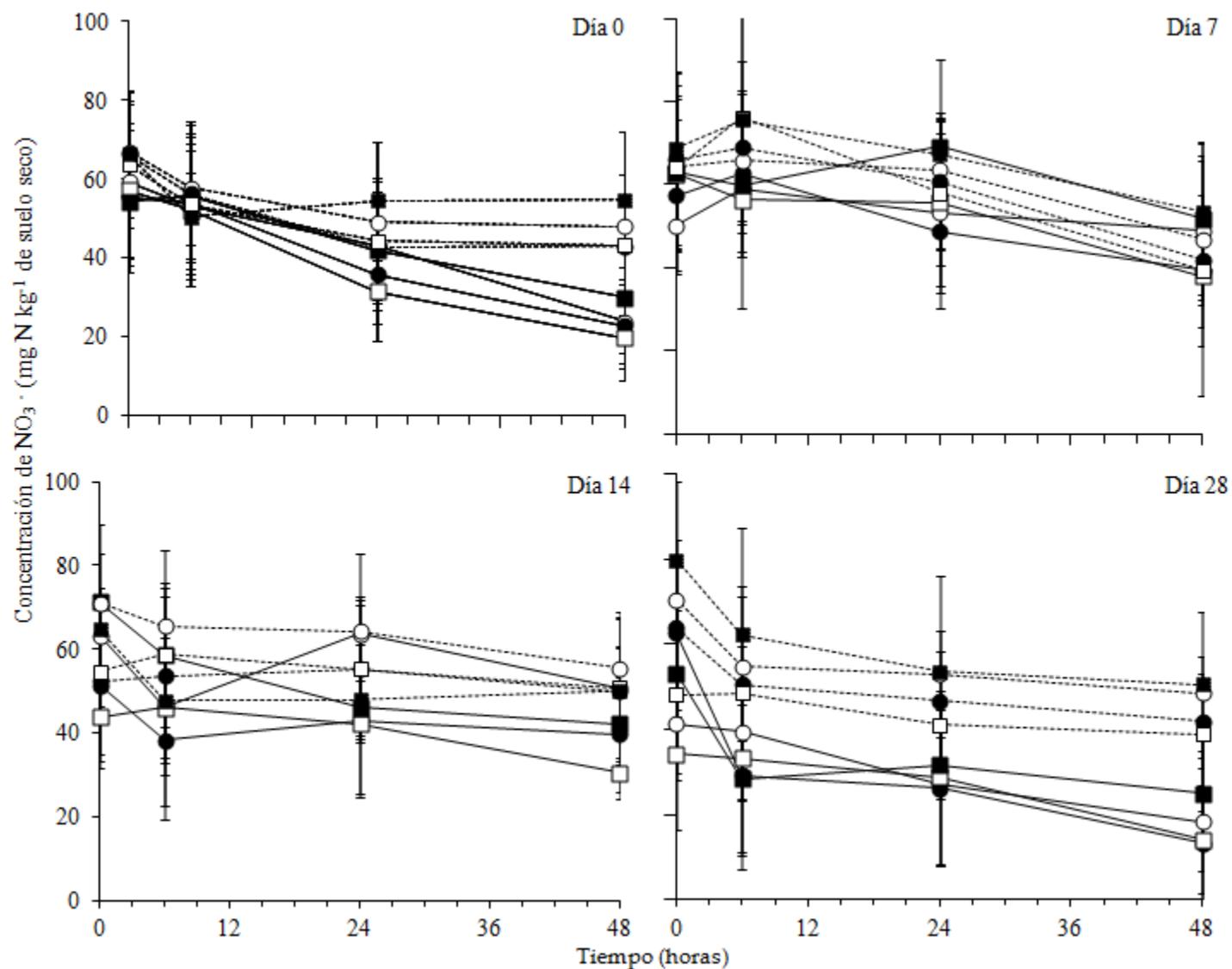
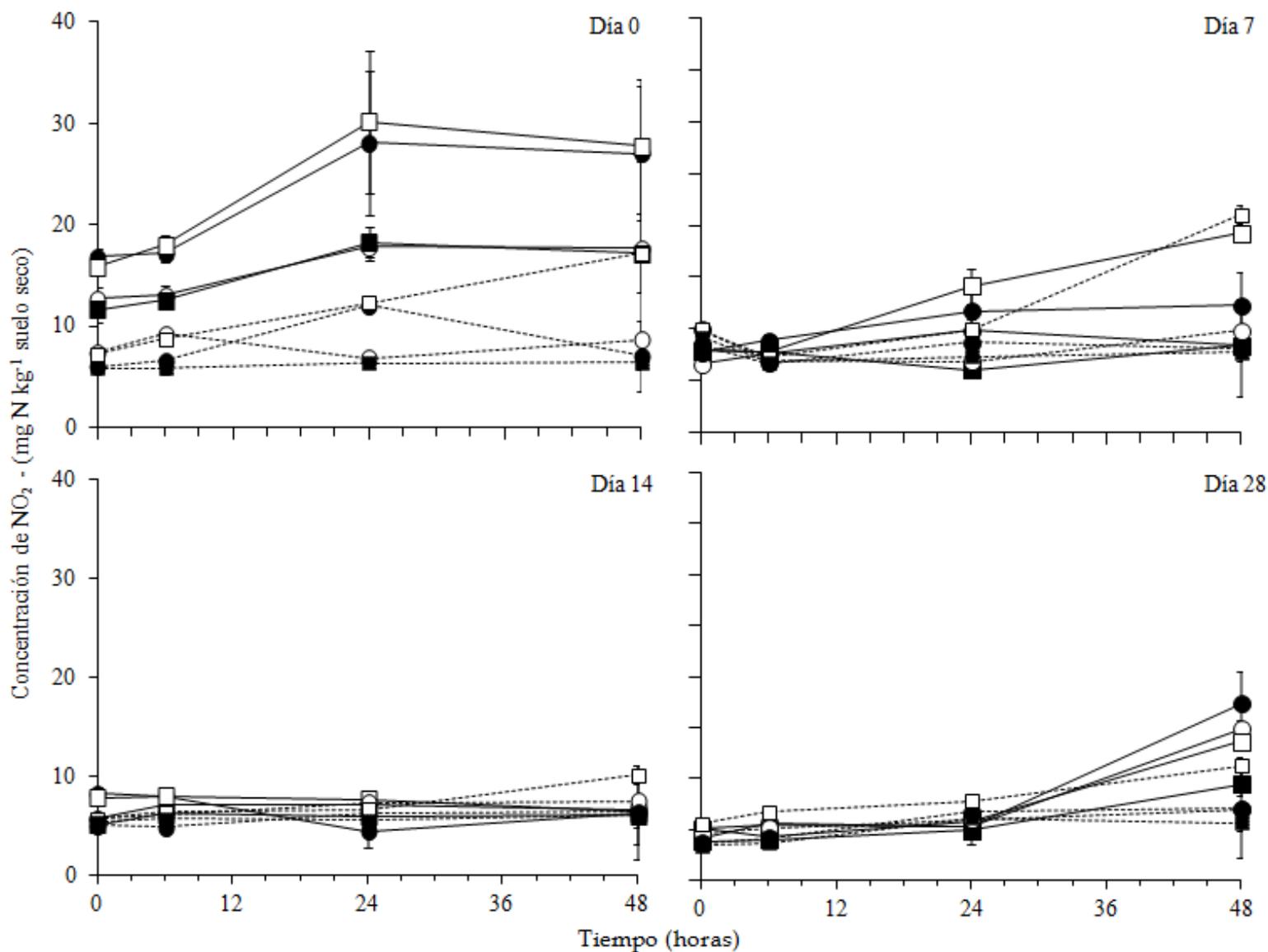
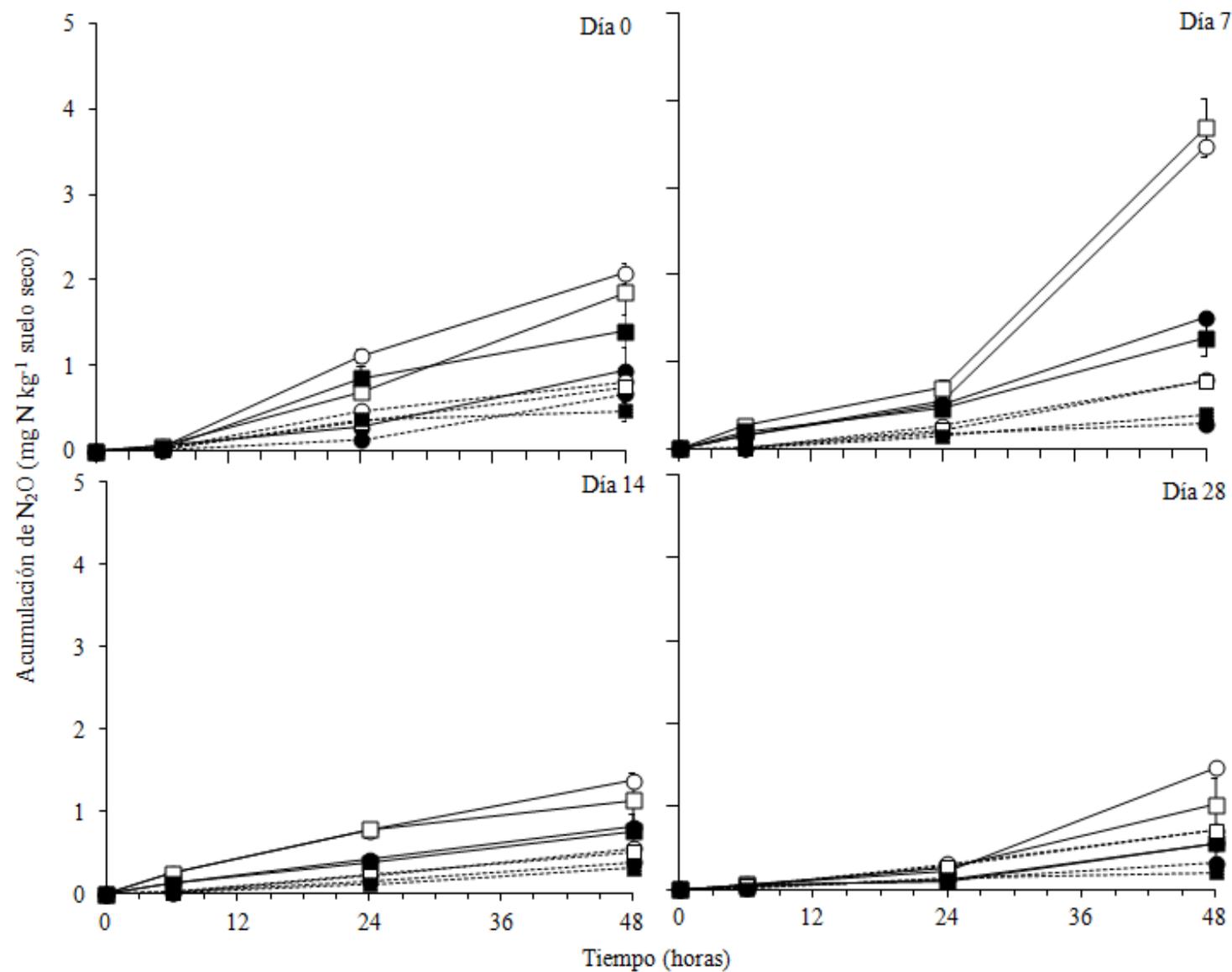


FIGURA 9. Gráfica de NO_3^-

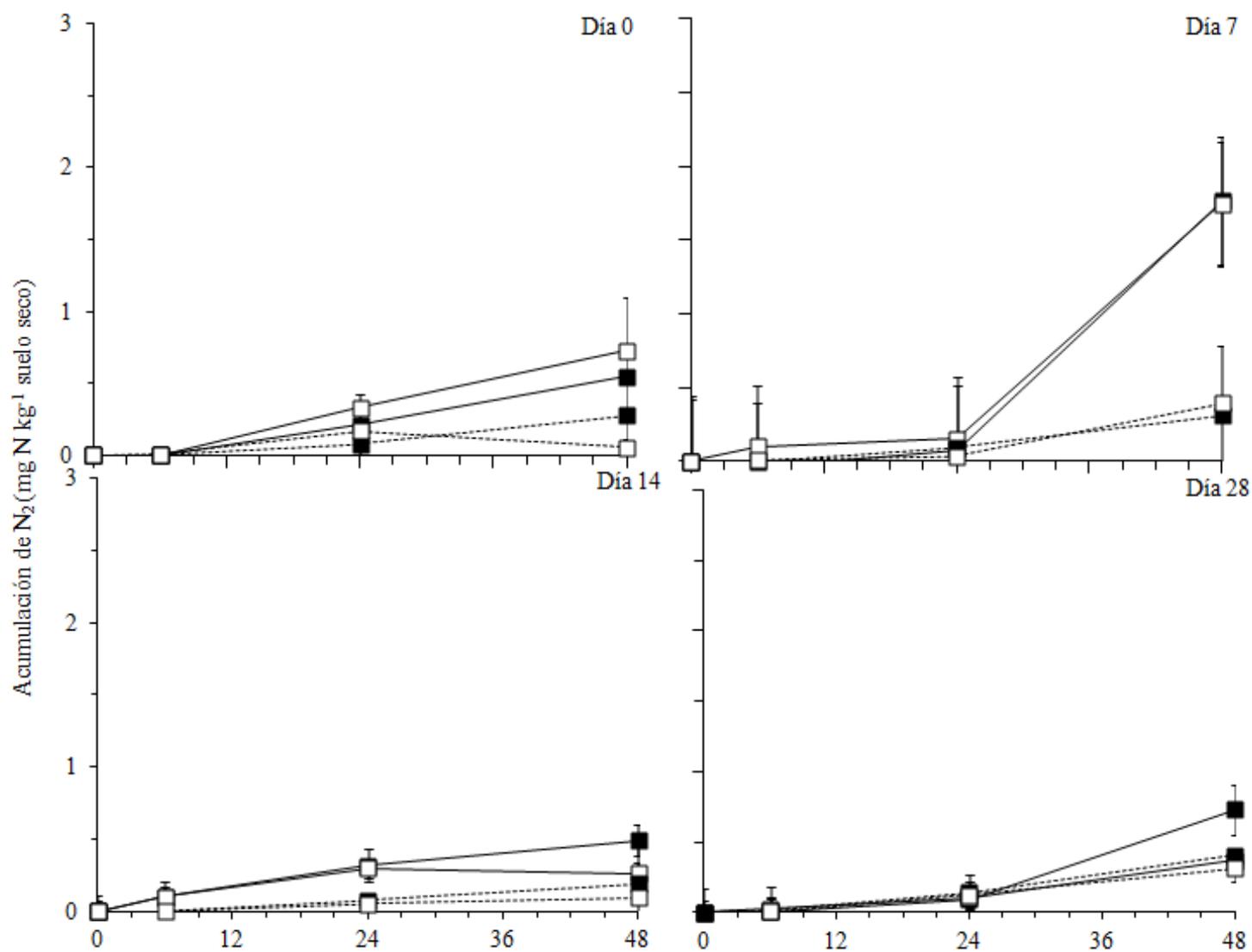
Concentración de NO_3^- (mg N kg^{-1} suelo) en suelo incubado anaeróbicamente por 48 h. Las líneas punteadas representan el suelo CMP y las continuas el suelo SMP, los tratamientos se simbolizan como: CON (■), ACE (○), CH (●) y CHA (□). Error estándar ± 1 con $p < 0.05$ y $n = 3$.

FIGURA 10. Gráfica de NO_2^-

Concentración de NO_2^- (mg N kg^{-1} suelo) en suelo incubado anaeróbicamente por 48 h. Las líneas punteadas representan el suelo CMP y las continuas el suelo SMP, los tratamientos se simbolizan como: CON (■), ACE (○), CH (●) y CHA (□). Error estándar ± 1 con $p < 0.05$ y $n = 3$.

FIGURA 11. Gráfica de N_2O

Concentración de N_2O (mg N kg⁻¹ suelo) en suelo incubado anaeróbicamente por 48 h. Las líneas punteadas representan el suelo CMP y las continuas el suelo SMP, los tratamientos se simbolizan como: CON (■), ACE (○), CH (●) y CHA (□). Error estándar ± 1 con $p < 0.05$ y $n = 3$.

FIGURA 12. Gráfica de N_2

Concentración de N_2 ($mg\ N\ kg^{-1}$ suelo) en suelo incubado anaeróbicamente por 48 h. Las líneas punteadas representan el suelo CMP y las continuas el suelo SMP, los tratamientos se simbolizan como: CON (■) y CH (●). Error estándar ± 1 con $p < 0.05$ y $n = 3$.

Tabla 7. Efecto del tiempo de acondicionamiento aeróbico (cada 0, 7, 14 y 28 días) y el tratamiento (control, acetileno, cloranfenicol y cloranfenicol + acetileno), sobre la media de las concentraciones de NO_2^- y NO_3^- (mg N kg^{-1} de suelo) y las tasas de producción de N_2O (mg N kg^{-1} de suelo h^{-1}) en suelos con y sin metil paratión. Incubaciones anaeróbicas de 48 h con temperatura constante de 25°C .

Muestreo	Concentración NO_2^-		Concentración NO_3^-		Emisión de N_2O		
	SMP	CMP	SMP	CMP	SMP	CMP	
	-- mg N kg^{-1} suelo--		----- mg N kg^{-1} suelo-----				
Día 0	8.3 A ^c	18.8 A	-0.39 A	-0.60 BC	0.014 A	0.032 B	
Día 7	9.1 A	9.4 B	-0.27 A	-0.10 A	0.011 B	0.043 A	
Día 14	6.4 B	6.7 B	-0.26 A	-0.25 AB	0.009 B	0.022 C	
Día 28	5.9 B	7.2 B	-0.42 A	-0.83 C	0.010 B	0.016 C	
MSD ^d	1.6	3.0	SEE ^e	0.19	0.20	0.001	0.003
Tratamiento							
CON	6.1 B	8.5 A	-0.23 A	-0.33 A	0.007 B	0.020 B	
CH	7.2 B	9.4 A	-0.25 A	-0.50 A	0.014 A	0.038 A	
ACE	6.8 B	11.9 A	-0.39 A	-0.53 A	0.008 B	0.018 B	
CHA	9.6 A	12.3 A	-0.42 A	-0.59 A	0.014 A	0.034 A	
MSD	1.6	3.9	SEE	0.19	0.21	0.001	0.003

^a SMP: sin metil paratión,

^b CMP: con metil paratión,

^c Valores con la letra mayúscula igual no presentan diferencia significativa entre columnas $p < 0.05$

^d MSD: Mínima diferencia significativa ($p < 0.05$),

^e SEE: Error estándar de las estimaciones ($p < 0.05$)

Tabla 8. Efecto del metil paratión sobre las medias de las concentraciones de NO_2^- y NO_3^- (mg N kg^{-1} suelo) y los rangos de producción de N_2O y N_2 (mg N kg^{-1} suelo h^{-1}) en muestreos cada 0, 7, 14 y 28 días y con diferentes tratamientos control, cloranfenicol, acetileno y cloranfenicol + acetileno. Incubaciones anaeróbicas de 48 h con temperatura constante de 25°C.

	Concentración		Emisión		
	NO_2^- mg N kg^{-1} suelo	NO_3^- ----- mg N kg^{-1} suelo día ⁻¹ -----	N_2O	N_2	$\text{N}_2 + \text{CHL}^a$
SMP	7.4 B ^b	-0.21 A	0.011 B	0.009 B	0.005 B
CMP	10.5 A	-0.58 B	0.028 A	0.015 A	0.012 A
MSD^c	1.2	SEE ^d 0.10	0.001	0.002	0.001

^a Cloranfenicol

^b Valores con la letra mayúscula igual no presentan diferencia significativa entre columnas $p < 0.05$

^c MSD: Mínima diferencia significativa ($p < 0.05$)

^d SEE: Error estándar de las estimaciones ($p < 0.05$)

4.4 Análisis de los patrones de bandeado de los DGGE's

A las muestras de suelo con y sin plaguicida se les extrajo el DNA microbiano total (Fig. 13) en cada uno de los tiempos (0, 6, 24 y 48 horas para cada uno de los días 0, 6, 24 y 48) y tratamientos (CON, CH, ACE y CHA) de la cinética de desnitrificación.

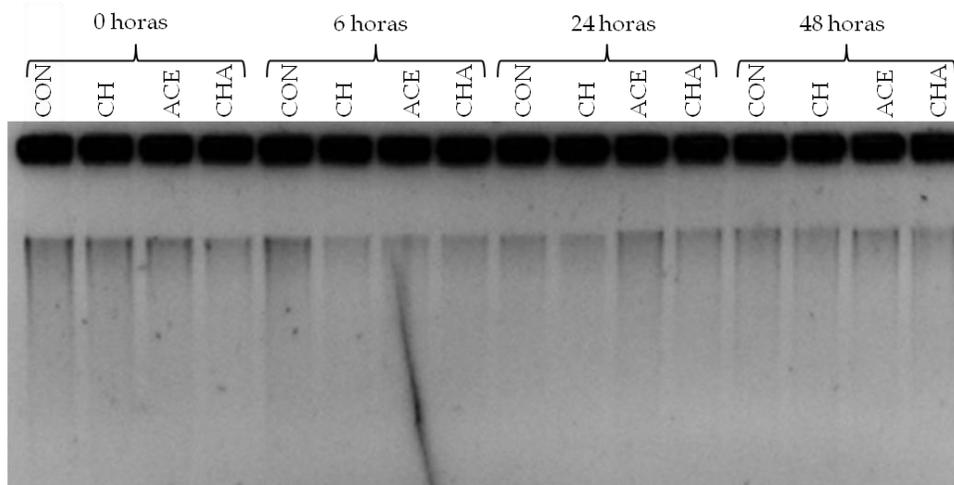


FIGURA 13. Extracciones de DNA en gel de agarosa al 1%.

Electroforesis representativa del día 0 en suelo sin plaguicida. En la parte superior se indican las muestras.

De las extracciones de DNA se hicieron las amplificaciones específicas para los genes 16S rDNA y *nosZ* (Fig. 14), los amplicones obtenidos fueron utilizados como molde para un segundo ciclo de amplificación (Figuras 15, 16, 17 y 18).

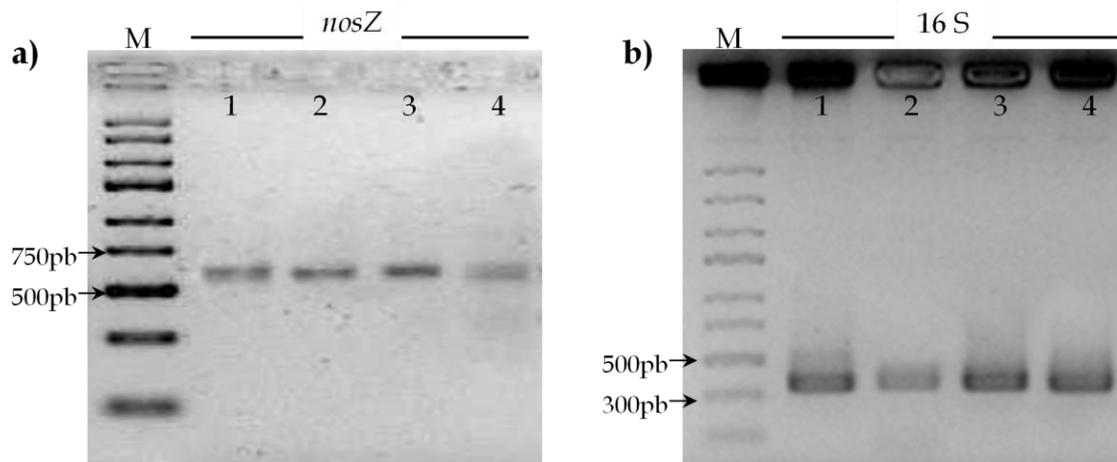


FIGURA 14. PCR de *nosZ* y 16S.

Representación de las amplificaciones realizadas, analizadas en geles de agarosa al 1%. El gen detectado está indicado en la parte superior, al lado izquierdo se localiza el marcador de peso molecular.

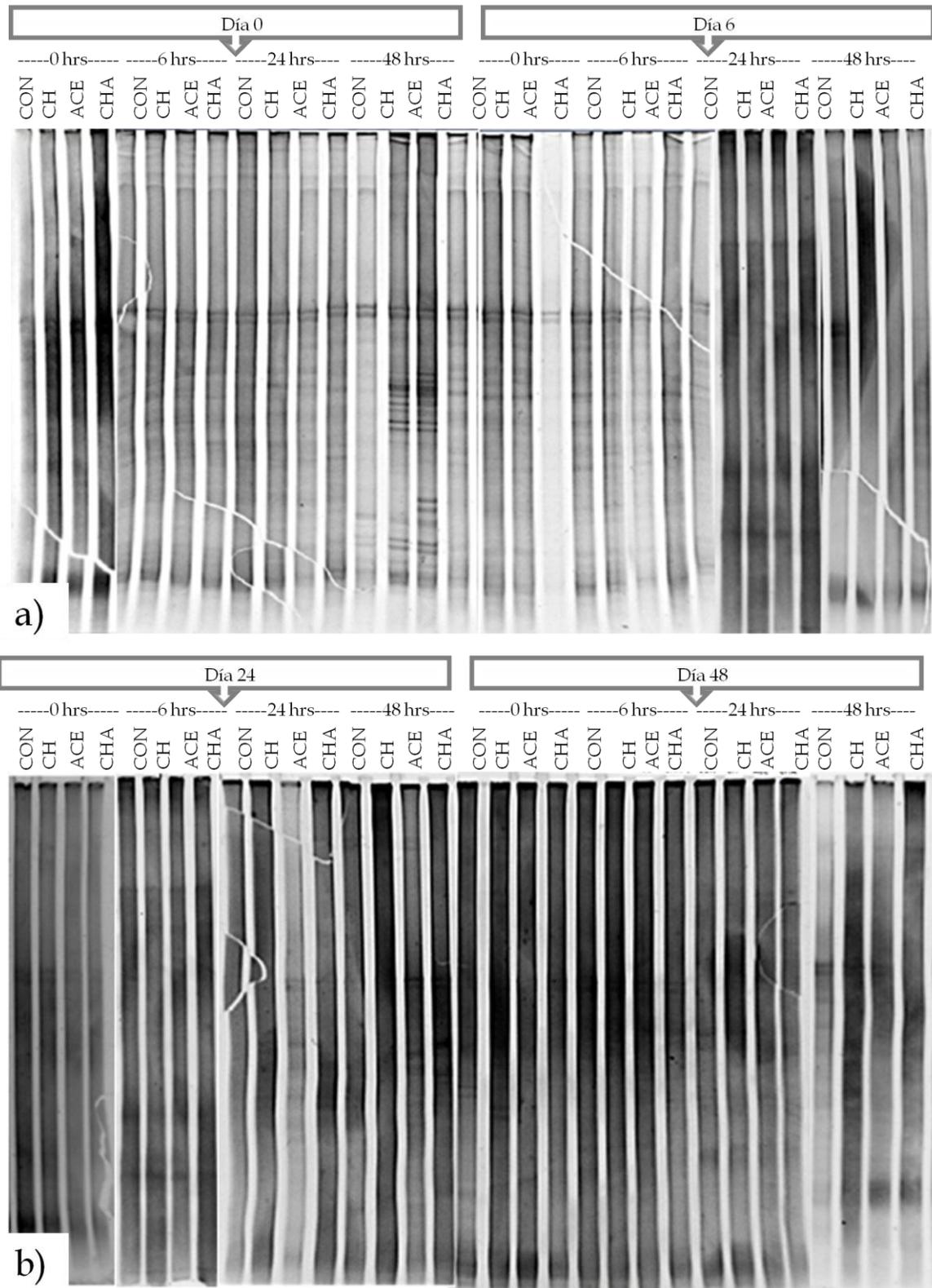


FIGURA 15. DGGE para el gen *nosZ* en muestras sin plaguicida
 Gradiente de desnaturalización 45%-60%; a) días 0 y 6 y b) días 24 y 48. Fotos sobre-expuestas.

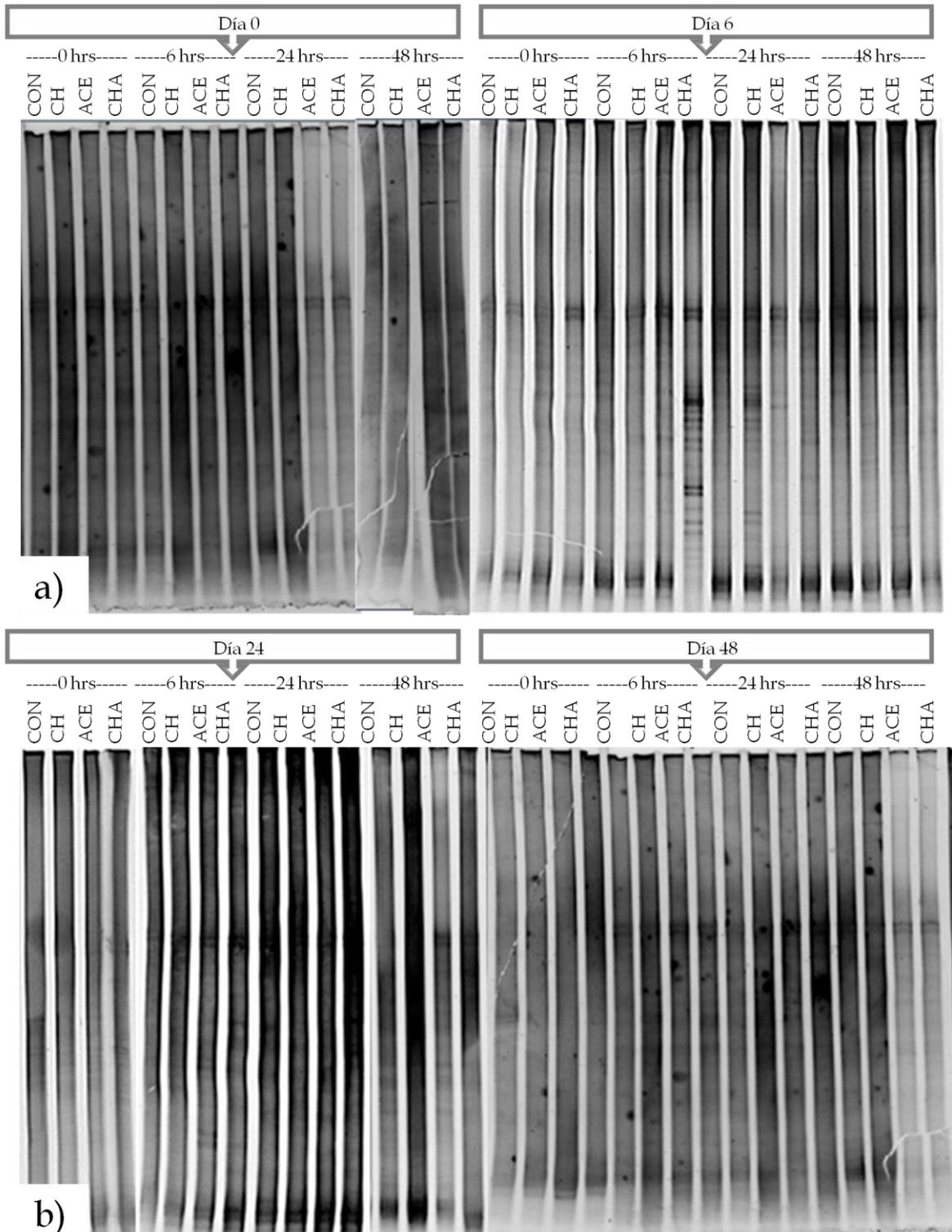


FIGURA 16. DGGE para el gen *nosZ* en muestras con plaguicida
 Gradiente de desnaturalización 45%-60%; a) días 0 y 6 y b) días 24 y 48. Fotos sobre-expuestas.

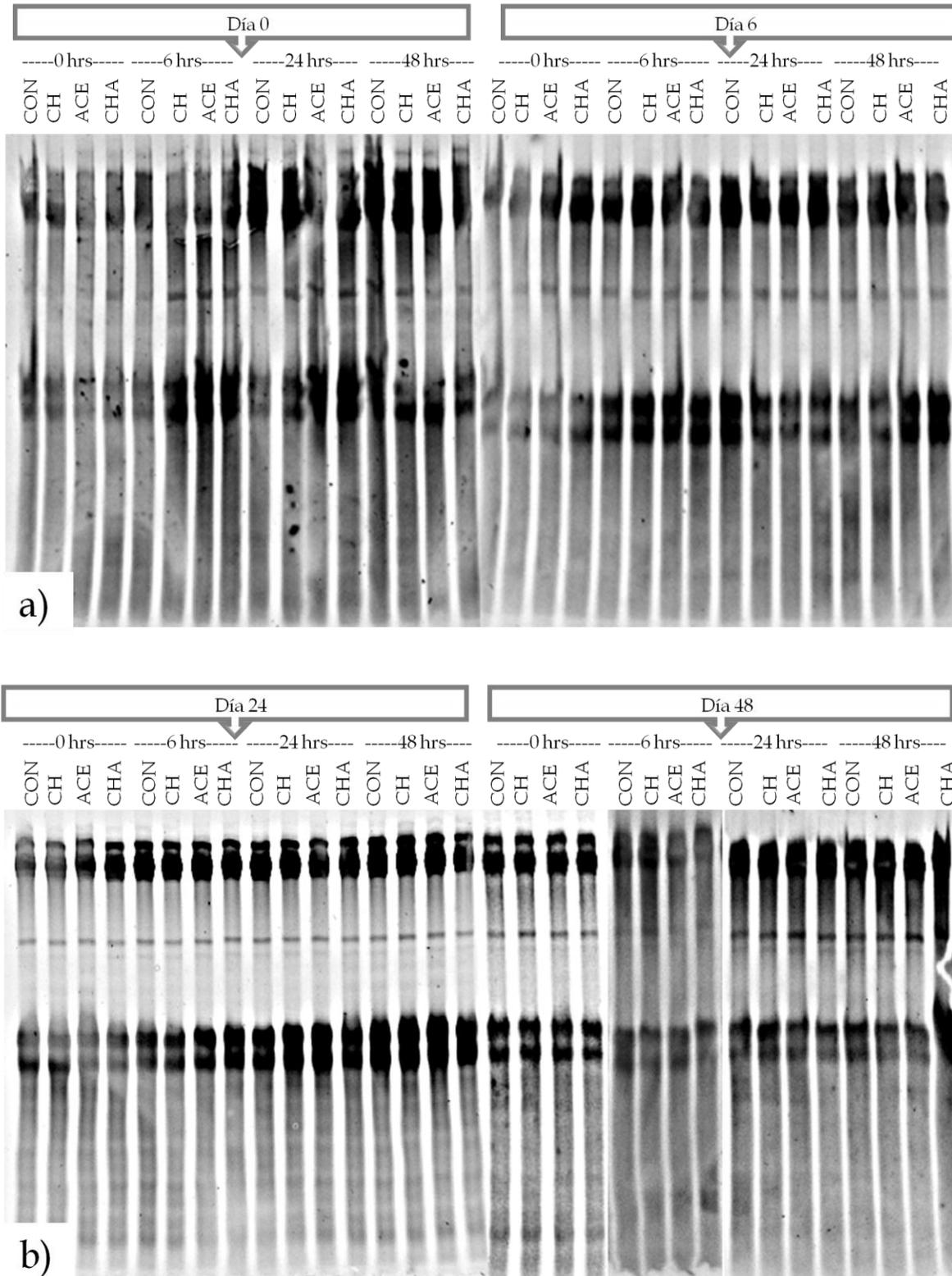


FIGURA 17. DGGE para el gen 16S rDNA en muestras sin plaguicida
 Gradiente de desnaturación 60%-80%; a) días 0 y 6 y b) días 24 y 48. Fotos sobre-expuestas

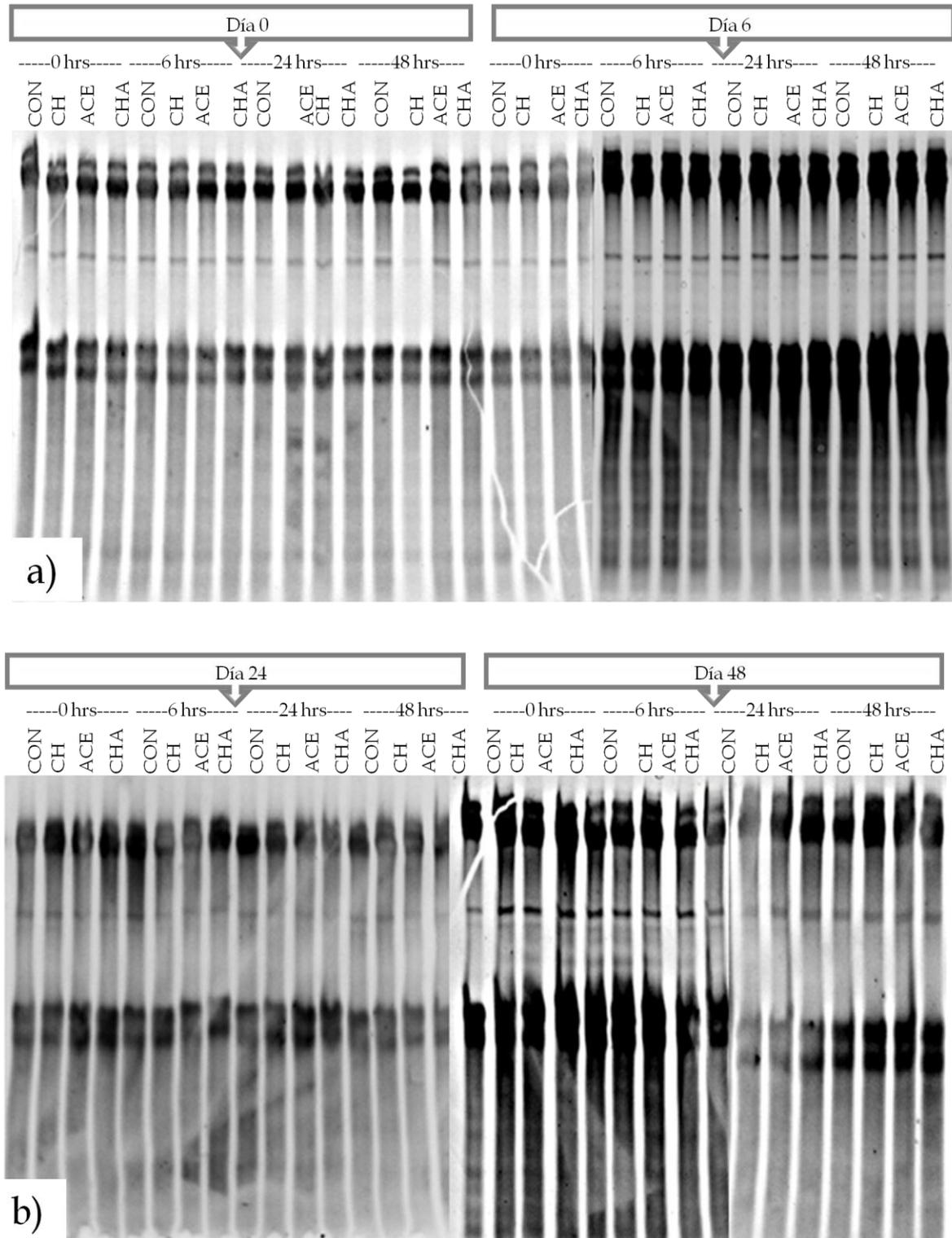


FIGURA 18. DGGE para el gen 16S rDNA en muestras con plaguicida
 Gradiente de desnaturalización 60%-80%; a) días 0 y 6 y b) días 24 y 48. Fotos sobre-expuestas.

Debido a los diferentes patrones de bandeo observados para el gen *nosZ*, se utilizaron en cada uno de los DGGE tres controles como referencia, los cuales corresponden al tratamiento control, con cloranfenicol y con acetileno sin plaguicida del día 0 a las 48 hrs (Figura 19a). Dado que el patrón de bandeo fue igual para el rDNA 16S, sólo se utilizó como referencia la muestra control sin plaguicida del día 24 a las 0 hrs (Fig. 19b). Las bandas indicadas con color en la figura 19 son aquellas de las que se obtuvo su secuencia de nucleótidos y las únicas que se consideraron para los análisis de patrones de bandeo de los geles.

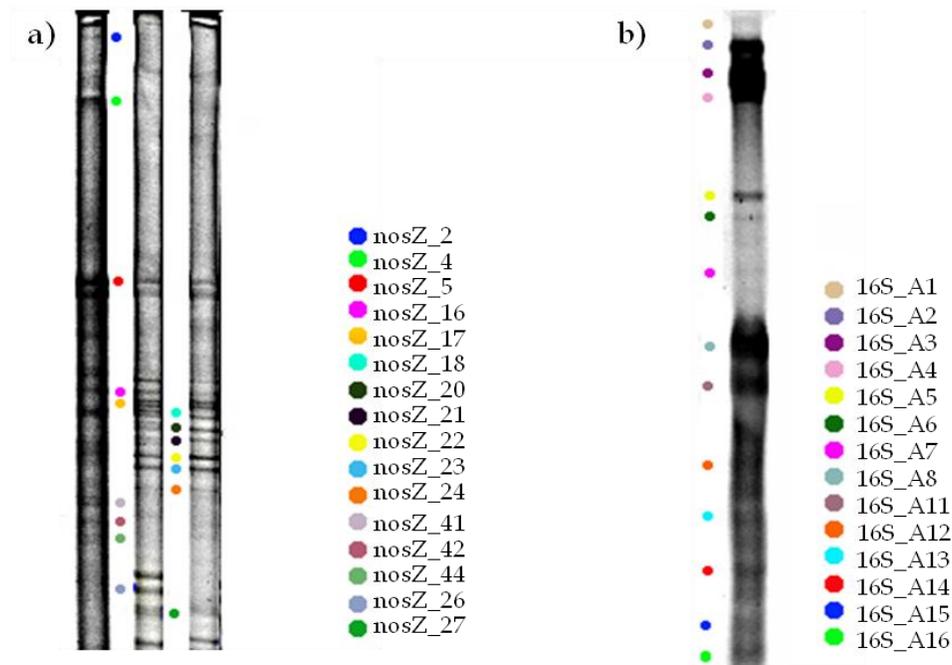


FIGURA 19. Muestras utilizadas como referencia en los DGGE del gen *nosZ* y el 16S rDNA
Las bandas indicadas con los diferentes colores son las que se cortaron y analizaron; a) bandas cortadas del gen *nosZ* y b) bandas cortadas del gen 16S rDNA.

En los análisis de las bandas de los DGGE para el gen *nosZ* se pudo observar la agrupación de aquellas muestras que comparten un patrón, con base a la presencia o ausencia de bandas (Fig. 20a y 21). En todos los geles con y sin plaguicida se encontraron las bandas *nosZ_2*, *nosZ_4* y *nosZ_5*. La figura 20b esquematiza como se da este cambio, desde la condición mínima en todos los tratamientos de las muestras sin plaguicida iniciales y en los tratamientos ACE y CHA del cuarto día de muestreo a las 0 h hasta la condición de presencia en todas las bandas, representada por la muestra CH del primer día a las 48 hrs.



FIGURA 20. Relación de bandas de los DGGE del gen *nosZ* en muestras sin metil paratión (a) y con metil paratión (b)

En esta figura se representan con dos tipos de árboles las bandas encontradas. Los días de muestreo 0, 6, 24 y 48 están indicados como 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

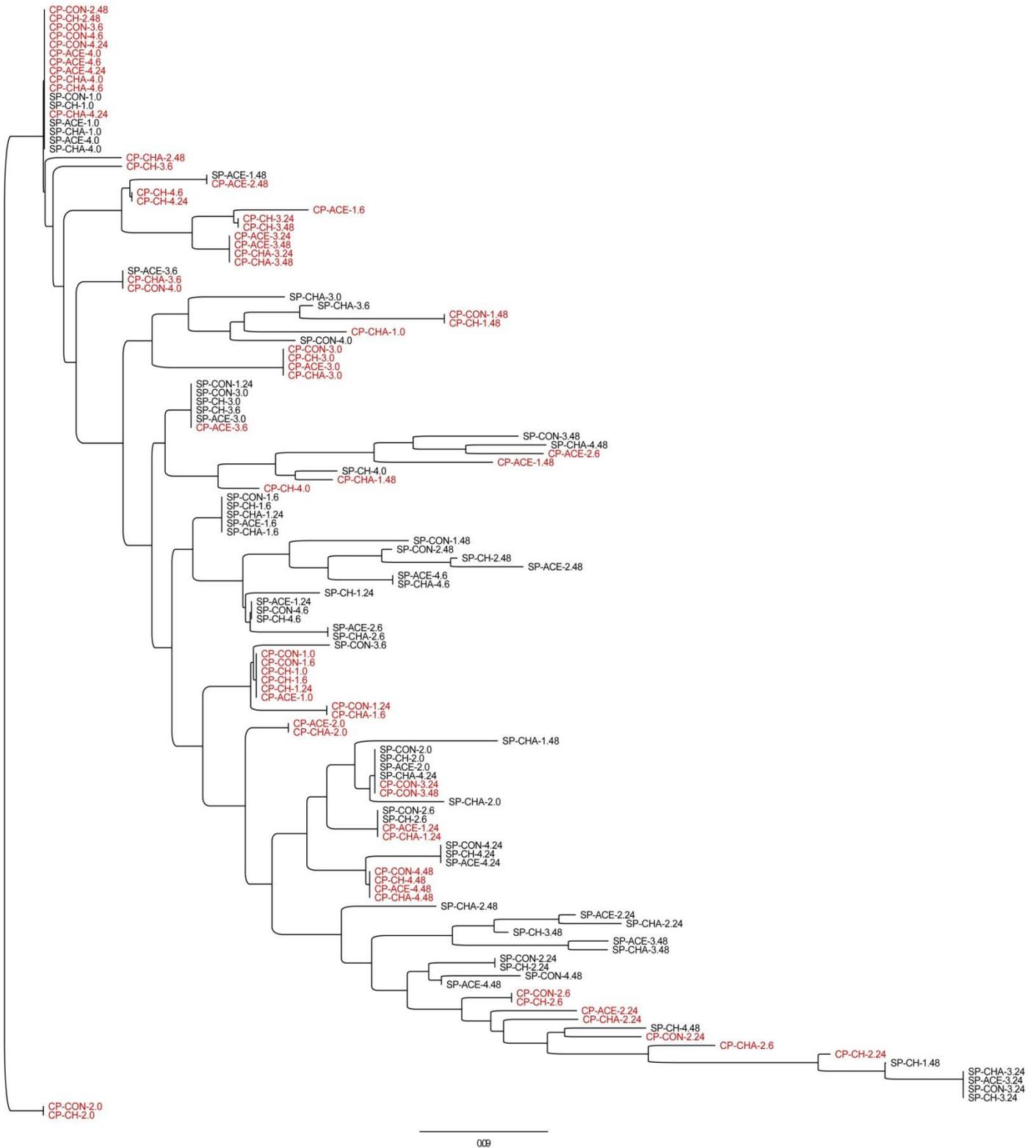


FIGURA 21. Relación de bandas de los DGGE del gen *nosZ* en muestras con y sin metil paratión
 Los días de muestreo 0, 6, 24 y 48 están indicados como 1, 2, 3 y 4, respectivamente. En rojo se ubican las muestras con plagiocida y en negro las muestras sin plagiocida.

Los análisis de los patrones de bandeo de los geles de DGGE fueron representados en dendogramas independientes para muestras sin metil paratión (Fig. 20a) y con metil paratión (Fig. 20b). Además se contruyó un dendograma para analizar juntas las muestras con y sin plaguicida (Fig. 21). En estos análisis se observó que las bandas no mostraron un patrón de agrupamiento que se correlacionara con el tratamiento y/o tiempo.

Se construyeron dendogramas para muestras con y sin plaguicida (Fig. 22a y b) tomando como base la frecuencia de las bandas a lo largo del tiempo y tratamiento de la cinética de desnitrificación, en las muestras sin metil paratión (Fig. 22a) se encontró que se separaban tres grupos; el primero representado por las bandas nosZ_2, nosZ_4 y nosZ_5, el segundo por las muestras nosZ_18, nosZ_24 y nosZ_41 y finalmente el que contiene a las bandas nosZ_16, nosZ_17, nosZ_20, nosZ_21, nosZ_22, nosZ_23, nosZ_26, nosZ_27, nosZ_42 y nosZ_44.

El dendograma que tiene representadas a las bandas con metil paratión (Fig. 22b) presenta dos grupos, en el primero están contenidas las muestras nosZ_2, nosZ_4 y nosZ_5 y en el segundo se encuentran las bandas nosZ_16, nosZ_17, nosZ_18, nosZ_20, nosZ_21, nosZ_22, nosZ_23, nosZ_24, nosZ_26, nosZ_27, nosZ_42 y nosZ_44.

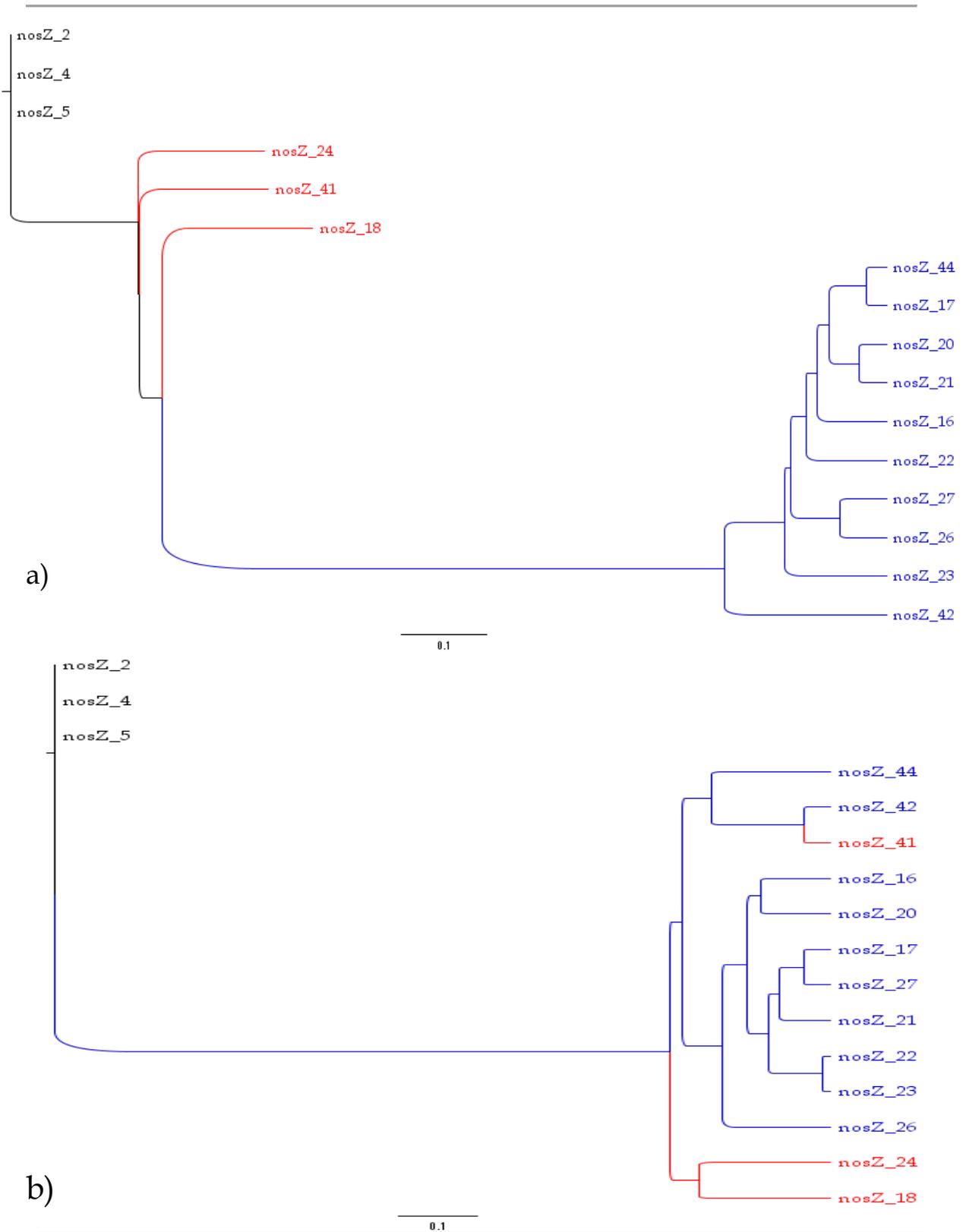


FIGURA 22. Relación de bandas en función del tiempo de los DGGE del gen *nosZ* en muestras sin metil paración (a) y con metil paración (b)

Los DGGE para el gen 16S rDNA en muestras con y sin metil paratión mostraron un patrón de bandeo igual para todos los tratamientos y tiempos, por lo tanto los dendrogramas sólo presentaron una agrupación donde están contenidas todas las bandas (Fig. 23).

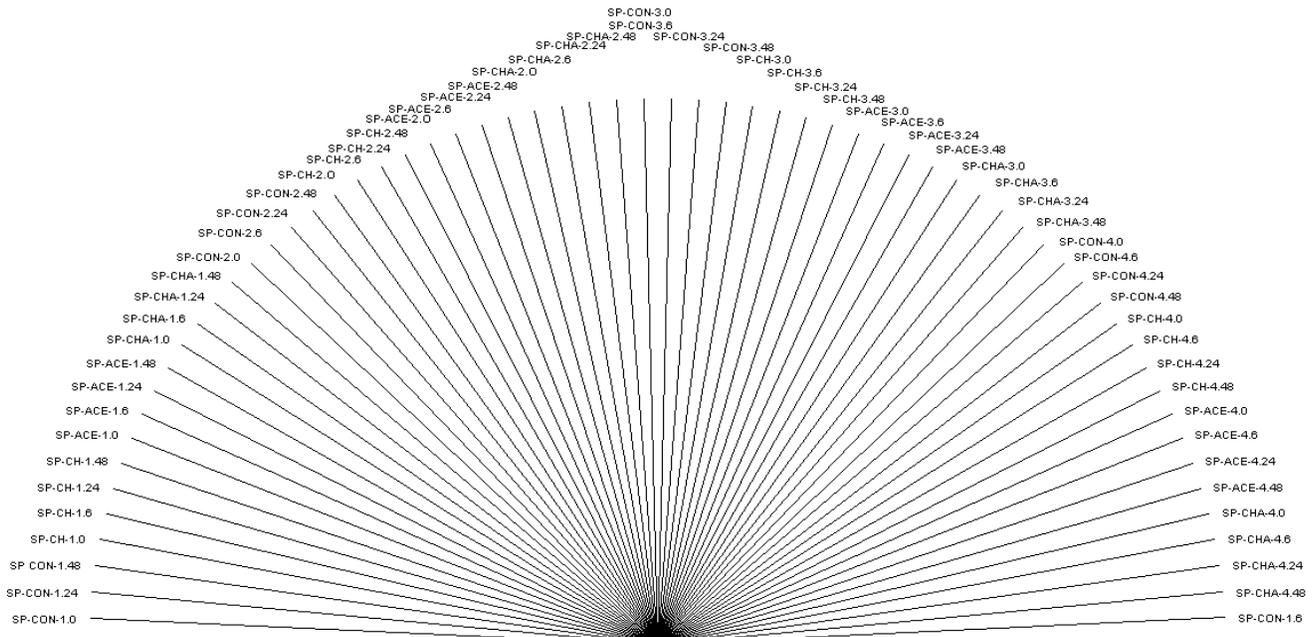


FIGURA 23. Relación de bandas de los DGGE del 16S rDNA en muestras sin metil paratión
Los días de muestreo 0, 6, 24 y 48 están indicados como 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

4.5 Identificación de las bandas obtenidas por DGGE

Se realizaron amplificaciones para las bandas obtenidas mediante DGGE de los genes 16S rDNA y *nosZ*. Posteriormente, se purificaron y secuenciaron. Sin embargo, no todas las bandas pudieron ser amplificadas.

Se obtuvieron 16 secuencias parciales para el gen *nosZ* con un tamaño de 267 pb (unos 79 aminoácidos, una vez procesada la secuencia). Estas secuencias fueron analizadas individualmente mediante BLAST, para obtener secuencias con los mayores niveles de similitud (Tabla 6) que permitieran la construcción de un dendrograma (Fig. 24). Para el análisis se utilizaron secuencias ambientales y de proteínas (NosZ) ya identificadas, además de grupos bacterianos diversos para dar soporte. La topología del dendrograma mostró tres grandes grupos con un alto soporte: α -, β - y γ -Proteobacteria.

Dentro del clado de las γ -Proteobacteria se localizaron las secuencias del presente estudio, las muestras *nosZ*_42 y *nosZ*_44 se relacionaron con una clona de sedimento marino costero (ACJ02321), que a su vez se relaciona con la clona de un biorreactor (ACH69021). Este subclado está relacionado con las muestras *nosZ*_18, *nosZ*_16, *nosZ*_22 y *nosZ*_20, las referencias más cercanas están ubicadas en el clado superior con *Pseudomonas* sp. (ABD23995) y *Pseudomonas migulae* (ABD23996), quienes comparativamente tienen mayor relación con *nosZ*_23, *nosZ*_21 y *nosZ*_17.

Las muestras *nosZ*_26 y *nosZ*_27 se ubican relacionadas con una clona de rizósfera (ABY19446) que las separa de las muestras *nosZ*_24, *nosZ*_5, *nosZ*_41 y *nosZ*_4, quienes a su vez se mantienen relacionadas con otras clonas ambientales y con *Pseudomonas aeruginosa* (YP001347122).

La topología del dendrograma revela una composición heterogénea de grupos bacterianos en su parte inferior. Sin embargo, esto no implica que el árbol no esté bien resuelto, esta mezcla puede deberse a la posible transferencia horizontal del gen en cuestión.

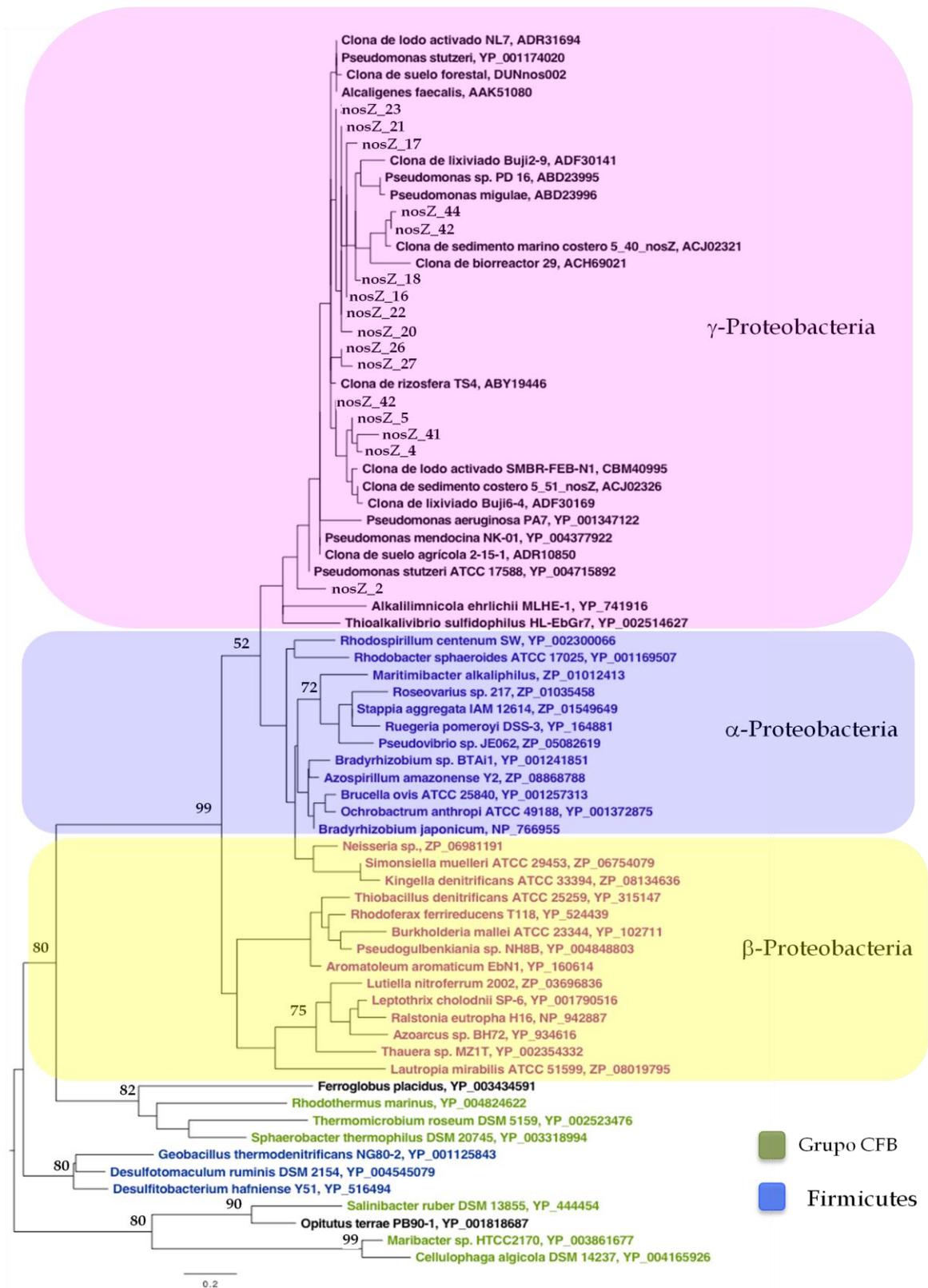


FIGURA 24. Dendrograma de fragmentos del gen *nosZ*

Comparación de secuencias de DGGE y secuencias tomadas del GenBank . El dendrograma se construyó por Máxima Verosimilitud y se usó el modelo WAG.

Para el gen 16S rDNA fueron obtenidas 14 secuencias parciales con una longitud de 315 pb, que fueron analizadas individualmente del mismo modo descrito para las secuencias del gen *nosZ*, aunque utilizando en este caso secuencias de nucleótidos (Fig. 25). Para el análisis se utilizaron secuencias de 16S rDNA de muestras ambientales identificadas y grupos bacterianos diversos para dar soporte. La topología del dendrograma mostró cuatro grupos, las Firmicutes, α -, γ - y δ -Proteobacteria. En los blasts iniciales que se realizaron coincidieron los grupos microbianos para las secuencias parciales obtenidas (Tabla 6).

Las muestras 16S_A1, 16S_A2, 16S_A3, 16S_A4, 16S_A5, 16S_A6, 16S_A7 y 16S_A8 se ubicaron dentro del grupo de las γ -Proteobacteria. Sin embargo, es complicado ver con qué secuencias están mayormente relacionadas, ya que, exceptuando a 16S_A3 las otras forman su propio subclado que no tiene secuencias de referencia cercanas.

En el grupo de las Firmicutes están contenidas las secuencias 16S_A11, 16S_A13, 16S_A14, 16S_A15 y 16S_A16, donde también forman un subclado incluyente pero externo a las secuencias reportadas.

Tabla 9. Relación de las coincidencias más cercanas para los filotipos de las secuencias parciales de 16S rDNA.

Banda	Coincidencia mas cercana	I.M. ^a	E ^b
16S_A1	<i>Aquimonas voraii</i>	93 %	2e-124
16S_A2	<i>Aquimonas voraii</i>	95 %	4e-131
16S_A3	<i>Dokdonella fugitiva</i>	96 %	4e-131
16S_A4	<i>Thiococcus pfennigii</i>	96 %	5e-125
16S_A5	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	94 %	7e-129
16S_A6	<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i>	94 %	3e-127
16S_A7	<i>Lysobacter oryzae</i>	94 %	2e-128
16S_A8	<i>Lysobacter spongiicola</i>	94 %	1e-126
16S_A11	<i>Planococcus maritimus</i>	92 %	7e-119
16S_A13	<i>Thermolithobacter carboxydivorans</i>	94 %	9e-128
16S_A14	<i>Caldalkalibacillus thermarum</i>	94 %	2e-128
16S_A15	<i>Moorella glycerini</i>	91 %	1e-115
16S_A16	<i>Caldalkalibacillus thermarum</i>	95 %	1e-130

^a Máxima Identidad

^b Parámetro E, es conocido como e-valor (*e-value*) de corte

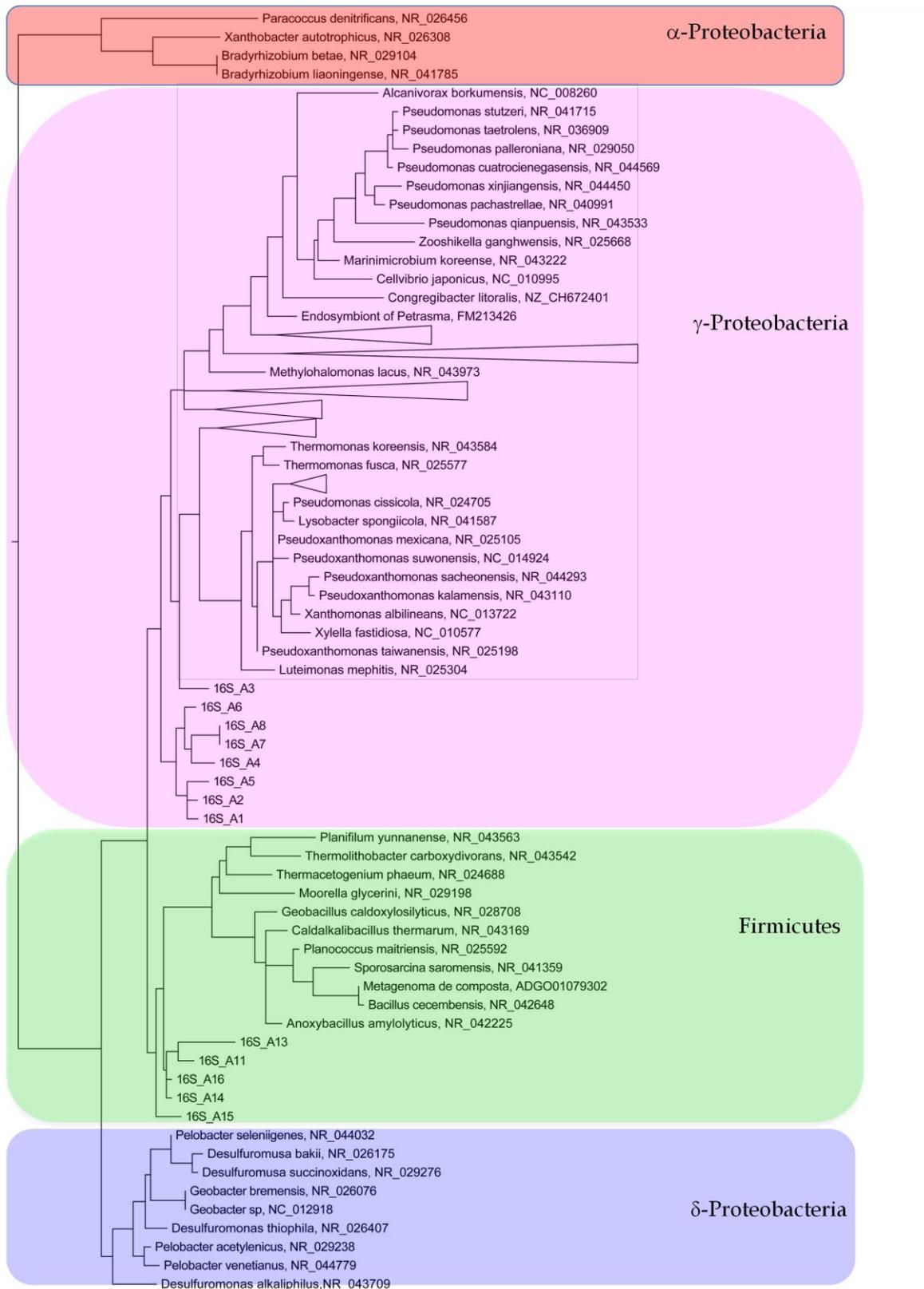


FIGURA 25. Dendrograma de fragmentos del 16S

Comparación de secuencias del DGGE y secuencias tomadas del GenBank. El dendrograma se construyó por Máxima Verosimilitud y se usó el modelo GTR.

DISCUSIÓN

Varios factores, tales como el pH, temperatura, disponibilidad de sustratos de C, alta concentración de NO_3^- y las condiciones anaeróbicas afectan a las tasas de desnitrificación (Knowles, 1982). En el caso del suelo tomado de las chinampas de Xochimilco se cumplen las condiciones antes descritas, es decir, pH entre 7 y 8, alto contenido de materia orgánica y, debido a que estos suelos se inundan con regularidad, los microorganismos están expuestos a altos niveles de anaerobiosis. Para el montaje experimental las condiciones se optimizaron aún más, ya que, los microcosmos se dejaron en anaerobiosis estricta y sin limitaciones en la disponibilidad de NO_3^- , esta estandarización permitió estudiar un posible efecto de la aplicación de metil paratión en la desnitrificación y en la dinámica del N.

En las cinéticas de desnitrificación se observó que el cloranfenicol no afecta a la remoción de NO_3^- del suelo o a las emisiones de N_2O , por lo tanto, la actividad de nitrato reductasa no se vio afectada cuando se indujo la anaerobiosis. Esto indica que hubo poca o nula síntesis *de novo* de nitrato reductasa y la enzima persistió en el suelo durante 28 días. Sin embargo, el cloranfenicol aumentó las concentraciones de NO_2^- en el suelo tratado con metil paratión, sugiriendo que en estos casos sí existió síntesis *de novo* para la producción de nitrito reductasa.

La relación de N_2O a N_2 en el suelo de la chinampa fue baja, indicando poca formación de N_2 . Además, el metil paratión y el cloranfenicol no afectaron ésta relación. Se pudo observar la formación de pequeñas cantidades N_2 dentro de las 24 h, aunque posteriormente a menudo se incrementó (lo que implica una fase de retraso en la producción de N_2). Firestone y Tiedje (1979) reportaron que la actividad reductasa en el N_2O sólo se incrementaba después de 16 a 33 h.

En el presente estudio se encontró que el metil paratión estimula la desnitrificación, ya que aumentó la reducción de NO_3^- , la concentración de NO_2^- y la emisión de N_2O y N_2 . La disponibilidad de C en compuestos orgánicos de C es uno de los factores más importantes para controlar la actividad de la microbiota desnitrificadora (Knowles, 1982). El metil paratión puede servir como un sustrato de C y un donador de electrones, incrementando así la reducción de NO_3^- y por lo tanto las emisiones de N_2O y N_2 a la atmósfera (Ramanathan y Lalithakumari, 1999; Liu *et al.*, 2006; IPCC 2007). Algunos microorganismos tienen la capacidad de

degradar metil parati3n, por ejemplo *Arthrobacter* sp. (Actinobacteria) y *Pseudomonas stutzeri* (γ -Proteobacteria) pueden utilizar al metil parati3n como 3nica fuente de C para su crecimiento, degrad3ndolo dentro de las primeras 9 y 12 h (Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Chen y colaboradores (2002) observaron que *Pseudomonas* sp. fue capaz de degradar 15 mg de parati3n $1^{-1} h^{-1}$ y alcanz3 su fase estacionaria cerca de las 22 h. Cabe mencionar que en el dendrograma del gen *nosZ* (Fig. 24), ninguna secuencia del estudio se encuentra en proximidad de *Pseudomonas stutzeri* (Fig. 25).

Estudios anteriores encontraron que el metil parati3n persiste en el suelo durante s3lo 30 d3as (Tayal *et al.*, 1999). Sin embargo, en un estudio paralelo en el que se utiliz3 el mismo sitio de muestreo, el metil parati3n fue removido del suelo en menos de 30 d3as, lo que hace suponer que pudiera servir f3cilmente como un donador de electrones (Ch3vez-L3pez *et al.*, 2011). No obstante, trabajos de S3ez y colaboradores (S3ez *et al.*, 2003 y 2005) encontraron que el metil parati3n tambi3n pueden inhibir el crecimiento de bacterias desnitrificantes pertenecientes a la clase α -Proteobacteria, como *Xanthobacter autotrophicus* (CECT 7064) y *Paracoccus* (ATCC 19367) y por lo tanto afectar negativamente la emisi3n de N_2O . En el presente estudio las bandas secuenciadas del gen *nosZ* y del 16S rDNA no muestran relaci3n con dicha clase (Fig. 25 y Tabla 6).

El dendrograma de *nosZ* (Fig. 23) tiene definidos a los grupos de Proteobacterias (y donde se ubican los filotipos en estudio). Sin embargo, 3stos se mezclan entre las Firmicutes y las bacterias de tipo CFB. Esta problem3tica es relativamente com3n y en la actualidad se tienen fuertes cr3ticas a la utilizaci3n de genes desnitrificantes como marcadores moleculares, ya que las filogenias se ven muy afectadas por la transferencia horizontal y causan incongruencias cuando se comparan con las obtenidas del gen 16S rDNA (Delorme *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2008). En el presente estudio, el an3lisis de DGGE del gen 16S rDNA permiti3 observar que las bandas m3s representativas (m3s marcadas) corresponden a los filotipos ubicados en el grupo de las γ -Proteobacteria. Esto es un indicio de que el dendrograma obtenido para el gen *nosZ* s3 ser3 congruente, ya que todos sus filotipos caen en ese grupo bacteriano (Fig. 25 y Tabla 6).

En este trabajo se encontr3 que el metil parati3n tiene la capacidad de aumentar las emisiones de N_2O . Por lo tanto, se debe investigar c3mo act3a el metil parati3n en

los procesos del suelo y sobre los microorganismos involucrados. Los estudios mencionados anteriormente indican que el metil paratión puede estimular la actividad de ciertos microorganismos y/o inhibir a otros. Así, Zhang y colaboradores (2005) encontraron que en el suelo sin tratar los grupos dominantes de bacterias son miembros de las α -Proteobacteria, mientras que en el suelo contaminado con metil paratión los filotipos dominantes fueron reemplazados por una subdivisión de la γ -Proteobacteria. En el suelo de las chinampas de Xochimilco se encontró por análisis del gen *nosZ* y 16S rDNA que los filotipos dominantes pertenecen a las γ -Proteobacteria y Firmicutes (Fig. 25 y Tabla 6), grupos bacterianos que se mantienen en suelos con y sin plaguicida a lo largo del estudio.

Los análisis de patrones de bandas del 16S rDNA no revelan una relación clara entre la composición microbiana, el tiempo y/o tratamiento de la cinética de desnitrificación. El 16S rDNA es una herramienta útil, pero a su vez limitante si queremos entender la composición de las comunidades microbianas en un sistema. Se debe considerar que el utilizar genes funcionales como *nosZ* reflejan una composición biológica compleja que tiene interacciones espacio temporales dependientes del uso de suelo y que la utilización de pesticidas químicos como el metil paratión, afecta a las comunidades microbianas desnitrificantes. Por lo que los análisis con 16S rDNA nos reflejan que los filotipos estudiados no muestran alteración en su composición ante los diferentes tratamientos, en comparación con los filotipos obtenidos para el *nosZ*.

El gen *nosZ* puede estar presente o no en bacterias desnitrificantes, este gen han sido perdido y heredado durante la evolución, indicando que la capacidad de desnitrificar ha sido consecuencia en muchos organismos de una transferencia horizontal (Jones *et al.*, 2008). La ausencia del gen *nosZ* trunca la vía de desnitrificación en el N_2O e impide la formación del N_2 , en el caso del suelo de Xochimilco se pudo observar la presencia de diversos filotipos (Fig. 19 y 24), indicando que el incremento en la emisión de N_2O a la atmósfera está dada por el uso del plaguicida y no por la ausencia de la maquinaria metabólica (artículo en preparación). En este estudio se pudo observar que al hacer un análisis de la frecuencia de bandas a través del tiempo se observan diferencias entre las muestras con y sin metil paratión.

Los filotipos *nosZ_2*, *nosZ_4* y *nosZ_5* se encuentran constantes en todos los tiempos y tratamientos (Fig. 15, 16, 17 y 18), indicando que posiblemente el metil paratión no afecta la presencia de estos tipos bacterianos. En las muestras donde

no se adiciona el plaguicida se puede observar que los filotipos nosZ_18, nosZ_24 y nosZ_41 son más frecuentes a lo largo de la cinética de desnitrificación (Fig. 22a y b) en comparación con los filotipos nosZ_16, nosZ_17, nosZ_20, nosZ_21, nosZ_22, nosZ_23, nosZ_26, nosZ_27, nosZ_42 y nosZ_44. Contrariamente en las muestras con metil paratión no se observa una agrupación que contenga nosZ_18, nosZ_24 y nosZ_41, lo cual indica un efecto directo del metil paratión sobre estas poblaciones desnitrificantes, indicando el favorecimiento de una sucesión microbiana a partir de una perturbación como es la adición de este plaguicida al suelo de las chinampas de Xochimilco.

Se debe considerar que la chinampa de estudio ha tenido un tiempo de fumigación intensivo a lo largo de los años y, como se mostró anteriormente, esto puede influir en las dinámicas del nitrógeno (y probablemente para otros elementos como el carbono), provocando condiciones más o menos favorables para algunos tipos bacterianos. Por lo tanto, la aplicación de químicos como el plaguicida organofosforado metil paratión pudo haber influido sobre la composición de la diversidad microbiana existente. Se debe considerar que el sitio de muestreo ha estado sometido a otros tipos de plaguicidas, y aunque estos puedan persistir poco tiempo en el suelo la presión de selección que ejercen podría mantenerse. Aunado a lo anterior se debe recordar que las chinampas tienen un tipo de agricultura donde el riego es constante, favoreciendo condiciones anaeróbicas para los microorganismos desnitrificantes.

CONCLUSIONES

Durante la cinética de desnitrificación se observó que los muestreos aerobios a lo largo del tiempo indican una reducción en la concentración de NO_2^- en comparación con las incubaciones anaeróbicas posteriores. Sin embargo no se observó efecto sobre la eliminación del NO_3^- . El acetileno y/o cloranfenicol no tuvieron efecto significativo en la eliminación de NO_3^- del suelo y poco o ningún efecto sobre la concentración de NO_2^- . El acetileno aumentó las emisiones de N_2O , independientemente de la aplicación de metil paratión y/o el cloranfenicol.

El análisis mediante el gen 16S rDNA reveló que la adición de metil paratión no provocó una diferencia significativa en la composición bacteriana de los suelos. Sin embargo al hacer el análisis con *nosZ* un efecto directo del metil paratión sobre estas poblaciones desnitrificantes, indicando el favorecimiento de una sucesión microbiana a partir de una perturbación.

En el presente estudio se encontró que el metil paratión aumentó las emisiones de N_2O y N_2 , la concentración de NO_2^- y la eliminación de NO_3^- del suelo y debido a que los filotipos que pertenecen al grupo de las γ -Proteobacteria son constantes y predominantes en todos los tiempos y tratamientos, deben ser los responsables directos de las dinámicas del N obtenidas en el presente estudio.

PERSPECTIVAS

Los genes funcionales que codifican para la nitrito y oxido nitroso reductasa pueden ser utilizados como marcadores moleculares de los microorganismos desnitrificantes debido sus regiones blanco conservadas (Zumft, 1997). Por lo tanto, es importante hacer análisis de los genes *nirK* y *nirS*, esto proveerá una herramienta útil en la búsqueda y comparación del efecto de la adición de metilparatión sobre comunidades microbianas en los diferentes tiempos y tratamientos de los suelos de las chinampas de Xochimilco.

Con el fin de salvaguardar las Chinampas es que se vuelve urgente realizar estudios enfocados a conocer la diversidad de microorganismos de los suelos agrícolas de las Chinampas de Xochimilco y como se pueden ver afectados por la utilización de plaguicidas. Así, el análisis de genes funcionales nos permitirá conocer la densidad y biodiversidad de los microorganismos bajo condiciones con plaguicidas y determinar los posibles efectos en las poblaciones microbianas y en su producción de gases de efecto invernadero, los cuales son responsables directos del calentamiento global, el cual está considerado dentro de los planes de desarrollo de la ciudad de México, la cual se ha comprometido a alcanzar acuerdos en materia de cambio climático.

Este proyecto plantea una de las problemática existente en las chinampas de Xochimilco, sin embargo es fundamental hacer más estudios al respecto para integrar la información que en un futuro permita hacer propuestas tangibles y reales a los habitantes de la región.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Abascal F., Posada D., Zardoya R. (2007) MtArt: a new model of amino acid replacement for Arthropoda. *Mol Biol Evol.* **24**: 1-5.
- Anderson J. M. (1975) The enigma of soil animal species diversity. En: Vanek, J (editor), *Progress in Soil Zoology*. Academia, Prague, pp. 51-58.
- Asner G. P., Seastedt T. R. y Townsend A. R. (1997) The decoupling of terrestrial Carbon and Nitrogen cycles. *BioScience.* **47**: 226-234.
- Baisden W. T. y Amundson R. (2003) An analytical approach to ecosystem biogeochemistry modelling. *Ecol. Appl.* **13**: 649-663.
- Balderstone W. L., Scherr B., Payne W. J. (1976) Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 504-508.
- Bange W. H., (2000). It's not a gas. *Nature.* **408**: 302-302.
- Bartha R., Lanzilotta R. P., Pramer D. (1967) Stability and Effects of Some Pesticides in Soil. *Appl. Microbiol.* **15**: 67-65.
- Baumann B., Snozzi M., Zehnder A. J. B., Van der Meer J. R. (1996) Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J. Bacteriol.* **178**: 4397-4374.
- Blanco-Jarvio A, Chávez-López C, Luna-Guido M, Dendooven L, Cabirol N. (2011) Denitrification in a Chinampa soil of Mexico City as affected by methylparathion. *Eur. J. Soil Biol.* **47**: 271-278.
- Blasco F., Lobbi C., Giordano G., Chippaux M., Bonnefoy V. (1989) Nitrate reductase of *Escherichia coli*: completion of the nucleotide sequence of the *nar* operon and reassessment of the role of the alpha and beta subunits in iron binding and electron transfer. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 249-256.
- Blasco F., Dos Santos J., Magalon A., Frixon C., Guigliarelli B., Santini C., Giordano G. (1998) NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **28**: 435-447.
- Bollag J. M., Kure E. (1980) Nitrite and nitrous oxide accumulation during denitrification in the presence of pesticide derivatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 845-849.
- Braker G., Fesefeldt A., Witzel K. P. (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirk* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3769-3775

- Braker G., Zhou J., Wu L., Devol H. A., Tiedje M. J. (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2096-2104.
- Bremner J. M., Blackmer A. M. (1978) Nitrous oxide: emission from soils during nitrification of fertilizer Nitrogen. *Science.* **199**: 295-296.
- Bronick C. J., Lal R. (2004) Soil structure and management: a review. *Geoderma.* **124**: 3-22.
- Bueno R. E. (2008) Desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*. Implicación de las proteínas FIXK₂ Y NIFA. Tesis doctoral, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias.
- Chávez-López C., Blanco-Jarvio A., Luna-Guido M., Dendooven L., and Cabirol N. (2011) Removal of methyl parathion from a chinampa agricultural soil of Xochimilco Mexico A laboratory study. *Eur. J. Soil Biol.* **47**: 264-269.
- CICOPLAFEST (2006) Control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. (<http://www.sagarpa.gob.mx/cicoplafest/>).
- CICOPLAFEST (2008) Control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. (<http://www.sagarpa.gob.mx/cicoplafest/>).
- Coleman D. C., Whitman W. B. (2005) Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. *Pedobiologia.* **49**: 479-497.
- Conrad, R. (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O and NO). *Microbiol. Rev.* **60**: 609-640.
- Cordero S. (2007) Apapatl. Una ventana al pasado mexicana. EDAMEX. México, D.F.
- Coyne M. (2000) Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Paraninfo, Madrid, España. 397 p.
- Chen Y. Zhang X. Liu H. Wang Y. Xia X. (2002) Study on *Pseudomonas sp.* WBC-3 capable of complete degradation of methylparathion, *Wei Sheng Wu XueBao.* **42**: 490-497.
- Deiglmayr K. L., Philippot U. A., Hartwig E., Kandeler. (2004) Structure and activity of the nitrate-reducing community in the rhizosphere of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* under long-term elevated atmospheric pCO₂. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **49**: 445-454.
- Delorme S., Philippot L., Edel-Hermann V., Deulvot C., Mougél C., Lemanceau. (2003). Comparative genetic diversity of the *narG*, *nosZ*, and 16S rDNA genes in fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1004-1012.
- Dendooven L. Anderson J. M. (1995) Maintenance of denitrification potential in pasture soil following anaerobic events. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 1251-1260.

- Dendooven L., Splatt P., Anderson J. M., Scholefield D. (1994) Kinetics of the denitrification process in a soil under permanent pasture. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 361-370.
- Diario Oficial de la Federación (1992) 05-07-92 DECLARATORIA que establece como zona prioritaria de preservación y conservación del equilibrio ecológico y se declara como área natural protegida, bajo la categoría de zona sujeta a conservación ecológica, la superficie que se indica de los ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco, D. F. (14).
- Digrak M., Kazanici F. (1999) Effect of some organophosphorus insecticides on soil microorganisms. *Turk. J. Biol.* **25**: 51-58.
- Enwall K., Philippot L., Hallin S. (2005) Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8335-8343.
- Errampalli D., Odile T., Trevors J. (1999) Bacterial survival and mineralization of p-nitrophenol in soil by green fluorescent protein-marked *Moraxella sp.* G21 encapsulated cells. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**: 229-236.
- Espinosa-García A. C., Mazari-Hiriart M. (2006) Reuso de agua y contaminación viral en el sistema de canales de Xochimilco. En: Xochimilco. Un proceso de gestión participativa. Imprenta Crear Imagen. UNESCO-México, Gobierno del Distrito Federal-Delegación Xochimilco.
- Espinosa G. A. C. (2008) En: UNESCO Agua y diversidad cultural en México. Israel Sandre Osorio, Daniel Murillo, (eds). Serie Agua y Cultura del PHI-LAC, N° 2.
- Ferris M. J., Muyzer G., Ward D. M. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (2): 340-346.
- Firestone M. K., Tiedje J. M. (1979) Temporal changes in nitrous oxide and dinitrogen from denitrification following onset of anaerobiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 673-679.
- Gaceta Oficial del Distrito Federal (2005) Decreto que contiene el programa delegacional de desarrollo urbano para la delegación del Distrito Federal en Xochimilco. Décima quinta época. No. 53-TER.
- Gibson C. (1964). Los aztecas bajo el dominio español 1519-1810. Editorial Siglo Veintiuno, México. 650pp.
- Girvan M. S., Campbell C. D., Killham K., Prosser J. I., Glover L. A. (2005) Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ. Microbiol.* **7**: 301-313.

- Guindon S., Dufayard J. F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**: 307-321.
- Hallin S., Lindgren P. E. (1999) PCR detection of genes encoding nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1652-1657.
- Hansen, R. A. (2000). Diversity in the decomposing landscape. En: Coleman, D.C., y P. F. Hendrix (eds), *Invertebrates as Webmasters in Ecosystems*, CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 203-219.
- Henry S., Baudoin, E., López-Gutiérrez J., Martin-Laurent F., Brauman A., Philippot L. (2004). Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *J. Microbial Meth.* **59**: 327-335
- Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S., Philippot L., (2006) Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK* and *nosZ* gene soils. *Apl. Environ. Microbiol.* **72(8)**: 5181-5189.
- Hochstein L. I., Tomlinson G. A. (1998) The enzymes associated with denitrification. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**: 231-261.
- Holland E., Dentener F. J., Bobby H., Braswell., Sulzman M. J. (1999) Contemporary and pre-industrial global reactive nitrogen budgets. **46**: 7-43.
- Hooper D. U., Bignell D. E., Brown V. K., Brussaard L., Dangerfield J. M., Wall D. H., Wardle D. A., Coleman D. C., Giller K. E., Lavelle P., Van der Putten W. H., de Ruiter P.C., Rusek J., Silver W. L., Tiedje J. M., Wolters W. (2000) Interactions between aboveground and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: Patterns, Mechanisms, and Feedbacks. *BioScience.* **50**: 1049-1061.
- Huson D.H., Auch A., Ji Qi., Schuster S. C. (2006) MEGAN analysis of metagenome data, under review, software freely available for academic purposes from [www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/megan](http://www.ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/megan).
- INECOL (2002) reporte final, en: Programa rector de restauración ecológica área natural protegida zona sujeta a conservación ecológica "Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco" (<http://ramsar.conanp.gob.mx/documentos/fichas/50.pdf>).
- IPCC (2007). *Climate Change: Mitigation of Climate Change. Contribution of working group III to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*, Metz, B., Davidson, O. R., Bosch, P. R., Dave, R., Meyer L. A. (eds.), Cambridge University Press, pp. 499-532.
- Isbister G., Mills K., Friberg L., Hodge M., O'Connor E., Patel R., Abeyewardene M., Eddleston M. (2007). Human methyl parathion poisoning. *Clin. Toxicol.* **45(8)**: 956-960.

- Johnsen K., Jacobsen S. S., Torsvik V., Sorensen J. (2001) Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils. *Biol. Fertil. Soils*. **33**: 454-459.
- Jones M. C., Stres B., Rosenquist M., Hallin S. (2008) Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Mol. Biol. Evol.* **25**(9): 1955-1966.
- Kanekar P., Bhadbhade B., Deshpande N., Sarnaik S. (2004) Biodegradation of organophosphorus pesticides. *Proc. Indian Nation Sci. Acad.* **1**: 57-70.
- Kinney C., Mandernack K., Moiser A. (2005) Laboratory investigations into the effects of pesticides mancozeb, chlorothalonil, and prosulfuron on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilized soil. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 837-850.
- Knowles R., (1982). Denitrification. *Microbiol. Rev.* **46**: 43-70.
- Koponen H., Flöjt L., Martikainen P. (2004). Nitrous oxide emissions from agricultural soils at low temperatures: a laboratory microcosm study. *Soil. Biol. Biochem.* **36**: 757-766.
- Liu P. P., Yan Y. C., Xie X. P. (2006) The mechanism of purification and degradation of methylparathion-degrading bacterium YL8, *Zhongguo Huanjing Kexue.* **26**: 206-209.
- Locke M. A. Zablotowicz (2004) Pesticides in soil-benefits and limitations to soil health. En: *Managing soil quality: challenges in modern agriculture* (Elmholt y Christensen) Edit. P. Schjonning.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. Brock. *Biología de los microorganismos*. Decima edición Madrid, 2004. 1096 pp.
- Mazari-Hiriart M., Ponce-de-León S., López-Vidal Y., Islas-Macías P., Amieva-Fernández R. I., Quiñones-Falconi F. (2008) Microbiological implications of periurban agriculture and water reuse in Mexico City. *PLoS ONE.* **3**: 1-8.
- Moraghan J. T., Buresh R. J. (1977) Correction for dissolved nitrous oxide in nitrogen studies. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **41**: 1201-1202.
- Moreno-Vivián C., Cabello P., Martínez-Luque M., Blasco R., Castillo F. (1999) Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J. Bacteriol.* **181**: 6573-6584.
- Moura I., Moura J. G. (2001) Structural aspects of denitrifying enzymes. *Chem. Biol.* **5**: 168-175.
- Murray E. R., Knowles R. (1999) chloramphenicol inhibition of denitrifying enzyme activity in two agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3487-3492.

- Nelson D.W., Sommers L.E., 1996. Total carbon, organic carbon and organic matter en: Sparks D.L. (Ed.), Methods of soil analysis, Parte 3, Chemical methods. Soil Science Society of America Inc. & American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, pp. 1010.
- Noredal T. I., Enwall K., Jarvis A, Hallin S., 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* y *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. FEMS Microbiol. Ecol. **49**: 401-417.
- Ongley E.D., 1997. Control of water pollution from agriculture. Serie: FAO Irrigation and Drainage Papers Versión 55. URL <http://www.fao.org/docrep/W2598S/W2598S00.htm>
- Page R. D. M., 1996. Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput. Appl. Biosci. **12**: 357-358.
- Pakala S., Gorla P., Basha A., Kumar R., Baru R., Yanamandra M., Merrick M., Siddavattam D. (2007) Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative *Serratia* sp. strain DS001. Appl. Microbiol. Biotechnol. **73**: 1452-1462.
- Patureau, D., Godon J. J., Dabert P., Bouchez T., Bernet N., Delgenes J. P., Moletta R. (1998) *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. Nov., a new gram negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen saturate conditions. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**: 775-782.
- Pell M., Stenberg B., Stenström J., Torstensson L. (1996) Potential denitrification activity assay in soil-with or without chloramphenicol? Soil Biol. Biochem. **28**: 393-398.
- Pfenning K. S., McMahon P. B. (1997) Effect of nitrate, organic carbon, and temperature on potential denitrification rates in nitrate-rich riverbed sediments. J. Hydrol. **187**: 3-4.
- Philippot L., Hallin S. (2005) Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. Curr. Opin. Microbiol. **8**: 234-239.
- Pochana K., Keller J. (1999) Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). Water Sci. Technol. **39**: 61-68.
- Posada D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol. Biol. Evol. **25**: 1253-1256.
- RAMSAR (2012) en <http://195.143.117.139/indexsp.htm>.
- Ramanathan M.P., Lalithakumari D., (1999) Complete mineralization of methylparathion by *Pseudomonas* sp. A3, Appl. Biochem. Biotechnol. **80**: 1-12.

- Ramos-Bello R., Cajuste L. J., Fores-Román D., García-Calderón N. E. (2001) Metales pesados, sales y sodio en suelos de chinampa en México. *Agrociencia*. **35**: 385-395.
- Rhoades J.D ., Mantghi N. A., Shause P. J., Alves W. (1989) Estimating soil salinity from saturated soil-paste electrical conductivity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **53**: 428-433.
- Rice, C.W. y Tiedje J. M. (1989) Regulation of nitrate assimilation by ammonium in soils and in isolated soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **21**:597-602
- Rojas R. T. (1982) Evolución histórica del repertorio de plantas cultivadas en las chinampas de la cuenca de México. En Rojas R. T., 1983. La agricultura chinampera. Compilación histórica. Dirección de difusión cultural. Número 7 de Colección Cuadernos universitarios: Serie Agronomía, Editorial Universidad Autónoma Chapingo, Dirección de Difusión Cultural, 229 pp.
- Rojas R. T. (1995) Presente, pasado y futuro de las Chinampas CIESAS, Patronato del Parque Ecológico de Xochimilco A. C., México D.F. 1995.
- Saad A. L. O ., Conrad R. (1993) Temperature dependence of nitrification, denitrification and turnover of nitric oxide in different soils. *Biol. Fertil. Soils*. **15**: 21-27.
- SAS Institute (1989). *Statistic Guide for Personal Computer, Version 6.04*, Edn. SAS 418 Institute, Cary.
- Sáez F. Pozo C. Gómez M. A. Rodela B. González-López J. (2003) Growth, nitrite, and nitrous oxide accumulation of *Paracoccus denitrificans* ATTC 19367 in the presence of selected pesticides, *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 1-5.
- Sáez F., Pozo C., Gómez M. A., Rodela B., González López J. (2005) Growth and denitrifying activity of *Xanthobacter autotrophicus* CECT 7064 in the presence of selected pesticides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 563-567.
- SAGARPA-DF. (2003) Sistema Productor Hortalizas Distrito Federal. Plan Rector. http://www.sagarpa.gob.mx/dlg/df/cadenas_productivas.html 2003.
- Sahrawat K. L. (2008) Factors affecting nitrification in soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **39**: 1436-1446 .
- Sánchez M. E., Estrada O. B., Martínez O., Martín-Villacorta J., Aller A., Morán A. (2004) Influence of the application of sewage sludge on the degradation of pesticides in the soil. *Chemosphere*. **57**: 673-679.
- Sandoval J. (2003) Calidad microbiológica y fisicoquímica del agua de los canales de Xochimilco. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México
- Séjourné L. (1990) *Arqueología E Historia Del Valle de México: De Xochimilco a Amecameca*. XXI. México. 328pp

- Shammas N. K., (1986) Interactions of temperature, pH, and biomass on the nitrification process. Water Pollution Control Federation. **58**: 52-59
- Simek M., Jisova L., Hopkins W. D., (2002) What is the so-called optimum pH for denitrification in soil? Soil Biol. Biochem. **34**: 1227-1234
- Singh B. K., Walker A. (2006) Microbial degradation of organophosphorus compounds. FEMS Microbiol. Rev. **30**(3): 428-471.
- Six J, Elliot E. T., Paustian K (2000) Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. Soil Biol. Biochem. **32**: 2099-2103.
- Smith S. M., Tiedje J. M. (1979) Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. Soil Biol. Biochem. **11**: 261-267.
- Snigh N., Majumdar D., Kumaraswamy S., Shakil N.A., Kumar S., Jain B., Ramakshnan B., Sethunathan N. (1999) Effect of Carbofuran and Hexachlorocyclohexane on N₂O Production in Alluvial Soils. Environ. Contam. Toxicol. **62**(5): 584-590.
- Spokas K., Wang D. (2003) Stimulation of nitrous oxide production resulted from soil fumigation with chloropicrin. Atmospheric Environ. **37**: 3501-3507
- Spokas K., Wang D., Venterea R., Sadowsky M. (2006). Mechanisms of N₂O production following chloropicrin fumigation. Appl. Soil Ecol. **31**: 101-109.
- Stephan-Otto E., Slotnik A. (2001) La Chinampa. Evaluación y Sustentabilidad. Patronato Parque Ecológico de Xochimilco, A. C. y UAM-X. México D F.
- Suzuki M., Arai H., Ishii M., Igarashi Y., 2006. Gene structure and expression profile of cytochrome bc nitric oxide reductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. Biosci. Biotechnol. Biochem. **70** (7): 1666-1671.
- Takaya N., Catalan-Sakairi M. A., Sakaguchi Y., Kato I., Zhou Z., Shoun H. (2003) Aerobic denitrifying bacteria that low levels of nitrous oxide. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 3152-3157.
- Tayal A. K., Kaur I., Tandon S. N. (1999) Identification of metabolites of methylparathion in plant, water and soil, Anal. Lett. **32**: 2521-2530.
- Thomas G. W. (1996) Soil pH and soil acidity, in: D.L. Sparks, (Ed.), Methods of soil analysis: chemical methods, Soil Science Society of America, Madison, pp. 475-490.
- Throbäck I. N., Enwall K., Jarvis A., Hallin S. (2004) Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. Microbiol. Ecol. **49**: 401-417.

- Tu C.M., 1969. Effect of four organophosphorus insecticides on Microbial Activities in Soil. *Appl. Microbiol.* **19**: 479-484
- UNESCO. (2008) Proyecto UNESCO-Xochimilco.
<http://www.unescomexico.org/xochimilco/index.htm>.
- Vitousek, P. M. (1992) Global environmental change: an introduction. *Annu. Rev.Ecol. Syst.* **23**: 1-14.
- Wang B., Xiong L., Zheng Y., Zhang Z., Tong W., Liu S., Chen Y., Xiao W., Liu D. (2008) Cloning and expression of the *mpd* gene from a newly isolated methylparathion-degrading strain of bacteria. *Huanjing Kexue Xuebao.* **28**: 1969-1975.
- Warnecke-Eberz U., Friedrich B. (1993) Three nitrate reductase activities in *Alcaligenes eutrophus*. *Arch. Microbiol.* **159**: 405-409.
- Wei C., Gao M., Shao J., Xie., Pan G (2006) Soil aggregate and its response to land management practices. *China Particuology.* **4**: 211-219.
- Whelan S., Goldman. (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 691-699.
- Wolsing M., Prieme A. (2004) Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 261-271.
- Yang C., Dong M., Yuan Y., Huang Y., Guo X., Qiao C. (2007) Reductive transformation of parathion and methyl parathion by *Bacillus sp.* *Biotechnol.* **29**: 487-493.
- Yeomans J. C., Bremner J. M. (1985) Denitrification in soil: Effects of insecticides and fungicides. *Soil Biol. Biochem.* **17**: 453-456.
- Zehr P. J., Ward B. B. (2002) Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1015-1024.
- Zhang R., Cui Z., Jiang J., He J., Gu X., Li S. (2005) Diversity of organophosphorus pesticide-degrading bacteria in a polluted soil and conservation of their organophosphorus hydrolyses genes. *Can. J. Microbiol.* **51**: 337-343.
- Zlonik E. A. (2003) Sustentabilidad: hacia una visión integral. Tesis doctoral, Facultad de Filosofía y Letras, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
- Zumft W. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Biol. Rev.* **61**: 533-616.

Denitrification in a chinampa soil of Mexico City as affected by methylparathion: A laboratory study

A. Blanco-Jarvio^{a,d}, C. Chávez-López^{a,d}, M. Luna-Guido^b, L. Dendooven^b, N. Cabriol^{c,*}

^a Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

^b Laboratorio de Ecología de Suelos, GIB, Cinvestav, Mexico City, Mexico

^c Facultad de Ciencias, Departamento de Ecología y Recursos Naturales, UNAM, Mexico City, Mexico

^d Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2011

Received in revised form

24 June 2011

Accepted 28 June 2011

Available online 19 July 2011

Handling editor: Bryan Griffiths

Keywords:

Chloramphenicol

Dynamics of mineral N

Nitrous oxide to dinitrogen ratio

Organophosphorus pesticide

ABSTRACT

Chinampas are raised garden beds used for agriculture in the valley of Mexico since pre-Hispanic times. Large amounts of methylparathion, i.e. approximately 0.5 kg ha^{-1} per crop cycle, are used to control pests with an unknown effect on soil processes, such as the denitrification process. Soil was amended with nitrate (NO_3^-) with or without chloramphenicol known to inhibit *de novo* synthesis of enzymes, with or without acetylene (C_2H_2) known to inhibit the reduction of nitrous oxide (N_2O) to dinitrogen (N_2) and spiked with or without methylparathion. Methylparathion increased the N_2O and N_2 emissions, the NO_2^- concentration and removal of NO_3^- from soil. The NO_2^- concentration in the anaerobic incubation was larger when soil was conditioned aerobically <7 days compared to soil conditioned for >7 days, but no such pattern was observed for the removal of NO_3^- , C_2H_2 and/or chloramphenicol had no significant effect on NO_3^- removal and the NO_2^- concentration in the methylparathion-amended soil, but increased the NO_2^- concentration in unamended soil with C_2H_2 plus chloramphenicol compared to the other treatments. C_2H_2 increased the N_2O emission in soil amended with or without methylparathion and with or without chloramphenicol.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

In Xochimilco (Mexico City), agriculture is done in a unique way called '*chinampa*' since the tenth century, but most importantly in the 14th and 15th century before the Spaniards conquered the Aztec empire [1]. Chinampas are man-made plots bordered by canals characterized by high yields for a large variety of vegetables and crops [2]. *Chinampa* is a pre-Columbian form of agriculture whereby sediment from canals is collected regularly and applied to human-made islands forming raised garden beds called chinampas. They contributed greatly to the development of indigenous cultures that occupied the southeastern part of the Valley of Mexico, i.e. Tenochtitlan. The soils are deep and discontinuous and due to the human influence some authors classify them as Anthrosols [3].

Pesticides are important components of modern agriculture and their global use is expected to increase 2.7 times to 10.1×10^6 metric tons y^{-1} in the next 50 years [4,5]. Soil fumigation with pesticides is often applied to control pests. Chinampas

are intensively cultivated whereby different pesticides, such as clorpirifos, methylparathion, malathion, lindane and atrazine, are used in large quantities [6]. The large application rate of methylparathion, which is an organophosphate and classified as extremely toxic to mammals and birds with a median lethal dose (LD50) of 6–24 mg kg^{-1} in mice [7], is especially of great concern. Little information is available how methylparathion might affect soil processes.

It is well known that different contaminants, such as pesticides [8–10] and heavy metals can affect denitrification population and denitrification activity in soil [11,12]. However, evidence also suggests that bacteria can adapt to these contaminants [13]. Negative effects on non-targeted soil microorganisms have been reported when pesticides are applied and microbial activity and diversity is reduced in soil [14–16]. Zhang et al. [17] reported that the diversity and structure of microbial communities changed in soil contaminated with methylparathion. Nevertheless, other studies found that fumigation increased organic matter degradation rates [15]. Recently, it has been reported that fumigation with pesticides increased nitrous oxide (N_2O) emissions [18–20]. This suggests that pesticides might affect the production of N_2O although little information exists about it.

* Corresponding author.

E-mail address: natcabriol@yahoo.com (N. Cabriol).

Denitrification is one of the most important processes in the global N cycle. Denitrification is a respiratory microbial process by which oxides of nitrogen serve as electron acceptors for respiratory electron transport in anaerobic conditions. As a result nitrate (NO_3^-) is reduced to nitrite (NO_2^-) and then to gaseous products, mainly N_2O and dinitrogen (N_2) [21,22]. It is controlled by different environmental factors, such as water content, pH, salt content, O_2 diffusion, NO_3^- concentration and soil organic matter content, so the study of the denitrification process and the fluxes of N_2O and N_2 in the field is marred by a high spatial and temporal variability [23].

The denitrification process has been studied intensively as it is an important contributor to the emission of N_2O although little or no information exist about how methylparathion might affect it. N_2O is a strong greenhouse gas with a global warming potential that is 300 times more powerful than carbon dioxide (for time horizon of 100 years) [24]. The concentration of N_2O in the atmosphere has been increasing at approximately $0.25\% \text{ y}^{-1}$ since 1970 and was rising to $319 \pm \text{ppb}$ until 2005 [25]. Agriculture contributes for approximately 58% to the total human N_2O emission [16]. Globally, N_2O production has increased by nearly 17% from 1990 to 2005 and it has been assumed that N_2O emissions due to agricultural practices will increase by 35–60% until 2030 [16].

The study of the denitrification process and the ratio of N_2O -to- N_2 is possible under laboratory conditions using specific inhibitors [26]. *Denovo* synthesis of reductases involved in the denitrification process is inhibited with chloramphenicol so that the denitrification capacity of the soil is revealed, i.e. how well adapted is the soil to anaerobic conditions [26]. Acetylene (C_2H_2) inhibits the activity of nitrous oxide reductase so that the N_2O -to- N_2 ratio of the denitrification process can be determined [27]. As such, the combined use of C_2H_2 and chloramphenicol at low concentrations allows to study the denitrification capacity of the soil upon sampling [21,28].

A chinampa soil was amended with or without methylparathion and incubated aerobically for 28 days. After 0, 7, 14 and 28 days, soil with or without methylparathion was amended with or without chloramphenicol and with or without C_2H_2 and incubated aerobically for 48 h, while dynamics of NO_3^- , NO_2^- , N_2O and N_2 were monitored. The objective of this study was to determine the effect of the pesticide methylparathion on dynamics of the denitrification process in a chinampa soil using acetylene, known to inhibit the reduction of N_2O to N_2 , and chloramphenicol, known to inhibit *de novo* synthesis of bacterial proteins, as selective inhibitors in microcosms under anaerobic conditions. It was hypothesized that methylparathion would change the dynamics of NO_3^- , NO_2^- , N_2O and N_2 .

2. Materials and methods

2.1. Sampling site

Soil samples were collected in the chinampa of Xochimilco in San Gregorio Atlapulco (Xochimilco, Mexico City, Mexico). It is situated at an altitude of 2240 m above sea level with a mean annual temperature of 15°C and annual precipitation of 620 mm. The study area has been planted with lettuce, fertilized intensively and crops have been treated with pesticides. Methylparathion has been used intensively for approximately six years. Farmers add 1 ml methylparathion to 1000 ml tap water and spray their field two weeks after the lettuce has been planted. As such, approximately $0.5 \text{ kg methylparathion ha}^{-1}$ is applied. Considering that four crops are cultivated, a total of $2 \text{ kg methylparathion ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$.

As part of a study into the effects of methylparathion on soil processes one chinampa soil was sampled. Therefore, three similar plots were defined in the 4500 m^2 sampling site perpendicular to

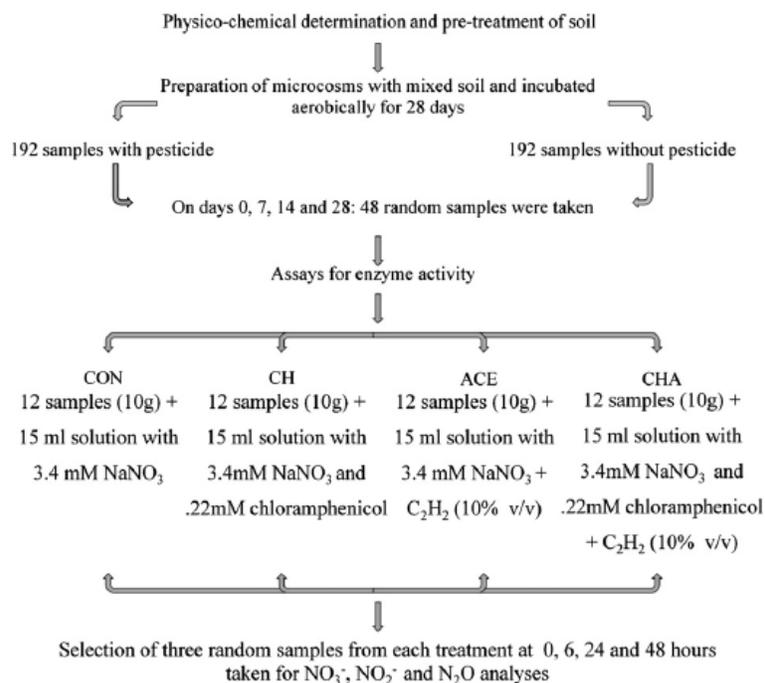


Fig. 1. Experimental protocol used to investigate the denitrification process in chinampa soil of Xochimilco. For details see text.

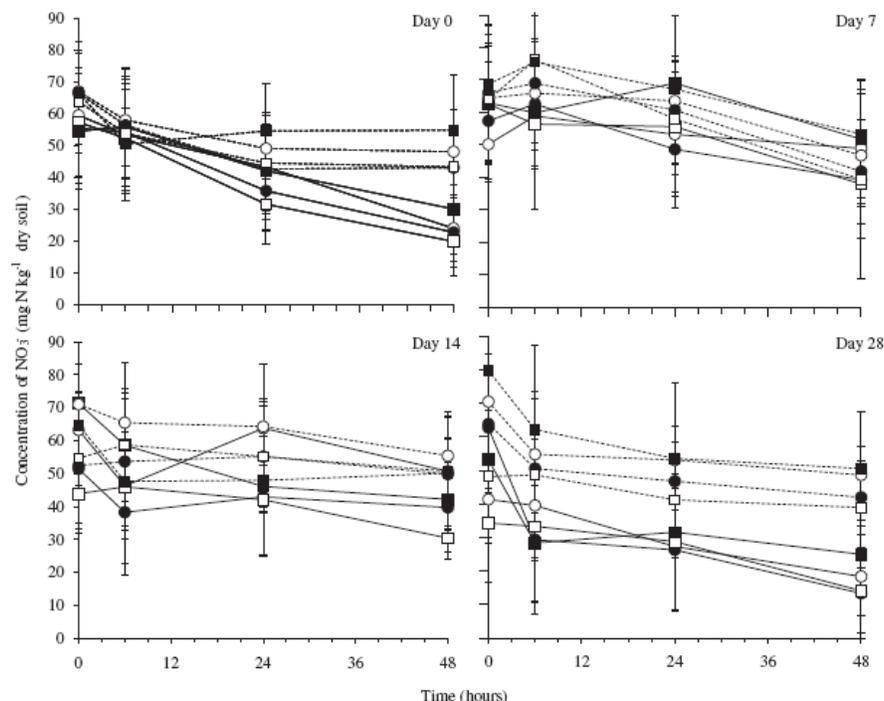


Fig. 2. Concentration of NO_3^- (mg N kg^{-1} soil) in Xochimilco soil incubated anaerobically for 48 h and conditioned aerobically for a) 0 days, b) 7 days, c) 14 days and d) 28 days. Dotted lines are soil amended with methylparathion and continuous lines are soil not amended with methylparathion. Treatments are unamended soil (CON, ■), or amended with acetylene (ACE, ○), chloramphenicol (CHL, ●) or chloramphenicol plus acetylene (CHA, □). Bars are ± 1 standard error of the estimates ($p < 0.05$ and $n = 3$).

the canal. Soil was sampled by augering 20 times the 0–15 cm layer at each of the three plots with a stony soil auger (diameter 7 cm, Eijkelkamp, NL). The 20 sub-samples of each plot were pooled, 5-mm sieved and characterized. This field-based replication, i.e. three different soil samples, was maintained in the incubation study. The clay loamy soil with pH 7.3 and EC 1.33 dS m^{-1} had an organic C content of 97 g kg^{-1} , total N 6.3 g kg^{-1} and a particle size distribution of 260 g kg^{-1} sand, 440 g kg^{-1} silt and 300 g kg^{-1} clay.

2.2. Aerobic incubation

The soil samples ($n = 3$) were taken to the laboratory and treated as follows. The soil, approximately 12 kg from each plot, was adjusted to 40% of water holding capacity (WHC) and pre-incubated for 7 days in a drum containing a beaker with 100 ml distilled H_2O to avoid desiccation and one beaker with 100 ml of 1 M NaOH solution to trap CO_2 evolved so as to avoid an excess concentration of CO_2 in the drum.

The experimental design is complex and can be found in Fig. 1. Three hundred and eighty four sub-samples of 10 g soil of each plot ($n = 3$) were added to 110 ml flasks. Half of the flasks were amended with 2.6 ml methylparathion (1 ml in 1000 ml H_2O) (considered the CMP soil) and the other half with a similar amount of distilled H_2O (considered the SMP soil). Each flask was placed in a 945 ml jar containing a vessel with 20 ml 1 M NaOH to trap emitted CO_2 so as to avoid an excess concentration of CO_2 in the jar and distilled water on the bottom of the jar to minimize water loss from the soil. The jars were sealed and incubated under aerobic

conditions in the dark at $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 28 days. After 0, 7, 14 and 28 days, 48 flasks of each plot ($n = 3$) amended with methylparathion or without methylparathion were selected at random and used to study the denitrification process under strict anaerobic conditions. As such, the effect of methylparathion on the denitrification process could be studied over time. Four different treatments were applied to the soil samples before the anaerobic incubation (Fig. 1). The remaining jars were opened, aired for 10 min every day to avoid anaerobic conditions and resealed [29].

2.3. Anaerobic incubation

The 24 sub-samples of soil from each plot ($n = 3$) amended with or without methylparathion were amended with 15 ml of a degassed 3.4 mM NaNO_3 solution while 24 were amended with 15 ml of a degassed 3.4 mM NaNO_3 and 0.22 mM chloramphenicol solution. A final concentration of $71.4 \text{ mg NO}_3^- \text{N kg}^{-1}$ was thus obtained. The application of $100 \text{ mg chloramphenicol kg}^{-1}$ was sufficient to inhibit protein synthesis, e.g. NO_3^- , NO_2^- and N_2O reductases, but not the activity of existing enzymes [30]. The samples were well mixed to create a soil slurry thereby minimizing the influence of diffusion of NO_3^- through the soil matrix.

The flasks were sealed air-tight with a rubber stopper, the atmosphere was flushed with N_2 for 10 min [31]. After purging the air, a 10 ml sample was taken from the headspace of 12 samples amended with NaNO_3 and from 12 amended with $\text{NaNO}_3 + \text{chloramphenicol}$ and replaced with 10 ml C_2H_2 (10% v/v) [27]. As such four treatments were obtained: 1.

Table 1

Effect of time of aerobic conditioning at 25 °C, i.e. 0, 7, 14 and 28 days, and treatment, i.e. control, acetylene, chloramphenicol, acetylene + chloramphenicol, on mean concentrations of NO_2^- (mg N kg^{-1} soil) and NO_3^- and N_2O production rates (mg N kg^{-1} soil h^{-1}) in soil amended or not with methylparathion incubated anaerobically at 25 °C for 48 h.

	NO_2^- concentration (mg N kg^{-1} soil)		Concentration of NO_3^- (mg N kg^{-1} soil h^{-1})		Emission of N_2O (mg N kg^{-1} soil h^{-1})		
	SP ^a	CP ^b	SP	CP	SP	CP	
<i>Time of conditioning</i>							
Day 0	8.3A ^c	18.8A	-0.39A	-0.60BC	0.014A	0.032B	
Day 7	9.1A	9.4B	-0.27A	-0.10A	0.011B	0.043A	
Day 14	6.4B	6.7B	-0.26A	-0.25AB	0.009B	0.022C	
Day 28	5.9B	7.2B	-0.42A	-0.83C	0.010B	0.016C	
MSD ^d	1.6	3.0	SEE ^e	0.19	0.20	0.001	0.003
<i>Treatment</i>							
Control	6.1B	8.5A	-0.23A	-0.33A	0.007B	0.020B	
Acetylene (C_2H_2)	7.2B	9.4A	-0.25A	-0.50A	0.014A	0.038A	
Chloramphenicol	6.8B	11.9A	-0.39A	-0.53A	0.008B	0.018B	
Chloramphenicol + (C_2H_2)	9.6A	12.3A	-0.42A	-0.59A	0.014A	0.034A	
MSD ($p < 0.05$)	1.6	3.9	SEE	0.19	0.21	0.001	0.003

^a SP: without methylparathion.

^b CP: with methylparathion.

^c Values with the same capital letter are not significantly different within the column at $p < 0.05$.

^d MSD: Least significant difference ($p < 0.05$).

^e SEE: Standard error of the estimates ($p < 0.05$).

soil amended with 71.4 mg NO_3^- -N kg^{-1} (CON), 2. soil amended with 71.4 mg NO_3^- -N kg^{-1} + 100 mg chloramphenicol kg^{-1} (CH), 3. soil amended with 71.4 mg NO_3^- -N kg^{-1} + 10%v/v C_2H_2 (ACE), 4. soil amended with 71.4 mg NO_3^- -N kg^{-1} + 100 mg chloramphenicol kg^{-1} + 10%v/v C_2H_2 (CHA). The experimental treatment is given in Fig. 1.

After 0, 6, 24 and 48 h, three sub-samples of each treatment ($n = 4$), plot ($n = 3$) and amended with or without pesticide ($n = 2$) were selected at random for assays of NO_2^- , NO_3^- and N_2O . The headspace of each flask was sampled and analysed for N_2O . The concentrations of N_2O were corrected for gas dissolved in the water [32]. After measurement of N_2O , each sub-sample was extracted for NO_2^- and NO_3^- with 100 ml 0.5 M K_2SO_4 . The soil sample was shaken on an orbital shaker at 180 rpm for 30 min, filtered through Whatman[®] No. 42 filter paper[®] and the extracts were stored at -20 °C until analysed. Data for NO_2^- were corrected for the formation of NO_2^- through the degradation of chloramphenicol [33].

2.4. Chemical analysis

Soil pH was measured in 1:2.5 soil-H₂O suspension using a glass electrode [34]. The EC was determined in a saturated solution extract as described by Rhoades et al. [35]. The WHC was measured on soil samples water-saturated in a funnel and left to stand overnight. Soil particle size distribution was determined by the hydrometer method as described by Gee and Bauder [36]. The

organic C in soil was measured with a total organic carbon analyzer (TOC-V_{CSH}, Shimadzu, Canby, Oregon, USA). Inorganic C in soil was determined by adding 20 ml 1 M HCl to 2 g air-dried soil and trapping CO_2 evolved in 20 ml 1 M NaOH. Total N was measured by the Kjeldahl method using concentrated H_2SO_4 , K_2SO_4 and HgO to digest the sample [37]. The NO_2^- and NO_3^- in the K_2SO_4 extracts were determined colourimetrically on a San Plus System – SKALAR automatic analyzer (Skalar, Breda, The Netherlands) [38].

The amount of N_2O was determined with a gas chromatograph (Agilent 4890D, Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) fitted with an electron capture detector. A GS-Q column (inner diameter 520 μm and 30 m length; Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) was used to separate N_2O from the other gases; the flow rate of the carrier gas, N_2 , was 5 ml min^{-1} . Injection, detection and column-oven temperatures were set at 100 °C, 225 °C, and 35 °C, respectively. An aliquot of 1 cm^3 was injected into the chromatograph using a Teflon sealed glass syringe (Hamilton[®], Reno, Nevada, USA). Concentrations of N_2O were calculated by comparing peak areas against a standard curve prepared from known concentrations, i.e. 10 and 100 ppm N_2O in N_2 , every time samples were analysed.

2.5. Statistical analyses

Emission rates of N_2O and production rates of NO_2^- and NO_3^- were calculated in the following way. Emission of N_2O was regressed on elapsed time using a linear regression model which

Table 2

Effect of methylparathion on mean concentrations of NO_2^- (mg N kg^{-1} soil) and NO_3^- , N_2O and N_2 production rates (mg N kg^{-1} soil h^{-1}) of soil conditioned for 0, 7, 14 or 28 days and left untreated or treated with acetylene, chloramphenicol, acetylene + chloramphenicol, and incubated anaerobically at 25 °C for 48 h.

	NO_2^- concentration (mg N kg^{-1} soil)	NO_3^- production rate (mg N kg^{-1} soil day^{-1})	N_2O emission (mg N kg^{-1} soil day^{-1})	N_2 emission (mg N kg^{-1} soil day^{-1})	N_2 emission + chloramphenicol (mg N kg^{-1} soil day^{-1})
-Methylparathion	7.4B ^a	-0.21A	0.011B	0.009B	0.005B
+Methylparathion	10.5A	-0.58B	0.028A	0.015A	0.012A
MSD ^b ($p < 0.05$)	1.2	SEE ^c	0.001	0.002	0.001

^a Values with the same capital letter are not significantly different within the column at $p < 0.05$.

^b MSD: Least significant difference ($p < 0.05$).

^c SEE: Standard error of the estimates ($p < 0.05$).

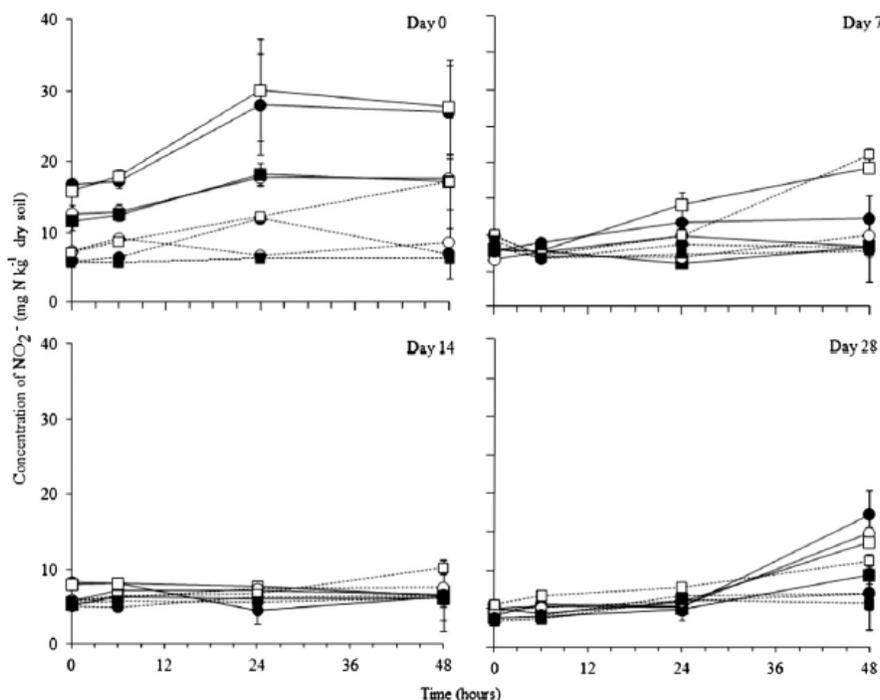


Fig. 3. Concentration of NO_2^- (mg N kg^{-1} soil) in Xochimilco soil incubated anaerobically for 48 h and conditioned aerobically for a) 0 days, b) 7 days, c) 14 days and d) 28 days. Legends to the figure can be found in Fig. 2.

was forced to pass through the origin but allowed different slopes (production rates) for each treatment. This approach is supported by theoretical considerations that no N_2O was produced at time zero and the atmosphere in the flask contained no N_2O as the headspace was flushed with N_2 . Production of NO_2^- and NO_3^- was regressed on elapsed time using a linear model that was not forced to pass through the origin and allowed different slopes (production rates) for each treatment.

The production of N_2 was calculated in the following way. The emission of $\text{N}_2 = [\text{the emission of } \text{N}_2\text{O in the } \text{C}_2\text{H}_2 \text{ amended soil} - \text{the emission of } \text{N}_2\text{O in the unamended control}] * 4/5$, i.e. considering the fact that one electron more is required to reduce N_2O to N_2 [39].

Concentrations of NO_2^- were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) using PROC GLM [40] to test for significant differences between treatments with the Tukey's Studentized Range test. Significant differences between treatments for NO_3^- and N_2O production rates were determined using PROC MIXED [40]. Each point in the figures is the mean of nine measurements, i.e. data from three plots in triplicate ($n = 3$).

3. Results

3.1. Concentration of NO_2^- and NO_3^-

The concentration of NO_3^- decreased over time in all treatments (Fig. 2, Table 1). In the SMP soil, the decrease in concentration of NO_3^- was similar in all treatments (Table 1). In the CMP soil, the decrease in the concentration of NO_3^- was slowest in soil

conditioned aerobically for 7 days and the fastest for soil incubated for 28 days, while treatment had no significant effect on it. Methylparathion had no significant effect on the concentration of NO_3^- in soil (Table 2).

The changes in NO_2^- concentrations did not follow a clear pattern during the anaerobic incubation (Fig. 3). In the SMP soil, the concentration of NO_2^- (mean of all treatments) was significantly larger at day 0 and 7 than at day 14 and 28. In CMP soil, the mean concentration of NO_2^- was significantly larger at day 7 than at day 14 and 28, but significantly lower than at the onset of the experiment ($p < 0.05$) (Table 1). In the SMP soil, the mean concentration of NO_2^- was largest when amended with C_2H_2 plus chloramphenicol and lowest in the unamended SMP soil. In CMP soil, the concentration of NO_2^- increased significantly when amended with chloramphenicol compared to soil not amended with chloramphenicol. The concentration of NO_2^- was significantly larger in the CMP soil than in the SMP soil ($p < 0.05$) (Table 2).

3.2. Emission of N_2O

The emission of N_2O increased over time and resembled a zero order kinetic (Fig. 4). However, in the CMP soil amended with C_2H_2 , the emission of N_2O increased after 24 h (Fig. 4). In the SMP soil, the N_2O emission rate was significantly larger at the onset of the experiment than when conditioned aerobically for 7, 14 or 28 days (Table 1). In CMP soil, the highest N_2O emission rate was found when conditioned aerobically for 7 days and lowest when incubated aerobically for 14 or 28 days. The emission of N_2O was

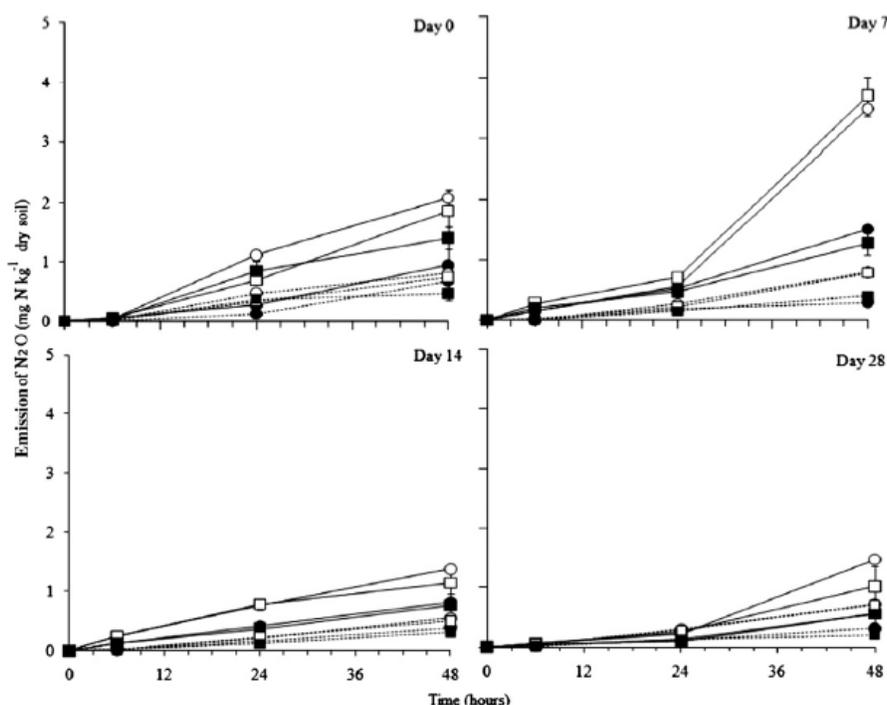


Fig. 4. Emission of N_2O ($mg\ N\ kg^{-1}$ dry soil) from soil of Xochimilco incubated anaerobically for 48 h and conditioned aerobically for a) 0 days, b) 7 days, c) 14 days and d) 28 days. Legends to the figure can be found in Fig. 2.

significantly larger in the CMP soil than in the SMP soil ($p < 0.05$) (Table 2).

The production of N_2 increased over time and resembled a zero order kinetic (Fig. 5). However, in CMP soil conditioned for 7 days, the emission of N_2 increased after 24 h. The emission of N_2 was significantly larger in the CMP soil than in the SMP soil ($p < 0.05$) (Table 2).

4. Discussion

Several factors, such as pH, temperature, C-substrate availability, high NO_3^- concentration and anaerobic conditions affect denitrification rates [21]. The soil of Xochimilco shows near optimum conditions, i.e. pH between 7 and 8, high organic matter content, microorganisms adapted to anaerobic conditions as the soils are regularly flooded. The conditions were further optimized in the experimental set-up, i.e. strict anaerobiosis and no limitations in the availability of NO_3^- , so that a possible effect of methylparathion condition on denitrification and the N_2O -to- N_2 ratio could be studied.

Methylparathion stimulated denitrification as it increased the NO_3^- reduction, the concentration of NO_2^- and the emission of N_2O and N_2 . The availability of carbon in organic carbon compounds is one of the most important factors controlling the activity of denitrifiers [21]. Methylparathion can serve as a C-substrate and e^- donor thereby increasing NO_3^- reduction and consequently emission of N_2O and N_2 [16,41,42]. Different microorganisms have the capacity to degrade methylparathion. *Arthrobacter* sp. and *Pseudomonas stutzeri* can use methylparathion as a sole carbon source for growth and degraded it within 9 and 12 h [42,43]. Chen et al. [16] found that

Pseudomonas sp. was able to degrade $15\ mg\ parathion\ l^{-1}\ h^{-1}$ and reached its stationary phase in about 22 h. Tayal et al. [44] reported that methylparathion persisted in soil for only 30 days. In a parallel study with the same chinampa soil, methylparathion was removed from soil <30 days thus easily serving as an e^- donor. However, methylparathion might also inhibit denitrification and emissions of N_2O . Saez et al. [45,46] reported that methylparathion inhibited growth of the denitrifiers *Xanthobacter autotrophicus* (CECT 7064) and *Paracoccus* (ATCC 19367) and emission of N_2O . As such, methylparathion might stimulate the activity of certain microorganisms and/or inhibit others. Zhang et al. [11] found that in untreated soil the dominant bacterial groups included members of α -proteobacteria, while in the methylparathion-contaminated soil the dominant phylotypes were replaced by a subdivision of γ -proteobacteria.

Chloramphenicol did not affect the removal of NO_3^- from soil or the emissions of N_2O . As such, the activity of NO_3^- reductase was not affected by chloramphenicol when anaerobiosis was induced. This indicated that no or little *de novo* synthesis of NO_3^- reductase occurred and the enzyme persisted in the soil for 28 days. Chloramphenicol, however, did increase the concentrations of NO_2^- in the methylparathion-amended soil suggesting that some *de novo* synthesis of nitrite reductase occurred.

The N_2O -to- N_2 ratio in the chinampa soil was 3.5, i.e. little N_2 was formed, and methylparathion and chloramphenicol did not affect the ratio. Only small amounts of N_2 were formed within 24 h, but the N_2 emission often increased thereafter. As such, a lag phase in the N_2 production was detected. Firestone and Tiedje [47] reported that N_2O reductase activity only increased after 16–33 h.

This research revealed that methylparathion has the capacity to increase the emission of N_2O . Consequently, it might be important

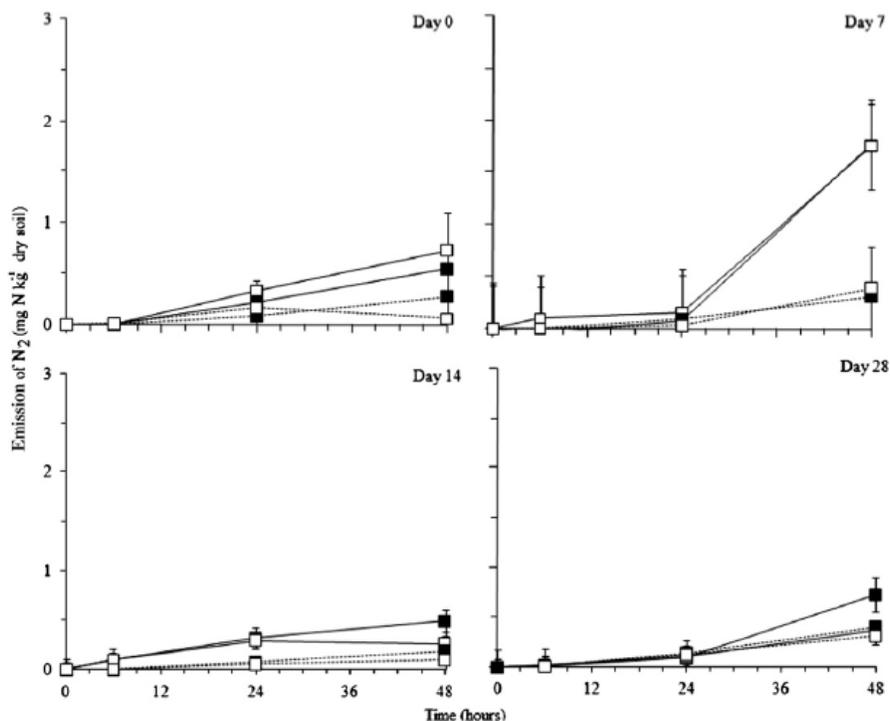


Fig. 5. Emission of N_2 ($mg\ N\ kg^{-1}$ dry soil) from soil of Xochimilco incubated anaerobically for 48 h and conditioned aerobically for a) 0 days, b) 7 days, c) 14 days and d) 28 days. Dotted lines are soil amended with methylparathion and continuous lines are soil not amended with methylparathion and unamended soil (■), treated with chloramphenicol (□). Bars are ± 1 standard error of the estimates ($p < 0.05$ and $n = 9$).

to investigate how methylparathion affects other soil processes and the microorganisms involved.

5. Conclusions

It was found that methylparathion increased the emission of N_2O and N_2 , the concentration of NO_2^- and the removal of NO_3^- from soil. Conditioning the soil aerobically reduced the concentration of NO_2^- in the subsequent anaerobic incubation, but had no effect on the removal of NO_3^- from soil. Acetylene and/or chloramphenicol had no effect on the removal of NO_3^- from soil and little or no effect on the concentration of NO_2^- . Acetylene increased the emission of N_2O independent from the application of methylparathion and/or chloramphenicol.

Acknowledgements

We are grateful to Sanchez-Nahuacatl M. G. for technical assistance and Godoy-Rufino J. L. to allow us to sample his field. B.-J. A. and C.-L. C. received grant-aided support from 'Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM' and 'Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología' (CONACYT, Mexico). This work was funded by CONACYT project number 60725.

References

- [1] R.T. Rojas, Presente, Pasado y Futuro de las Chinampas CIESAS. Patronato del Parque Ecológico de Xochimilco A. C., México D.F., 1995.
- [2] R.T. Rojas, La agricultura chinampera, Compilación histórica, Dirección de difusión cultural, Cuadernos universitarios, Agronomía 7 (1983) 181–211.
- [3] INECOL, Final report, in: Programa rector de restauración ecológica área natural protegida zona sujeta a conservación ecológica 'Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco' (2002). <http://ramsar.conanp.gob.mx/documentos/fichas/50.pdf>.
- [4] D. Tilman, J. Fargione, B. Wolff, D. D'Antonio, A. Dobson, A. Howarth, D. Schindler, W.H. Schlesinger, D. Simberloff, D. Swackhamer, Forecasting agriculturally driven global environmental change, *Science* 292 (2001) 281–284.
- [5] C.A. Kinney, K.W. Mandernack, A.R. Mosier, Laboratory investigations into effects of the pesticides mancozeb, chlorothalonil, and proflururon on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilized soil, *Soil Biol. Biochem.* 37 (2005) 837–850.
- [6] Cicoplafest, Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (2008). <http://www.sagarpa.gob.mx/cicoplafest/>.
- [7] G. Isbister, K. Mills, L. Friberg, M. Hodge, E. O'Connor, R. Patel, M. Abeyewardene, M. Eddleston, Human methylparathion poisoning, *Clin. Toxicol.* 45 (2007) 956–960.
- [8] M. Pell, B. Stenborg, J. Stenström, L. Torstenson, Potential denitrification and nitrification tests for evaluation of pesticide effects in soil, *AMBIO* 27 (1996) 24–28.
- [9] Y. Chen, X. Zhang, H. Liu, Y. Wang, X. Xia, Study on *Pseudomonas* sp. WBC-3 capable of complete degradation of methylparathion, *Wei Sheng Wu Xue Bao* 42 (2002) 490–497.
- [10] C. Magalhães, J. Costa, C. Teixeira, A. Bordalo, Impact of trace metals on denitrification in estuarine sediments, *Marine Chem.* 107 (2007) 332–341.
- [11] P. Doelman, L. Haanstra, Short-term and long-term effects of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn on microbial respiration in relation to abiotic soil factors, *Plant Soil* 79 (1984) 317–321.
- [12] L. Holtan-Hartwig, M. Bechmann, T.R. Høyås, R. Linjordet, L.R. Bakken, Heavy metals tolerance of soil denitrifying communities: N_2O dynamics, *Soil Biol. Biochem.* 34 (2002) 1181–1190.
- [13] D. Sobolev, M.F.T. Begonia, Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers, *Int. J. Res. Public Health* 5 (2008) 450–456.
- [14] K. Johnsen, S.S. Jacobsen, V. Torsvik, J. Sørensen, Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils, *Biol. Fertil. Soils* 33 (2001) 454–459.
- [15] M.A. Locke, R.M. Zablotowicz, Pesticides in soil – benefits and limitations to soil health, in: P. Schjønning, S. Elmholt, B.T. Christensen (Eds.), *Managing Soil*

- Quality: Challenges in Modern Agriculture. CABI Publishing, Wallingford, 2004, pp. 239–260.
- [16] IPCC, Climate change, in: B. Metz, O.R. Davidson, P.R. Bosch, R. Dave, L.A. Meyer (Eds.), Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge and New York, 2007, pp. 499–532.
- [17] R. Zhang, J. Jiang, J.D. Gu, S. Li, Long term effect of methylparathion contamination on soil microbial community diversity estimated by 16S rRNA gene cloning, *Ecotoxicology* 15 (2006) 523–530.
- [18] K. Spokas, D. Wang, Stimulation of nitrous oxide production resulted from soil fumigation with chloropicrin, *Atmos. Environ.* 37 (2003) 3501–3507.
- [19] K. Spokas, D. Wang, R. Venterea, Impact of soil fumigation with chloropicrin and methyl isothiocyanate on greenhouse gases, *Soil Biol. Biochem.* 37 (2005) 475–485.
- [20] K. Spokas, D. Wang, R. Venterea, M. Sadowsky, Mechanisms of N₂O production following chloropicrin fumigation, *Appl. Soil Ecol.* 31 (2006) 101–109.
- [21] R. Knowles, Denitrification, *Microbiol. Rev.* 46 (1982) 43–70.
- [22] M. Simek, J.E. Cooper, T. Pček, H. Santruckova, Denitrification in arable soils in relation to their physico-chemical properties and fertilization practice, *Soil Biol. Biochem.* 32 (2000) 101–110.
- [23] M.K. Firestone, R.B. Firestone, J.M. Tiedje, Nitrous oxide from soil denitrification: factors controlling its biological production, *Science* 208 (1980) 749–751.
- [24] IPCC, Climate Change, in: J.T. Houghton, Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell, C.A. Johnson (Eds.), The Scientific Basis, Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge and New York, 2001, p. 881.
- [25] IPCC, Climate Change, in: S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, H.L. Miller (Eds.), The Physical Science Basis, Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge and New York, 2007, p. 996.
- [26] S.M. Smith, J.M. Tiedje, Phases of denitrification following oxygen depletion in soil, *Soil Biol. Biochem.* 11 (1979) 261–267.
- [27] W.L. Balderstone, B. Scherr, W.J. Payne, Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 31 (1976) 504–508.
- [28] M. Pell, B. Stenberg, J. Stenström, L. Torstensson, Potential denitrification activity assay in soil-with or without chloramphenicol? *Soil Biol. Biochem.* 28 (1996) 393–398.
- [29] A. Montoya-Gonzalez, O.E. Gonzalez-Navarro, B. Govaerts, K.D. Sayre, I. Estrada, M. Luna-Guido, J. Ceja, L. Patiño-Zuniga, R. Marsch, L. Dendooven, Effect of straw management, crop rotation and nitrogen source effect on carbon and nitrogen dynamics and nitrous oxide emissions: a laboratory study, *Plant Soil* 325 (2009) 243–253.
- [30] R.E. Murray, R. Knowles, Chloramphenicol inhibition of denitrifying enzyme activity in two agricultural soils, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 3487–3492.
- [31] L. Dendooven, P. Splatt, J.M. Anderson, D. Scholefield, Kinetics of the denitrification process in a soil under permanent pasture, *Soil Biol. Biochem.* 26 (1994) 361–370.
- [32] J.T. Moraghan, R.J. Buresh, Correction for dissolved nitrous oxide in nitrogen studies, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41 (1977) 1201–1202.
- [33] L. Dendooven, P. Splatt, J.M. Anderson, The use of chloramphenicol in the study of the denitrification process: some side-effects, *Soil Biol. Biochem.* 26 (1994) 925–927.
- [34] G.W. Thomas, Soil pH and soil acidity, in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods*, Soil Science Society of America, Madison, 1996, pp. 475–490.
- [35] J.D. Rhoades, N.A. Mantghi, P.J. Shause, W. Alves, Estimating soil salinity from saturated soil-paste electrical conductivity, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53 (1989) 428–433.
- [36] G.W. Gee, J.W. Bauder, Particle-size analysis, in: A. Klute (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Physical and Mineralogical Methods*, Soil Science Society of America, Madison, 1996, pp. 383–411.
- [37] J.M. Bremner, Total nitrogen, in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods*, Soil Science Society of America, Madison Inc, Wisconsin, 1996, pp. 1085–1121.
- [38] R.L. Mulvaney, Nitrogen – inorganic forms, in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Chemical methods*, Soil Science Society of America, Madison Inc, Wisconsin, 1996, pp. 1123–1184.
- [39] L. Dendooven, J.M. Anderson, Maintenance of denitrification potential in pasture soil following anaerobic events, *Soil Biol. Biochem.* 27 (1995) 1251–1260.
- [40] SAS Institute, *Statistic Guide for Personal Computer Version 6.04*, Ed. SAS 418 Institute, Cary (1989).
- [41] M.P. Ramanathan, D. Lalithakumari, Complete mineralization of methylparathion by *Pseudomonas* sp. A3, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 80 (1999) 1–12.
- [42] P.P. Liu, Y.C. Yan, X.P. Xie, The mechanism of purification and degradation of methylparathion-degrading bacterium YL8, *Zhongguo Huanjing Kexue* 26 (2006) 206–209.
- [43] B. Wang, L. Xiong, Y. Zheng, Z. Zhang, W. Tong, S. Liu, Y. Chen, W. Xiao, D. Liu, Cloning and expression of the mpd gene from a newly isolated methylparathion-degrading strain of bacteria, *Huanjing Kexue Xuebao* 28 (2008) 1969–1975.
- [44] A.K. Tayal, I. Kaur, S.N. Tandon, Identification of metabolites of methylparathion in plant, water and soil, *Anal. Lett.* 32 (1999) 2521–2530.
- [45] F. Sáez, C. Pozo, M.A. Gómez, B. Rodela, J. González-López, Growth, nitrite, and nitrous oxide accumulation of *Paracoccus denitrificans* ATCC 19367 in the presence of selected pesticides, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003) 1–5.
- [46] F. Sáez, C. Pozo, M.A. Gómez, B. Rodela, J. González-López, Growth and denitrifying activity of *Xanthobacter autotrophicus* CECT 7064 in the presence of selected pesticides, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 (2005) 563–567.
- [47] M.K. Firestone, J.M. Tiedje, Temporal changes in nitrous oxide and dinitrogen from denitrification following onset of anaerobiosis, *Appl. Environ. Microbiol.* 38 (1979) 673–679.

Artículo en redacción:

Determination by 16S DNAr and *nosZ* gen of bacteria involved in denitrification in a chinampa soil of Mexico City as affected by methylparathion

A. Blanco-Jarvio ^a, C. Chávez-López ^a, FJ. Fernández ^b, L. Dendooven ^c, N. Cabirol ^d

^a Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, Mexico City, Mexico

^b Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

^c Laboratorio de Ecología de Suelos, GIB, Cinvestav, Mexico City, Mexico

^d Facultad de Ciencias, Departamento de Ecología y Recursos Naturales, UNAM, Mexico City, Mexico

Artículo reportando los resultados de las partes 4.4 y 4.5.

Removal of methyl parathion from a chinampa agricultural soil of Xochimilco Mexico: A laboratory study

C. Chávez-López^a, A. Blanco-Jarvio^a, M. Luna-Guido^b, L. Dendooven^b, N. Cabirol^{c,*}

^aInstitute of Engineering, UNAM, Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510 D.F. Mexico

^bLaboratory of Soil Ecology, Cinvestav, Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, C.P. 07360 México, D.F., Mexico

^cFaculty of Sciences, UNAM, Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510 México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2011

Received in revised form

29 May 2011

Accepted 3 June 2011

Available online xxx

Handling editor: Bryan Griffiths

Keywords:

4-Nitrophenol

C dynamics

N dynamics

Pesticide degradation

Methyl parathion

ABSTRACT

Large amounts of methyl parathion are used to control pests on crops when cultivated in chinampa soils of Mexico City. The effect of adding methyl parathion on soil characteristics, CO₂ emissions, mineral N and 4-nitrophenol, a degradation product of methyl parathion, and the degradation of methyl parathion, was investigated in an aerobic incubation experiment. Treatments were sterilized and non-sterilized soil amended with or without methyl parathion at 280 mg kg⁻¹, a concentration sometimes found in the top soil. Methyl parathion removal followed a first-order kinetic with a half-life ranging from 16 to 34 days, while small amounts of 4-nitrophenol were detected after three days. No abiotic processes affected the methyl parathion concentration and no 4-nitrophenol was formed in the sterilized soil. It was found that methyl parathion was removed rapidly from soil and less than 35 µg kg⁻¹ 4-nitrophenol was found in soil.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

In some parts Mexico City, i.e. to the southwest in Xochimilco, agriculture is still done as was done by the Aztecs or Mexicas whom founded the city Tenochtitlan. They made rectangular plots from lake sediments and called them chinampas meaning artificial islands or floating gardens. Sediment from the canals that surround the chinampas is still applied to the soil, which is used to cultivate flowers, vegetables and maize. As such, the soils are nutrient and organic rich and irrigation is unlimited so up to four harvests of certain crops can be obtained per year. The lettuce is harvested two months after application. Overall, four harvests of lettuce are obtained per year and as such large amounts of methyl parathion, i.e. 2 kg ha⁻¹, are applied to the soil layer. Ammonium sulphate, and horse and cow manure are applied as fertilizers, while crops are irrigated with tap water to prevent pathogen contamination. This antropogenic pre-hispanic agroecosystem was declared a World Heritage site by UNESCO in 1987, due to its unique agricultural tradition in the world. Since 1990, farmers at Xochimilco have used organophosphorus pesticides, such as

methyl parathion, chlorpirifos, malathion and diazinon, to control pests [1]. Farmers cultivate lettuce. Overall, four harvests of lettuce are obtained per year and as such large amounts of methyl parathion, i.e. 2 kg ha⁻¹, are applied to the soil layer. These pesticides are neurotoxic to animals and humans as they affect nervous system functioning [2]. The pesticide methyl parathion is an organophosphorus compound classified as highly toxic (class I) by the United States Environmental Protection Agency, US-EPA, and extremely toxic (category Ia) by the World Health Organization (WHO) [3]. The IUPAC name of methyl parathion is O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate.

Bacteria that can degrade the pesticide, such as *Serratia* sp. strain DS001, *Bacillus* sp., *Pseudoaminobacter* sp., *Achromobacter* sp., *Brucella* sp., *Ochrobactrum* sp., *Flavobacterium balustinum*, *Pseudomonas* sp. A3, have been isolated from cultivated soil treated with methyl parathion [4–6]. Some of those bacteria use methyl parathion as a carbon and phosphorus source [7,8]. Biodegradation of methyl parathion in a liquid media occurs between pH 7.0 and 10.0 and temperatures of 30–37 °C [4,9]. Other factors, such as salinity, organic carbon content, water holding capacity and microorganisms are also known to affect its removal from soil [10,11]. Biodegradation of methyl parathion begins by a hydrolysis whereby two compounds 4-nitrophenol and dialkylthiophosphate (DATP) are formed [12,13]. 4-nitrophenol is the major degradation product

* Corresponding author. Tel.: +52 55 54848114; fax: +52 55 5747 3313.

E-mail address: natcabirol@yahoo.com (N. Cabirol).

of methyl parathion and can accumulate in soil [14]. Two enzymes, methyl parathion hydrolase (MPH) and organophosphorus hydrolase (OPH), are involved in the hydrolysis of methyl parathion and produced by the afore mentioned bacteria [15].

Large amounts of methyl parathion, up to $2 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$, have been applied to vegetables being cultivated in the chinampa soils since the beginning of 1990's. But no information exists on how long it remains in chinampa soils and how it affects the dynamics of inorganic N and microbial activity in this particular and unique ecosystem. The objective of this study was to investigate the removal of methyl parathion from a chinampa soil, the dynamics of 4-nitrophenol, its major degradation product, concentrations of soil mineral N, and the emissions of CO_2 from treated soil.

2. Materials and methods

2.1. Soil sampling site

The chinampa soil used in this study is situated in the village San Gregorio Atlapulco ($19^\circ 15.9' \text{ N}$ and $99^\circ 4.0' \text{ W}$) at 2237 m.s.l. in Xochimilco (Mexico City), Mexico. Mexico City has a mean annual temperature of 16.8°C (calculated over 2003–2010) and an average annual rainfall of 755 mm yr^{-1} [16]. The chinampa soil is from anthropogenic origin, so it is considered a cumullic Anthrosol [17]. Farmers cultivating lettuce apply methyl parathion to control pests, mostly aphids (plant louse) *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) and the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner). Farmers apply generally a methyl parathion pesticide solution at 0.5 kg ha^{-1} (Foley 50E) during the first 15 days. Foley 50E is a commercial available emulsion of methyl parathion. The lettuce is harvested two months after application. Ammonium sulphate, and horse and cow manure

are applied as fertilizers, while crops are irrigated with tap water to prevent pathogen contamination.

2.2. Soil sampling

A chinampa soil 1350 m^2 ($90 \times 15 \text{ m}$) was sampled to study the effects of methyl parathion on soil processes in May 2009, two months after methyl parathion was applied by the farmer (Fig. 1). Three similar plots of 450 m^2 ($90 \times 5 \text{ m}$) were defined and sampled perpendicular to the canal. Each plot was divided in three subplots and sampled by augering 20 times the 0–15 cm layer with a stony soil auger 7 cm in diameter (Eijkkelkamp, NL). Soil from each subplot was pooled so that nine different soil samples were obtained. The soil samples ($n = 9$) were 2-mm sieved and characterized (Table 1). Concentrations of methyl parathion ranged from 290 to $307 \mu\text{g kg}^{-1}$ and 4-nitrophenol from 2 to $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ upon sampling. This field-based replication, i.e. three different soil samples in triplicate, was maintained in the incubation study.

2.3. Experimental set-up and treatments

The experimental design was a completely randomized factorial with three replications of soil taken from the plots and subplots (maintained from the field site replications). A first factor was the number of plots ($n = 3$) and subplots ($n = 3$). The second factor was incubation time with seven measurements during the incubation, i.e. 0, 1, 3, 10, 15, 20 and 25 days. The third factor was the amount of methyl parathion added to soil, i.e. 0 or 280 mg kg^{-1} , while the fourth factor was sterilized or unsterilized soil. Normally lower amounts of methyl parathion ranging from 1 mg kg^{-1} to 100 mg kg^{-1} have been used in laboratory studies [14,18]. However, as the lettuce plants are handsprayed with methyl parathion and

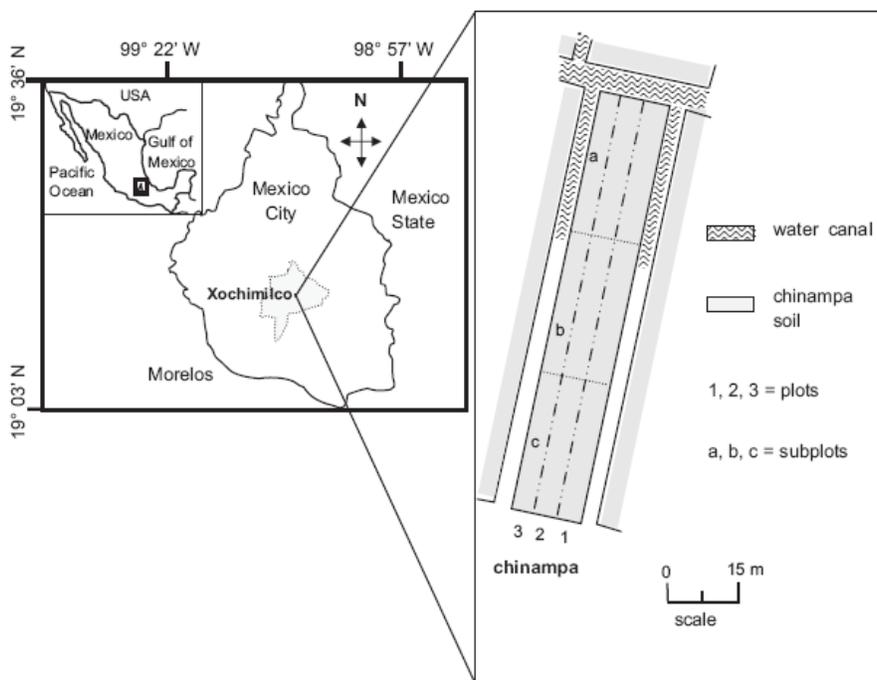


Fig. 1. Location of the chinampa soil in Mexico City (Mexico) and outline of plots and subplots.

Table 1
Some characteristics of the 0–20 cm layer of three plots sampled of a chinampa soil.

Soil characteristics	Plot number		
	1	2	3
Sand (g kg ⁻¹)	610 ^a (60) ^b	560 (10)	600 (30)
Clay (g kg ⁻¹)	30 (1.0)	40 (1.0)	50 (1.0)
Silt (g kg ⁻¹)	360 (60)	400 (20)	350 (30)
Bulk density (g cm ⁻³)	0.42 (0.01)	0.46 (0.02)	0.48 (0.02)
pH	8.4 (0.1)	7.7 (0.1)	8.03 (0.1)
Electrolytic conductivity (dS m ⁻¹)	1.3 (0.2)	0.2 (0.01)	0.3 (0.01)
Organic Carbon (g kg ⁻¹)	86.4 (8.9)	86.6 (7.9)	92.8 (2.1)
Total Nitrogen (g kg ⁻¹)	5.8 (0.5)	6.0 (0.7)	5.8 (0.4)
N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	72.5 (0.1)	28.1 (0.6)	32.7 (0.7)
N-NO ₂ ⁻ (mg kg ⁻¹)	3.2 (0.1)	6.4 (0.3)	1.9 (0.2)
Total phosphorus (mg kg ⁻¹)	91 (3.0)	103 (2.0)	96 (2.0)
Extractable phosphorus (mg kg ⁻¹)	4.1 (0.1)	4.3 (0.3)	5 (0.2)
Methyl parathion (µg kg ⁻¹)	290 (40)	260 (35)	307 (39)
4-Nitrophenol (µg kg ⁻¹)	2 (0.1)	3 (0.4)	2 (0.2)
Exchange K ⁺ (cmol kg ⁻¹)	3.3 (0.3)	1.7 (0.2)	0.5 (0.02)
Exchange Na ⁺ (cmol kg ⁻¹)	6.3 (0.3)	6.6 (0.2)	1.6 (0.03)
Exchange Ca ²⁺ (cmol kg ⁻¹)	18.9 (1.3)	16.8 (0.3)	9.2 (0.2)
Exchange Mg ²⁺ (cmol kg ⁻¹)	13.1 (0.9)	8.2 (0.3)	27.6 (9.8)
Exchange SO ₄ ²⁻ (cmol kg ⁻¹)	4.6 (0.02)	3.1 (0.1)	1.9 (0.1)
Exchange Cl ⁻ (cmol kg ⁻¹)	4.5 (0.3)	8.0 (0.4)	14.6 (0.4)
Exchange CO ₃ ²⁻ (cmol kg ⁻¹)	6.1 (0.4)	0.3 (0.01)	0.2 (0.2)
Exchange HCO ₃ ⁻ (cmol kg ⁻¹)	10.2 (0.1)	5.3 (0.2)	6.3 (0.4)

^a Mean of three soil subplots.

^b Values between parenthesis are standard deviation of the mean ($P < 0.05$), ($n = 3$).

that four times in a year, it was assumed that the concentrations of methyl parathion in the top soil layer will reach much higher values than the above mentioned concentrations. Therefore, a high dose of methyl parathion was applied in this study.

Seven hundred and fifty six sub-samples of 40 g soil were added to 250 ml glass flasks. Half of the flasks were sterilized in a vertical autoclave at 121 °C and 1.3 bar for 35 min (1 bar = 14.5 psi) on three consecutive days. Half of the sterilized and unsterilized soil samples were amended with methyl parathion under sterile conditions. A 0.22% methyl parathion solution was prepared from the commercial available emulsion (Foley 50E), 18 ml of this solution was added to 40 g soil and mixed. The final average methyl parathion concentration in soil was 280 mg kg⁻¹ dry soil. The other half of the sterilized and unsterilized soil samples were amended with an equal amount of distilled water and mixed under sterile conditions. Foley 50E was added to sterile water and applied to the soil under sterile conditions. The amount of water used to apply the methyl parathion was such that the water content of the soil reached 40% water holding capacity (WHC). Three soil sub-samples of soil were taken at random from sterilized and unsterilized soil amended with or without methyl parathion from each of the plots ($n = 3$) and subplots ($n = 3$) and extracted for methyl parathion. These provided zero time samples.

The open glass flasks were placed in screw-capped 2 l glass jars containing a vessel with 20 ml 0.5 M NaOH to trap the CO₂ evolved. The screw-capped 2 l glass jars were closed air-tight, covered with aluminium foil and incubated at 19 °C ± 2.0 for 25 days. An additional 18, 2 l glass jars, containing a vessel with 20 ml 0.5 M NaOH, but without soil were incubated to account for the CO₂ trapped from the air. After 0, 1, 3, 10, 15, 20 and 25 days, three glass jars were selected at random from each treatment, plot and sub-plot and opened, i.e. a total of 108 jars. The vessel with 20 ml 0.5 M NaOH was removed and titrated with 1 M HCl to determine the trapped CO₂. Three jars without soil were also selected at random and the CO₂ trapped from the air determined. The soil was removed from the 250 ml flasks and analyzed for pH, electrolytic conductivity (EC), methyl parathion, 4-nitrophenol, NO₂⁻ and NO₃⁻. All the

remaining jars were opened, aired for 15 min to avoid anaerobic conditions, closed and further incubated.

2.4. Chemicals used

Analytical-grade triphenyl phosphate solution 48064 SUPELCO (standard type internal), tributyl phosphate 44094-U SUPELCO (surrogate), methyl parathion PESTANAL[®] 36187 FLUKA (analytical standard) and 4-nitrophenol PESTANAL[®] 335836 FLUKA (analytical standard) were obtained from SIGMA-ALDRICH Mexico. Methyl parathion emulsion Foley 50E Dragon was supplied by 'Agricultura Nacional S. A. de C.V, Mexico'.

2.5. Soil analysis

The pH was measured in 1:2.5 soil/H₂O (w/w) suspension using a 716 DMS Titrino pH meter (Metrohm Ltd. CH-901, Herisau, Switzerland) fitted with a glass electrode. The EC was determined in a saturated solution extract as described by Rhoades et al. [19]. Total N was measured by the Kjeldhal method using concentrated sulphuric acid (H₂SO₄), potassium sulphate (K₂SO₄) and copper sulphate (CuSO₄) to digest the sample [20]. Soil particle size distribution was determined by the hydrometer method as described by Gee and Bauder [21]. 10 g soil was extracted for inorganic nitrogen with 100 ml 0.5 M K₂SO₄ solution, shaken for 30 min, filtered through Whatman No. 42 paper[®] and NO₃⁻, NO₂⁻ and NH₄⁺ in the K₂SO₄ were determined colourimetrically on a San Plus System-SKALAR automatic analyzer Segmented Flow auto-analyzer (The Netherlands). The WHC was determined by differences of weight on soil samples water-saturated in a funnel and left to stand overnight. Total carbon was quantified with a total organic carbon analyzer Shimadzu [22]. Total phosphorus was determined by digesting a 500 mg soil sub-sample with concentrated HCl and HNO₃ at 125 °C and measured at 880 nm with a spectrophotometer [23]. Extractable P was determined by extracting a 10 g soil sub-sample with NaHCO₃ 0.5 N. The extract was analyzed for P at 880 nm with a spectrophotometer [23]. The cation exchange capacity was determined with ammonium acetate 1.0 N at pH 7, while K⁺ and Na⁺ were quantified with a Flame Photometer Jenway PFP7 and Ca²⁺ and Mg²⁺ with an Atomic Absorption Spectrometer Perkin Elmer Analyst 800 [24]. The amount of HCO₃⁻, CO₃²⁻, Cl⁻ and SO₄²⁻ was determined as described by Zelazny et al. [25].

2.6. Determination of methyl parathion and 4-nitrophenol

The extraction of methyl parathion was based on a modified technique described by Zhang et al. [26]. Briefly, a 5 g soil sub-sample was mixed with anhydrous Na₂SO₄ to absorb soil water in a Teflon extraction vessel and 30 ml ethyl acetate was added to extract the methyl parathion, while 30 µl (1000 ng ml⁻¹) tributyl phosphate was added as surrogate. The Teflon extraction vessel was placed in a CEM-MARS Microwave Reactions System at 950 W, 1207 kPa and 110 °C for 20 min and cooled down. The mixture was filtered over Whatman[®] paper 43, 20 µl triphenyl phosphate (1000 ng ml⁻¹) was added as internal standard and analyzed for methyl parathion on an Agilent Technologies 6890N Gas Chromatography Systems fitted with a Phosphorus/Nitrogen detector and an Agilent Technologies split/splitless Injector 7683B. A HP-5MS ultra inert capillary column of 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm was used with an internal layer of 5%-phenyl-methylpolysiloxane. The injection volume was 2 µl with an analysis time of 35.42 min. The temperature of the injector was 250 °C, the detector 300 °C and the oven 320 °C. The carrier gases N₂, air and He were flowing at 3, 60

and 1 ml min⁻¹, respectively. The methyl parathion extraction efficiency was 92%.

The extraction of 4-nitrophenol was based on a modified technique described by Lopez-Avila et al. [27]. Briefly, a 5 g sub-sample of soil was mixed with 20 ml 2% NaOH and centrifuged at 5000 rpm for 20 min. The supernatant was mixed with 30 ml ethyl acetate in a Teflon extraction vessel and placed in a CEM-MARS Microwave Reactions System at 950 W, 1207 kPa and 110 °C for 20 min and cooled down. The extract was filtered over Whatman® paper 43, concentrated in a rotavapor and dissolved in methanol. A 4 µl aliquot of the extract was analyzed at 315 nm on a Varian HPLC chromatograph fitted with an UV-VIS detector 9050 and a waters Spherisorb C8 column of 250 mm × 4.6 mm × 10 µm. The mobile phase used was 0.1% trifluoroacetic acid/acetonitrile (80:20) at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹. The 4-nitrophenol extraction efficiency was 90%.

2.7. Statistical analysis

The experimental design was a completely randomized factorial. The factors were sterilized and unsterilized soil, three plots in triplicate and two soil amendments, i.e. 0 or 280 mg methyl parathion kg⁻¹ soil.

Emission of CO₂ was regressed on elapsed time using a linear regression model, which was forced to pass through the origin but allowed different slopes (production rates) for each treatment. The jars without soil accounted for the CO₂ in the atmosphere. Significant differences between treatments for the cumulative CO₂ production were determined using PROC MIXED [28].

pH, EC and concentrations of NO₂⁻, NO₃⁻, methyl parathion and 4-nitrophenol were subjected to one way analysis of variance using PROC GLM [28] to test for significant differences between treatments with Tukey's Studentized Range test. All data presented were the mean of three replicates of soil taken from the three subplots (n = 9).

2.8. Reaction rate constant (k) and half-life (t_{1/2})

A neperian logarithm of the methyl parathion concentration versus time was used to define the order of kinetics. The kinetics showed a first-order reaction, i.e. highest R², with a straight lines and a slope equal to k (days⁻¹). The half-life, t_{1/2}, for methyl parathion was calculated using the equation:

$$t_{1/2} = \text{Ln}2/K \quad (1)$$

with: where k is the reaction rate constant and Ln represents the neperian logarithm

3. Results

In the sterilized soil, the concentration of methyl parathion showed little variation and no significant changes over time (Fig. 2). The decrease in the concentration of methyl parathion in the unsterilized soil was a first-order kinetic and was significantly faster in plot 1 than in plots 2 and 3 (P < 0.05). Within 25 days, 66% of the methyl parathion was removed from plot 1, 42% and 39% in plot 2 and 3 respectively. The half-life ranged from 16 to 34 days (Table 2). The concentration of 4-nitrophenol started to increase only after 15 days (Fig. 3).

In each of the plots, the pH decreased while the EC increased significantly when soil was amended with methyl parathion solution compared to the unamended soil (P < 0.0001) (Table 3). The emission of CO₂ was significantly larger from plot 1 than from plot 2 and 3 (Table 3). Application of methyl parathion solution

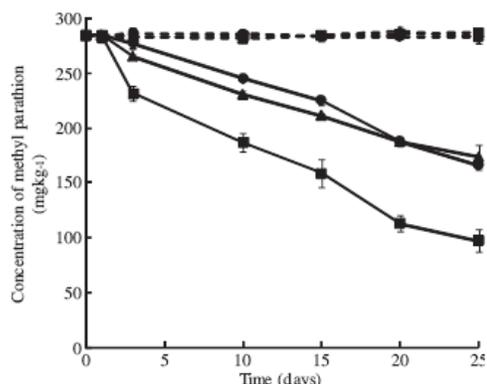


Fig. 2. Concentration of methyl parathion in a chinampa soil (plot 1 (■), plot 2 (▲) and plot 3 (●)) incubated at 19 ± 2 °C for 25 days. The solid lines correspond to non-sterilized soil and dotted lines correspond to sterilized soil. Bars are 1 standard deviation of 3 replicates from 3 sub-plot samples.

significantly increased the emission of CO₂ in each plot (P < 0.0001). The concentrations of NH₄⁺ were not affected by treatment (Data not shown). The mean concentration of NO₂⁻ was significantly larger in plot 2 than in plot 1 and 3 (P < 0.05). Application of methyl parathion had no significant effect on the mean concentration of NO₂⁻. The mean concentration of NO₃⁻ was significantly larger in plot 1 than in plot 2 and 3 (P < 0.05). Application of methyl parathion increased the concentration of NO₃⁻ with 12 mg N kg⁻¹ soil, i.e. mean of plot 1, 2 and 3.

4. Discussion

Application of methyl parathion solution increased the EC in soil used in this experiment. The methyl parathion solution, i.e. Foley 50E, had an EC 0.3 ± 0.01 dS m⁻¹. Long-term application of Foley 50E might thus increase the soil EC, which is already high and inhibiting plant growth [29].

The concentration of methyl parathion decreased after the first day. It has to be remembered that methyl parathion was frequently applied to the soil at high rates over the last 20 years and the microbial community may be adapted to utilise methyl parathion. Misra et al. [30] found similar results while studying the removal of parathion from an alluvial and a laterite soil. The absence of a lag phase is normally attributed to adaptation of the microorganisms to the contaminant [31]. Half-life times for methyl parathion in sandy clay soils ranged from 20 to 28 days and thus similar to the values found for the chinampa soil [32,33]. The half-life of the methyl parathion was different between the soils. It was 16 days in soil of plot 1, 33 days in plot 2 and 34 days in plot 3. There are different factors that will control the removal of methyl parathion from soil. Microbial activity as witnessed by the emission of CO₂ was larger

Table 2
Reaction rate constant and half-life of methyl parathion in chinampa soil incubated at 19 ± 2 °C for 25 days.

Non-sterilized soil	First order kinetic		Half-life (day)
	reaction rate constant (day ⁻¹)	R ²	
Plot 1	-0.044	0.985	16
Plot 2	-0.021	0.973	34
Plot 3	-0.021	0.993	33

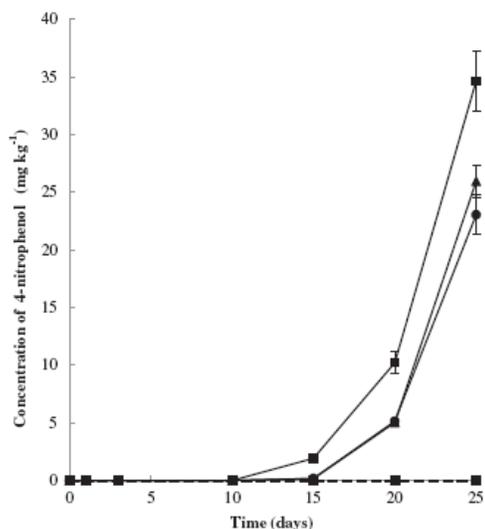


Fig. 3. Concentration of 4-nitrophenol in a chinampa soil (plot 1 (■), plot 2 (▲) and plot 3 (●)) incubated at 19 ± 2 °C for 25 days. The solid lines correspond to non-sterilized soil and dotted lines correspond to sterilized soil. Bars are 1 standard deviation of 3 replicates from 3 sub-plot samples.

from plot 1 than from plot 2 and 3. A higher microbial activity in plot 1 might have accelerated the removal of methyl parathion compared to plot 2 and 3. Although the EC was higher in plot 1 than in plot 2 and 3, this did not appear to have inhibited the removal of methyl parathion [34]. Abiotic processes did not affect the concentration of methyl parathion as it remained constant in the sterilized soil. The amount of methyl parathion in the soil upon sampling ranged from 290 to 307 $\mu\text{g kg}^{-1}$ soil. It appears that the methyl parathion was removed from soil between the last application and soil sampling, i.e. four months.

The concentration 4-nitrophenol increased after only 15 days although the concentration of methyl parathion decreased within 1 day. As such, a lag occurred between the decrease in the concentration of methyl parathion and the production of 4-nitrophenol. A lag between the decrease in methyl parathion and an increase in its degradation product 4-nitrophenol has been reported in liquid media with *Pseudomonas* sp. A3 [7].

The production of CO_2 increased on the average 1.3 times in the chinampa soil amended with methyl parathion. However, Bindhya et al. [18] reported that the emission of CO_2 increased when an agricultural soil from India was treated with 1 mg methyl parathion kg^{-1} , but decreased sharply when 50 or 100 mg methyl parathion kg^{-1} was added. This would indicate that methyl parathion can be toxic for soil microorganisms. Toxicity studies have shown that 4 mg l^{-1} methyl parathion can be lethal to bacteria, such as *Flavobacterium* and *Pseudomonas*, in pure cultures [34]. The chinampa soil has been treated with methyl parathion for over 20 years so it can be speculated that the microorganisms have adapted to the pesticide and have developed the capacity to degrade the pesticide [32].

The production of CO_2 increased with between 60 and 68 mg C kg^{-1} in soil amended with 280 mg methyl parathion-C kg^{-1} after 25 days. Andrea et al. [35] also found an increase in emissions of CO_2 when methyl parathion was added to soil. This would suggest that approximately 60% of the 104 mg C added with the methyl parathion was mineralized to CO_2 . However, no priming

Table 3

pH, electrolytic conductivity (dS m^{-1}), CO_2 production rate (mg C $\text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$), means of NO_2^- (mg N kg^{-1}) and NO_3^- (mg N kg^{-1}) of chinampa soil with or without methyl parathion, incubated at 19 ± 2 °C for 25 days.

Plot	-methyl parathion	+methyl parathion	MSD ^a	P value
pH				
1	8.4 A b a c	8.2 B a	0.1	<0.0001
2	7.7 A c	7.4 B b	0.1	<0.0001
3	8.0 A b	7.5 B b	0.1	<0.0001
MSD	0.1	0.1	—	—
P value	<0.0001	<0.0001	—	—
EC^d (dS m^{-1})				
1	1.3 B a	1.4 A a	0.04	<0.0001
2	0.2 B c	0.3 A c	0.03	<0.0001
3	0.4 B b	0.5 A b	0.03	<0.0001
MSD	0.03	0.05	—	—
P value	<0.0001	<0.0001	—	—
CO_2 production rate (mg C $\text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)				
1	209 B a	277 A a	4	<0.0001
2	191 B b	255 A b	7	<0.0001
3	194 B b	254 A b	6	<0.0001
SEE	6	7	—	—
P value	0.0064	0.0006	—	—
NO_2^- concentration (mg N kg^{-1})				
1	1.1 A b	1.3 A ab	0.5	0.3746
2	2.2 A a	2.2 A a	1.2	0.9991
3	0.9 A b	1.0 A b	0.5	0.6855
MSD	0.9	1.1	—	—
P value	0.0003	0.0158	—	—
NO_3^- concentration (mg N kg^{-1})				
1	97 B a	115 A a	12	0.0034
2	64 A b	72 A b	14	0.2653
3	61 A b	71 A b	10	0.0679
MSD	12	17	—	—
P value	<0.0001	<0.0001	—	—

^a MSD: Minimum significant difference ($P < 0.005$).

^b Values with the same capital letter in the row are not significantly different between the treatments.

^c Values with the same letter in the column are not significantly different between the plots.

^d EC: Electrolytic conductivity.

^e SEE: standard error of the estimate.

effect was considered so the amount mineralized might have been lower [36].

Methyl parathion increased the concentration of NO_3^- in soil by 12 mg kg^{-1} (mean of the three soils). Approximately 15 mg N kg^{-1} soil was added with the methyl parathion to the soil, so it appears that most of it was mineralized. Andrea et al. [35] reported similar results in soils of Brazil. Misra et al. [30] found that the concentration of NO_2^- increased in soil amended with methyl parathion and that within 4 days. The NO_2^- will be oxidized immediately thereby increasing the concentration of NO_3^- rapidly in soil [37].

5. Conclusion

Methyl-parathion was removed immediately from a chinampa soil with a half-life that ranged between 16 and 34 days. These values were similar for those reported for sandy clay soils even though large amounts were applied in our study. There was a lag of 15 days between the dissipation of methyl parathion and the increase of its most important degradation product 4-nitrophenol. Methyl-parathion increased the emission of CO_2 with between 60 and 68 mg C kg^{-1} and the concentration of NO_3^- with between 8 and 18 mg N kg^{-1} soil. The methyl parathion solution, i.e. Foley 50E,

contained salt and increased the EC of the soil, which might inhibit crop cultivation on the long term.

Acknowledgements

The research was funded by 'Universidad Nacional Autónoma de México' (UNAM) project PAPIIT-DGAPA IN222507 (Mexico). We thank the Posgrado en Ciencias Biológicas from UNAM for use of its facilities, I. Méndez Ramírez for help with the experimental design, C. Ponce de León Hill and V. Alcántara-Concepción for assistance with the analysis of the methyl parathion, and L. Rufino Godoy for access to the sampling site. C. C.-L. received grant-aided support from 'Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología' (CONACYT) Mexico.

References

- [1] V. Alcántara, S.C. Heydrich, R.W. Gibson, M. Mazari-Hiriart, C.A. Ponce de León, Occurrence of Organophosphorus Pesticide (OPP) Compounds from the Xochimilco Wetland Area, South of Mexico City, 3rd Wetland Pollutant Dynamics and Control WETPOL, Barcelona, Spain, 2009, pp. 20–24.
- [2] F.L. Edwards, P.B. Tchounwou, Environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure—a Scientific Review, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2 (2005) 430–441.
- [3] K. Jaga, C. Dharmani, Methyl parathion: an organophosphate insecticide not quite forgotten, *Rev. Environ. Health* 21 (2006) 57–67.
- [4] C. Sreenivasulu, Y. Aparna, Bioremediation of methyl parathion by free and immobilized cells of *Bacillus* sp. isolated from soil, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67 (2001) 98–105.
- [5] R. Zhang, Z. Cui, J. Jiang, J. He, X. Gu, S. Li, Diversity of organophosphorus pesticide-degrading bacteria in a polluted soil and conservation of their organophosphorus hydrolase genes, *Can. J. Microbiol.* 51 (2005) 337–343.
- [6] S.B. Pakala, P. Gorla, A.B. Pnjar, R.K. Krovidi, R. Baru, M. Yanamandra, M. Merrick, D. Siddavattam, Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative *Serratia* sp. strain DS001, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73 (2007) 1452–1462.
- [7] M.P. Ramanathan, D. Lalithakumari, Complete mineralization of methyl parathion by *Pseudomonas* sp. A3, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (1999) 1–12.
- [8] M.L. Ortiz-Hernández, M. Monterrosas-Brisson, G. Yáñez-Ocampo, E. Sánchez-Salinas, Degradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 17 (2001) 147–155.
- [9] X. Qiu, Q. Zhong, M. Lia, W. Baia, B. Lic, Biodegradation of p-nitrophenol by methyl parathion-degrading *Ochrobactrum* sp. B, *Int. Biodeterior. Biodegrad* 59 (2007) 297–301.
- [10] K. Venkateswarlu, T.K.G. Siddarame, N. Sethunathan, Persistence and biodegradation of carbofuran in flooded soils, *J. Agric. Food Chem.* 25 (1977) 533–536.
- [11] H.C. Suter, R.E. White, L.K. Heng, Organic compounds in the environment. Sorption and degradation characteristics of Phosmet in two contrasting Australian soils, *J. Environ. Qual.* 31 (2002) 1630–1635.
- [12] B.K. Singh, A. Walker, Microbial degradation of organophosphorus compounds, *FEMS Microbiol. Rev.* 30 (2006) 428–471.
- [13] G.M. Benke, S.D. Murphy, The influence of age on the toxicity and metabolism of methyl parathion and parathion in male and female rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31 (1975) 254–269.
- [14] L.T. Ou, Methyl parathion degradation and metabolism in soil: influence of high soil–water content, *Soil Biol. Biochem.* 17 (1985) 241–243.
- [15] B.K. Singh, Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications, *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 156–164.
- [16] Smn, Servicio Meteorológico Nacional, 2010, <http://smn.cna.gob.mx/>.
- [17] R. Ramos-Bello, L.J. Cajuste, D. Flores-Román, N. García-Calderón, Heavy metals, salts and sodium in chinampa soils in Mexico, *Agrociencia* 35 (2001) 385–395.
- [18] R. Bindhya, S.A. Sunny, V.S.G. Thanga, In vitro study on the influence of methyl parathion on soil bacterial activity, *J. Environ. Biol.* 30 (2009) 417–419.
- [19] J.D. Rhoades, N.A. Mantghi, P.J. Shause, W. Alves, Estimating soil salinity from saturate soil paste electrical conductivity, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53 (1989) 428–433.
- [20] J.M. Bremner, Nitrogen-total, in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3 – Chemical Methods*, Soil Science Society of America Inc. – American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, 1996, pp. 1085–1121.
- [21] G.W. Gee, J.W. Bauder, Particle size analysis, in: A. Klute (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 1, Physical and Mineralogical Methods*, second ed. Soil Science Society of America Inc. – American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, 1986, pp. 383–411.
- [22] D.W. Nelson, L.E. Sommers, Total carbon, organic carbon and organic matter, in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical methods*, Soil Science Society of America Inc. – American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, 1996, pp. 961–1010.
- [23] S. Kuo, Phosphorus, in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical methods*, Soil Science Society of America Inc. – American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, 1996, pp. 869–919.
- [24] M.E. Sumner, W.P. Miller, Cation exchange capacity and exchange coefficients, in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods*, Soil Science Society of America Inc. – American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, 1996, pp. 1201–1229.
- [25] L.W. Zelazny, L. He, A. Vanwormhoudt, Charge analysis of soils and anion exchange, in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods*, Soil Science Society of America Inc. – American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, 1996, pp. 1231–1253.
- [26] Z.L. Zhang, H.S. Hong, J.L. Zhou, G. Yua, Occurrence and behaviour of organophosphorus insecticides in the River Wuchuan, southeast China, *J. Environ. Monit.* 4 (2002) 498–504.
- [27] V. Lopez-Avila, R. Young, W.F. Beckert, Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1097–1106.
- [28] SAS Institute, *Statistic Guide for Personal Computer Version 6.04*, Edn., SAS Institute, Cary, 1989.
- [29] L.M. Chu, Natural revegetation of coal fly ash in a highly saline disposal lagoon in Hong Kong, *Appl. Vegetation Sci.* 11 (2008) 297–306.
- [30] D. Misra, S. Bhuyan, T.K. Adhya, N. Sethunathan, Accelerated degradation of methyl parathion, parathion and fenitrothion by suspensions from methyl parathion- and p-nitrophenol-treated soils, *Soil Biol. Biochem.* 24 (1992) 1035–1042.
- [31] M. Kah, S. Beukle, C.D. Brown, Factors influencing degradation of pesticides in soil, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 4487–4492.
- [32] R.C. Sims, W.J. Doucette, J.E. McLean, W.J. Grenney, R.R. Dupont, Treatment Potential for 56 EPA Listed Hazardous Chemicals in Soil, United States Environmental Protection Agency, 1988, EPA/600/56–88/001.
- [33] K.V. Ragnarsdottir, Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides, *J. Geol. Soc.* 15 (2000) 859–876.
- [34] P.C. Mishra, *Soil Pollution and Soil Organisms*, APH Publishing Corporation, New Delhi, 2008.
- [35] M.M. Andrea, T.B. Peres, L.C. Luchini, M.A. Marcondes, A. Pettinelli, L.E. Nakagawa, Impact of Long Term Applications of Cotton Pesticides on Soil Biological Properties, Dissipation of [14C]-methyl Parathion and Persistence of Multi-pesticide Residues. Impact of Long Term Pesticide Usage on Soil Properties Using Radiotracer Techniques Report of a Final Research Coordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Hangzhou, Zhejiang, Peoples' Republic of China, 1999, pp. 13–34.
- [36] Y. Kuz'yakov, J.K. Friedel, K. Stahr, Review of mechanisms and quantification of priming effects, *Soil Biol. Biochem.* 32 (2000) 1485–1498.
- [37] L. Bruining, Connections between the C, N and P Biogeochemical Cycles of System Earth and Their Relevance for Environmental Problems, Institute of Environmental Sciences, Leiden University, The Netherlands, 2005.