



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN MICROBIANA DE LOS GENES

***nirK* y *nosZ* EN SUELO DE CHINAMPA DE XOCHIMILCO,**

MÉXICO: ESTUDIO EN MICROCOSMOS.

TESIS

QUE PRESENTA PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

RUIZ DÍAZ ULISES ALFREDO

DIRECCIÓN DE TESIS:

DRA. NATHALIE CABIROL

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 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 18 de octubre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **RUÍZ DÍAZ ULISES ALFREDO** con número de cuenta **95112978** con la tesis titulada **"ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN MICROBIANA DE LOS GENES *nirK* Y *nosZ* EN SUELO DE CHINAMPA DE XOCHIMILCO, MÉXICO: ESTUDIO EN MICROCOSMOS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. NATHALIE CABIROL**:

Presidente: DRA. MARÍA SOLEDAD VÁZQUEZ MURRIETA
Vocal: DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
Secretario: DRA. NATHALIE CABIROL
Suplente: DRA. MARÍA DEL ROCÍO TORRES ALVARADO
Suplente: DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de octubre de 2011

M del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARÍZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del interesado.

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el periodo 2007-2009.

Este proyecto fue financiado por el proyecto CONACyT 60725-Z a cargo de las Dras. Nathalie Cabirol y Rosa María Ramírez Zamora.

Al Químico José Manuel Hernández Solís por la asesoría en cromatografía

Este trabajo contó con la asesoría del Comité Tutorial conformado por:

Dra. Nathalie Cabirol, Tutora

Dra. Pilar Ortega Larrocea, Comité

Dr. Francisco José Fernández Perrino, Comité

A los miembros del Jurado:

Dra. María del Rocío Torres Alvarado

Dra. María Soledad Vásquez Murrieta

Para mi familia

A mis padres, que se han reencontrado con la vida. Por ser un ejemplo al compartirse mutuamente y seguir juntos en un mismo camino después de caminar por senderos peligrosos cuidando de su rebaño en todo momento. A mis hermanos por seguir persiguiendo sus sueños a pesar de todo, a mi tortuga Ninja por ser agua nueva revitalizante, mucho de lo que hago es para que tengas un mejor mundo Emi, Te amo como no tienes idea.

Agradecimientos Personales

A la comunidad de San Gregorio Atlapulco, por el espacio de estudio concedido y por conservar la tradición Chinampera, a la banda del labo, Sarita Dinamita, Rosa Salvaje, Arturo, Claudia, Anidia, Cecilia, Vladimir Paty

A mis amigos por la camaradería y por los fermentos de cebada compartidos, Caballo, Feo, mil gracias por hacerme sentir como en casa en la base. A Sandra, Juan, Marqués, hada Minerva, Juan C, por todas las experiencias vividas.

A la comunidad del Instituto de Ingeniería, y de la gloriosa Facultad de Ciencias.

A mis parejitas del pancracio Mr. Justicia, Psique, Puma Galáctico, Pikador, al profe Juan que compartieron el sueño de pisar el rombo de batalla de 6 X 6 peleando, llaveando, combatiendo, gritando LUCHANDO.

A Poseidón por revelarse y salir a crear tormentas tsunamis y huracanes.

Brwa, Adrian, Roxana, Daniel: Wir muss feiern wenn ich nach Deutschland zurückkomme ¿oder?

Für meine María

Ich widme Diese These für meine shönen Maria dass in Deutschland warten sie mir ist. Bis jetzt bin ich zhalen die Tagen, die Stunden und die Minuten für sehen sie noch einmal. Meine kleine Kind Viele Dank für deine Zeit, für deine Liebe und für anteilst mit mir deine verrückted Welt. Bald wir sein laghen, singen, feiern und bauen unsere trääumen zussamen. Ich liebe dich.

*Es otra noche y yo estoy sin ti por que te fuiste y yo sigo aquí
toda la noche recordandote por que tu cara ya no puedo ver
paso los días escuchando tu voz y tu sonrisa que robó mi corazón
y a la calle ya no quiero salir, para que si no estás junto a mi
quiero estar junto a ti por que me quiero morir en tus ojos
y pensar que estás aquí para ver otro amanecer
quiero estar feliz por que a tu lado todo importa poco
por que mi vida es una mierda es una mierda, si no estás aquí*

Los Desechos

CONTENIDO

Índice de Figuras.....	IX
Índice de Cuadros	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	7
1 Ciclo del nitrógeno y medio ambiente.....	8
1.1 Oxido nitroso	10
1.2 Procesos biológicos de producción del N ₂ O.....	11
1.2.1 DESNITRIFICACIÓN	11
1.2.2 NITRIFICACIÓN/DESNITRIFICACIÓN.....	13
2 Plaguicidas.....	14
2.1 Metil paratión	15
2.2 Efectos sobre la diversidad.....	16
3 Diversidad	18
4 Generalidades edáficas.....	20
4.1 Agregados del suelo.....	21
4.2 Microcosmos.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
5 Zona de estudio	27
6 Experimento 1:.....	30
6.1 Muestreo	30
6.2 Montaje de microcosmos.....	30
6.3 Aplicación de plaguicida	32
7 Experimento 2.....	32
7.1 Muestreo del suelo inalterado	33
7.2 Suelo alterado	33
7.3 Determinación de la microbiota funcional de nirK y nosZ.....	33
7.4 Análisis Físicoquímicos.....	35
7.4.1 Determinación de la CRA.....	35
7.4.2 Determinación de humedad.....	35
8 Análisis Molecular	35
8.1 Extracción de ADN	36
8.2 Amplificación del ADN por PCR	36
8.3 TGGE.....	37
8.4 Secuenciación.....	38
8.5 Análisis estadístico	38
8.6 Análisis de riqueza ponderada	38

RESULTADOS.....	40
9 Experimento 1.....	40
10 Experimento 2.....	44
10.1 Comunidad bacteriana con el gen nirK	44
10.1.1 Análisis de porcentaje de cambio de fragmentos genéticos nirK.....	46
10.1.2 Analisis puntual del porcentaje de cambio en el tiempo.....	47
10.2 Comunidad bacteriana con el gen nosZ	48
10.2.1 Suelo alterado	48
10.2.2 Suelo inalterado	49
10.2.3 Análisis de la dinámica y número de fragmentos genéticos del gen nosZ (número de bandas de suelo inalterado vs. suelo alterado).....	50
10.2.4 Análisis del porcentaje de cambio y riqueza de bandas de nosZ.....	52
10.2.5 Análisis de porcentaje de cambio con el gen nosZ	53
10.2.6 Porcentaje de cambio en el tiempo	54
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS.....	62
LITERATURA CITADA	63
APÉNDICE.....	71

Índice de Figuras

	Página
Figura 1 Porcentaje de gases de efecto invernadero	6
Figura 2 Ciclo del nitrógeno	9
Figura 3 Conversión de nitrógeno de estado sólido a estado gaseoso	12
Figura 4 Ficha técnica del metil paratión.	16
Figura 5 Zona lacustre de San Gregorio Atlapulco.	28
Figura 6 San Gregorio Atlapulco: vista aérea de la zona de estudio.	29
Figura 7 Chinampa de estudio (propiedad del Sr. Alfredo Godoy)	30
Figura 8 Diseño experimental (experimento 1)	31
Figura 9 Esquema del segundo experimento	33
Figura 10 Diseño del experimento 2	34
Figura 11 Esquema del sitio de muestreo	34
Figura 12 Perfil de <i>nirK</i> .	41
Figura 13 Dendograma de <i>nirK</i>	43
Figura 14 TGGE de suelo inalterado. Perfil de bandas en el tiempo	44
Figura 15 Análisis de número de bandas propuesto por Marssorati	45
Figura 16 Número de bandas realizado en tres experimentos independientes	46
Figura 17 <i>nirK</i> cambio en el porcentaje de cambio con la adición de plaguicida	47
Figura 18 <i>nirK</i> , porcentaje de cambio en el tiempo	47
Figura 19 TGGE de suelo alterado. Perfil de bandas con y sin plaguicida y dinámica en el tiempo.	48
Figura 20 TGGE de suelo inalterado. Perfil de bandas con y sin plaguicida y dinámica en el tiempo.	49
Figura 21 Análisis de <i>nosZ</i> en suelo inalterado con o sin plaguicida a diferentes tiempos. Carril 1-9 sin plaguicida 10-19 con plaguicida	50
Figura 22 Análisis de <i>nosZ</i> en suelo inalterado con o sin plaguicida a diferentes tiempos.	51
Figura 23 Análisis de <i>nosZ</i> en suelo alterado con o sin plaguicida a diferentes tiempos	51
Figura 24 Análisis de ANOVA multivariable.	53
Figura 25 Porcentaje de cambio de <i>nosZ</i> en suelo inalterado con plaguicida <i>B</i> Porcentaje de cambio de <i>nosZ</i> en suelo alterado con plaguicida	54
Figura 26 Porcentaje de cambio de <i>nosZ</i> en el tiempo	54

Índice de Cuadros

		Página
Tabla 1	Oligonucleótidos usados para la amplificación de <i>nirK</i> y <i>nosZ</i> .	37
Tabla 2	Promedios y desviación estándar de la aparición de bandas de <i>nirK</i>	46
Tabla3	Resultados de ANOVA <i>nirK</i>	46
Tabla 4	Riqueza de fragmentos genéticos <i>nosZ</i>	50
Tabla5	Resultados de la prueba estadística	52
Tabla6	Resultados de ANOVA <i>nosZ</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS

CRA Capacidad de retención del agua

GEI Gases de efecto invernadero

DGGE Gel de electroforesis con gradiente desnaturizante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

TGGE Gel de electroforesis con gradiente de temperatura (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*)

N₂O Óxido nitroso

OTU Unidad Taxonómica Operacional

RESUMEN

Las chinampas de Xochimilco son un sistema de agricultura que prevalece en la ciudad de México desde la época prehispánica. Desde hace unas décadas se han utilizado en este sitio agroquímicos, como fertilizantes y plaguicidas, aunque se sabe que dichos compuestos pueden ocasionar problemas ambientales. Además, el uso de controladores de plagas puede afectar a las comunidades microbianas del suelo. Éste es el caso del metil paratión (perteneciente al grupo de plaguicidas nitrogenados y organofosforados), ya que bajo ciertas condiciones y debido a su composición química, puede influir en la alteración del ciclo del nitrógeno, así como impactar en las comunidades microbianas.

Durante los últimos años, las evaluaciones sobre la modificación de la diversidad bacteriana de suelos contaminados por el uso de plaguicidas han empleado la identificación del gen ribosomal 16 S como marcador molecular. No obstante, esta metodología resulta poco contundente para la detección de bacterias con funciones ecológicas específicas como nitrificación y/o desnitrificación. Cabe mencionar que el óxido nitroso (N_2O) es un gas de efecto invernadero que se produce de forma natural por procesos de nitrificación, desnitrificación y nitrificación-desnitrificación, los cuales involucran a las enzimas bacterianas *nirK* y *nosZ*.

El objetivo de este trabajo es describir la influencia del plaguicida nitrogenado, metil paratión sobre las comunidades bacterianas del suelo agrícola de Xochimilco, que poseen los genes *nirK* y/o *nosZ*. Estos genes codifican para las enzimas nitrito reductasa y óxido nitroso reductasa, involucradas en los procesos de nitrificación, desnitrificación y nitrificación-

desnitrificación; procesos importantes relacionados con la producción de óxido nítrico (N_2O). Se utilizaron microcosmos como modelo experimental y la técnica de Gel de Electroforesis con Gradiente de Temperatura (TGGE) como herramienta de huella molecular. Se evaluó además el efecto de los agregados del suelo sobre la modificación de la microbiota por la ruptura de los agregados.

Los resultados obtenidos indican una modificación en la riqueza y similitud de los genes *nirK* y *nosZ* dependiente de la adición de plaguicida y/o la ruptura de la estructura edáfica. Estos cambios en la diversidad se dan de manera individual en el periodo de tiempo analizado: 15, 30, 60 y 90 días (experimento 1) y 0, 5 y 10 días (experimento 2) cuando se utiliza plaguicida en exceso (experimento 1) o cuando se rompe la estructura del suelo (experimento 2). También se observó que dichos efectos no son acumulables entre sí.

ABSTRACT

The Xochimilco's floating beds are man made constructions of farming beds in shallow water. The chinampa beds are built of alternating layers of aquatic weeds, bottom sediments, and soil packed inside rectangular cane frames firmly rooted to the lake floor. The chinampa's agriculture has represented a self-contained and self-sustaining system that has operated for centuries as one of the most intensive and productive man-made systems (Chapin 1998). These agricultural practices have worked since the pre-hispanic era until these days. Over the past decades farmers have used nitrogen compounds like methyl parathion to control different kind of pests, although nitrogen derivatives are now reported to have negative environmental effects. Additionally, It is well known that modern agriculture practices may influence the soil microbiota.

In the past few years ribosomal region 16's has been used as a biomarker in bacterial soil community dynamics, specifically in those studies using disturbed soils. Nevertheless, this methodology is unsuitable for detecting bacteria with the mentioned specific ecological functions.

On the other hand, it is also known that biological nitrification, denitrification and nitrification-denitrification naturally produce nitrous oxide (N₂O), a potent greenhouse gas. Different bacterial enzymes such as *nirK* and *nosZ* have been identified in such processes

Dynamic of the Xochimilco's soil bacteria community bearing *nosZ* or *nirK* in their genetic pool were analyzed, and the richness and similarity changes quantified. The factors measured in this study were soil structure and plaguicide addition in a time line period.

Microcosms were the experimental model used in this work and *TGGE* was carried out as a molecular approach. According to obtained data, both, the addition of metylparation and variations in soil structure had significant effect on the community structure during the evaluated periods.

INTRODUCCIÓN

Las chinampas de Xochimilco, (Ciudad de México), forman parte de un sistema de agricultura que se desarrolló desde los siglos XII-XIV en la zona lacustre de México-Tenochtitlán durante el dominio de la civilización Mexica (Chapin, 1998). Más de 500 años han pasado desde entonces y este sistema agrícola sigue vigente. De unos años a la fecha las noticias relacionadas con la contaminación y el deterioro ambiental son temas recurrentes que tienen cada día mayor difusión en la mayoría de los medios de comunicación. El desarrollo de una civilización con necesidades crecientes ha transformado de manera significativa los ciclos biogeoquímicos del planeta en un tiempo relativamente corto [(de la era preindustrial a la fecha) IPCC, 2007], dando como resultado graves problemas ambientales que pueden tener repercusiones en la salud humana. Unos de estos problemas ambientales son los cambios en la abundancia de gases de efecto invernadero (**GEI**, figura 1), que se reflejan en el denominado cambio climático (IPCC, 2007). El óxido nitroso (N_2O) es uno de estos gases y se sabe que es producto de un tipo de respiración bacteriana. La concentración actual de este gas en la atmósfera se encuentra entre 320-330 ppm y se ha incrementado a razón de 0.25% cada año (Mosier, 1998, Blaz, 2004; Fernández-Luqueño *et al.*, 2009).

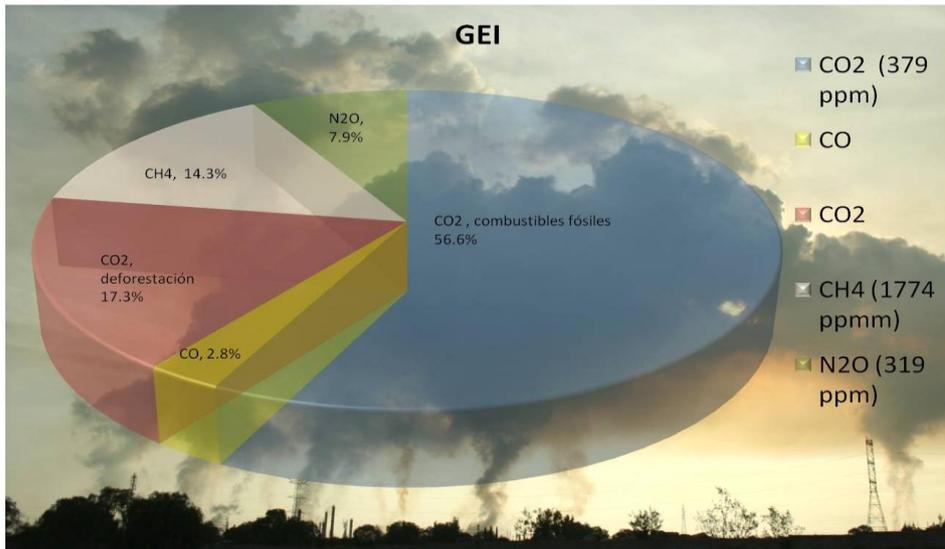


Fig. 1 Porcentaje y concentración de gases invernadero IPCC (2007). La temperatura promedio de la tierra se ha incrementado **0.6°C** en los últimos 100 años (Wilmers *et al.*, 2005).

La comunidad microbiana del suelo es una parte integral de los ecosistemas terrestres, ya que regula diversos procesos como la descomposición de residuos orgánicos, la formación de sustancias húmicas, la degradación de contaminantes y el reciclaje de nutrientes (Omirou *et al.*, 2010). En los últimos años se han realizado varios estudios sobre las bacterias involucradas en el ciclo del nitrógeno, estudios que abordan diversos aspectos como evolución, distribución, regulación del metabolismo y fisiología, así como diversidad molecular y funcional en distintos ecosistemas (Galloway *et al.*, 2004; Ciampitti *et al.*, 2005; Clays-Josserand *et al.*, 1999). Sin embargo, aún no ha quedado claro cómo los microorganismos involucrados catalizan las conversiones de nitrógeno y cómo responden a distintos xenobióticos. Poder hacer predicciones y modelos que nos ayuden a entender mejor éstos procesos, será de gran ayuda en el futuro para evitar efectos negativos al ambiente. En este sentido, algunos investigadores han estudiado la alteración de la diversidad bacteriana debido al uso de plaguicidas implicadas en el ciclo del nitrógeno (Johansen *et*

al., 2001). En México, el aumento en el uso de plaguicidas nitrogenados ha incrementado la necesidad de información sobre los efectos del uso de pesticidas sobre la microbiota del suelo.

Desde hace varios años, algunos análisis de identificación de comunidades bacterianas han utilizado el gen ribosomal 16S como marcador molecular (Head *et al.*, 1998; Sheng, 2005). No obstante, esta prueba de identificación resulta poco contundente para las bacterias con funciones ecológicas específicas, como la nitrificación, desnitrificación, nitrificación/desnitrificación. La elección de comunidades bacterianas que pueden realizar respiración a partir de compuestos nitrogenados, puede ser usada como un buen modelo para valorar la diversidad microbológica de los ecosistemas. La utilización de dichas comunidades como modelo de estudio, se ve fortalecida por los avances en la descripción de la mayoría de los genes involucrados, así como la actual disponibilidad de anticuerpos contra enzimas involucradas en este tipo de respiración, lo que ha facilitado el monitoreo de comunidades (Priemé *et al.*, 2002; Philippot *et al.*, 2005). Con base en lo anterior se planteó el desarrollo de éste trabajo teniendo como objetivo la composición microbiana con los genes involucrados en las rutas de respiración anaerobia relacionadas con el ciclo del nitrógeno, en específico *nirK* y/o *nosZ* utilizando un suelo agrícola de chinampa. Las chinampas son testimonio de una antigua técnica agrícola mesoamericana y se consideran patrimonio de la humanidad desde 1987 (UNESCO, 1987).

MARCO TEÓRICO

1 Ciclo del nitrógeno y medio ambiente

El proceso por el cual el nitrógeno se transforma y circula de forma inorgánica a forma orgánica y viceversa en la Tierra se denomina ciclo del nitrógeno (Figura 2). En este ciclo biogeoquímico se llevan a cabo diversas reacciones redox en las que el nitrógeno recorre una variedad de estados oxidados y reducidos. Estas reacciones son catalizadas por diferentes enzimas de varios microorganismos, como arqueas, bacterias y algunos hongos. Por ejemplo, en el caso de la desnitrificación, los microorganismos usan intermediarios del nitrógeno como nitrato, nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso como aceptores de electrones (Jones *et al.*, 2008).

La atmósfera es el principal reservorio de nitrógeno en la Tierra, ya que este elemento representa el 79% del total de los gases que la conforman. Sin embargo, aunque es el elemento más abundante, la mayoría de los seres vivos no pueden utilizar el nitrógeno atmosférico para la síntesis de sus biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas). El nitrógeno atmosférico tiene en su estructura química un triple enlace ($N\equiv N$) que muy pocos organismos pueden hidrolizar, debido a que no poseen la capacidad enzimática para hacerlo y posteriormente fijarlo. Como consecuencia, el nitrógeno resulta ser un elemento limitante en los ecosistemas. A pesar de esto, del 6-12% de la masa seca de los organismos es nitrógeno (Alberts *et al.*, 2000; Madigan *et al.*, 2004).

Uno de los problemas ambientales causados por la actividad humana es la interferencia con el ciclo del nitrógeno, debido a la quema de combustibles

fósiles y a la creciente demanda y mal manejo del nitrógeno en la agricultura y la industria (Galloway *et al.*, 2004).

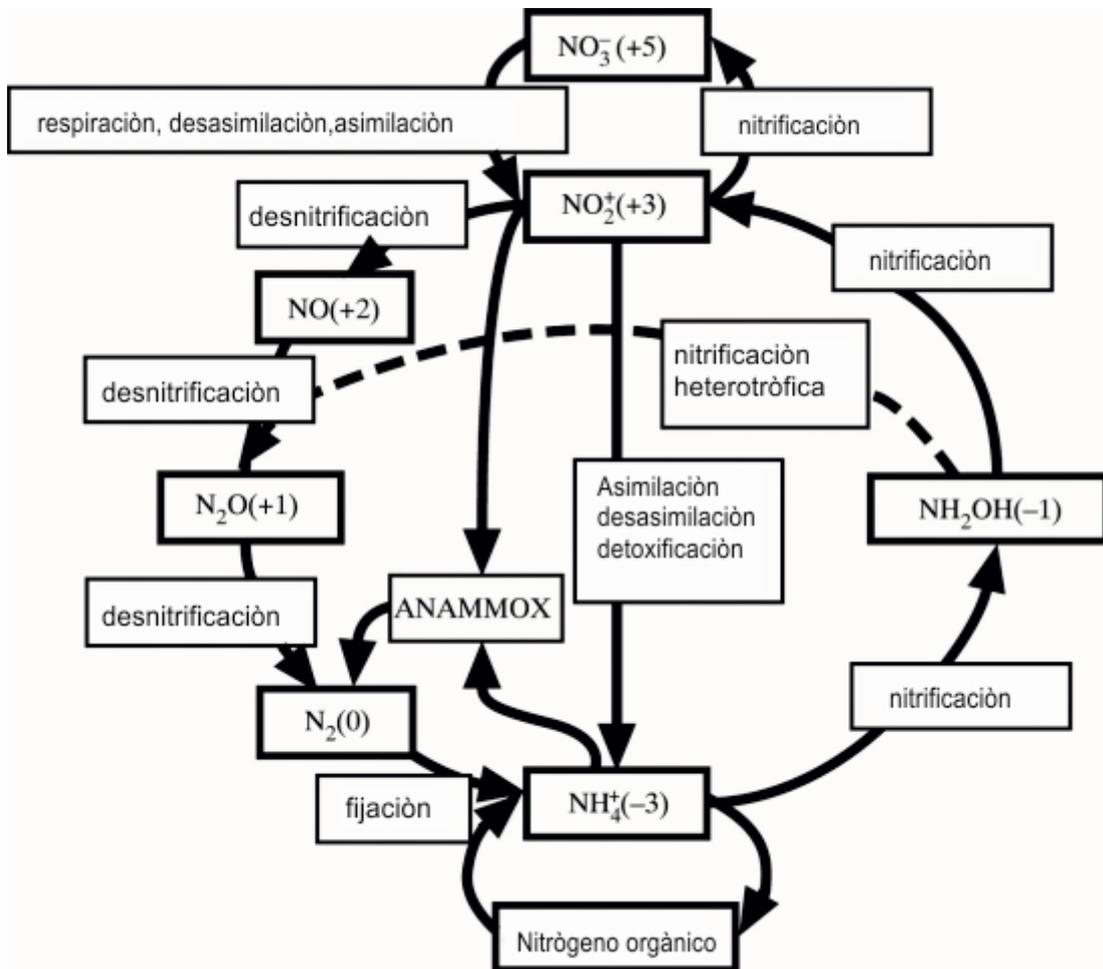


Figura 2. Asimilación y desasimilación de nitrógeno (ciclo del nitrógeno). Los paréntesis denotan el estado de oxidación del nitrógeno. Tomado y modificado de Richardson (2000).

Esto último ha traído como consecuencia la acumulación excesiva de nitrógeno en el ambiente y en algunos ecosistemas la concentración de este elemento se ha llevado al límite, lo que ha originado severos problemas ambientales. Vitousek y colaboradores (1997) mencionan que algunas consecuencias de la elevada concentración de nitrógeno, son la reducción de la diversidad biológica en los ecosistemas. También puntualizan que la acumulación de nitratos puede filtrarse a través del suelo acidificándolo y dañando los mantos acuíferos. Por

último también se ha reportado que las emisiones de GEI modifican el equilibrio del ciclo (Aber *et al.*, 1989; Fernández-Luqueño *et al.*, 2009).

Se proyecta que el uso de fertilizantes y la fijación de nitrógeno continuarán aumentando durante los próximos años por lo menos 2.7 veces por cada 10.1×10^6 metros/año (Mosier, 1998; Kinney *et al.*, 2005). Además, alrededor de 1,5 Tg de nitrógeno serán emitidos directamente a la atmósfera cada año en forma de óxido nitroso como resultado de actividades agrícolas, sin tener en cuenta los abonos animales ni la fijación biológica del mismo (Watson, 1996). Esto representa cerca del 44% de los aportes antropogénicos y alrededor del 13% total.

1.1 Óxido nitroso

El N_2O es un gas conocido comúnmente como “gas de la risa”, por producir estados pasajeros de hilaridad cuando es inhalado. Éste gas es incoloro, no tóxico y fue descubierto hace aproximadamente 200 años. El N_2O es un gas considerado de efecto invernadero y algunas de sus características son las siguientes:

- estabilidad en la tropósfera. Cuando éste se transporta a la estratosfera participa en reacciones de destrucción del ozono (Davidson *et al.*, 2001).
- absorción de la radiación infrarroja, confirmando su papel en el calentamiento global.

Como se citó anteriormente, la concentración del N_2O en la atmósfera se incrementa 0.25% cada año (Kaiser *et al.*, 1998; Ciampitti *et al.*, 2005). Ésta concentración, aunque menor a la del dióxido de carbono (CO_2), puede persistir en la atmósfera hasta 150 años y puede ser 296 veces más potente en calentamiento que el mismo CO_2 .

La agricultura se considera responsable de producir hasta el 70% del N_2O liberado a la atmósfera (Marinho *et al.*, 2004). Por lo tanto, los distintos usos y prácticas del manejo agrícola han modificado los niveles de producción de N_2O y ahora sabemos que el alto porcentaje de óxido nitroso emitido desde la biosfera proviene del suelo a través de procesos de nitrificación, desnitrificación, nitrificación-desnitrificación a causa de las intensas descargas de agroquímicos nitrogenados en cultivos agrícolas (Mosier, 1998; Rochette *et al.*, 2004, Adams y Angradi, 2005; Fernández-Luqueño, 2009).

1.2 Procesos biológicos de producción del N_2O

1.2.1 DESNITRIFICACIÓN

Existen un gran número de bacterias que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Cuando la concentración de oxígeno es baja, algunas bacterias utilizan una respiración alternativa usando nitrato (NO_3^-) como aceptor de electrones en un mecanismo llamado desnitrificación. En esta respiración, el NO_3^- se convierte en nitrito (NO_2^-) por medio de las enzimas Nar o Nap. Posteriormente el NO_2^- se reduce a óxido nítrico (NO) por medio de las enzimas NirK o NirS. A continuación, el NO se transforma en óxido nitroso (N_2O) por la acción de cNor o qNor y finalmente el N_2O se convierte en dinitrógeno molecular (N_2) por la acción de NosZ (Zumft, 1997; Henry *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2008) (Figura 3). Las bacterias que efectúan este proceso contienen en su genoma unos genes, como *nirK* y/o *nosZ*.

La desnitrificación se distribuye entre diversos grupos taxonómicos de bacterias anaerobias facultativas, arqueas y hongos. Es el proceso biológico

más importante en cuanto a la pérdida de N de los ecosistemas terrestres. También es el proceso dominante de respiración anaerobia que utiliza como base el nitrógeno (Zumft 1997; Enwall *et al.*, 2005; Jie *et al.*, 2005).

La reducción de nitrito a óxido nítrico es un paso fundamental en el proceso de desasimilación del nitrógeno dentro de la desnitrificación, este paso se puede catalizar por dos enzimas distintas, separadas filogenéticamente. La diferencia entre estas dos enzimas radica en su estructura y en el metal que utilizan dentro de su grupo prostético. Los genes que codifican estas dos nitrito reductasas son *nirS*, que codifica para una proteína (cd1-Nir) que contiene un grupo hemo c y un hemo d1 y *nirK*, que codifica para una proteína (CuNir) que contiene cobre en su grupo prostético. Estas dos enzimas nunca se encuentran dentro de una misma célula, y hasta la fecha no se ha descrito que existan diferencias funcionales entre las dos (Silke *et al.*, 2010).

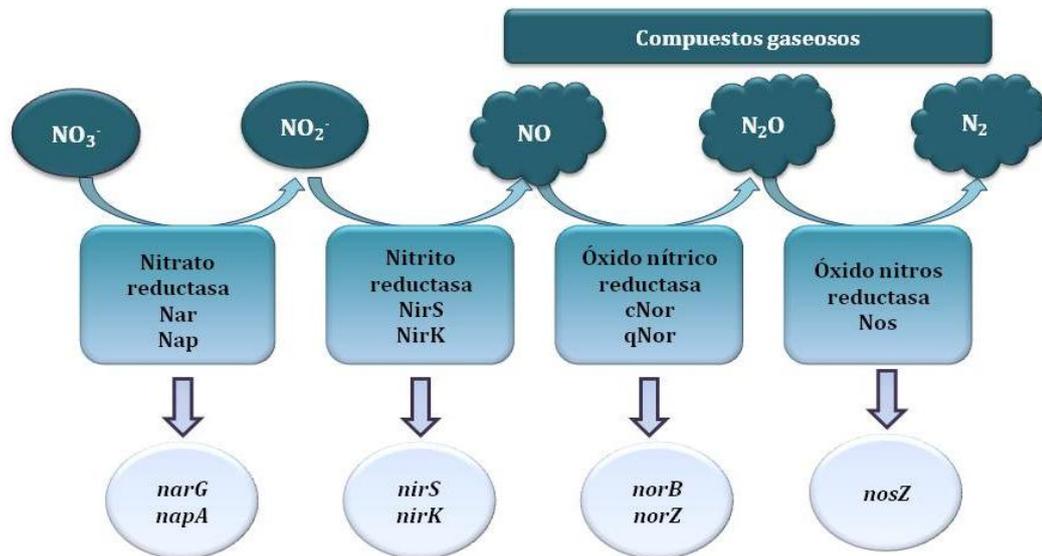


Figura. 3 Conversión de nitrógeno de estado sólido a estado gaseoso. (Tomado de Márquez, 2009)

Las bacterias que son capaces de desnitrificar se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente y exhiben una alta diversidad taxonómica. Cerca de

130 especies de Bacteria y Archaea pertenecientes a más de 50 géneros pueden desnitrificar (Priemé *et al.*, 2002; Henry *et al.*, 2004). La mayoría de las bacterias desnitrificantes pertenecen filogenéticamente a las proteobacterias y son aerobios/anaerobios facultativos. Se ha encontrado que bacterias relacionadas cercanamente no comparten necesariamente la característica de desnitrificar y aunque lo hagan, pueden tener capacidades desnitrificantes completamente diferentes (Tiedje, 1988; Jones *et al.*, 2008). Por otro lado, capacidades enzimáticas idénticas pueden ser encontradas en bacterias no relacionadas, por lo que las bacterias desnitrificantes son metabólicamente y filogenéticamente diversas desde el punto de vista de los mecanismos alternativos generadores de energía (Madigan *et al.*, 2004). Esto ocurre también cuando se ha estudiado una distribución de los genes desnitrificantes; genes relacionados se pueden encontrar dentro de organismos relacionados distantemente y viceversa (Clays-Josserand *et al.*, 1999). Todo esto sugiere que los genes de desnitrificación se han perdido y heredado durante la evolución. Se ha propuesto que debido a que la capacidad de desnitrificar está tan ampliamente dispersa entre los procariontes, ésta podría deberse a una transferencia horizontal de genes (Jones *et al.*, 2008).

1.2.2 NITRIFICACIÓN/DESNITRIFICACIÓN

Como ya se mencionó, la nitrificación/desnitrificación es un proceso responsable de la formación de N_2O . De hecho, es el producto final de este proceso cuando la ruta metabólica no está completa. La nitrificación-desnitrificación es una vía de nitrificación en la cual la oxidación del amonio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-) es seguida por la reducción del N_2O a N_2 (Wrage *et al.*, 2001). Esta vía es realizada por un único grupo de microorganismos, llamados

oxidadores autótrofos del NH_4^+ (AOB autótrofos), siendo *Nitrosomonas eutropha* la especie más conocida de este grupo (Butler *et al.*, 2009). La primera parte de esta vía se ha atribuido a la nitrificación (oxidación del NH_4^+) mientras que la reducción de NO_2^- se atribuye a la desnitrificación (Wrage *et al.*, 2004). En suelos aerobios, las emisiones de N_2O pueden ser significativas debido a la nitrificación, mientras que en suelos con poco oxígeno es la desnitrificación quien produce el N_2O . En estas dos rutas metabólicas, que cumplen una función ecológica específica, tanto el gen *nirK* como *nosZ* pueden estar involucrados.

2 Plaguicidas

Un plaguicida es una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a controlar cualquier plaga que perjudique o interfiera con la producción agropecuaria o forestal (Márquez, 2009). Dentro de los plaguicidas están los organofosforados, que constituyen un amplio grupo de compuestos sintéticos (en general de moderada a altamente tóxicos), con origen en los gases de guerra (a menudo conocidos como 'gases nerviosos', y que se desarrollaron de manera especial a partir de la Segunda Guerra Mundial). Dentro de estos compuestos se encuentra el metil paratión (éster organofosforado del grupo de los trifosfatos) que incluso se ha catalogado como precursor de armas químicas (Manzanilla *et al.*, 2000; Kanekar *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2009). Este plaguicida es de uso común en distintos países en el mundo. Las propiedades de estos compuestos como insecticidas fueron el motivo por el que a partir de 1959 se sintetizaron alrededor de 50.000 variedades, al revelarse como útiles elementos de lucha contra las plagas de insectos (ATSDR, 2001). Por ello forman parte como

ingredientes activos de diversos formulados comerciales en los que se integran distintos componentes para obtener una mayor eficacia del producto (Karam *et al.*, 2004).

Los plaguicidas organofosforados se caracterizan por tener enlaces fosfodiéster y una estructura química heterogénea, además de una baja solubilidad en el agua que hace que su biodegradación se vea limitada (Yañes-Ocampo *et al.*, 2009).

Como dato interesante, en el año 2005 se dio a conocer que las ventas de pesticidas alcanzaron 31.4 billones de dólares a nivel mundial. De este total, el 30% de los pesticidas vendidos en los países en vías de desarrollo no cumplían con las normas ni los estándares internacionales de calidad necesarios. Dentro de los problemas que encontraron en los plaguicidas era que frecuentemente contenían impurezas y sustancias peligrosas que ya se habían prohibido, restringido o retirado del sistema agrícola en Europa y EUA debido a sus efectos negativos sobre la salud humana y el ambiente (Watss, 2010).

2.1 Metil paratión

Desde los años 30 del siglo pasado, el fumigante bromuro de metilo fue ampliamente utilizado en la agricultura (MBGC, 1994), principalmente en plantaciones de gran valor económico. Años más tarde, esta sustancia química salió del mercado estadounidense al comprobarse que causaba daños a la capa de ozono, así como por su alta tasa de volatilidad después de la fumigación. Por estas mismas razones, el uso de otros compuestos químicos como el clorpirifos, **metil paratión**, (Figura 4), malatión, lindano y la atrazina fueron fruto de discusión para su aplicación agrícola, a nivel mundial incluyendo

México (CICLOPAFEST, 2008). El uso de plaguicidas es inevitable por los beneficios que aporta a los agricultores, sin embargo han sido utilizados indiscriminadamente en las áreas agrícolas alrededor del mundo debido a la falta de conocimiento (Kanekar *et al.*, 2004), incluyéndose México y a su vez, en las chinampas de Xochimilco, D.F, (Márquez, 2009). Esto ha traído como consecuencia la contaminación del suelo y los cuerpos de agua, así como efectos sobre la diversidad y actividad microbiana (Zhang *et al.*, 2006, Blanco-Jarvio *et al.*, 2010)

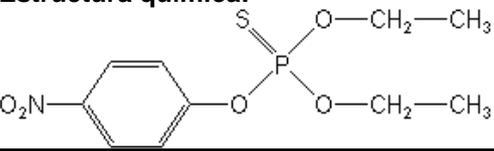
Estructura química: 	Fórmula química: $C_8H_{10}NO_5PS$
	Peso molecular: 263.21
Tipo de plaguicida: Insecticida de moderado a altamente tóxico	Clasificación: Organofosforado
Uso: Agrícola e industrial	
Importación en México toneladas: 2002-2005 498.88 (2)	
Vida media en el suelo: 1-30 días*(3)	
Producción tons/año: en México: 8,000**	

Figura 4. Ficha técnica del metil paratión.
 Tomada de Secretaría de Economía, 2006, ³ EXTOXNET InfoBase, 2006. Fertilizante
 *la degradación depende de los factores físico químicos y biológicos
 **Bayer 1998

La aplicación en masa de estos compuestos conlleva graves problemas para la salud humana. Algunos autores han reportado que los pesticidas de la familia del paratión pueden inhibir la enzima acetilcolina esterasa (AchE) en el sistema nervioso central, produciendo neuropatías y alterando funciones nerviosas e incluso causando la muerte (Sogorb y Vilanova, 2002; Yu *et al.*, 2009).

2.2 Efectos sobre la diversidad

El metil paratión es un pesticida utilizado para matar insectos en las cosechas. Con respecto al efecto que causa este plaguicida a los organismos y

al medio ambiente hay datos contradictorios: por un lado se sabe que puede tener efectos positivos al favorecer la formación de biomasa y la reproducción de los microorganismos, ya que utilizan este compuesto como fuente de energía; por el contrario, en otros organismos macroscópicos como los ajolotes, puede incrementar la mortalidad en ciertas etapas del desarrollo y en el caso de las abejas puede causar daños mortales aun usando la dosis recomendada del pesticida (Ficha técnica de seguridad *Bayer crop science. Agency for toxic substances and disease registry*, 2001).

Se han documentado distintos efectos negativos en microorganismos. Bindhya y colaboradores (2009) reportaron una considerable reducción en la comunidad bacteriana del suelo cuando aplicaron una concentración de 100 ppm de metil paratión, aunque las poblaciones bacterianas se incrementaron gradualmente después de 35 días de incubación con el plaguicida. Esta reducción en la población está relacionada con el incremento en la producción de CO₂. El incremento en la respiración de la comunidad, puede ser el primer signo de estrés, ya que el daño respiratorio que causa una alteración requiere el desvío de energía destinada al crecimiento y la reproducción hacia el mantenimiento de las células. Por lo tanto si la biomasa del suelo está bajo estrés, se necesitará más energía en el mantenimiento celular en lugar del crecimiento celular, de manera que a una mayor proporción de carbono absorbida por la biomasa será respirada en forma de CO₂.

Por otro lado, la degradación y la hidrólisis microbiana en suelos y sedimentos son procesos importantes para reducir su impacto ecológico. Distintos estudios afirman que el metil paratión se degrada más rápido en suelos anaerobios que en suelos aerobios. Por experimentos realizados con C¹⁴ se determinó que, en

promedio la vida media del metil paratión es de 64 días en suelos aeróbicos, mientras que en suelos anaerobios la vida media es de tan sólo 7 días. Otro mecanismo de degradación es el de fotólisis, aunque al parecer no es un proceso significativo en el suelo, ya que en este mismo estudio sólo se perdió de 5 a 17% en 60 días en un estudio de fotólisis de 330 días (Ficha de datos de seguridad SEMARNAT. *Toxical profile of Methyl parathion*, 2001).

Debido a la ambigüedad en los efectos del metil paratión sobre los organismos es necesario analizar el comportamiento microbiológico por encima de los 60 días promedio de degradación, así como en los primeros días de exposición al plaguicida.

3 Diversidad

Las comunidades bacterianas del suelo participan en los ciclos biogeoquímicos y las actividades de éstas son cruciales para la productividad de los ecosistemas terrestres. Aunque la importancia de los microorganismos es bien conocida, se sabe muy poco acerca de su distribución en el suelo o de cómo responden a los cambios por el manejo del mismo (Torsvik *et al.*, 1990, Buckley *et al.*, 2003). La falta de información acerca de las comunidades microbiológicas es consecuencia de la enorme complejidad y su diversidad genética. Los estudios hechos con microorganismos que pueden ser aislados del suelo sólo representan una pequeña porción de grupos presentes *in situ*. En este sentido, Escalante y colaboradores (2001) afirman que los estudios tradicionales para caracterizar la diversidad microbiana en distintos ambientes basados en técnicas de cultivo, sólo permiten analizar entre el 0.1 y 10% de las bacterias presentes; esto podría explicarse en parte por el desconocimiento de los requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas necesarias

para su desarrollo. Por otro lado, la falta de información acerca de las relaciones simbióticas, parasitarias o de comensalismo que establecen los microorganismos entre si y el desarrollo de consorcios metabólicos vuelve más difícil el aislamiento de cepas específicas. Por estas razones, el estudio de la diversidad bacteriana del suelo se ha visto limitada (Escalante *et al.*, 2001).

El análisis de la riqueza, así como de la diversidad funcional y la dinámica por métodos distintos a los tradicionales de cultivo y aislamiento son esenciales para entender la ecología microbiana y la biogeoquímica de los ecosistemas. De este modo la aproximación actual es estudiar los genes potencialmente funcionales involucrados en reacciones importantes para el ecosistema y así caracterizar los metabolismos de dichas poblaciones como la nitrificación, nitrificación/desnitrificación y desnitrificación (Throbäck *et al.*, 2004).

Gracias a su heterogeneidad física, química y biológica, los suelos se consideran los ambientes con más biodiversidad de microorganismos sobre el planeta. Se sabe que 1 gramo de suelo puede contener más de 10^9 células microbianas aproximadamente, lo que representaría más de 10,000 genomas (Daniel, 2005; Hansel *et al.*, 2008). El estudio de la diversidad microbiológica a nivel metagenómico en los suelos ha tenido gran impacto en los últimos años (Agnelli *et al.*, 2004; Hansel *et al.*, 2008; Márquez, 2009).

Se han realizado diferentes estudios moleculares acerca de la diversidad genética de comunidades microbianas Hansel (2008) y Agnelli (2004) estudiaron la variabilidad en la región del gen 16S rRNA y lo demostraron con distintas herramientas moleculares. El primero lo hizo con bibliotecas genómicas de rRNA 16S, mientras que el segundo lo analizó por medio de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). El objetivo de los dos estudios

fue realizar el análisis de la distribución de las comunidades bacterianas a lo largo de un gradiente de profundidad en el suelo, encontrando diferencias (de manera independiente y con ambas metodologías) entre bacterias de la superficie y la parte baja del suelo. Sin embargo, es preciso identificar comunidades involucradas en funciones específicas.

Por su parte, Márquez (2009) estudió cambios en la composición de las comunidades por medio de TGGE en suelos de Xochimilco con distintas concentraciones del plaguicida metil paratión durante 90 días, encontrando diferencias dependientes de la concentración y el tiempo de muestreo.

Distintas comunidades desnitrificantes en el suelo muestran diferencias en sus requerimientos de oxígeno y carbono, lo que podría influir en la competencia con heterótrofos aerobios y la emisión de N_2O (Priemé *et al.*, 2002).

4 Generalidades edáficas

Más de un cuarto del área terrestre del planeta se usa para la agricultura a nivel mundial. Desde mediados del siglo pasado, las prácticas agrícolas destructivas (como la labranza de la tierra, el cambio de uso del suelo y el empleo de plaguicidas) han degradado casi un tercio de esta superficie por erosión, salinización y agotamiento de nutrientes. Algunas consecuencias de estos fenómenos son la modificación de la estructura y estabilidad reticular del suelo, así como la alteración de las comunidades bióticas y la estabilidad de los ecosistemas (Watts, 2010; Bronick y Lal, 2004).

Coyne (2000) ubica al suelo como un sistema abierto, dinámico y complejo que suele comportarse como una entidad viviente, dadas las interacciones con su

entorno. El espacio y tiempo son factores que influyen en que el suelo sea un medio intrincado ecológica y evolutivamente hablando, en el que el flujo de energía, así como otros aspectos de relevancia, necesitan ser estudiados (Killham *et al.*, 1996).

De manera general, la estructura del suelo está conformada por minerales y materia orgánica (principal agente aglutinador) organizados en agregados que pueden variar en tamaño, porosidad y continuidad. Estos materiales se unen fuertemente entre sí dándole estabilidad al suelo (Bronick y Lal, 2004, Chaofu *et al.*, 2006).

Dadas las características antes mencionadas, podemos decir que el suelo tiene propiedades físicas, químicas y biológicas que le permiten desarrollar funciones específicas dentro de los ecosistemas, incluyendo el ciclo del nitrógeno.

4.1 Agregados del suelo

Los agregados pueden formarse de distintas maneras y presentar varios tamaños. Asimismo son el hábitat para diferentes comunidades bacterianas debido a las limitaciones de los poros internos, seleccionando un tipo de biota específica y minimizando la predación y/o disminuyendo la competencia por el agua. La complejidad, dinamismo y estado de agregación del suelo son el resultado de la interacción de factores como el ambiente, manejo del suelo, crecimiento radicular y de las propiedades mismas del suelo. Tales propiedades incluyen la composición mineral, textura, concentración de SOC (**Soil Organic Carbon**, por sus siglas en inglés), procesos pedogénicos, actividad microbiana, intercambio de iones, reservas de nutrientes y humedad disponible (Chaofu *et al.*, 2006, Zu *et al.*, 2009).

Por último, la estructura del suelo también influye en el movimiento del agua, el transporte de calor, la aireación, la erosión, la formación de costra y el sellado superficial, el ciclo de nutrientes, la penetración de las raíces y la producción de los cultivos.

Existen dos principales tipos de agregados: los macroagregados (20-250 μm) y los microagregados (2-20 μm), estos son los hábitats más apropiados para las bacterias en la mayoría de los tipos de suelo. El estado de anaerobiosis que se genera dentro de algunos microagregados puede determinar la colonización de microorganismos específicos que pueden utilizar nitrato, sulfato y hierro presentes como óxidos dentro de la fracción mineral de los agregados, como vía alterna en la recepción de electrones (Chaofu Wei *et al.*, 2006).

Los microagregados que inducen anaerobiosis tienen un elevado potencial de desnitrificación, en comparación con un suelo sin agregados. Aunque poco se sabe del impacto de la estructura del suelo sobre la diversidad bacteriana, la composición de las comunidades microbianas parece variar en función de su localización dentro del agregado del suelo y del tamaño del mismo (Hansel *et al.*, 2008).

4.2 Microcosmos

Los microcosmos son un sistema ecológico controlado, a pequeña escala del ambiente encontrado en el campo (Angle *et al.*, 1995; Longta *et al.*, 2009). Otros autores los definen como ecosistemas simplificados que se utilizan como modelos de ecosistemas naturales (Roeselers *et al.*, 2006). Eller y colaboradores (2005) mencionan que tanto los ecosistemas naturales como los microcosmos presentan ventajas y desventajas metodológicas, ya que los experimentos realizados en el campo suelen ser "más reales" que los

realizados dentro de microcosmos. Sin embargo, una virtud de los microcosmos es que son más fáciles de manipular en gran número bajo condiciones controladas.

Así pues, el acercamiento ecológico que se ha realizado dentro de los microcosmos ha podido responder a distintas preguntas acerca del impacto de plaguicidas y otros compuestos químicos sobre las comunidades biológicas del suelo (Adetutu *et al.*, 2008), los procesos de biodegradación microbiana y la dinámica de poblaciones microbianas (Cordier *et al.*, 2007). En los últimos años se han realizado experimentos en los que se han utilizado microcosmos como modelo para experimentar con OGM's (organismos genéticamente modificados) antes de ser liberados en ecosistemas naturales, confirmando la relevancia de este modelo.

Existen distintos diseños estructurales de microcosmos, algunos van de varios gramos de suelo tamizado dentro de frascos de vidrio (librándose del problema de la variabilidad espacial asociada con los núcleos intactos). Algunos investigadores sin embargo, reconocen problemas asociados con estos métodos, ya que algunas propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo se alteran. Existe consenso en que los núcleos de suelo intactos son de gran utilidad, ya que estos mantienen la estructura de la biota nativa encontrada en ambientes naturales (Angle *et al.*, 1995).

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que Xochimilco tiene gran importancia biológica e histórica (por lo que se ha hecho acreedor a los nombramientos por parte de UNESCO y RAMSAR), este sitio se encuentra bajo una enorme presión a nivel ambiental. Márquez (2009) menciona que es imprescindible realizar estudios interdisciplinarios, que abarquen análisis moleculares y ecosistémicos para poder entender la dinámica de la zona y poder mantener y restablecer un sitio que representa una reserva biológica, además de ser parte de la historia de nuestro país. Dentro de las chinampas se han utilizado indiscriminadamente diversos compuestos químicos, lo que ha traído como consecuencia la contaminación del suelo y los cuerpos de agua. Una de las consecuencias de utilizar productos agroquímicos en las zonas agrícolas es que al no ser especie específicos pueden afectar a las comunidades bióticas, como lo demostraron Mendoza y colaboradores (2008) estudiando los efectos de plaguicidas organofosforados sobre el ajolote. Los autores encontraron diferencias en la mortalidad, desarrollo embrionario, conducta y deficiencias físicas debidas al uso de ese plaguicida. En esta misma zona geográfica, Zambrano (2004) describió que los contaminantes en el agua, tanto orgánicos como inorgánicos, se encuentran en niveles muy altos (en particular el **nitrógeno** amoniacal) y que las variables inorgánicas (como el **nitrito**) se encuentran por encima de los niveles permitidos por la Norma Mexicana Ecológica NOM-127-SSAI-1994.

El uso de plaguicidas nitrogenados en áreas agrícolas y la labranza de la tierra modifica las comunidades bióticas. En las chinampas agrícolas de la zona lacustre de Xochimilco, la investigación acerca de las bacterias del suelo

involucradas en el ciclo del nitrógeno es escasa, por lo que resulta necesario hacer un estudio prospectivo para identificar la presencia de grupos funcionales microbianos en el suelo agrícola de Xochimilco, sitio histórico que preserva técnicas agrícolas prehispánicas.

HIPÓTESIS

El uso del plaguicida metil paratión, así como la labranza del suelo pueden modificar las comunidades bacterianas que contienen los genes *nirK* y/o *nosZ*, afectando de esta manera los procesos de nitrificación y desnitrificación locales.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del metil paratión sobre las comunidades bacterianas que contienen los genes *nirK* y *nosZ* en suelos de uso agrícola de una chinampa de Xochimilco

Objetivos Particulares

- a) Evaluar el efecto del metil paratión sobre las comunidades bacterianas que contienen los genes *nirK* y *nosZ* en microcosmos de suelo alterado y no alterado
- b) Determinar la diversidad microbiana funcional que contienen los genes *nirK* y *nosZ* por el cálculo del rango ponderado de riqueza en cada tipo de microcosmos.
- c) Evaluar la dinámica en el tiempo de los genes *nirK* y *nosZ* en cada tipo de microcosmos.

MATERIALES Y MÉTODOS

5 Zona de estudio

Xochimilco es una de las 16 delegaciones pertenecientes al Distrito Federal, con una superficie de 12,517 hectáreas. Dentro de esta delegación existe un área ecológica que ocupa 10,012 hectáreas y una extensión de canales acuáticos de 189 km que se alimentan por plantas de tratamiento de agua residual localizadas en el cerro de la Estrella. El agua arrojada al sistema hidrológico por las plantas de tratamiento no cuenta con la calidad establecida en las normas para el uso agrícola (Sandoval, 2003). Dada su importancia en muchos aspectos, Xochimilco es considerado patrimonio de la Humanidad en la declaratoria de la UNESCO (<http://www.unescomexico.org/xochimilco/docs/introduccion-sin-mapa.pdf>).

Xochimilco se encuentra en la parte centro-sureste del Distrito Federal, al pie de la sierra de Chichinautzin con una altitud de 2238 msnm. Colinda al norte con el anillo Periférico, al este con el canal de Chalco, al sur con el canal del Bordo y al oeste con el canal de Cuemanco. El clima que predomina es C (w1) (w) que corresponde a templado sub-húmedo con régimen de lluvias en verano. Su precipitación pluvial es de 700 a 900 mm (promedio anual) y temperatura media anual de 15.9°C, con heladas ocasionales (Otto-Parrodi, 1999). Dentro de esta demarcación se encuentra el sistema lacustre de San Gregorio Atlapulco, (19° 17'N 099° 04'W) que cuenta con una área de 2,657 hectáreas y está considerada como un humedal en la convención **RAMSAR (No. 1363)** desde el 2 de febrero del 2004 (Figura 5) (Sitio en línea RAMSAR <http://www.ramsar.org>).



Figura 5. Zona lacustre de San Gregorio Atlapulco. Tomado de www.imagnesaareasdemexico.com

En el listado RAMSAR del 20 de mayo del 2008 la comunidad internacional reconoce el valor significativo de los humedales que se encuentran conformados en varias categorías dependiendo el país de origen y el entorno internacional como patrimonio ecológico para la humanidad. La selección de los humedales dentro de este listado se basa en su importancia internacional en términos ecológicos, botánicos, zoológicos, limnológicos y/o hidrológicos.

El contenido integro del Marco Estratégico de la lista RAMSAR descansa en la siguiente visión:

“Crear y mantener una red internacional de humedales que revistan importancia para la diversidad biológica mundial y para el sustento de la vida humana debido a las funciones ecológicas e hidrológicas que desempeñan”

(Sitio en línea RAMSAR <http://www.ramsar.org>)

El sistema lacustre perteneciente al área de Xochimilco es un ecosistema remanente de la cuenca de México formado por planicies inundadas naturalmente y cuerpos de agua inducidos, siendo un área natural de descarga del flujo subterráneo (Otto-Parrodi, 1999). En un estudio realizado en colaboración con la delegación Xochimilco y la Universidad Autónoma

Metropolitana mencionaron que la importancia de este ecosistema radica en términos de su biodiversidad, que es determinada por la presencia de comunidades vegetales características, como los tulares - islas compuestas por Tule (*Typha* spp. y *Schoenoplectus americanus*) que albergan gran cantidad de especies de flora y fauna acuática y terrestre. Algunas de las especies que aquí habitan son vulnerables y de distribución muy restringida como *Nymphaea mexicana* (Apatatla ó lirio amarillo) y *Ambystoma mexicanum* (ajolote) - así como más de 200 especies de aves migratorias, por lo que tiene una gran importancia ecológica debido a su potencial como reserva biótica (Otto-Parrodi, 1999).

En este ecosistema existe un área de rescate y preservación ecológica la cual disminuyó el 87% en el año 1980 a un 42.2% en el año 1997. Además esta zona sufre explotación forestal; introducción de especies exóticas, como lirio acuático, muérdago así como la extracción de agua en 78 pozos que han sido sobreexplotados produciendo hundimientos en algunas partes de la delegación donde se encuentra.



Figura 6. San Gregorio Atlapulco: vista aérea de la zona de estudio .Tomado de Google Earth

6 Experimento 1:

6.1 Muestreo

El suelo se obtuvo de una chinampa en el ejido de San Gregorio Atlapulco Xochimilco, México D.F., propiedad del Señor Alfredo Godoy, donde se cultivan distintas hortalizas y se han usado plaguicidas durante al menos 30 años. La chinampa mide 150 x 30 m y se dividió en 3 cuadrantes de 50 x 30 m. Cada uno de los cuadrantes se consideró como una réplica. Las réplicas se marcaron como Sitio 1 (S1), Sitio 2 (S2) y Sitio 3 (S3) (Figura 7). Posteriormente, cada réplica se dividió en tres partes de 16.5 x 10 m, quedando 9 cuadrantes en total. Para la toma de las muestras de suelo se realizaron tres cuadros de 2 x 2 m en cada punto, el cual se subdividió en cuadrantes de 200 cm². Se seleccionaron al azar 5 cuadrantes y se obtuvieron 5 kg por campo de cada sitio. Los suelos se transportaron bajo refrigeración para los experimentos en laboratorio.

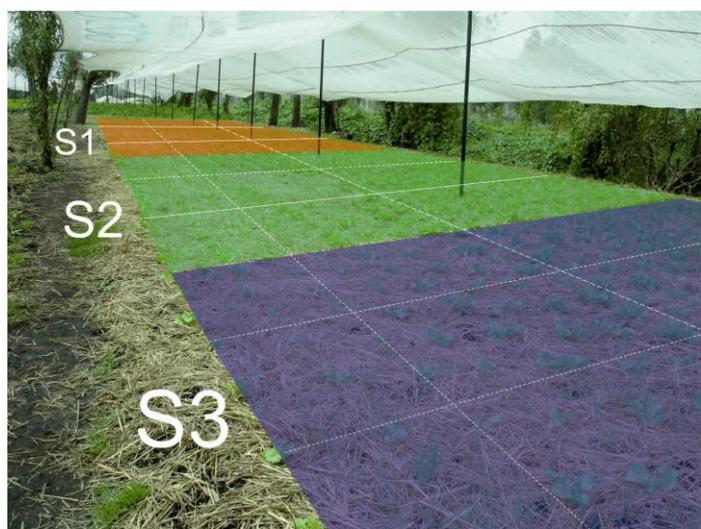


Figura 7. Chinampa de 150x30 m donde tomaron las muestras de suelo. La chinampa se dividió en tres sitios marcados como S1, S2, S3 de 50x 30 cada sitio

6.2 Montaje de microcosmos

Los microcosmos se montaron por triplicado y se incubaron en el laboratorio durante 90 días con o sin plaguicida (ver más abajo las concentraciones y la aplicación). En cada microcosmo de 1.6 L de capacidad se agregaron 500 g de suelo, previamente tamizado con malla No.10 (2 mm) y la humedad se ajustó al 40% de capacidad de retención de agua (CRA). Una vez montados, los microcosmos se cerraron con una tapa especial con dos salidas y en una de ellas se colocó una salida "T" de vidrio para tomar la muestra de gas. Las tomas de muestra se realizaron a los 0, 1, 15, 30, 60 y 90 días (Figura 8).

Los microcosmos se agruparon como en el siguiente diagrama lo resume.

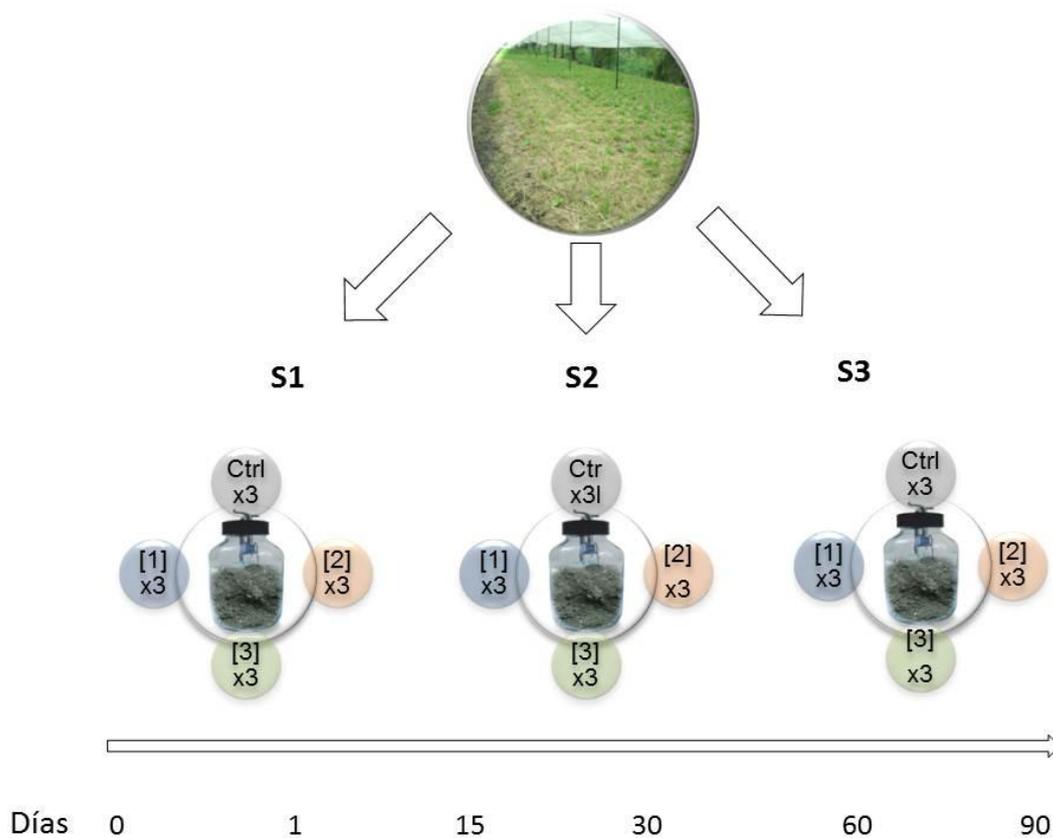


Figura 8. Diseño experimental (experimento 1) En la parte de arriba se muestra la chinampa donde se tomaron las muestras. La chinampa se dividió en tres sitios **S1**, **S2** y **S3**. De cada sitio se incubó el suelo por triplicado durante 90 días. El suelo muestreado de cada sitio fue expuesto a 3 concentraciones distintas de metil parción: [1] 0.7, [2] 1.4 y [3] 4.2 g/kg además del control sin plaguicida.

En total se tuvieron 36 microcosmos, los cuales se mantuvieron a temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ\text{C}$). Los microcosmos se abrieron cada tercer día para permitir la entrada de oxígeno y evitar un ambiente anaerobio. En cada toma de muestra se tomó 1 g de suelo de cada microcosmo y se conservó a -70°C para su análisis molecular.

6.3 Aplicación de plaguicida

La aplicación y la preparación del plaguicida se realizó de la siguiente manera. Se utilizaron tres concentraciones de metil paratión de marca comercial FOLEY 2% teniendo como base la dosis aplicada en el campo de 1 ml/L. Se consideró la mitad de esta concentración como una subexposición 0.5 ml/L [1] la usada en campo 1ml/L [2] y para simular una sobreexposición 3.0 ml/L [3] de plaguicida. Se dividió el suelo tamizado en tres partes y se les agregó la solución de plaguicida con las concentraciones correspondientes y se mezcló la solución del plaguicida con el suelo para conseguir la mayor homogenización posible. Posteriormente, el suelo se introdujo en los microcosmos y se cerraron. Los parámetros físico-químicos del suelo se describen más adelante. Una vez finalizados los experimentos anteriores y con base en las conclusiones obtenidas, se procedió a diseñar un segundo experimento para evaluar la composición de la comunidad microbiana *nirK* durante 10 días de incubación con el plaguicida (concentración 3) 3.0 ml/L ya que ésta concentración tuvo efecto sobre las emisiones de N_2O en el primer experimento. Por otro lado, se utilizó suelo obtenido con núcleos “intactos”, llamándolo suelo inalterado.

7 Experimento 2

Para los experimentos de suelo alterado y suelo inalterado se procedió de la siguiente manera:

7.1 Muestreo del suelo inalterado

Se tomaron tres núcleos de suelo con tubos de PVC de 10 cm de largo y 4 Cm de ancho, se colectó el suelo a lo largo del canal de la chinampa S3 (cercana al canal) (Figura 9). Posteriormente se colocaron tres núcleos de suelo dentro de los microcosmos ajustando el CRA al 40% y adicionando el plaguicida [3] 3.0 ml/L. Por separado se sacrificaron núcleos para saber la distribución del plaguicida. La distribución fue heterogénea en todos los casos, por lo que este factor fue para todos microcosmos con núcleos intactos el mismo.

7.2 Suelo alterado

Se tomó suelo S1 de la orilla del canal y se hizo una mezcla compuesta que se tamizó con malla número 10 (figura 9). Se colocó el suelo tamizado en los tubos de PVC, ajustando la cantidad para que fuese equivalente a la del suelo inalterado. Se ajustó el CRA al 40% y se le agregó el plaguicida. Finalmente, se colocaron tres tubos de PVC con suelo tamizado dentro de cada microcosmos.



7.3 Determinación de la microbiota funcional de *nirK* y *nosZ*.

De cada microcosmo, se extrajo 1 mg de suelo a cada tubo de PVC a su vez, de cada tubo se tomaron las muestras del suelo en distintas profundidades del

tubo y posteriormente se mezclaron para que fueran lo más homogéneamente posible. Se tomaron las muestras de 0, 5 y 10 días de incubación (Figura 10), este suelo se refrigeró a -70°C para su análisis.

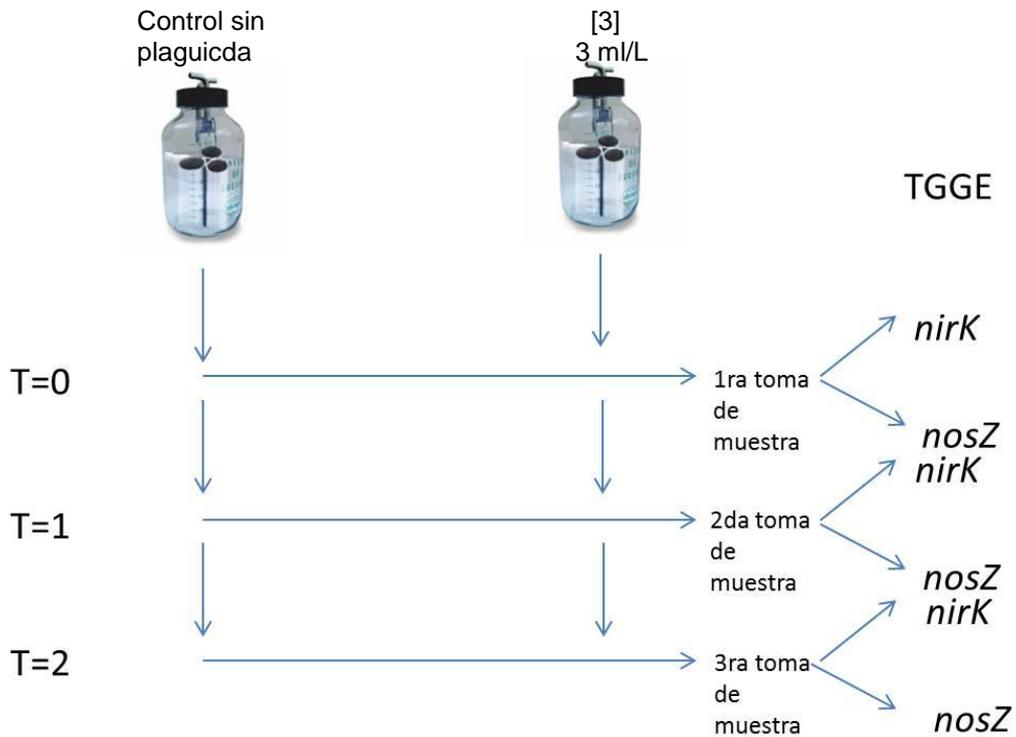


Figura 10. Esquema del segundo experimento. Las tomas de muestra se realizaron a distintas profundidades de los tubos PVC contenidos en los microcosmos. Posteriormente se homogenizaron para la extracción de ADN

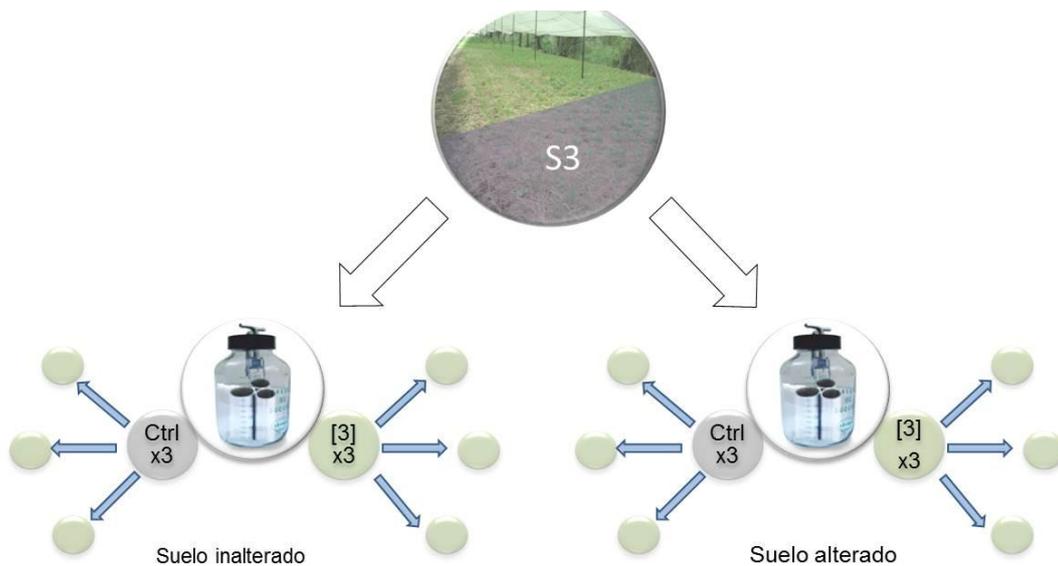


Figura 11. Diseño del experimento 2. La zona marcada con color representa el lugar de la chinampa donde se colectó el suelo para los experimentos en laboratorio. El suelo colectado se dividió en suelo inalterado y suelo alterado para los análisis. Cada experimento se realizó por triplicado y se agregó el plaguicida [3]

7.4 Análisis Físicoquímicos

7.4.1 Determinación de la CRA

Para determinar la CRA se pesaron 20 g de suelo seco por triplicado y se tamizó con malla N°10 (2 Mm), posteriormente se colocaron en un recipiente con orificios en el fondo. Se les agregó agua hasta saturación, momento en que comienza a haber percolación. Se asignó un valor de 100 % de CRA pasadas dos horas cuando se drenó el exceso de agua y quedó retenida en contra de la gravedad considerándose el 100% de retención de agua por el suelo. Transcurrida una semana adicional para aclimatar el suelo se calculó que se deberían adicionar 10.24 mL de agua a 20 g de suelo seco (muestras alteradas) para ajustarlo al 40% de CRA. Es importante notar que es un valor aproximada de CRA, ya que la estructura del suelo alterado es diferente de la del suelo inalterado. Sin embargo, se definió un volumen idéntico de agua para los dos suelos, ya que a esta cantidad de agua se agregaron las distintas concentraciones de plaguicida correspondientes. La determinación se realizó por triplicado.

7.4.2 Determinación de humedad

Para determinar la humedad del suelo colectado en el campo, se pesaron 10 g de suelo (por triplicado) previamente aireado a temperatura ambiente y se tamizó con malla N°10 (2 Mm) y se secaron en la estufa a 105°C durante 24 h. Inmediatamente las muestras se colocaron durante una hora en el desecador y se volvieron a pesar para determinar la humedad.

8 Análisis Molecular

8.1 Extracción de ADN

De cada experimento mencionado en los puntos anteriores se tomaron 0.25 mg del suelo colectado se homogenizó y se realizó la extracción de ADN total usando el *Ultra Clean soil ADN isolation kit* (MoBio 12888-100), bajo las indicaciones del fabricante. Para verificar la calidad del ADN se analizaron las extracciones en un gel de agarosa al 1%. La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 minutos. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador Gel Doc 2000 de Bio-Rad (Laboratorios Bio-Rad, Inc.). El ADN se cuantificó en el biofotómetro a 260 nm (Eppendorf, Hamburg, Germany).

8.2 Amplificación del ADN por PCR

Se realizaron las amplificaciones del gen de función enzimática *nirK* a partir de las muestras tomadas a diferentes tiempos de incubación. Para el experimento 2, se realizó la amplificación de los genes de función enzimática *nirK* y *nosZ*.

Los genes se amplificaron a partir de 50 ng de ADN extraído de las muestras del suelo de los microcosmos, en un volumen total de 25 μ L, usando los oligonucleótidos correspondientes para cada gen (Cuadro1). Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 94°C/5 min, 30 ciclos de 94°C/1 min, 58°C/45" y 72°C/1 min y finalmente un ciclo de 72°C/10 min. Cada reacción contenía 1x *Taq* Pol buffer, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 100 pmol de oligonucleótidos, 200 ng ADN y 2 U *Taq* Pol (GoFlex TaqPol A, Promega ®), en un volumen final de 25 μ l.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la amplificación de *nirK* y *nosZ*

Oligonucleótidos	Posición	Secuencia
<i>nirK</i> 5r	1023-1040	GCC TCG ATC AG (A/G) TT (A/G) TGG
<i>nirK</i> 5rGC	990-1040	GGC GGC GCG CCG CCC GCC CCG CCC CCG TCG CCC GCC TCG ATC AGT TTR TGG TT
<i>nirK</i> 1F	526-542	GCC TCG ATC AG (A/G) TTG TGG TT
<i>nosZ</i> F	1169-1188	GC (C/T) TGT TC (A/C) TCG ACA GCC AG
<i>nosZ</i> R	1849-1869	CAT GTG CAG (A/C/G/T) GC (A/G) TG GCA GAA

Para los iniciadores de *nirK* la posición es relativa de *Alcaligenes faecalis* y para *nosZ* *Pseudomonas aeruginosa* (Throbäck, 2004).

8.3 TGGE

Se tomaron 20 µL de las reacciones de PCR y se cargaron en geles de poliacrilamida al 8%, urea 7 M y TAE 1.25x. Se hizo un gradiente de temperatura de 55 °C a 67 °C y la electroforesis se realizó a 50 V durante 12 horas, elevando un grado centígrado por hora. Los geles se revelaron durante 3 horas con SYBR Gold 1:10000 (v/v) y se analizaron en un fotodocumentador Gel Doc 2000 de Bio-Rad. Las imágenes digitales se analizaron con el software *Quantity One* de Bio-Rad (Laboratorios Bio-Rad Inc.).

En los geles, se cortaron las bandas de los carriles que mostraban diferente patrón de bandeo y se dejaron en un tubo Eppendorf con agua bidestilada durante una noche para recuperar el ADN por difusión. Posteriormente se volvió a hacer PCR con el ADN recuperado y con los oligonucleótidos sin grapa para la secuenciación. Los productos de PCR se purificaron con el Kit Wizard SV Gel and PCR (Promega) bajo las indicaciones del fabricante. Las bandas con un tamaño diferente al esperado (450 pb) se descartaron y las que sí correspondían se secuenciaron.

8.4 Secuenciación

Los productos de PCR del experimento 1 se secuenciaron en el Instituto de Fisiología Celular / UNAM. Las secuencias nucleotídicas de las bandas seleccionadas se determinaron por medio de un secuenciador automático modelo ABI 373 A (Applied Biosystems, Perkin-Elmer) por el método de terminación con didesoxinucleótidos.

8.5 Análisis estadístico

Para estudiar la dinámica y riqueza de bandas y para analizar las posibles diferencias entre las distintas variables se realizó una matriz de datos de ANOVA multivariable (ver anexo) y se analizó en el programa STATISTICA versión 7.

8.6 Análisis de riqueza ponderada

Otra interpretación para medir el número de bandas existentes se tomó de Marzorati y colaboradores (2008). El rango ponderado de riqueza R_r se midió a partir de una inferencia del *DGGE* y se consideró el número total de bandas multiplicado por el porcentaje de gradiente de desnaturalización con la siguiente fórmula:

$$R_r = N^2 \times D_g$$

Donde N representa el número total de bandas en el gel y D_g es la diferencia del gradiente de desnaturalización de un *DGGE* entre la primera y última banda de cada carril. Ya que en el presente trabajo se utilizó una variante del *DGGE* (*TGGE*), se realizó una corrección propuesta por el autor quedando de la siguiente manera

$$Rr = N^2 \times Tg$$

Tg = Diferencia de temperatura entre la primera y la última banda del patrón/Gt

Donde *Tg* es la diferencia del gradiente de temperatura entre la primera y la última banda del patrón y *Gt* representa el gradiente total teórico posible de un TGGE (100-0 °C).

RESULTADOS

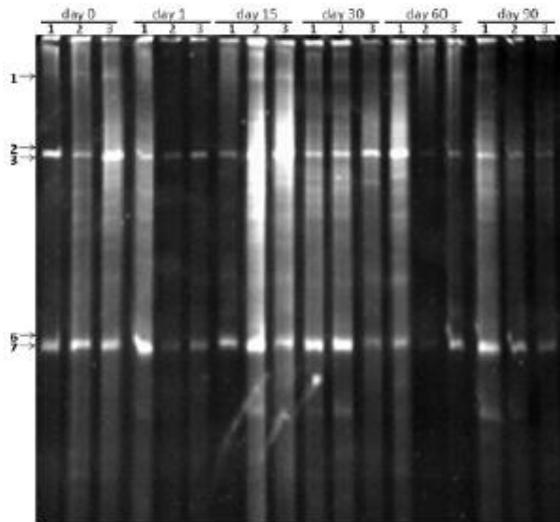
9 Experimento 1

El análisis de la estructura y la composición de la comunidad bacteriana de la chinampa de Xochimilco se caracterizó por medio del gen *nirK*. Las muestras se colectaron en distintos tiempos de la cinética del experimento durante 90 días.

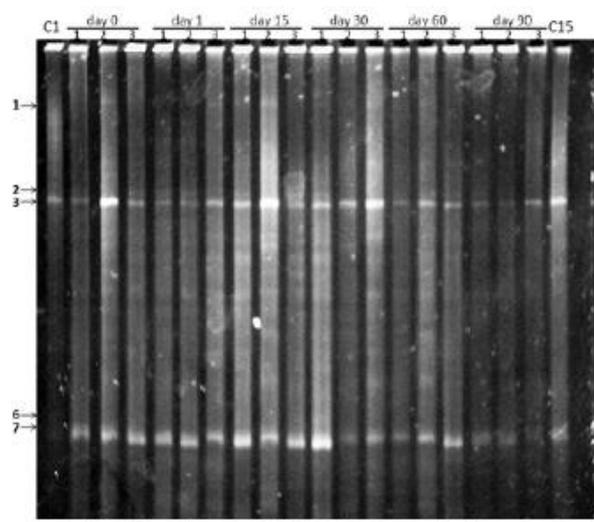
En la figura 12 se presenta el patrón de bandas de *nirK*, donde puede ser observada la presencia de sólo algunas bandas en todos los microcosmos, con 2 bandas más intensas que dominan en la parte media del gel marcadas como X3 y X7.

Como se puede observar, (figura 12 A y B) existen patrones similares entre el tratamiento 1 y el control, aparentando una diversidad similar. Por otro lado, el patrón de los tratamientos 2 y 3 tiene más parecido entre sí (figura 12 C y D), aunque con menos bandas con respecto al control y al tratamiento 1 (Figura 12). En los tratamientos 2 y 3 la intensidad de las bandas X3 y X7 disminuyó después de 30 días de incubación. Hay que destacar que en el día 60 las bandas aparecen de nuevo y en el día 90 vuelvan a desaparecer. Como la técnica de PCR no es cuantitativa, estos resultados deben ser tomados con precaución.

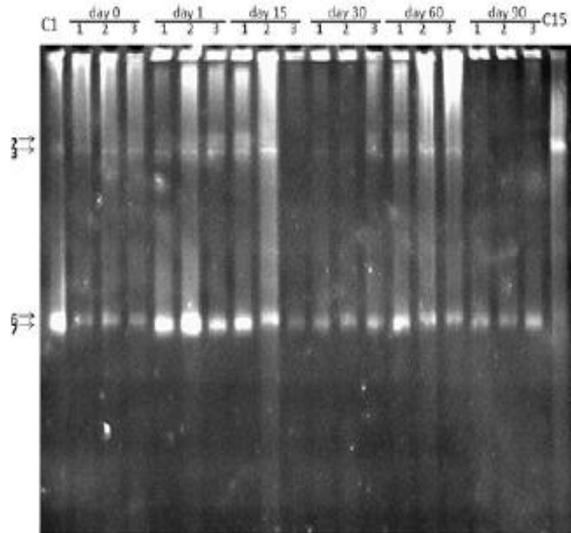
A)



B)



C)



D)

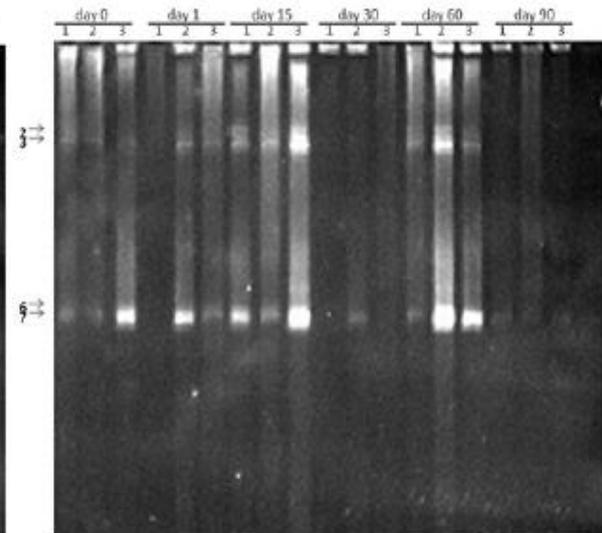


Figura 12. Geles de TGGE donde se muestra el perfil de *nirK*. A) control, B) concentración 1 (0.7), C) concentración 2 (4) D) concentración 3 (4.2). La numeración de los carriles corresponde a los sitios 1, 2, 3 respectivamente y los días en que fueron tomados

Se cortaron 18 bandas de los geles de las cuales se obtuvieron cinco secuencias. El análisis de la similitud de la secuencia de ADN confirmó que los productos de PCR son del tamaño esperado (450 nucleótidos), por lo que se usaron para generar un dendrograma, usando el gen *nosZ* de *Marinobacter* sp.

como grupo externo (Figura 13). Aparentemente las 5 secuencias están asociadas al dominio Bacteria y con algunas clonas de *nirK*. También se muestra que las bandas X1 y X3 se agruparon en un clúster y X6 se agrupó en otro con una clona de *nirK*; éstas no están relacionadas con ninguna de las otras cepas del dendrograma aunque la secuencia de *Rizobium* sp. se encuentra cercana. Algo que hay que resaltar es que las secuencias X1, X3 y X6 están próximas entre sí.

Por otro lado, la banda X7 se agrupó con *Pseudomonas fluorescens*. Hay que notar que las 2 bandas más intensas que dominan la parte media del gel, es decir X3 y X7, son muy divergentes de acuerdo a la distancia que muestran en el dendrograma.

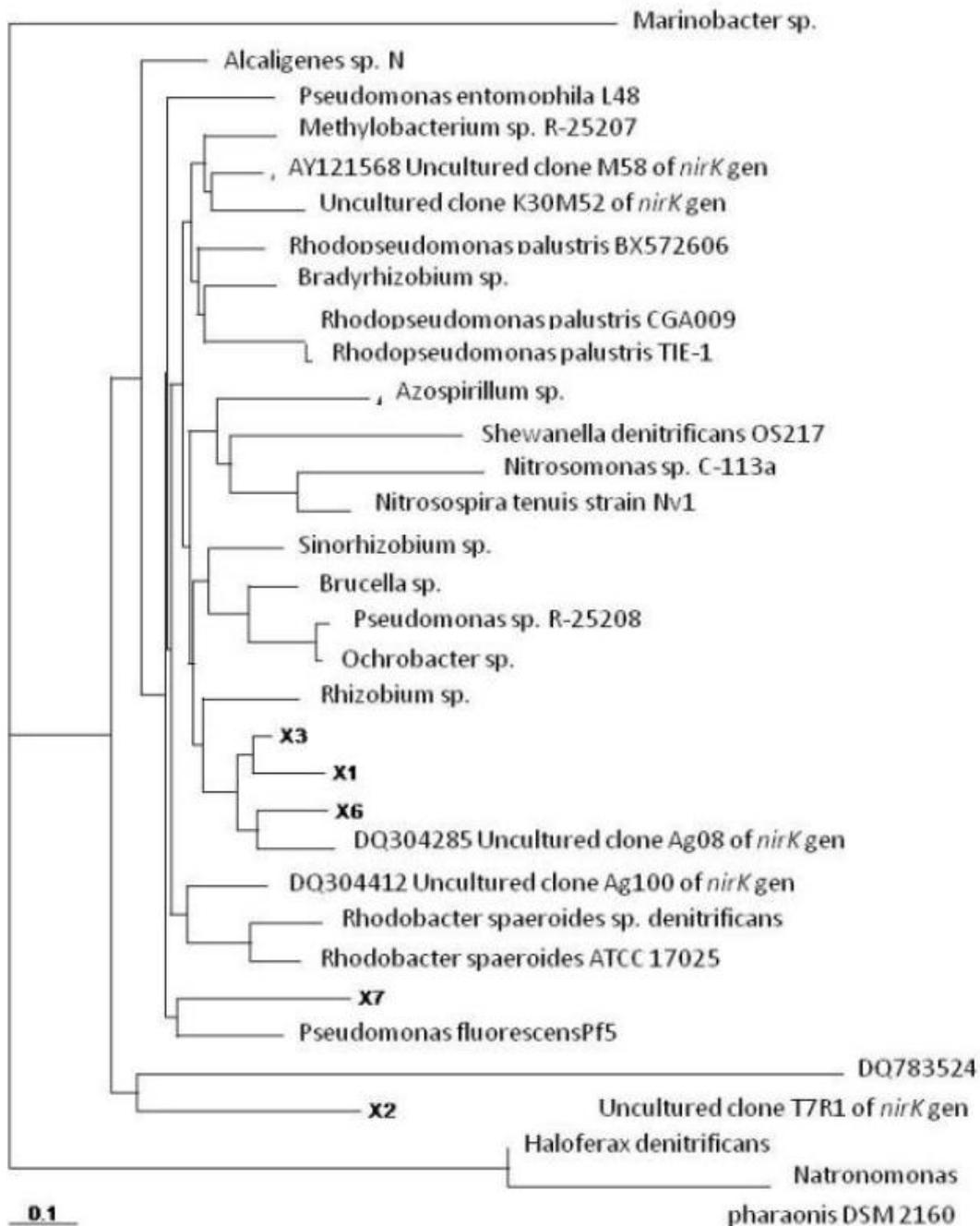


Figura 13. Dendrograma basado en la secuencia del gen *nirK*. Las distancias fueron determinadas por análisis de Neighbor-joining El árbol se realizó con amplicones parciales de *nirK*

10 Experimento 2

La evaluación de la composición de la comunidad microbiana *nirK* se hizo después de 10 días de incubación con el plaguicida a una dosis mayor que la aplicada en campo (concentración 4.2 g/Kg) con los microcosmos intactos

10.1 Comunidad bacteriana con el gen *nirK*

Análisis de la dinámica e índice de riqueza de fragmentos genéticos del gen *nirK*

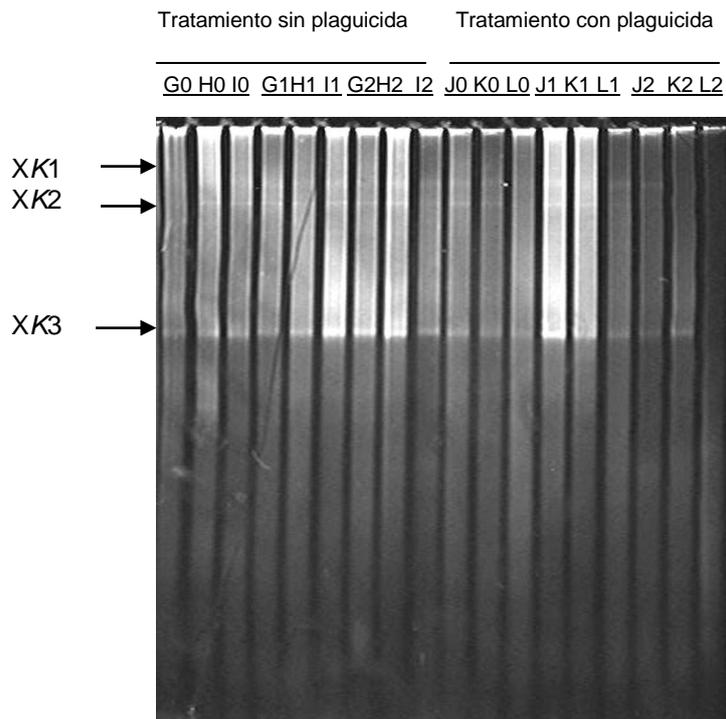


Figura 14. *nirK* TGGE de suelo inalterado. Perfil de bandas con plaguicida (1-9) y sin plaguicida(10-18) G0,H0,I0 repeticiones del tiempo 0. G1,H1,I1 repeticiones del tiempo 1., G2,H2,I2 repeticiones del tiempo 2. J0,K0,L0, repeticiones de tiempo 0. J1,K1,L1, repeticiones de tiempo 1. J2,K2,L2, repeticiones de tiempo 2

En la figura 14 se observan tres fragmentos dominantes en el gel, nombrados como **XK1**, **XK2** y **XK3** (por sus iniciales, **X**ochimilco, **nirK**, más el número para el orden de aparición). Las bandas se manifestaron uniformemente en el gel donde se corrieron las muestras de los tratamientos sin plaguicida. Cuando se comparan los tratamientos con plaguicida, las bandas del tiempo 5 días con

plaguicida son más tenues y en el carril L2 del suelo con plaguicida están ausentes (sin embargo, y como ya se mencionó anteriormente, la PCR realizada no es cuantitativa).

En la figura 15 se representa esquemáticamente la lectura de las bandas en el gel en el momento de su revelación donde se hacen evidentes algunas bandas que no se aprecian en la fotografía. El carril dos es el que presenta un mayor número de bandas (con seis en total). Por otro lado, el carril 18 es el único que no presenta ninguna banda.

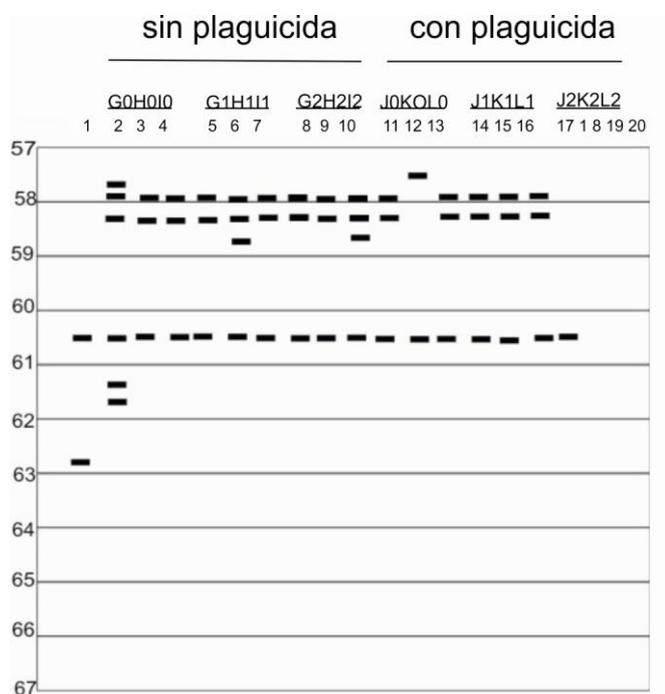


Figura 15. Anàlisis de número de bandas propuesto por Marzorati y col. (2008). Carril 1 y 20 control. Carriles 2-10 **suelo sin plaguicida**. carriles 2,3,4 tiempo 0 del sitio 1,2,3 respectivamente. Carriles 5,6,7 tiempo 1 del sitio 1,2,3. Carriles 8,9,10 tiempo 2 del sitio 1,2,3. Carriles 11-19 **suelo con plaguicida**. Carriles 11,12,13, tiempo 0 del sitio 1,2,3 respectivamente. Carriles 14,15,16 tiempo 1 del sitio 1,2,3. Carriles 17,18,19 tiempo 2 del sitio 1,2,3.

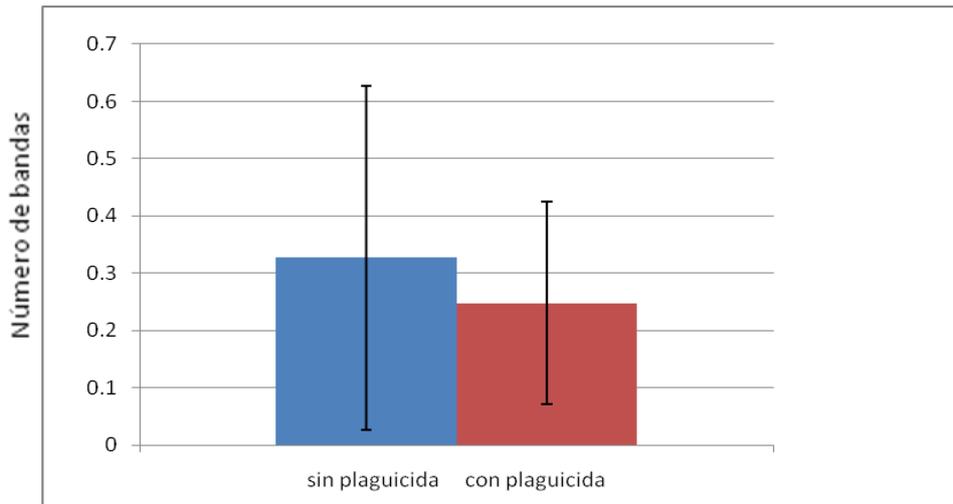


Figura 16 Número de bandas presentes (*nirk*). Resultado del promedio de tres experimentos por triplicado

Tabla 2. Promedio y desviación estándar de la aparición de bandas

	Sin plaguicida	Con plaguicida
Rr (número de bandas)	0.32	0.24
Dstd	0.29	0.17

El número de bandas con o sin plaguicidas no presenta una diferencia significativa, ya que la desviación estándar no permite diferenciarlos.

10.1.1 Análisis de porcentaje de cambio de fragmentos genéticos *nirK*

El análisis de matriz multivariable no detectó ningún cambio significativo con respecto al número de bandas, tanto a lo largo del tiempo como con la adición del plaguicida (Figura 16). Sin embargo, con respecto al porcentaje de cambio (Figura 17), el análisis muestra cambios a lo largo del tiempo y con la adición de plaguicida

Tabla 3. Datos con resultados significativos en el análisis ANOVA

Suelo inalterado	SS	Grados de libertad	ms	f	p
C/S plaguicida	9.389	1	9.389	13.00	0.004
Tiempo	6.333	2	167	4.38	0.037

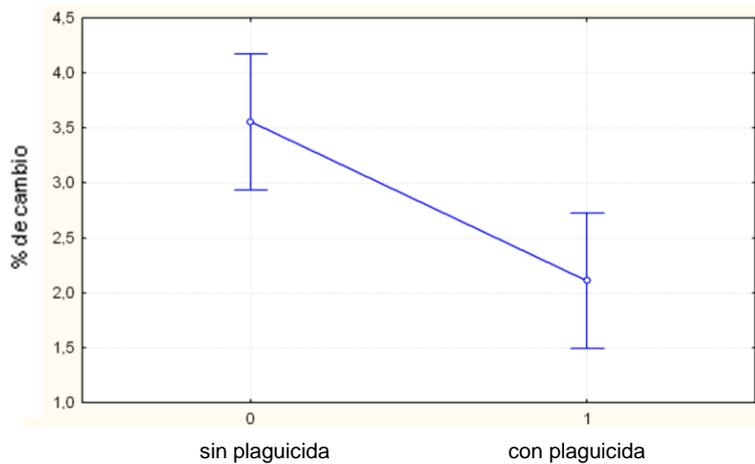


Figura 17 *nirK* alteración en el porcentaje de cambio con la adición de plaguicida

10.1.2 Analisis puntual del porcentaje de cambio en el tiempo

Cuando se analizó el porcentaje de cambio de *nirK* a lo largo del tiempo (Figura 18), se observa que en ambos tratamientos (tipos de suelo) existen diferencias y que el mayor contraste se da entre el tiempo 0 y el tiempo 1, así como entre el 0 y el 2.

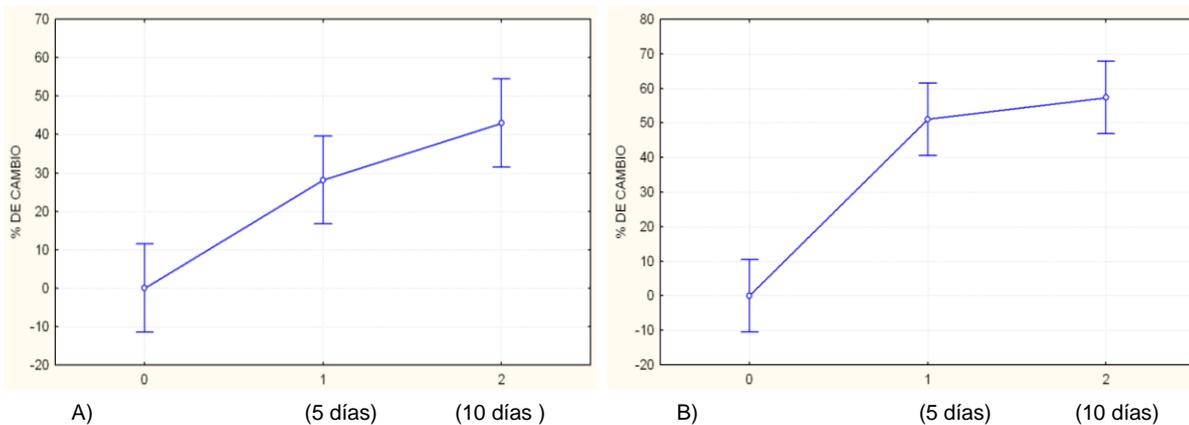


Figura 18. *nirK*, porcentaje de cambio en el tiempo. A) suelo inalterado B) suelo alterado

Con el fin de tener una visión más amplia de la dinámica de las comunidades, y dado que se tiene reportado que otro marcador molecular es sensible a la adición de plaguicidas, se completó la dinámica de la comunidad bacteriana en relación al gen *nosZ*.

10.2 Comunidad bacteriana con el gen *nosZ*

Ya que cada banda en el gel se puede asociar a alguna unidad taxonómica dada por el lugar que ocupa en el gel, se pudo realizar el método cuantitativo de $R_r = \text{Número de bandas}$ (ver experimento 1) para definir el rango ponderado de riqueza (Marzorati *et al.*, 2008).

10.2.1 Suelo alterado

El perfil TGGE de la región del gen *nosZ* se presenta en la figura 19. Estos perfiles reflejan una uniformidad de las poblaciones en el suelo alterado, observándose tres bandas dominantes nombradas como **XZ1**, **XZ2** y **XZ3** (Xochimilco *nosZ* más el número de aparición en el gel), las cuales se mantienen presentes tanto a lo largo del tiempo como y sin plaguicida. Las bandas se evaluaron en el análisis de dinámica (porcentaje de cambio) y de riqueza de fragmentos genéticos.

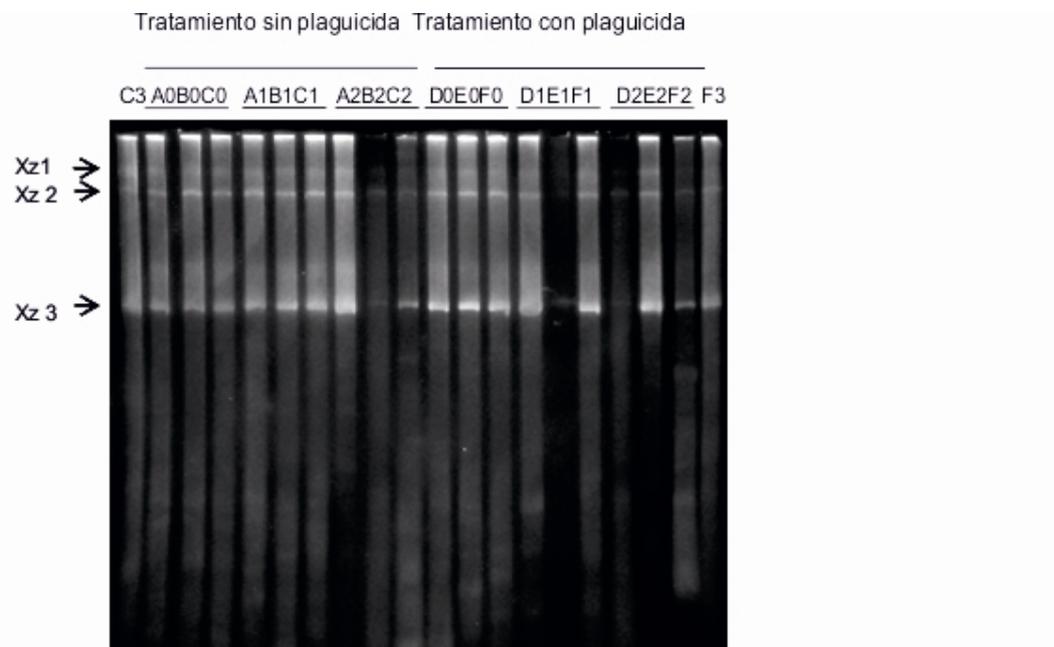
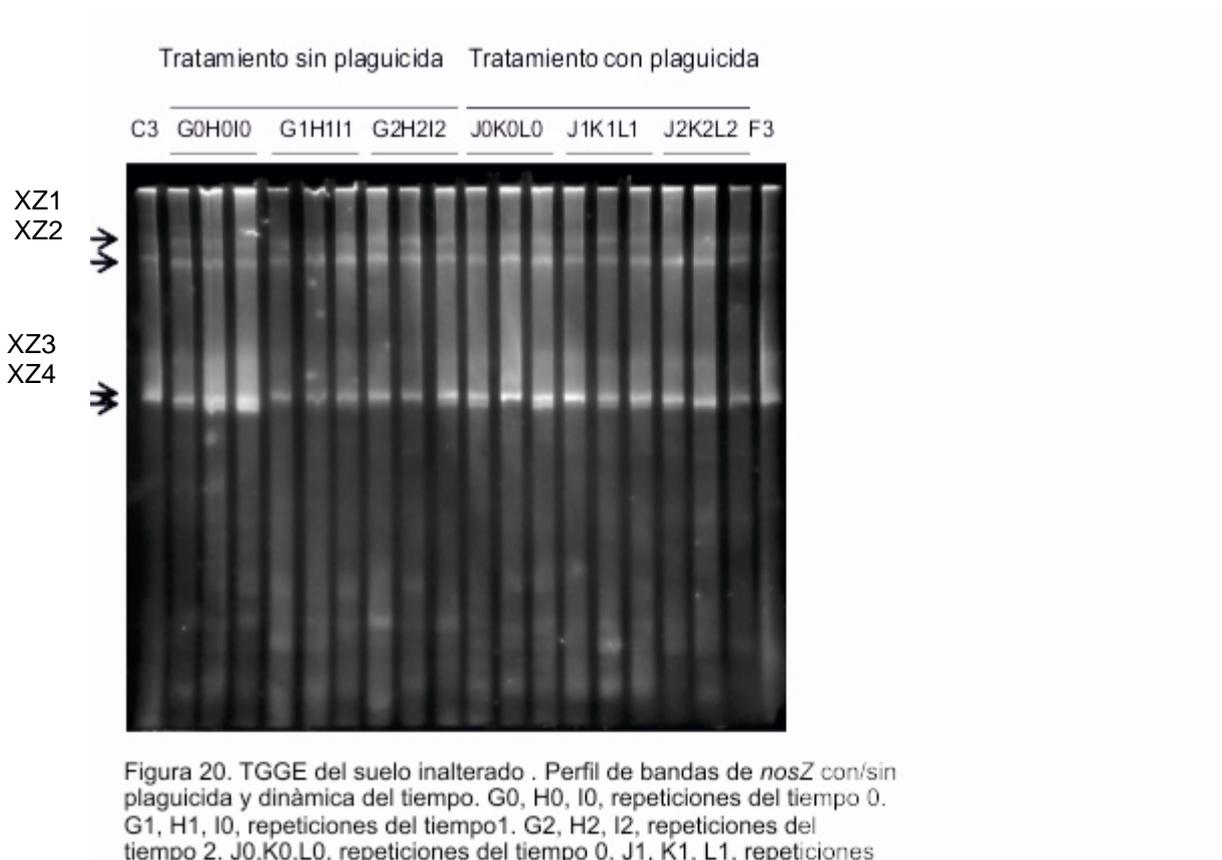


Figura 19. TGGE de suelo alterado *nosZ*. Perfil de bandas con/ sin plaguicida y dinámica del tiempo. A0, B0, C0, repeticiones del tiempo 0. A1, B1, C1, repeticiones del tiempo 1. A2, B2, C2, repeticiones del tiempo 2. D0, E0, F0, repeticiones del tiempo 0. D1, E1, F1, repeticiones del tiempo 1. D2, E2, F2, repeticiones del tiempo 2.

10.2.2 Suelo inalterado

En el perfil producido por el TGGE (Figura 20) en el suelo inalterado también se encuentra uniformidad en los fragmentos genéticos de *nosZ*. Sin embargo, el perfil muestra otra banda dominante marcada como **XZ4**, en contraste con el perfil del suelo alterado. En este mismo experimento se puede observar la existencia de más bandas, tanto en el periodo de tiempo analizado como entre tratamientos, mismas que se mencionarán más adelante.



El patrón de bandas de la región del gen *nosZ*, es el resultado del análisis molecular de las muestras de suelo tomadas durante el experimento que duró 10 días.

10.2.3 Análisis de la dinámica y número de fragmentos genéticos del gen *nosZ* (número de bandas de suelo inalterado vs. suelo alterado).

En el cuadro 4 se muestran los datos del promedio del número de bandas presentes, comparando suelo alterado contra suelo inalterado. El cambio que se ve concuerda con el análisis en matriz que se muestra en la figura 17.

Se observa que el número de bandas es 7 veces mayor cuando el suelo está inalterado en su estructura (Figura 21). Este es la única comparación que tiene cambios significativos en cuanto al cambio en el número total de bandas totales se refiere (ver más abajo).

Tabla 4. Datos de riqueza de fragmentos genéticos de *nosZ*

	Sin plaguicida	Con plaguicida
Rr (número de bandas)	7.13	1.15
Dstd	0.49	0.21

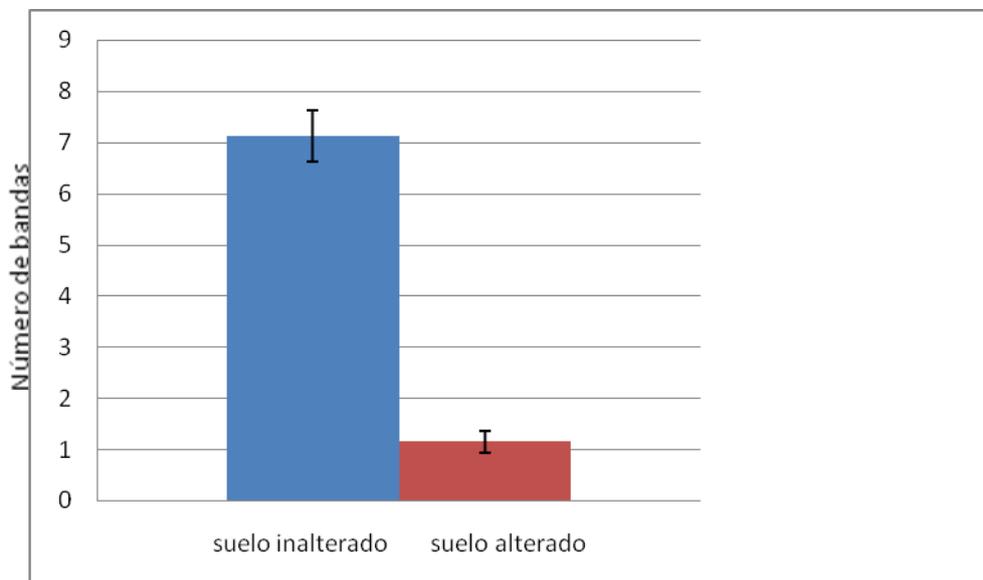


Figura 21. Análisis de riqueza de *nosZ* entre suelo inalterado y suelo alterado

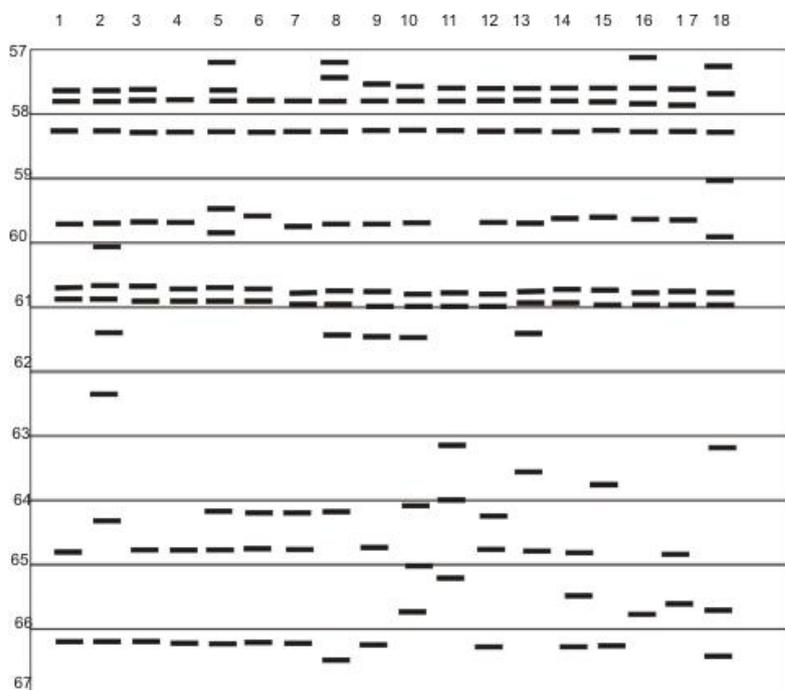


Figura 22. Análisis de bandas de *nosZ* en suelo inalterado con (carril 1-9) o sin plaguicida (10-18)

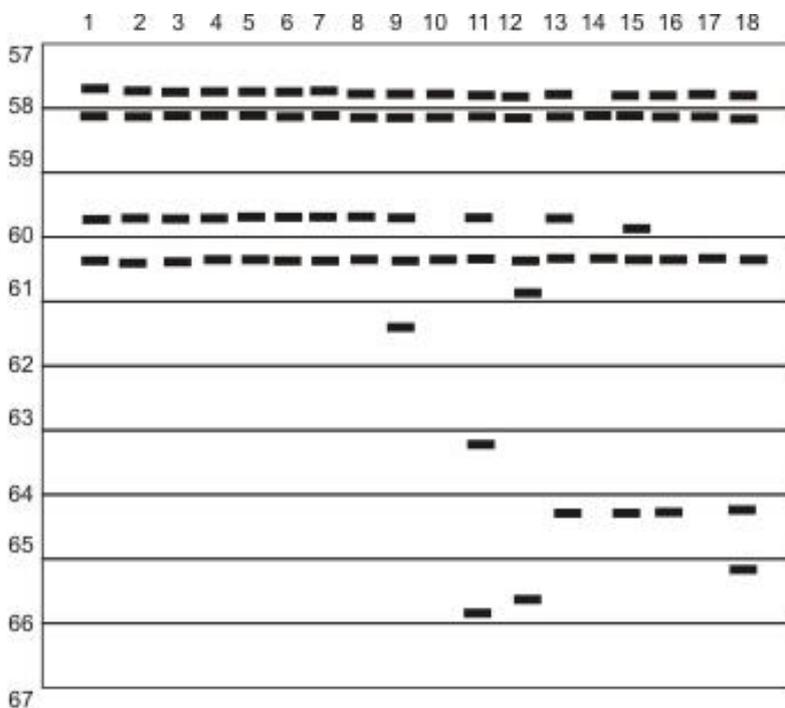


Figura 23. Análisis de fragmentos de *nosZ* en suelo alterado con o sin plaguicida en diferentes tiempos. Carril 1-9 sin plaguicida 10-18 con plaguicida

10.2.4 Análisis del porcentaje de cambio y riqueza de bandas de nosZ

El análisis estadístico del número de bandas y del porcentaje de cambio mostró que los cambios significativos de las comunidades se encuentran principalmente cuando influye una sola variable (plaguicida o alteración física), mientras que cuando se analiza alguna combinación de variables no existen cambios significativos. Hay que subrayar que la única ocasión en que existe cambio en el número de bandas totales es cuando se analiza el tipo de suelo en los experimentos analizados. En la figura 24 se muestran los cambios en el porcentaje de cambio y en el número de bandas.

Con base en el análisis estadístico, la figura 24 muestra que el número de bandas presentes, así como el porcentaje de cambio, son significativos si se analizan de manera independiente. Con lo que respecta al disturbio del suelo (alterado/inalterado), el porcentaje de cambio disminuye una vez en cada caso, por lo que es probable que la alteración del suelo es un elemento importante que incide tanto en el número de bandas presente como en el porcentaje de cambio.

Tabla 5. Resultados significativos en la prueba estadística.

	F	Effect	Error df	p
Suelo/alterado vs Inalterado	60.35	2	23	.000

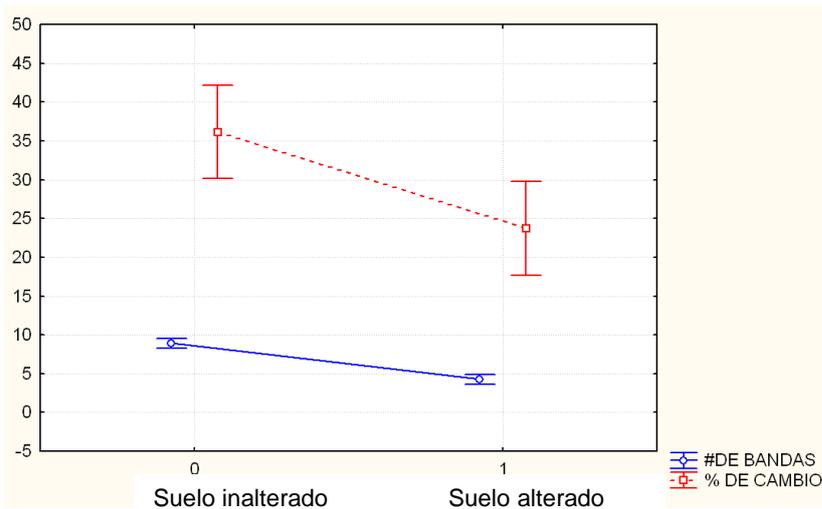


Figura 24. Análisis de ANOVA multivariable

10.2.5 Análisis de porcentaje de cambio con el gen nosZ

Tabla 6 Resultados de ANOVA (porcentaje de cambio)

Suelo inalterado	SS	Grados de libertad	ms	f	p
C/S plaguicida	799	2	799	5.73	0.0034
Tiempo	119 e 2	2	5936	42.58	0.000
Suelo alterado					
C/S plaguicida	983	1	983	5.92	0.0032
Tiempo	5722	2	2861	17.23	0.000

Los resultados obtenidos de las comparaciones de cambio en el número de bandas, en el tiempo y con la adición de plaguicida se muestran en la figura 25.

Los datos analizados muestran que la adición de plaguicida como variable (en ambos tipos de suelo), modifica el porcentaje de cambio y no el número de bandas totales.

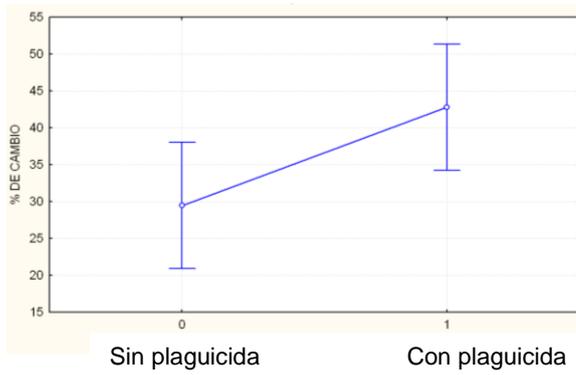
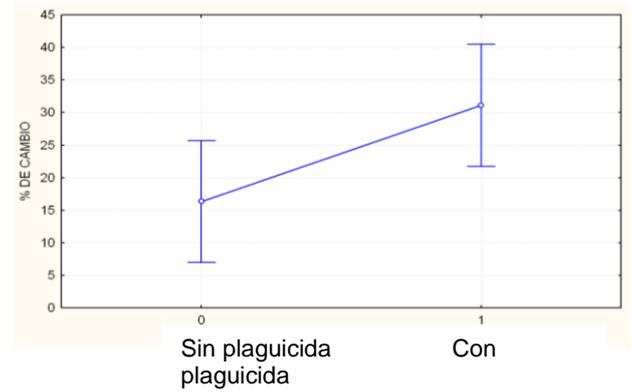


Figura 25. A) Porcentaje de cambio de *nosZ* en suelo inalterado con plaguicida



B) Porcentaje de cambio de *nosZ* en suelo alterado con plaguicida

10.2.6 Porcentaje de cambio en el tiempo

Cuando se evalúa el tiempo que duró el experimento y se analiza su dinámica (Figura 26) se puede observar que en ambos tipos de suelo existen cambios significativos entre el tiempo 0 y el tiempo 2. Sin embargo, cuando se analizan los cambios entre el tiempo 1 (cinco días) y tiempo 2 (diez días) no se registraron diferencias.

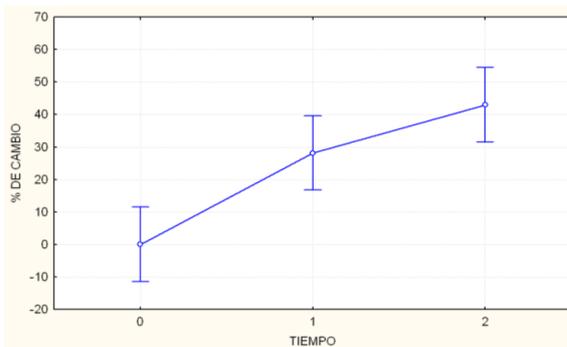
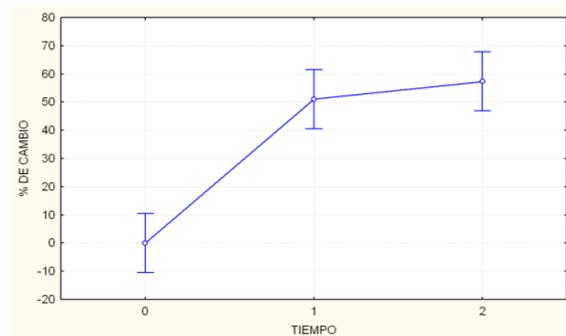


Figura 26. A) porcentaje de cambio en el tiempo *nosZ* en suelo inalterado



B) porcentaje de cambio en el tiempo *nosZ* en suelo alterado

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La microbiota del suelo es el resultado de las condiciones físico-químicas que le rodean, dando como resultado heterogeneidad de los nichos alimenticios y oxido-reductores. Otro de los resultados de esta interacción, es una amplia diversidad biológica y genética la cual aporta valor multifuncional al suelo (Black *et al.*, 2003). La microbiota del suelo juega un papel primordial en la descomposición de la materia orgánica y, especialmente, en la dinámica del nitrógeno (Omirou *et al.*, 2010). El estudio de la composición y dinámica bacteriana del suelo se ha ido explorando recientemente ya sea para encontrar una solución al impacto ambiental que se ejerce sobre el planeta o bien debido a las pérdidas económicas existentes por el bajo aprovechamiento de los agroquímicos nitrogenados (Enwall *et al.*, 2005).

Los resultados ponen de manifiesto que el tratamiento de los suelos en el estudio de las comunidades microbiológicas pueden ser significativamente distintos en relación al tratamiento previo de la muestra y no a la variable de estudio *sensu stricto*. Al respecto no existe consenso en los parámetros a utilizar en la investigación con microcosmos y este trabajo demuestra la importancia de calibrar algunas variables antes de interpretar resultados definitivos con el fin de asegurar una adecuada simulación de parámetros. Se sugiere mantener las condiciones más similares a las de campo como el caso de trabajar con muestras inalteradas para que las respuestas sean más acotadas a lo que pueda estar sucediendo en condiciones naturales. La calibración actúa como una medida de relación entre los microcosmos y el ambiente. Sin embargo, esta calibración no implica que sea un análogo exacto de lo que ocurre en el ambiente (Longa *et al.*, 2009). Los estudios en

microcosmos aportan datos valiosos para el entendimiento de la dinámica en los sistemas de campo, es por eso que el uso de estos sistemas es fundamental para la investigación de la ecología microbiana y la interacción con distintos xenobióticos y/o disturbios físicos en la estructura y dinámica del ambiente natural del suelo. Es un hecho que la construcción de los microcosmos puede afectar la composición y la riqueza de la comunidad bacteriana (Hughes *et al.*, 2008). Sin embargo, en el presente estudio los factores bióticos y abióticos son los mismos para cada microcosmo. En este sentido, se ha estimado que la comparación entre tratamientos y el control es válida, soportada por el número de muestras en el estudio estadístico. Además, Philippot y colaboradores (2002) reportan que la estandarización en la preparación de los microcosmos con diferentes suelos estudiados permite una comparación válida.

La biodiversidad es una definición compleja que incluye aspectos taxonómicos, funcionales, espaciales y temporales de la diversidad de los organismos. Actualmente la riqueza de especies (número de especies) se ha tomado como una medida importante para la definición del concepto. La mayoría de los estudios de diversidad funcional y estabilidad en la diversidad utilizan análisis de riqueza ponderada como parámetro (Wittebolle *et al.*, 2009).

El desarrollo de técnicas de huellas moleculares permite un acercamiento a uno de los problemas centrales en ecología microbiana, que es estimar la diversidad “real” en un ambiente dado. No obstante, existen algunos inconvenientes asociados a estas técnicas que hay que tener en cuenta para la interpretación de los resultados (Head *et al.*, 1998). Las técnicas de obtención del material genético de muestras ambientales suelen tener complicaciones

(Carrigg *et al.*, 2007). Es probable que las características del suelo de Xochimilco (ácidos húmicos, materia orgánica) puedan interferir en los procesos posteriores a su extracción, dificultando de esta forma su manejo (Dong *et al.*, 2006). Dado lo antes expuesto, en el presente trabajo se necesita una crítica más aguda a la hora de interpretar los datos moleculares como resultado del tipo de métodos utilizados en el estudio, así como tener en cuenta las limitaciones de la técnica utilizada antes de llegar a conclusiones definitivas de los procesos estudiados (Carrigg *et al.*, 2007; Marzorati *et al.*, 2008). El empleo de estas técnicas ayuda, sin embargo, a describir los grupos dominantes en la comunidad en un momento y espacio dado y permite tener un enfoque de los cambios que se dan en la misma. El análisis de la secuencia, tamaño y aparición de los fragmentos genéticos de *nirK* en los tratamientos utilizados en los microcosmos se muestran en el dendrograma de la figura 13. En él se observa que X1 y X3 se agrupan en un clúster. Sin embargo, con los análisis realizados no se obtuvo información suficiente que permitiera ampliar la discusión sobre estos fragmentos. Por otro lado, la banda marcada como X6 se agrupa con una clona de *nirK*. Por último, la banda que más información proporcionó es X7, que se agrupó en un clúster (grupo) con *Pseudomonas fluorescens* (que se sabe que puede desnitrificar aeróbicamente). En este sentido, Castrejón y colaboradores (2005) lograron aislar distintas *Pseudomonas* en suelo incubado con metil paratión. El género *Pseudomonas* incluye bacterias aerobias capaces de metabolizar una enorme variedad de compuestos orgánicos, los cuales son utilizados como substratos para crecimiento, como es el caso de *Pseudomonas putida* que puede hidrolizar el metil paratión a p-nitrofenol como única fuente de carbón para su crecimiento

(Zhongli *et al.*, 2001), además de poseer la capacidad de colonizar nichos con déficit de nutrientes. Otra característica importante de éstas bacterias es que pueden degradar distintos compuestos, como plaguicidas, hidrocarburos derivados del petróleo y otros compuestos halogenados, por lo que se les ha utilizado ampliamente en procesos de biorremediación (Benavides *et al.*, 2006). Es preciso señalar que *nirk* ha presentado a lo largo de su historia evolutiva distintos procesos de duplicación y pérdida de genes, así como mecanismos de transferencia horizontal de genes. Estos hechos podrían dificultar las interpretaciones filogenéticas, y mostrar algunas incongruencias en el árbol comparativo (Heylen *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008). Para efectos de este trabajo, la agrupación en *clústers* sirve para identificar especies con potencial metabólico de desnitrificación (*vía nirK*) que habitan en suelos contaminados, por lo que el dendrograma resulta un buen acercamiento para la identificación de grupos funcionales a nivel molecular. Pruebas de actividad microbiana como la realizada por Márquez (2009) señala que la producción de N₂O aumenta cuando se expone al suelo una concentración de 2.8 g de plaguicida / kg de suelo seco durante 90 días. Por lo visto en la figura 12D resulta evidente que la desaparición de bandas en el gel podría significar menor presencia de bacterias con *nirK*, lo que obligaría a que las bandas persistentes fueran más activas y que éstas contribuyeran al aumento del N₂O. Para demostrarlo se tendrían que realizar estudios transcripcionales de los genes implicados o bien medidas de la actividad enzimática.

Las técnicas moleculares para estudiar comunidades a nivel molecular y su respuesta a ambientes cambiantes son usadas en ecología microbiana. Haciendo modificaciones a la fórmula de riqueza ponderada publicada por

Marzorati (2009), se pudo evaluar el índice de riqueza como el número de bandas que aparecen en un gel. Para saber cómo se comportaban las comunidades dominantes que tienen *nirK*, se decidió analizar este gen en suelo inalterado (Figura 14) y se le añadió plaguicida [concentración 3 (2.8 g de plaguicida / kg suelo seco)]. Para tener un espectro más amplio de análisis y comparación, se evaluó una cinética temporal. Los datos indican que el número de bandas que aparecen en distintos puntos de muestreo y con la adición del metil paratión no presentan cambios significativos. En este análisis, es evidente el dominio de tres bandas (XK1, XK2 y XK3) en el gel, bandas que son consistentes en el tiempo y con la adición del plaguicida.

Para tener un mejor entendimiento de la diversidad existente en las comunidades que habitan el suelo, se realizó el análisis de riqueza y del porcentaje de cambio del gen *nosZ* como marcador molecular, ya que se ha reportado que la enzima NosZ puede ser más sensible que NirK a los cambios en el ambiente en respuesta a distintos xenobióticos (Richards y Knowles, 1995; Steven *et al.*, 2000). En el análisis con suelo alterado (Figura 19) aparecieron 3 bandas dominantes designadas como XZ1 XZ2 y XZ3, las cuales aparecen prácticamente en todos los carriles y que no cambian ni en el tiempo ni con la adición del plaguicida. Sin embargo, la aparición y desaparición de otras bandas con menos intensidad en distintos puntos del gradiente, revela una variación en el porcentaje de cambio cuando se le añade plaguicida, así como un porcentaje de cambio en función del tiempo.

Por lo que respecta al análisis de *nosZ* en el suelo inalterado (Figura 20), la variación en el porcentaje de cambio se da, una vez más, cuando se analiza a

través del tiempo con la adición de plaguicida. También se encuentran diferencias si se comparan los dos tipos de suelo. Es importante observar que en el análisis de bandas, además de las bandas XZ1 XZ2 y XZ3 aparece una banda adicional denominada XZ4 en todos los carriles del gel (justo debajo de XZ3). Ésta es una diferencia constante cuando se comparan los dos tipos de suelo. El análisis del número de bandas soporta la idea de que los mayores cambios se dan cuando el suelo es tamizado (Figura 21). Este resultado reforzaría la observación de que el número de bandas se ve más afectado cuando el suelo se altera en su estructura, como lo muestra la figura 24. Bronick y Lal (2004) mencionaron que métodos como la labranza de tierra han tenido como consecuencia la alteración de comunidades bióticas, así como la estabilidad en distintos ecosistemas, lo que concuerda con lo observado en el presente estudio.

De los resultados se puede suponer que la diversidad de las comunidades que contienen los genes *nirK* y/o *nosZ* se afecta por la concentración de metilparatión usada, y que la uniformidad de algunas bandas dominantes en los geles revela la dominancia de determinadas unidades taxonómicas (OTU's, por sus siglas en inglés) en distintas condiciones. Las huellas resultantes del TGGE se analizaron por 2 métodos, análisis estadísticos del porcentaje de cambio y del número de bandas (Marzorati *et al.*, 2009) para dar más soporte a nuestro estudio. Los datos obtenidos sugieren la existencia de perturbación en las comunidades cuando una variable como el plaguicida, tipo de suelo y tiempo son puestas a prueba (análisis de riqueza ponderada y matriz de datos) y que estos efectos no son acumulativos entre sí (análisis multivariado). Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar lo antes mencionado.

El presente documento se suma a los estudios realizados sobre la sensibilidad de la comunidad microbiana a los cambios ambientales. Con los datos obtenidos, se ha visto que no existe un patrón consistente en las comunidades. Waldrop y Firestone (2006) señalan a este respecto que la composición de la comunidad puede cambiar rápidamente, o cambiar lentamente o no cambiar ante diversos factores, lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados.

En resumen, se puede decir que los métodos moleculares de identificación agruparon en *clusters* las bandas secuenciadas, dando información valiosa para futuras investigaciones. Una constante en todos los datos analizados es que el porcentaje de cambio siempre fue significativo, tanto para el tipo de suelo, la adición de plaguicida en exceso, y el paso del tiempo. Por otro lado, el análisis de número de bandas es igualmente significativo (7 veces más) cuando se comparan los diferentes tipos de suelo. En este contexto parecería que el suelo se encuentra en una estabilidad volátil ante la aplicación de agentes externos. Con el análisis de la diversidad de las comunidades involucradas en el ciclo del nitrógeno, se tendrá un mejor entendimiento de las relaciones entre la composición de la comunidad microbiana y la dinámica del nitrógeno en los ecosistemas (Philippot, 2005).

Xochimilco alberga una gran cantidad de especies de flora y fauna, aportando un patrimonio genético importante (Otto-Parrodi, 1999). Este sitio también ha sido de gran importancia para el desarrollo alimenticio de nuestra civilización, debido a las actividades agrícolas realizadas en las chinampas (consideradas como forma de cultivo único en el mundo). Distintos problemas ambientales han llevado a un notable descenso en la productividad de las chinampas y con esto al desarrollo de actividades agrícolas diferentes a las

tradicionales. Esto ha conllevado problemas de contaminación e impacto ambiental que atentan contra su condición de Patrimonio Mundial Cultural y Natural y de Zona Sujeta a Conservación Ecológica (Ramsar, 2004). El rescate de este humedal resulta indispensable para conservar la singularidad de sus comunidades naturales y hábitats asociados, además del valor cultural que representa como museo vivo natural, por la permanencia de sistemas agrícolas tradicionales.

PERSPECTIVAS

Con el fin de tener una visión más amplia al término del proyecto se propone:

- Secuenciar las bandas de los *TGGE* del experimento 2.
- Realizar extracciones de ARN total para RT-PCR (*nirK*, *nosZ*) e investigar cuáles son las poblaciones ecológicamente activas.
- Realizar un alineamiento del gen *nosZ* con ayuda del programa BLAST.
- Experimentar en campo y comparar los datos obtenidos en microcosmos con datos obtenidos en campo para su validación.
- Complementar los estudios con técnicas clásicas de microbiología.

LITERATURA CITADA

- Aber**, J.D., Magill, A, McNulty, S.G., Boone, R.D., Nadelhoffer, K.J., Downs, M., (1995). Forest biogeochemistry and primary production altered by nitrogen saturation. *Water air soil pollut*;85:1665– 1670.
- Adams**, M.B., Angradi, T.R. (1996). Decomposition and nutrient dynamics of hardwood leaf litter in the Fernow whole-watershed acidification experiment. *Forest ecol manag*;83:61–69.
- Adetutu**, E.M., Ball, A.S., Osborn, A.M., (2008). Azoxystrobin and soil interactions: degradation and impact on soil bacterial and fungal communities. *J appl microbiol*;105:1777-90.
- Agencia** para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades (ATSDR). (2001). *Reseña toxicológica del metil paratión*. Atlanta, GA: Departamento de salud y servicios humanos de los EE.UU., Servicio de salud pública.
- Agnelli**, A., Ascher, J., Corti, G.C., Ceccherini, M.T., Nannipieri, P., (2004). Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular ADN. *Soil boil biochem*;36:859-868.
- Alberts**, B., Bray,D., Lewis, J., Raff,M., Roberts, K., Watson, J.D., (2000). *Biología molecular de la célula*. 3ra edición. Omega España pp.43.
- Angle**, J.S., Levin, M.A., Gagliardi, J.V., McIntosh, M.S.,(1995). Validation of microcosms for examining the survival of *Pseudomonas aureofaciens* (lacZY) in *Soil appl environ microbial*;61:2835-2839.
- Benavides-López**, J., Quintero, G., Guevara-Vizcaíno, A.L., Jaimes-Cáceres, D.C., Gutiérrez-Riaño, S.M., Miranda-García, J., (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*;4:82-89.
- Bindhya**, R., Sunny S.A., Thanga, V.S., (2009). In vitro study on the influence of methyl parathion on soil bacterial activity. *J environ biol*;3:417-419.
- Black**, H.I.J., Hornung, M., Bruneau, P., Gordon, J.E., Hopkins, J.J., Weighell, A.J. & Williams, D.LI., (2004). Soil biodiversity indicators for agricultural land: nature conservation perspectives. In *agricultural impacts on soil erosion and soil biodiversity: Developing indicators for policy Analysis*, ed. by R. Francaviglia. OECD Expert Meeting, Rome, Italy, 2003. pp. 517–530.
- Blanco-Jarvio**, A., Chávez-López, C., Luna-Guido, M., Dendooven, L., Cabirol, N., (2010). Denitrification in Chinampa soil of Mexico City as affected by methylparathion: laboratory study. En proceso.

- Blaz, S.,** Mahne, I., Avgustin, G., Tiedje, J.M., (2004). Nitrous oxide reductase (*nosz*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Appl environ microbial*;70:301–309.
- Bronick, C.J.** y Lal R. (2004). Soil structure and management: a review. *Geoderma*;124:3-22.
- Buckley, D.H.,** Schmidt, T.M., (2003). Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environ microbiol*;5:441–452.
- Butler, M.D.,** Wnag, Y.Y., Cartmell, E., Stephenson, T., (2009). Nitrous oxide emissions for early warning of biological nitrification failure in activated sludge. *Water Res*;43:1265-1272.
- Carrigg, C.,** Rice, O., Kavanagh, S., Collins G., Flaherty V., (2007). ADN extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. *App microb biotech*;77:955-964.
- Castrejón-Godinez, M.L.,** Sánchez-Salinas., Ortiz-Hernández E., (2001). Crecimiento de bacterias aisladas de suelos agrícolas sobre plaguicidas organofosforados como sustrato. *Reporte anual*;1-10
- Chaofu, W.,** Gao, M., Jingan, S., Deti, W., (2006). Genwing soil aggregate and its response to land management practices. *China part*;5:211-219.
- Chapin, M.,** (1998). The seduction of models chinampa agriculture in Mexico. *Grass roots dev*;12:8-17.
- Ciampitti, A.,** Esteban, A., Ciarlo, C., (2005). Emisiones de óxido nitroso en un cultivo de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]: efecto de la inoculación y de la fertilización nitrógenada. *Ci Suelo*;1850-2067.
- CICLOPAFEST,** (2008). Control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (<http://www.sagarpa.gob.mx/ciclopafest/>)
- Clays-Josserand, A.,** Ghiglione, J.F., Philippot, L., Lemanceau, P., Lensi, R., (1999). Effect of soil type and plant species on the fluorescent *Pseudomonas* nitrate dissimilating community. *Plant soil environ*;209:275-282.
- Cordier, C.,** Edel-Hermann, V., Martin-Laurent, F., Blal, B., Steinberg, C., Alabouvette, C. (2007) Scar-based real time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. *J microbiol meth*;68:60–68.
- Coyné, M.,** (2000). *Microbiología del suelo un enfoque exploratorio*. Ed. paraninfo;1^{ra}. pp.416.
- Daniel, R.,** (2005). The metagenomics of soil. *Nat rev microbial*;3:470–478.

- Davidson**, E.A., Bustamante, M.M., Siqueira-Pinto, A., (2001). Emissions of nitrous oxide and nitric oxide from soils of native and exotic ecosystems of the Amazon and Cerrado regions of Brazil *In* Optimizing nitrogen management in food and energy production and environmental protection: Proceedings of the 2nd International nitrogen conference on science and policy;312-319
- Dong** D., Yan, A., Liu, H., Zhang, X., Xu, Y., (2006). Removal of humic substances from soil ADN using aluminium sulfate. *J microbiological meth*;66:217-222.
- Eller**, G., Kruger, M., Frenzel, P., (2005).Comparing field and microcosm experiments: a case study on methano- and methylo-trophic bacteria in paddy soil. *FEMS microbiol ecol*;51:279–291.
- 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.
- Escalante**, A., Gosset, G., Martínez, A., Bolivar F., (2001). Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia*;38:583-592.
- Fernández-Luqueño**, F., Reyes-Varela, V., Martínez-Suárez, C., Salomón-Hernández, G., Yáñez-Meneses, J., Ceballos-Ramírez, J.M., Dendooven, L. (2009). Effect of different nitrogen sources on plant characteristics and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Bioresour technol*;1:396-403.
- Galloway**, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger S.P., Sutton, M.A., (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochem*;70:153-226.
- Google** earth <http://earth.google.es/>
- Hansel**, C.M., Fendorf, S., Jardine P.M., Francis C.A., (2008). Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Appl environmen microb*;74:1620-1633.
- Head**, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W., (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb ecol*;35:1–21.
- 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. Microbiol meth*;59:327-335.
- Heylen**, K., Gevers, D., Vanparys, B., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N., Vos, P., (2006).The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ microbiol*;8:2012-21.

- Hughes**, A.R., Inouye, B.D., Johnson, M.T., Underwood, N., Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol lett*;11:609-623.
- IPCC, 2007**. Climate Change (2007). 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., Bosc, P.R., R., Meyer, L.A., Cambridge University Press, pp. 499-532.
- Jie, S.**, (2005). Identification of denitrifying bacteria diversity in an activated sludge system by using nitrite reductase genes. *Biotechnol lett*;27:1477-1482.
- Johansen**, K., Jacobsen, C., Torsvik, V., (2001). Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils. *Biol fertil soils*;33:443-453.
- Jones**, 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*;25:1955-1966.
- Kaiser**, E.A., Kohrs, K., Kucke, M., Schnug, E., Heinemeyer, O., Munch, J.C., (1998). Nitrous oxide release from arable soil: importance of N-fertilization, crops and temporal variation. *Soil biol biochem*;30:1553-1563.
- Kanekar**, P., Bhadbhade, B., Deshpande, N., Sarnaik S., (2004). Biodegradation of organophosphorus pesticides. *Proc indian natn sci acad*;1: 57-70.
- Karam**, M., Ramirez, G., Bustamante, P., Galván, M., (2004). Plaguicidas y salud de la población. *Ciencia Ergo sum*;11:245-254.
- Killham**, K., (1996) Soil ecology. Cambridge press University. pp 242
- 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.
- Longa**, M.O., Pertot, I., (2009). An intact soil-core microcosm method to evaluate the survival and vertical dispersal of *Trichoderma atroviride* SC1. *Appl microbiol* 49:609-614.
- Madigan**, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., (2004). Brock, Biología de los microorganismos. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid, pp 1064.
- Manzanilla-Cano**, J., Barceló-Quintal, M., Reyes-Salas, O., (2001). Degradación del metil paratión: hidrólisis básica y transformación con Cu (II) en medio ácido;17:71-78.
- Marinho**, E.V., DeLaune, R.D., Lindau, C.W., (2004). Nitrous oxide flux from soybeans grown on Mississippi alluvial soil. *Comm soil science plan*;35:1-8.

-Márquez, S., (2009). Efecto del metil paratión en la producción de óxido nitroso en suelos de chinampas de Xochimilco. Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.

-Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstaete, W., (2008). How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environ microbiol*;10: 1571-1581.

-Mendoza Robles-Mendoza C, García-Basilio C, Cram-Heydrich S, Hernández-Quiroz M, Vanegas-Pérez, C., (2008). Organophosphorus pesticides effect on early stages of the axolotl *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Caudata). *Chemosphere*;74:703-710.

-Methyl Bromide Global Coalition (MBGC), (1994). Annual Production and Sales for the Year 1984–1992, June 4, 1992, Washington,DC.

-Mosier, A.R., (1998). Soil processes and global change. *Biol fert soils*;27:221-229.

-NORMA oficial Mexicana nom-127-ssa1-1994, "salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

-Omirou, M., Rousidou, C., Bekris, F., Papadopoulou, K.K., Menkissoglou-Spiroudi, U., Ehalotis, C., Karpouzas, D.G., (2010). The impact of biofumigation and chemical fumigation methods on the structure and function of the soil microbial community. *Microb ecol*;1:13-13.

-Otto-Parrodi, E.S., (1999). Conservación del ajolote (*Ambystoma mexicanum*) mediante su cultivo y siembra en el parque ecológico de Xochimilco. Patronato del parque ecológico de Xochimilco AC. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. L087. México D. F

-Philippot, L., Piutti, S., Martin-Laurent, F., Hallet, S., Germon, JC., (2002). Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Appl Environ Microbiol*; 68: 6121-6128.

-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.

-Priemé A., G. Braker and Tiedje JM., (2002). Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl environ microbiol*; 4:1893-900

-RAMSAR. <http://195.143.117.139/indexsp.htm>.

- Richards, S.R., Knowles, R. (1995).** Inhibition of nitrous oxide reduction by a component of Hamilton Harbour sediment. *FEMS. Microbiol ecol*;17, 39–46.
- Richardson, J., (2000).** Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiol*; **146**:551-571.
- Rochette, P., Angers, D., Belanger, G., Chantigny, M., Prevost, D., Levesque, G. (2004).** Emissions of nitrous oxide from alfalfa and soybean crops in eastern Canada. *Soil sci soc of Am J*;68:493-506.
- Roeselers, G., Zippel, B., Staal, M., Van Loosdrecht, M., Muyzer, G., (2006).** On the reproducibility of microcosm experiments different community composition in parallel phototrophic biofilm microcosms. *FEMS Microbiol ecol*;58:169–178,
- Sandoval, J., (2003).** Calidad microbiológica y fisicoquímica del agua de los canales de Xochimilco. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México
- **SEMARNAT(2000).** NOM-027- <http://www.semarnat.gob.mx/leyesy normas>
- Sheng, Y., (2005).** Identification of denitrifying bacteria diversity in an activated sludge system by using nitrite reductase genes. *Biotechnol lett*;19:1477:1482.
- Silke, F., Liu, B., Braker, G., (2010).** Isolation, genetic and functional characterization of novel soil *nirK*-type denitrifiers. *Syst appl microbiol*;33:337-347.
- Sogorb, M., Vilanova, E., (2002).** Enzymes involved in detoxification of organophosphorous, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol lett*;128:215-228.
- Steven, D., Siciliano, R., Roy, C.W. Greer, (2000).** Reduction in denitrification activity in field soils exposed to long term contamination by 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *FEMS Microbiol ecol*;32:61-68.
- Su, Y.Z., Liu, W.J., Yang, R., Chang X.X., (2009).** Changes in soil aggregate, carbon, and nitrogen storages following the conversion of cropland to alfalfa forage land in the marginal oasis of northwest.China. *Environ manage*;43:1061-1070.
- 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.
- Tiedje, J.M., (1988).** Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. Zehnder, A., (Ed), *Biology of anaerobic microorganisms.* John Wiley and Sons, New York, pp. 179-244.

-Torsvik, V., Goksoyr, J. y Daae, F.L., (1990). High diversity of ADN of soil bacteria. *Appl. environ microbial*;56:782-787.

-Toxical profile for Methyl parathion (2001). U.S. Department of health and human services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry 267.

-UNESCO <http://www.unescomexico.org/xochimilco/index.htm>

-Waldrop, M., Firestone M.K., (2006). Response of microbial community composition and function to soil climate change. *Microb ecol*;52:716-724.

-Watson, C.A., Atkinson, D., (1999). Using nitrogen budgets to indicate nitrogen use efficiency and losses from whole farm systems: a comparison of three methodological approaches. *Nutr cycl agrosysts*;53: 259–267.

-Watts, M., (2010). Pesticides: Sowing poison, growing hunger, reaping sorrow 2nd edition pp., 23.

-Wilmers, C., Getz, W.M., (2005). Gray wolves as climate change buffers in Yellowstone. *Plos boil*;3:1-6.

-Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., De Vos, P., Verstraete, W., Boon, N., (2009). Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature*;458:623-626.

-Wrage, N., Velthof, G.L., van Beusichem, M.L., Oenema, O., (2001). Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil biol biochem*;33: 1723-1732.

-Wrage, N., Velthof, G.L., Laanbroek, H.J., Oenema, O., (2004). Nitrous oxide production in grassland soils: assessing the contribution of nitrifier denitrification. *Soil biol and biochem*;36:229-236.

-Yu, H., Yan, X., Shen, W., Hong, Q., Zhang J., Shen, Y., Li, S., (2009). Expression of methyl parathion hydrolase in *Pichia pastoris*. *Curr microbiol*; 59:573-8.

-Yañes-Ocampo G., E., Sanchez-Salinas, G., Jimenez-Tobon., (2009). Removal of two organophosphate pesticides by a bacterial consortium immobilized in alginate or tezontle. *J hazard mater*;168:1554-1561.

-Yong, Z., Liu, J.W., Yang, R., Chang Xiang., (2009). Environmental management changes in soil aggregate, carbon, and nitrogen storages following the conversion of cropland to alfalfa forage land in the marginal oasis of northwest China. *Environ microbiol*;43: 1061-1070.

-Zambrano, L., (2004). Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulce acuícolas de Xochimilco y Chalco. Informe final de proyecto AS004;1-26.

-Zhang, R., Jiang, J., Gu, J.D., Li, S., (2006). Long term effect of methylparathion contamination on soil microbial community diversity estimated by 16S rRNA gene cloning. *Ecotoxicology*;15:523-530.

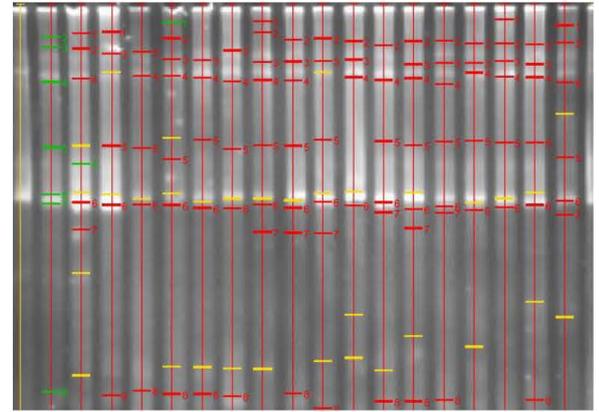
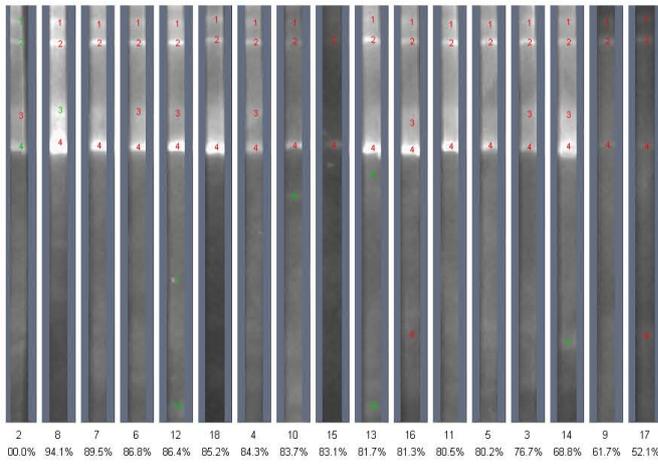
-Zhongli, C., Shunpeng, L., Guoping, F., (2001). Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gen. *Appl environ microbiol*;67:4922-5.

-Zu, Y., Wang, W.J., Wang, H.M., Liu, W., Cui, S., Koike, T. (2009). Soil CO₂ efflux, carbon dynamics, and change in thermal conditions from contrasting clear-cut sites during natural restoration and uncut larch forests in northeastern China. *Climatic change*;96:137-159.

-Zumft, W., (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol biol*; 61:533-616.

APÉNDICE

Análisis de similitud de bandas con el software Quantity One



Matriz de datos multifactorial para análisis de porcentaje de cambio y número de OTU's

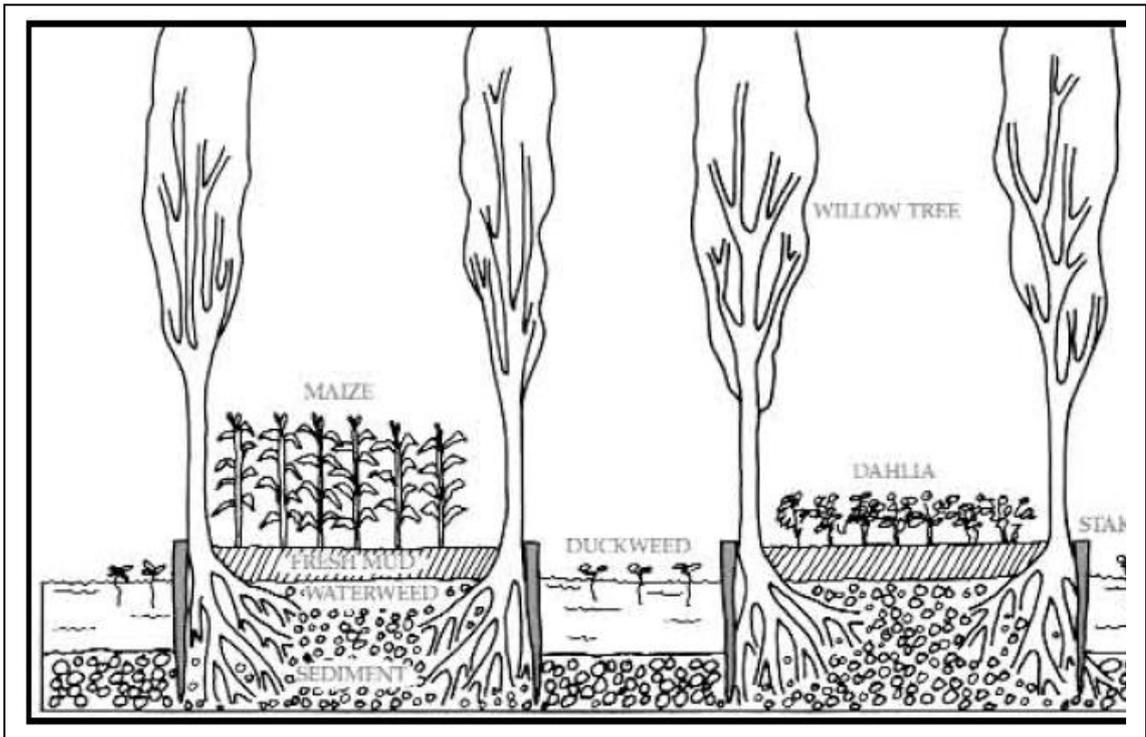
Suelo	s/plag c/plaguicida	tiempo	Réplicas	#bandas	similitud	
0	0	0	0	1	8	0
0	0	0	0	2	11	0
0	0	0	0	3	8	0
0	1	0	1	1	11	0
0	1	0	0	2	8	0
0	1	0	0	3	8	0
0	0	1	1	1	8	41.2
0	0	1	1	2	10	30
0	0	1	1	3	9	70.4
0	1	1	1	1	10	39.5
0	1	1	1	2	9	54.9
0	1	1	1	3	10	70.4
0	0	2	1	1	7	33.9
0	0	2	2	2	11	50
0	0	2	2	3	9	39.8
0	1	2	1	1	7	67.9
0	1	2	2	2	9	84.8
0	1	2	2	3	8	67.7
1	0	0	0	1	5	0
1	0	0	0	2	4	0
1	0	0	0	3	4	0
1	1	0	0	1	4	0
1	1	0	0	2	6	0
1	1	0	0	3	5	0
1	0	1	1	1	4	27.3
1	0	1	1	2	4	15.1
1	0	1	1	3	4	13.3
1	1	1	1	1	5	42.9
1	1	1	1	2	3	24.9
1	1	1	1	3	6	45.6
1	0	2	1	1	5	37.9
1	0	2	2	2	3	25.5
1	0	2	2	3	4	27.9
1	1	2	1	1	4	54.2
1	1	2	2	2	2	28.5
1	1	2	2	3	5	83.9

Tukey HSD test; variable #DE BANDAS (análisis nosz en statistica)

Approximate Probabilities for Post Hoc Tests

Error: Between MS = 1,6111, df = 24,000

Cell No.	SUELO	C/S plaguicida	TIEMPO	{1} 9,0000	{2} 9,0000	{3} 9,0000	{4} 9,0000	{5} 9,6667	{6} 8,0000	{7} 4,3333	{8} 4,0000	{9} 4,0000	{10} 5,0000	{11} 4,6667	{12} 3,6667			
1	0	0	0		1,000000	1,000000	1,000000	0,999935	0,997214	0,006551	0,003074	0,003074	0,028685	0,013825	0,001476			
2	0	0	1	1,000000		1,000000	1,000000	0,999935	0,997214	0,006551	0,003074	0,003074	0,028685	0,013825	0,001476			
3	0	0	2	1,000000	1,000000		1,000000	0,999935	0,997214	0,006551	0,003074	0,003074	0,028685	0,013825	0,001476			
4	0	1	0	1,000000	1,000000	1,000000		0,999935	0,997214	0,006551	0,003074	0,003074	0,028685	0,013825	0,001476			
5	0	1	1	0,999935	0,999935	0,999935	0,999935		0,889817	0,001476	0,000727	0,000727	0,006551	0,003074	0,000394			
6	0	1	2	0,997214	0,997214	0,997214	0,997214	0,889817		0,057857	0,028685	0,028685	0,204402	0,111935	0,013825			
7	1	0	0	0,006551	0,006551	0,006551	0,006551	0,001476	0,057857		1,000000	1,000000	0,999935	1,000000	0,999935			
8	1	0	1	0,003074	0,003074	0,003074	0,003074	0,000727	0,028685	1,000000		1,000000	0,997214	0,999935	1,000000			
9	1	0	2	0,003074	0,003074	0,003074	0,003074	0,000727	0,028685	1,000000	1,000000		0,997214	0,999935	1,000000			
10	1	1	0	0,028685	0,028685	0,028685	0,028685	0,006551	0,204402	0,999935	0,997214	0,997214		1,000000	0,973227			
11	1	1	1	0,013825	0,013825	0,013825	0,013825	0,003074	0,111935	1,000000	0,999935	0,999935	1,000000		0,997214			
12	1	1	2	0,001476	0,001476	0,001476	0,001476	0,000394	0,013825	0,999935	1,000000	1,000000	0,973227	0,997214				



Formación de las Chinampas Tomada de Chapin, 1988