



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
ECOLOGÍA

**EFFECTO DEL METIL PARATIÓN EN LA DIVERSIDAD BACTERIANA PRESENTE EN EL
SUELO DE UNA CHINAMPA DE XOCHIMILCO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Claudia Chávez López

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. Nathalie Cabirol.- Facultad de Ciencias

COMITÉ TUTOR:

Dra. Silke Cram Heydrich .- Instituto de Geografía

Dr. Francisco José Fernández Perrino.- UAM-IZTAPALAPA

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2012.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
ECOLOGÍA

**EFFECTO DEL METIL PARATIÓN EN LA DIVERSIDAD BACTERIANA PRESENTE EN EL
SUELO DE UNA CHINAMPA DE XOCHIMILCO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Claudia Chávez López

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. Nathalie Cabirol.- Facultad de Ciencias

COMITÉ TUTOR:

Dra. Silke Cram Heydrich .- Instituto de Geografía

Dr. Francisco José Fernández Perrino.- UAM-IZTAPALAPA

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2012.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de Julio de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **CHÁVEZ LÓPEZ CLAUDIA** con número de cuenta **86213387** con la tesis titulada: "Efecto del metil paratión en la diversidad bacteriana presente en el suelo de una chinampa de Xochimilco", realizada bajo la dirección de la DRA. NATHALIE CABIROL:

Presidente:	DR. JOSÉ ADELFO ESCAANTE LOZADA
Vocal:	DR. LUC DENDOOVEN
Secretario:	DRA. SILKE CRAM HEYDRCH
Suplente:	DRA. BLANCA ELENA JIMÉNEZ CISNEROS
Suplente	DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 08 de noviembre de 2012.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente de la interesada.

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, todo el apoyo que me brindaron para realizar y concluir mi Doctorado .

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT) por la beca que me dieron para realizar mi doctorado

Así como el apoyo del proyecto PAPIIT-DGAPA IN222507

A mi comité tutorial formado por la Dra. Nathalie Cabirol, Dra. Silke Cram Heydrich y el Dr. Francisco José Fernández Perrino, por su tiempo e interés para desarrollar mi trabajo de doctorado

Agradecimientos a título personal

Al Sr. Rufino Godoy por darnos sus confianza y permitimos trabajar con el suelo de su chinampa

Al Dr. Luc Deendoven por el apoyo incondicional durante la realización de mi Doctorado

A Victor Alcántara Concepción, alumno de Doctorado del posgrado en Ciencias de la Tierra de la UNAM, por su amistad y por su apoyo en el laboratorio

A Cecilia Stefania Sánchez por todo su apoyo para concluir mi trabajo de tesis

A la Dra. Rosa María Ramírez Zamora y Dra. Rosario Iturbe Argüelles por su apoyo en circunstancias muy difíciles

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 Marco teórico.....	14
1.1.1 Reseña histórica.....	14
1.1.2 Plaguicidas	16
1.1.3 Generalidades en ecología microbiana del suelo	21
Antecedentes.....	24
Justificación.....	27
2. OBJETIVOS	28
Objetivo general:.....	28
Objetivos particulares:	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 CINÉTICA DE REMOCIÓN DE METIL PARATIÓN	29
3.1.1 Sitio de muestreo	29
3.1.2 Muestreo del suelo	29
3.1.3 Diseño de experimentos.....	30
3.1.4 Químicos empleados.....	32
3.1.5 Análisis de suelo.....	32
3.1.6 Determinación del metil paratión y 4-nitrofenol	33
3.1.7 Análisis estadístico.....	34
3.1.8 Constante de la velocidad de reacción (k) y la vida media (t 1/2)	35
3.1.9 Análisis moleculares	35
3.1.10 Análisis de los datos moleculares	36
4.2 PERFILES DE SUELO	47
4.1.2 Análisis de las bandas de los geles de DGGE	47
4.2 PERFILES DE SUELO	54
4.2.1 Parámetros fisicoquímicos	54
4.2.2 Análisis molecular	56
Índice de riqueza	59
Análisis de las secuencias	61
5. DISCUSIÓN	63

5.1 CINÉTICA DE REMOCIÓN DEL METIL PARATIÓN.....	63
5.1.1 Parámetros fisicoquímicos.....	63
5.1.2 Análisis de las bandas de los geles de DGGE.....	65
5.2 PERFILES DE SUELO.....	68
5.2.1 Parámetros fisicoquímicos.....	68
5.2.2 Análisis molecular.....	70
6. CONCLUSIONES.....	73
RECOMENDACIONES.....	74
7. BIBLIOGRAFÍA.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Transporte y transformación de plaguicidas en el ambiente (adaptada de Alberta, 2012) 17

Figura 1.2 Biodegradación del metil paratión. (Singh et al., 2006) 20

Figura 3.1. Ubicación de la chinampa 31

Figura 3.2 Chinampa. Se muestran los sitios y los perfiles 41

Figura 4.10 Componentes principales.. 56

Figura 4.11 Dispositivos principales. 57

Figura 4.12 Geles del gen ADNr 16S (DGGE). Perfil 1 y perfil 2, con sus tres profundidades..... 58

Figura 4.13 Geles del gen ADNr 16S (DGGE). Perfil 3 y perfil 4, con sus tres profundidades..... 59

Figura 4.14 Geles del gen ADNr 16S (DGGE). Perfil 5 y perfil 6 con sus tres profundidades..... 60

Figura 4.16 Análisis de correspondencia de los Índices de riqueza de los perfiles y sus profundidades. a 0-15, 15-47 y 47-98 cm de profundidad..... 61

Figura 4.17 Dendrograma de los fragmentos del gen ADNr 16S. Comparación de secuencias de DGGE y secuencias tomadas del *GenBank*.. 63

Figura 4.3 DGGE del gen ADNr 16S..... 48

Figura 4.4. Dendrograma de los fragmentos del gen ADNr 16S. Comparación de secuencias de DGGE y secuencias tomadas del *GenBank* 49

Figura 4.5. Comportamiento de las 3 secuencias experimentales 21-1070, 25-1070 y 54-1070 en los tratamientos sin y con plaguicida 50

Figura 4.6 Geles del gen ADNr 16S (DGGE) para el Sitio 1. 52

Figura 4.7 Geles del gen ADNr 16S (DGGE) para el Sitio2..... 53

Figura 4.8 Geles del gen ADNr 16S (DGGE) para el Sitio3..... 54

Figura 4.9 Dinámica de las comunidades de bacterias en el suelo..... 54

Figura. 4.1. Concentración del metil paratión en el suelo de la chinampa..... 44

LISTA DE CUADROS

Tabla 1.1 Movimiento y transformación de los plaguicidas en el ambiente (Pierczynski et al., 2000)	19
Tabla 1.2 Bacterias que tienen el gen de función <i>mpd</i>	22
Tabla 3.1. Oligonucleotidos utilizados	37
Tabla 3.2 Programa para PCR	37
Tabla 3.3 Parámetros determinados en los perfiles	41
Tabla 4.1 Algunas características del suelo de los tres sitios muestreados de la chinampa, 0-15 cm de profundidad	43
Tabla 4.2. pH y CE(dS m ⁻¹) en el suelo de la chinampa con o sin metil paratión incubado a 19 ± 2 °C por 25 días.	46
Tabla 4.3 Velocidad de producción del CO ₂ (mg C kg ⁻¹ d ⁻¹), medias de NO ₂ ⁻ (mg N kg ⁻¹) y NO ₃ ⁻ (mg N kg ⁻¹) del suelo de la chinampa con y sin metil paratión, incubado a 19 ± 2 °C por 25 días.....	47
Tabla 4.4 Secuencias experimentales y su alineamiento con secuencias de bacterias	49
Tabla 4.6 Promedios de los índices de riqueza para los perfiles en las tres profundidades	60

RESUMEN

El plaguicida metil paratión es un compuesto organofosforado que se usa para controlar plagas de insectos en los cultivos de las chinampas de Xochimilco. Cuando los agricultores aplican el plaguicida a las plantas, éste también llega al suelo. Debido a que es un compuesto altamente tóxico, es importante saber cómo se comporta en el suelo. En este trabajo se estudió la remoción de dicho compuesto, en el suelo de una chinampa de Xochimilco, así como su efecto en la emisión de CO₂, mineralización del nitrógeno, en la comunidad bacteriana del suelo y en la producción del 4-nitrofenol, el cual es un producto de degradación del plaguicida. Se realizó un diseño de experimentos factorial completo al azar en condiciones aerobias, en donde las unidades experimentales fueron los microcosmos. Los tratamientos consistieron en suelo esterilizado o no esterilizado, con o sin metil paratión (280 mg kg⁻¹). La remoción del metil paratión siguió una cinética de primer orden con una vida media entre 16 y 34 días, la producción del 4-nitrofenol (35 µg kg⁻¹) se empezó a detectar después de los tres días de incubación. En el suelo esterilizado no se detectó producción de 4-nitrofenol ni remoción del metil paratión.

El tipo de bacterias que se encontraron en el suelo de la chinampa pertenecen a los grupos de α-Proteobacterias, β-Proteobacterias, γ-Proteobacterias, Bacillales y Firmicutes. Tres secuencias obtenidas del ADN de bacterias del suelo de la chinampa son similares a bacterias que pueden degradar plaguicidas organofosforados y anillos aromáticos (*Achromobacter xylosoxidans*, *Brevundimonas diminuta* y *Ochrobactrum lupini*). Lo anterior indica que las bacterias que están presentes en el suelo de la chinampa podrían degradar plaguicidas organofosforados como el metil paratión. Los valores de riqueza disminuyeron significativamente cuando había una concentración elevada del plaguicida

(280 mg kg⁻¹) y cuando la concentración del 4-nitrofenol empezó a incrementarse en el suelo. La velocidad de cambio de las comunidades de bacterias en el suelo no varió significativamente entre el suelo con y sin plaguicida, tal vez porque las bacterias tuvieron la capacidad de adaptarse rápidamente a este tipo de estrés, ya que el suelo ha estado en contacto con plaguicidas desde hace 20 años. Por último, se encontraron diferencias entre las características fisicoquímicas del suelo y el tipo de bacterias presentes a diferentes profundidades, 0-15, 15-47 y 47-98cm.

ABSTRACT

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

α-Proteobacteria, β-Proteobacteria, γ-Proteobacteria, Bacillales y Firmicutes was founded in chinampa soil. Three experimental DNA sequences were similar to bacterial degradation of pesticides (*Achromobacter xylosoxidans*, *Brevundimonas diminuta* y

Ochrobactrum lupini). May be, these results indicated that soil bacteria can to degrade methyl parathion. When methyl parathion was high (280 mg kg^{-1}) and 4-nitrophenol beginning increase, the richness value decreased significantly. In the rate of change of treatments with and without pesticide, there were not a significant difference. Owing to the fact that soil bacteria were adapted to pesticide, because soil was in contact with pesticide from 20 years ago. There are physicochemical and bacterial differences in soil between 0-15, 15-47 y 47-98cm depth.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Marco teórico

1.1.1 Reseña histórica

Xochimilco se localiza al sureste de la cuenca de México, en la zona que corresponde al lago de Xochimilco. Su origen data desde el Preclásico Mesoamericano (aproximadamente 200 d.C.), lo habitaban los xochimilcas, quienes fueron sometidos por los mexicas en el postclásico (900 a 1521 d.C.) (Pérez Taylor y Ramírez, 1997). Los habitantes de la cuenca de México, como los xochimilcas, construyeron lotes rectangulares de suelo adentro de la zona lacustre. Estos lotes están hechos de una base de carrizo que contienen sedimentos del lago y están rodeados de árboles llamados ahuehuetes (*Taxodium mucronatum*; del náhuatl āhuēhuētl, árbol viejo de agua) (Hugh et al., 1993). A esos lotes los llamaron chinampas (del náhuatl chinamitl, cerca de cañas), éstas les servían para cultivar y construir sus hogares (Montemayor, 2007). Desde Tenochtitlán, pasando por la época de la colonia hasta principios del siglo XIX, Xochimilco fue uno de los proveedores de alimentos para los habitantes de la Ciudad de México (más del 20% de los alimentos consumidos en Tenochtitlán provenía de Xochimilco) (Stephan-Otto, 2005).

En este siglo XXI, aún existe una zona agrícola de chinampas en las delegaciones de Xochimilco y Tlahuac, aunque provee menos del 1% de los alimentos de la ciudad de México. Dependiendo del poblado, es el tipo de siembra que realizan. San Gregorio Atlapulco siembra hortalizas, pueblo de Xochimilco y San Luis Tlaxialtemalco siembran flores de ornato, estos productos son para consumo local. El suelo de las chinampas ha sido clasificado como antrosol cumúlico (Ramos-Bello et al., 2001) Es un suelo con un alto

1. INTRODUCCIÓN

contenido de materia orgánica, carbono y nitrógeno, por lo que lo hacen muy fértil, y se pueden obtener de 2 a 4 cosechas al año dependiendo del cultivo. La UNESCO, en 1987, declaró a Xochimilco Patrimonio de la Humanidad debido al tipo de siembra que usan en las chinampas, la cual se considera única en el mundo.

En la actualidad, la zona de las chinampas de Xochimilco presenta un deterioro ambiental debido a (SMADF, 2004):

- a) Expansión no controlada de la zona urbana
- b) Vertimiento de aguas negras en los canales de las chinampas
- c) Tratamiento inadecuado del agua residual
- d) Empleo de plaguicidas y fertilizantes químicos

1.1.2 Plaguicidas

La fabricación de los plaguicidas se incrementó a partir de 1930, con la síntesis química de compuestos organoclorados como el dicloro difenil tricloroetano (DDT). Sin embargo, los plaguicidas organofosforados empezaron a usarse después de la segunda guerra mundial (EPA, 2006). Los plaguicidas se usan para controlar plagas provocadas por animales, plantas y microorganismos.

Cuando a un cultivo se aplica un plaguicida, este puede migrar al suelo, sedimentos, agua superficial, agua subterránea, aire y/o biota. Su movimiento dentro del ambiente depende de: a) las características fisicoquímicas de cada plaguicida; b) del clima, y c) de las características de la matriz en donde se encuentre (suelo, agua, etc.) (NPIC, 2011). El transporte y transformación de los plaguicidas en el ambiente es complejo y se explican brevemente en la tabla 1.1. En la figura 1.1 se muestran los procesos de movimiento y degradación de plaguicidas en el ambiente.

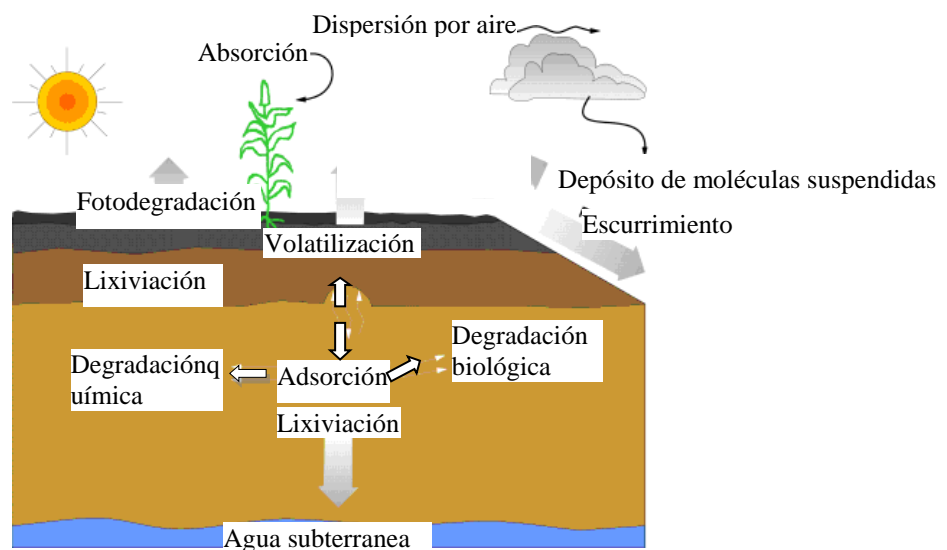


Figura 1.1 Transporte y transformación de plaguicidas en el ambiente (adaptada de Alberta, 2012)

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1 Movimiento y transformación de los plaguicidas en el ambiente (Piercynski et al., 2000)

Proceso	Consecuencia	Factores
MOVIMIENTO (proceso que transfiere al plaguicida)		
Volatilización	Evaporación del plaguicida del suelo, plantas, ecosistemas acuáticos	Presión de vapor, temperatura, velocidad del viento
Adsorción	Adhesión de las moléculas del plaguicida en la superficie de plantas, partículas del suelo y sedimentos	Tipo de arcillas, materia orgánica
Absorción	Incorporación de los compuestos por plantas o ingestión por animales	Transporte a través de la membrana celular, tiempo de contacto
Lixiviación	Traslado del compuesto a través del suelo (verticalmente)	Textura del suelo, macroporos, contenido de arcilla y materia orgánica, intensidad de las lluvias, irrigación
Erosión	Movimiento del plaguicida por agua o viento	Lluvia, velocidad del viento
DEGRADACIÓN (proceso que altera la estructura química del plaguicida)		
Fotoquímica	Rompimiento de las moléculas del plaguicida por absorción de luz (ejemplo: luz UV)	Estructura química del plaguicida intensidad y duración de la luz, exposición
Química	Separación de la molécula en sus elementos	pH, humedad
Microbiológica	Transformación de los compuestos por acción de enzimas	Factores ambientales (pH, humedad, materia orgánica)

Cuando los plaguicidas son degradados por la microbiota edáfica, los elementos que forman parte de dichos compuestos orgánicos son incorporados a los ciclos biogeoquímicos. El carbono, azufre, fósforo y nitrógeno que se encuentra en la estructura química de algunos plaguicidas se incorporan al metabolismo de los microorganismos o queda disponible para las plantas (Topp, 2012).

1.1.2.1 Metil paratión

Es un plaguicida organofosforado nombrado por la IUPAC como O,O dimetil-O-p-nitrofenil fosforotioato. Este plaguicida es neurotóxico para animales como el humano, porque afecta el funcionamiento del sistema nervioso (Edwards y Tchounwou, 2005). Está clasificado como altamente tóxico (clase I) por la Agencia de Protección al Ambiente de los

Estados Unidos (U.S.EPA), y extremadamente tóxico (categoría Ia) por la Organización Mundial de la Salud (WHO) (Jaga y Dharmani, 2006). Se ha encontrado como contaminante en alimentos, suelos, sedimentos y aguas (Carvalho et al., 2002).

1.1.2.2 Biodegradación del metil paratión

En el suelo, los plaguicidas pueden ser degradados por comunidades de microorganismos. Las características químicas del suelo, como pH, materia orgánica, humedad y/o condiciones aerobias, afectan la velocidad de biodegradación de los plaguicidas, ya que tales características influyen en la actividad y crecimiento de los microorganismos (Fishel, 1997).

La degradación bioquímica del metil paratión, la cual es realizada por bacterias, puede llevarse a cabo de tres maneras: i) hidrólisis, ii) oxidación, y iii) reducción. Las dos primeras se dan en presencia de oxígeno y la tercera puede suceder a niveles altos o muy bajos de oxígeno (Singh y Walker, 2006; Yang et al. 2007).

i) Hidrólisis. La hidrólisis del metil paratión puede ser realizada por la enzima metil paratión hidrolasa (MPH) o la enzima organofósforo hidrolasa (OPH). Ellas hidrolizan el enlace fosfotriéster, dando origen a los compuestos p-nitrofenol (PNP) y dialquiltiofosfato. Después, el PNP es transformado a ácido 3-oxoadípico. Éste compuesto puede ser incorporado al ciclo de Krebs y degradado hasta CO_2 (Figura 1.2: A1, A2, A3).

ii) Oxidación. El metil paratión puede ser oxidado a paraxón, por medio de una oxigenasa. El paraxón es hidrolizado y transformado a PNP y dialquiltiofosfato; el PNP puede ser degradado por otros microorganismos hasta ser incorporado al ciclo de Krebs (Figura 1.2: B1, B2, A2 y A3).

iii) Reducción. Cuando existen niveles muy bajos de oxígeno (O_2), el grupo nitro del metil paratión puede ser reducido a un grupo amino por una nitrorreductasa, formando una

1. INTRODUCCIÓN

molécula denominada aminoparatión. El aminoparatión es hidrolizado a p-aminofenol y después a p-benzoquinona (Figura 1.2: C1, C2 y C3).

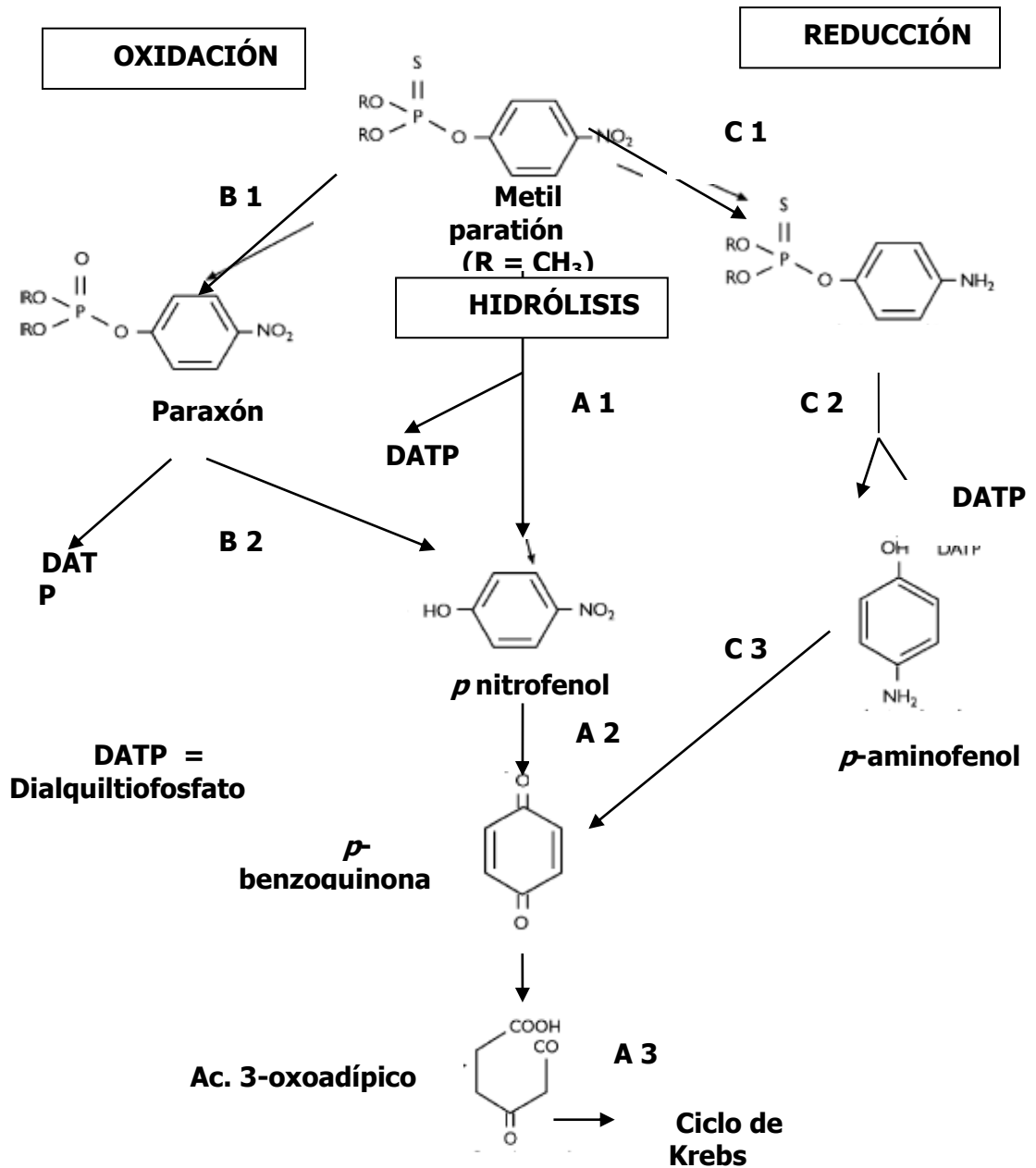


Figura 1.2 Biodegradación del metil paratión. (Singhy Walker, 2006)

Bacterias como *Serratia* sp. cepa DS001, *Bacillus* sp., *Pseudoaminobacter* sp., *Achromobacter* sp., *Brucella* sp., *Ochrobactrum* sp., *Flavobacteriumbalustinumy*

1. INTRODUCCIÓN

Pseudomonas sp. A3 han sido aisladas de suelos agrícolas donde se aplica metil paratión y capaces de degradar el plaguicida (Zhang et al., 2006; Pakala et al., 2007; Sreenivasulu y Aparna, 2011). La biodegradación de este plaguicida en medio líquido ocurre entre pH de 7.0 a 10.0 y temperaturas de 30 a 37°C (Qiu et al., 2007; Sreenivasulu y Aparna, 2011). *Pseudomonas* sp. WBC-3, *Pseudomonas putida* y *Ochrobactrum* sp. B2 utilizan el PNP como fuente de carbono y energía (Qiu et al, 2006; Singh y Walker, 2006). Las bacterias *Serratia* DS001 y *Pseudomonas* sp. A30 sp., obtienen su carbono y energía de las moléculas metil paratión y p-nitrofenol (Pakala et al., 2007). *Pseudomonas* sp. A30 usa el ditiometilfosfotioato como fuente de fósforo (Ramanathan y Lalithakumari, 1999).

En la tabla 1.2 se muestran las bacterias que contienen el gen *mpd*, el cual codifica para la enzima metil paratión hidrolasa (MPH).

Tabla 1.2 Bacterias que tienen el gen de función *mpd*

Bacteria	No. acceso del gen <i>mpd</i>	Clasificación (NCBI, 2009)
Se localiza en el cromosoma		
^{A)} <i>Pseudaminobacter salicylatoxidans</i> AF072542	AY627033	α -proteobacteria; Rhizobiales; Phyllobacteriaceae
^{A)} <i>Brucela melitensis</i> AE009656	AY627039	α -proteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae
^{A)} <i>Ochrobactrum tritici</i> AF508089	AY627035	α -proteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae
^{A)} <i>Achromobacter xylosoxidans</i> AF411020	AY627034	β -proteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae
Se localiza en plásmido		
^{B)} <i>Pseudomonas</i> sp WBC-3	AY251554	χ -proteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae
No mencionan en donde se localiza		
^{C)} <i>Plesiomonas</i> sp. M6	AF338729	χ -proteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae

	EF515812	χ -proteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae
^{D)} <i>Pseudomonas stutzeri</i> HS-D36		
^{D)} <i>Stenotrophomonas</i> sp. YC-1	DQ677027	χ -proteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae
^{D)} <i>Stenotrophomonas</i> sp. OP-1	DQ823418	χ -proteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae
^{D)} <i>Ochrobactrum</i> sp. Yw28	DQ843608	α -proteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae
^{D)} <i>Ochrobactrum</i> sp. Yw18	DQ843607	
^{D)} <i>Ochrobactrum</i> sp. Yw15	DQ843606	
^{D)} <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	DQ843605	α -proteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae;

FUENTE: ^{A)} Zhang et al., 2005. ^{B)} Liu et al., 2007. ^{C)} Cui et al., 2001. ^{D)} NCBI, 2009

1.1.3 Generalidades en ecología microbiana del suelo

La ecología agrupa a los organismos vivos en diferentes niveles de organización, entre los cuales se encuentran las comunidades. Una comunidad es el conjunto de poblaciones de diferentes especies que interactúan en un mismo espacio (hábitat) (Begon et al., 2006). En las comunidades existe una estructura y una dinámica.

1.1.3.1 Estructura de las comunidades

La estructura de una comunidad está determinada por el tipo, el número y la distribución de los individuos de cada población. Puede ser descrita por la diversidad y la riqueza, las cuales son características que muestran la composición de la comunidad. La diversidad se refiere a la variedad entre organismos vivos, entre especies y dentro de las especies en los ecosistemas (Bardgett et al., 2005) y depende de la riqueza y la abundancia. La riqueza indica el número de especies (Escalante, 2004). La diversidad de microorganismos en el suelo puede indicar el efecto de un disturbio natural o humano, como la presencia de plaguicidas (Collins y Qualset, 1999). En suelos de Canadá y Australia, expuestos a altas

1. INTRODUCCIÓN

concentraciones de metil paratión, las bacterias que han encontrado pertenecen a los géneros *Pseudaminobacter*, *Achromobacter*, *Brucella* y *Ochrobactrum*. (Zhang et al., 2005). En suelos agrícolas de Andhra Pradesh (India) en donde han usado metil paratión, el género que predomina es *Serratia* sp. cepa DS001 (Pakala et al., 2007). En un suelo de China, sin el plaguicida metil paratión, las bacterias dominantes fueron del género *Bacillus*, y del grupo de α -proteobacteria; mientras que en el suelo con dicho plaguicida, las bacterias encontradas fueron del *phylum* de las Bacteroides Flexibacteracitofaga y 2 miembros de la clase γ -Proteobacteria (Lo, 2010). En un suelo de Medellín, Colombia, en donde se disponían residuos como metil paratión, se encontraron consorcio de bacterias formado por *Acinetobacter* sp, *Pseudomonas putida*, *Bacillus* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Stenotrophomonas* sp, *Flavobacterium* sp, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp, *Klebsiella* sp y *Proteus* sp (Pino et al., 2011).

1.1.3.2 Dinámica

La dinámica de una comunidad se refiere al cambio en la estructura de la comunidad con respecto al tiempo y al espacio; es decir, algunas poblaciones son remplazadas por otras mejor adaptadas a nuevas condiciones ambientales (sucesión). Estas condiciones pueden ser contaminación por plaguicidas, cambios estacionales e introducción de microorganismos, entre otros (Bardgett et al., 2005). Cuando el plaguicida “fenpropimorf” fue aplicado a un suelo agrícola en Dinamarca, bacterias del género *Bacillus* disminuyeron a los 17 días y aumentaron después de los 56 días; sin embargo la bacteria *Pseudomonas* y algunos hongos actinomicetos no se vieron afectados durante los 56 días de exposición al plaguicida (Thirup et al., 2001). Durante la degradación del plaguicida 2,4-D amina en el suelo, se observó un cambio en las poblaciones microbianas, lo cual indicó la presencia de diferentes grupos funcionales en el tiempo de incubación (Lerch et al., 2009). En algunos

casos, durante la biodegradación en el suelo del paratión, metil paratión y *p*-nitrofenol, no se han observado cambios significativos en las poblaciones de bacterias como el grupo *Proteobacteria*, y los géneros *Actinobacteria*, *Acidobacterium* y *Planctomycetes* (Debarati et al., 2006).

Los microorganismos del suelo pueden adaptarse y reproducirse en presencia de compuestos químicos sintetizados por el humano, como son los plaguicidas. En un inicio muchos de los plaguicidas son recalcitrantes, pero después suelen ser degradados por microorganismos como las bacterias. Los genes que codifican para las enzimas que degradan los plaguicidas se encuentran frecuentemente en plásmidos. Algunos de los plásmidos son elementos móviles que pueden ser intercambiados entre bacterias. Así, la capacidad de degradar algún compuesto no es propia de una especie de bacteria, y tal función se encuentra distribuida dinámicamente en una comunidad por transferencia horizontal. Esto hace que las comunidades de bacterias se adapten rápidamente y que exista redundancia fisiológica y ecológica (Topp, 2012). La redundancia se refiere a que si existen varios organismos que pueden llevar a cabo un mismo proceso y algunos de los organismos son incapacitados o removidos, entonces el proceso no puede ser afectado (Bardgett et al., 2005).

Antecedentes

El crecimiento y desarrollo de la ciudad de México ha afectado negativamente la zona lacustre de Xochimilco y Tlahuac, debido a la extracción de agua subterránea, las descargas de aguas de plantas de tratamiento, las descargas de aguas residuales sin tratamiento, a la contaminación por plaguicidas y fertilizantes empleados por los agricultores en sus sembradíos (Crossley, 2000).

Desde 1970 se empezó a reportar la presencia de cloruro de sodio, cloruro de magnesio, bicarbonatos de sodio y magnesio y sulfato de calcio en el suelo de las chinampas (Lot et al., 1979). Otros estudios como los de Ramos-Bello y colaboradores (2001) y Pérez-Olvera y colaboradores (2008) reportan que el suelo de las chinampas tiene un pH alcalino, son ligeramente salino-sódicos, siendo los iones Na^+ y SO_4^{2-} los que predominan, así como los metales Pb, Cd, Ni, Cu, Cr y Zn. Lo anterior se debe a que el agua proveniente de las plantas de tratamiento tiene una gran cantidad de sales y metales.

Juárez Figueroa y colaboradores (2003) analizaron efluentes de agua residual que llega a los canales de las chinampas de Xochimilco: el contenido de quistes de *Giardia* y de colifagos fue de 1199.8/100 L y 1467.5/100 mL, respectivamente; apareciendo además coliformes fecales (media de 40.4/100 mL), enterococos (media de 58.8/100 mL) y quistes de *Cryptosporidium* (media de 13.2/100L).

Brócoli cultivado en el suelo de las chinampas presenta de 30.60 a 47.16, de 0.8 a 4.49, de 0.77 a 1.03 y de 0.5 a 4.51 mg kg^{-1} de Zn, Pb, Ni y Cd, respectivamente (Pérez-Olvera et al., 2008). Rosas y colaboradores (1984) encontraron altas cantidades de bacterias, en espinacas, 8700 (número de bacterias/100g) de coliformes totales y 2400 (número de

1. INTRODUCCIÓN

bacterias/100g) para coliformes fecales, y en lechuga, 37000 (número de bacterias/100g) para coliformes totales y 3600 (número de bacterias/100g) para coliformes fecales.

Desde 1990, los agricultores de Xochimilco han empleado plaguicidas organofosforados como el metil paratión, clorpirifos, malatión y diazinón, para controlar plagas (Alcantara et al., 2009). En el suelo de la chinampa que se usó para realizar este trabajo experimental, los agricultores cultivan lechuga y aplican metil paratión para controlar plagas como pulgones y gusanos verdes. La cantidad que aplican es de 2 mL L^{-1} (FOLEY 5DCE, nombre comercial). Se obtienen cuatro cultivos por año en la chinampa, lo que resulta en grandes cantidades de plaguicida aplicado en la parte superior del suelo, dos veces con un rociador antes de que la lechuga empiece a madurar y un mes antes de ser cosechada. Se aplican como fertilizantes sulfato de amonio junto con estiércol bovino y equino, y los cultivos son regados con agua potable para prevenir la contaminación con microorganismos patógenos. Debido a lo anterior, la zona lacustre de Xochimilco y Tlahuac presenta un problemática ambiental muy compleja que no debe dejarse de lado.

Como ya se mencionó anteriormente, las bacterias son microorganismos que pueden degradar plaguicidas como el metil paratión. Además, para saber cómo los plaguicidas afectan a las comunidades bacterianas del suelo existen métodos que no necesitan del cultivo de las bacterias y que se basan en el análisis de los ácidos nucleicos. Uno de los más usados es la obtención de secuencias del gen ADNr 16S. Previamente debe extraerse el ADN total de las muestras de suelo y después hacer una amplificación del gen ADNr 16S por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos amplificados se separan por electroforesis, usando la técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). A cada banda obtenida en el gel, se le denomina OTU (por las siglas en

1. INTRODUCCIÓN

ingles de “unidad taxonómica operacional”). Las bandas son cortadas y purificadas, para después ser secuenciadas(Escalante, 2004). Las técnicas mencionadas anteriormente se han empleado para analizar la diversidad de microorganismos que degradan compuestos como plaguicidas, surfactantes, hidrocarburos, entre otros (Hosoda et al., 2010).

Justificación

El plaguicida metil paratión puede ser transportado al suelo después de ser aplicado a las plantas. Debido a que es un plaguicida altamente tóxico para el ser humano es importante saber si los microorganismos del suelo tienen la capacidad de degradar dicho compuesto o si el suelo funciona como un reservorio.

No existen estudios sobre el efecto de los plaguicidas como el metil paratión en las comunidades de bacterias del suelo de las chinampas de Xochimilco, así como de la biodegradación de dicho compuesto en el suelo. Debido a que es un suelo endémico y muy fértil, es importante desarrollar estudios que permitan recalcar la importancia de cuidar este recurso no renovable.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la remoción del plaguicida metil paratión por las bacterias autóctonas, así como el efecto de dicho plaguicida sobre la diversidad bacteriana en suelo agrícola de una chinampa de Xochimilco.

Objetivos particulares:

1. Evaluar la cinética de remoción del metil paratión en suelo superficial de una chinampa de Xochimilco.
2. Evaluar la estructura de la comunidad bacteriana (ADNr 16S) en el suelo superficial para identificar diferencias en muestras con y sin plaguicida de la chinampa de Xochimilco.
3. Analizar la estructura de la comunidad bacteriana (ADNr 16S) en el suelo a diferentes profundidades de la chinampa

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CINÉTICA DE REMOCIÓN DE METIL PARATIÓN

3.1.1 Sitio de muestreo

La chinampa estudiada se ubica en el barrio de Apatitla del pueblo San Gregorio Atlapulco, Xochimilco (19° 15.9' N y 99° 4.0' W) a 2237 msnm. La temperatura promedio anual fue de 16.8°C (calculada para los años 2003-2012) y la precipitación anual de 755 mm a⁻¹ (SMN, 2011).

3.1.2 Muestreo del suelo

Una chinampa de 1350 m² (90 × 15 m) fue muestreada en mayo de 2009, (Figura 3.1). La chinampa se dividió en tres sitios de 450 m² (90 × 5 m), los cuales fueron perpendiculares al canal. Cada sitio fue dividido en tres subsitios, en cada subsitio se tomaron 20 muestras a una profundidad de 0-15 cm con un muestreador Auger de 7 cm de diámetro (Eijkelkamp, Netherlands). Las muestras de suelo de cada subsitio se mezclaron, obteniéndose en total 9 muestras de suelo. Las muestras de suelo (n = 9) se secaron a temperatura ambiente en el laboratorio, fueron pasadas en un tamiz de 2-mm y se analizaron en el laboratorio.

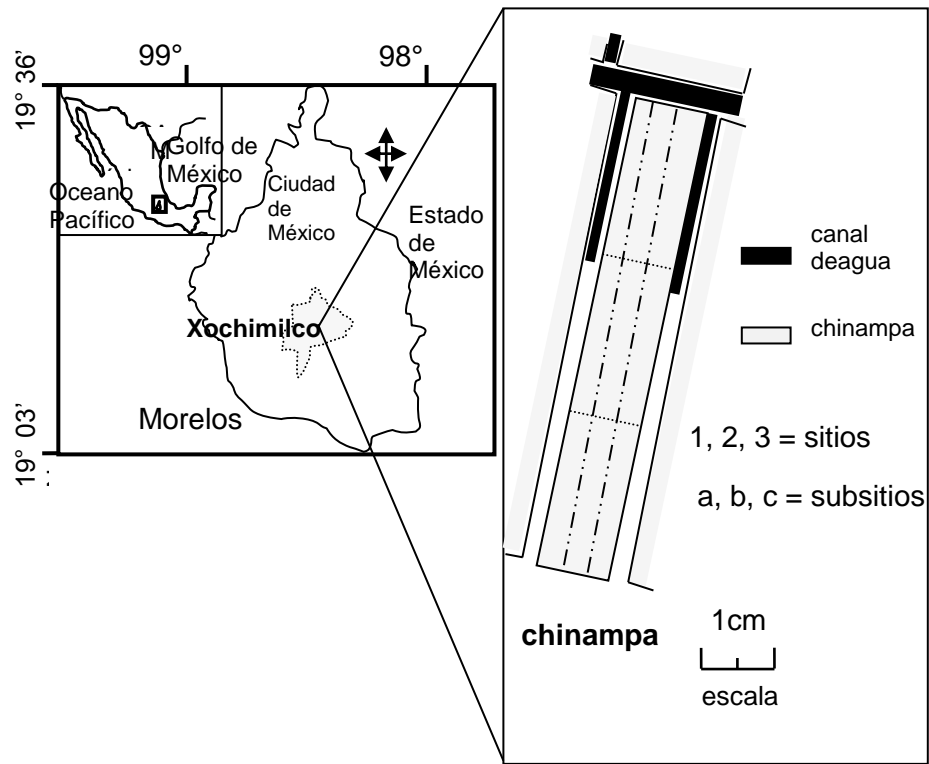


Figura3.1. Ubicación de la chinampa

3.1.3 Diseño de experimentos

Se empleó un diseño de experimentos factorial completamente al azar. El primer factor fue el número de sitios ($n = 3$) y subsitios ($n = 3$). El segundo factor fue el tiempo de incubación con 7 mediciones, por ejemplo 0, 1, 3, 10, 15, 20 y 25 días. El tercer factor fue la cantidad de plaguicida adicionada al suelo 0 ó 280 mg kg^{-1} suelo seco. El cuarto factor fue el suelo esterilizado o no esterilizado. Y se usaron tres réplicas del suelo para cada subsitio (manteniendo las réplicas que se tomaron durante el muestreo). Generalmente, en estudios de laboratorio se han aplicado bajas concentraciones de metil paratión (1 mg kg^{-1} a 100 mg kg^{-1}) (Ou et al., 1985; Bindhya et al., 2009). Sin embargo en este trabajo experimental se usó una concentración más alta.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describe como se armaron los microcosmos: 756 submuestras de 40 g de suelo fueron adicionadas a frascos de 250 mL de vidrio. La mitad de los frascos (378 frascos) fueron esterilizados en una autoclave horizontal a 121°C y 1.3 bar por 35 min (1 bar = 14.5 psi) en tres días consecutivos. A 189 frascos esterilizados y 189 no esterilizados se les adicionó metil paratión bajo condiciones estériles. Una solución al 22% de metil paratión fue preparada de la emulsión (Foley 50E), 18 mL de dicha solución se agregaron a 40 g de suelo y después se mezclaron. La concentración final del metil paratión en el suelo fue de 280 mg kg⁻¹ suelo seco. A la otra mitad de los frascos esterilizados y no esterilizados (189 frascos para cada lote) se les agregó una cantidad igual de agua destilada y se mezclaron en condiciones estériles. La cantidad de agua usada fue suficiente para mantener un contenido de agua del 40% (WHC). Tres submuestras de suelo se tomaron al azar del suelo estéril y no estéril, con o sin metil paratión, de cada sitio (n=3) y subsitio (n=3); a esas muestras se les analizó la concentración de metil paratión.

El frasco de 250 mL de vidrio con suelo se colocó adentro de un frasco de vidrio de 2 litros con tapa de rosca, que también contenía un frasco de 20 mL con una solución 0.5M de NaOH para atrapar el CO₂. Los frascos de 2 litros se taparon y cubrieron con papel aluminio. La incubación se realizó a 19°C ± 2.0 por 25 días. También se pusieron 18 frascos de vidrio de 2 litros, conteniendo un frasco de vidrio de 20 mL 0.5 M de NaOH como trampa de CO₂. Durante los 0, 1, 3, 10, 15, 20 y 25 días de incubación, tres frascos fueron seleccionados al azar para cada sitio y subsitio, lo cual representó un total de 108 frascos sacrificados para cada muestreo. Los frascos de 20 mL con 0.5 M de NaOH fueron removidos y titulados con ácido clorhídrico (HCl) 1M para analizar la cantidad de CO₂ producido. Las características estudiadas del suelo (de los frascos de 250 mL) fueron: pH, conductividad eléctrica (CE),

metil paratión, 4-nitrofenol, NO_2^- y NO_3^- . Cada microcosmos se abría durante 15 min cada tercer día para mantener las condiciones aerobias.

3.1.4 Químicos empleados

Se usó una solución de trifetil fosfato grado analítico 48064 SUPELCO (estándar interno), Tributíl fosfato 44094-U SUPELCO (estándar interno), metil paratión PESTANAL® 36187 FLUKA (estándar analítico) y 4-nitrofenol PESTANAL® 335836 FLUKA (estándar analítico) fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH México. La solución de plaguicida, el metil paratión, Foley 50E Dragon fue comprado a ‘Agricultura Nacional S. A. de C.V, México’.

3.1.5 Análisis de suelo

El análisis de cada muestra de suelo, obtenida en campo, se realizó por triplicado. Se emplearon blancos en los análisis de laboratorio, a excepción del pH y la conductividad eléctrica. Los blancos estaban compuestos de los reactivos que se usaron para cada análisis químico, y sin suelo. Los estándares que se emplearon para calibrar los equipos o hacer las curvas estándar fueron grado analítico.

El pH fue medido en 1:2.5 suelo/ H_2O (w/w) usando un medidor de pH 716 DMS Titrimo (Metrohm Ltd. CH.-901, Herisau, Suiza) con un electrodo de vidrio. La conductividad eléctrica (CE) fue determinada en una solución de acuerdo a Rhoades y colaboradores (1989). El nitrógeno total fue analizado por el método de Kjeldhal usando ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), sulfato de potasio (K_2SO_4) y sulfato de cobre (CuSO_4) para digerir la muestra (Bremner, 1996). La distribución de las partículas del suelo fue determinada por el método del hidrómetro, según Gee y Bauder (1986). Diez gramos de suelo se usaron para extraer el nitrógeno inorgánico con 100 mL de 0.5 M K_2SO_4 , agitado durante 30 min y filtrado con papel Whatman No. 42; el NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+ fueron determinados colorimétricamente en un analizador automático (San Plus System- SKALAR automatic analyzer Segmented Flow

3. MATERIALES Y MÉTODOS

autoanalyzer, Holanda). El contenido de agua fue medida por diferencias de peso en muestras de suelo saturados con agua y después secadas en una estufa. El carbono total fue determinado en un analizador de Shimadzu (Nelson y Sommers, 1996). El fósforo total se determinó por digestión de 500 mg de suelo con ácido clorhídrico concentrado (HCl) y ácido nítrico (HNO₃) a 125°C, y medido a 880 nm con un espectrofotómetro Spectrumlab 752S (Kuo, 1996). El fósforo extraíble se determinó en 10 g de suelo con NaHCO₃ 0.5 N. El extracto fue analizado a 880 nm con el espectrofotómetro citado anteriormente (Kuo, 1996). El K⁺ y Na⁺ fueron cuantificados en un flavómetro (Flame Photometer Jenway PFP7), el Ca²⁺ y Mg²⁺ con un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer Analyst 800) (Sumner y Miller, 1996). Las cantidades de HCO₃⁻, CO₃²⁻, Cl⁻ y SO₄²⁻ fueron determinadas de acuerdo a Zelazny y colaboradores (1996).

3.1.6 Determinación del metil paratión y 4-nitrofenol

La extracción del metil paratión se basó en una técnica modificada descrita por Zhang y colaboradores (2005). Una muestra de 5 g de suelo fueron mezclados con Na₂SO₄ anhidro para absorber el agua del suelo en un vaso de extracción de Teflón. Un volumen de 30 mL de acetato de etilo se adicionaron al vaso de extracción, y 30 µl (1000 ng mL⁻¹) de tributil fosfato fueron adicionados como estándar interno. El vaso de extracción se colocó en un sistema de reacción de microondas a: 950 W, 1207 kPa y 110°C durante 20 min. Después del enfriamiento, la mezcla se filtró en papel Whatman® 43, 20 µl de trifenil fosfato (1000 ng mL⁻¹) fueron adicionados como estándar interno. Para cada 10 muestras de suelo se preparò un blanco, el cual contenìa los reactivos para la extracción del plaguicida. El metil paratión fue analizado en un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Gas Chromatography Systems* acoplado a un detector de Fósforo/Nitrógeno y a un inyector *Agilent Technologies split/splitless InjCEtor 7683B*. Se usó una columna capilar ultra inerte HP-5MS de 30 m ×

3. MATERIALES Y MÉTODOS

0.25 mm × 0.25 mm con una capa interna de 5%-fenil-metilpolisiloxano. El volumen inyectado fue de 2 µL, con un tiempo de análisis de 35.42 min. La temperatura del inyector fue de 250°C, la del detector de 300°C y la del horno de 320°C. Los gases acarreadores fueron N₂, aire y He, los cuales tuvieron un flujo de 3, 60 y 1 mL min⁻¹, respectivamente. La eficiencia de extracción del metil paratión fue de 92%.

La extracción del 4-nitrofenol se basó en una técnica modificada por Lopez-Avila y colaboradores (1994). Se tomaron 5 g de suelo, los cuales se mezclaron con 20 mL 2% NaOH para ser centrifugados a 5000 rpm por 20 min. El sobrenadante se mezcló con 30 mL de acetato de etilo en un vaso de extracción de Teflón. Los vasos de extracción se colocaron en un sistema de reacción de microondas CEM-MARS a 950 W, 1207 kPa y 110°C por 20 min. Después de dejar enfriar a los vasos, el extracto se filtró en papel. Para cada 10 muestras de suelo se preparò un blanco, el cual contenía los reactivos para la extracción del 4-nitrofenol. Whatman® 43. Se usó un rotavapor para concentrar el analito y se resuspendió con etanol. Una alícuota de 4 µL del extracto fue analizada a 315 nm en un cromatógrafo Varian HPLC acoplado a un detector UV-VIS 9050 y con una columna Waters Spherisorb C8 de 250 mm × 4.6 mm × 10 µm. La fase móvil que se usó fue 0.1% de ácido trifluoroacético/acetonitrilo (80:20) a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. La eficiencia de extracción del 4-nitrofenol fue de 90%.

3.1.7 Análisis estadístico

La emisión de CO₂ fue analizada usando un modelo de regresión lineal. Las diferencias significativas para la producción de CO₂ fueron determinadas usando el modelo PROC MIXED (SAS, 1989).

Los datos de pH, CE y concentraciones de NO₂⁻, NO₃⁻, metil paratión y 4-nitrofenol fueron analizados por un ANOVA con el programa PROC GLM (SAS, 1987). Con el fin de

3. MATERIALES Y MÉTODOS

determinar diferencias significativas entre tratamientos, se usó la prueba de Tukey's Studentized Range test. Todos los datos se presentaron por triplicado para los tres subsitios (n=9).

3.1.8 Constante de la velocidad de reacción (k) y la vida media (t 1/2)

El logaritmo neperiano de la concentración de metil paratión *versus* tiempo de incubación se usó para determinar el orden de la cinética. El tiempo de vida media, t 1/2, para el metil paratión se calculó usando la ecuación:

$$t_{1/2} = \ln 2/k$$

dónde: k es la constante de la velocidad de reacción y Ln representa el logaritmo neperiano.

3.1.9 Análisis moleculares

Se tomaron 2 g de suelo de cada microcosmos, de los cuales se usaron 0.3 g de suelo por triplicado para hacer las extracciones de ADN con el kit de extracción *Ultra Clean Soil DNA isolation kit*® (MoBio, ICESA, México). El ADN se amplificó con oligonucleótidos específicos del gen ADNr 16S, empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un termociclador *Mastercycler*® *Eppendorf* (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Oligonucleótidos utilizados

Primer	Posición	Secuencia (5'-3')
ADNr 16S-F^a	1070-1085	ATGGCTGTCGTCGTCAGCT
ADNr 16S-R^a	1392-1378	ACGGGCGGTGTGTAC
ADNr16S-R	1392-1378	ACGGGCGGTGTGTACGCCCGCCGCCCCGCGCCC
GC^b		GCCCCCGCCCCGCCC

^a La posición de los oligonucleótidos en el gen ADNr 16S se expresa con referencia a la secuencia de *Escherichia coli* (X80725 del GenBank).

^b Oligonucleótidos con grapa. Fuente: Burr et al., 2006

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El programa utilizado para amplificar al gen 16S rDNA se muestra en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Programa para PCR

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	5 min	1
94	40 s	30
54	40 s	
72	30 s	
72	5 min	1

Los productos del PCR, obtenidas por triplicado para cada microcosmos se usaron como molde para hacer amplificaciones anidadas con el oligonucleótido 1392R-GC, el cual tenía una “grapa” que permite que la doble cadena de ADN se quede unida al gel durante el DGGE. En los geles de acrilamida del DGGE se colocaron los triplicados de las amplificaciones mencionadas anteriormente.

En los análisis de DGGE se usaron geles de acrilamida:bis-acrilamida (37.5:1) al 6%, con un gradiente de 54% a 64%, durante 18 horas a 65V. Los geles se incubaron durante 1 hora en un baño de SYBR Gold®, en una concentración de 1:1000 v/v. Las imágenes de los geles se analizaron en el programa *Quantity One*, versión 4. 6, Bio-Rad. Posteriormente se cortaron las bandas de interés, se colocaron en 20 µl de agua grado molecular durante 24 horas a 4°C y se realizaron amplificaciones con oligonucleótidos del gen ADNr16S. Los productos de dichas amplificaciones se purificaron usando el kit Wizard® SV Gel y el PCR *Clean-Up System*. Estas muestras se secuenciaron por el método BIG DYE Terminator, en el secuenciador *ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer) (Laboratorio divisional de Biología molecular, UAM Iztapalapa).

3.1.10 Análisis de los datos moleculares

Secuencias

Las secuencias obtenidas en el experimento se examinaron en el programa Bellerophon (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-bel3_interface.cgi) para descartar posibles quimeras. Como no se encontraron quimeras, las secuencias se compararon con las secuencias ambientales y de bacterias de la base de datos del GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), usando el programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*), con la opción de alta similitud. Se eligieron las secuencias que en los análisis BLAST mostraron una identidad máxima del 97%. Los dendrogramas se hicieron con las secuencias experimentales y las del GenBank en el programa Phylip 3.69 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Se empleó el método Jukes-Cantor para calcular las distancias (1000 réplicas). Para hacer el fenograma se usó el método *Neighbor-joining* con 1000 réplicas y un número al azar de 999. El árbol filogenético se visualizó en el programa SplitsTree4 versión 4.12.3 (www.splitstree.org/).

De las secuencias obtenidas en el trabajo experimental se seleccionaron 3, las cuales mostraron una identidad máxima del 97% con secuencias del GenBank. A estas secuencias (OTU's) se les calculó su frecuencia relativa, a partir de su presencia o ausencia, en los tratamientos con y sin plaguicida. Para calcular la frecuencia relativa (f_i) se usó la siguiente ecuación:

Donde

: es la frecuencia absoluta

: es el tamaño de la muestra

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Las frecuencias relativas se analizaron con el estadístico multivariable: escalamiento multidimensional no métrico, empleando el coeficiente de similitud de Bray-Curtis. Para ello se usó el programa PAST versión 2.15 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

Índice de riqueza

Las fotografías de los geles del DGGE se examinaron en el programa *Quantity One*, para seleccionar y contar las bandas de cada carril. Con esos datos se calculó el rango ponderado de riqueza (*Range-weighted richness*, Rr) para cada carril, usando la siguiente fórmula de acuerdo a Marzorati y colaboradores (2008):

Donde N : número total de bandas en el carril

: gradiente de desnaturalización entre la primera y última banda de cada carril

Los datos obtenidos del rango ponderado de riqueza fueron de los tratamientos con y sin plaguicida, a dichos datos se les aplicó la prueba estadística ANOVA y correlación de variables en el programa JMP® 7 (SAS Institute Inc.).

Dinámica

Las imágenes digitalizadas de los geles del DGGE se analizaron en el programa *Quantity One* para comparar la semejanza de las bandas obtenidas en cada carril. El programa generó matrices de similitud, usando el coeficiente de Dice. De esta manera, se obtuvieron los porcentajes de similitud entre cada carril. Los porcentajes de similitud se usaron para calcular los porcentajes de cambio para cada carril, según Marzorati y colaboradores (2008):

Posteriormente, se construyó una gráfica de tiempo vs % de cambio, en donde la media (promedio) del % de cambio calculada para el tratamiento con plaguicida y la calculada para

el tratamiento sin plaguicida representan la velocidad de cambio (Δt) de las comunidades de bacterias.

3.2 PERFILES DE SUELO

3.2.1 Muestreo del suelo

La chinampa se dividió en los sitios 1, 2 y 3. Y cada sitio se dividió en 2 subsitios. En cada subsitio se realizó un perfil. Los perfiles se muestran con letras mayúsculas (Figura 3.2). En cada perfil se tomaron muestras a las siguientes profundidades: 0-15cm (capa arable), 12-47cm y 47-98cm. De cada profundidad se tomaron 3 muestras inalteradas de suelo con tubos de aluminio de 3cm de \emptyset y 15cm de altura, para determinar la densidad aparente del suelo. Posteriormente en cada profundidad, se tomaron 3 muestras de suelo con un nucleador de acero inoxidable de $2\frac{3}{4}$ \emptyset (Mud Auger). Las muestras se pusieron en bolsas de plástico por separado. Las muestras de suelo ($n = 54$) fueron pasadas en un tamiz de 2-mm para caracterizar el suelo. Los parámetros fisicoquímicos que se analizaron se enlistan en la Tabla 3.3

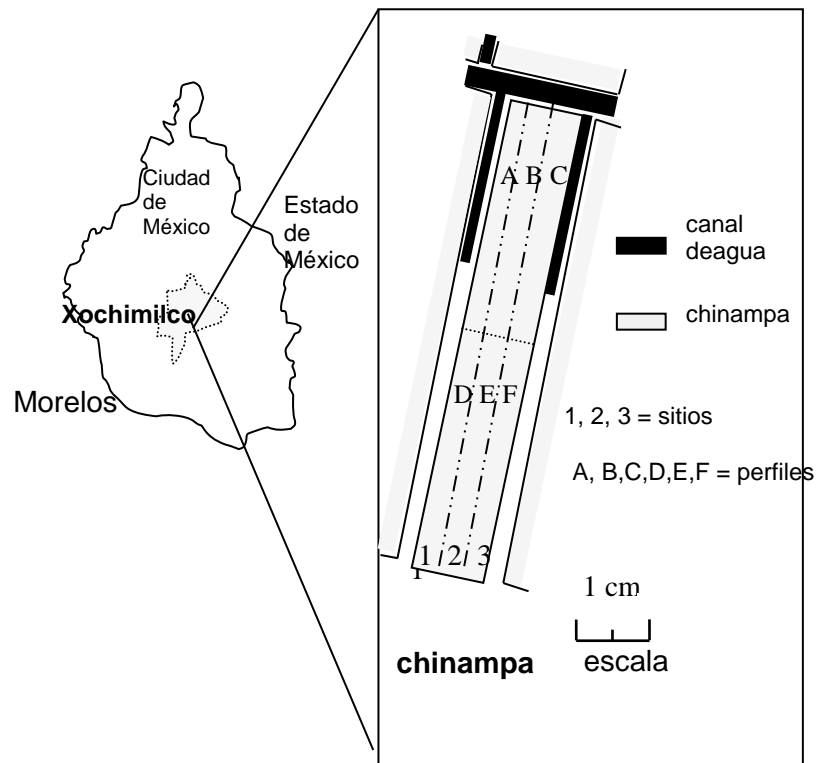


Figura 3.2 Chinampa. Se muestran los sitios y los perfiles .

Tabla 3.3 Parámetros determinados en los perfiles

Parámetros	
Físicos	Densidad aparente Densidad real Arcilla, arena y limo Porosidad
Químicos	pH y conductividad eléctrica (CE) Carbono orgánico total Nitrógeno total, N- NH_4^+ , N- NO_3^- y N- NO_2^- Fósforo total y fósforo disponible Metilparatión y 4-nitrofenol K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , HCO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- y SO_4^{2-}

La densidad aparente se analizó con el método del cilindro (Blake et al, 1986). La densidad real por el método del picnómetro (ASTM, 1990). La cantidad de arcilla, arena y limo por densidad y la porosidad por diferencia de pesos (Bigam et al, 1996). El pH, conductividad eléctrica (CE), carbono orgánico total, nitrógeno total, N- NH_4^+ , N- NO_3^- y N- NO_2^- , fósforo total, fósforo disponible,

3. MATERIALES Y MÉTODOS

metilparati6n, 4-nitrofenol, K^+ , Na^+ , Ca_2^+ , Mg_2^+ , HCO_3 , CO_3^{2-} , Cl^- y SO_4^{2-} se determinaron usando los m6todos que se describieron en el subt6tulo 3.5.

Los resultados obtenidos de las caracter6sticas fisicoqu6micas del suelo fueron analizadas estad6sticamente con la t6cnica ANOVA (SAS, 1989). Para determinar diferencias significativas entre los perfiles y profundidades se us6 la prueba de Tukey's Studentized Range test. Las variables que fueron significativamente diferentes se analizaron con la t6cnica multivariada de Componentes Principales, para encontrar los componentes o factores que describieran al suelo en sus caracter6sticas fisicoqu6micas (SAS, 1987).

3.2.2 An6lisis moleculares

De cada muestra de suelo se realizaron an6lisis moleculares, para observar el tipo de bacterias presentes en cada profundidad de los perfiles y calcular los 6ndices de riqueza. La metodolog6a que se sigui6 ya fue descrita en los subt6tulos 3.1.9 y 3.1.10.

Los 6ndices de riqueza calculados se analizaron estad6sticamente con la t6cnica ANOVA (SAS, 1987). Se us6 la prueba de Tukey's Studentized Range test para encontrar las diferencias significativas. Finalmente, se aplic6 el an6lisis multivariado de An6lisis de correspondencia para determinar posibles asociaciones de los 6ndices de riqueza entre los perfiles y las profundidades del suelo, usando el programa PAST versi6n 2.15 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

RESULTADOS

4.1 CINÉTICA DE REMOCIÓN DE METIL PARATIÓN

4.1.1 Parámetros fisicoquímicos

En la tabla 4.1 se muestran algunas características del suelo de la chinampa.

Tabla 4.1 Algunas características del suelo de los tres sitios muestreados de la chinampa, 0-15 cm de profundidad

Características del suelo	Sitio		
	1	2	3
Arena (g kg ⁻¹)	610 ^a (60) ^b	560 (10)	600 (30)
Arcilla (g kg ⁻¹)	30 (1.0)	40 (1.0)	50 (1.0)
Limo (g kg ⁻¹)	360 (60)	400 (20)	350 (30)
Densidad aparente (g cm ³)	0.42 (0.01)	0.46 (0.02)	0.48 (0.02)
pH	8.4 (0.1)	7.7 (0.1)	8.03 (0.1)
Conductividad eléctrica (dS m ⁻¹)	1.3 (0.2)	0.2 (0.01)	0.3 (0.01)
Carbón orgánico (g kg ⁻¹)	86.4 (8.9)	86.6 (7.9)	92.8 (2.1)
Nitrógeno total (g kg ⁻¹)	5.8 (0.5)	6.0 (0.7)	5.8 (0.4)
Metil paratión (µg kg ⁻¹)	290 (40)	260 (35)	307 (39)
4-Nitrophenol (µg kg ⁻¹)	2 (0.1)	3 (0.4)	2 (0.2)

Los valores son promedios de los tres subsitios, ^b Valores entre paréntesis son las desviaciones estándar de los promedios (P<0.05), (n =3).

En el suelo esterilizado la concentración de metil paratión mostró una pequeña variación pero no significativamente diferente en el tiempo (Figura 4.1). El decremento de la concentración del metil paratión en el suelo no esterilizado se ajusta a una cinética de primer orden, y fue significativamente diferente para los sitios 1, 2 y 3 (P < 0.05). A los 25 días, 66% del metil paratión fue removido del sitio 1, y 42% y 39% en los sitios 2 y 3,

4. RESULTADOS

respectivamente. El tiempo de vida media fue de 16 a 34 días (Tabla 4.2). La concentración de 4-nitrofenol empezó a incrementar a partir de los 15 días, Figura. 4.2.

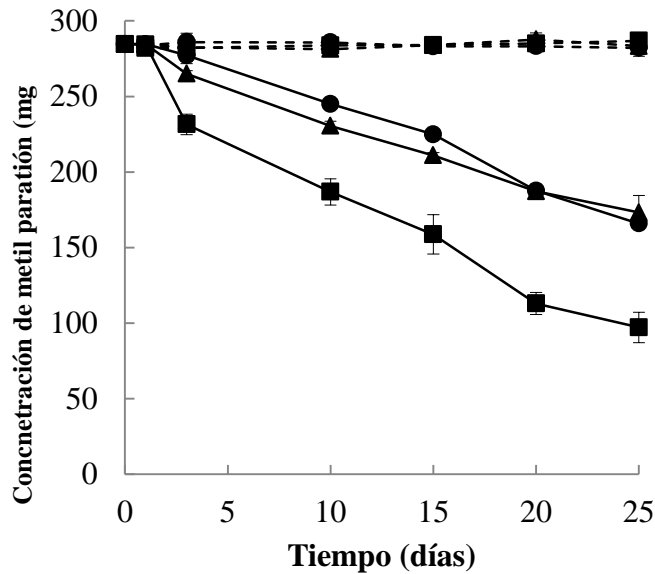


Figura. 4.1. Concentración del metil paratión en el suelo de la chinampa. (sitio 1 (■), sitio 2 (▲) y sitio 3 (●)) incubado a $19 \pm 2^\circ\text{C}$ por 25 días. Las líneas sólidas pertenecen al suelo no esterilizado y las líneas punteadas al suelo esterilizado. Las barras verticales son las desviaciones estándar

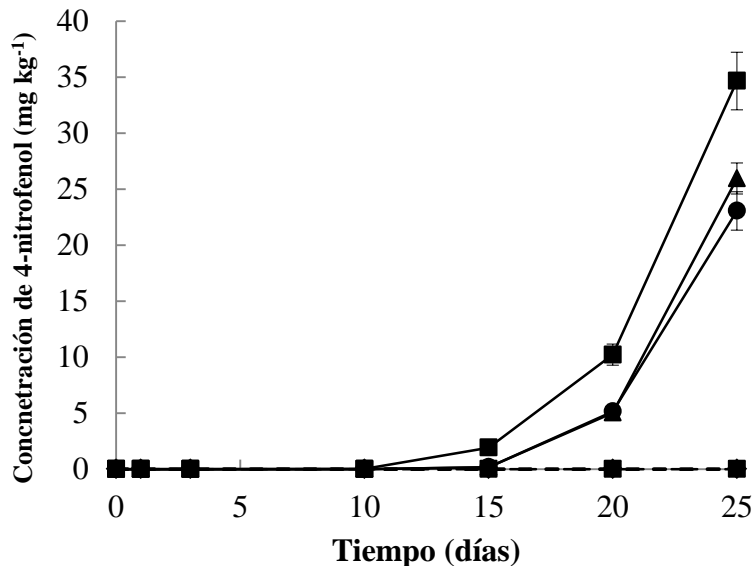


Figura 4.2. Concentración del 4-nitrofenol en el suelo de la chinampa (sitio 1 (■), sitio 2 (▲) y sitio 3 (●)) incubado a $19 \pm 2^\circ\text{C}$ por 25 días. Las líneas sólidas corresponden al

suelo no esterilizado y las líneas punteadas al suelo esterilizado. Las barras corresponden a la desviación estándar

En cada sitio el pH disminuyó, mientras la conductividad eléctrica (CE) se incrementó significativamente cuando el suelo estaba con metil paratión, comparado con el suelo sin plaguicida ($P < 0.0001$), Tabla 4.2. La emisión de CO_2 fue significativamente mayor para el sitio 1 que para los sitios 2 y 3, Tabla 4.3. El metil paratión incrementó la emisión de CO_2 en cada sitio ($P < 0.0001$) y las concentraciones de NH_4^+ no se vieron afectadas (los datos no se muestran). La media de la concentración de NO_2^- fue significativamente mayor en el sitio 2 que en el 1 y 3 ($P < 0.05$). La media de la concentración de NO_3^- fue significativamente mayor para el sitio 1 que para los sitios 2 y 3 ($P < 0.05$). El metil paratión incrementó la concentración de NO_3^- con 12 mg N kg^{-1} , medias de los sitios 1, 2 y 3.

Tabla 4.2. Promedios de pH y CE (dS m⁻¹) en el suelo de la chinampa con o sin metil paratión incubado a 19 ± 2°C por 25 días.

Suelo	pH				CE ^a (dS m ⁻¹)			
	- metil paratión	+ metil paratión	MSD ^b	valor de P	- metil paratión	+ metil paratión	MSD	valor de P
Sitio1	8.4 A ^c a ^d	8.2 B a	0.1	< 0.0001	1.3 B a	1.4 A a	0.04	<0.0001
Sitio2	7.7 A c	7.4 B b	0.1	< 0.0001	0.2 B c	0.3 A c	0.03	<0.0001
Sitio3	8.0 A b	7.5 B b	0.1	< 0.0001	0.4 B b	0.5 A b	0.03	<0.0001
MSD	0.1	0.1			0.03	0.05		
P value	< 0.0001	< 0.0001			< 0.0001	< 0.0001		

^aEC: Conductividad eléctrica, ^bMSD: Mínima diferencia significativa (P < 0.05), ^c Valores con misma letra mayúscula en el renglón no son significativamente diferentes entre tratamientos, ^d Valores con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes entre sitios

4. RESULTADOS

Tabla 4.3 Velocidad de producción del CO₂ (mg C kg⁻¹ d⁻¹), medias de NO₂⁻ (mg N kg⁻¹) y NO₃⁻ (mg N kg⁻¹) del suelo de la chinampa con y sin metil paratión, incubado a 19 ± 2°C por 25 días

Sitio	- metil paratión	+ metil paratión	SEE	valor de P
			a	
Velocidad de producción de CO ₂ (mg C kg ⁻¹ d ⁻¹)				
1	209 B ^b a ^c	277 A a	4	< 0.0001
2	191 B b	255 A b	7	< 0.0001
3	194 B b	254 A b	6	< 0.0001
SEE	6	7		
valor	0.0064	0.0006		
de P				
NO ₂ ⁻ (mg N kg ⁻¹)			MS	P value
			D ^d	
1	1.1 A b	1.3 A ab	0.5	0.3746
2	2.2 A a	2.2 A a	1.2	0.9991
3	0.9 A b	1.0 A b	0.5	0.6855
MSD	0.9	1.1		
valor	0.0003	0.0158		
de P				
NO ₃ ⁻ (mg N kg ⁻¹)			MS	P value
			D	
1	97 B a	115 A a	12	0.0034
2	64 A b	72 A b	14	0.2653
3	61 A b	71 A b	10	0.0679
MSD	12	17		
valor	< 0.0001	< 0.0001		
de P				

^a SEE: error estándar del estimado (P < 0.005), ^b Valores con la misma letra mayúscula en el renglón no son significativamente diferentes entre los tratamientos, ^c Valores con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes entre sitios, ^d MSD: Mínima Diferencia significativa.

4.2 PERFILES DE SUELO

4.1.2 Análisis de las bandas de los geles de DGGE

En la figura 4.3 se muestran bandas del gen ADNr 16S del DGGE, las cuales se purificaron y secuenciaron.

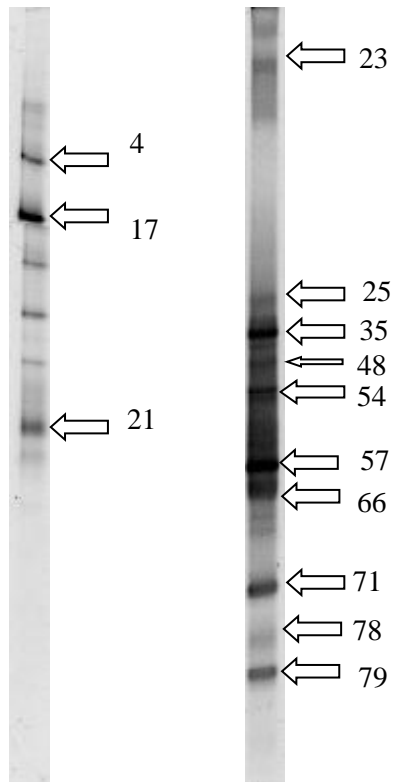


Figura 4.3 DGGE del gen ADNr 16S. Las bandas numeradas se purificaron y secuenciaron

El dendrograma se construyó con secuencias experimentales y del *GenBank*. Las secuencias experimentales están relacionadas con 5 grupos de bacterias: α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Actinobacteridae y Bacillales (Figura 4.4). El tamaño de las secuencias fue de 315 pb.

4. RESULTADOS

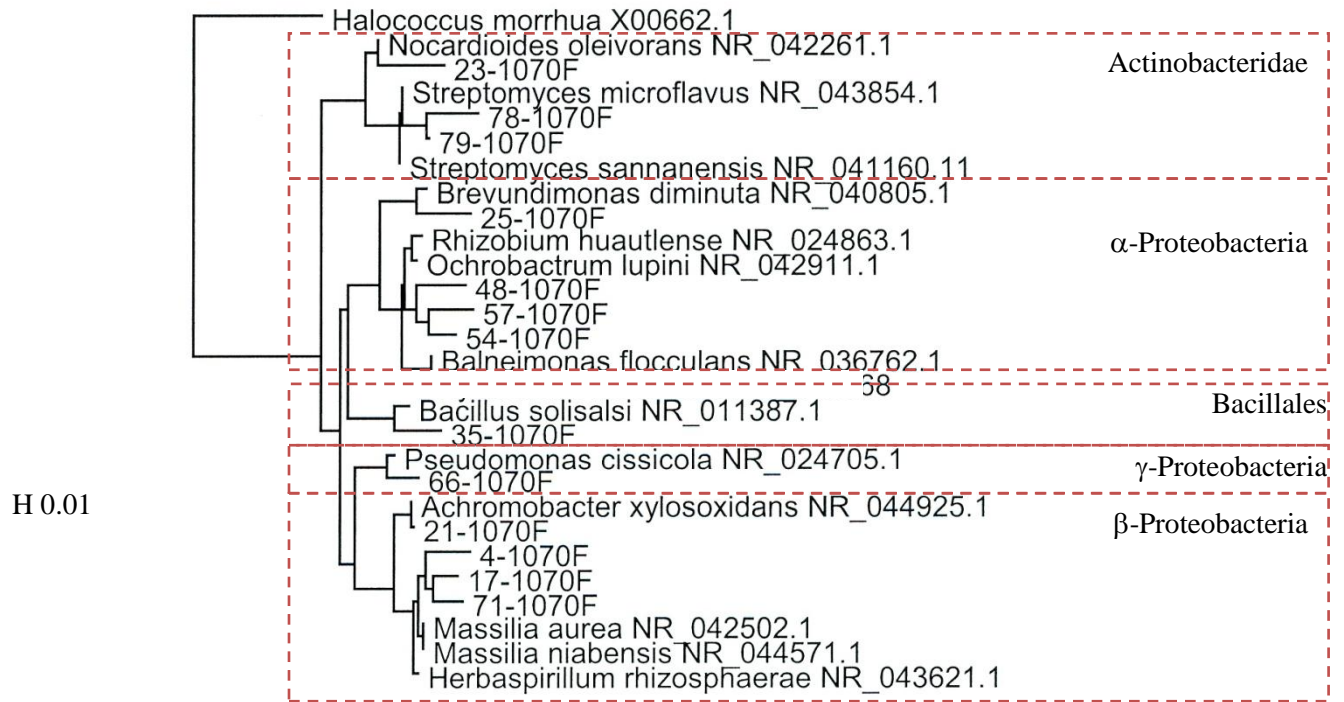


Figura 4.4. Dendrograma de los fragmentos del gen ADNr 16S. Comparación de secuencias de DGGE y secuencias tomadas del *GenBank*. Las distancias filogenéticas se determinaron por el análisis de Neighbor-joining. Como grupo externo se usó a la arqueobacteria *Halococcus morrhua* (gen ADNr 16S)

De las secuencias experimentales del gen ADNr 16S que se obtuvieron, tres se emparentan con bacterias que han sido reportadas como degradadoras de plaguicidas organofosforados y de anillos aromáticos (Tabla 4).

Tabla 4.4 Secuencias experimentales y su alineamiento con secuencias de bacterias

No. secuencia experimental	Alineado con el closest match del GenBank	Identidad máxima (%)	Función
21-1070	NR_044925.1 <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	98	Degrada insecticidas organofosforados (Zhang et al., 2005)
25-1070	NR_040805.1 <i>Brevundimonas diminuta</i>	96	Degrada insecticidas organofosforados (Purushotham et al, 2009)
54-1070	NR_042911.1 <i>Ochrobactrum lupini</i>	96	Degrada compuestos aromáticos (Shi et al, 2011)

4. RESULTADOS

De éstas 3 secuencias se observó su presencia y ausencia en los geles del DGGE que correspondieron a los tratamientos sin y con plaguicida. Con estos datos se calcularon sus frecuencias relativas, las cuales se analizaron con el método multivariable de escalamiento no métrico (Figura 4.5). El valor de Stress del modelo fue de 0.0161, los valores de R^2 para el eje 1 y eje 2 fueron de 0.947 y 0.027, respectivamente.

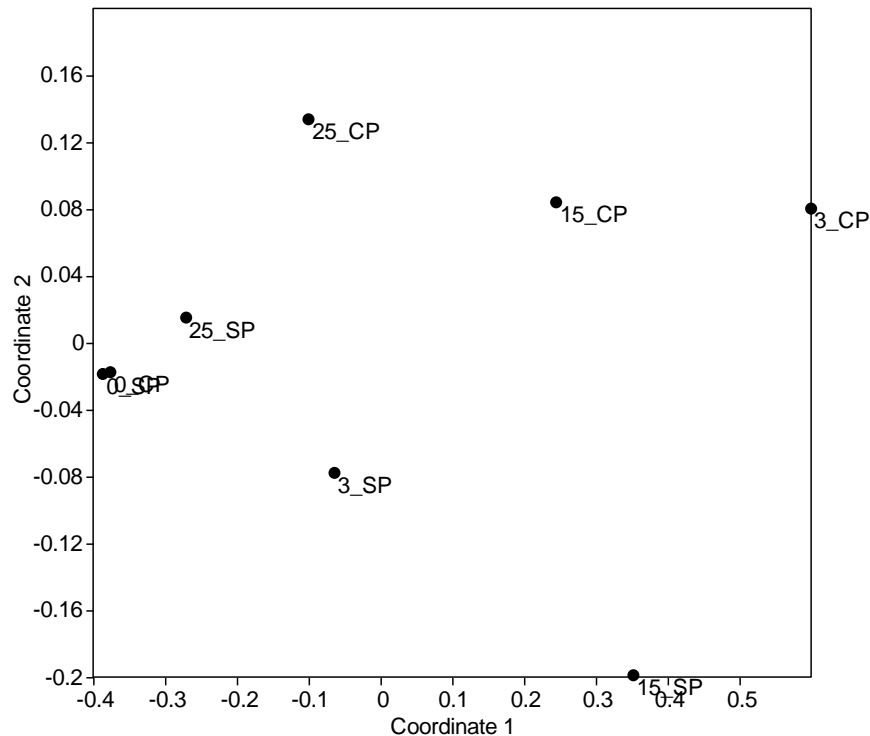


Figura 4.5. Comportamiento de las 3 secuencias experimentales 21-1070, 25-1070 y 54-1070 en los tratamientos sin y con plaguicida. SP: sin plaguicida; CP: con plaguicida

Al iniciar la cinética, las frecuencias relativas de las tres secuencias son similares en el suelo sin y con plaguicida, 0_CP (promedio de 0.87) y 0_SP (promedio de 0.86). A los 3 días de incubación se observó la mayor disminución de las frecuencias relativas en el suelo con plaguicida, 3_CP (promedio 0.28). Sin embargo a los 25 días de incubación las frecuencias relativas tienden a parecerse a las del tiempo 0, para 25_SP (promedio de 0.76) y 25_CP (promedio de 0.76) (Figura 4.5). No me queda muy clara tu gráfica y lo que representa. ¿Las escalas que muestran?

Índice de riqueza

Los índices de riqueza para el tratamiento sin plaguicida no presentan diferencia significativa durante el tiempo. Sin embargo en el tratamiento con plaguicida la disminución del índice de riqueza a los 3 y 25 días de incubación es significativamente diferente (Tabla 4.5). Lo anterior puede deberse a que cuando las concentraciones del metil paratión y 4-nitrofenol son altas el índice de riqueza disminuye, según el análisis de correlación de variables: -0.2064 , $p < 0.0023$, para metil paratión; y -0.1302 , $p < 0.05$ para 4-nitrofenol.

Tabla 4.5 Medias del índice de riqueza para los tratamientos sin y con plaguicida. Concentraciones del metil paratión y 4-nitrofenol presentes en el tratamiento con plaguicida.

Índices de riqueza para los tratamientos con y sin plaguicida			
Tiempo (días)	- metil paratión	+ metil paratión	valor de P
0	28.77 A ^a a ^b	31.34 Aa	0.064
3	31.87 Aa	9.44 Bb	0.022
15	26.42 Aa	25.60 Aa	0.080
25	36.86 Aa	16.74 Bb	0.017
valor de P	0.080	0.011	

Concentraciones del metil paratión y 4-nitrofenol en el suelo		
Tiempo (días)	metil paratión (mg kg⁻¹ de suelo)	4-nitrofenol (mg kg⁻¹ de suelo)
0	284	0
3	257	0.01
15	198	0.76
25	145	27.89

^a Valores con la misma letra mayúscula en el renglón no son significativamente diferentes entre tratamientos. ^b Valores con la misma letra en la columna son significativamente diferentes en el tiempo.

En las figuras 4.6, 4.7 y 4.8 se muestran los geles del DGGE para los sitios 1, 2 y 3 con y sin plaguicida. En los geles se añadieron tres muestras de ADN, para cada día de incubación, las cuales correspondían a los triplicados de la extracción de una muestra de

4. RESULTADOS

suelo de un microcosmos. Se señalan con flechas las bandas que corresponden a las secuencias, 21-1070, 25-1070 y 54-1070 (Tabla 4.4).

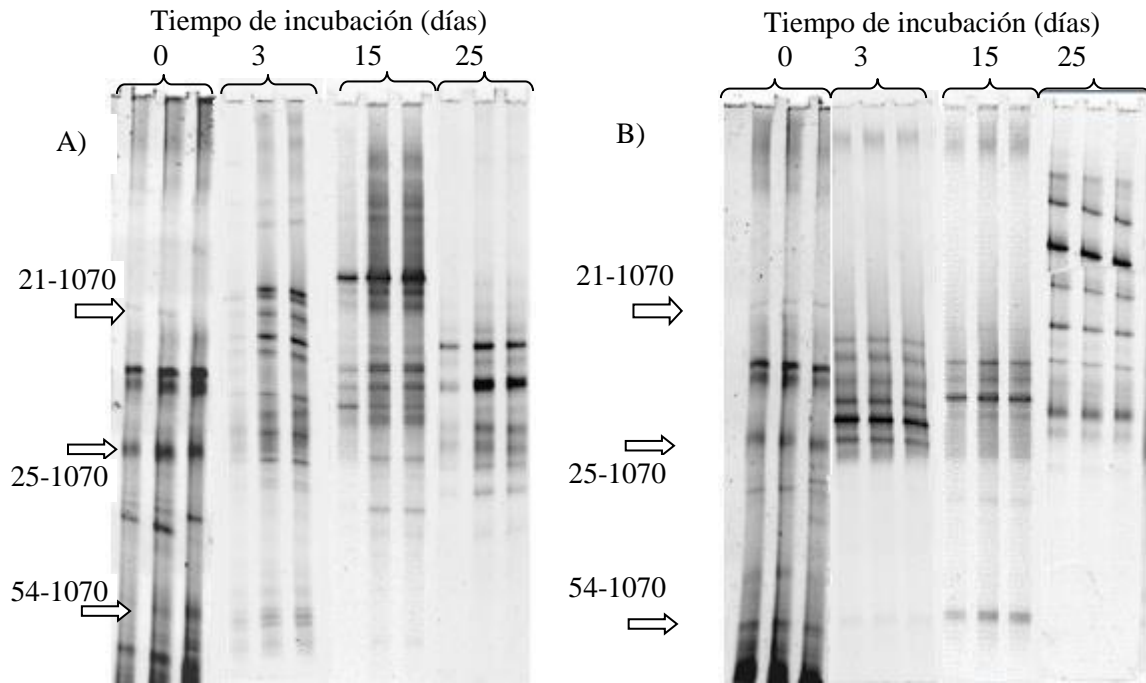


Figura 4.6 Geles del gen ADNr 16S (DGGE) para el Sitio 1. A) Tratamiento sin plaguicida. B) Tratamiento con plaguicida.

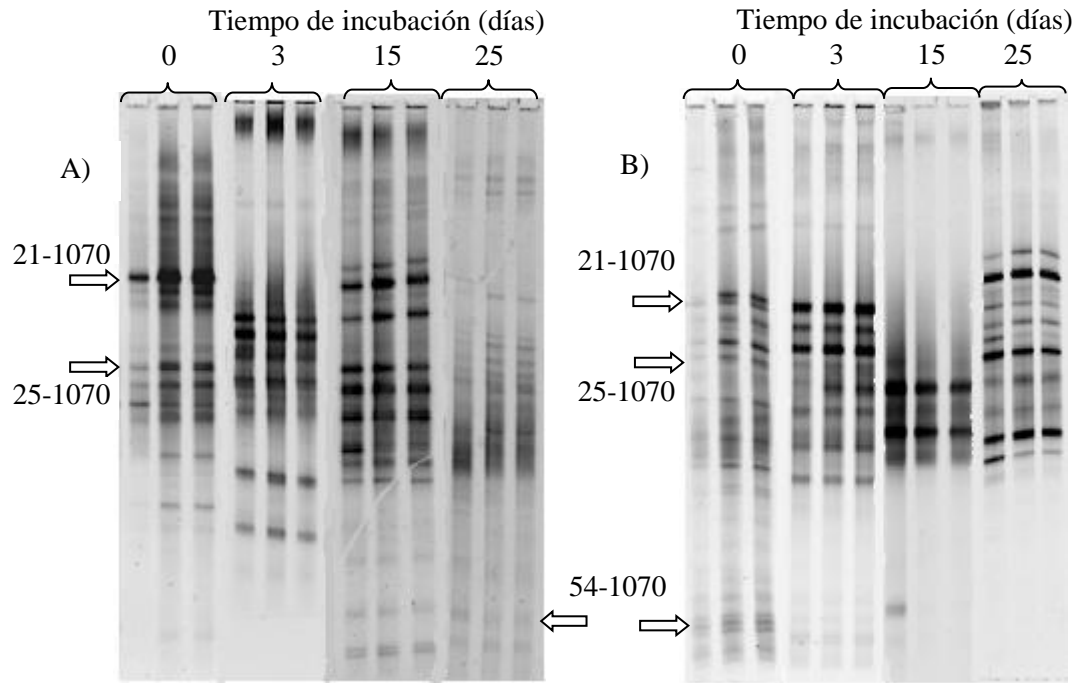


Figura 4.7 Geles del gen ADNr 16S (DGGE) para el Sitio2. A) Tratamiento sin plaguicida. B) Tratamiento con plaguicida.

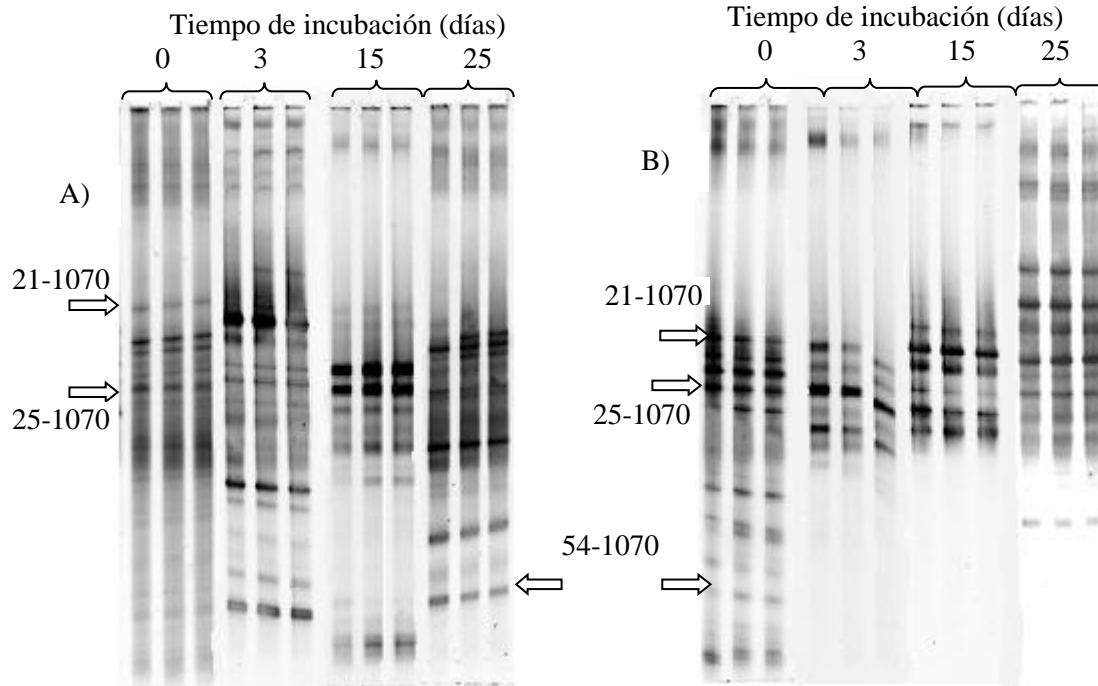


Figura 4.8 Geles del gen ADNr 16S (DGGE) para el Sitio 3. A) Tratamiento sin plaguicida. B) Tratamiento con plaguicida.

Dinámica

La velocidad de cambio (Δt) de la comunidad de bacterias para el tratamiento sin y con plaguicida fue de $56 \pm 3.0\%$ y $58 \pm 2.9\%$ respectivamente, y no son significativamente diferentes (Figura 4.9).

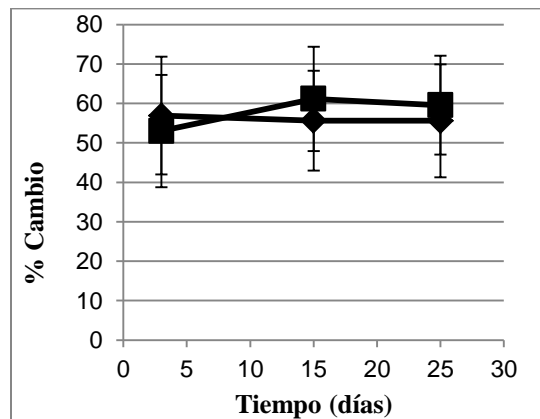


Figura 4.9 Dinámica de las comunidades de bacterias en el suelo. La curva con (♦) representa al tratamiento sin plaguicida y la curva con (■) al tratamiento con plaguicida. Las barras son las desviaciones estándar

4.2 PERFILES DE SUELO

4.2.1 Parámetros fisicoquímicos

Se obtuvieron los valores de las características fisicoquímicas del suelo para las tres profundidades de cada uno de los seis perfiles. Esas características fueron: densidad aparente, densidad real, arcilla, arena, limo, porosidad, pH, conductividad eléctrica (CE), carbono orgánico total, nitrógeno total, N-NH_4^+ , N-NO_3^- , N-NO_2^- , fósforo total, fósforo disponible, metil paratión, 4-nitrofenol, K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- y SO_4^{2-} (datos no presentados).

Los valores de las características fueron analizados con la técnica de ANOVA. De acuerdo a la prueba de Tukey, se encontraron diferencias significativas en: densidad aparente, arcilla, pH, conductividad eléctrica (CE), N-NO_3^- , fósforo total, fósforo disponible, metil paratión, 4-nitrofenol, K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- y SO_4^{2-} . Estas características se analizaron con el método de Componentes Principales, los 3 primeros factores o componentes describieron el 74% de la variabilidad; el factor 1 (51%), factor 2 (16%) y factor 3 (7%), figura 4.10.

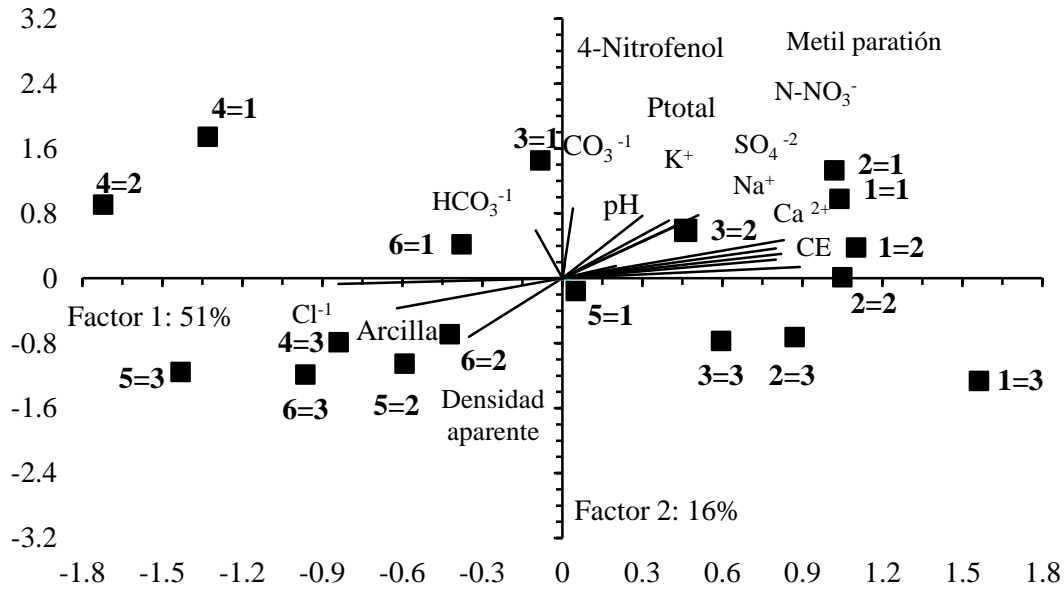


Figura 4.10 Componentes principales. Los factores 1 y 2 explican el 51% y 16% de la variabilidad, respectivamente. Los ■ representan al perfil y su profundidad; ejemplo: 4=1 (número de la izquierda es el perfil 4 y el número de la derecha la profundidad 1).

En los perfiles 1 y 2, a las profundidades de 0-15cm (capa arable) y 15-47cm, presentaron valores similares para el plaguicida metil paratión (1=1, 0.58; 1=2, 0.29; 2=1, 0.25; y 2=2, 0.29 mg kg⁻¹) y para el 4-nitrofenol (1=1, 0.005; 1=2, 0.002; 2=1, 0.007; y 2=2, 0.002 mg kg⁻¹). La presencia del 4-nitrofenol nos indica que el metil paratión se está degradando, ya que el 4-nitrofenol es un producto de la degradación de dicho plaguicida. También comparten concentraciones de cationes (K⁺, Na⁺, Ca²⁺) y aniones (CO₃²⁻ y SO₄²⁻), los cuales son responsables de que la conductividad eléctrica del suelo se eleve. Los promedios de la conductividad eléctrica para los perfiles 1=1, 1=2, 2=1, 2=2 y 3=2 son 1.7, 1.9, 2.1, 1.9 y 0.8 (dS m⁻¹), respectivamente. Las altas concentraciones de sales en esos perfiles se debe a que el suelo está en contacto con el agua del canal, la cual tuvo una conductividad eléctrica promedio de 2.2 dS m⁻¹. El pH estuvo en un rango de 7.5 a 7.7 para los perfiles mencionados anteriormente (Figura 4.10).

4. RESULTADOS

La densidad aparente y el contenido de arcilla son características que agrupan a los perfiles 4, 5 y 6 a diferentes profundidades. El perfil 4 se destaca en las dos primeras profundidades en, sin embargo para los perfiles 5 y 6 de 15-47cm y 47-98cm de profundidad. Aniones como el HCO_3^- y el Cl^- agrupan a los perfiles 4, 5 y 6 a diferentes profundidades (Figuras 4.10 y 4.11).

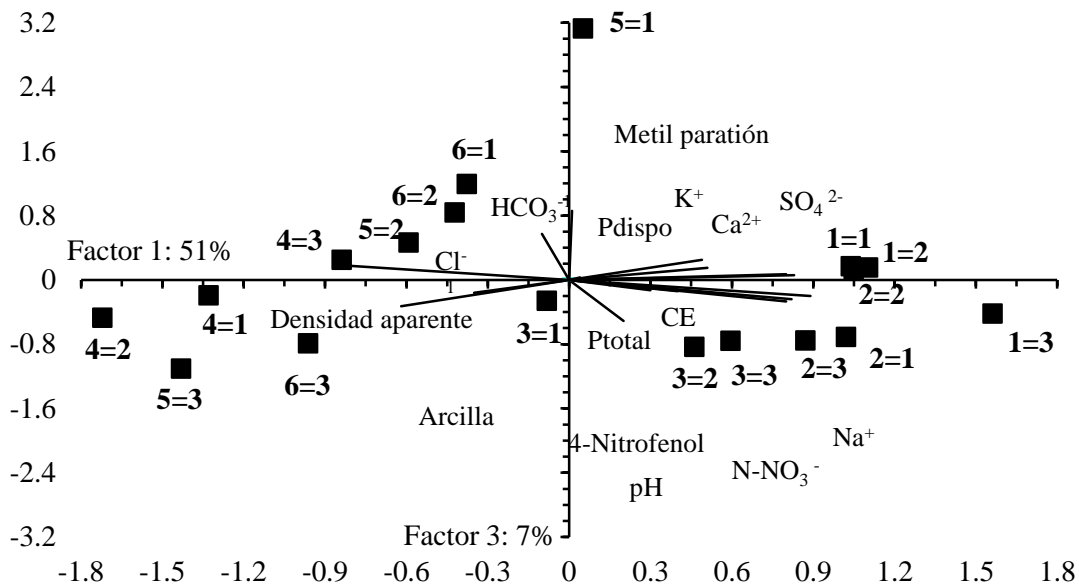


Figura 4.11 Componentes principales. Los factores 1 y 3 explican el 51% y 7% de la variabilidad, respectivamente. Los ■ representan al perfil y su profundidad; ejemplo: 4=1 (número de la izquierda es el perfil 4 y el número de la derecha la profundidad 1).

El perfil 5=1 está muy apartado de los perfiles 1=1, 1=2 y 2=2, porque su concentración promedio del metil paratión fue de $2.05 \text{ (mg kg}^{-1}\text{)}$, con una desviación estándar de 0.11, figura 4.11. Tal valor fue 3.5 veces más alto para el perfil 1=1 (0.58 mg kg^{-1}) y 7 veces mayor para los perfiles 1=2 y 2=2 (0.29 mg kg^{-1}). El fósforo total y disponible agrupa a los perfiles 1, 2 y 3, figura 4.11.

4.2.2 Análisis molecular

4. RESULTADOS

En las figuras 4.12, 4.13 y 4.14 se muestran los geles del DGGE para los perfiles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 a 0-15, 15-47 y 47-98 cm de profundidad. Se realizó un gel para cada perfil. Para cada profundidad se pusieron tres muestras de ADN, cada una de esas muestras correspondía a cada una de las tres muestras de suelo tomadas a esa profundidad. Las bandas del gen ADNr 16S del DGGE que se purificaron y secuenciaron se señalan en cada gel.

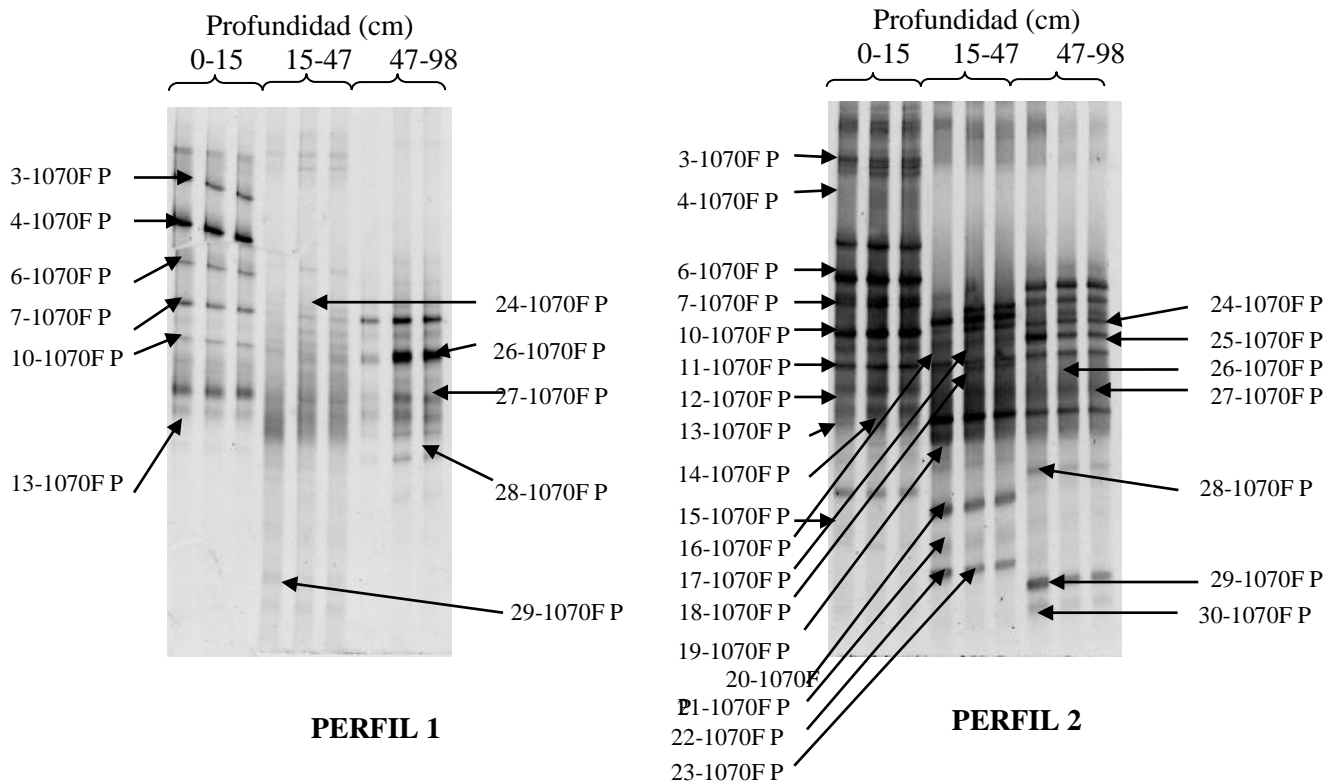


Figura 4.12 Geles del gen ADNr 16S (DGGE). Perfil 1 y perfil 2, con sus tres profundidades. Las bandas que se purificaron y secuenciaron se señalan con flechas

4. RESULTADOS

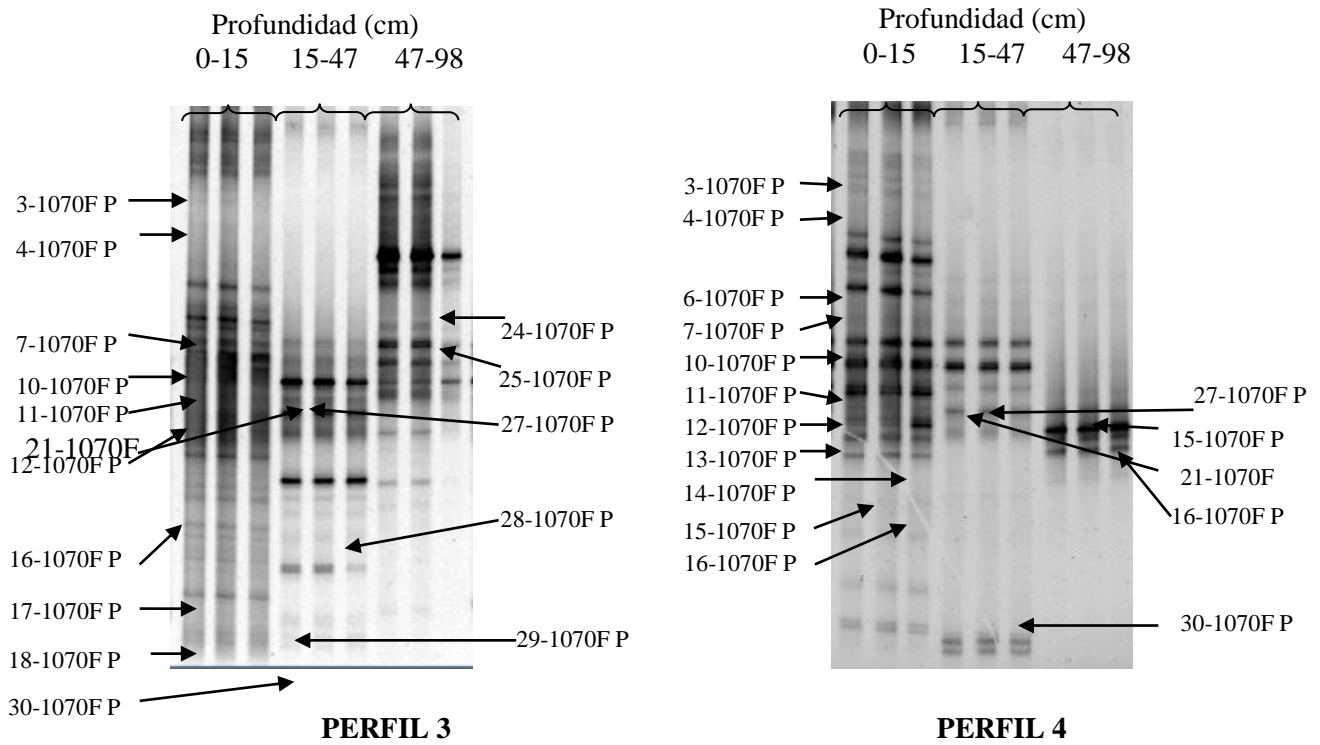


Figura 4.13 Geles del gen ADNr 16S (DGGE). Perfil 3 y perfil 4, con sus tres profundidades. Las bandas que se purificaron y secuenciaron se señalan con flechas

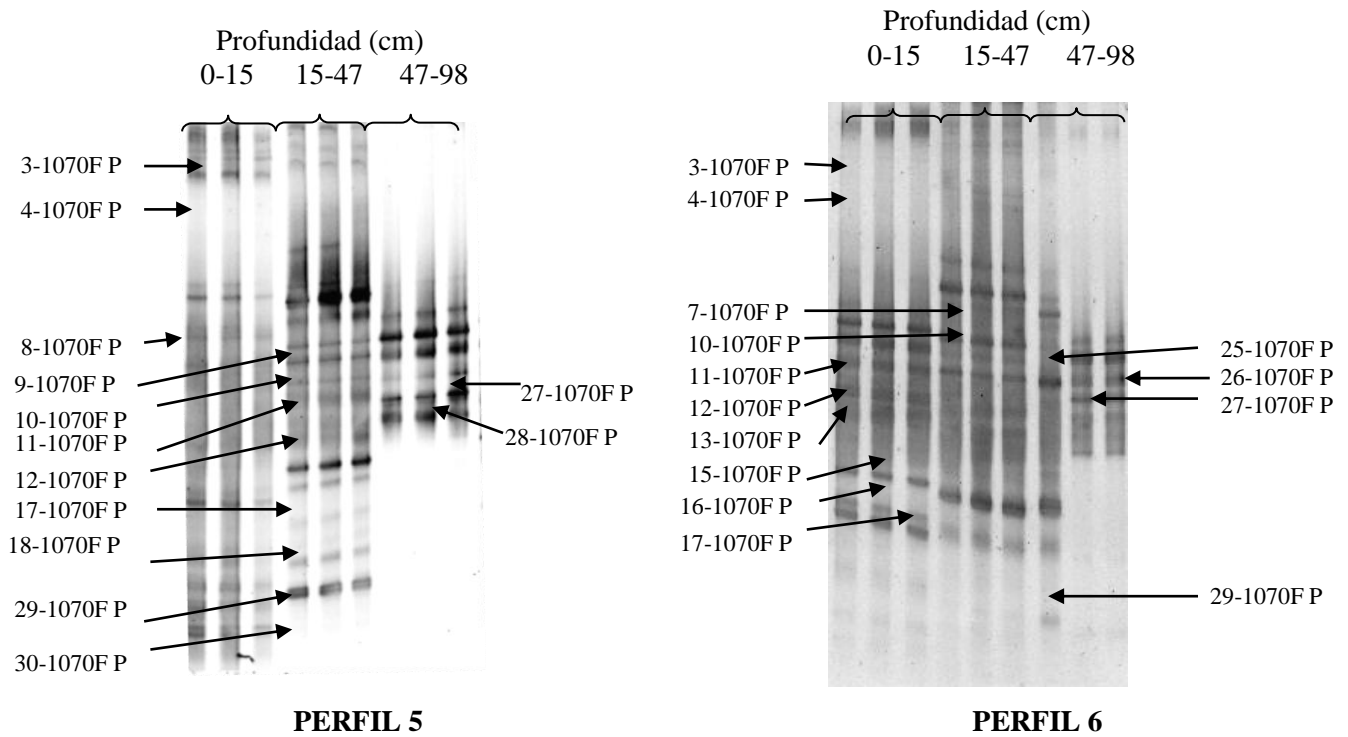


Figura 4.14 Geles del gen ADNr 16S (DGGE). Perfil 5 y perfil 6 con sus tres profundidades. Las bandas que se purificaron y secuenciaron se señalan con flechas

Se debería de esperar un perfil relativamente similar para cada profundidad en los respectivos perfiles 1-4. ¿si o no?. Justificar.

Índice de riqueza

El perfil 3, 0-15cm de profundidad, presentó el índice de riqueza más alto con respecto a los perfiles 1 y 6, fueron significativamente diferentes. De 15-47 cm de profundidad, en los perfiles 4 y 6 los índices de riqueza son los más bajos con respecto a los valores de los perfiles 1, 2, 3 y 5, con diferencias significativas. Y de 47-98 cm de profundidad, los índices de riqueza son menores en todos los perfiles con respecto a los observados en las dos primeras profundidades (Tabla 4.6).

4. RESULTADOS

Tabla 4.6 Promedios de los índices de riqueza para los perfiles en las tres profundidades

Profundidad (cm)	PERFIL						Valor de P
	1	2	3	4	5	6	
0-15	5.15 A ^a a ^b	59.16 Ba	91.03 Ca	34.40 Da	69.02 Ba	7.32 Aa	>0.0001
15-47	35.62 Ab	32.40 Aa	19.29 Bb	4.12 Ca	44.96 Aa	3.59 Ca	>0.0001
47-98	3.59 Aa	16.07 Bb	12.10 Bb	0.48 Ab	3.45 Ab	1.27 Aa	>0.00 1
Valor de P	>0.0001	>0.0001	>0.0001	>0.0001	>0.0001	>0.0001	

^a Valores con la misma letra mayúscula en el renglón no son significativamente diferentes entre los perfiles. ^b Valores con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes en las profundidades.

Generalmente, los mayores índices de riqueza se presentaron de 0-15 cm de profundidad, perfiles 2, 3, 4, 5 y 6. Sin embargo en el perfil 1, de 15-47 cm de profundidad, el índice de riqueza fue muy parecido a los observados a 0-15cm de profundidad. Y en todos los perfiles, a 47-98cm de profundidad, los índices de riqueza fueron menores con respecto a los observados de 0-47 cm de profundidad (Figura 4.16).

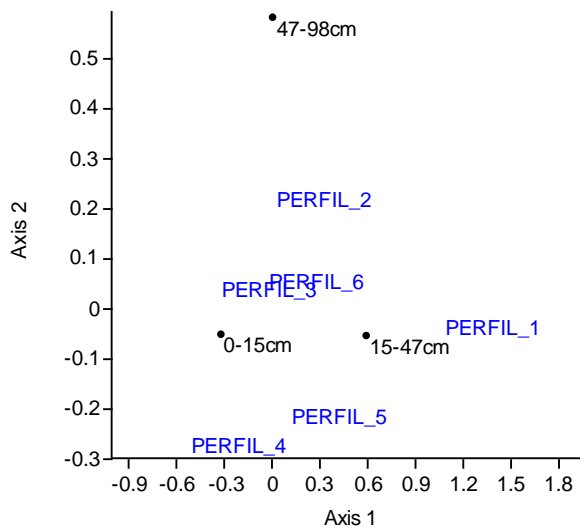


Figura 4.16 Análisis de correspondencia de los índices de riqueza de los perfiles y sus profundidades. Asociación de los perfiles de acuerdo a los índices de riqueza observados a

4. RESULTADOS

0-15, 15-47 y 47-98 cm de profundidad. El eje 1 representa el 84.84 % de la variabilidad y el eje 2 el 15.16% de la variabilidad.

Análisis de las secuencias

Con las secuencias experimentales se realizó un dendrograma, Tabla 4.7, el cual se muestra en la figura 4.17. Se usó como grupo externo a la arqueobacteria *Holococcus morrhua* X00662.1. El dendrograma se construyó con secuencias experimentales y del *GenBank*. Las secuencias experimentales están relacionadas con 7 grupos de bacterias: α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Sphingobacteria y Bacillales. El tamaño de las secuencias fue de 315 pb.

Tabla 4.7 Bandas de los geles de DGGE y el porcentaje de identidad

Banda		% de Identidad	Banda		% de Identidad
30-1070	<i>Olivibacter soli</i>	96			
22-1070	<i>Uncultured Acidobacteria</i>	96	20-1070	<i>Caulobactereceae bacterium</i>	97
4 -1070	<i>Duganella sp.</i>	97	20-1070	<i>Brevundimonas sp.</i>	96
7-1070	<i>Herbaspirillum rhizosphereae</i>	96	20-1070	<i>Brevundimonas diminuta</i>	96
14-1070	<i>Massilia niabensis</i>	97	25-1070	<i>Lysobacter enzymogenes</i>	98
17-1070	<i>Massilia aurea</i>	97	25-1070	<i>Balneimonas flocculans</i>	98
18-1070	<i>Masillia sp.</i>	97	25-1070	<i>Rhizobium huahutlense</i>	99
19-1070	<i>Massilia timonae</i>	96	25-1070	<i>Ochrobactrum lupini</i>	97
21-1070	<i>Telluria mixta</i>	96			
24-1070	<i>Collimonas sp.</i>	97	10-1070	<i>Bacillus boronophilus</i>	97
26-1070	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	96	12-1070	<i>Bacillus sp.</i>	96
27-1070	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	96	13-1070	<i>Virgibacillus salarius</i>	96
			11-1070, 6-1070, 3-1070, 28-1070	<i>Xanthomonas translucens</i>	96

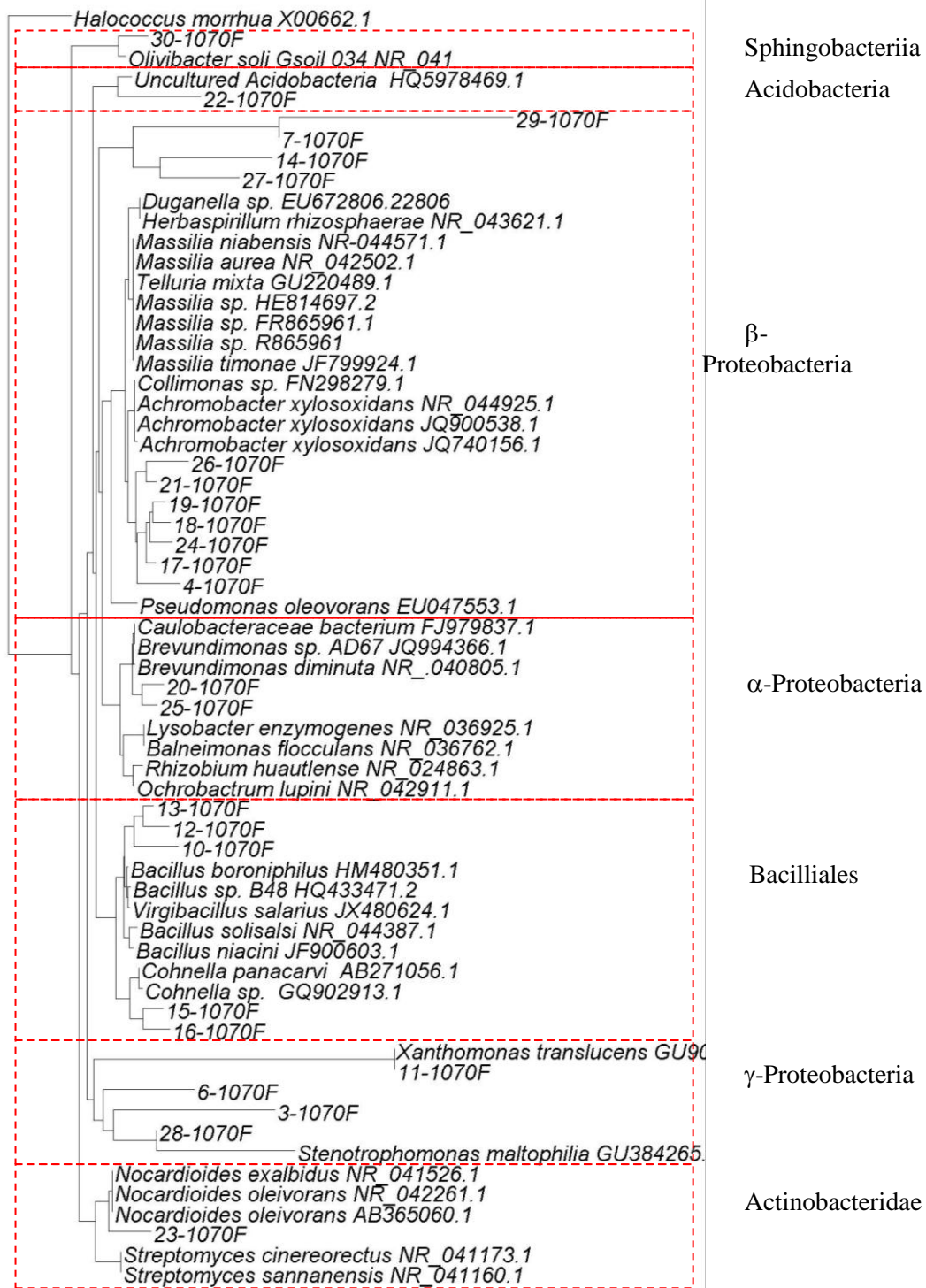


Figura 4.17 Dendrograma de los fragmentos del gen ADNr 16S. Comparación de secuencias de DGGE y secuencias tomadas del *GenBank*. Las distancias filogenéticas se determinaron por el análisis de Neighbor-joining. Como grupo externo se usó a la arqueobacteria *Halococcus morrhua* (gen ADNr 16S).

5. DISCUSIÓN

5.1 CINÉTICA DE REMOCIÓN DEL METIL PARATIÓN

5.1.1 Parámetros fisicoquímicos

La aplicación del metil paratión incrementó la conductividad eléctrica (CE) en el suelo empleado en este experimento. La solución del metil paratión Foley 50E, tiene una conductividad de $0.3 \pm 0.01 \text{ dS m}^{-1}$. El uso del Foley 50E a largo plazo podría incrementar la CE del suelo y como consecuencia inhibir el crecimiento de la vegetación.

En los microcosmos con plaguicida, se observó una disminución en la concentración del plaguicida después del primer día, esto puede deberse a que durante los últimos 5 años el plaguicida fue aplicado con frecuencia y las bacterias del suelo hayan desarrollado la capacidad de degradar el plaguicida.. Misra y colaboradores (1992) reportan resultados similares en la remoción de paratión de suelos aluviales. La ausencia de una fase de latencia en las figuras 3 y 4 se atribuye a que los microorganismos del suelo están adaptados al contaminante (Kah et al., 2007). La vida media del metil paratión en suelos arcillo arenosos es de 20 y 28 días (Sims et al., 1988; Ragnarsdottir, 2000), estos valores son similares a los obtenidos en nuestro estudio. El tiempo de vida media fue diferente entre los sitios de muestreo. Para el sitio 1 fue de 16 días, de 33 días para el sitio 2 y de 34 días para el sitio 3. Hay diferentes factores que influyen en la remoción del metil paratión del suelo. La actividad microbiana analizada por la emisión de CO_2 fue mayor para el sitio 1 que para el 2 y 3. Una alta actividad microbiana en el sitio 1 puede deberse a una rápida remoción del metil paratión comparado con los sitios 2 y 3. Aunque la CE es mayor en el sitio 1, no parece inhibir la remoción del metil paratión (Mishra, 2008). Los procesos abióticos no afectan la concentración del metil paratión, como puede observarse en el suelo esterilizado.

La concentración de 4-nitrofenol se incrementó a partir de los 15 días de incubación mientras que el metil paratión empezó a disminuir al primer día de incubación. En este caso se observa una fase de latencia entre el decremento de la concentración del metil paratión y la aparición del 4-nitrofenol, su producto de degradación. La presencia de esta fase de latencia ha sido reportada, en una solución acuosa que contenía 250 $\mu\text{g/mL}$ de metil paratión, para *Pseudomonas* sp. A3 (Ramanathan y Lalithakumari, 1999).

La producción media de CO_2 aumentó 1.3 veces en el suelo con plaguicida de la chinampa. Sin embargo, Bindhya y colaboradores (2009) reportaron que la emisión de CO_2 se incrementó cuando fue aplicado 1 mg de metil paratión kg^{-1} , pero disminuyó cuando 50 o 100 mg de metil paratión kg^{-1} fueron adicionados. Esto podría indicar que dicho plaguicida puede ser tóxico para los microorganismos del suelo. Estudios de toxicidad muestran que 4 mg L^{-1} de metil paratión en cultivos puros pueden ser letales para bacterias como *Flavobacterium* y *Pseudomonas* (Nazarian y Mousawi, 2005). La chinampa ha sido tratada con plaguicidas por 20 años, lo que pudo favorecer la resistencia de los microorganismos así como la capacidad de degradar plaguicidas. La producción de CO_2 se incrementó entre 60 y 68 mg C kg^{-1} en suelos con 280 mg de metil paratión-C kg^{-1} después de 25 días. Andrea y colaboradores (1999) también observaron un incremento en la emisión de CO_2 cuando en el suelo había metil paratión. (2mg kg^{-1}). Esto sugiere que aproximadamente el 60% de los 104 mg de C añadido con el metil paratión se mineraliza a CO_2 .

El metil paratión aumenta la concentración de NO_3^- en el suelo, ese incremento fue de 12 mg kg^{-1} (promedio de los 3 suelos). Aproximadamente, 15 mg de N kg^{-1} suelo fueron adicionados al suelo a través del metil paratión, pero fueron mineralizados. Andrea y colaboradores (1999) reportaron resultados similares en un suelo agrícola de San Paulo,

Brasil, en donde siembran algodón y han aplicado metil paratión por más de dos años. Misra y colaboradores (1992) encontraron que la concentración de NO_2^- se incrementó cuando se adicionó metil paratión al suelo. El NO_2^- fue oxidado inmediatamente incrementando rápidamente la concentración de NO_3^- en el suelo (Bruining, 2005).

5.1.2 Análisis de las bandas de los geles de DGGE

Índice de riqueza

En este estudio, la riqueza del suelo sin plaguicida se mantuvo sin cambios significativos a través del tiempo; sin embargo, en el suelo con plaguicida la riqueza varió significativamente. Estos valores disminuyeron al tercer día de iniciada la cinética, ya que la concentración inicial del metil paratión fue de 284 mg kg^{-1} . Generalmente la riqueza de los microorganismos del suelo disminuye cuando las concentraciones de plaguicidas son altas y cuando se encuentran algunos productos de su degradación (Fang et al., 2009). La resistencia del suelo a la perturbación por el metil paratión tuvo un periodo de 3 días, ya que a los 3 días de haberse iniciado la cinética, la riqueza disminuyó 3.32 veces con respecto al valor inicial. La capacidad que tuvo el suelo de casi regresar al valor inicial de la riqueza, resiliencia, fue a los 15 días de incubación, ya que el valor de riqueza aumentó 2.71, tabla 4.5). Sin embargo, a los 25 días de iniciada la incubación se observó otra disminución de la riqueza, de 1.53 veces con respecto a los 15 días de incubación. Esta última disminución está correlacionada con la aparición del compuesto 4-nitrofenol. Generalmente, cuando un ecosistema es perturbado, su recuperación no es total; es decir la riqueza o diversidad de las comunidades de microorganismos no logran mantener los mismos valores observados antes de una perturbación (Bardgett et al., 2005). En un suelo calcáreo, después de aplicar 1.5 mg kg^{-1} del plaguicida atrazina, dos veces cada 15 días, se

observó que la estructura de la comunidad bacteriana cambió 0.1 veces con respecto al suelo donde no aplicaron dicho compuesto. Y a los 90 días de incubación, la estructura de la comunidad bacteriana mostró valores muy parecidos a los iniciales (Bressan et al., 2008).

Dinámica

Para saber de qué manera los plaguicidas afectan a los suelos y sus posibles implicaciones ecológicas, es importante estudiar la estructura y dinámica de las comunidades de los microorganismos en el suelo, antes y durante la exposición a dichos compuestos (Imfeld y Vuilleumier, 2012). Algunas de las bacterias que han sido aisladas de suelos con metil paratión y que tienen genes que codifican para la enzima organofósforo hidrolasa, la cual interviene en la degradación de ese compuesto, pertenecen a los géneros *Pseudaminobacter*, *Achromobacter*, *Brucella*, y *Ochrobactrum* (Zhang et al., 2005). En el suelo de la chinampa de Xochimilco se hizo el seguimiento de tres secuencias experimentales, las cuales coincidieron con bacterias que han sido reportadas como degradadoras de plaguicidas (*Achromobacter xylosoxidans*, *Brevundimonas diminuta* y *Ochrobactrum lupini*), estas secuencias se encontraron en los tratamientos sin y con plaguicida durante toda la cinética. En el tratamiento con plaguicida, se observa que al tercer día de incubación, las frecuencias relativas de esas tres secuencias experimentales disminuyeron 70%, siéndolas más bajas. Mientras, en el tratamiento sin plaguicida las frecuencias relativas de esas secuencias fueron parecidas a las frecuencias relativas del primer día de incubación, disminuyeron 32%. A los 15 días las frecuencias relativas empezaron a aumentar, en los tratamientos con y sin plaguicida. Y a los 25 días de incubación las frecuencias relativas para los dos tratamientos se acercan a los valores iniciales, 71% para el tratamiento con plaguicida y 88% para el tratamiento sin plaguicida. Lo anterior pudo deberse a que la concentración del plaguicida aplicada fue tóxica para los

microorganismos del suelo, lo cual se observa a los 3 días de incubación. Y a medida que disminuye la concentración del plaguicida en el suelo, la frecuencia de los microorganismos va aumentando hasta observarse frecuencias relativas parecidas al tiempo inicial. Un comportamiento similar observaron Chu y colaboradores (2008), los plaguicidas clorpirifos y clorotalonil, después de 7 días de haber sido aplicados al suelo, disminuyeron 72 % y 59% a la población bacteriana, respectivamente. Y después de 21 días, en el suelo con clorpirifos la población bacteriana se recuperó 88%, y para el suelo con clorotalonil fue de 89 %.

En cuanto a las velocidades de cambio (Δt) de toda la comunidad bacteriana, para los tratamientos con y sin plaguicida del suelo de Xochimilco, no fueron significativamente diferentes. Es decir que la aparición y desaparición de unidades taxonómicas (OTUs) en los tratamientos con y sin plaguicida durante los 25 días de incubación no tuvieron diferencias significativas. Lo anterior podría deberse a que las bacterias del suelo de la chinampa están adaptadas a la presencia de plaguicidas, debido a que durante 20 años los agricultores de la chinampa han aplicado esos compuestos a sus cultivos. Bressany colaboradores (2008) han observado que las comunidades bacterianas pueden preadaptarse a perturbaciones por plaguicidas y después soportar un estrés más fuerte, como el aumento de temperatura o la aplicación de una concentración elevada de algún metal. Las bacterias pueden adaptarse rápidamente a exposiciones tóxicas de plaguicidas o desarrollar la capacidad de degradar dichos compuestos (Imfeld y Vuilleumier, 2012). Lo anterior se debe a que las bacterias que presentan genes que codifican para las enzimas que degradan plaguicidas, como el metil paratión, pueden transferir horizontalmente esos genes a bacterias que no los tenían (Karns et al., 1990).

5.2 PERFILES DE SUELO

5.2.1 Parámetros fisicoquímicos

La conductividad eléctrica fue uno de los parámetros que dominó en los perfiles 1, 2 y 3 a las 3 profundidades, así como los iones K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , CO_3^{2-} y SO_4^{2-} . Estos iones se consideran responsables de que la conductividad eléctrica del suelo aumente. Esos perfiles se encuentran en contacto con el agua de los canales, que tiene una conductividad promedio de 2.2 dS m^{-1} . En el suelo cercano a los canales los agricultores ya no siembran debido a que las plantas no crecen adecuadamente. Los valores de conductividad eléctrica del suelo de los perfiles 1, 2 y 3 se encuentran en el rango de 1.7 a $2.1 \text{ (dS m}^{-1}\text{)}$, lo cual se considera muy ligeramente salino según la NOM-021-RECNAT-2000. Ramos-Bello y colaboradores (2001) reportan una conductividad eléctrica de 6.0 dS m^{-1} , 3.5 veces más alta que la conductividad medida en nuestro estudio para la superficie de la chinampa; conforme aumenta la profundidad, la conductividad eléctrica disminuye. Asimismo, en la superficie (0-15 cm) los iones Na^+ , Ca^{2+} , y SO_4^{2-} tienen una mayor concentración que a 15-98cm de profundidad, lo cual se puede explicar por el fenómeno de capilaridad. De 0-15 cm de profundidad, el pH del suelo de los perfiles 1, 2 y 3 fue de 7.7, 7.5 y 7.7 respectivamente, medianamente alcalino según la NOM-021-RECNAT-2000, lo cual difiere con los valores reportados por Pérez-Olvera y colaboradores (2008), cuyos valores son 1.2 veces mayores con respecto a los que obtuvimos.

El plaguicida metil paratión y 4-nitrofenol están más correlacionados con los perfiles 1, 2 y 3 a las tres profundidades y con el perfil 5 a 0-15 cm de profundidad. Es decir, es donde se encuentran las concentraciones más altas de esos 2 compuestos. La presencia del 4-nitrofenol indica que el metil paratión en el suelo se está degradando. Debido a que el metil

paración y el 4-nitrofenol se encuentran de 15-47 y 47-98 cm de profundidad, dichos compuestos están siendo lixiviados en el suelo, aunque el contenido promedio de materia orgánica del suelo de la chinampa fue de 16%, contenido alto de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000. Roticha y colaboradores (2004) mencionan que sí en el suelo el contenido de materia orgánica es alto, también aumenta la capacidad de retención del agua, por lo que los plaguicidas pueden ser hidrolizados o desadsorbidos, y por lo tanto estar disponibles para los microorganismos o ser lixiviados. El pH del suelo también es un factor que afecta el movimiento de los plaguicidas: el valor promedio de pH para el suelo de la chinampa fue de 7.9. Cuando el pH del suelo es mayor a 8, algunos plaguicidas como el imidacopril, disminuyen su adsorción en el suelo y pueden ser lixiviados (Bajeer et al., 2012).

Cuanto mayor sea la concentración de carbonatos y sulfatos en el suelo, mayor será la competencia con el fósforo por los sitios de adsorción en el suelo (Shen et al., 2011). Lo anterior puede explicar que el fósforo total y el fósforo disponible se encuentren en mayor proporción en los perfiles 1, 2 y 3 de 0-15 y 15-47 cm de profundidad. También puede deberse a que los agricultores siembren pocas plantas en esos perfiles, las cuales hacen uso de dichos nutrientes, debido a que las plantas no crecen adecuadamente por la conductividad eléctrica del suelo.

El nitrato se encuentra en mayor cantidad en los perfiles 1, 2 y 3 a las tres profundidades. Tal vez se deba a que la velocidad de transformación del amonio a nitrato, realizada por las bacterias del suelo, sea alta (nitrificación). Debido a que es un suelo con arcillas y alto contenido de materia orgánica, las cargas del suelo son negativas, lo cual permite que los cationes sean fácilmente adsorbidos; y los aniones como el nitrato no puedan ser retenidos en el suelo. Por lo tanto el nitrato puede ser lixiviado y/o lavado de la superficie del suelo y llegar a contaminar el agua.

La densidad aparente está relacionada con la arcilla en los perfiles 4, 5 y 6, de 15-47 y 47-98 cm de profundidad. Las densidades para 4=2, 4=3, 5=2, 5=3, 6=2 y 6=3 fueron de 0.47, 0.49, 0.52, 0.61, 0.50 y 0.62 respectivamente. Son densidades por debajo de 1, lo cual concuerda con las densidades esperadas para el suelo de las chinampas, ya que su contenido de carbono orgánico es alto (86-92g kg⁻¹). Es un suelo que no presenta compactación, ya que el sistema de sembrado es por chapines. Debido a que la densidad aparente es baja, la porosidad del suelo es mayor y por lo tanto habrá una mejor disponibilidad de agua, nutrientes y oxígeno para las plantas y microorganismos del suelo (ANRA, 2012).

5.2.2 Análisis molecular

Índice de riqueza

De 0-15 cm de profundidad en los perfiles 2,3, 4 y 5 de la chinampa, los índices de riqueza estuvieron en un rango de 34.40 a 91.01. De 15-47 cm de profundidad, los índices de riqueza fueron de 3.59-44.96. Y de 47-98 cm de profundidad los índices fueron de 0.48-16.07. En las dos primeras profundidades los índices de riqueza llegan a tener valores similares. Y de 47-98 cm los índices de riqueza son más pequeños, 0.48-16.07, que en las dos primeras profundidades. En el suelo, a mayor profundidad la riqueza es menor porque la difusión de oxígeno disminuye (Himaya y Williams, 2010). Will y colaboradores (2010) reportaron que en suelos cubiertos con pastos, los índices de riqueza fueron de 5.65 a 7.16 a una profundidad de 0-10 cm, y de 5.01 a 6.72 a 10-34 cm de profundidad; lo anterior se debió a que la cantidad de carbono orgánico y nitrógeno fueron menores a mayor profundidad. Sin embargo en el suelo de la chinampa, el carbono orgánico se encuentra en un rango de 78-96 g kg⁻¹ y el nitrógeno de 4.0-6.9 g kg⁻¹ en las tres profundidades de los 6 perfiles; es decir no hay una diferencia significativa en el contenido de carbono orgánico y

nitrógeno en las tres profundidades. Por lo tanto, el oxígeno puede ser un factor que esté afectando la riqueza del suelo de la chinampa de 47-98 cm de profundidad.

En el suelo de la chinampa la distribución de las bacterias es homogénea, ya que a las tres profundidades el tipo de bacterias que se encuentran presentes pertenecen a los grupos Bacilliales, α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteridae y Sphingobacteriia. La acidobacteria, secuencia 22-1070F, sólo se observó de 15-47cm de profundidad. *Xanthomonas translucens*, alineada con la secuencia 11-1070F, se encuentra de 0-15 cm de profundidad y puede degradar compuestos organofosforados. *Bacillus solisalsi*, alineada con las secuencias 10-1070F, 12-1070F o 13-1070F, se observó de 0-15 cm de profundidad; es una bacteria halotolerante que soporta concentraciones por arriba del 15% de NaCl, además es alcalifílica ya que puede vivir en pH de 5-13 (Liu et al., 2009). *Virgibacillus salarius*, alineada con las secuencias 10-1070F, 12-1070F o 13-1070F, también es una bacteria halotolerante. Lo descrito anteriormente nos indica que las bacterias del suelo de la chinampa se han adaptado a las condiciones de salinidad y contacto con los plaguicidas.

Bacterias como *Duganella* sp., *Herbaspirillum rhizosphaerae*, *Bacillus niacine* (secuencias 17-1070, 19-1070 y 21-1070) se encuentran asociadas a las raíces de las plantas. Las bandass se encuentran en las profundidades 0-15 y 15-47cm. Su presencia a 15-47cm puede deberse a la técnica agrícola que usan para sembrar, ya que cada vez que se siembra se coloca una nueva capa de sedimentos sobre la capa de suelo en donde crecieron las plantas de la cosecha anterior (Martínez-Ruiz, 2004).

Will y colaboradores (2010) reportaron los siguientes grupos de bacterias en suelos con pastos: horizonte A, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Fibrobacteres, Firmicutes, Spirochaetes, Verrucomicrobia, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria y

Gammaproteobacteria; y para el horizonte B, Acidobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Nitrospira, TM7 y WS3. Acidobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Chloroflexi, Firmicutes y Bacteroidetes, representando 26.98, 15.76, 11.62, 11.10, 9.69, 5.09, 3.85, 3.22 y 1.45%, respectivamente.

Brevundimonas diminuta se encuentra asociada con las secuencias 20-1070F y 25-1070F, y se observó a la profundidad de 15-47 cm y 47-98cm. *Acromobacter lupini* está asociado a las secuencias 21-1070F y 26-1070F, se observó de 15-47 y 47-98cm de profundidad. Estas dos bacterias tienen la capacidad de degradar insecticidas organofosforados (Zhang et al., 2005; Purushotham et al, 2009). A 15-47 y 47-98 cm de profundidad también hay metil paratión y 4-nitrofenol, tal vez la presencia del 4-nitrofenol a esas profundidades esté relacionada con *Brevundimonas diminuta* y *Acromobacter lupini*. Aunque el suelo tiene un alto contenido de materia orgánica, estos compuestos se encuentran de 15-98 cm de profundidad. Lo anterior puede deberse a que el plaguicida se esté lixiviando, porque la concentración de cationes adsorbidos en el suelo es alta y no permiten la adsorción del plaguicida y el 4-nitrofenol. También por el tipo de siembra realizada en las chinampas, la cual fue descrita anteriormente. Y porque el suelo ha estado expuesto a plaguicidas durante 20 años. En perspectiva, la actividad de dichos microorganismos se podría estudiar para poder definir si en estas profundidades se sigue degradando los plaguicidas presentes o si su presencia es resultado de la técnica de siembra propia a la zona chinampera de Xochimilco.

6. CONCLUSIONES

El metil paratión fue removido del suelo de la chinampa y tuvo una vida media de entre 16 y 34 días. Estos valores fueron similares a los reportados para suelos arcillo arenosos. Se observó una fase de latencia de 15 días entre la disminución del metil paratión y el incremento de uno de sus más importantes productos de degradación, el 4-nitrofenol. El metil paratión incrementa la emisión de CO₂ entre 60 y 68 mg C kg⁻¹ y la concentración del NO₃⁻, la cual fue de 8 y 18 mg N kg⁻¹ suelo. El Foley 50E contiene sales que elevan los valores de la CE del suelo, y a largo plazo puede inhibir el cultivo de hortalizas.

Durante la cinética de degradación del metil paratión, el tipo de bacterias que se encontraron en el suelo de la chinampa pertenecen a los grupos de α -Proteobacterias, β -Proteobacterias, γ -Proteobacterias, Bacillales y Firmicutes. En los tratamientos con y sin plaguicida fue constante la presencia de 3 secuencias experimentales de ADN, las cuales son similares a las de las bacterias que degradan plaguicidas organofosforados y anillos aromáticos (*Achromobacter xylosoxidans*, *Brevundimonas diminuta* y *Ochrobactrum lupini*). Lo anterior indica que las bacterias que se encuentran en el suelo de la chinampa pueden degradar plaguicidas organofosforados como el metil paratión. Los valores de riqueza disminuyeron significativamente en el suelo después de tres días de haber aplicado 280 mg kg⁻¹ de metil paratión, y cuando empezó a incrementar la concentración del 4-nitrofenol en el suelo (27.89 mg kg⁻¹). La velocidad de cambio (Δt) de las comunidades de bacterias en el suelo no tuvo una diferencia significativa entre el suelo con y sin plaguicida, tal vez porque las bacterias tuvieron la capacidad de adaptarse rápidamente a este tipo de estrés, ya que el suelo ha estado en contacto con plaguicidas desde hace 20 años.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las características fisicoquímicas del suelo de la chinampa estudiada son heterogéneas. El suelo que se encuentra en contacto con el agua de los canales presenta valores de pH y conductividad eléctrica considerados como medianamente alcalino y ligeramente salino, respectivamente. El suelo presenta cargas negativas, debido a que es un suelo con arcillas y un alto contenido de materia orgánica, por lo tanto permite que cationes como el K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} sean adsorbidos en el suelo, mientras que aniones como el nitrato puedan ser lixiviados o lavados de la superficie del suelo.

La densidad aparente, el pH, el contenido de carbono orgánico, el fósforo disponible y la concentración de nitratos hacen que este suelo sea adecuado para el crecimiento de las plantas y que puedan obtenerse de 2 a 3 cosechas de legumbres por año, por lo tanto debe recalcar la importancia de cuidar este recurso no renovable.

El análisis de diversidad es una parte muy importante de tu trabajo y se ve muy pobre en tus conclusiones.

La estructura de las comunidades de las bacterias en las tres profundidades del suelo de la chinampa fue homogénea.

RECOMENDACIONES

Realizar una cinética de remoción en los suelos de 15 a 47 y 47 a 92 cm de profundidad para saber si se observa el mismo comportamiento de las comunidades de bacterias reportado en este trabajo

Analizar las muestras de suelo de la chinampa una vez que el agricultor aplica el plaguicida y en durante los 40 días después. Y comparar los resultados de campo y laboratorio.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Aislar bacterias del suelo de la chinampa, después de tenerlo en contacto con ciertas dosis del plaguicida, para saber que tipo de bacterias estan presentes.

A esas bacterias aisladas, mantenerlas en medio líquido para hacer cinéticas de remoción del plaguicida. Y tal vez poder desarrollar investigación relacionada con biotecnología y biología molecular.

Hacer un seguimiento de las características químicas del suelo de las chinampas de Xochimilco y Tláhuac, como pH, conductividad eléctrica, aniones, cationes y plaguicidas, para que esa información sirva a las autoridades en la toma de decisiones sobre el uso de plaguicidas y manejo adecuado del suelo. Ya que si los valores de dichos parámetros aumentan, el suelo puede salinizarse, y los agricultores no podrán sembrar una gran variedad de hortalizas, leguminosas, cereales y flores. Lo cual provocaría un problema socioeconómico para los agricultores de Xochimilco y Tlahuac.

Que el agua de los canales provenga de plantas de tratamiento en donde eliminen la mayor cantidad de cationes y aniones, para que no se siga salinizando el suelo de las chinampas de Xochimilco y Tláhuac.

Continuar con el estudio de los microorganismos del suelo de las chinampas, ya que es un ecosistema único en el planeta.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alberta. 2012. A primer on water quality: pollutant pathways. Agriculture and Rural Development. Government of Alberta Canada. [http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/wat3350](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/wat3350)

Alcantara V., Heydrich S.C., Gibson R.W., Mazari-Hiriart M., Ponce de Leon C.A. 2009. Occurrence of organophosphorus pesticide (OPP) compounds from the Xochimilco wetland area, south of Mexico City, 3rd Wetland Pollutant Dynamics and Control WETPOL, Barcelona, Spain, pp. 20-24.

Andrea M.M., Peres T.B., Luchini L.C., Marcondes M.A., Pettinelli A., Nakagawa L.E. 1999. Impact of long term applications of cotton pesticides on soil biological properties, dissipation of [¹⁴C]-methyl parathion and persistence of multi-pesticide residues. Impact of long term pesticide usage on soil properties using radiotracer techniques. Report of a Final Research Coordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Hangzhou, Zhejiang, Peoples' Republic of China, pp. 13-34.

ANRA. 2012. Australian Natural Resources Atlas. APPENDIX 2. Australian Soil Resources Information System. http://www.anra.gov.au/topics/soils/pubs/national/agriculture_asris_density

ASTM. 2003. Standard Method for Specific Gravity of soils D854-83 (Reapproved 1990) In: Volume 4.08 Construction: Soil and Rock (I). American Society for Testing and Materials, Virginia, USA, pp 170-172

Bajeer M.A., Nizamani S.M. Sherazi, S.T.H., Bhangar M.I. 2012. Adsorption and leaching potential of imidacloprid pesticide through alluvial soil. American Journal of Analytical Chemistry. 3(8): 604-611

Bardgett R.D., Usher M.B., Hopkins D.W. 2005. Biological diversity and function in soils. Cambridge University Press. USA. pp. 4, 390

Begon M., Townsend C.R., Harper J.L. 2006. Ecology. John Wiley and Sons. pp. 470-482.

Bindhya R, Sunny S.A., Thanga V.S.G. 2009. In vitro study on the influence of methyl parathion on soil bacterial activity, *Journal Environmental Biology*. 30: 417-419.

Blake GR, Hartage KH. 1986. Bulk density In: Klute A (ed) *Methods of soil analysis, Part 1-Physical and Mineralogical Methods*. Soil Science Society of America Inc. - American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, pp 363-375

Bremner J.M.1996. Nitrogen-Total, in: D.L. Sparks (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 3- Chemical Methods*, Soil Science Society of America Inc. - American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, pp. 1085-1121.

Bressan M., Mougél C., Dequiedt S., Maron P-A., Lemanceau P., Ranjard L. 2008. Response of soil bacterial community structure to successive perturbations of different types and intensities. *Environmental Microbiology*. 10(8): 2184–2187

Bruining L. 2005. Connections between the C, N and P biogeochemical cycles of system Earth and their relevances for environmental problems, Institute of Environmental Sciences, Leiden University, The Netherlands

Burr M. D., Clark S. J., Spear C. R., Camper A. K.. 2006. Denaturing gradient gel electrophoresis can rapidly display the bacterial diversity contained in 16S rDNA clone libraries. *Microbial Ecology*. 51(4): 479-486

Carvalho F.P., Gonzalez-Farias F., Villeneuve J.P., Cattini C., Hernandez-Garza M., Mee L.D., Fowler S.W. 2002. Distribution, fate and effects of pesticide residues in tropical coastal lagoons of Northwestern Mexico. *Environmental Technology*. 23 (11): 1257-1270

Chu X.O., Fang H., Pan X., Wang X., Shan M., Feng B., Yu Y. 2008. Degradation of chlorpyrifos alone and in combination with chlorothalonil and their effects on soil microbial populations. *Journal of Environmental Sciences* 20: 464–469

Collins W.W., Qualset C.O. 1999. *Biodiversity in agroecosystems*. CRC Press LLC. USA. pp. 3-4

Crossley P.L. 2000. Sub-irrigation in wetland agriculture. *Agriculture and Human Values*. 21: 191–205

Cui Z., Shunpeng L., Guoping F. 2001. Isolation of Methyl Parathion-Degrading Strain M6 and Cloning of the Methyl Parathion Hydrolase Gene. *Applied Environmental Microbiology*. 67(10): 4922–4925

Debarati P., Gunjan P., Christoph M., van der Meer J.R., Rakesh K. J. 2006. Bacterial community structure of a pesticide-contaminated site and assessment of changes induced in community structure during bioremediation. *FEMS Microbiology Ecology*. 57: 116–127

Edwards F.L, Tchounwou P.B. 2005. Environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure – a scientific review. *International Journal Environmental Resources Public Health*. 2: 430-441.

EPA. 2006. EPA-Pesticides: Topical & Chemical Fact Sheets, Regulatory Action Fact Sheets. <http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/chemicals/>

Escalante A.E. 2004. Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas. En: *Microbiología ambiental*. Compiladores: Rosas I., Cravioto A. Excurra E. Instituto Nacional de Ecología. México. pp. 111-114, 393-416.

Fang H., Yu Y., Chu X., Wang X., Yang X., Yu J. 2009. Degradation of chlorpyrifos in laboratory soil and its impact on soil microbial functional diversity. *Journal of Environmental Sciences* 21: 380–386.

Fierer N., Jackson R.B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 103(3): 626-631

Fishel F. 1997. Pesticides and the Environment. Insects and diseases. *Agricultural MU Guide*. G7520. University of Missouri-Columbia. New 9/91. Revised 7/97/7M. 6 p

Gee G.W., Bauder J.W. 1986. Particle size analysis, in: A. Klute (Eds.), *Methods of soil analysis, Part 1, Physical and Mineralogical Methods*, 2nd Edition, Soil Science Society of America Inc. - American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, pp. 383-411.

Himaya M., Williams M.A. 2010. Soil habitat and horizon properties impact bacterial diversity and composition. *Soil Science Society of America Journal*. 75(4):1440-1448

Hosoda A., Hotta Y., Isoi T., Amao S., Ito A. Ueno K., Yoshikawa H., Tamura H. 2010. Diversity of octylphenol polyethoxylate-degrading bacteria in river sediments and enrichment cultures, was revealed by 16S rRNA and *adh1*-gene molecular analysis. *Journal of Pesticide Science*. 35(4): 470–478

Hugh T., Alba V., Boune C. 1993. *La conquista de México: el encuentro de dos mundos, el choque de dos imperios*. Planeta. México. 156p

Imfeld G., Vuilleumier S. 2012. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. *European Journal of Soil Biology*. 1-9.

Jaga K., Dharmani C. 2006. Methyl parathion: an organophosphate insecticide not quite forgotten. *Review of Environmental Health*. 21: 57-67.

Juárez-Figueroa L.A., Silva-Sánchez J., Uribe-Salas F.J., Cifuentes-García E. 2003. Microbiological indicators of water quality in the Xochimilco canals, Mexico City. *Salud Pública de México*. 45(5): 389-395

Kah M., Beukle S., Brown C.D. 2007. Factors influencing degradation of pesticides in soil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 55: 4487-4492.

Karns J.S. 1990. Molecular genetics of pesticide degradation by soil Bacteria. *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. Chapter 11, ACS Symposium Series. Vol. 426. Chapter 11: 141-152

Kuo S., 1996. Phosphorus, in: D.L. Sparks (Eds.), *Methods of soil analysis, Part 3, Chemical methods*, Soil Science Society of America Inc. - American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, , pp. 869-919.

Lerch T.Z., Dignac M.F., Nunan N., Bardoux G., Barriuso E., Mariotti A. 2009. Dynamics of soil microbial populations involved in 2,4-D biodegradation revealed by FAME-based stable isotope probing. *Soil Biology and Biochemistry*. 41: 77-

Liu F.-Y., Hong M.-Z., Liu D.-M., Li D.-M., Shou P.-S., Yan H., Shi G.-Q. 2007. Biodegradation of methyl parathion by *Actinobacter radioresistens* USTB-04. *Journal Environmental Science (China)*. 19(10): 1257-1260

Liu H., Zhou Y., Liu R., Zhang K.Y. Lail R. 2009. *Bacillus solisalsi* sp. nov., a halotolerant, alkaliphilic bacterium isolated from soil around a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(6): 1460-1464

Lo C.C. 2010. Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 45(5): 348-359

Lopez-Avila V., Young R., Beckert W.F. 1994. Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments, *Analytical Chemistry*. 66: 1097-1106.

Lot A., Novelo A., Quiroz A. 1979. The Chinampa: An agricultural system that utilize aquatic plants. *Journal of Aquatic Plant Manager*. 17: 74-75

Martínez-Ruíz J.L. 2004. *Manual de construcción de chinampas*. IMTA. México. pp 33

Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, Daffonchio D, Verstraete W. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*. 10(6): 1571-81

Mishra P.C. 2008. *Soil pollution and soil organisms*, APH Publishing Corporation, New Delhi.

Misra D., Bhuyan S., Adhya T.K., Sethunathan N. 1992. Accelerated degradation of methyl parathion, parathion and fenitrothion by suspensions from methyl parathion- and p-nitrophenol-treated soils. *Soil Biology Biochemistry*. 24 : 1035-1042

Montemayor C. 2007. *Diccionario de nahuatlismos en el español de México*. Gobierno del Distrito Federal-Universidad Nacional Autónoma de México. 267 p

Nazarian A., Mousawi M. 2005. Study of bacterial resistance to organophosphorous pesticides in Iran. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2: 207-211.

NCBI. 2009. National Center for Biotechnology Information. Nucleotide Entrez. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

Nelson D.W., Sommers L.E. 1996. Total carbon, organic carbon and organic matter, in: D.L. Sparks (Eds.), *Methods of soil analysis, Part 3, Chemical methods*, Soil Science Society of America Inc. - American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, pp. 961-1010

NOM-021-RECNAT-2000. Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.

NPIC. 2011. National Pesticide Information Center. Soil and Pesticides. Oregon State University and the U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). <http://npic.orst.edu/envir/soil.html>

Ou L.T. 1985. Methyl parathion degradation and metabolism in soil: influence of high soil-water content. *Soil Biology and Biochemistry*. 17: 241-243.

Pakala S.B., Gorla P., Pinjari A.B., Krovdi R.K., Baru R., Yanamandra M., Merrick M., Siddavattam D. 2007. Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative *Serratia* sp. strain DS001. *Applied Microbiology Biotechnology*. 73: 1452–1462.

Pérez Taylor R., Ramírez F. 1997. Fuentes bibliográficas de Xochimilco. Cuadernos de Trabajo del Instituto de Investigaciones Antropológicas No. 6, UNAM, México. p 20

Pérez-Olvera M.A., García-Mateos R., Vázquez-Alarcón A., Colinas-León T., Pérez-Grajales M., Navarro-Garza H. 2008. Concentration of Pb, Cd, Ni, and Zn in polluted soils and their transference to broccoli heads. *Terra Latinoamericana* 26 (3): 215-225

Piercynsky G.M., Sims T.J., Vance G.F. 2000. *Soils and environmental quality*. CRC Press. USA. p. 284-287

Pino, N.J., Dominguez M.C., Penuela G.A. 2011. Isolation of a selected microbial consortium capable of degrading methyl parathion and p-nitrophenol from a contaminated soil site. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*. 46: 173-180.

Purushotham G., Pandey J.P., Parthasarathy S., Merrick M., Siddavattam D. 2009. Organophosphate hydrolase in *Brevundimonas diminuta* is targeted to the periplasmic face of the inner membrane by the twin arginine translocation pathway. *Journal of Bacteriology*. 191(20): 6292–6299.

Qiu X, Zhong Q., Li M., Bai W., Li B. 2007. Biodegradation of p-nitrophenol by methyl parathion-degrading *Ochrobactrum* sp. B. *International Biodeterioration and Biodegradation Journal*. 59: 297-301.

Qiu X.-H, Bai W.-Q., Zhong Q.-Z., Li M., He F.-Q., Li B.-T. 2006. Isolation and characterization of a bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with methyl parathion mineralizing activity. *Journal of Applied Microbiology*. 101(5): 986-994

Ragnarsdottir K.V. 2000. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides, *J. Geol. Soc.* 15: 859-876.

Ramanathan M.P., Lalithakumari D. 1999. Complete mineralization of methyl parathion by *Pseudomonas* sp. A3. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80: 1-12.

Ramos-Bello R., Cajuste L.J., Flores-Román D., García-Calderón N. 2001. Heavy metals, salts and sodium in chinampa soils in Mexico, *Agrociencia* 35: 385-395.

Rhoades J.D., Mantghi N.A., Shause P.J., Alves W. 1989. Estimating soil salinity from saturate soil paste electrical conductivity. *Soil Science Society of America Journal*. 53: 428-433.

Rosas I, Baez A., Coutino M. 1984. Bacteriological quality of crops irrigated with wastewater in the Xochimilco plots, Mexico City, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. 47(5):1074-1079.

Roticha H., Zhangb Z., Zhaoc Z., Li J. 2004. Pesticides in peat and soil samples and their degradation in aqueous solutions at different temperatures and ph values. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 84(4): 289–301.

SAS Institute, *Statistic Guide for Personal Computer*, Version 6.04, Edn. SAS Institute, Cary, 1989.

Shen J., Yuan L., Zhang J., Li H., Bai Z., Chen X., Zhang W., Zhang F. 2011. Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiology*. 156; 997–1005.

ShiX.-Z., GuoR.-J., TakagiK., Zuo-Qing MiaoZ.-Q., Shi-Dong LiS.-D.. 2011. Chlorothalonil degradation by *Ochrobactrum lupini* strain TP-D1 and identification of its metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(8): 1755-1764.

Sims R.C., Doucette W.J., McLean J.E., Grenney W.J, Dupont R.R., 1988. Treatment potential for 56 EPA listed hazardous chemicals in soil, United States Environmental Protection Agency, EPA/600/S6-88/001.

Singh B.K., Walker A. 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds, *FEMS MicrobiologyReviews*. 30: 428-471.

SMADF. 2004. Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal. Programa de manejo. Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco, México.

SMN. 2011. Servicio Meteorológico Nacional. <http://smn.cna.gob.mx/>

Sreenivasulu C., Aparna Y. 2001. Bioremediation of methyl parathion by free and immobilized cells of *Bacillus* sp. isolated from soil, *Bulletin Environ. Contaminant Toxicology*. 67: 98–105.

Stephan-Otto E. 2005. Xochimilco hoy: una realidad insustentable. Facultad de Ciencias Políticas y Sociales, UNAQM, pp. 111.

Sumner M.E., Miller W.P. 1996. Cation exchange capacity and exchange coefficients, in: D.L. Sparks (Eds.), *Methods of soil analysis, Part 3, Chemical methods*, Soil Science Society of America Inc. - American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, pp. 1201-1229.

Thirup L., Johnsen K., Torsvik V., Spliid N.H., Jacobsen C.S. 2001. Effects of fenpropimorph on bacteria and fungi during decomposition of barley roots. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 1517-1524.

Topp E. 2012. Bacteria in agricultural soils: Diversity, role and future perspectives. *Canadian Journal of Soil Sciences*. 303-309

Will C, Thürmer A, Wollherr A, Nacke H, Herold N, Schrumpf M, Gutknecht J, Wubet T, Buscot F, Daniel R. 2010. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology*. 76(20):6751-9.

Yang C., Dong M., Yuan Y., Huang Y., Guo X., Qiao C. 2007. Reductive transformation of parathion and methyl parathion by *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*. 29: 487-493.

Zhang R, Cui Z., Jiang J., He J., Gu X, Li S.2005. Diversity of organophosphorus pesticide-degrading bacteria in a polluted soil and conservation of their organophosphorus hydrolase genes. *Canadian Journal of Microbiology*. 51 (4): 337-43.

Zhang R. Cui Z., Zhang X., Jiang J., Gu J.-D., Li S. 2006. Cloning of the organophosphorus pesticide hydrolase gene clusters of seven degradative bacteria isolated from a methyl parathion contaminated site and evidence of their horizontal gene transfer. *Biodegradation*. 17: 465-472



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Soil Biology

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejsobi>

Original article

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

C. Chávez-López^a, A. Blanco-Jarvio^a, M. Luna-Guido^b, L. Dendooven^b, N. Cabriol^{c,*}^a Institute of Engineering, UNAM, Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510 D.F., Mexico^b Laboratory of Soil Ecology, Cinvestav, Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, C.P. 07360 México, D.F., Mexico^c Faculty of Sciences, UNAM, Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510 México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2011

Received in revised form

29 May 2011

Accepted 3 June 2011

Available online 24 June 2011

Handling editor: Bryan Griffiths

Keywords:

4-Nitrophenol

C dynamics

N dynamics

Pesticide degradation

Methyl parathion

ABSTRACT

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

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

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

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

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

* Corresponding author. Tel.: +52 55 54848114; fax: +52 55 5747 3313.
E-mail address: natcabriol@yahoo.com (N. Cabriol).

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

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

2. Materials and methods

2.1. Soil sampling site

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

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

2.2. Soil sampling

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

2.3. Experimental set-up and treatments

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

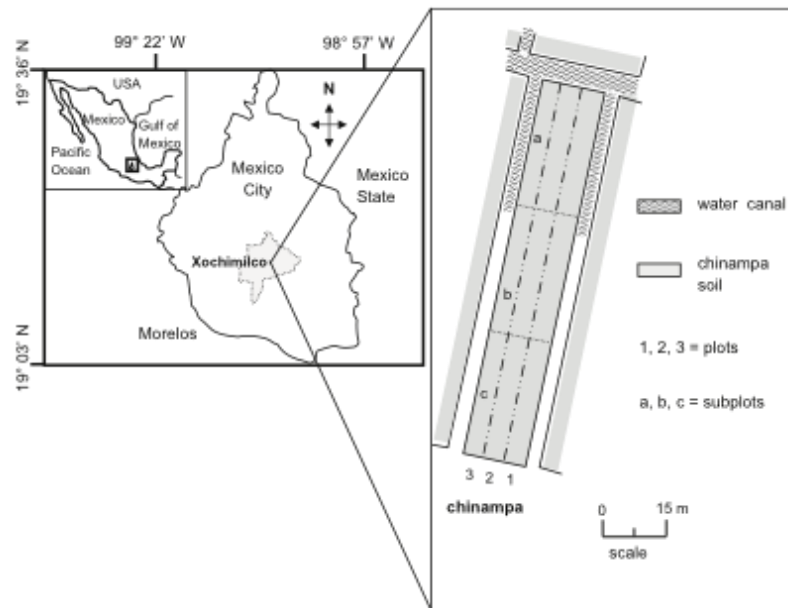


Fig. 1. Location of the chinampa soil in Mexico City (Mexico) and outline of plots and subplots.

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

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

^a Mean of three soil subplots.

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

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

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

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

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

2.4. Chemicals used

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

2.5. Soil analysis

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

2.6. Determination of methyl parathion and 4-nitrophenol

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

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

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

2.7. Statistical analysis

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

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

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

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

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

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad (1)$$

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

3. Results

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

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

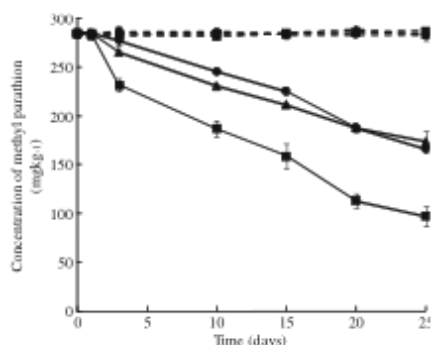


Fig. 2. Concentration of methyl parathion in a chinampa soil (plot 1 (■), plot 2 (▲) and plot 3 (●)) incubated at 19 ± 2 °C for 25 days. The solid lines correspond to non-sterilized soil and dotted lines correspond to sterilized soil. Bars are 1 standard deviation of 3 replicates from 3 sub-plot samples.

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

4. Discussion

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

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

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

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

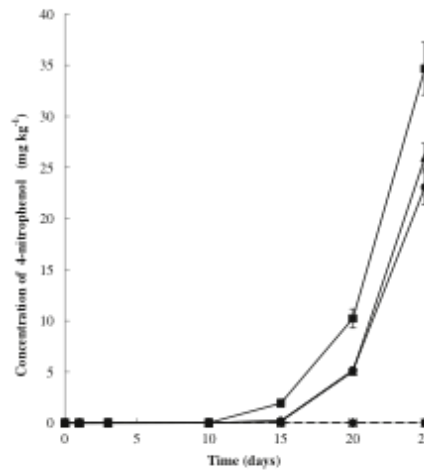


Fig. 3. Concentration of 4-nitrophenol in a chinampa soil (plot 1 (■), plot 2 (▲) and plot 3 (●)) incubated at 19 ± 2 °C for 25 days. The solid lines correspond to non-sterilized soil and dotted lines correspond to sterilized soil. Bars are 1 standard deviation of 3 replicates from 3 sub-plot samples.

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

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

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

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

Table 3

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

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

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

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

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

^d EC: Electrolytic conductivity.

^e SEE: standard error of the estimate.

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

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

5. Conclusion

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

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

Acknowledgements

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

References

- [1] V. Alcántara, S.C. Heydrich, R.W. Gibson, M. Mazari-Hiriart, C.A. Ponce de León, Occurrence of Organophosphorus Pesticide (OPP) Compounds from the Xochimilco Wetland Area, South of Mexico City, 3rd Wetland Pollutant Dynamics and Control WETPOL, Barcelona, Spain, 2009, pp. 20–24.
- [2] F.L. Edwards, P.B. Tchounwou, Environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure—a Scientific Review, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2 (2005) 430–441.
- [3] K. Jaga, C. Dharmani, Methyl parathion: an organophosphate insecticide not quite forgotten, *Rev. Environ. Health* 21 (2006) 57–67.
- [4] C. Sreenivasulu, V. Aparna, Bioremediation of methyl parathion by free and immobilized cells of *Bacillus* sp. isolated from soil, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67 (2001) 98–105.
- [5] R. Zhang, Z. Cui, J. Jiang, J. He, X. Gu, S. Li, Diversity of organophosphorus pesticide-degrading bacteria in a polluted soil and conservation of their organophosphorus hydrolase genes, *Can. J. Microbiol.* 51 (2005) 337–343.
- [6] S.B. Pakala, P. Gorla, A.B. Pinjari, R.K. Krovdi, R. Bara, M. Yanamandra, M. Merrick, D. Siddavattam, Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative *Serratia* sp. strain D5001, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73 (2007) 1452–1462.
- [7] M.P. Ramanathan, D. Lalithakumari, Complete mineralization of methyl parathion by *Pseudomonas* sp. A3, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (1999) 1–12.
- [8] M.L. Ortiz-Hernández, M. Monterosas-Brison, G. Yáñez-Ocampo, E. Sánchez-Salinas, Degradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 17 (2001) 147–155.
- [9] X. Qiu, Q. Zhong, M. Liu, W. Baia, B. Lic, Biodegradation of p-nitrophenol by methyl parathion-degrading *Ochrobactrum* sp. B, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 59 (2007) 297–301.
- [10] K. Venkateswarlu, T.K.G. Siddarama, N. Sethunathan, Persistence and biodegradation of carbofuran in flooded soils, *J. Agric. Food Chem.* 25 (1977) 533–536.
- [11] H.C. Suter, R.E. White, L.K. Heng, Organic compounds in the environment. Sorption and degradation characteristics of Phosmet in two contrasting Australian soils, *J. Environ. Qual.* 31 (2002) 1630–1635.
- [12] B.K. Singh, A. Walker, Microbial degradation of organophosphorus compounds, *FEMS Microbiol. Rev.* 30 (2006) 428–471.
- [13] G.M. Benke, S.D. Murphy, The influence of age on the toxicity and metabolism of methyl parathion and parathion in male and female rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31 (1975) 254–269.
- [14] L.T. Ou, Methyl parathion degradation and metabolism in soil: influence of high soil-water content, *Soil Biol. Biochem.* 17 (1985) 241–243.
- [15] B.K. Singh, Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications, *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 156–164.
- [16] Smn, Servicio Meteorológico Nacional, 2010, <http://smn.cna.gob.mx/>.
- [17] R. Ramos-Bello, L.J. Cajuste, D. Flores-Román, N. García-Calderrón, Heavy metals, salts and sodium in chinampa soils in Mexico, *Agrociencia* 35 (2001) 385–395.
- [18] R. Bindhya, S.A. Sunny, V.S.G. Thanga, In vitro study on the influence of methyl parathion on soil bacterial activity, *J. Environ. Biol.* 30 (2009) 417–419.
- [19] J.D. Rhoades, N.A. Mantoglou, P.J. Shouse, W. Alves, Estimating soil salinity from saturated soil paste electrical conductivity, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53 (1989) 428–433.
- [20] J.M. Bremner, Nitrogen-total in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3 – Chemical Methods*, Soil Science Society of America Inc. – American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, 1996, pp. 1085–1121.
- [21] G.W. Gee, J.W. Bauder, Particle size analysis in: A. Klute (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 1. Physical and Mineralogical Methods*, second ed. Soil Science Society of America Inc. – American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, 1986, pp. 383–411.
- [22] D.W. Nelson, L.E. Sommers, Total carbon, organic carbon and organic matter, in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical methods*, Soil Science Society of America Inc. – American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, 1996, pp. 961–1010.
- [23] S. Kuo, Phosphorus, in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical methods*, Soil Science Society of America Inc. – American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, 1996, pp. 869–919.
- [24] M.E. Sumner, W.P. Miller, Cation exchange capacity and exchange coefficients, in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods*, Soil Science Society of America Inc. – American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, 1996, pp. 1201–1229.
- [25] L.W. Zelazny, L. He, A. Vanwormhoudt, Charge analysis of soils and anion exchange, in: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods*, Soil Science Society of America Inc. – American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, 1996, pp. 1231–1253.
- [26] Z.L. Zhang, H.S. Hong, J.L. Zhou, G. Yua, Occurrence and behaviour of organophosphorus insecticides in the River Wuchuan, southeast China, *J. Environ. Monit.* 4 (2002) 498–504.
- [27] V. Lopez-Avila, R. Young, W.F. Beckert, Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1097–1106.
- [28] SAS Institute, *Statistic Guide for Personal Computer Version 6.04*, Edn. SAS Institute, Cary, 1989.
- [29] L.M. Chu, Natural revegetation of coal fly ash in a highly saline disposal lagoon in Hong Kong, *Appl. Vegetation Sci.* 11 (2008) 297–306.
- [30] D. Misra, S. Bhuyan, T.K. Adhya, N. Sethunathan, Accelerated degradation of methyl parathion, parathion and fenitrothion by suspensions from methyl parathion- and p-nitrophenol-treated soils, *Soil Biol. Biochem.* 24 (1992) 1035–1042.
- [31] M. Kah, S. Beukle, C.D. Brown, Factors influencing degradation of pesticides in soil, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 4487–4492.
- [32] R.C. Sims, W.J. Doucette, J.E. McLean, W.J. Grenney, R.R. Dupont, Treatment Potential for 56 EPA Listed Hazardous Chemicals in Soil, United States Environmental Protection Agency, 1988, EPA/600/56-88/001.
- [33] K.V. Ragnarsdottir, Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides, *J. Geol. Soc.* 15 (2000) 859–876.
- [34] P.C. Mishra, *Soil Pollution and Soil Organisms*, APH Publishing Corporation, New Delhi, 2008.
- [35] M.M. Andrea, T.B. Peres, L.C. Luchini, M.A. Marcondes, A. Pettinelli, L.E. Nakagawa, Impact of Long Term Applications of Cotton Pesticides on Soil Biological Properties, Dissipation of ¹⁴C-methyl Parathion and Persistence of Multi-pesticide Residues, Impact of Long Term Pesticide Usage on Soil Properties Using Radiotracer Techniques Report of a Final Research Coordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Hangzhou, Zhejiang, Peoples' Republic of China, 1996, pp. 13–34.
- [36] Y. Kuzayakov, J.K. Friedel, K. Stahr, Review of mechanisms and quantification of priming effects, *Soil Biol. Biochem.* 32 (2000) 1485–1498.
- [37] L. Bruining, Connections between the C, N and P Biogeochemical Cycles of System Earth and Their Relevance for Environmental Problems, Institute of Environmental Sciences, Leiden University, The Netherlands, 2005.