



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

Cromatografías en papel como indicador  
de características físicas, químicas y  
biológicas de suelos agrícolas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

**Yólotli Amelina Narvárez Carreño**

**DIRECTORA DE TESIS**

**Dra. Mariana Benítez Keinrad**

CIUDAD DE MÉXICO

2019





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

### **1. Datos del alumno**

Narváez  
Carreño  
Yólotli Amelina  
5539530063  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
311055920

### **2. Datos del tutor**

Dra.  
Mariana  
Benítez  
Keinrad

### **3. Datos del sinodal 1**

Dr.  
Bruno Manuel  
Chávez  
Vergara

### **4. Datos del sinodal 2**

Dra.  
Ana Laura  
Wegier  
Briuolo

### **5. Datos del sinodal 3**

Dra.  
Thalita Fernanda  
Abbruzzini

### **6. Datos del sinodal 4**

M. en C.  
Luis Manuel  
Rodríguez  
Sánchez

### **7. Datos del trabajo escrito**

Cromatografías en papel como indicador de características físicas, químicas y biológicas de suelos agrícolas.

83 pp

2019

## **Agradecimientos**

Agradezco al proyecto *Biodiversidad y ecología funcional de suelos: conservación y resiliencia en sistemas naturales, agroecológicos y agroforestales*, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y todo el equipo de trabajo que lo integra. A la Dra. Morena Avitia Cao Romero, a la M. en C. Ingue Karen Carrasco Espinosa, a la M. en C. Adriana Uscanga Castillo, a la Dra. Denise Arroyo Lambaer y al biólogo Rodrigo González Chauvet por su enorme trabajo en la colecta de campo y procesamiento de muestras. Asimismo, al Laboratorio de Ecología Funcional del Instituto de Ecología de la UNAM, coordinado por el Dr. Julio Campo Alves, por generar los datos físicos, químicos y de actividad enzimática del suelo y al Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad bajo la coordinación de la Dra. Ana Elena Escalante, quienes realizaron los análisis de secuenciación de DNA de bacterias. Por último, al Dr. Víctor Manuel Peña Ramírez, del Instituto de Geología, quien realizó los análisis físicos, físico-químicos y la descripción de los perfiles de suelo y quien estuvo siempre dispuesto a ayudarme y compartirme sus datos.

Al taller de titulación de la licenciatura en Biología de la Facultad de Ciencias, UNAM “Análisis Integral de Sistemas Socioambientales”, bajo la coordinación del Dr. Luis Zambrano González, y a los investigadores que la integran, Dra. Mariana Benítez Keinrad, Dra. María Fernanda Figueroa Díaz Escobar, Dra. Ana Wegier Briuolo, Dr. Fernando Córdova Tapia y Dr. Rodolfo Omar Arellano Aguilar, por la formación académica rigurosa y crítica que nos transmitieron.

A los académicos Dra. Ana Laura Wegier Briuolo, Dra. Thalita Fernanda Abbruzzini, Dr. Bruno Chávez Vergara y M. en C. Luis Manuel Rodríguez Sánchez, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, a la retroalimentación y los comentarios constructivos que hicieron para mejorar el escrito.

Al laboratorio de Biogeoquímica del Instituto de Geología, UNAM, a cargo del Dr. Bruno Chávez Vergara, por los aprendizajes académicos y personales que me compartieron durante mi estancia.

Al M. en C. Luis Manuel Rodríguez Sánchez, del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, que con ayuda del estudiante Manuel, iniciamos en el aprendizaje de la técnica cromatográfica. Agradecemos también la invitación a escuchar a Sebastiao y su amplio conocimiento sobre la interpretación de los cromatogramas. A Sebastiao Pinheiro, que nos dió consejitos cuando no sabíamos por dónde continuar.

Al Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad (LANCIS), del Instituto de Ecología de la UNAM, en donde se desarrolló el trabajo de laboratorio y de análisis de imágenes. En particular agradezco a Karen Ingue Carrasco Espinosa, Francisco Reyes Sánchez, Juan Antonio Arias Del Angel, Cecilia González González y Natsuko Rivera Yoshida por su apoyo y acompañamiento en la realización de los análisis estadísticos y los análisis de imágenes.

Al Grupo de Estudios Ambientales GEA A.C., a la asociación REDES A.C. y al grupo de trabajo El Molote Agroecológico, por los espacios que nos facilitaron para retroalimentar la técnica cromatográfica, así como el estudio y aplicación de los cromatogramas en campo.

Agradezco el apoyo de la beca para titulación otorgada por el proyecto CONACyT (247672).

## Gracias ...

Mariani, que sin tu acompañamiento académico y emocional no hubiese podido resultar un proceso tan fructífero como lo fue esta tesis, me siento bien contenta de lo mucho que construimos juntas, de lo mucho que aprendí, y sigo aprendiendo, de tu palabra y de tu corazón transparente.

integrantes de LaParcela. Gracias Cris por ser tan amorosa y acompañar un montón de decisiones que tomé; Nat por ser sincerísima en toda ocasión, escucharme, reflexionar juntas y reírnos; a Irene, que siempre estuviste dispuesta a darme consejitos de la vida; David, por rifarte explicándome la dimensión fractal en el vestíbulo, aquella vez en Colima, y el método de bacterias y mi tarea de álgebra en una misma lluviosa sesión; Francisco, que con tu paciencia y disposición los análisis estadísticos fluyeron; Juan, por explicarme dimensión fractal y transformada de Fourier, y por ser amable en cualquier circunstancia; Ana U. por darle el visto bueno a mi mapita y por enseñarme a hacer crepas deliciosas; al resto de los integrantes, por la retroalimentación, observaciones y sugerencias en cada seminario durante taaantísimas presentaciones para lograr *estructurar* las ideas alrededor de la tesis.

equipi M, por morirnos de miedo, angustia y ansiedad juntos, ser un caos y, al final, lograrlo. Les llevo en mi corazón, gracias por tanto en este proceso de aprendizaje juntas.

Blanqui, por acompañarnos en la tesis, en las alegrías, en las tristezas, en las dudas, en las incertidumbres y en las certidumbres, en la vida. Que este caminar juntas sea por siempre y nos lleve a todos lados.

Jassobebé, por tu alegría contagiosa, por las risas y tristezas que compartimos desde que nuestros caminos confluyeron, por el apoyo mutuo en Curso de Oriente, por las cacas de lagartija colectadas y las anécdotas asociadas, por tomarme una foto y reírte a morir cuando estaba intentando recuperar mi celular del río, por más cenas de navidad.

Javi, por estar ahí en mis momentos más tristes y abrumadores, que es casi siempre, pues. Por siempre invitarme a lugares chidos aunque sea una abuela. Tienes la maravillosa cualidad de

escucharme y ser muy sensible a mis problemas existenciales. Y por ser muy honesto, como aquella vez que me llamaste *delincuente*.

a todes mis amixes en los diferentes espacios que confluimos y que me llenan la existencia: Andrés, por siempre confiar en mí y en mis habilidades ingenuas para trabajar con niños y adolescentes; Víctor Valdez por ser cómplices del mundo tantos años, agradezco infinitamente el momento en el que el *destino* nos encontró, para seguir buscándonos juntos; Alonso, por ser amigo y compañero, exigente y sensible de *mil almas*, que ilumina mi camino con el suyo andando y hace provocaciones que agudizan mi perspectiva política de la vida toda; Flaka y Ashley, mis seños favs por siempre, deseo con todo mi corazoncito de abuela que nunca nos perdamos el hilo, con o sin bendiciones; a Moy, que me acompañaste cuando más lo necesité, cuando más vulnerable me he sentido en la facultad; a mis jardincites preciosxs, que son amor, alegría, chisme y tragadera; a los teatreros de *Un hombre es un hombre*, sin ustedes y sin los ensayos en la recta final de la tesis, probablemente, la hubiese acabado antes peero más tristita; a todxs lxs compañerxs y amigxs fugaces que dejaron una huella en mi estar siendo.

colectiva Familia. Yatzil, que he decidido *toda la vida no aguantarte a vos*. Mamá, por el acompañamiento constante e incondicional que tanto necesito en mi corazón y en mi cuerpo, por escucharme y pensarte, por quererme y cuidarte, estamos haciendo el mundo con cada abrazo. Cómo les agradezco las veces que estuvieron ahí para recordarme vivir con alegría y la alegría de vivir.

A todxs quienes han construido y están construyendo una herencia de amor, trabajo y  
anarquía

A *yao* Miyu gordita suavcita pederá

## Índice

Índice de figuras .....	viii
Índice de tablas .....	x
Resumen.....	xi
1. <b>Introducción</b> .....	1
1.1 <i>Agroecosistemas y propiedades del suelo</i> .....	2
1.2 <i>Indicadores de calidad del suelo</i> .....	5
1.3 <i>Cromatografías de suelo en papel</i> .....	6
1.3.1 <i>Interpretación o evaluación visual empírica</i> .....	8
2. <b>Justificación</b> .....	12
3. <b>Pregunta de investigación</b> .....	13
4. <b>Hipótesis</b> .....	13
5. <b>Objetivos</b> .....	13
6. <b>Método</b> .....	14
6.1 <i>Sitios de estudio</i> .....	14
6.1.1 <i>Estado de Veracruz</i> .....	15
6.1.2 <i>Estado de Guanajuato</i> .....	16
6.2 <i>Muestreo de suelo</i> .....	17
6.3 <i>Análisis de laboratorio</i> .....	19
6.3.1 <i>Cromatografía de suelo en papel</i> .....	19
6.3.2 <i>Análisis de imágenes digitales</i> .....	23
6.3.3 <i>Parámetros físicos, químicos y biológicos</i> .....	24
6.3.4 <i>Manejo agrícola</i> .....	25
6.4 <i>Análisis estadístico</i> .....	26
7. <b>Resultados</b> .....	28
7.1 <i>Pruebas de reproducibilidad</i> .....	28
7.2 <i>Cromatogramas de los cultivos</i> .....	28
7.3 <i>Correlaciones a nivel ecorregión</i> .....	40
7.4 <i>Correlaciones en cultivos perennes</i> .....	41
7.5 <i>Correlaciones en cafetales</i> .....	44
7.6 <i>PCA de atributos de forma y color</i> .....	49
8. <b>Discusión de resultados</b> .....	51
8.1 <i>Críticas y limitaciones</i> .....	56
8.2 <i>Perspectivas</i> .....	57
9. <b>Conclusiones</b> .....	60
10. <b>Referencias</b> .....	61
Anexos.....	65

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Zonas o anillos concéntricos de un cromatograma. Los números corresponde a las zonas: 1- zona central, 2- zona interna, 3- zona intermedia, 4- contornos o terminaciones, 5- forma y color de los anillos interiores. Imagen tomada de Abad, 2014.....	9
<b>Figura 2.</b> Distribución geográfica de los sitios de estudio según la clasificación por ecorregiones.....	14
<b>Figura 3.</b> Muestreo de suelo. La señalización corresponde a los 9 puntos equidistantes de una parcela.....	18
<b>Figura 4.</b> Vasos de precipitado con 50 mL de NaOH 1% y muestra de suelo.....	20
<b>Figura 5.</b> Cromatograma molde (a) y cromatograma marcado para los cuadros de 2x2 (b)....	20
<b>Figura 6.</b> Estructura de las cajas Petri para impregnar el cromatograma.....	21
<b>Figura 7.</b> Vista del ascenso por capilaridad durante el corrimiento de la muestra .....	22
<b>Figura 8.</b> Cromatogramas revelándose a luz indirecta.....	22
<b>Figura 9.</b> Misma muestra de un suelo de café. Sin dilución (a), con dilución 1:1 (b) .....	22
<b>Figura 10.</b> Contornos obtenidos del procesamiento de imágenes de diferentes muestras.....	24
<b>Figura 11.</b> Pruebas de reproducibilidad, 10 repeticiones de una misma muestra de suelo.	28
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas (1-5) correspondientes a cultivo de maíz en La Quemada, San Felipe, Guanajuato.....	29
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas (1-4) correspondientes a cultivo de frijol en La Quemada, San Felipe Guanajuato. Cromatograma vg corresponde al sitio de vegetación primaria.....	29
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas (1-12) correspondientes a cultivo de café en Veracruz.....	29
<b>Figura 15.</b> Cromatogramas (1-6) correspondientes a cultivo de aguacate en Veracruz.....	29
<b>Figura 16.</b> Cromatogramas correspondientes a cultivo de maíz y frijol de Guarapo, Guanajuato .....	30
<b>Figura 17.</b> Correlaciones no paramétricas (Spearman) a nivel ecorregión. Los círculos más grandes presentan un $p < 0.05$ , el color indica si la relación es (-) o (+) y mientras más saturado el color, más alto será el valor rho.....	32
<b>Figura 18.</b> Dispersión de canal de color RGB con humedad ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.76$ ).....	34
<b>Figura 19.</b> Dispersión de datos de canal de color RGB con densidad aparente ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.88$ ), de color del anillo central con densidad aparente ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.46$ ) y dimensión fractal con densidad aparente ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.46$ ).....	35
<b>Figura 20.</b> Dispersión de datos de canal de color R con pedregosidad ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.50$ ), canal de color G con pedregosidad ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.54$ ) y canal de color B con pedregosidad ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.50$ ) .....	36
<b>Figura 21.</b> Dispersión de datos de materia orgánica con canal de color RGB ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.81$ ) .....	36
<b>Figura 22.</b> Dispersión de datos contenido de materia orgánica con canal de color R ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.76$ ), G ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.8$ ) y B ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.82$ ) .....	37

<b>Figura 23.</b> Dispersión de datos del color del anillo central y nitrógeno total ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.36$ ) .....	37
<b>Figura 24.</b> Dispersión de datos de dimensión fractal con enzima BGLC ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.34$ ), POX ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.46$ ), LEU ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.49$ ), NAC ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.6$ ) y enzima FOS ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.62$ ). Las unidades de la actividad enzimática son $\mu\text{mol } g^{-1} \text{ suelo } h^{-1}$ .....	38
<b>Figura 25.</b> Dispersión de datos de color RGB con diversidad bacteriana con índice de Shannon ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.67$ ) y con índice de Chao1 ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.37$ ).....	39
<b>Figura 26.</b> Dispersión de datos de color RGB con pH ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.59$ ) y dimensión fractal con pH ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.6$ ).....	39
<b>Figura 27.</b> Dispersión de datos canal de color RGB con conductividad eléctrica ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.44$ ), dimensión fractal con conductividad eléctrica ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.41$ ), compresión .jpg a color con conductividad eléctrica ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.36$ ) y compresión .zip a color con conductividad eléctrica ( $p < 0.04$ , $\rho = 0.4$ ).....	40
<b>Figura 28.</b> Visualización de las correlaciones con método Spearman en cultivos perennes. Los círculos más grandes presentan un $p < 0.05$ , el color indica si la relación es (-) o (+) y mientras más saturado el color, más alto el valor rho es.....	41
<b>Figura 29.</b> Dispersión de datos canal de color RGB con materia orgánica ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.56$ ), G con materia orgánica ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.57$ ) y B con materia orgánica ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.6$ ).....	42
<b>Figura 30.</b> Dispersión de datos canal de color RGB con densidad aparente ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.67$ ).....	43
<b>Figura 31.</b> Dispersión de datos de dimensión fractal y nitrógeno total ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.6$ ) y con pH ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.48$ ).....	43
<b>Figura 32.</b> Dispersión de datos de compresión de imágenes .jpg a b/n con contenido de arcilla ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.57$ ), con diversidad bacteriana por índice de Shannon ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.48$ ), con contenido de arena ( $p < 0.05$ , $\rho = -0.42$ ) y con densidad aparente ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.44$ ).....	44
<b>Figura 33.</b> Visualización de las correlaciones con método Spearman, en cafetales. Los círculos más grandes presentan un $p < 0.05$ , el color indica si la relación es (-) o (+) y mientras más saturado el color, más alto el valor rho es.....	45
<b>Figura 34.</b> Dispersión de datos de canal de color R con densidad aparente ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.59$ ), G con densidad aparente ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.65$ ) y B con densidad aparente ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.57$ ).....	46
<b>Figura 35.</b> Dispersión de datos de compresión .jpg b/n con enzima NAC ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.52$ ), compresión .zip b/n con enzima NAC ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.64$ ) y compresión .zip a color con enzima NAC ( $p < 0.05$ , $\rho = 0.6$ ).....	46
<b>Figura 36.</b> Relaciones encontradas entre atributos de forma y color del cromatograma con características del suelo .....	48

<b>Figura 37.</b> Agrupamiento de los atributos de forma y color de los cromatogramas por cultivos anuales y perennes (izquierda). Contribución de los atributos de forma y color a los componentes principales (derecha).....	49
<b>Figura 38.</b> Agrupamiento de las muestras individuales por ecorregión. (A) corresponde a sierra con bosque mesófilo del Sistema Neovolcánico Transversal, (B) lomeríos del Norte de Veracruz con selva mediana y alta perennifolia y (C ) lomeríos y planicies del Altiplano con matorral xerófilo y pastizal.....	50
<b>Figura 39.</b> Agrupamiento de los individuos por cultivo. "A" corresponde a aguacate, "C" a café, "F" a frijol y "M" a maíz.....	50

### Índice de tablas

Tabla 1. Interpretación o evaluación visual empírica .....	10
Tabla 2. Muestras colectadas.....	18
Tabla 3. Índice de manejo para las parcelas de café. Recuperado de Sosa-Aranda <i>et al.</i> , 2018 .....	26
Tabla 4. Atributos cuantificados de los cromatogramas como imágenes digitales. "O1, O2 y O3" significa que corresponde al sitio de vegetación primaria para la ecorregión de cafetales; "AVO" para el suelo de vegetación primaria en ecorregión de cultivos de aguacate; y, "OGN" es el sitio de vegetación primaria en la misma ecorregión que los suelos de maíz y frijol). Asimismo, "C" corresponde a la muestra de suelo de cultivos de café, "A" a aguacate, "M" a maíz y "F" a frijol.....	31

## Resumen

Dada la importancia de los suelos en el mantenimiento de los ecosistemas y los agroecosistemas, es necesario contar con indicadores accesibles para la evaluación de su calidad. Las cromatografías de suelo en papel o cromatografías de Pfeiffer son una técnica cualitativa de análisis de calidad que funciona a través de la extracción y fraccionamiento de materia orgánica del suelo. Son una herramienta económica y de relativamente fácil realización que ha sido trabajada de manera empírica por campesinos, campesinas y técnicos a través de la interpretación de patrones de forma y color. Sin embargo, no se ha evaluado sistemáticamente su aplicación en diferentes suelos de México y tampoco se conoce su relación con datos cuantitativos de laboratorio como actividad enzimática y diversidad bacteriana.

En esta investigación se pusieron a prueba correlaciones entre atributos cuantificados de forma y color de los cromatogramas y datos de laboratorio sobre características físicas, químicas y biológicas del suelo. Se colectaron 38 muestras de cultivos de importancia económica y cultural (maíz, frijol, café y aguacate), así como 6 muestras de sitios de vegetación primaria en diferentes ecorregiones de México: en el norte y sur del estado de Guanajuato para cultivos anuales y en cultivos perennes en el estado de Veracruz. De cada parcela se recabaron muestras compuestas de suelo. Con éstas se realizó un cromatograma por parcela y se obtuvieron los datos de laboratorio que incluyen: concentración de materia orgánica, concentración de nitrógeno, fósforo total, carbono orgánico, densidad aparente, conductividad eléctrica, pedregosidad, pH, actividad enzimática y diversidad bacteriana por secuenciación de la región 16S de DNA. En el presente trabajo, se estandarizó la técnica de cromatografía para los suelos colectados y la transformación de los cromatogramas obtenidos a imágenes digitales. Se realizó el procesamiento de imágenes digitales con el software ImageJ, el cual consistió en la cuantificación de los atributos de los cromatogramas mediante la estimación de la dimensión fractal de los contornos, el color del anillo central y el valor promedio de los canales de color R, G, B y RGB de toda la imagen, así como el tamaño de la compresión de la imagen en .jpg y .zip. Los parámetros resultantes se sometieron a un análisis de correlaciones no paramétricas (Spearman) y análisis de componentes principales (PCA) junto con otras propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Como resultados, se resalta la importancia de sistematización del tiempo de escaneado con los controles de reproducibilidad, se descartó cuantificar el grosor de los anillos concéntricos puesto que presentó variación por el método mismo y se propuso una modificación del

protocolo para suelos con alto aporte de hojarasca, como los asociados a cultivos de árboles frutales. La relación de los atributos cuantificados y los datos de laboratorio se resumen en que:

- a. los canales de color RGB y R, G y B están correlacionados significativamente con humedad, nitrógeno total, fósforo total, densidad aparente, pedregosidad, capacidad máxima de retención de agua, conductividad eléctrica, materia orgánica, pH y actividad enzimática;
- b. el color del anillo central está correlacionado con densidad aparente, conductividad eléctrica, nitrógeno total, materia orgánica, pH y la actividad de las enzimas polifenol oxidasa y fosfatasa;
- c. la dimensión fractal de las terminaciones está relacionada con la textura limo, nitrógeno total, materia orgánica y actividad enzimática; por otro lado, se relaciona negativamente con el pH y el contenido de arena;
- d. por último, la compresión en .jpg está relacionada con conductividad eléctrica, densidad aparente, N-acetil glucosaminidasa y diversidad bacteriana por índice de Shannon.

Los resultados del PCA sugieren que la agrupación de los cromatogramas está dada principalmente por atributos de color (PC1, 50.8%) y de forma (PC2, 36.6%). La cuantificación del color digital y la dimensión fractal mostraron ser una herramienta útil que correlaciona atributos de los cromatogramas con características y propiedades del suelo que, a su vez, están asociados a funciones que sostienen la calidad, como la materia orgánica, nutrientes y la actividad enzimática. El color del anillo central, propuesto en la literatura como asociado a nitrógeno disponible, en esta investigación no mostró una correlación significativa con la concentración de nitrógeno total, por lo que es necesario ahondar en la relación entre concentración de las formas de nitrógeno y el nitrógeno total para entender la relación entre ambas variables.

La correlación de atributos de los cromatogramas, que hasta ahora habían sido evaluados visualmente, con datos cuantitativos de laboratorio ha retroalimentado la interpretación empírica de la técnica cromatográfica y evidenciado a las cromatografías de suelo como un indicador accesible y económico que puede ser utilizado para evaluar cualitativamente la calidad del suelo.

**Palabras clave:** *indicador cualitativo, cromatografías de Pfeiffer, agroecosistemas*

## 1. Introducción

La agricultura es una actividad productiva con prácticas y manejos muy diversas, por lo cual derivan en diferentes consecuencias en los procesos que regulan las funciones ecológicas de los agroecosistemas. A pesar de la diversidad de manejos agrícolas, éstos se pueden diferenciar en dos grandes grupos, que suelen agrupar un conjunto de prácticas y epistemologías: el manejo agroindustrial y el manejo agroecológico. El manejo agroindustrial es considerado aquel que implementa los monocultivos, la labranza mecanizada e intensiva y el uso constante y en grandes cantidades de insecticidas, herbicidas y fertilizantes sintéticos [Bender *et al.*, 2016]. Las prácticas agroindustriales han tenido consecuencias como: la erosión y la disminución de la materia orgánica en el suelo, la pérdida de biodiversidad a nivel local y paisajístico, la contaminación, salinización y compactación del suelo e inundaciones, además de la desertificación del suelo, la pérdida de soberanía alimentaria y la dependencia económica a insumos de paquetes tecnológicos [Labrador, 2008; Chappell *et al.*, 2013].

Por otro lado, los manejos agroecológicos y prácticas ecológicas proponen: la diversificación y rotación de cultivos para mantener la agrobiodiversidad, el control biológico de plagas para sustituir el uso de pesticidas y herbicidas sintéticos, la gestión paisajística del territorio que considere la matriz en la que se encuentra inserto el sistema agrícola y la aplicación de biofertilizantes y compostas para disponibilidad de nutrientes y agua [Chappell *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016]. Estos manejos o prácticas pueden o no enmarcarse en la *agroecología*. La agroecología enunciada desde los organismos internacionales se refiere al conjunto de tecnologías y conocimiento científico aplicadas a la agricultura y sistemas silvopastoriles para lograr una producción ecológica y sostenible (FAO, 2015). Para nosotras, es necesario contextualizarla históricamente en los movimientos sociales, organizaciones campesinas y de productores a pequeña escala, puesto que éstos son quienes conforman la red campesina alimentaria que producen el 70% de los alimentos para consumo humano [ETC Group, 2017]. Entendemos la agroecología como una forma de vivir, transformar y construir autogestiva y colectivamente los sistemas alimentarios, cuyos pilares son: la aplicación de prácticas de producción agroecológicas, el reconocimiento de la autodeterminación y autonomía de los pueblos y sus territorios, el acceso a los bienes comunes, el desarrollo de diversos saberes y conocimientos, el respeto a las cosmovisiones en la relación naturaleza-ser humano, así como favorecer la toma de decisiones entre hombres y mujeres, incentivar las cadenas de producción,

distribución y consumo responsable. Estos pilares tienen como objetivo “poner en manos de los pueblos que alimentan el mundo el control de las semillas, la biodiversidad, la tierra y los territorios, el agua, los saberes, la cultura y los bienes comunes” [LVC, 2015] ... y, también, del suelo. De los diferentes pilares que enmarca la agroecología, pensamos que tenemos cabida en las *prácticas de producción agroecológicas* puesto que para evaluar la implementación de estas técnicas es necesario contar con indicadores de calidad del suelo. Por ello, enfatizamos la importancia de recuperar las cromatografías en papel o de Pfeiffer como indicador de calidad de fácil acceso y bajo costo para las organizaciones campesinas.

Estamos convencidas que la construcción de la agroecología como forma de (re)producción de la vida y de los alimentos debe ser de la mano de campesinos y campesinas, como aliadas desde la ciencia institucional y de manera interdisciplinaria, crítica y rigurosa desde nuestro quehacer científico. Sobre este último punto quisiéramos destacar el estudio de la técnica cromatográfica, también conocida como cromatografía de Pfeiffer, como método físico de separación de una sustancia compleja, como lo es el suelo, e investigarla con una perspectiva que considere el papel fundamental de los microorganismos en la circulación de materia y energía. Asimismo, la interdisciplina se hace presente como un medio útil y necesario para estudiar las cromatografías con herramientas computacionales de análisis y procesamiento de imágenes que nos permitan retroalimentar su interpretación visual empírica sobre la calidad del suelo.

### *1.1 Agroecosistemas y propiedades del suelo*

La unidad básica de estudio de la agroecología es el agroecosistema. Los agroecosistemas pueden ser definidos, termodinámicamente, como cualquier sistema agrícola abierto que recibe insumos del exterior y que da lugar a productos que ingresan a otros sistemas, y cuyos componentes bióticos y abióticos son interdependientes en cuanto a los nutrientes y flujo de energía [Altieri, 1999]. Muchos de los procesos físicos, químicos y biológicos que sostienen a los ecosistemas y agroecosistemas ocurren en el suelo. El suelo es la matriz donde ocurre: 1) el soporte y promoción del crecimiento vegetal, 2) gran parte de los ciclos biogeoquímicos, 3) la provisión de hábitat para organismos edáficos, 4) el almacenamiento, translocación y descontaminación del agua y 5) gran parte de las actividades bióticas [Magdoff *et al.* 2004].

Dentro de las funciones ecológicas que ocurren en los suelos y que son fundamentales en los agroecosistemas se incluyen: la provisión de nutrientes minerales disponibles para las raíces de las plantas en tiempo, espacio y forma; la retención de agua en cantidades tales que esté disponible para la absorción por las raíces; la provisión de una red interconectada de poros que permita en el intercambio gaseoso; así como el soporte físico para las plantas y hábitat de organismos del suelo [Magdoff *et al.* 2004]. Los suelos son hábitat de una vasta y compleja diversidad de comunidades de bacterias, hongos, arqueas, insectos, anélidos y otros invertebrados, así como de plantas y algas [Aislabie y Deslippe, 2013; Bardgett y van der Putten, 2014]. Se reconoce que existen zonas en la matriz edáfica donde se incrementa la actividad biológica, por ejemplo, en los agregados del suelo, en zonas enriquecidas de materia orgánica particulada y en la rizósfera [Nannipieri *et al.*, 2016]. Se estima que 1 gramo de suelo contiene hasta 1 millón de bacterias de diferentes taxa, 200 metros de hifas fúngicas y un amplio número de nemátodos, gusanos y artrópodos [Bender *et al.*, 2016]. La biodiversidad edáfica puede contribuir a mantener las funciones ecológicas de los sistemas agrícolas y agroforestales, particularmente las bacterias, a través de: el incremento y la transformación y movilización de nutrientes (por ejemplo, nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P)) y carbono (C) resultado de sus actividades metabólicas [Wu *et al.*, 2008; Aislabie y Deslippe, 2013], el mejoramiento de la estructura del suelo debido a la producción de polímeros que contribuyen a la formación de agregados estables [Wu *et al.*, 2008], la estimulación de germinación por producción de fitohormonas [Nielsen, 2002:15], la regulación de plagas, herbívora y enfermedades de los cultivos [Bardgett y van der Putten, 2014], el secuestro de carbono y la polinización por diversos taxa [Chappell *et al.*, 2013]. Se considera que un 80-90% de los procesos que ocurren en el suelo son mediados por microorganismos con alta redundancia funcional [Nannipieri *et al.*, 2016]. Sin embargo, la degradación y erosión del suelo de determinadas prácticas antropogénicas, que se realizan de manera crónica, reducen la biodiversidad de los suelos [Wagg *et al.*, 2014]. Al reducirse la diversidad del suelo y simplificarse la comunidad bacteriana y fúngica, se reducen los procesos de ciclaje de nutrientes y de descomposición de la materia orgánica, disminuye la diversidad de plantas y el secuestro de carbono [Wagg *et al.*, 2014].

El suelo está compuesto de agua, aire, materia mineral y materia orgánica. La materia orgánica se encuentra en una fracción igual o menor a 5% del volumen total, sin embargo, tiene una influencia importante en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y, por tanto,

en su calidad [Brady y Weil, 2017]. Una alta cantidad de materia orgánica está asociada con: la reducción de la erosión y degradación del suelo, la formación y estabilización de agregados, el aumento de la porosidad total, la capacidad de infiltración y la retención de agua, así como permitir un mayor reciclaje de nutrientes disponibles, aumentar la capacidad de intercambio catiónico y proveer energía para la mayoría de microorganismos [Magdoff *et al.*, 2004; Brady y Weil, 2017], asimismo, retener y amortiguar los contaminantes [Lehmann y Klebber, 2015]. A pesar de que la materia orgánica como componente del suelo tiene una gran importancia reconocida entre la comunidad científica, existe una gran diversidad de explicaciones sobre su origen, dinámica de descomposición, fraccionamiento y caracterización. Lehmann y Klebber [2015] clasifican las explicaciones sobre la naturaleza de la materia orgánica en tres modelos generales, uno de ellos es el modelo tradicional de humificación.

El modelo tradicional de humificación es aquél que supone la formación de sustancias húmicas por procesos bioquímicos de descomposición y síntesis de materia orgánica; este proceso es mediado por los microorganismos del suelo [Fedotov y Lysak, 2013; Kosobuki y Buszewski, 2014]. En este modelo, la materia orgánica del suelo (MOS) está constituida de biomoléculas como biopolímeros de carbohidratos, aminoácidos y proteínas que tienen una estructura química definida y de sustancias húmicas amorfas que puede persistir en el suelo largos periodos de tiempo [Pinheiro, 2011; Vandermeer, 2011; Kosobuki y Buszewski, 2014]. Como mecanismo de adquisición de carbono y nutrientes, los microorganismos secretan enzimas que degradan los biopolímeros de bajo peso molecular y realizan la posterior formación de moléculas poliméricas de sustancias húmicas [Fedotov y Lysak, 2013].

Las sustancias húmicas se dividen en tres fracciones conocidas según su comportamiento como soluciones ácidas y básicas: 1) ácidos húmicos solubles en solución alcalina, insolubles en agua y en pH ácidos (<2), por lo que precipitan, 2) ácidos fúlvicos solubles en solución alcalina, solubles en agua a cualquier pH y solubles en ácidos y no precipitan y 3) huminas insolubles en solución alcalina e insolubles en agua (Stevenson, 1994; Kosobuki y Buszewski, 2014). Los ácidos húmicos son complejos químicos con una estructura química no definida, recientemente descritos como una mezcla de moléculas pequeñas que contienen anillos aromáticos, cadenas alifáticas y grupos funcionales ionizables que interactúan entre ellos para formar agregaciones coloidales [Rose *et al.*, 2014].

A pesar de su utilidad, es necesario reconocer las limitantes del modelo tradicional de humificación. Se ha descrito que la caracterización de los ácidos húmicos, fúlvicos y huminas conlleva el fraccionamiento de la MOS según su comportamiento con sustancias alcalinas o ácidas. Es, precisamente, el método de fraccionamiento el que ha recibido críticas puesto que la reacción química puede formar compuestos que no están presentes en el suelo, la extracción puede incluir biomoléculas y biomasa de microorganismos y materia orgánica disuelta y, además, es una extracción incompleta de carbono orgánico [Lehmann y Klebber, 2015]. En esta investigación, nosotras reconocemos que existen otras técnicas más eficientes que la extracción por una solución alcalina para aislar y caracterizar químicamente los compuestos extraídos. Sin embargo, es un método de extracción de materiales orgánicos que permite obtener de cada muestra de suelo un conjunto de sustancias que, posteriormente, en la técnica de cromatografía de suelo es posible colorear. Se enfatiza que, de manera transversal a los modelos de la materia orgánica, la participación de los microorganismos es considerada como fundamental para los procesos de descomposición y síntesis de material orgánico del suelo.

### *1.2 Indicadores de calidad del suelo*

La calidad del suelo es considerada como la capacidad que tiene éste de realizar las funciones ecológicas que soporten los agroecosistemas al promover el crecimiento vegetal, resistir la erosión y amortiguar el impacto del uso agrícola [Magdoff *et al.* 2004: 1; Bastida *et al.*, 2008; Bunemann *et al.*, 2018]. La calidad del suelo es el producto de múltiples procesos de degradación o conservación que ahí ocurren [Kennedy y Papendick, 1995].

Debido a la degradación generalizada de los suelos, es necesario contar con herramientas para la evaluación integral de la calidad del suelo en los agroecosistemas. Estas herramientas deben proporcionar información sobre las propiedades, procesos y características del suelo [Astier-Calderón *et al.*, 2002], así como facilitar el monitoreo y la evaluación de las consecuencias de distintas prácticas en los procesos ecológicos de los agroecosistemas [Kennedy y Papendick, 1995]. Los indicadores, como una herramienta para evaluar de calidad del suelo, deben ser accesibles a los diferentes usuarios, ser sensibles a variaciones de manejo y clima, además de tener una base de datos existente [Astier-Calderón *et al.*, 2002], también deben ser interpretables, reproducibles y ser fácil de muestrear y analizar [Bracamontes Nájera *et al.*, 2016]. Los indicadores de calidad del suelo pueden clasificarse como cualitativos o cuantitativos. Los

indicadores cuantitativos suelen considerar propiedades físicas, químicas y biológicas como conductividad eléctrica, pH, concentración de nutrientes, textura, capacidad de intercambio catiónico, o bien, cantidad de materia orgánica y biomasa microbiana; tales parámetros arrojan características diagnósticas sobre la calidad de los suelos cultivados en agroecosistemas diferentes [Bastida *et al.*, 2008]. Cabe mencionar que, dado que la materia orgánica del suelo es heterogénea y su composición química depende de múltiples factores, su caracterización molecular permanece insatisfactoria [Derenne y Nguyen Tu, 2014] y no es una sustancia específica que pueda ser medida. Los análisis generalmente miden el contenido de C orgánico total o la relación entre los contenidos de C y N (C:N) [Magdoff *et al.*, 2004]. Un punto central en la evaluación de la calidad del suelo es el de identificar un conjunto de atributos del suelo que sean sensibles a cambios que permitan conocer la capacidad del suelo para realizar sus funciones y que puedan ser útiles y prácticos de realizar [Bunemann *et al.*, 2018].

Las propiedades biológicas permiten diagnosticar de manera temprana los procesos de degradación o mejoría de los suelos [Astier-Calderón *et al.*, 2002]. Particularmente, los microorganismos presentan sensibilidad a los cambios en el ambiente, el clima o el manejo y su importancia ecológica en el reciclaje de carbono y nitrógeno por lo que son útiles indicadores de la calidad del suelo [Kennedy y Papendick, 1995; Griffiths *et al.*, 2016; Nannipieri *et al.*, 2016]. Respecto a la comunidad microbiana se estiman parámetros como biomasa y actividad bacteriana a través de actividad enzimática (p.e. ureasa, deshidrogenada, fosfatasa) [Kennedy y Papendick, 1995; Nielsen y Winding, 2002], o tasas metabólicas (como respiración) para conocer las especies involucradas en las reacciones de los procesos estudiados [Nannipieri *et al.*, 2016]. Para conocer la diversidad microbiana, que incluye la riqueza taxonómica y su abundancia relativa, es necesario utilizar técnicas moleculares de secuenciación del DNA debido a que sólo un número muy limitado de bacterias es cultivable en laboratorio (Wu *et al.*, 2008). Las técnicas moleculares incluyen la extracción de ácidos nucleicos y la identificación bacteriana mediante secuenciación de material genético, por ejemplo, del ARNr 16S [Nannipieri *et al.*, 2016].

### *1.3 Cromatografías de suelo en papel*

La técnica de cromatografía de suelo en papel, o cromatografía de Pfeiffer, es un análisis cualitativo del suelo basado en la extracción de material orgánico en una solución alcalina y su separación y visualización en cromatogramas de papel filtro. Esta técnica cromatográfica es

accesible económica y técnicamente para pequeños productores u organizaciones campesinas puesto que requiere equipos y materiales de bajo costo en contraste con las técnicas de laboratorio para el suelo. La técnica cromatográfica es utilizada por los campesinos y agricultores de algunos países de Latinoamérica, como Colombia, Cuba, Brasil y México, para el diagnóstico y monitoreo de la calidad del suelo. Ha sido difundida a través de libros (Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011), manuales (Pinheiro, 2011 y Bracamontes Nájera *et al.*, 2016) y talleres donde se enseñan la técnica y la interpretación de los cromatogramas.

La invención de la cromatografía de suelo en papel circular se le atribuye al químico Ehrenfried Pfeiffer (1899- 1961) [Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011]. Durante los años siguientes, las diferentes técnicas de cromatografía en papel se vieron rápidamente reemplazada por la cromatografía de capa delgada debido a su mayor efectividad en la separación de compuestos [Braithwaite y Smith, 1999] y la investigación asociada a la técnica en papel disminuyó.

La cromatografía (palabra derivada de las raíces griegas *khroma* (color) y *graphein* (escribir) es una técnica utilizada en la separación de sustancias coloreadas [Braithwaite y Smith, 1999]. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*IUPAC* por sus siglas en inglés) define que “la cromatografía es un método físico de separación, en el cual los componentes a ser separados son distribuidos en dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida” [IUPAC, 1993]. En la cromatografía en papel, la mezcla muestra es aplicada como solución, los componentes sólidos deben de ser macerados en solventes; los solventes que eluyen la muestra (fase móvil) son generalmente seleccionados por experimentación según la muestra. La cromatografía en papel es reconocida como un método estándar para obtener información de mezclas complejas, particularmente de aminoácidos [Braithwaite y Smith, 1999].

La cromatografía de suelo en papel utiliza el hidróxido de sodio (NaOH) como sustancia alcalina extractora de materia orgánica, y Pfeiffer utilizó la solución NaOH 1% [Pinheiro, 2011]. Al realizar una extracción de materia orgánica en solución alcalina, sales y solventes orgánicos se obtiene una fracción que, históricamente, se le ha denominado sustancias húmicas [Kosobucki y Buszewski, 2014]. La extracción con NaOH es considerada un método clásico en la obtención de materia orgánica de una muestra, en el que los ácidos húmicos se obtienen por la disrupción de enlaces en NaOH 0.1 M [Stevenson, 1994; Magdoff *et al.* 2004]. Además, en este proceso ocurre la conversión de los componentes ácidos a formas solubles como sales monovalentes. La

extracción del suelo con NaOH 0.1M o 0.5M recupera aproximadamente 2/3 partes de las sustancias húmicas del suelo [Stevenson, 1994]. Además de la utilización del NaOH, el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) es sustancia clave del método. El  $\text{AgNO}_3$  es una sal inorgánica incolora que se vuelve negra con la exposición a la luz o a materiales orgánicos [NCBI, 2018] y que ha sido utilizada para ensayos clínicos con intereses antisépticos y germicidas. Los efectos antisépticos y germicidas podrían atribuirse a la precipitación de las proteínas bacterianas debido a la combinación de los iones de plata con grupos químicos de biomoléculas como carboxilos, fosfatos y aminos, asimismo, los iones de plata causan cambios en la membrana y en la pared celular de las bacterias [NCBI, 2018]. El mayor porcentaje de N en ácidos húmicos extraídos en soluciones alcalinas ocurre en forma de aminoácidos, esto puede deberse a la oxidación del fenol a quinona, con la liberación de un aminoácido [Stevenson, 2014].

### 1.3.1 Interpretación o evaluación visual empírica

Después de realizar la técnica cromatográfica con el material orgánico extraído en solución alcalina, el  $\text{AgNO}_3$  y el papel filtro (ver Métodos para mayor detalle), los cromatogramas elaborados con muestras de suelo se interpretan cualitativamente. En esta investigación, llamaremos interpretación o evaluación visual empírica a la evaluación de los atributos de forma y color de patrones establecidos únicamente a partir de la inspección visual de los cromatogramas. Esta interpretación visual empírica ha sido propuesta por la comparación de una amplia variedad de suelos y manejos agrícolas, se han descrito comparativamente los patrones de forma y color de los cromatogramas y se han relacionado de forma empírica con las características físicas, químicas y biológicas de los suelos. Existen diferentes formas de realizar la interpretación visual empírica, frecuentemente se utiliza la zonificación en anillos concéntricos, pero, también se puede realizar la evaluación de atributos específicos como las líneas radiales, las terminaciones o contornos, o bien, el color de los anillos concéntricos interiores (Figura 1).

Respecto a la zonificación de anillos concéntricos (central, interno, intermedio y externo) se ha propuesto que cada anillo está asociado a ciertas características del suelo. Esta forma de relacionar colores y formas de los anillos con características del suelo es el antecedente en el que se cimienta su potencial como indicador de la calidad del suelo puesto que busca promover el monitoreo participativo y comunitario de la calidad del suelo [Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011; Bracamontes Nájera *et al.*, 2016]. Sin embargo, suele hacerse un uso vago e impreciso de los

términos en los que se describen los atributos de forma y color. A continuación, en la Tabla 1 se resume la zonificación, los atributos y las características del suelo asociadas. Se reconoce que la cromatografía en papel es de carácter cualitativo y relativo puesto que es necesario establecer comparaciones entre cromatogramas para obtener un diagnóstico sobre las características del suelo.

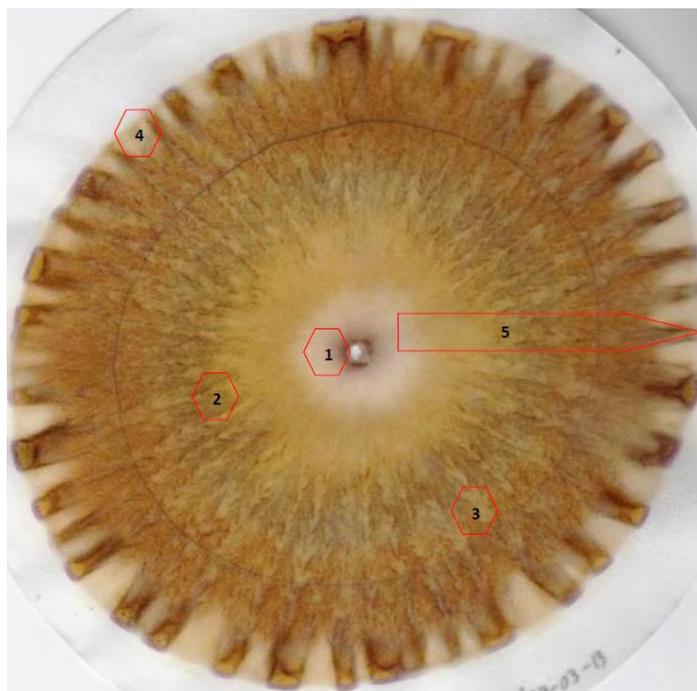


Figura 1. Zonas o anillos concéntricos de un cromatograma. Los números corresponde a las zonas: 1- zona central, 2- zona interna, 3- zona intermedia, 4- contornos o terminaciones, 5- forma y color de los anillos interiores. Imagen tomada de Abad Santana, 2014.

En la literatura, hemos encontrado estudios científicos sobre la cromatografía de suelo en papel hasta años recientes. Khemani [2008] y colaboradores proponen un algoritmo que podría predecir el contenido de minerales en el suelo a partir de la suposición "cromatogramas similares presentan propiedades del suelo similares", cuya caracterización se basa en la medición del color digital de los anillos concéntricos y el promedio de crestas que presentan los contornos de los cromatogramas. Además, obtienen análisis de laboratorio sobre los minerales presentes en las muestras de suelo. Sus resultados concluyen en la mejora del algoritmo para predecir los minerales de otros cromatogramas.

Recurrentemente, en la interpretación visual empírica se relaciona el contorno de los cromatogramas con actividad enzimática. Sin embargo, desconocemos la existencia de

investigaciones que aborden la actividad enzimática en relación a los atributos de forma y color de los cromatogramas.

Tabla 1. Interpretación o evaluación visual empírica

**Interpretación o evaluación visual empírica**

Zona o anillo concéntrico	Atributo evaluado	Características del suelo
Central	Color y grosor del anillo	Esta zona ha sido asociada con la cantidad de nitrógeno [Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011]. Está representada por el primer anillo y, según las características del suelo, se presenta como núcleos de color negro que se ha referido a un limitado metabolismo microbiano aeróbico, mientras que los colores hueso o crema indican una mayor actividad aeróbica [Pinheiro, 2011]. Además, el color y grosor de esta zona se reporta asociada con la oxigenación, estructura del suelo [Bracamontes Nájera <i>et al.</i> , 2016] y cantidad de nitrógeno [Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011].
Interna	Color y grosor del anillo Inicio y ramificación de líneas radiales	La <i>zona o anillo interno</i> se ha identificado con la presencia de nutrientes unidos a materia orgánica humificada. Su coloración puede ir desde un color negro homogéneo, que indicaría la presencia de poca materia orgánica hasta colores oro, café o naranja que reflejarían una disponibilidad de nutrientes para las plantas. Resalta también el atributo de las líneas radiales que se forman desde la zona interna hasta la zona externa, y según su grado de ramificación se han asociado a la presencia o ausencia de minerales [Pinheiro, 2011; Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011].
Intermedia	Color y grosor del anillo	La <i>zona o anillo intermedio</i> suele asociarse a la materia orgánica en descomposición. En un cromatograma de un suelo con buena calidad se observa un anillo ancho que reflejaría la alta actividad de descomposición. Se propone que cuando la materia orgánica no ha sido transformada en el suelo, el anillo es angosto y de color marrón, por lo que se considera que la actividad microbiana es baja o deficiente [Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011; Bracamontes Nájera <i>et al.</i> , 2016].
Externa	Color y grosor del anillo Contorno o terminaciones	La <i>zona o anillo externo</i> indica la presencia de la materia orgánica que recién se agregó y comienza el proceso de transformación, es decir, los minerales contenidos en la materia orgánica aún no están disponibles para la planta [Pinheiro, 2011]. Además, aquí terminan las líneas radiales en diferentes patrones, desde contornos puntiagudos hasta terminaciones redondeadas y de color marrón que indicarían actividad biológica [Bracamontes Nájera <i>et al.</i> , 2016].

Abad Santana [2014] realizó una evaluación visual de los cromatogramas según el color, las líneas radiales, la interacción entre los colores de las zonas y la complejidad de los contornos y los clasifica comparativa y visualmente en cuatro categorías, desde cromatogramas con formas y colores que se han asociado a una mala calidad hasta una buena calidad del suelo. Posteriormente, encuentra regresiones logísticas significativas entre los valores categóricos asignados visualmente a cada cromatograma y datos de laboratorio de características del suelo. Abad Santana [2014] reporta regresiones logísticas significativas entre: color del cromatograma con contenido de materia orgánica, minerales (N, P, calcio (Ca), magnesio (Mg) y zinc (Zn)), densidad aparente, conductividad eléctrica y hongos cultivados en cajas Petri; formas del cromatograma (líneas radiales y contornos) con contenido de materia orgánica, minerales y hongos y bacterias cultivados en cajas Petri.

Kokornaczyk y colaboradores [2016] llevan a cabo una evaluación visual empírica de los atributos como: líneas radiales, intensidad del color y anillos concéntricos, el cual es realizado por un grupo de 20 estudiantes que califican cada atributo del uno al 5. También realizan un análisis computarizado de imágenes que incluye la medición del radio de los diferentes anillos concéntricos y un análisis de textura. De las muestras colectadas obtienen datos cuantitativos de características físicas y químicas del suelo. Reportan correlaciones tanto para los atributos evaluados visualmente como para los datos obtenidos con análisis computarizado, particularmente con materia orgánica y minerales (N total y P disponible). Cabe mencionar que en las investigaciones realizada por Abad Santana [2014] y Kokornaczyk y colaboradores [2016] existe el componente subjetivo de la evaluación de los atributos de forma y color de los cromatogramas. Aunque valiosa y fundamental para su uso y aplicación en campo, pensamos que para entender las relaciones entre características del suelo y los patrones de forma y color es importante estudiar los atributos de los cromatogramas sin las limitaciones del ojo humano.

Por último, recientemente ha sido evaluado el uso de los cromatogramas como herramientas cualitativas de diagnóstico de la calidad de suelo por Nivia Torres [2017] y Medina Saavedra y colaboradores [2018]. Aunque estas investigaciones no tienen el objetivo de encontrar relaciones entre atributos de forma y color de los cromatogramas y características físicas, químicas o biológicas del suelo, han concluido en la utilidad para reflejar las características del suelo en función del manejo del sistema agrícola [Medina Saavedra *et al.*, 2018] y como una herramienta de evaluación integral y económica para los agricultores [Nivia Torres, 2017].

## **Justificación**

En México, la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) en su Línea Base Nacional de Degradación de Tierras y Desertificación indica que el 45.2% de la superficie del país presenta algún grado de degradación, y entre las principales causas de degradación se identifica el cambio de uso de suelo para la agricultura y el pastoreo [CONAFOR, 2013]. La degradación del suelo está acompañada de erosión y lixiviación o pérdida de suelo que afecta la productividad de los ecosistemas [Bastida *et al.*, 2008]. Por ello, para diagnosticar y monitorear la calidad del suelo es necesario contar con indicadores que nos permitan evaluar las prácticas y manejos agrícolas. Las características físicas, químicas y biológicas suelen ser estudiados con técnicas que se obtienen con insumos y tecnología poco asequible para los campesinos y agricultores que no cuentan con el equipo necesario para estas mediciones. Usualmente, para el diagnóstico y monitoreo del suelo, quienes trabajan la tierra envían muestras a diferentes laboratorios especializados para realizar análisis cuantitativos, los cuales suelen tener un alto costo y requieren una interpretación auxiliada por un técnico especializado. La cromatografía de suelo en papel es un indicador cualitativo que está siendo ampliamente utilizado como herramienta para evaluar la calidad del suelo dada su accesibilidad técnica y económica para organizaciones campesinas y productores. Al ser un análisis cualitativo, se presenta la información sobre el suelo en los diversos atributos de forma y color, por lo que su interpretación resulta más accesible de realizarse para obtener un diagnóstico general del suelo.

Sin embargo, existen pocos estudios que relacionen los atributos de forma y color de los cromatogramas con datos edáficos obtenidos en laboratorio, y se desconoce su relación con actividad microbiana medida a través de enzimas o de diversidad de DNA bacteriano. Además, hay preguntas abiertas respecto a la técnica: ¿es reproducible?, es decir, qué atributos de forma y color de los cromatogramas no varían por el método y aportan información del suelo, ¿a qué escala geográfica son sensibles?, ¿pueden detectar cambios entre mismos cultivos de diferentes parcelas? Los resultados de esta tesis aportan evidencia sobre la cromatografía suelo en papel como indicador de calidad accesible y económico en un contexto de alta heterogeneidad ambiental y en cultivos de importancia económica, alimentaria y cultural (maíz, frijol, café y aguacate) en México considerando características y propiedades físicas, químicas y, particularmente, biológicas.

## **2. Pregunta de investigación**

¿Los atributos de forma y color de los cromatogramas se correlacionan estadísticamente con características físicas, químicas o biológicas usualmente cuantificadas en los suelos de uso agrícola?

## **3. Hipótesis**

La cromatografía de suelo en papel es una técnica física de separación de mezclas complejas de moléculas del suelo y, dado que las evidencias de la interpretación visual empírica con diversos suelos y manejos agrícolas han mostrado aportar información sobre la calidad del suelo, se espera que haya atributos de forma y color de los cromatogramas que estén correlacionados con datos de análisis de laboratorio.

## **4. Objetivos**

### General

Determinar si existen atributos de forma y color de los cromatogramas que se relacionen a las características físicas, químicas o biológicas de suelos con cultivos anuales (maíz y frijol) y perennes (café y aguacate).

### Particulares

1. Sistematizar la técnica cromatográfica para los suelos recolectados con cultivos anuales (maíz y frijol) y perennes (café y aguacate).
2. Realizar las cromatografías en papel para los diversos suelos de uso agrícola colectados correspondientes a los cultivos mencionados en diferentes ecorregiones.
3. Cuantificar los atributos de forma y color de los cromatogramas obtenidos y sistematizar el análisis de las imágenes.
4. Identificar las posibles correlaciones entre los atributos de forma y color de los cromatogramas con características física, químicas y biológicas obtenidas de datos del laboratorio de los diferentes suelos de uso agrícola correspondientes a diferentes ecorregiones.

## 6. Método

### 6.1 Sitios de estudio

Con el objetivo de obtener datos que permitan buscar relaciones entre atributos de los cromatogramas y los análisis de laboratorio, conviene obtener muestras con suficiente variación, por lo que se utilizaron muestras de suelo de contextos con una alta heterogeneidad de condiciones climáticas y edáficas. Se trabajó en diferentes ecorregiones: lomeríos y planicies del Altiplano con matorral xerófilo y pastizal (A), planicie interior con mezquital (B), sierra con bosque mesófilo del Sistema Neovolcánico Transversal (C) y lomeríos del Norte de Veracruz (D) con selva mediana y alta perennifolia donde se muestrearon suelos de varias localidades (Figura 2).

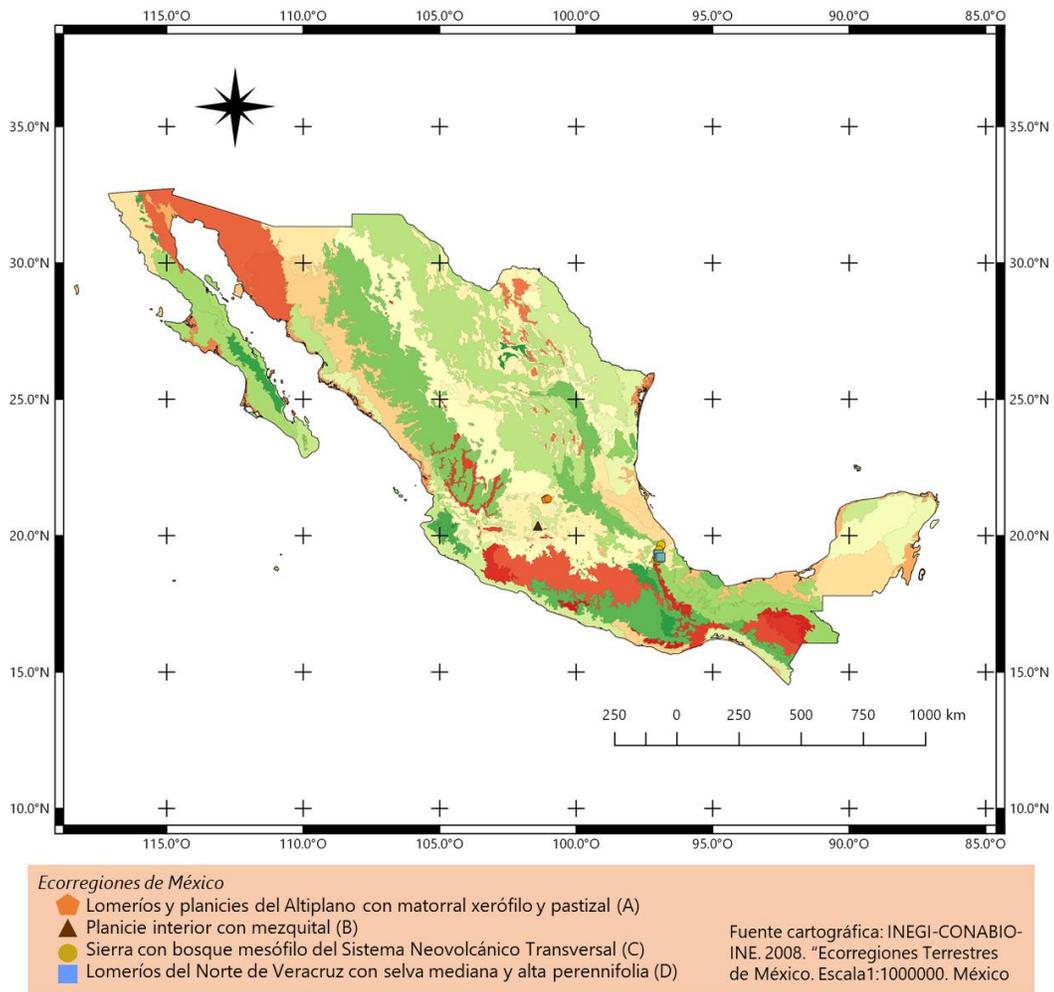


Figura 2. Distribución geográfica de los sitios de estudio según la clasificación por ecorregiones.

Para la descripción de los sitios se retoma la división geopolítica, por lo que de las ecorregiones A y B se colectaron muestras en los municipios de Valle de Santiago y San Felipe

en el estado de Guanajuato; mientras que para las ecorregiones C y D se colectó en los municipios de Huatusco, Naolinco, Coatepec y Cosautlán, ubicados en el estado de Veracruz.

### 6.1.1 Estado de Veracruz

#### Coatepec, Veracruz

Coatepec se encuentra entre las coordenadas 19° 21' y 19° 32' N y 96° 47' y 97° 06' O del estado de Veracruz, a una altitud de 500 a 2900 msnm [INEGI, 2009]. Se caracteriza por un clima semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano o todo el año, con una temperatura media anual mayor de 18° C, también presenta clima templado húmedo con lluvias todo el año [INEGI, 2009] con una precipitación media anual de 1 926 mm [INAFED, 2010] y una media anual de 1 755 mm en los últimos 50 años [SMN, 2010]. Se localiza en la provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico en su mayoría y en la Llanura Costera del Golfo Sur (4%); la región hidrológica a la que pertenece es completamente al Papaloapan [INEGI, 2009]. Los suelos de su territorio son Andosoles en 41%, Luvisoles en 35%, Phaeozem en 11%, Vertisoles en 4% y Leptosoles en 1%, y cuyo uso es predominantemente para la agricultura (61%) [INEGI, 2009].

#### Cosautlán de Carvajal, Veracruz

Cosautlán es un municipio de Veracruz que se encuentra entre las coordenadas 19° 17' y 19° 23' N y 96° 53' y 97° 02' O, con altitudes entre los 600 y 1500 msnm [INEGI, 2009a]. Su clima es semicálido húmedo con lluvias todo el año o abundantes lluvias en verano, presenta una temperatura media anual de 19.3°C, una temperatura media máxima anual de 25.3°C y una mínima de 14.4°C, así como una precipitación media anual de 2147 mm [INEGI, 2009a; SMN, 2010a]. Su territorio pertenece a la provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico con lomerío de basalto como topoforma predominante (98%); asimismo, pertenece a la región hidrológica del Papaloapan [INEGI, 2009a]. Los suelos presentes en su territorio son Andosoles (84%) y Leptosoles (11%), utilizados para la agricultura (76%) y zona urbana (5%) [INEGI, 2009a].

#### Huatusco, Veracruz

Huatusco se ubica entre las coordenadas 19° 04' y 19° 13' N, 96° 41' y 97° 04' O, con una altitud entre 400 y 2000 msnm. Su clima es semicálido húmedo con lluvias todo el año o abundantes lluvias en verano [INEGI, 2009b]. Presenta una temperatura media de 18.5°C y una precipitación

de 2020 mm anualmente [SMN, 2010b]. Es parte de la provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico en 86% de su territorio y de la Llanura Costera del Golfo Sur en un 14%, presenta lomería de aluvión antiguo, lomerío de basalto y lomerío típico como sus principales topoformas, además, pertenece a la región hidrológica del río Papaloapan [INEGI, 2009b]. Los suelos se caracterizan como Andosoles (45%), Luvisoles (43%) y Leptosoles (10%) en su territorio, con un uso de suelo predominantemente agrícola (52%), pastizal (26%), bosque y selva como tipos de vegetación y 2% de zona urbana [INEGI, 2009b].

#### Naolinco, Veracruz

Naolinco se encuentra en el estado de Veracruz, entre las coordenadas 19° 34' y 19° 42' N y los 96° 45' y 96° 56'O, se encuentra a una altitud entre 600 y 1920 msnm [INEGI, 2009d]. Presenta un clima semicálido húmedo con lluvias todo el año, con temperatura promedio de 16°C y precipitación media anual de 1640 mm [INAFED, 2010a]. Su territorio pertenece a la provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico y su sistema de topoformas son sierra volcánica de laderas escarpadas en un 60% de su superficie y lomerío de basalto en el resto; su región hidrológica es el Papaloapan [INEGI, 2009d]. El uso de suelo en su mayoría es agrícola (68%), así como vegetación de pastizal (14%), bosque (10%), selva (5%) y zona urbana (3%), además, los suelos predominantes son Andosoles (84%) y Luvisoles, Phaeozems, Vertisoles y Leptosoles en el resto de su territorio [INEGI, 2009d].

#### 6.1.2 Estado de Guanajuato

##### La Quemada, San Felipe, Guanajuato

La localidad La Quemada pertenece al municipio de San Felipe, al noreste del estado de Guanajuato, se encuentra entre las coordenadas 21° 51' y 21° 08' N y entre los 100° 49' y 101° 41' O, con altitudes entre los 1300 y los 3000 msnm [INEGI, 2009d]. El clima es semiseco templado, con temperatura media anual de 16.7° C y la precipitación media anual de 473 mm [INAFED, 2010b] y 517 mm de precipitación media anual durante 1951- 2010 [SMN, 2010c]. Pertenece a la provincia fisiográfica de la Mesa del Centro, con sierras altas escarpadas con mesetas (44.9%), llanura aluvial de piso rocoso o cementado (12.8%) y lomería de pie de monte (9.7) como sus principales topoformas. Es parte de la región hidráulica Lerma-Santiago, Pánuco y El Salado [INEGI, 2009d]. Presenta diversos tipos de suelo: Phaeozem (51.1%) en la mitad de su

superficie, Leptosoles, Durisoles, Luvisoles, Planosoles, Regosoles, Solonchaks y Vertisoles en el resto de su territorio [INEGI, 2009d].

#### Guarapo, Valle de Santiago, Guanajuato

La localidad de Guarapo se encuentra en el municipio de Valle de Santiago, en el suroeste del estado de Guanajuato [Pastrana Pineda, 2011] entre las coordenadas 20° 33' y 20° 14' N y 101° 04' y 101° 28' O, presenta altitudes de 1600 a 2500 msnm [INEGI, 2009e]. El clima es semicálido subhúmedo con lluvias en verano, con una precipitación de 160-170 mm, ha llegado a presentar temperatura máxima de 40° y mínima de 5°, con una temperatura media anual de 19.8°, siendo los meses más calurosos de abril a junio [Pastrana Pineda, 2011; INAFED, 2010c]. En el municipio del Valle de Santiago se encuentran 13 cráteres volcánicos de bordes bajos y abruptos y centro plano de 1 km, esto le confiere una topografía con pendientes de 0 a 8% en un 70% de su superficie, y pendientes mayores a 20% en 10% de su superficie, localizándose esta última en la franja sur del municipio [Pastrana Pineda, 2011]. Su territorio pertenece a la región hidrológica Lerma-Santiago y a la provincia fisiográfica del eje Neovolcánico, con sierras volcánicas de laderas tendidas con lomería (43.5%) y llanuras aluviales (35.5%) [INEGI, 2009e]. Sus suelos son Vertisoles en 82% de su territorio y Phaeozem en 15.5% [INEGI, 2009e]. Presenta suelos de estructura granular, con textura franco-arenosa a arcillosa de origen aluvial y pH ligeramente ácido a neutro [Pastrana Pineda, 2011]. El uso de suelo es principalmente agrícola, con vegetación de matorral y pastizales, así como zona urbana en crecimiento [INAFED, 2010c].

#### *6.2 Muestreo de suelo*

Se colectó un total de 44 muestras, la distribución de las muestras por cada ecorregión y cultivo se muestra en la Tabla 2. Para la ecorregión A se colectaron 4 muestras de parcelas con siembra de frijol y 5 con maíz en La Quemada, San Felipe, Guanajuato. Para la ecorregión B se colectaron 6 muestras de parcelas cultivadas con frijol y 5 muestras de parcelas cultivadas con maíz en Guarapo, Guanajuato, así como un sitio de vegetación primaria para cada ecorregión. En las ecorregiones C y D se colectaron 12 muestras de cafetales y tres sitios de vegetación primaria y 6 muestras de parcelas con árboles de aguacate, con su respectivo sitio de vegetación primaria en Veracruz.

Para cada muestreo en campo se colectaron muestras compuestas. Se seleccionaron nueve puntos equidistantes por parcela (Figura 3), en cada uno se limpió la superficie del suelo de piedras y raíces superficiales y se tomaron 200 g de suelo de los primeros 10 centímetros de profundidad. Se combinaron las 9 muestras en una bolsa nueva y se mezclaron muy bien para obtener la muestra compuesta de cada parcela.

Para la técnica cromatográfica se requieren suelos secos y tamizados y dado que el muestreo se realizó en temporada de lluvias (agosto 2016), las muestras compuestas húmedas se transportaron al laboratorio donde se envolvió la tierra en papel estraza para la absorción de agua y se dejó secar a temperatura ambiente y en la sombra. Una vez seca, se tamizó la muestra y se guardó en un lugar oscuro a temperatura ambiente.

Tabla 2. Muestras colectadas

Estado	Ecorregión	Parcela	n
Guanajuato	A	Maíz	5
		Frijol	4
		Vegetación primaria	1
	B	Maíz	5
		Frijol	6
		Vegetación primaria	1
Veracruz	C	Café	6
		Aguacate	1
		Vegetación primaria	2
	D	Café	6
		Aguacate	5
		Vegetación primaria	2



Figura 3. Muestreo de suelo. La señalización corresponde a los 9 puntos equidistantes de una parcela.

### 6.3 Análisis de laboratorio

Para cada una de estas muestras compuestas se obtuvo un cromatograma y se realizaron análisis de laboratorio de parámetros físicos, químicos y biológicos.

#### 6.3.1 Cromatografía de suelo en papel

El primer objetivo de esta tesis fue establecer la técnica de cromatografía en papel para los diversos suelos de uso agrícola colectados. El método que se siguió, en términos generales, fue el del manual *Cartilha da Sade do Solo* [Pinheiro, 2011]. Se utilizó papel filtro Whatman #4, solución de NaOH 1% preparada con NaOH al 98% de pureza, solución de AgNO<sub>3</sub> 0.5% preparada con AgNO<sub>3</sub> al 99% de pureza. También se utilizó material de laboratorio para medición de sustancias sólidas y líquidas como probetas y báscula, asimismo se usaron cajas Petri de 100x15mm y de 60x15mm. El tamaño del tamiz no está especificado en la literatura, sin embargo, en esta tesis se utilizó uno de 0.595 mm de abertura del tamiz. La apertura del tamiz está relacionada con las escalas de hábitat de los organismos, en micrómetros  $\mu\text{m}$  para bacterias y hongos [Nannipieri *et al.*, 2016], por lo que el uso de un tamaño de malla menor al convencional (2mm) es útil para el objetivo de esta investigación.

El método de realización de la cromatografía se puede dividir en cuatro grandes pasos: 1) extracción del material orgánico del suelo, 2) impregnación de papel filtro con nitrato de plata, 3) corrimiento de la muestra y 4) revelado del cromatograma para interpretación visual. A continuación, se describe cada paso para la preparación de un cromatograma, es posible procesar más de una muestra de suelo al mismo tiempo.

- 1) Extracción del material orgánico. De la muestra de suelo ya tamizada y seca se colocó una cantidad aproximada a 5g en el mortero y se trabajó con el pistilo hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Se pesaron 5g en la báscula, posteriormente, éstos se colocaron en un vaso de precipitado. De las disoluciones previamente preparadas se vertieron 50 mL de NaOH al 1% en el recipiente donde se colocó la muestra (Figura 4). Se mezcló la solución de NaOH con el suelo realizando giros seis veces a la derecha, seis veces a la izquierda, seis veces. Esto con el objetivo de establecer un número de fijo de movimientos para mezclar. Se repitió la secuencia anterior a los 15 y 60 minutos. Después de mezclar a los 60 minutos, se dejó reposar la muestra con la disolución de NaOH durante 6 horas sin resuspender los sedimentos.



Figura 4. Vasos de precipitado con 50 mL NaOH 1% con muestra de suelo.

- 2) Impregnación de papel filtro con nitrato de plata. Mientras reposan las muestras de suelo en NaOH, se marcó un cromatograma molde (Figura 5a) con un agujero en el centro hecho con el socavado de 2 mm de diámetro, se marcó un agujero con la aguja de la jeringa a los 4 cm y a los 6 cm del centro. El cromatograma molde sirve para marcar los otros cromatogramas según el número de muestras a realizar. Por otra parte, se cortaron cuadros de 2x2 cm del mismo papel filtro Whatman No. 4 (Figura 5b). Los cuadritos de 2x2 se enrollaron para formar pabilos delgados que se colocaron en el centro del cromatograma, en el agujero de los 2mm de diámetro.

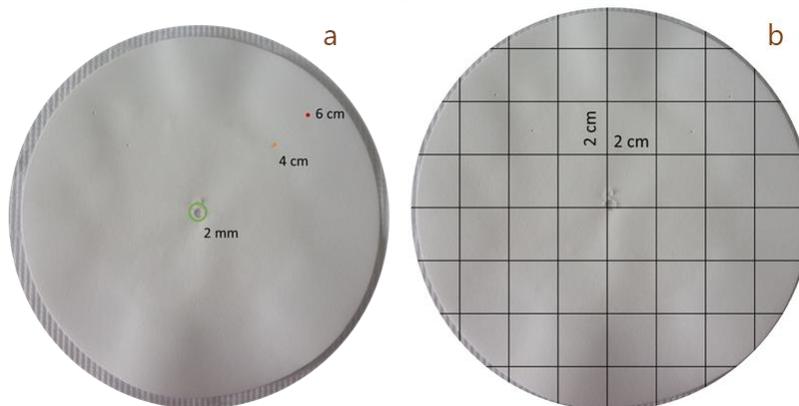


Figura 5. Cromatograma molde (a) y cromatograma marcado para los cuadros de 2x2 (b).

De las cajas de Petri, se colocó la caja más pequeña dentro de la más grande y se ubicaron en una superficie plana y vertical. Se agregó nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 0.5% en la caja de Petri pequeña. Es importante no derramar esta sustancia en la mesa o en el borde

de las cajas, pues puede manchar el cromatograma y hacerlo inservible. Una vez vertido el  $\text{AgNO}_3$  0.5% en la caja interna, se colocó el cromatograma con el pabilo en el centro, de tal manera que hubiera contacto entre el pabilo y el líquido de  $\text{AgNO}_3$  0.5% para impregnación por capilaridad (Figura 6). La impregnación debe llegar hasta la marca de 4 cm, una vez que el líquido tocó la marca, se retiró el cromatograma y se desechó el pabilo. Se colocó el cromatograma rápidamente sobre una toalla de papel absorbente y se envolvió por abajo y por arriba, quedando un sándwich de: hoja- papel absorbente- cromatograma- papel absorbente- hoja y se guardó en una caja oscura a temperatura ambiente. Se esperó mínimo 4 horas a que el cromatograma estuviera completamente seco.

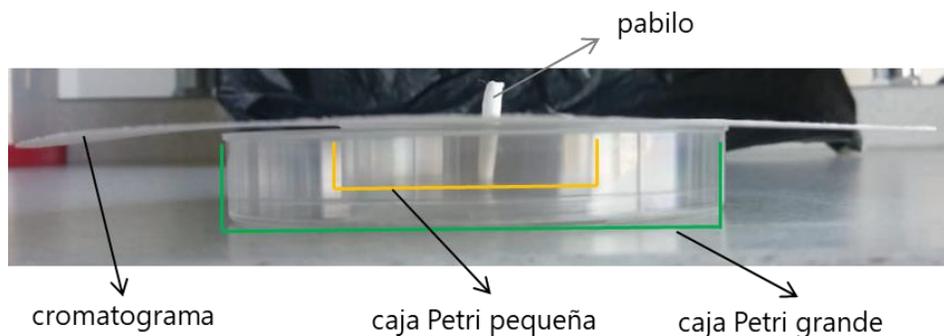


Figura 6. Estructura de las cajas Petri para impregnar el cromatograma.

- 3) Corrimiento de la muestra. Una vez pasadas las 4 horas de secado del cromatograma impregnado de nitrato de plata y a las 6 horas de la extracción en  $\text{NaOH}$  al 1%, se procedió al corrimiento de la muestra. Se colocó, nuevamente, una caja Petri limpia pequeña dentro de otra caja Petri grande, también limpia. Del vaso de precipitado con muestra de suelo en  $\text{NaOH}$  se tomaron 5 mL del sobrenadante con la jeringa, sin resuspender los sedimentos. Se agregaron los 5 mL a la caja de Petri pequeña, y se colocó el cromatograma con un pabilo nuevo a un cromatograma impregnado con  $\text{AgNO}_3$  proveniente de la caja oscura. Es importante que el sobrenadante de la solución del suelo suba por capilaridad hasta la marca de 6 cm (Figura 7). Una vez alcanzada la marca de 6 cm se retiró el cromatograma y se desechó el pabilo. Se colocó el cromatograma sobre un papel absorbente limpio durante 20 minutos para evitar escurrimiento.



Figura 7. Vista del ascenso por capilaridad durante el corrimiento de la muestra.

- 4) Revelado del cromatograma. Después de los 20 minutos, los cromatogramas se colocaron en un cuarto donde había luz solar indirecta y se esperó el revelado durante 14 días (Figura 8).



Figura 8. Cromatogramas revelándose a luz indirecta.

Debido a que los extractos de los suelos en cultivos frutales de café y aguacate fueron muy oscuros, se requirió la dilución 1:1 del sobrenadante en la misma solución alcalina NaOH 1% para el corrimiento de la muestra (Figura 9).

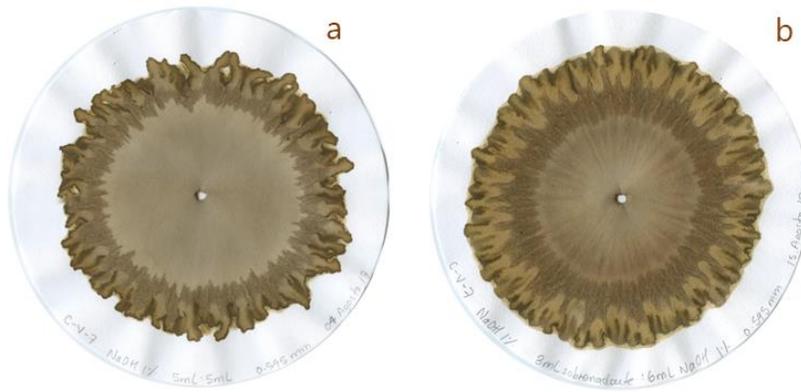


Figura 9. Misma muestra de un suelo de café. Sin dilución (a), con dilución 1:1 (b).

Además, se realizaron pruebas de reproducibilidad para conocer los intervalos de variabilidad entre los cromatogramas de un mismo suelo en réplicas técnicas. Para esto, se hicieron diez repeticiones de un mismo suelo (vegetación primaria de San Felipe, Guanajuato) en NaOH al 1%. El tiempo de revelado propuesto por Pinheiro (2011) es de 2 semanas, lo que resulta en un manejo impreciso de la cantidad de días. Con las pruebas de reproducibilidad se monitoreó y escaneó a los 10 días y 14 días para realizar la cuantificación de los canales de color en cada tiempo. También se prestó atención a los atributos que presentaron variación entre las repeticiones dado que esta variabilidad puede ser atribuida al método y no a la información sobre las características del suelo.

### 6.3.2 *Análisis de imágenes digitales*

Se escanearon las imágenes con el objetivo de analizar los cromatogramas como imágenes digitales con herramientas computacionales. Esto permitió homogeneizar la cantidad de luz en comparación a la variación que puede presentarse al tomar una fotografía. El método de escaneo de los cromatogramas se realizó en Escaner Perfection U750PRO a 1200 puntos por pixel con 24 bit de color.

El análisis de imagen se realizó con el software de procesamiento de imágenes ImageJ, con la distribución FIJI [Schindelin et al., 2012]. Se realizó un escalamiento de las imágenes con el método de interpolación bicúbica [Ferreira y Rasband, 2012] para agilizar su análisis. Dado que el color forma parte fundamental de la evaluación visual empírica de los cromatogramas, se estudió el color digital de las imágenes. Las imágenes digitales RGB están formadas por un mapa espacial cúbico de tres colores: en el eje x se presentan diferentes valores del canal R (*Red*, rojo por sus siglas en inglés), en el eje y se extiende el canal G (*Green*, verde) y en el eje z se encuentran los valores para el canal B (*Blue*, azul) [Ferreira y Rasband, 2012]. Se realizó la obtención del valor promedio de los pixeles de cada canal o matriz de color por separado (R, G y B) de los canales de color juntos (RGB) (*red, green and blue* por sus siglas en inglés). Además, puesto que el color del anillo central del cromatograma ha sido asociado al N presente en el suelo en la interpretación visual empírica, se cuantificó el color manualmente al seleccionar un rectángulo en el radio del anillo central. Los diferentes algoritmos que guardan la información de los pixeles de la imagen se pueden clasificar en dos grandes grupos: con pérdidas de información y sin pérdidas de información. Se obtuvo el tamaño de compresión de los archivos en bytes después

de una transformación a imágenes de 8-bit para su compresión en algoritmos de información con pérdida (.jpg) y sin pérdida (.zip) en un proceso semi-automatizado.

En la evaluación visual empírica, los contornos de los cromatogramas están asociados a actividad biológica [Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011], por lo que consideramos útil medir qué tan complejos o intrincados son. Se realizó una detección automática del contorno al aplicar un algoritmo de umbral de color con diferentes métodos según el cultivo (maíz, *mean*; frijol, *moments*; aguacate, *default*; café, *percentil*), se seleccionó manualmente el contorno detectado y se guardó en un nuevo archivo (Figura 10).

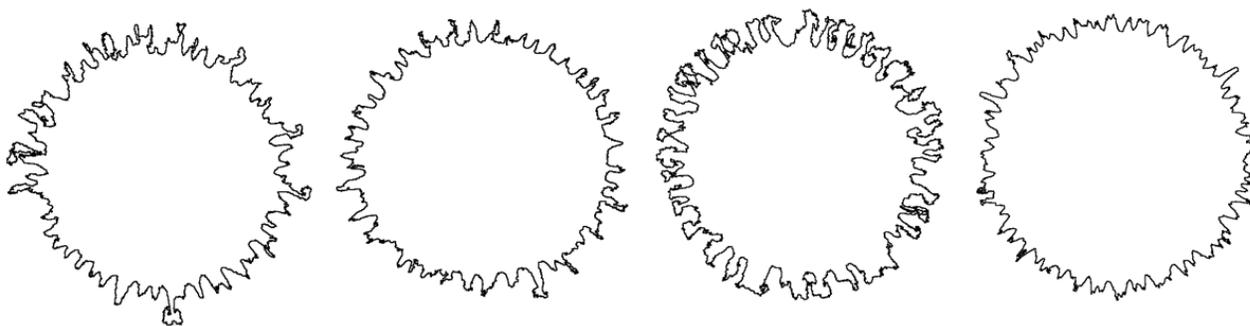


Figura 10. Contornos obtenidos del procesamiento de imágenes de diferentes muestras.

A los contornos seleccionados se les aplicó dimensión fractal con el programa FracLac v 2.5 [Karperien, 2013] para ImageJ, se utilizó un método de conteo de cajas, método de “scaling rule” para determinar el tamaño de las cajas y 10 repeticiones no aleatorias por imagen. La dimensión fractal es una función matemática que describe objetos que presentan auto-similaridad a diferentes escalas, ha sido utilizada en la descripción geométrica de las costas de línea, cadenas de islas, arrecifes de coral y parches de vegetación [Sugihara, 1990; Pérez Rodríguez *et al.*, 2018]. Para las pruebas de reproducibilidad, se obtuvo solamente el valor del canal de color RGB con el software ImageJ, en la distribución FIJI [Schindelin *et al.*, 2012].

### 6.3.3 Parámetros físicos, químicos y biológicos

La obtención de variables del suelo como textura, humedad, pH, contenidos de materia orgánica, carbono orgánico y nitrógeno total, así como la actividad de enzimas extracelulares la realizó el grupo de trabajo del Laboratorio de Ecología Funcional del Instituto de Ecología de la UNAM, a cargo del Dr. Julio Campo Alves. Para la obtención de la textura del suelo se utilizó el método de Bouyoucos, para la humedad se obtuvo el contenido gravimétrico de agua y la materia orgánica

se obtuvo por el método Walkley y Black (1934). La obtención de los porcentajes de pedregosidad y densidad aparente, conductividad eléctrica y capacidad máxima de retención de agua fueron obtenidas por el Dr. Víctor Manuel Peña, del Instituto de Geología, UNAM.

La extracción y secuenciación del DNA para evaluar la diversidad microbiana estuvo a cargo del Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad bajo la coordinación de la Dra. Ana Elena Escalante. El método que se utilizó fue la extracción de DNA genómico de las muestras compuestas de suelo con kits comerciales (PowerSoil DNA Isolate Kit™ MoBio Laboratories), usando como marcador la región V1-V2 del gen 16s rRNA (27F/388R) para la comunidad bacteriana; la amplificación y secuenciación se realizó en el Research and Testing Laboratory (en Lubbock, Texas, EE.UU.) con la plataforma Illumina MiSeq, por último, la aplicación de filtros y limpieza de las secuencias se realizó con QIIME 2, resultando OTUs agrupadas con un valor de similitud de 95%.

#### *6.3.4 Manejo agrícola*

Para los cultivos de maíz, frijol y aguacate se realizaron talleres participativos con los campesinos y campesinas bajo la coordinación de la Dr. Ana Wegier (Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM) con la participación de la M. en C. Adriana Uscanga Castillo, la Dra. Denise Arroyo Lambaer, la Biol. Valeria Vázquez, el Biol. Víctor Manuel Piña Tejeda y estudiantes universitarias. De estos talleres se obtuvieron datos sobre el manejo general de las parcelas en cada ecorregión. Sin embargo, se carece de información detallada sobre el manejo histórico de cada parcela. Para el cultivo de maíz y el de frijol en la ecorregión de La Quemada, San Felipe, Guanajuato se utiliza el tractor y la yunta para preparar la tierra, se aplican fertilizantes sintéticos y abonos orgánicos, estos últimos acompañados de un barbecho de la tierra. Asimismo, hay parcelas de temporal y otras de riego, las parcelas de temporal suelen estar asociadas a siembra de semilla criolla, mientras que las de riego siembran semilla híbrida [Piña Tejeda, 2018]. Para los cultivos de maíz y de frijol de Guarapo, Valle de Santiago, Guanajuato, se utiliza maquinaria agrícola, principalmente el tractor, así como el uso de herbicidas y fertilizantes sintéticos. El uso del agua es heterogéneo puesto que puede ser de riego o de temporal exclusiva o facultativamente [Piña Tejeda, 2018].

Por otro lado, para el cultivo de café, Sosa-Aranda y colaboradores calcularon un índice de manejo para cada uno de los sitios donde se obtuvieron las muestras, el cual recupera

información biológica y de manejo agrícola. Se midió el porcentaje de cobertura del dosel, cobertura media de epífitas, riqueza y diversidad de especies de plantas, densidad de árboles, altura media, área basal de los árboles de sombra, presencia de hierbas, número de estratos y densidad del café. Se realizaron entrevistas para conocer el uso de fertilizantes sintéticos, insecticidas, herbicidas, fungicidas, irrigación y arado. Se estandarizaron las variables del 0 al 1 sin ponderación. Para cada parcela, el índice consiste en sumar las 10 variables de cubierta vegetal y las 6 de manejo estandarizadas (Tabla 3). Posteriormente se clasificó el índice en una categoría de manejo: bajo, intermedio y alto, y ésta, a su vez, podría corresponder a policultivo tradicional de café, a policultivo tradicional o comercial y a monocultivo de sombra o monocultivo de sol, respectivamente [Sosa-Aranda *et al.*, 2018].

Tabla 3. Índice de manejo para las parcelas de café. Recuperado de Sosa-Aranda *et al.*, 2018

Sitios	Región	Vegetación natural	Índice de manejo	Categoría de manejo	Clasificación de Moguel y Toledo
CV7	Cosautlán	Bosque tropical lluvioso	2.85	Bajo	Policultivo tradicional/rústico
CV6	Cosautlán	Bosque tropical lluvioso	2.89	Bajo	Policultivo tradicional/rústico
CV9	Huatusco	Bosque tropical lluvioso	3.57	Intermedio	Policultivo tradicional/rústico
CV2	Naolinco	Bosque de niebla	4.23	Intermedio	Policultivo tradicional
CV3	Naolinco	Bosque de niebla	5.40	Intermedio	Policultivo tradicional
CV5	Coatepec	Bosque de niebla	5.69	Intermedio	Policultivo comercial
CV4	Coatepec	Bosque de niebla	7.16	Alto	P. comercial/ monocultivo de sombra
CV11	Huatusco	Bosque tropical lluvioso	10.13	Alto	monocultivo de sombra
CV8	Cosautlán	Bosque tropical lluvioso	10.17	Alto	monocultivo de sombra
CV10	Huatusco	Bosque tropical lluvioso	10.82	Alto	monocultivo de sombra
CV1	Naolinco	Bosque de niebla	13	Alto	Monocultivo de sol

#### 6.4 Análisis estadístico

Para todos los análisis estadísticos se utilizó el software libre R v 3.3.2 [R Core Team, 2016]. Se realizó prueba de t-pareada para evaluar cambios significativos en el canal de color RGB a dos tiempos (10 y 14 días) en las pruebas de reproducibilidad. Se pusieron a prueba correlaciones no paramétricas (Spearman, significancia estadística 95%) para el conjunto de datos de laboratorio y de las imágenes digitales en diferentes escalas geográficas; a nivel ecorregiones, a nivel estado y a nivel cultivo. También se realizaron gráficas de la dispersión de los datos para recuperar cualitativamente el comportamiento de las variables. Por último, se realizó Análisis de Componentes Principales (PCA por sus siglas en inglés) para reconocer cuáles de las variables de

los atributos de las imágenes digitales estaban distinguiendo diferencias entre los sitios, así como la sensibilidad espacial de los atributos cuantificados.

## 7. Resultados

### 7.1 Pruebas de reproducibilidad

La figura 11 muestra las pruebas de reproducibilidad de los cromatogramas. De la inspección visual de estas pruebas excluimos el ancho de los anillos concéntricos como medición puntual dado que varía entre las repeticiones. Sin embargo, estas pruebas muestran que la coloración y las formas de los contornos o terminaciones de los cromatogramas son estables. Además, encontramos que no existen diferencias significativas en los canales de color RGB de los cromatogramas en un intervalo de 10 a 14 días ( $p > 0.05$ ) para el tratamiento con NaOH 1%. Esto nos permitió establecer un intervalo de tiempo de escaneo confiable para la cuantificación o interpretación visual empírica del resto de los cromatogramas.

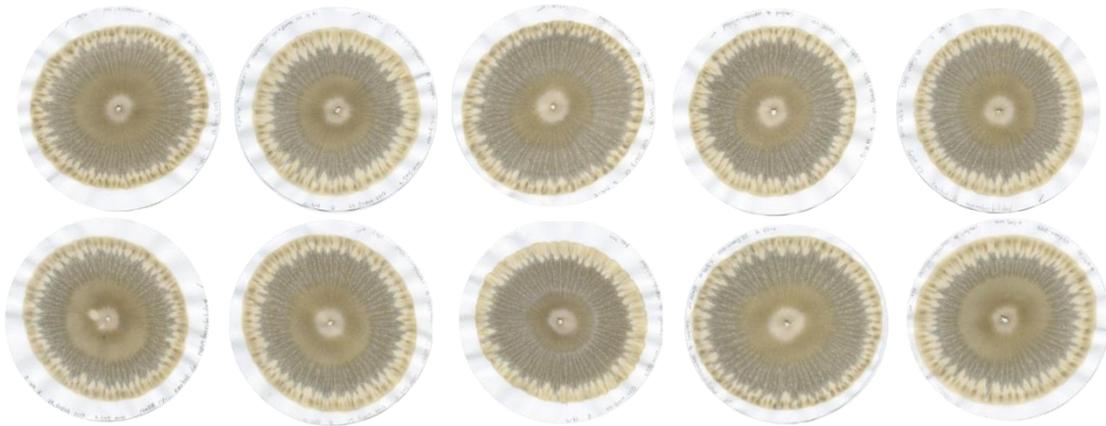


Figura 11. Pruebas de reproducibilidad, 10 repeticiones de una misma muestra de suelo.

### 7.2 Cromatogramas de los cultivos

Se obtuvieron los cromatogramas de las muestras colectadas de los suelos, enseguida se muestran de manera resumida (ver Anexo 1 para mayor resolución). Se obtuvieron los cromatogramas de maíz (Figura 12) y frijol (Figura 13) de La Quemada, San Felipe, Guanajuato siguiendo el método general. Para los cultivos de café (Figura 14) y aguacate (Figura 15) se obtuvieron con la modificación del método de dilución 1:1.

Respecto a los cromatogramas de café y aguacate, se consideró que el alto contenido de materia orgánica, por el aporte constante de hojarasca en cultivos frutales, requiere la modificación de la técnica general con la dilución 1:1 para la realización y lectura de cromatogramas.

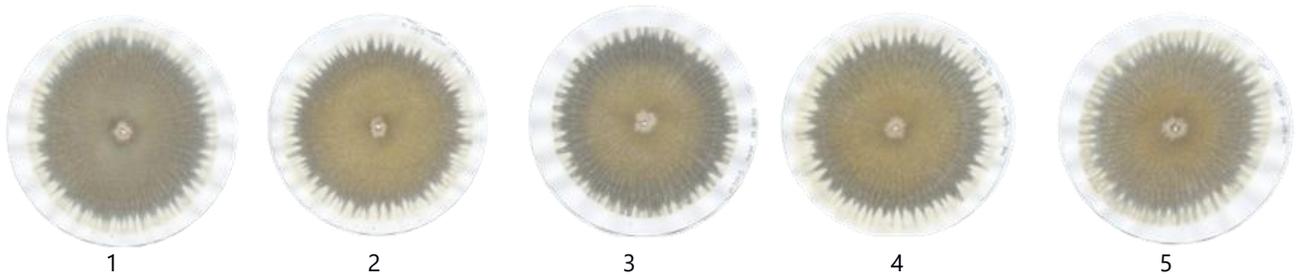


Figura 12. Cromatogramas (1-5) correspondientes a cultivo de maíz en La Quemada, San Felipe, Guanajuato.

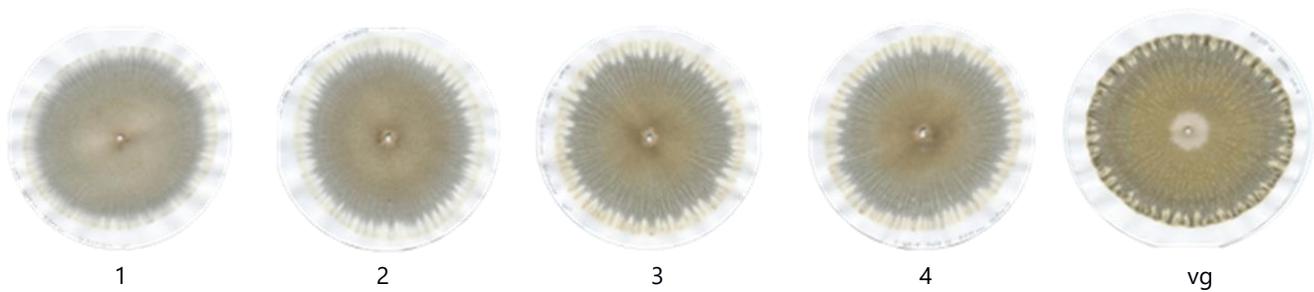


Figura 13. Cromatogramas (1-4) correspondientes a cultivo de frijol en La Quemada, San Felipe, Guanajuato. Cromatograma "vg" corresponde al sitio de vegetación primaria.

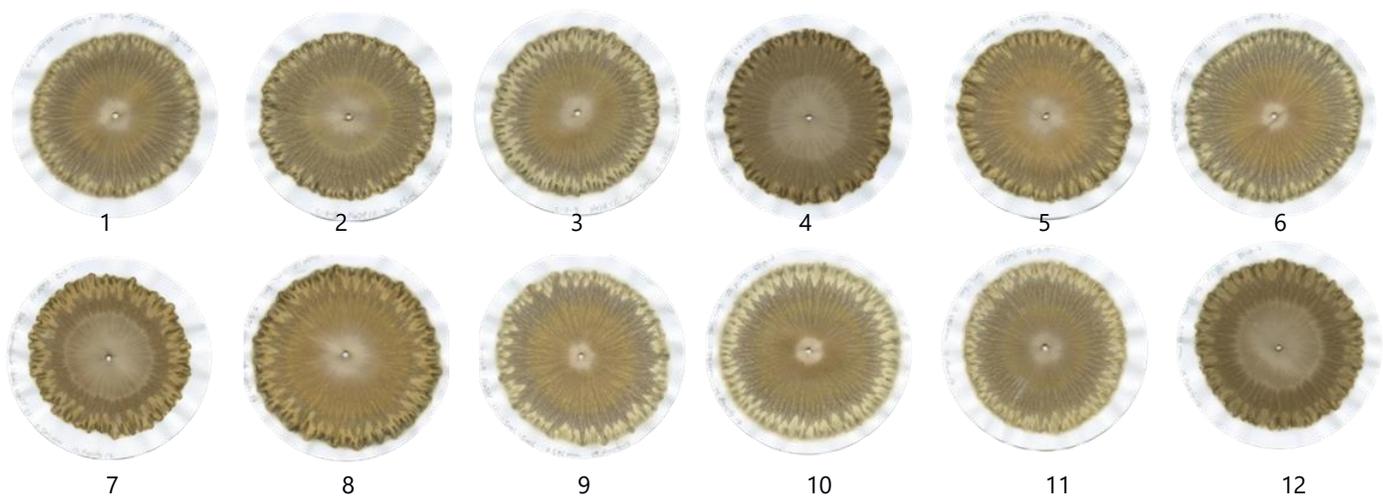


Figura 14. Cromatogramas (1-12) correspondientes a cultivo de café en Veracruz.

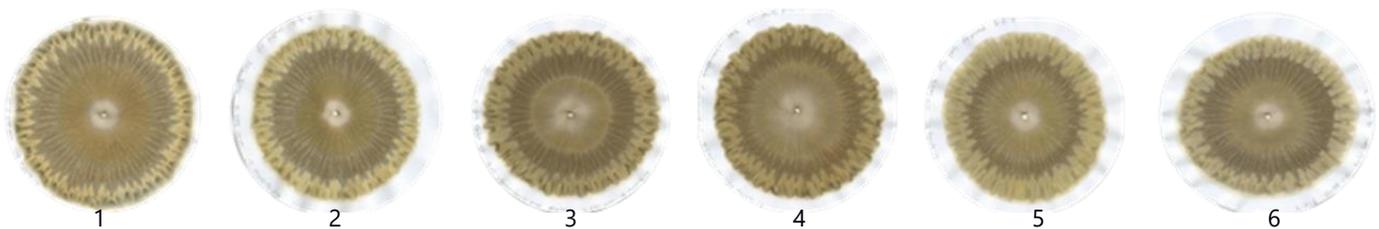


Figura 15. Cromatogramas (1-6) correspondientes a cultivo de aguacate en Veracruz.

En los cromatogramas obtenidos para maíz y frijol de Valle de Santiago, Guanajuato (Ecorregión B) (Figura 16), se observa que todos los cromatogramas, particularmente los de maíz, presentan el mismo color grisáceo en los anillos, sin formas ni coloraciones que se diferencien entre sí. En este caso, se realizaron varias pruebas para tratar de mejorar la extracción y visualización de la materia orgánica: se realizó una repetición de los cromatogramas por posibles errores durante la realización, se aumentó la concentración del NaOH al 2%, siendo al 1% en el protocolo general, y también se dejó reposar las muestras mayor tiempo (24 h) a lo establecido en el protocolo (de 6 h). En ninguno de estos ensayos resultaron cromatogramas que pudiesen ser evaluados (ver cromatogramas resultantes de cada ensayo en Anexo 2) por lo que las correlaciones no incluyen estos datos. Estos suelos presentaron alto contenido de arcillas y fueron identificados por el Dr. Victor Peña como Vertisoles. Atribuimos la dificultad de la extracción de materia orgánica en suelos de alto contenido de arcillas debido a sus propiedades de adsorción [Brady y Weil, 2017].

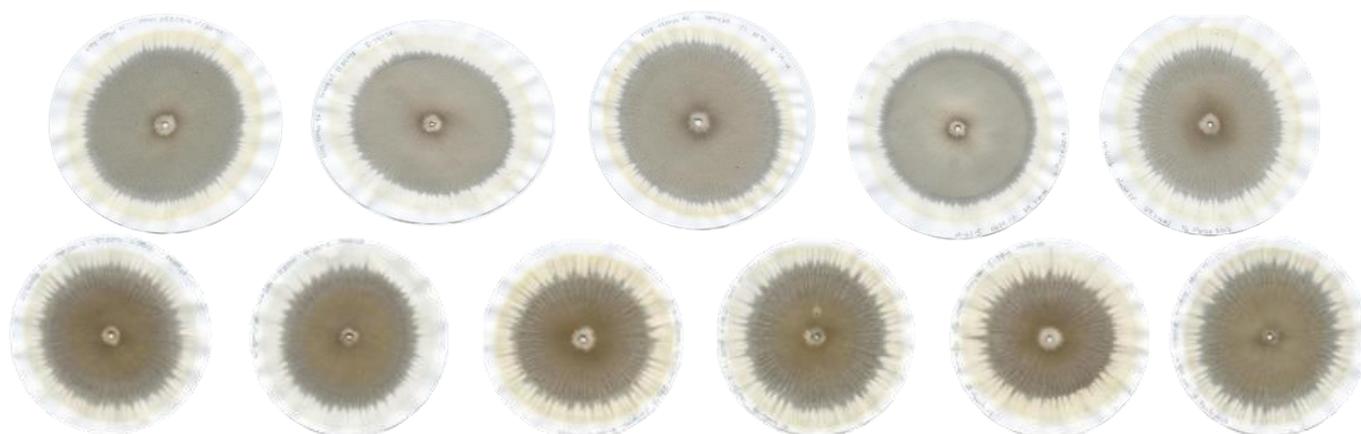


Figura 16. Cromatogramas correspondientes a cultivo de maíz y frijol de Guarapo, Guanajuato.

De los cromatogramas como imágenes digitales que se obtuvieron de los suelos de maíz y frijol de La Quemada, Guanajuato y de los suelos de café y aguacate en Veracruz se midieron algunos de los atributos de forma y color (Tabla 4). La cuantificación de los atributos corresponde a un interés de obtener datos numéricos de los cromatogramas para poder realizar correlaciones con los datos de laboratorio. Los atributos medidos son: compresión .jpg en la imagen en blanco y negro (BN jpg) y a color (RGBjpg) en megabytes, compresión .zip en la imagen en blanco y negro (BN zip) y a color (RGBzip) en megabytes, el color de todo el cromatograma en canal RGB, R, G y B, la dimensión fractal de los contornos extraídos (DF) y el

color del anillo central (CaC). La columna "muestra" corresponde a cada sitio donde se colectó una muestra de suelo y se realizó su cromatograma.

Tabla 4. Atributos cuantificados de los cromatogramas como imágenes digitales. "O1, O2 y O3" significa que corresponde al sitio de vegetación primaria para la ecorregión de cafetales; "AVO" para el suelo de vegetación primaria en ecorregión de cultivos de aguacate; y, "OGN" es el sitio de vegetación primaria en la misma ecorregión que los suelos de maíz y frijol). Asimismo, "C" corresponde a la muestra de suelo de cultivos de café, "A" a aguacate, "M" a maíz y "F" a frijol.

<b>muestra</b>	<b>BN jpg</b>	<b>BN zip</b>	<b>RGBjpg</b>	<b>RGBzip</b>	<b>RGB</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>B</b>	<b>DF</b>	<b>CaC</b>
O1	65.1	248	70.9	633	123.735	148.025	131.972	91.259	1.3607	160.146
O2	55.3	220	60.3	514	109.542	127.988	114.325	86.229	1.231	121.806
O3	62.1	218	66.5	552	119.752	140.163	127.064	92.082	1.4662	153.204
CV1	53.8	199	58.5	511	114.186	135.492	120.726	86.331	1.4324	146.848
CV2	57.7	200	62.3	487	112.489	133.76	119.288	84.42	1.4462	134.719
CV3	58.3	210	62.8	529	121.45	142.651	129.002	92.669	1.4474	146.566
CV4	49.5	197	54	448	95.763	115.125	100.481	71.657	1.4522	117.305
CV5	59.1	218	64.3	569	114.471	139.417	121.539	82.552	1.4214	139.273
CV6	62	216	66.9	576	119.873	141.69	127.536	90.3	1.4719	149.025
CV7	52.9	200	58.2	513	112.225	135.5	117.839	83.303	1.496	120.634
CV8	60.6	232	66.5	608	111.737	138.324	118.875	77.979	1.4781	146.663
CV9	62.4	225	67.3	595	131.555	154.218	138.988	101.362	1.4208	158.226
CV10	65.9	242	71.2	634	132.292	154.734	140.31	101.858	1.3385	156.726
CV11	58.4	214	62.8	538	124.91	146.938	132.149	95.698	1.3492	131.508
CV12	48.4	195	52.6	458	98.988	119.186	104.147	73.647	1.47	116.514
AVO	56.2	208	61	528	117.609	138.398	124.818	89.617	1.3215	147.855
AV1	67.3	244	73.2	632	123.11	147.809	131.098	90.462	1.4009	153.637
AV2	55.4	214	60.1	545	125.437	147.863	133.886	94.473	1.2938	157.981
AV3	55.4	220	60.2	530	109.379	131.301	115.788	81.087	1.2975	139.728
AV4	51.3	204	56.1	512	110.252	133.732	116.671	80.425	1.3392	138.517
AV5	52.1	207	56.5	507	124.74	147.675	132.887	93.689	1.3186	146.386
AV6	53.5	213	57.7	509	122.119	142.018	128.69	95.662	1.2981	151.333
OGN	61	225	65.8	672	137.456	154.259	144.661	113.446	1.4225	169.299
MGN1	57.2	217	60.4	474	153.924	161.848	157.766	141.977	1.2568	175.863
MGN2	53.6	218	57.4	506	155.454	165.428	159.962	140.945	1.3028	170.218
MGN3	55.2	199	58.5	483	136.242	147.314	140.764	120.6	1.2897	162.785
MGN4	65.6	244	69.9	610	149.731	162.768	154.849	131.72	1.2995	174.011
MGN5	57.4	225	61.5	552	150.717	162.753	154.992	134.48	1.3203	153.356
FGN1	49.1	201	52.2	424	161.666	168.612	165.84	150.498	1.1818	135.769
FGN2	51	214	54.2	464	158.315	166.849	162.744	145.262	1.225	123.799
FGN3	58.7	222	62.8	531	153.206	163.683	158.468	137.515	1.3073	144.718
FGN4	57.6	234	61.6	560	159.217	169.134	164.247	144.308	1.3175	148.607

Ahora bien, los datos obtenidos por los laboratorios del Dr. Julio Campo Alves (Instituto de Ecología, UNAM), la Dra. Ana Elena Escalante (Instituto de Ecología, UNAM) y el Dr. Víctor Peña (Instituto de Geología, UNAM) para cada muestra de suelo son: porcentaje de arcilla, limo, arena, humedad y pedregosidad (PED), así como densidad aparente (DA), conductividad eléctrica (CE), capacidad máxima de retención de agua (CMRA), nitrógeno total (Nt), fósforo total (Pt), materia orgánica (MO), carbono orgánico (CO), pH, actividad enzimática (BGLC: beta glucosidasa, POX: polifenol oxidasa, LEU: leucina aminopeptidasa, NAC: N-acetil glucosaminidasa y FOS: fosfatasa) y diversidad bacteriana cuantificada por índice de Shannon (DBs) e índice de Chao1 (DBc). Las correlaciones de todos los datos se realizaron con método no paramétrico Spearman, de interés son las correlaciones entre datos de laboratorio y datos de las imágenes (ver correlaciones en Anexos).

### 7.3 Correlaciones a nivel ecorregión

Con el objetivo de evaluar a los cromatogramas como indicadores de calidad de suelos asociados a cultivos y condiciones ambientales diversas, se realizaron correlaciones incluyendo las ecorregiones estudiadas. Sin embargo, no incluye los cultivos de maíz y frijol del Valle de Santiago debido a que no se obtuvieron cromatogramas interpretables (Figura 17).

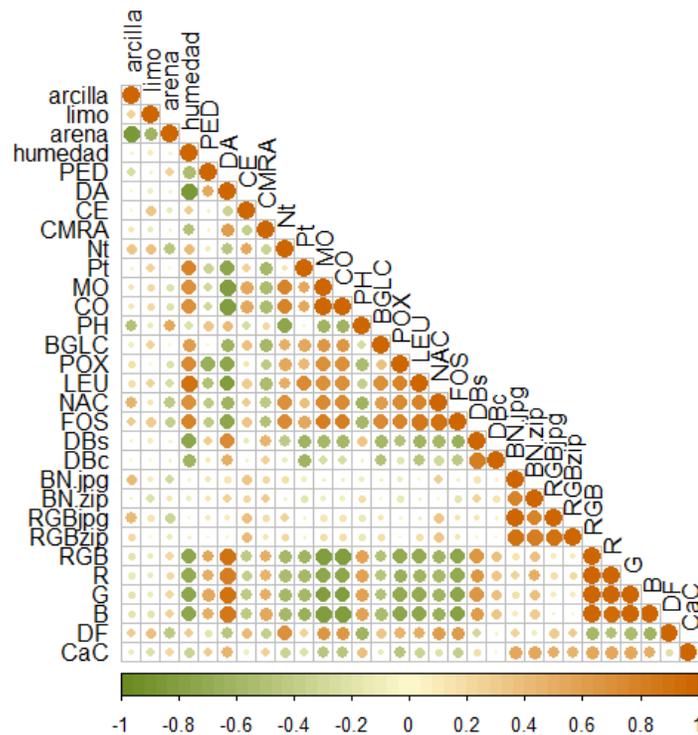


Figura 17. Correlaciones no paramétricas (Spearman) a nivel ecorregión. Los círculos más grandes presentan un  $p < 0.05$ , el color indica si la relación es (-) o (+) y mientras más saturado el color más alto será el valor rho.

Se encontró que existen correlaciones significativas no paramétricas ( $p < 0.05$ ; método Spearman) para las variables:

- Humedad con R ( $\rho = -0.68$ ), G ( $\rho = -0.75$ ), B ( $\rho = -0.74$ ) y RGB ( $\rho = -0.76$ )
- Pedregosidad con R ( $\rho = 0.50$ ), G ( $\rho = 0.54$ ), B ( $\rho = 0.50$ ) y RGB ( $\rho = 0.52$ )
- Densidad aparente con R ( $\rho = 0.83$ ), G ( $\rho = 0.88$ ), B ( $\rho = 0.86$ ), RGB ( $\rho = 0.88$ ), dimensión fractal ( $\rho = -0.47$ ) y color del anillo central ( $\rho = 0.46$ )
- Conductividad eléctrica con R ( $\rho = -0.38$ ), G ( $\rho = -0.42$ ), B ( $\rho = -0.44$ ), RGB ( $\rho = -0.44$ ), dimensión fractal ( $\rho = 0.41$ ), color del anillo central ( $\rho = -0.1$ ) y compresión a color .zip ( $\rho = 0.40$ ) y .jpg ( $\rho = 0.36$ )
- Capacidad máxima de retención de agua con R ( $\rho = 0.47$ ), G ( $\rho = 0.49$ ), B ( $\rho = 0.53$ ), RGB ( $\rho = 0.51$ ) y dimensión fractal ( $\rho = -0.37$ )
- Nitrógeno total con R ( $\rho = -0.54$ ), G ( $\rho = -0.59$ ), B ( $\rho = -0.59$ ), RGB ( $\rho = -0.58$ ), dimensión fractal ( $\rho = 0.69$ ) y color del anillo central ( $\rho = -0.36$ )
- Fósforo total con R ( $\rho = -0.56$ ), G ( $\rho = -0.6$ ), B ( $\rho = -0.65$ ), RGB ( $\rho = -0.61$ )
- Materia orgánica con R ( $\rho = -0.76$ ), G ( $\rho = -0.80$ ), B ( $\rho = -0.82$ ), RGB ( $\rho = -0.81$ ), dimensión fractal ( $\rho = 0.65$ ) y color del anillo central ( $\rho = -0.46$ )
- pH con R ( $\rho = 0.57$ ), G ( $\rho = 0.59$ ), B ( $\rho = 0.58$ ), RGB ( $\rho = 0.59$ ), dimensión fractal ( $\rho = -0.6$ ) y color del anillo central ( $\rho = 0.38$ )
- Actividad de la enzima beta glucosidasa con R ( $\rho = -0.47$ ), G ( $\rho = -0.5$ ), B ( $\rho = -0.54$ ), RGB ( $\rho = -0.51$ ) y dimensión fractal ( $\rho = 0.34$ )
- Actividad de la enzima polifenol oxidasa con R ( $\rho = -0.65$ ), G ( $\rho = -0.72$ ), B ( $\rho = -0.73$ ), RGB ( $\rho = -0.71$ ), dimensión fractal ( $\rho = 0.46$ ) y color del anillo central ( $\rho = -0.45$ )
- Actividad de la enzima leucina aminopeptidasa con R ( $\rho = -0.62$ ), G ( $\rho = -0.71$ ), B ( $\rho = -0.76$ ), RGB ( $\rho = -0.71$ ) y dimensión fractal ( $\rho = 0.49$ )
- Actividad de la enzima N-acetil glucosaminidasa con R ( $\rho = -0.57$ ), G ( $\rho = -0.64$ ), B ( $\rho = -0.65$ ), RGB ( $\rho = -0.64$ ) y dimensión fractal ( $\rho = 0.6$ )
- Actividad de la enzima fosfatasa con R ( $\rho = -0.71$ ), G ( $\rho = -0.76$ ), B ( $\rho = -0.78$ ), RGB ( $\rho = -0.76$ ), dimensión fractal ( $\rho = 0.62$ ) y color del anillo central ( $\rho = -0.37$ )
- Índice de diversidad de bacterias de Shannon con R ( $\rho = 0.65$ ), G ( $\rho = 0.67$ ), B ( $\rho = 0.62$ ), y RGB ( $\rho = 0.67$ )

- Índice de diversidad de bacterias de Chao1 con G ( $\rho = 0.37$ ) y RGB ( $\rho = 0.36$ ) y
- Dimensión fractal con limo ( $\rho = 0.36$ ) y arena ( $\rho = -0.44$ ).

De las correlaciones significativas, seleccionamos pares de datos entre atributos de los cromatogramas y resultado de laboratorio que son recurrentemente asociados entre sí en la interpretación visual empírica que antecede esta investigación. Se realizaron gráficas de dispersión para representar cualitativamente el comportamiento de las variables. Primero, se muestran las gráficas de: los canales de color RGB con la humedad del suelo (Figura 18); color RGB, color del anillo central y dimensión fractal con la densidad aparente (Figura 19); los canales de colores R, G, B con pedregosidad (Figura 20); los canales RGB, R, G, B con la cantidad de materia orgánica (Figura 21 y 22) y el color del anillo central con el contenido nitrógeno total (Figura 23). Posteriormente, se reportan las correlaciones significativas de atributos de cromatograma con características biológicas, como la dimensión fractal con las actividades enzimáticas (Figura 24) y el color con diversidad bacteriana de Shannon y Chao1 (Figura 25). Por último, se incluyen correlaciones de pares de datos que, hasta ahora, se desconoce que se recuperen en la interpretación visual empírica, pero que consideramos podrían ser de potencial importancia por la información que recuperan. Se presentan los canales de color RGB y la dimensión fractal con pH (Figura 26) y el color RGB, dimensión fractal y compresión .jpg y .zip a color con la conductividad eléctrica (Figura 27).

Los cultivos de maíz y frijol (cultivos anuales) presentan bajos contenidos de humedad del suelo, esto se refleja en la cuantificación de los valores del color RGB, siendo más alto (de 136-162) que en las muestras de café y aguacate de Veracruz. En este último, el suelo presentó mayor humedad y menor valor en el color RGB (de 100-130) en comparación con Guanajuato. De esto, se concluye que el canal de color RGB con la humedad distingue los suelos de los cultivos anuales y perennes tal como se distingue en la Figura 18.

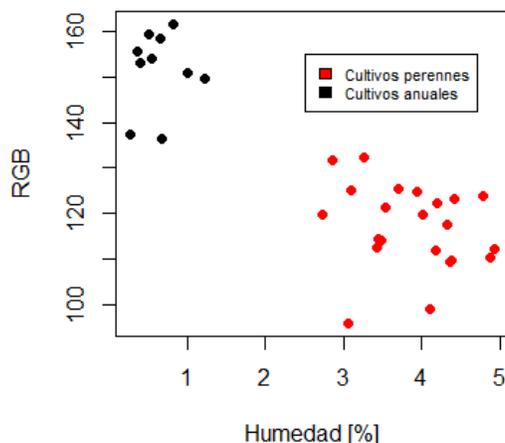


Figura 18. Dispersión de datos de canal de color RGB con humedad ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.76$ ).

La compactación es una de las características físicas del suelo que la interpretación visual empírica propone como asociada al color del cromatograma, particularmente del anillo central. La densidad aparente es una medición directamente asociada a la compactación. En esta investigación, resultó significativa la correlación entre los colores cuantificados de todo el cromatograma con la densidad aparente. Se observa que los cromatogramas con valores mayores en los canales de color presentaron valores mayores de densidad aparente. Sin embargo, en la interpretación visual empírica el color del anillo central se posiciona como el atributo que refleja la compactación, aunque significativa, la correlación no presenta una tendencia cualitativa clara (Figura 19). También resultó significativa la correlación de la densidad aparente con el atributo que cuantifica las terminaciones, la dimensión fractal, pero del mismo modo que el color del anillo central, no se observa una tendencia lineal clara.

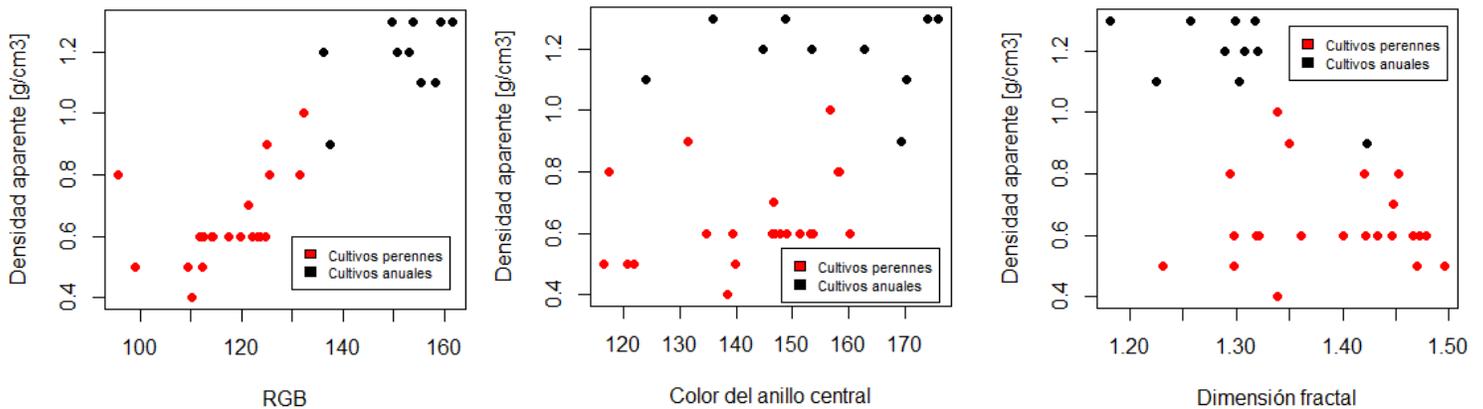


Figura 19. Dispersión de datos de canal de color RGB con densidad aparente ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.88$ ), de color del anillo central con densidad aparente ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.46$ ) y dimensión fractal con densidad aparente ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.46$ ).

La pedregosidad presenta tendencias cualitativas, tales que los valores mayores en los canales de color R, G y B se asocian a las muestras que presentan alta pedregosidad, y éstas corresponden a suelos de cultivos anuales en Guanajuato. Sin embargo, existen tres muestras de suelos en cultivos de café que presentan alta pedregosidad, pero tienen valores bajos en los canales de color R, G y B, por lo que es difícil establecer una relación lineal (Figura 20).

En la Figura 21 se observa una tendencia cuasi-lineal entre las variables de color RGB y la cantidad de materia orgánica, donde los suelos de cultivos perennes que muestran mayor contenido de materia orgánica corresponden a cromatogramas con valores de color RGB

menores en comparación con los suelos de cultivos anuales que presentan menor contenido de materia orgánica.

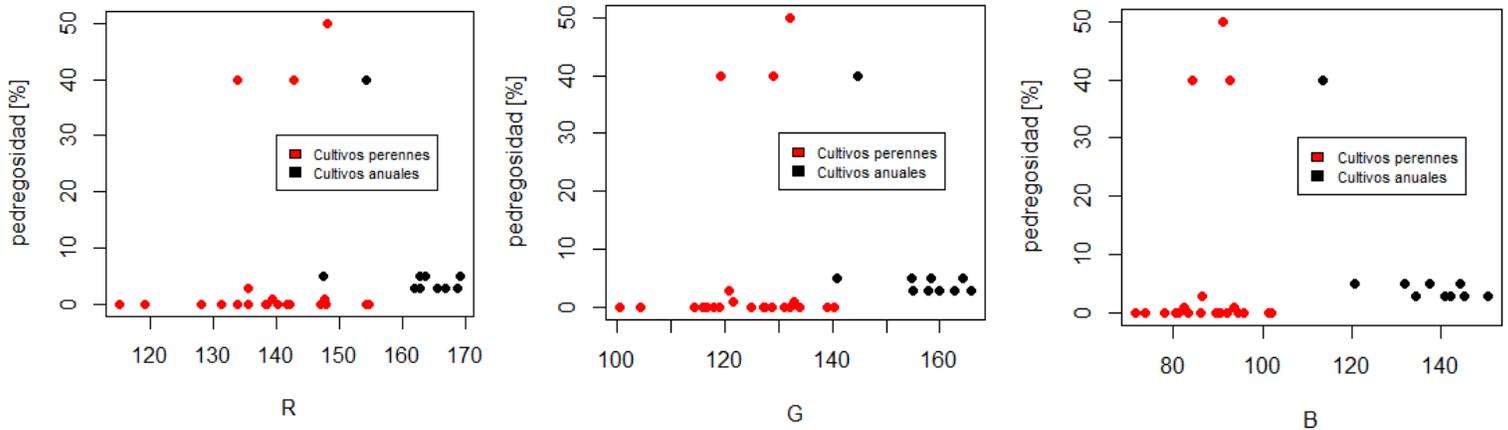


Figura 20. Dispersión de datos de canal de color R con pedregosidad ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.50$ ), canal de color G con pedregosidad ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.54$ ) y canal de color B con pedregosidad ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.50$ ).

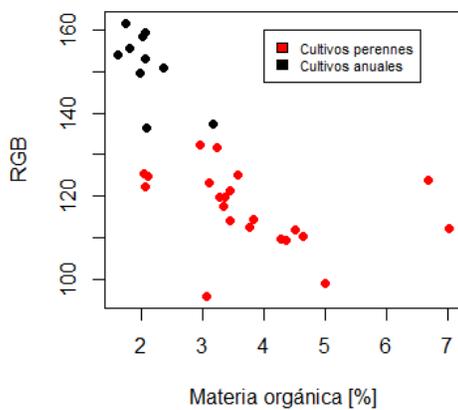


Figura 21. Dispersión de datos de materia orgánica con canal de color RGB ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.81$ ).

En la siguiente figura se presentan los canales de color R, G y B y su relación significativa con el contenido de materia orgánica. Los colores son un atributo fundamental para la evaluación visual empírica, sin embargo, conlleva cierta dificultad nombrar los tonos e intensidades de un color, lo que podría resultar en una interpretación confusa de la calidad del suelo. Consideramos que la cuantificación de los colores digitales provee de una escala parametrizada útil y accesible para medir el color de los cromatogramas. Los suelos con alto contenido de materia orgánica (café y aguacate: perennes) presentaron valores menores R (115-155), G (101-140) y B (72-102) en contraste con suelos con bajo contenido de materia orgánica (maíz y frijol: anuales) con valores R (147-169), G (141-166) y B (113-151). Además, el canal de color azul presentó una clara distinción entre los cultivos perennes y anuales, por lo que podría ser el color que más fácilmente permitiese distinguir suelos con cantidades contrastantes de materia orgánica (Figura 22).

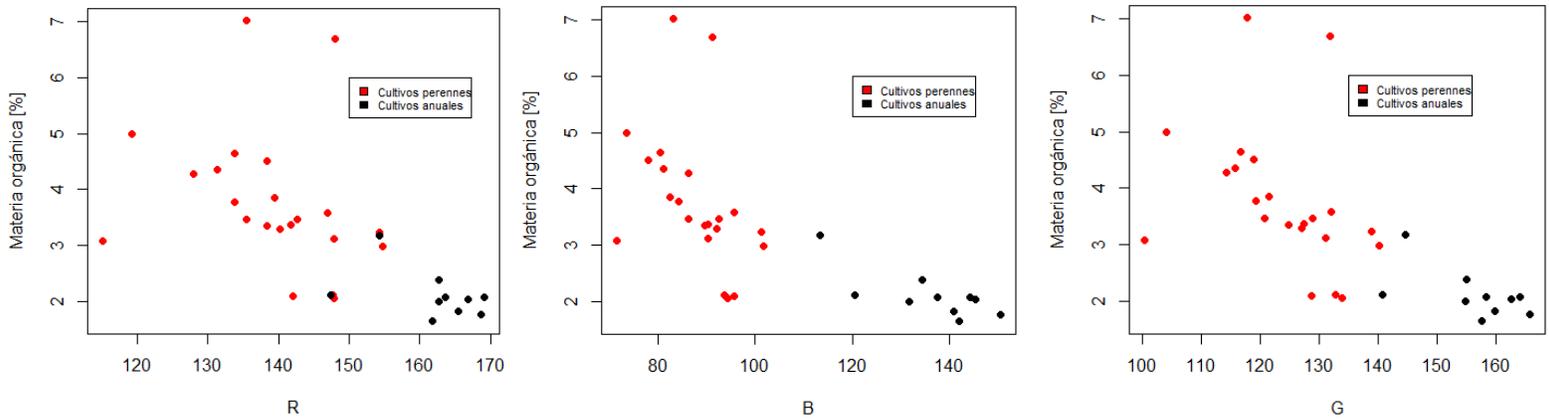


Figura 22. Dispersión de datos contenido de materia orgánica con canal de color R ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.76$ ), G ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.8$ ) y B ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.82$ ).

La disponibilidad de nitrógeno también es usualmente reportada en la interpretación visual empírica como una característica asociada al color del centro. Sin embargo, como se observa en la Figura 23, la dispersión de los datos del color del anillo central y nitrógeno total, aunque significativa no se observa un comportamiento funcional (lineal, exponencial o potencial) claro en los datos.

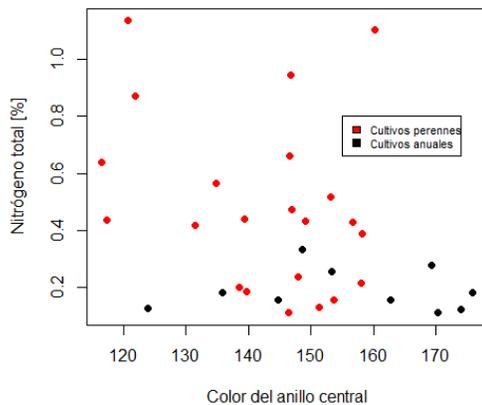


Figura 23. Dispersión de datos del color el anillo central y nitrógeno total ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.36$ ).

Es de interés recordar que la dimensión fractal la utilizamos para la cuantificación de los contornos de la imagen, y éstos han sido relacionados con la actividad microbiológica del suelo en la interpretación visual empírica. Con nuestros datos, se observa que el cromatograma con el valor más alto de dimensión fractal también es el que presentó mayor actividad enzimática en las enzimas beta glucosidasa, leucina aminopeptidasa, fosfatasa y polifenol oxidasa, siendo la muestra con mayor actividad e intrincación del contorno correspondiente a un cafetal con manejo de policultivo tradicional (Figura 24). Además, dos parcelas correspondientes a cultivo de café con un manejo de policultivo tradicional (CV8) y manejo café de sombra comercial (CV7),

un aguacatal (AV4) y un sitio de vegetación primaria presentaron alta dimensión fractal y alta actividad enzimática, significativamente correlacionadas. Estas enzimas están asociadas a procesos de descomposición y mineralización de C, N y P, y consideramos que al existir un gran aporte de materia orgánica de diversas composiciones en los cafetales debido al policultivo y los árboles de sombra, entonces existen múltiples sustratos para la actividad enzimática.

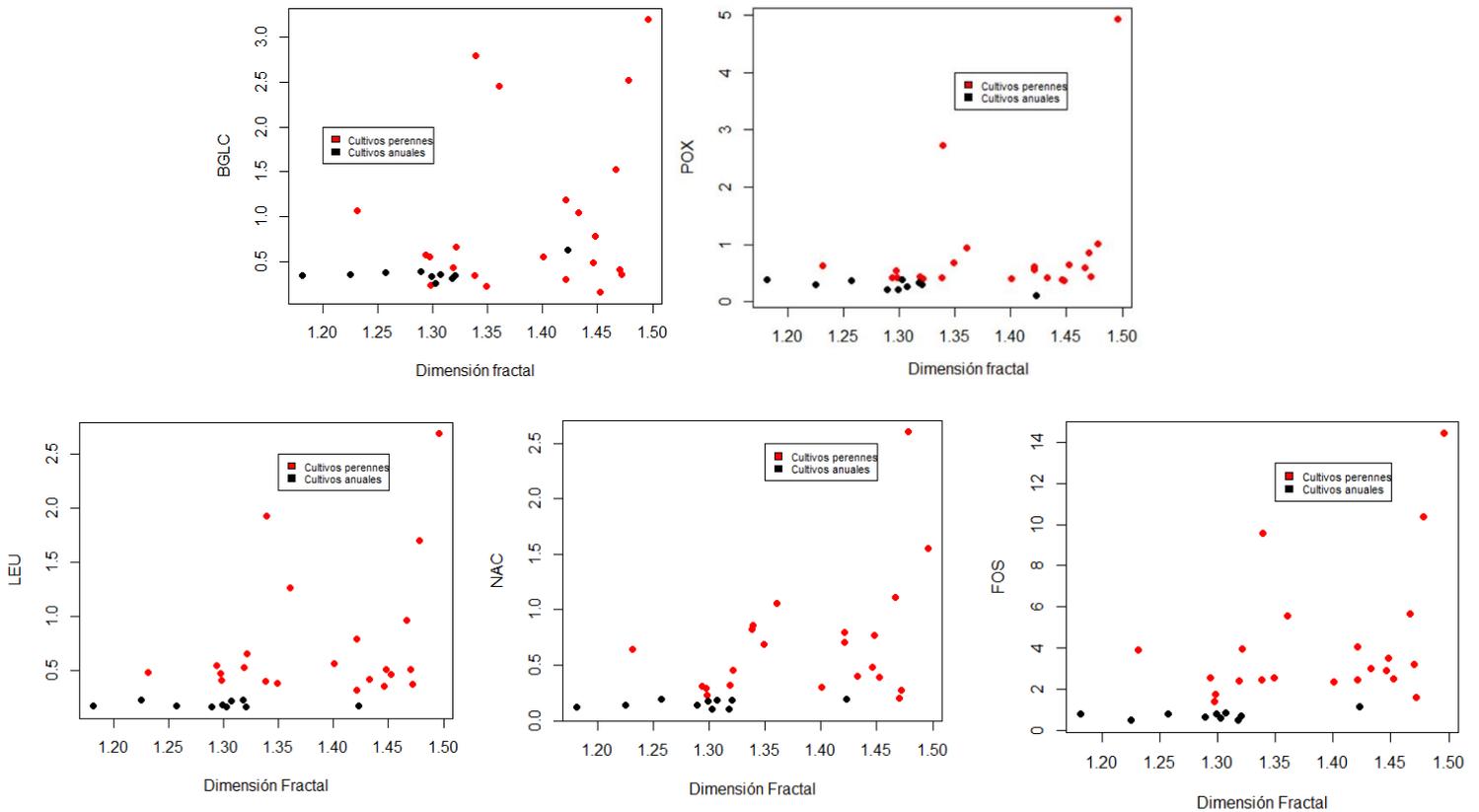


Figura 24. Dispersión de datos de dimensión fractal con enzima BGLC ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.34$ ), POX ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.46$ ), LEU ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.49$ ), NAC ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.6$ ) y enzima FOS ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.62$ ). Las unidades de la actividad enzimática son  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$

Con el interés de explorar la relación de los cromatogramas con la diversidad bacteriana, el grupo de la Dra. Ana Escalante estimó la diversidad bacteriana por extracción y secuenciación del DNA bacteriano con los índices de Shannon y Chao1. La diversidad bacteriana resultó mantener una correlación significativa con el color RGB, siendo mayor el índice de Shannon en muestras con cultivos anuales como maíz y frijol que en cultivos de café y aguacate. El índice de Chao1 muestra presenta un comportamiento similar al índice de Shannon, es decir, los cultivos perennes presentan un valor menor en comparación con los cultivos anuales (Figura 25).

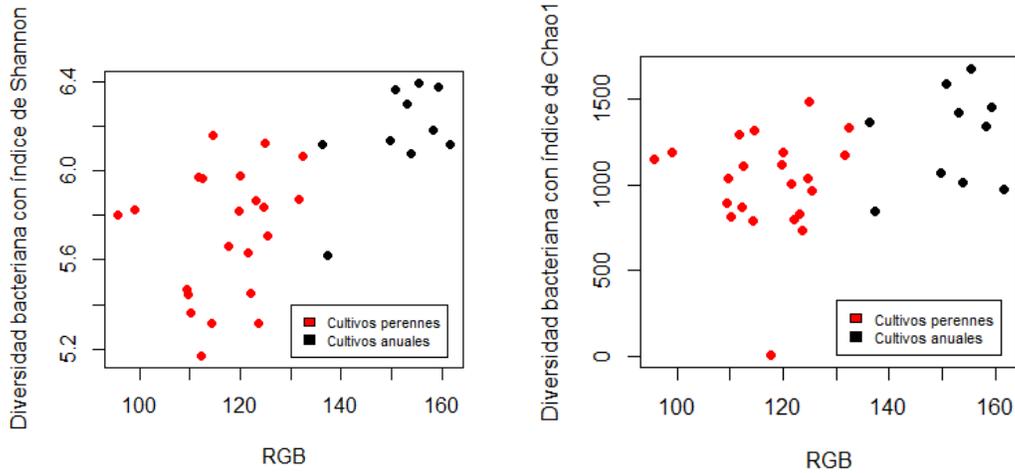


Figura 25. Dispersión de datos de color RGB con diversidad bacteriana con índice de Shannon ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.67$ ) y con índice de Chao1 ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.37$ ).

Por último, se muestran las correlaciones entre atributos de color y forma del cromatograma con características del suelo que no han sido reportadas en la interpretación visual empírica, pero que consideramos de particular interés por ser, usualmente, utilizados como indicadores físicos o químicos de la calidad del suelo. En la Figura 26 se observan los datos de color cuantificado en RGB, los cultivos perennes presentaron suelos neutros a ácidos, mientras que los cultivos anuales, en general, fueron suelos neutros. El pH correlacionó significativamente con el color digital de los cromatogramas, siendo el valor RGB mayor mientras el pH tendía a neutro. Por otro lado, la cuantificación de las terminaciones en la dimensión fractal también resultó correlacionada con pH. Se observa que mientras menor es el valor de la dimensión fractal más ácido tiende a ser el suelo.

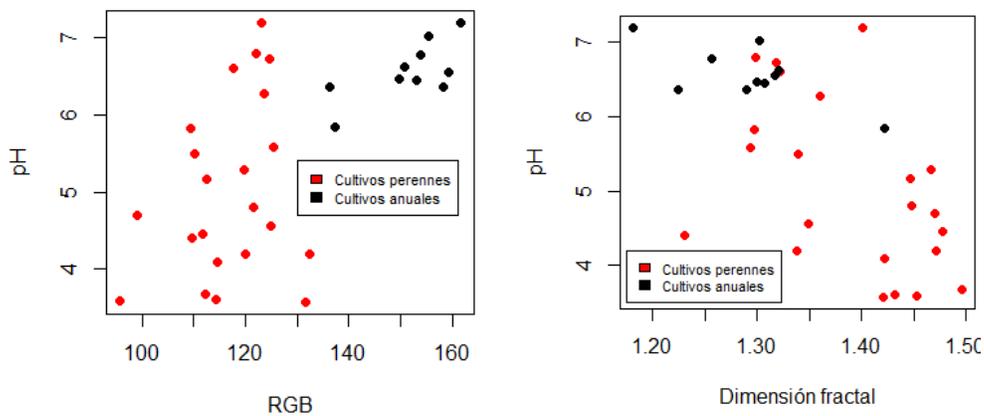


Figura 26. Dispersión de datos de color RGB con pH ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.59$ ) y dimensión fractal con pH ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.6$ ).

La conductividad eléctrica resultó correlacionada significativamente con los colores (Figura 27). La tendencia general indica que mientras mayor sea el valor RGB, menor es la conductividad eléctrica. La dimensión fractal también resultó correlacionada con la conductividad eléctrica, sin embargo, la tendencia no presenta un comportamiento cualitativamente funcional claro. Por último, a esta escala geográfica, que considera muestras de diferentes cultivos y ecorregiones, la compresión de la imagen del cromatograma a color en ambos algoritmos .jpg y .zip resultó significativamente correlacionada sólo con la conductividad eléctrica, tal como se observa en la Figura 27. Los cromatogramas con bajo valor de compresión presentan baja conductividad eléctrica; también, se observa que esta tendencia no distingue entre cultivos perennes y anuales.

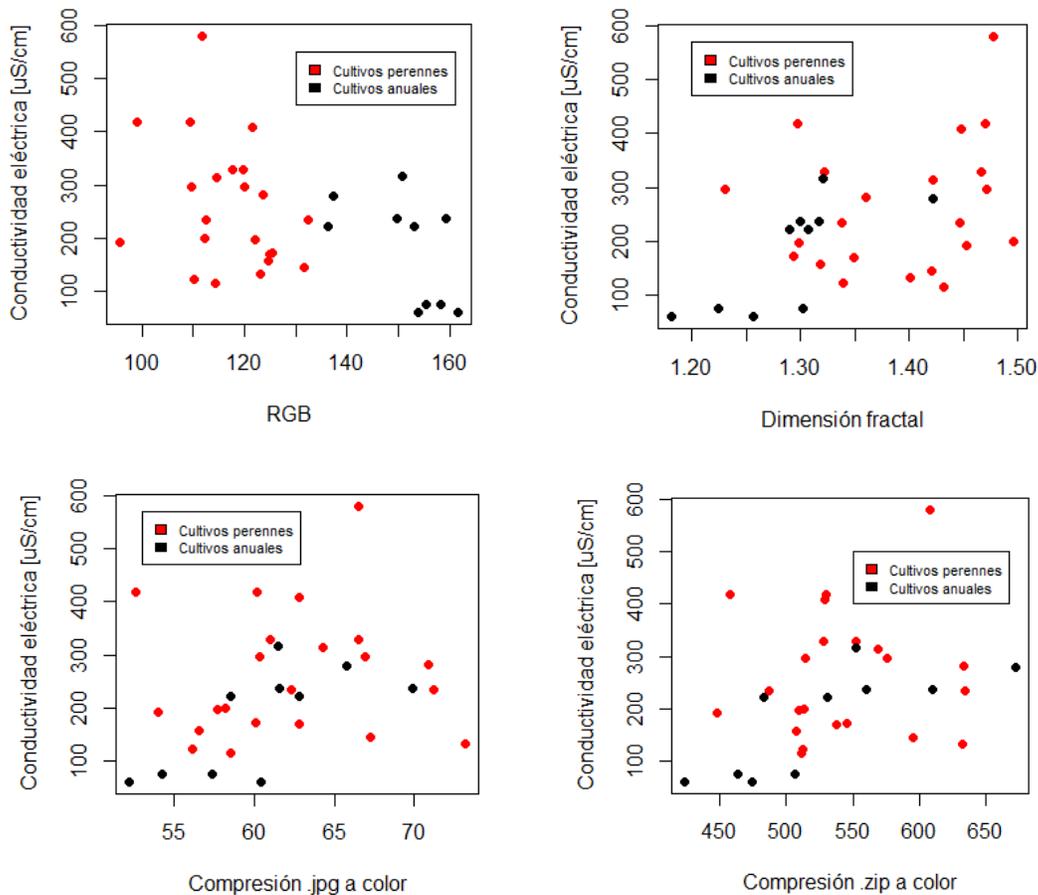


Figura 27. Dispersión de datos canal de color RGB con conductividad eléctrica ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.44$ ), dimensión fractal con conductividad eléctrica ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.41$ ), compresión .jpg a color con conductividad eléctrica ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.36$ ) y compresión .zip a color con conductividad eléctrica ( $p < 0.04$ ,  $\rho = 0.4$ ).

### 7.4 Correlaciones en cultivos perennes

Con el fin de probar el grado de resolución o sensibilidad espacial de los cromatogramas para un conjunto de muestras relativamente similares entre sí, se realizaron las correlaciones para las muestras de cultivos perennes de Veracruz (n=22). Se encontró que dentro de los cultivos perennes hay correlación (método Spearman,  $p < 0.05$ ) entre las siguientes variables:

- Arcilla con compresión .jpg en blanco/negro ( $\rho = -0.57$ ) y compresión .jpg a color ( $\rho = -0.57$ )
- Arena con compresión .jpg en blanco/negro ( $\rho = -0.42$ )
- Densidad aparente con color R ( $\rho = 0.63$ ), G ( $\rho = 0.68$ ), B ( $\rho = 0.63$ ), RGB ( $\rho = 0.67$ ) y compresión .jpg en blanco/negro ( $\rho = 0.44$ )
- Nitrógeno total con dimensión fractal ( $\rho = 0.6$ )
- Materia orgánica y carbono orgánico con R ( $\rho = -0.48$ ), G ( $\rho = -0.57$ ), B ( $\rho = -0.6$ ), RGB ( $\rho = -0.56$ ) y color del anillo central ( $\rho = -0.47$ ); así como
- Índice de diversidad bacteriana de Shannon ( $\rho = 0.48$ ) con compresión .jpg a blanco/negro ( $\rho = -0.48$ ) y con compresión .jpg a color ( $\rho = 0.47$ ) (Figura 28).

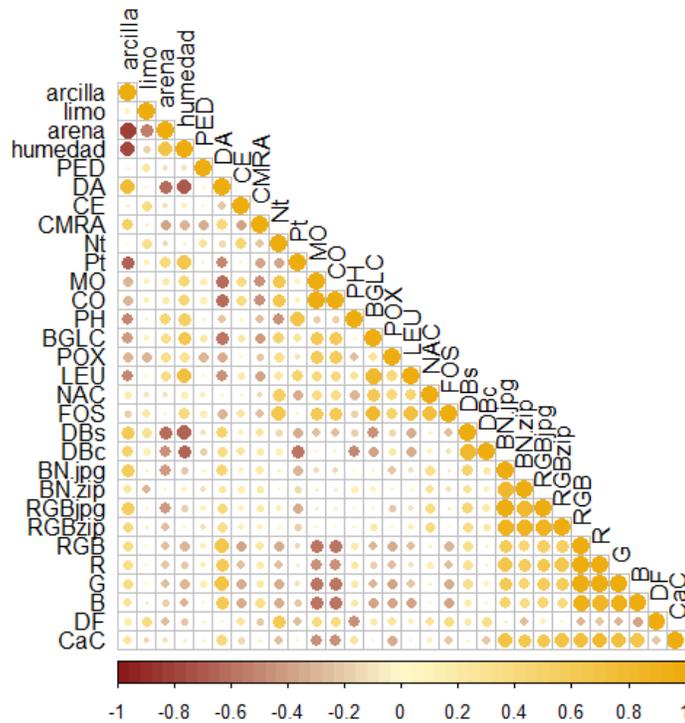


Figura 28. Visualización de las correlaciones con método Spearman en cultivos perennes. Los círculos más grandes presentan un  $p < 0.05$ , el color indica si la relación es (-) o (+) y mientras más saturado el color, más alto el valor rho es.

De estas correlaciones significativas, para realizar su gráfica de dispersión, se seleccionaron aquellas con un antecedente en la interpretación visual empírica como el color con la cantidad de materia orgánica (Figura 29). Por otro lado, se analizan las correlaciones que se mantuvieron significativas en los cultivos perennes aunque no son comúnmente usadas en la interpretación visual empírica: color RGB con densidad aparente (Figura 30) y dimensión fractal con pH y nitrógeno total (Figura 31). Por último, se muestran las correlaciones del algoritmo de compresión .jpg a blanco/negro con porcentaje de arcilla, arena, densidad aparente e índice de diversidad bacteriana de Shannon (Figura 32).

El color, como se ha mencionado, es una de las características más importantes en la interpretación visual empírica, resultando, en esta investigación, correlacionada con materia orgánica y con densidad aparente. La correlación de materia orgánica con los colores RGB, R, G y B es significativa en los cultivos perennes. En la Figura 29 se observa la dispersión de datos de RGB, G y B con materia orgánica, la tendencia cualitativa muestra que los canales de color con menos valor presentan menores contenidos de materia orgánica, independientemente del tipo de cultivo puesto que los datos de café y aguacate se encuentran intercalados. Esto se atribuye a que tanto los cultivos de aguacate como café tienen aportación importante de residuos orgánicos y que sería el tipo de suelo o manejo agrícola, más que el tipo de cultivo en sí, lo que contribuya al menor o mayor porcentaje de materia orgánica.

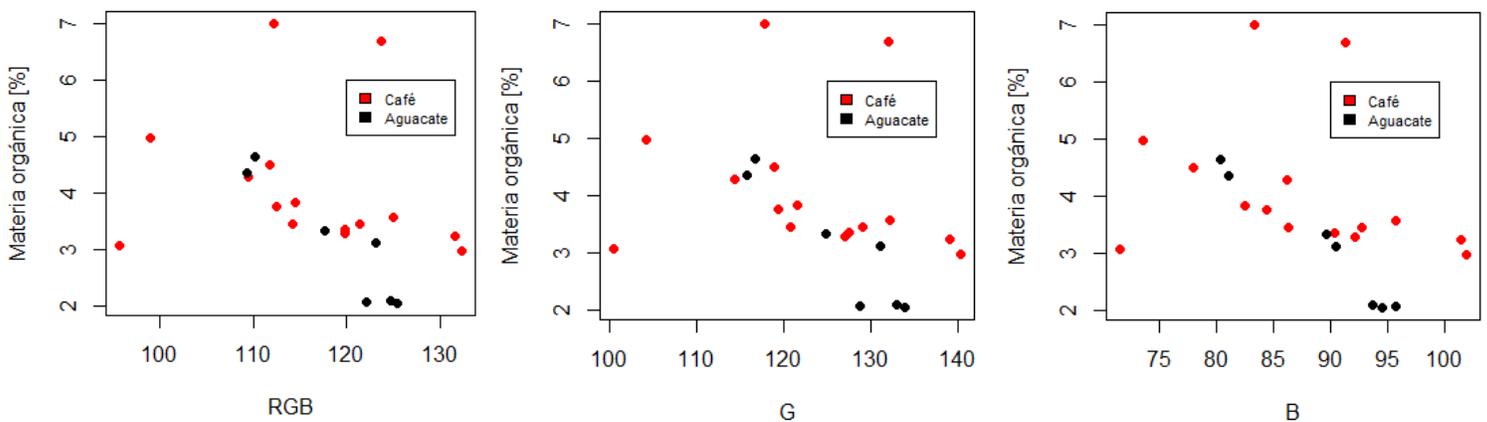


Figura 29. Dispersión de datos canal de color RGB con materia orgánica ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.56$ ), canal de color G con materia orgánica ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.57$ ) y B con materia orgánica ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.6$ ),

La densidad aparente correlaciona significativamente con el color RGB y muestra un comportamiento cualitativo lineal, donde los suelos que presentan baja densidad aparente también presentan menor valor del canal RGB tal como se observa en la Figura 30.

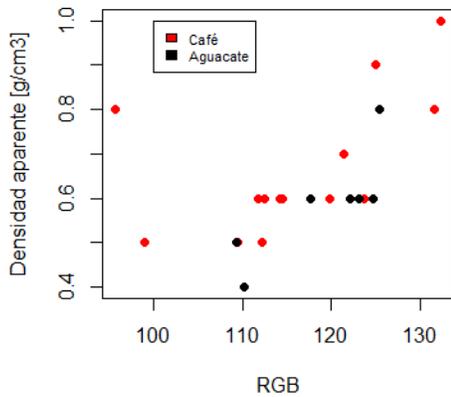


Figura 30. Dispersión de datos canal de color RGB con densidad aparente ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.67$ ).

Se muestran, en la Figura 31, las correlaciones de dimensión fractal de los contornos con nitrógeno total y pH, hasta donde sabemos, éstas no han sido reportadas en la interpretación visual empírica. En dicha interpretación, el nitrógeno suele estar asociado al color del anillo central, mas no a las terminaciones; mientras que el pH no está asociado a ninguna característica. Estas correlaciones de la dimensión fractal con el pH se mantienen tanto a la escala amplia (diversos cultivos y ecorregiones en Guanajuato y Veracruz) como en la regional (Veracruz, cultivos perennes). Respecto al nitrógeno, se observa que el contenido de nitrógeno permite diferenciar los cultivos de café y aguacate, siendo menor en este último. La dimensión fractal con el menor número corresponde a un sitio de vegetación primaria (O2) y un alto contenido de nitrógeno, aunque cabe mencionar que este cromatograma resultó particularmente saturado de materia orgánica y que presentó falta de contraste para la extracción de su contorno. Respecto al pH, tanto en las correlaciones que incluyen los cuatro cultivos como sólo los perennes, la correlación pH-dimensión fractal es significativa. Y, aunque hay pocos datos para que generar un resultado concluyente, observamos que cualitativamente los cultivos de café presentan suelos más ácidos y un número mayor de dimensión fractal, mientras que los suelos de aguacate tienden a un pH neutro y un menor número de dimensión fractal.

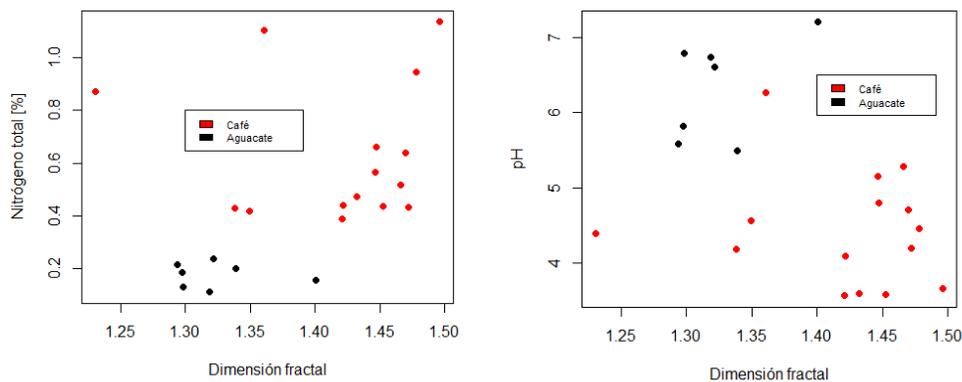


Figura 31. Dispersión de datos de dimensión fractal y nitrógeno total ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.6$ ) y con pH ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.48$ ).

Por último, el algoritmo de compresión .jpg a b/n resultó sensible a las variaciones dentro de los cultivos perennes puesto que se correlacionó significativamente con características del suelo como porcentaje de arcilla y arena, así como densidad aparente. Además, estos algoritmos exhibieron una correlación significativa con el índice de diversidad bacteriana de Shannon (Figura 32). Consideramos que los valores de compresión utilizados parecen ser más útiles para conjuntos de muestras y cromatogramas similares entre sí, es decir, para escalas regionales o locales.

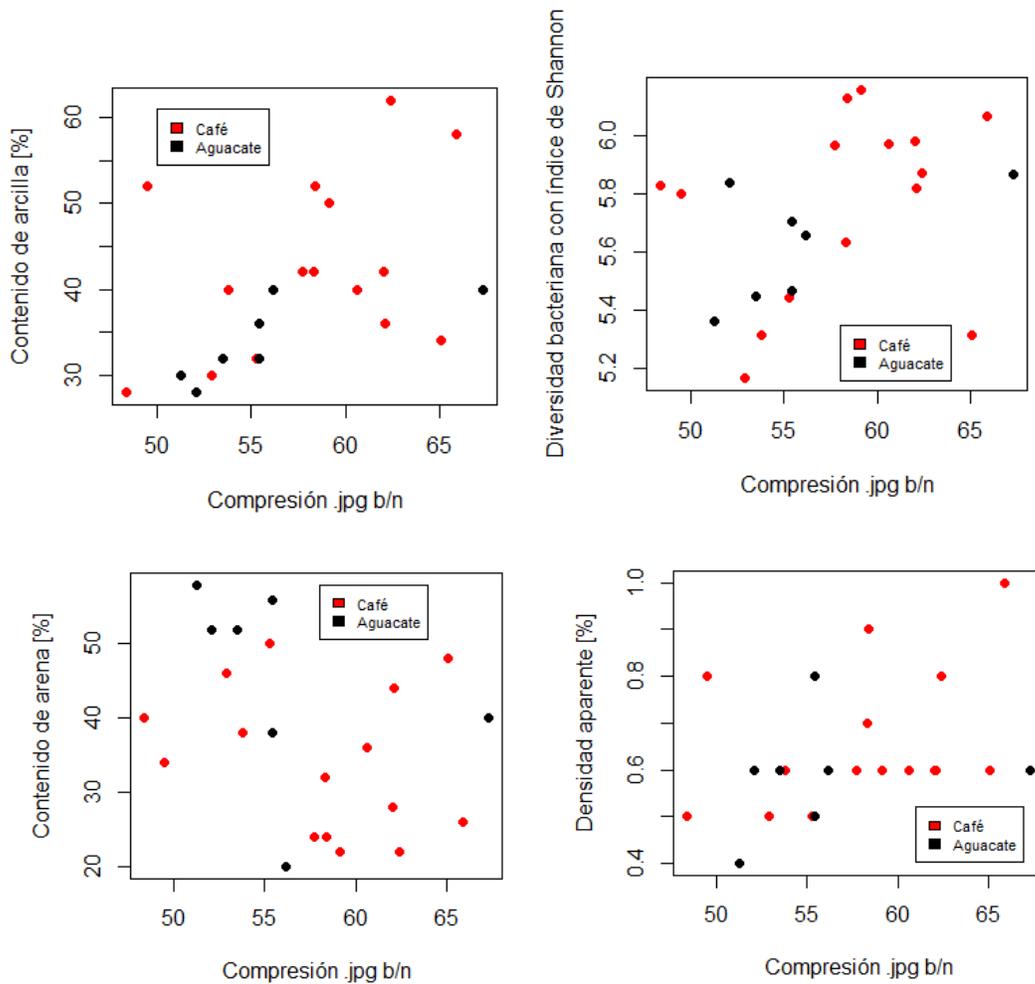


Figura 32. Dispersión de datos de compresión de imágenes .jpg a b/n con contenido de arcilla ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.57$ ), con diversidad bacteriana por índice de Shannon ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.48$ ), con contenido de arena ( $p < 0.05$ ,  $\rho = -0.42$ ) y con densidad aparente ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.44$ ).

### 7.5 Correlaciones en cafetales

Con el interés de explorar un mismo cultivo en una misma región, y con ello, la sensibilidad de los cromatogramas en una escala más local, se realizaron las correlaciones con los

cromatogramas de las parcelas de café puesto que es el cultivo con mayor número de muestras (n=15). Aunque informativo, el número muestral es muy pequeño para poder ser concluyentes. Se obtuvieron correlaciones significativas con el método no paramétrico Spearman para las siguientes variables:

- contenido de arcilla con color RGB (rho= 0.54) y G (rho= 0.56)
- densidad aparente con RGB (rho= 0.63), R (rho= 0.59), G (rho= 0.65) y B (rho= 0.57)
- capacidad máxima de retención de agua con dimensión fractal (rho= -0.55)
- actividad enzimática N-acetil glucosaminidasa con compresión .jpg en blanco/negro (rho= 0.52), con .zip a blanco/negro (rho= 0.64) y .zip a color (rho= 0.6) (Figura 35).

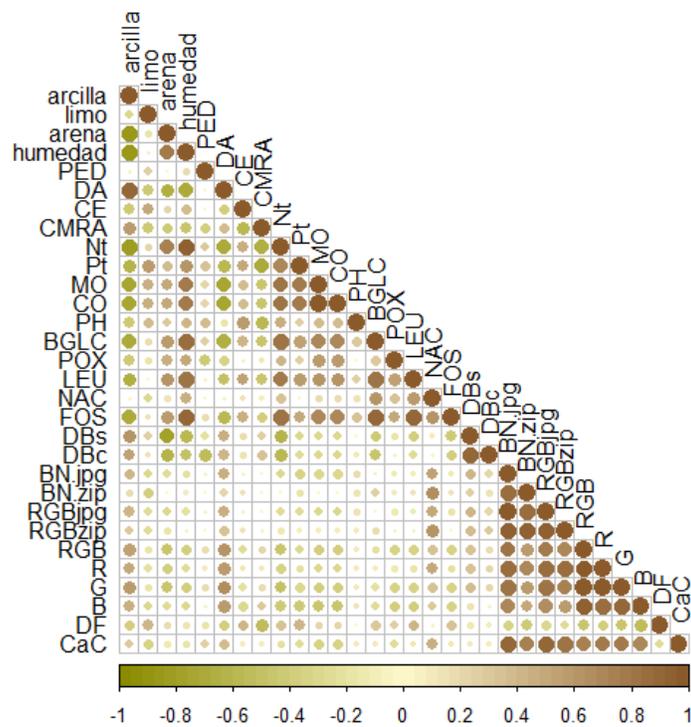


Figura 33. Visualización de las correlaciones con método Spearman, en cafetales. Los círculos más grandes presentan un  $p < 0.05$ , el color indica si la relación es (-) o (+) y mientras más saturado el color, más alto el valor rho es.

Se resaltan las correlaciones significativas de color con densidad aparente puesto que se ha mantenido a las diferentes escalas geográficas (Figura 34) y la actividad enzimática de N-acetil glucosaminidasa con los algoritmos de compresión .jpg y .zip (Figura 35). Además, a esta escala geográfica existe un índice de manejo calculado para cada uno de los sitios donde se obtuvieron las muestras de café [Sosa-Aranda *et al.*, 2018] que se utilizará para retroalimentar la explicación de las gráficas de dispersión de los datos. El índice de intensidad de manejo calculado para cada

parcela se categoriza en bajo, intermedio y alto, lo que podría corresponder a policultivo tradicional de café, a policultivo tradicional o comercial y a monocultivo de sombra o monocultivo de sol [Sosa-Aranda *et al.*, 2018].

Los canales de color R, G, B presentan una tendencia cualitativamente lineal respecto a la densidad aparente (Figura 34). Los suelos que presentan un manejo alto (monocultivo de sombra o monocultivo de sol) son suelos con mayor densidad aparente y mayor valor en los canales de color; mientras que, las parcelas con manejo bajo (policultivo tradicional) y sitios de vegetación primaria presentan menor densidad aparente y valores menores en los canales de color.

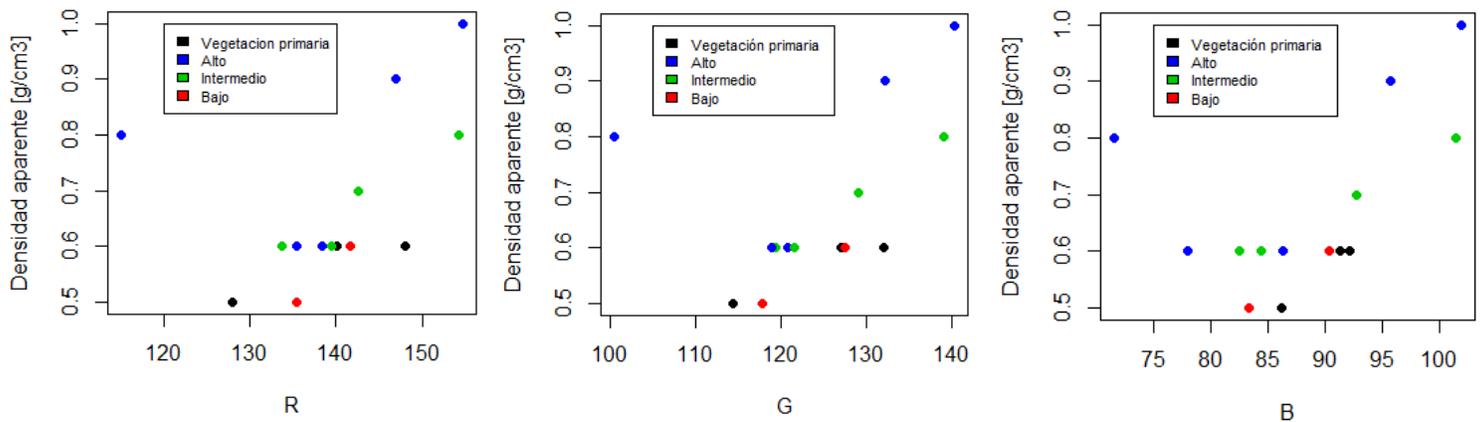


Figura 34. Dispersión de datos de canal de color R con densidad aparente ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.59$ ), G con densidad aparente ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.65$ ) y B con densidad aparente ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.57$ ).

La Figura 35 muestra la compresión de ambos algoritmos en relación con la enzima N-acetil glucosaminidasa. Se observa que las muestras de café que presenten un menor tamaño de compresión presentan menor actividad enzimática, sin embargo, la dispersión de los datos es muy variable respecto al manejo.

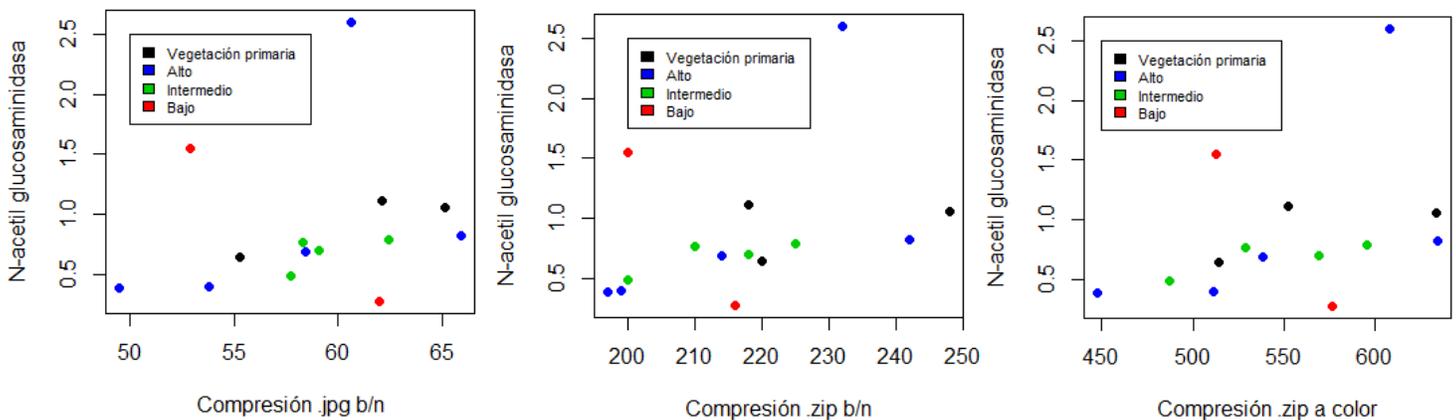


Figura 35. Dispersión de datos de compresión .jpg b/n con enzima NAC ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.52$ ), compresión .zip b/n con enzima NAC ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.64$ ) y compresión .zip a color con enzima NAC ( $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.6$ ).

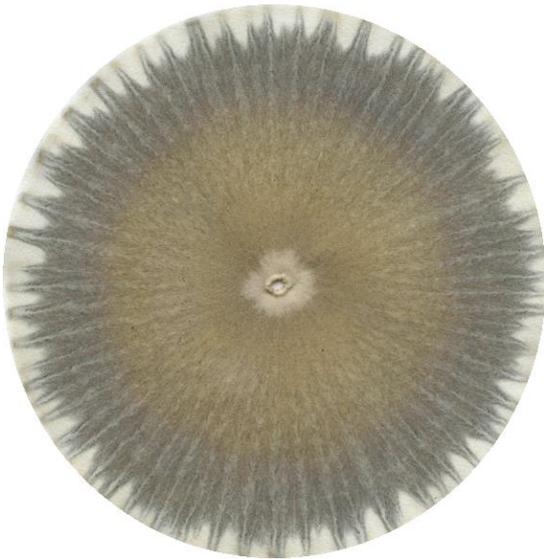
Con la información obtenida de las diferentes correlaciones a diferentes escalas espaciales se resume que:

- los **canales de color** RGB y R, G y B están robustamente relacionados significativamente con la humedad, el contenido de nitrógeno y fósforo totales, la densidad aparente, pedregosidad, la capacidad máxima de retención de agua, la conductividad eléctrica, el contenido de materia orgánica, el pH, la actividad enzimática y la diversidad bacteriana;
- el **color del anillo central** está relacionado con la densidad aparente, la conductividad eléctrica, los contenidos de nitrógeno total y materia orgánica, la actividad de las enzimas polifenol oxidasa y fosfatasa;
- la **dimensión fractal** está relacionada positivamente con la textura limo, el contenido de nitrógeno total, el contenido de materia orgánica y la actividad enzimática y, negativamente, con el pH y el contenido de arena; por último,
- la **compresión en .jpg** está relacionada con la conductividad eléctrica, la densidad aparente, la actividad enzimática N-acetil glucosaminidasa y la diversidad bacteriana por índice de Shannon.

La siguiente Figura 36 resume, visualmente, los resultados generales de esta investigación, los cuales pueden retroalimentar la interpretación visual. En ésta, se incluyen características del suelo de fundamental importancia en su calidad correlacionadas con los atributos medidos de los cromatogramas y se expresa cualitativamente su relación. Se encontraron correlaciones significativas con el nitrógeno y el fósforo, así como con la actividad enzimática extracelular que tiene como producto alguna forma soluble de minerales. Sin embargo, dado que las correlaciones no presentan una tendencia funcional como en el caso del nitrógeno total o presentan mucha dispersión como en la actividad enzimática, no hemos incluido tales características (Figura 36).

Color de todo el cromatograma

Valores de canales R, G, B y RGB	Característica del suelo	Valores de canales R, G, B y RGB	Característica del suelo
altos	bajo contenido de materia orgánica	bajos	alto contenido de materia orgánica
	bajo porcentaje de humedad		alto porcentaje de humedad
	mayor densidad aparente		menor densidad aparente
	baja actividad microbiológica		alta actividad microbiológica



Contorno del cromatograma

Valores de dimensión fractal	Característica del suelo	Valores de canales R, G, B y RGB	Característica del suelo
bajos	baja actividad microbiológica	altos	alta actividad microbiológica

Figura 36. Relaciones encontradas entre atributos de forma y color del cromatograma con características del suelo

### 7.6 PCA de atributos de forma y color

Por último, se muestran los resultados del PCA (Análisis de Componentes Principales, por sus siglas en inglés) de los atributos de forma y color cuantificados de todos los cromatogramas obtenidos. Los dos primeros componentes principales explican el 87.4% de variación en nuestras muestras. Las variables que contribuyen mayormente al primer componente son los canales de color R, G, RGB y B. La compresión en .jpg y .zip a color y .jpg en blanco y negro son las variables que contribuyen más al segundo componente principal. Se resalta que los cromatogramas obtenidos están siendo separados por el componente principal uno debido al color digital cuantificado, mientras que el componente dos está más relacionado a forma y tamaño digital de los cromatogramas. Al etiquetar los datos de cada muestra de cromatograma con una variable discreta, se observa que se diferencian dos grupos respecto a si son plantas anuales (maíz y frijol) o perennes (café y aguacate) (Figura 37).

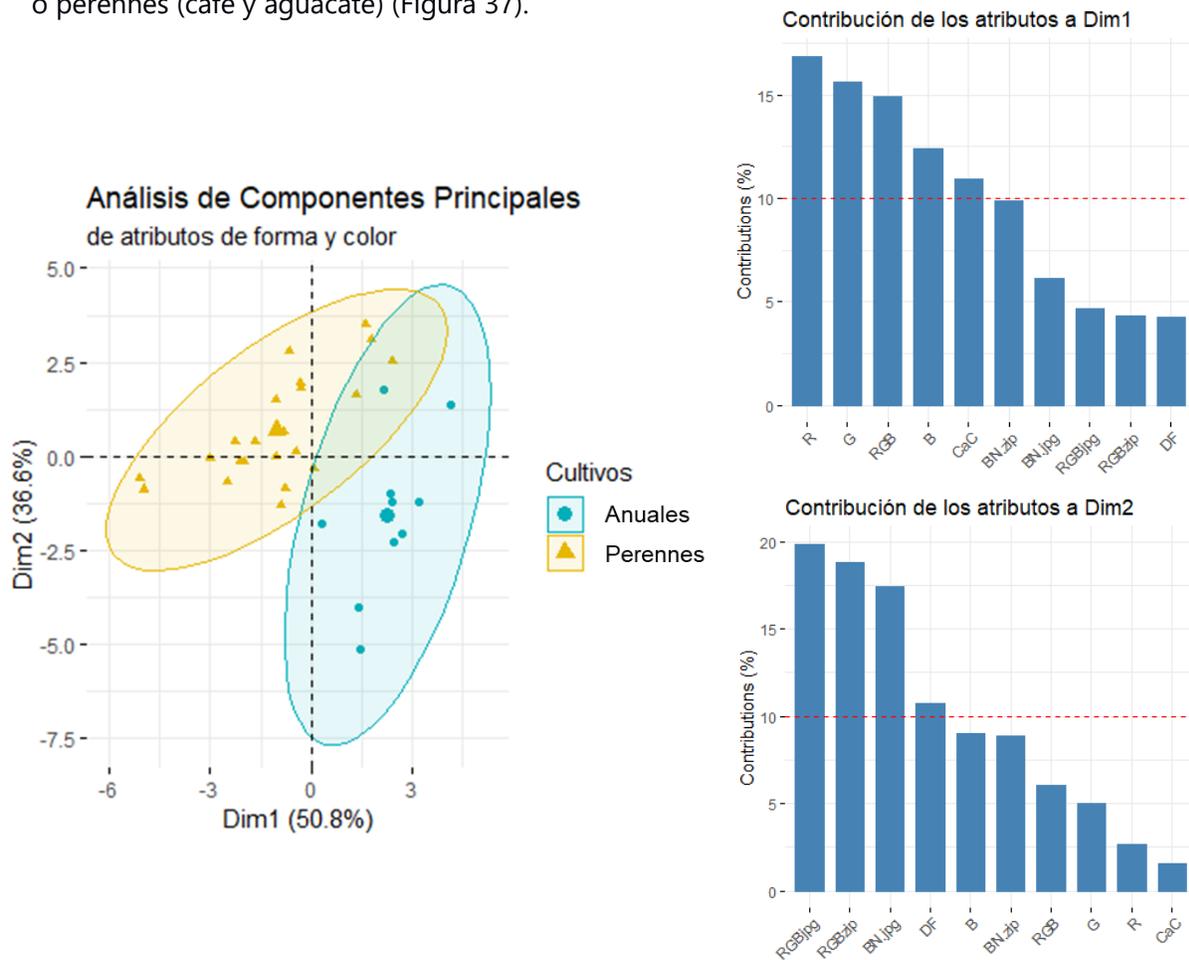


Figura 37. Agrupamiento de los atributos de forma y color de los cromatogramas por cultivos anuales y perennes (izquierda). Contribución de los atributos de forma y color a los componentes principales (derecha)

También se realizó PCA de los atributos de forma y color etiquetando por ecorregión (Figura 38). Se observa que la ecorregión C, correspondiendo a los cultivos de maíz y frijol en Guanajuato, está diferenciada de las ecorregiones A y B en donde se cultiva café y aguacate en Veracruz. Sin embargo, dentro de los cultivos perennes los grupos están poco diferenciados por ecorregión. No se observa un agrupamiento claro cuando la variable cualitativa es el tipo de cultivo, aunque sí hay cultivos como frijol y café que no se traslapan y se distinguen claramente entre sí (Figura 39).

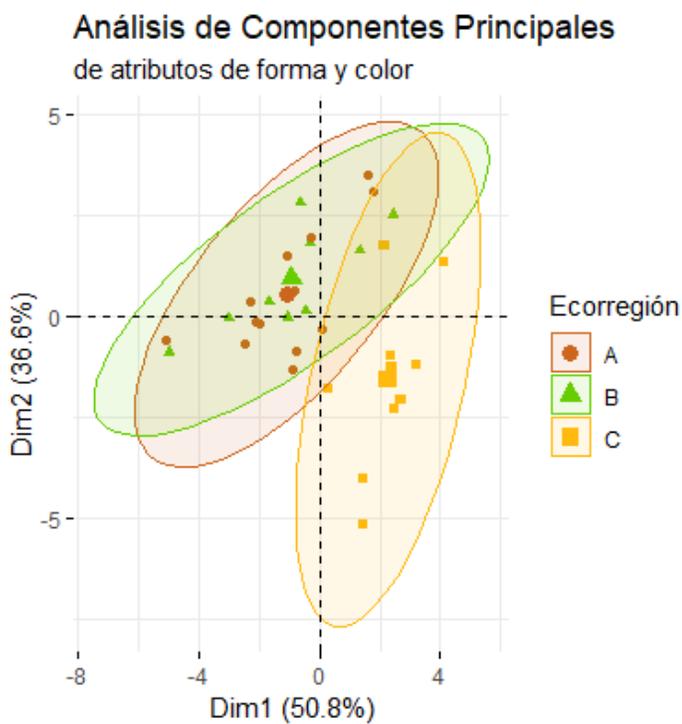


Figura 38. Agrupamiento de las muestras individuales por ecorregión. (A) corresponde a sierra con bosque mesófilo del Sistema Neovolcánico Transversal, (B) lomeríos del Norte de Veracruz con selva mediana y alta perennifolia y (C) lomeríos y planicies del Altiplano con matorral xerófilo y pastizal.

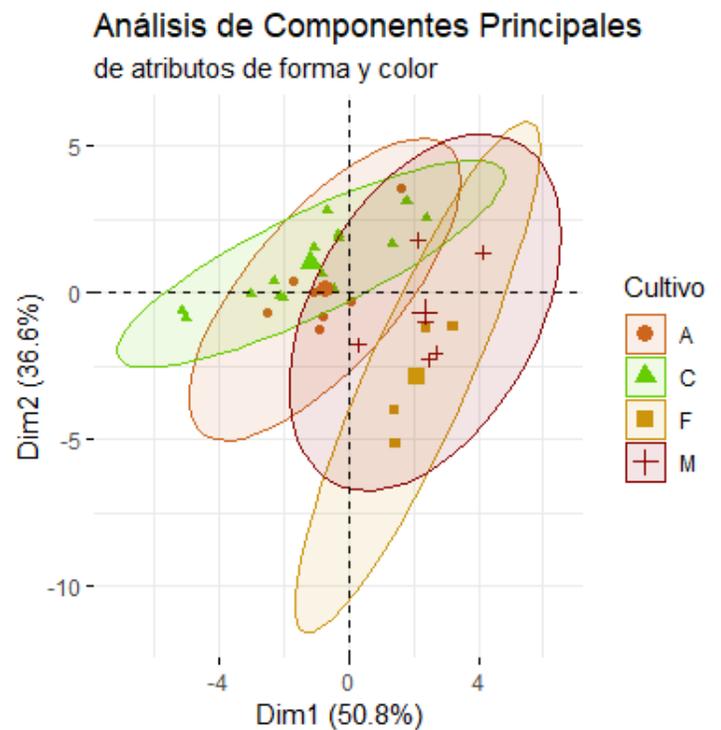


Figura 39. Agrupamiento de los individuos por cultivo. "A" corresponde a aguacate, "C" a café, "F" a frijol y "M" a maíz.

## 8. Discusión de resultados

En concordancia con los objetivos de la presente tesis, se realizó la cromatografía en papel para los diversos suelos de uso agrícola colectados en las diferentes ecorregiones, se obtuvieron los cromatogramas como imágenes digitales, de las cuales, se sistematizó el tiempo de revelado y la técnica para suelos de árboles frutales como café y aguacate. Se cuantificaron atributos como el color del anillo central, el color digital de la imagen, la dimensión fractal de los contornos y la compresión de los cromatogramas; después, se puso a prueba la correlación de los atributos de los cromatogramas con los datos de laboratorio para características físicas, químicas y biológicas del suelo. En concordancia con la hipótesis de este trabajo, se encontraron numerosas correlaciones significativas entre los atributos cuantificados de forma y color de los cromatogramas y los datos de laboratorio. A continuación, se discuten las correlaciones que se consideran una aportación importante al entendimiento de la técnica, posteriormente se presentan las críticas o limitaciones que aprendimos e identificamos respecto al método, la cuantificación y la interpretación de la cromatografía en esta investigación, para, finalmente, ofrecer perspectivas en torno a la investigación y uso de este indicador de calidad del suelo.

Los resultados de las correlaciones que incluyen los suelos de cuatro cultivos colectados mostraron correlaciones significativas entre los canales de color y el contenido de materia orgánica, tanto en la escala amplia de cultivos y ecorregiones muy contrastantes, como en la escala regional de cultivos perennes en Veracruz. El contenido de materia orgánica está asociado directa o indirectamente a: un incremento de actividad microbiana en procesos de descomposición, fijación del N y desnitrificación, incremento de polisacáridos, glomalina y ácidos orgánicos, incremento de la capacidad de retención de agua, incremento de la capacidad de resistir plagas en plantas, incremento de la capacidad de intercambio catiónico, incremento de la estabilidad de agregados, incremento de la mineralización y quelación iónica de metales, reducción de la pérdida de agua por evaporación, moderación de las temperaturas extremas del suelo, retención de Ca, Mg, K y micronutrientes, incremento en la infiltración de agua, absorción de contaminantes como Pb, Cd y Cu y la reducción en la toxicidad de aluminio [Brady y Weil, 2017]. Kokornaczyk *et al.* [2016] reporta una correlación significativa de la evaluación visual del color con la materia orgánica, asimismo, Abad Santana [2016] correlaciona el color evaluado visualmente con materia orgánica del suelo y nutrientes como P, K, Mg, Zn y Manganeseo (Mn). Ambas aportaciones proponen una evaluación visual al asignar un valor discreto de mayor a

menor, según la calidad de los atributos de los cromatogramas, sin embargo, no se presentan datos de las imágenes, sino que la evaluación dependía de la asignación de cada categoría a un cromatograma. En este sentido, la cuantificación del color digital que nosotras realizamos mostró ser una herramienta útil que confirmó la correlación de los cromatogramas con características y propiedades del suelo, como la materia orgánica que, a su vez, está asociada a procesos que sostienen la calidad del suelo. Además, consideramos que los valores de color son fácilmente almacenados y procesados en una base de datos que puedan contribuir al monitoreo de la calidad de los suelos en escalas espaciales y temporales amplias.

También, cuantificamos el color del centro de los cromatogramas (zona o anillo central) puesto que es propuesto, en la interpretación visual empírica, como un atributo que indica la presencia de nitrógeno disponible para las plantas cuando es color crema, no así cuando es color blanco o grisáceo [Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011]. En la literatura previa, se reporta una correlación significativa del grosor del anillo central con nitrógeno total [Kokornaczyk *et al.*, 2016], sin embargo, no se había realizado la correlación puntual del color del anillo central cuantificado con color digital y el nitrógeno presente en el suelo. En esta investigación, el color del anillo central está correlacionado significativamente con los contenidos de nitrógeno total en las muestras, aunque la forma funcional de la relación no es clara. Al analizar la dispersión de los datos, para los cultivos anuales (maíz y frijol) las muestras presentan contenidos de nitrógeno similares ( $0.19 \pm 0.073$ ) y los cultivos perennes presentan contenidos de nitrógeno muy dispersos ( $0.49 \pm 0.30$ ), por lo que no se establece una tendencia ascendente o descendente clara. La muestra con mayor contenido de nitrógeno corresponde a una parcela de frijol (FGN4) que en la interpretación visual empírica se evaluaría como una parcela con bajo contenido de nitrógeno dado el centro de color grisáceo. Asimismo, en los cultivos perennes (café y aguacate), las parcelas que evaluadas por interpretación visual empírica corresponden a un bajo contenido de nitrógeno por la coloración oscura del anillo central, resultaron ser las parcelas con alto contenido de nitrógeno total. Se considera que la evaluación certera de este atributo requiere de continuar explorando la cuantificación del color de todo el anillo central, así como de explorar la correlación con diferentes formas solubles e insolubles de nitrógeno en el suelo.

Los contornos de los cromatogramas han sido asociados a actividad microbiológica [Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011], tanto Kokornaczyk *et al.* [2016] como Abad Santana [2014] evalúan este atributo visualmente, los primeros la encuentran correlacionada con los contenidos

de materia orgánica, nitrógeno total, fósforo y bromo (Br) asimilable; mientras que, el segundo los relaciona con hongos y bacterias cultivadas en cajas de Petri, con nutrientes como P, K, Ca, Mg, MN y Zn, así como con densidad aparente y conductividad eléctrica. Sin embargo, en la evaluación visual es muy ambiguo qué se entiende como contornos o terminaciones asociadas a una buena calidad del suelo. La extracción de contornos por umbrales de detección en la imagen digital y la dimensión fractal, que realizamos en esta investigación, representó una aportación importante para la cuantificación de los contornos y su correlación con la actividad enzimática. También, en este estudio, los contornos se relacionan significativamente con la actividad enzimática y la diversidad microbiana. Los índices de riqueza de OTUs de bacterias, tanto Shannon como Chao1, presentaron una tendencia diferente a la esperada. Se esperaba que los cultivos perennes presentaran un mayor índice de riqueza dada la aportación de hojarasca como sustrato orgánico para la descomposición biológica, sin embargo, en ambos casos fue menor en los cultivos perennes (Shannon:  $5.71 \pm 0.29$  y Chao1:  $1046.56 \pm 208.42$ ) que en los cultivos anuales (Shannon:  $6.17 \pm 0.23$  y Chao1:  $1276 \pm 281.53$ ).

El pH y la materia orgánica del suelo son las características más frecuentemente usadas como indicadores de calidad del suelo [Bunemann *et al.*, 2018], y dado que los cromatogramas han mostrado correlaciones con materia orgánica y pH podrían estar aportando información cualitativa importante para conocer el estado del suelo. Los manuales que difunden la interpretación visual empírica no habían reportado una relación entre contornos de los cromatogramas y el color con el pH. En esta investigación, los contornos cuantificados por la dimensión fractal y el color digital se relacionaron significativamente con el pH. Observamos que la materia orgánica presentó una relación significativa con el pH que podría explicarse debido al aporte continuo de material orgánico, al tipo de suelo de la región y al clima. En esta investigación, los cultivos perennes con canal de color RGB (95-132), que reciben constantemente aporte de hojarasca, presentaron pH ácidos y ligeramente ácidos ( $5.03 \pm 1.14$ ), mientras que los cultivos anuales con canal de color RGB (136-161), generalmente con suelos desnudos, presentaron pH neutros y ligeramente ácidos ( $6.56 \pm 0.38$ ). Esta variación nos resulta interesante, sin embargo, consideramos no representa una causalidad en la explicación de suelos ácidos o neutros de cada región. Por otro lado, se ha reportado una influencia directa del pH como factor ambiental condicionante para el crecimiento y permanencia de las comunidades bacterianas en suelos agrícolas. Mientras más ácido sea el suelo, la abundancia de OTUS

bacterianos se reduce [Rousk *et al.*, 2010]. En esta investigación, precisamente los suelos con pH ligeramente ácidos y ácidos, como en cultivos perennes, presentó valores menores en los índices de Shannon y Chao1, por lo que el pH podría ser un factor que afecta el crecimiento de las comunidades bacterianas en los cultivos muestreados. Abad Santana [2014] reporta una regresión lineal no significativa para la evaluación visual del cromatograma y el pH, mientras que Kokornaczyk *et al.* [2016] también encuentra correlaciones significativas negativas entre la evaluación visual del color, de las terminaciones y de las líneas radiales con pH.

El estudio de la sensibilidad de los cromatogramas en diferentes escalas geográficas y de diversidad de suelos fue de interés a lo largo de toda la investigación. Por ello, se buscaron correlaciones usando diferentes conjuntos de muestras, desde el que abarca muestras de cultivos y regiones muy contrastantes, hasta el que incluye sólo muestras de cultivos de café en Veracruz. En la escala que incluía todos los cultivos en ecorregiones contrastantes, el color resultó correlacionado de manera importante con características físicas, químicas y biológicas del suelo, diferenciando entre cultivos perennes y cultivos anuales. La densidad aparente fue la característica física que se mantuvo correlacionada con el color en las diferentes escalas espaciales. Se discute que en los cultivos de maíz y frijol había un grado de mecanización y uso de tractor a lo largo de varios años mientras que, en los cafetales, el uso de tractor debido a la pendiente y al policultivo es casi inexistente. Para los cultivos de café y aguacate no se encontró una característica que distinguiera ni por cultivo ni por manejo. Para los cafetales, explicamos la relación de la densidad aparente con el color por el grado de intensificación del manejo agrícola, mientras más intenso es el manejo (menor cobertura del dosel, menor aporte de hojarasca al mantillo y menos diversa, menor densidad de árboles, entre otros) mayor es la densidad aparente. Es decir, la correlación de densidad aparente podría estar asociada a los cultivos y ser sensible al manejo agrícola dentro de un mismo cultivo. Sin embargo, la mayoría de las correlaciones no se mantuvieron para escalas espaciales menos contrastantes, por ejemplo, dentro de cafetales. Los cafetales en Veracruz presentaron correlaciones significativas con compresión de imágenes .jpg, se considera que este algoritmo de compresión fue suficientemente sensible para diferenciar entre muestras de un mismo cultivo en ecorregiones similares.

Destacamos la importancia de la sistematización del tiempo de escaneado con las pruebas de reproducibilidad, éstos se evaluaron visualmente y el grosor de los anillos concéntricos

presentó notable variación por el método mismo, por lo que se descartó para realizar medidas. Sin embargo, algunos autores consideran que el grosor de la zona intermedia está asociada a la presencia, incluso cantidad, de materia orgánica que puede no estar integrada al suelo [Bracamontes Nájera *et al.*, 2016; Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011]. Kokornaczyk *et al.* [2016] realizaron una medición del grosor y radio de las zonas central, intermedia y externa de los cromatogramas con tres repeticiones para recuperar la variación (desviación estándar). En su investigación, resultó significativa la correlación entre el grosor del anillo central y externo con el contenido de materia orgánica, no así el anillo o zona intermedia. En la evaluación visual del grosor de los anillos en los controles de reproducibilidad realizados en esta tesis, se consideró que era, precisamente, el anillo intermedio el que variaba más. Es decir, las pruebas de reproducibilidad de los cromatogramas contribuyen como evidencia a considerar cautelosamente la variabilidad del grosor del anillo intermedio para su interpretación visual dado que podría no estar reflejando información sobre la calidad del suelo.

Respecto al análisis de componentes principales, se resalta que los colores digitales sean las variables de mayor contribución al componente principal uno que explica casi el 50% de la varianza dado que es, precisamente, uno de los atributos que se evalúa de manera enfática en la interpretación visual empírica. Asimismo, el componente principal dos está agrupando lo que corresponde a los atributos de forma como dimensión fractal y compresión de imágenes. La cuantificación realizada en esta tesis sobre los atributos de color y forma de los cromatogramas permitió respaldar el uso de esta herramienta como indicador de datos de laboratorio tan significativos para la calidad del suelo como materia orgánica y actividad y abundancia microbiana. Al mismo tiempo, se encontraron correlaciones con nuevas características del suelo que no habían sido reportadas en los manuales que difunden la interpretación visual empírica, por ejemplo: el pH, la capacidad máxima de retención de agua, la conductividad eléctrica, la densidad aparente, la humedad y la diversidad microbiana. Sobre esta última quisiéramos enfatizar que la correlación encontrada de los índices de diversidad con los contornos de dimensión fractal es una primera aproximación con análisis de diversidad microbiana. Sin embargo, reconocemos que los índices de Shannon y Chaos no están reflejando la composición funcional de la comunidad bacteriana, y con ello, los procesos ecológicos en los que podrían participar las bacterias. Si bien es necesario que la técnica de cromatografía en papel continúe siendo evaluada en diversas condiciones ambientales y de manejo para esclarecer

relaciones entre pares de variables, el análisis de imágenes digitales llevada a cabo en esta tesis se destaca como una nueva propuesta metodológica para el estudio de este indicador cualitativo de características físicas, químicas y biológicas del suelo.

Por último, encontramos y reportamos correlaciones significativas entre la conductividad eléctrica y la dimensión fractal, el tamaño de las compresiones y el color RGB, o bien, entre la capacidad máxima de retención de agua y el color RGB y la dimensión fractal. Reconocemos que estas correlaciones podrían no estar relacionadas a los cromatogramas, y que fuesen producto de la aleatoriedad dado que no presentan tendencias funcionales claras.

## 8.2 Críticas y limitaciones

Bunemann y colaboradores [2018] realizaron una revisión crítica sobre los criterios que deben tener los indicadores de calidad del suelo y las consideraciones que es necesario que cumplan. En este contexto, la cromatografía de suelo en papel representa un indicador accesible respecto a la toma de muestras y ejecución de la técnica, además de que requiere de cantidades de suelo pequeñas y los cromatogramas son de fácil almacenamiento, sobre todo una vez que se digitalizan. Es sensible temporalmente en tanto que se ha reportado su sensibilidad a los cambios de manejo agrícola después de tres meses de aplicación de abonos verdes [Bracamontes Nájera *et al.*, 2016] y después de dos años de recuperación con abonos orgánicos y biofertilizantes en cultivo de cítricos, bananos y hortalizas [Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011]. Esta tesis contribuye a conocer los alcances de su sensibilidad, siendo más sensibles en muestras más contrastantes y para variables particulares, como la densidad aparente. Para su interpretación, los cromatogramas cuentan con criterios para evaluar la calidad del suelo cualitativamente [Bracamontes Nájera *et al.*, 2016; Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011] y su uso posibilita realizar un diagnóstico y monitoreo continuo del suelo, dado que la técnica es accesible de realizar y es sensible a la variación espacial, como lo reportamos en esta tesis. No obstante, aún consideramos necesario sistematizar su sensibilidad y precisión en muestras de suelos, cultivos y manejos similares.

Existe un procedimiento operacional estándar de la técnica en diferentes manuales, sin embargo, consideramos que requiere una rigurosa sistematización o adaptación para los diferentes suelos utilizados. Sería importante, por ejemplo, que los estudios con cromatogramas especifiquen el tamaño del tamiz y que los protocolos establezcan criterios para la modificación

de la técnica en suelos de características particulares, como en Vertisoles, o bien, suelos con alto contenido de materia orgánica. Si bien la modificación de dilución 1:1 debido al alto contenido de materia orgánica en los suelos de cultivos frutales resultó efectiva en nuestras muestras, no logramos adaptar el método para evaluar los suelos arcillosos de cultivos anuales. Los estudios de correlaciones de cromatogramas con datos de laboratorio son cada vez más frecuentes [Khemani *et al.*, 2008; Abad Santana, 2014; Kokornaczyk *et al.*, 2016], por lo que la comparabilidad y reproducibilidad se vuelve central.

Por otro lado, siguen abiertas las preguntas sobre ciertos aspectos del uso de la cromatografía en papel para el estudio de la calidad del suelo. Por un lado, aún quedan dudas sobre su aplicabilidad en suelos de gran importancia agrícola, como los Vertisoles. Consideramos que esto representa un punto a sistematizar apremiadamente. Por otro lado, no encontramos reportes sobre cuánto tiempo después de almacenada la muestra de suelo se pueda realizar la técnica cromatográfica sin cambios significativos con relación al estado original de las muestras. También, Bunemann y colaboradores [2018] indican que es recomendable que exista un material de referencia o una línea base disponible para los indicadores de calidad del suelo, el cual, hasta donde sabemos, no está disponible para los cromatogramas.

Una de las principales críticas a la evaluación de la calidad del suelo y/o a generación de índices únicos que institucionalicen la calidad de un suelo es que pareciera reducirse la complejidad de los procesos de formación de suelo y su transformación por el manejo humano. Así, consideramos necesario enfatizar que el uso de cualquier indicador, tanto cuantitativo como cualitativo, requiere un acompañamiento contextualizado según las características de la parcela, del suelo y del manejo actual e histórico para su interpretación integral, crítica y diversa. En este mismo sentido se considera que la cromatografía en papel podría funcionar como parte de un análisis general del suelo, económico, eficiente y accesible de interpretar. Sin embargo, no sustituye la información que aportan los análisis cuantitativos ni el conocimiento campesino sobre el manejo de la parcela.

### *8.3 Perspectivas*

Según los manuales de interpretación visual empírica, el cromatograma tiene diversos atributos que están asociados a diversas características edáficas [Bracamontes Nájera *et al.*, 2016; Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011]. Uno de ellos son las llamadas líneas radiales ramificadas, que en

diferente grado parecen estar relacionadas a la presencia de minerales asociados a sustancias orgánicas [Bracamontes Nájera *et al.*, 2016; Pinheiro y Restrepo Rivera, 2011]. Consideramos necesario dilucidar las reacciones químicas que podrían solubilizar los minerales en el hidróxido de sodio y su corrimiento por capilaridad en el papel, para reconocer qué minerales podríamos estar observando cualitativamente. Por otro lado, Khemani y colaboradores [2008] estudiaron las concentraciones de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, sodio (Na), Fe, Mn, Zn, cobre (Cu) y S) en muestras de suelo y recuperaron mediciones del color, del ancho y del área de los anillos del cromatograma, sin embargo, no reportaron correlaciones con los nutrientes. Si bien Kokornaczyk y colaboradores [2016] y Abad Santana [2014] realizan una evaluación visual y a partir de ella buscan una correlación con ciertos minerales, el atributo de líneas radiales no ha sido cuantificado en imágenes digitales. Para futuros trabajos, proponemos la aplicación de dimensión fractal a las líneas radiales obtenidas después de un procesamiento de imágenes. Asimismo, en la interpretación visual empírica reiteradamente se interpreta la interacción de las zonas como indicador de buena calidad del suelo. Sin embargo, resulta ambiguo y difícil para el ojo humano evaluar esta integración, por lo que proponemos que podría cuantificarse este atributo a través de perfiles radiales que estimen los cambios de luminosidad.

Entender las causas-efecto de los patrones de forma y color están más allá del alcance de esta tesis, pero enfatizamos la necesidad de explorar las reacciones químicas que ocurren en la técnica cromatográfica con la disolución del NaOH, el AgNO<sub>3</sub>, el papel filtro y los componentes orgánicos del suelo. Dadas las críticas al modelo de ácidos húmicos como método y teoría de caracterización de la materia orgánica [Lehmann y Klebber, 2014], consideramos que la técnica cromatográfica podría continuar siendo investigada como extracciones de material orgánico en diferentes sustancias, por ejemplo, la fracción de material orgánico extraíble en agua. La extracción de material orgánico en agua caliente (*HWOM* por sus siglas en inglés) presenta un amplio espectro de información, se reconoce que la fracción resultante de esta extracción contiene nitrógeno y carbono lábiles [Leinweber *et al.*, 1995; Heller y Weiß, 2015]. Dado que los componentes extraídos de la *HWOM* han sido caracterizados, podría realizarse la técnica cromatográfica con esta extracción y evaluar cómo se comporta el nitrógeno y el carbono lábil en el papel filtro.

En este mismo sentido, pensamos que es importante trabajar sobre un diseño experimental que permita controlar variables de confusión, así se podrían evaluar los efectos

específicos del manejo, del cultivo, del suelo o de las condiciones ambientales. Asimismo, consideramos importante evaluar la sensibilidad de los cromatogramas a condiciones locales, con procesos de formación de suelo, condiciones ambientales y cultivos similares para evaluar el efecto del manejo agrícola en diferentes parcelas. También proponemos experimentar la cromatografía en papel con sustancias conocidas en el suelo, tales como ciertos fertilizantes o herbicidas, sin perder de vista que el suelo es más que la suma de los componentes aislados.

En el marco de la agroecología como ciencia, práctica y movimiento social, hemos enfatizado la necesidad de indicadores de calidad del suelo accesibles a pequeños productores y organizaciones campesinas, y aunque la interpretación de los atributos de forma y color suele ser relativamente fácil de realizar, ésta requiere práctica y aprendizaje comparativo de los diversos patrones que presentan los cromatogramas y su asociación a características físicas, químicas y biológicas del suelo. Por ello, se considera necesario la construcción de una base de datos pública que permita el acceso a los cromatogramas disponibles con información georreferenciada mínima respecto al manejo, tipo de suelo, cultivos y condiciones ambientales. Esto contribuiría a construir una base de datos sólida para interpretar los cromatogramas de manera comparativa y monitorear la calidad en diversos suelos.

## **9. Conclusiones**

La cromatografía de suelo en papel, o cromatografía de Pfeiffer es una herramienta que permite el análisis cualitativo del suelo y que es ampliamente utilizada por organizaciones campesinas y productores. Esta investigación aportó evidencia para retroalimentar la interpretación visual empírica de los cromatogramas sobre diversas características del suelo. Se encontraron correlaciones significativas entre los atributos cuantificados de los cromatogramas como el color y los contornos con características físicas como: el contenido de materia orgánica y la densidad aparente; y atributos químicos y físico-químicos tales como el pH y los contenidos de nitrógeno y fósforo totales; y, atributos biológicos como la actividad de enzimas asociadas a los ciclos de C, N y P, así como la diversidad bacteriana.

Se resalta la importancia de la sistematización y cuantificación de atributos de los cromatogramas como propuesta metodológica para su estudio riguroso, siendo el análisis de imágenes digitales un camino con múltiples posibilidades para estudiar relaciones entre atributos de forma y color con características del suelo.

Se reconoce que es necesario profundizar el estudio de los procesos que subyacen para la formación de patrones de forma y color. Sin embargo, los cromatogramas están reflejando características físicas, químicas y biológicas del suelo como resultado de una técnica cromatográfica sencilla, económica e interpretable cualitativamente, por lo que pueden aportar una visión general y confiable del suelo.

## 10. Referencias

- Abad Santana FJ. 2014. Evaluación cualitativa mediante cromatografía, de la fertilidad de cinco suelos con diferentes manejos orgánicos y convencionales. Tesis de licenciatura. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Altieri M. 1999. El Agroecosistema: determinantes, recursos, procesos y sustentabilidad. En: Altieri M (ed.). *Agroecología: Bases científicas para una agricultura sustentable*. Editorial Nordan. Valparaíso, Chile, 43-66 pp
- Astier-Calderón M, Maass M y Etchevers J. 2002. Derivación de indicadores de calidad de suelos en el contexto de la agricultura sustentable. *Agrociencia*, 36(5): 605– 620.
- Aislabie J, Deslippe JR. 2013. Soil microbes and their contribution to soil services. En: Dymond JR (ed.). *Ecosystem services in New Zealand – conditions and trends*. Manaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand, 143-161 pp
- Bardgett RD, van der Putten WH. 2014. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515: 505- 511
- Bastida F, Zsolnay A, Hernández T y García C. 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147: 159-171.
- Bender SF, Wagg C, van der Heijden MGA. 2016. An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. *Trends in Ecology & Evolution* 31(6): 440-452
- Bracamontes Nájera L, Fuentes Ponce M, Rodríguez Sánchez LM, Macedas Jiménez J. 2016. Manual de indicadores biológicos de la salud del suelo. Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México, México, 79 pp
- Braithwaite A, Smith FJ. 1996. Chromatographic methods. 5<sup>th</sup> edition. Kluwer Academic Publishers. Países Bajos, 571 pp
- Bunemann EK, Bongiorno G, Bai Z, Creamer RE, De Deyn G, De Goede R, Fleskens L, Geissen V, Kuyper TW, Mader P, Pulleman M, Sukkel W, van Groenigen JW, Brussaard L. 2018. Soil quality. A critical review. *Soil Biology and Biochemistry* 120: 105-125
- Brady NC, Weil RR. 2017. Soil Organic Matter. En: Brady NC, Weil RR. *The nature and properties of soil*. 15<sup>th</sup> edition. Pearson Education Limited. England, 526-581
- Chappell MJ, Wittman H, Bacon CM, Ferguson BG, García Barrios L, García Barrios R, Jaffee D, Lima J, Méndez VE, Morales H, Soto-Pinto L, Vandermeer J, Perfecto I. 2013. Food sovereignty: an altern-ative paradigm for poverty reduction and biodiversity conservation in Latin America. *F1000Research* 2(235): 1-17
- Chenu
- CONACyT. 2015. *Biodiversidad y ecología funcional de suelos: conservación y resiliencia en sistemas naturales, agroecológicos y agroforestales* propuesta en el Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales. Ciudad de México, México, 16pp
- CONAFOR. 2013. *Línea Base Nacional de Degradación de Tierras y desertificación*. Informe final de la Comisión Nacional Forestal y la Universidad Autónoma de Chapingo. Zapopan, Jalisco, México, 161 pp
- Derenne S, Nguyen Tu TT. 2014. Characterizing the molecular structure of organic matter from natural environments: an analytical challenge. *Comptes Rendus Geoscience* 364: 53-63
- ETC Group. 2017. ¿Quién nos alimentará? La red campesina alimentaria o la cadena agroindustrial. 3° edición. Estados Unidos-Canadá. 65 pp

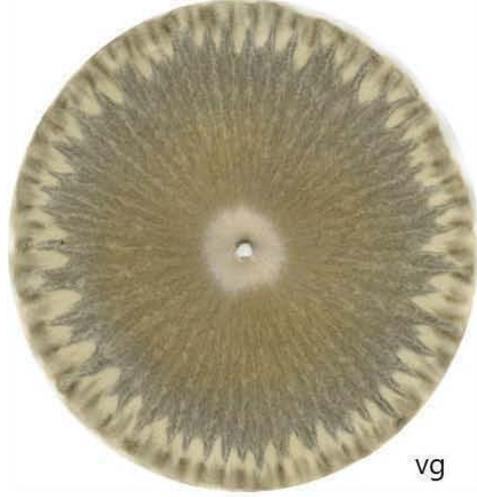
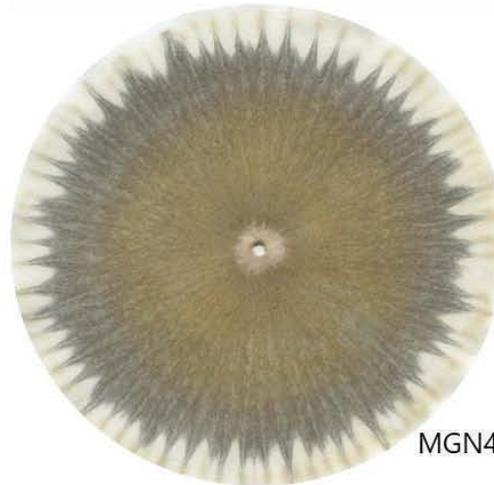
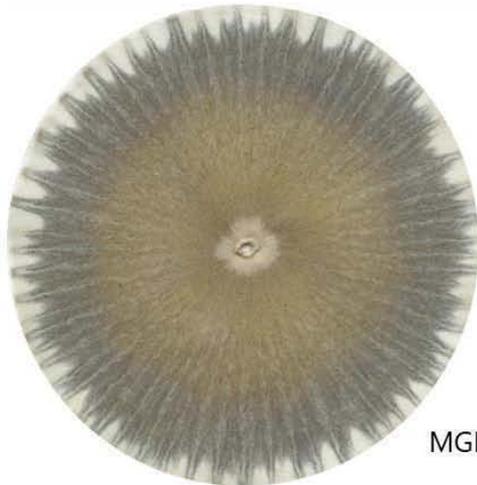
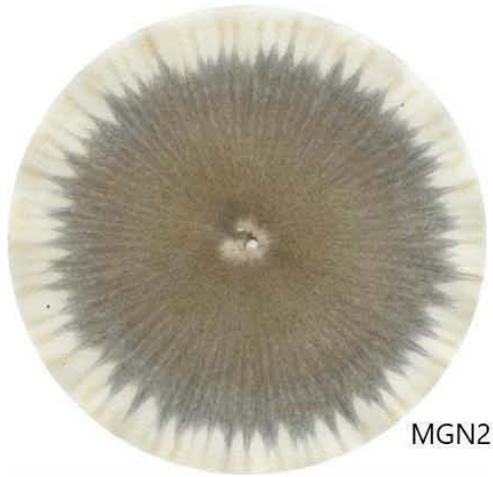
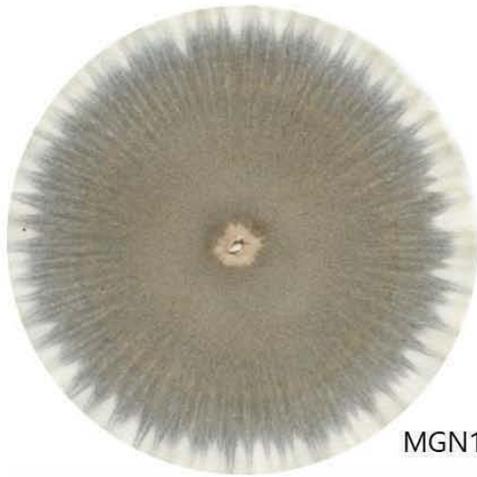
- FAO. 2015. Final report for the International Symposium on Agroecology for Food Security and Nutrition. Italy, Roma, 49 pp
- Fedotov GN y Lysak LV. 2013. The posible role of microorganisms in humus formation in soils. *Doklady Akademii Nauk*, 455(1): 114–117.
- Ferreira T y Rasband W. 2012. ImageJ User Guide. Edición revisada IJ 1.46r. Disponible em línea: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>
- Gliessman SR. 2002. El concepto de agroecosistemas. En: Gliessman SR (ed.). *Agroecología: procesos ecológicos en agricultura sostenible*. CATIE. Costa Rica, 17-28 p
- Griffiths BS, Ritz K, Bardgett RD, Cook R, Christensen S, Ekelund F, Sørensen SJ, Baath E, Bloem J, de Ruyter PC, Dolfing J, Nicolardot B. 2000. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. *Oikos* 90(2): 279–294
- Heller C, Weiß K. 2015. Approaching a Standardized Method for the Hot-Water Extraction of Peat Material to Determine Labile SOM in Organic Soils, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46:8, 1044-1060
- INAFED. 2010. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Coatepec. Estado de Veracruz Ignacio de la Llave. Disponible en línea: <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM30veracruz/municipios/30038a.html>
- INAFED. 2010a. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Naolinco. Estado de Veracruz Ignacio de la Llave. Disponible en línea: <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM30veracruz/municipios/30112a.html>
- INAFED. 2010b. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. San Felipe. Estado de Guanajuato. Disponible en línea: <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM11guanajuato/municipios/11042a.html>
- INAFED. 2010c. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Valle de Santiago. Estado de Guanajuato. Disponible en línea: <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM11guanajuato/municipios/11042a.html>
- INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Coatepec, Veracruz de Ignacio de la Llave. Disponible en línea [http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/30/30038.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/30/30038.pdf)
- INEGI. 2009a. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Cosautlán de Carvajal, Veracruz de Ignacio de la Llave. Disponible en línea [http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/30/30046.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/30/30046.pdf)
- INEGI. 2009b. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Huatusco, Veracruz de Ignacio de la Llave. Disponible en línea [http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/30/30071.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/30/30071.pdf)
- INEGI. 2009c. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Naolinco, Veracruz de Ignacio de la Llave. Disponible en línea [http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/30/30112.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/30/30112.pdf)
- INEGI. 2009d. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. San Felipe, Guanajuato. Disponible en línea [http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/11/11030.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/11/11030.pdf)
- INEGI. 2009e. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Valle de Santiago, Guanajuato. [http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/11/11042.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/11/11042.pdf)

- Karperien A. 1999-2013. Fraclac for ImageJ v 2.5. URL <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/fraclac/FLHelp/Introduction.htm>
- Kennedy AC, Papendick RI. 1995. Microbial characteristics of soil quality. *Journal of Soil and Water Conservation* 50(3): 243–248.
- Khemani D, Joseph MM, Variganti S. 2008. Case based interpretation of soil chromatograms. En: Althoff KD, Bergmann R, Minor M, Hanft A (eds.) *Advances in case-based reasoning*. 9<sup>th</sup> Conference ECCBR. Alemania. 587-599
- Kokornaczyk MA, Primavera F, Luneia R, Baumgartner S, Betti L. 2016. Analysis of soils by means of Pfeiffer's circular chromatography test and comparison to chemical analysis results. *Biological Agriculture & Horticulture*, 16 pp.
- Kosobuki P, Buszewski B. 2014. Natural Organic Matter in ecosystems- A review. *Nova Biotechnologica et Chimica* 13(2): 109
- Labrador J. 2008. Manejo del Suelo en los sistemas de producción ecológica. Sociedad Española de Agricultura Ecológica. Valencia, España, 47 pp.
- La Vía Campesina (LVC). 2015. Declaración del Foro Internacional sobre Agroecología. Nyélenu, Mali. Disponible en: <https://viacampesina.org/es/declaracion-del-foro-internacional-de-agroecologia/>
- Leinweber P, Schulten HR, Körschens M. 1995. Hot water extracted organic matter: chemical composition and temporal variations in a long-term field experiment. *Biology and Fertility of Soils* 20(1): 17-23.
- Magdoff F and Weil R. 2004. Chapter 2 Soil Organic Matter Management Strategies. En: Magdoff F and Weil R (eds.). *Soil organic matter in sustainable agriculture*. CRC Press, Washington, USA, 45-67 pp
- Medina Saavedra T, Arroyo Figueroa G, Peña Caballero V. 2018. Cromatografía de Pfeiffer en el análisis de suelos de sistemas productivos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9(3): 665-673
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella, G. 2017. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 68:1–26.
- NCBI National Centre for Biotechnology Information. 2018. PubChem Compound Database; CID=24470, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24470>
- Nielsen UN, Ayres E, Wall DH, Bardgett RD. 2010. Soil biodiversity and carbon cycling: A review and synthesis of studies examining diversity-function relationships. *European Journal of Soil Science* 62(1), 105–116
- Nielsen MN y Winding A. 2002. Microorganisms as indicators of soil health. Technical report 388. *National Environmental Research Institute*. Dinamarca, 85 pp
- Nivia Torres NI. 2017. Análisis del uso de la cromatografía como herramienta cualitativa de diagnóstico de la fertilidad del suelo en sistemas de producción agrícola. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente. Colombia.
- Pastrana Pineda O. 2011. Análisis del cambio de uso de suelo mediante percepción remota en el municipio de Santiago de Valle. Tesis para obtener el grado de Maestra en Geomática. CentroGeo CONACYT. 88 pp
- Pérez-Rodríguez L, Jovani R, Mougeot F. 2018. Fractal geometry of a complex plumage trait reveals bird's quality. *Proceedings Royal Society B* 280: 1-6
- Pinheiro S. 2011. *Cartilha da Saúde do Solo. Cromatografia de Pfeiffer. Juquirá Candiru Satygraha*. Salles Editora. Brasil, 122 p

- Pinheiro S, Restrepo Rivera J. 2011. *Cromatografía. Imágenes de vida y destrucción del suelo*. COAS Ediciones. Cali, Colombia, 247 pp
- Piña Tejeda VM. 2018. Percepción de tres sectores sociales sobre la calidad y la problemática de los suelos agrícolas de México. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- R Core Team 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, R version 3.5.1. Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Restrepo Rivera J. 2014. Manual de AgriCULTURA ORGÂNICA Curso teórico-práctico do ABC da AgriCultura Orgânica: Remineralização e Recuperação da Saúde dos Solos; Microbiologia dos Solos e Técnica da Cromatografia de Pfeiffer. Santa Catarina, Brasil, 82 pp
- Rose MT, Patti AF, Little KR, Brown AL, Roy Jackson W, Cavagnaro TR. 2014. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Advances in Agronomy* 124: 37-89
- Rousk J, Baath E, Brookes P, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R, Fierer N. 2010 Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME International Society of Microbial Ecology, Journal*, volume 4 (10): 1340–1351
- Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods* 9(7): 676-682,
- Silva C, Vinuesa P. 2007. Capítulo 11. Ecología evolutiva de bacterias y el concepto de especie: el caso de los rizobios. En: Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X (eds.). *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología SEMARNAT, México, 608 pp
- SMN. Servicio Meteorológico Nacional. 2010. Información climatológica por Estado. Estación Coatepec, Veracruz de Ignacio de la Llave. Clave 00030026. Periodo 1951-2010.
- SMN. 2010a. Información climatológica por estado. Estación Cosautlán, Veracruz de Ignacio de la Llave. Clave 00030311. Periodo 1951-2010.
- SMN. 2010b. Información climatológica por estado. Estación Huatusco, Veracruz de Ignacio de la Llave. Clave 00030187. Periodo 1951-2010.
- SMN. 2010c. Información climatológica por estado. Estación La Quemada, Guanajuato. Clave 00011107. Periodo 1951-2010.
- Sosa-Aranda I, del-Val E, Hernández-Martínez G, Arroyo-Lambaer D, Uscanga A, Boege K. 2018. Response of lepidopteran herbivore communities to crop management in coffee plantations. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 265: 37-44
- Stevenson FJ. 1994. Humus chemistry. Genesis, Composition, Reactions. Second Edition. John Wiley & Sons Inc. New York, USA, 512 pp
- Vandermeer J. 2011. *The ecology of agroecosystems*, Jones and Bartlett. Boston, USA, 387 pp
- Wagg C, Bender F, Widmer F, van der Heijden MGA. 2014. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *PNAS* 111(14): 5266-5270
- Wu T, Chellemi DO, Graham JH, Kendal JM, Roskopf EN. 2008. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. *Microb Ecol* 55: 293-310

Anexo 1

Cromatogramas obtenidos para los suelos colectados  
Cromatogramas de maíz de San Felipe, Guanajuato, México.



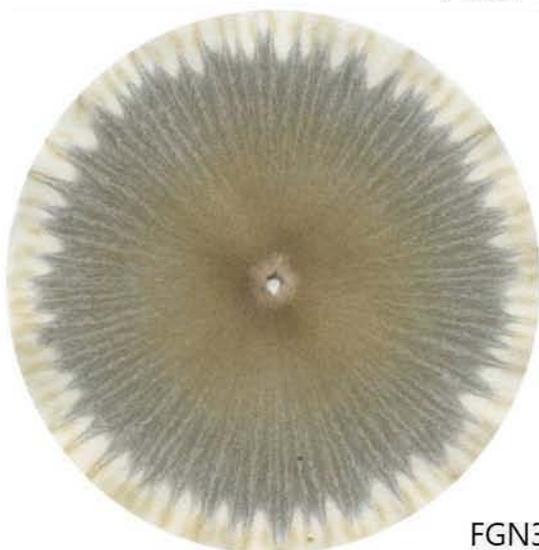
a. Cromatogramas de frijol de San Felipe, Guanajuato, México.



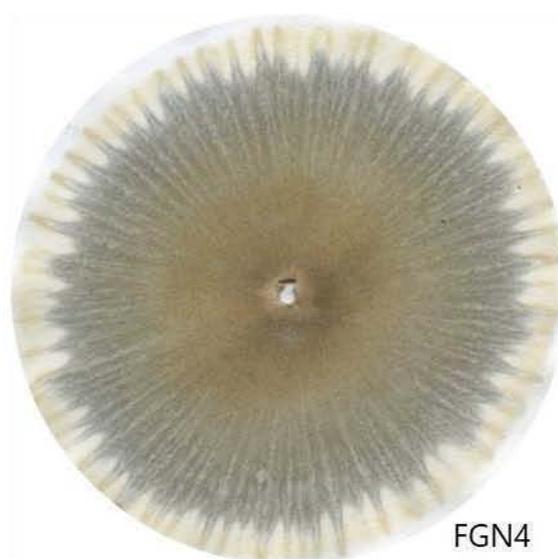
FGN1



FGN2

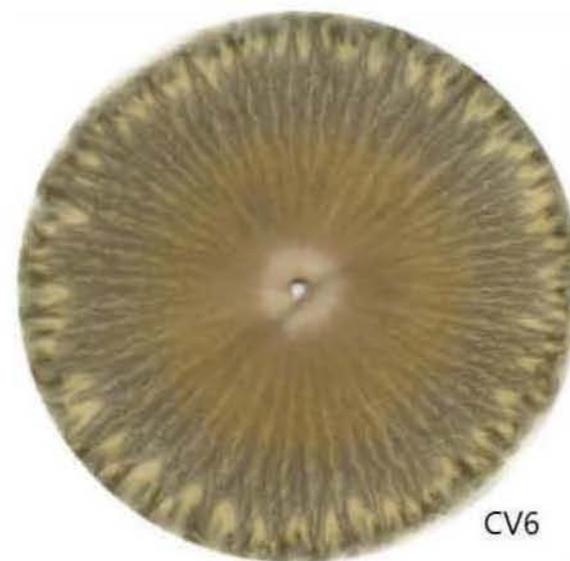
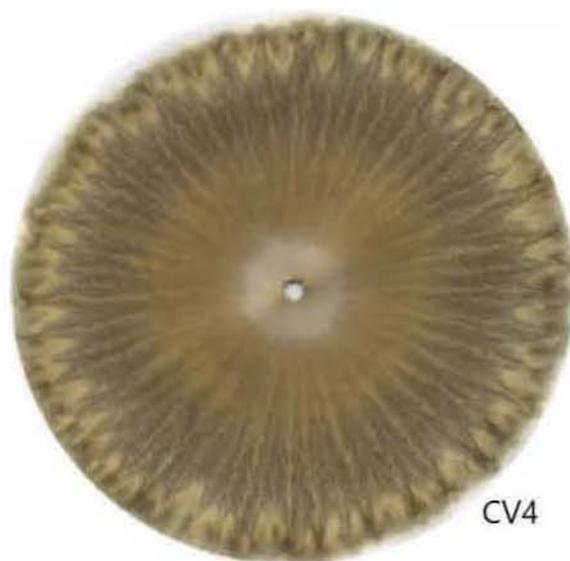
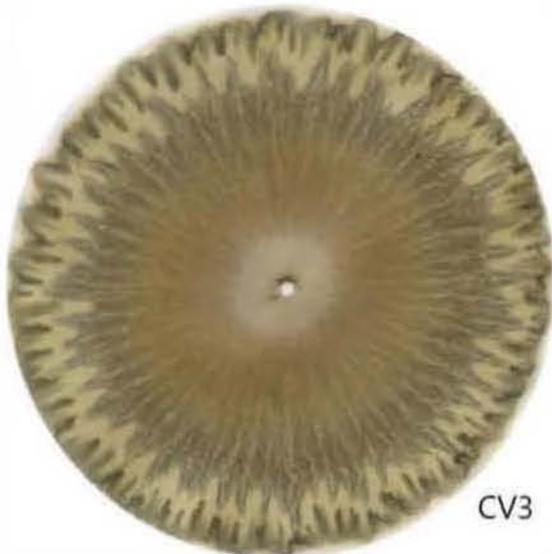
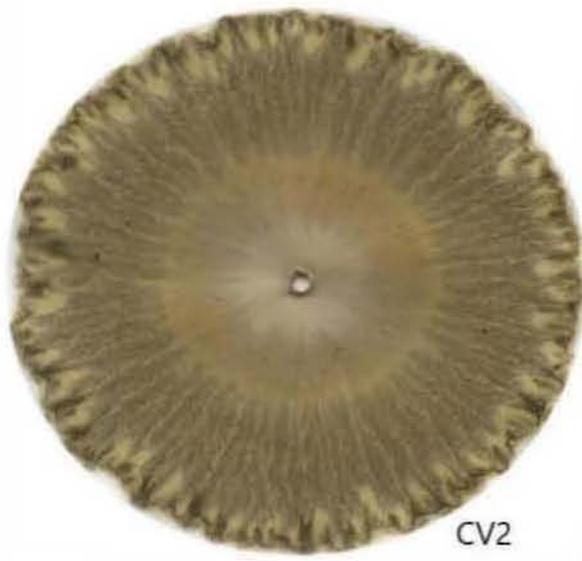
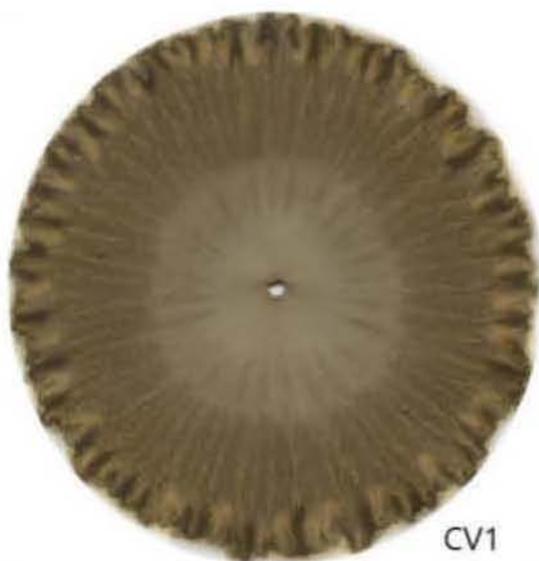


FGN3



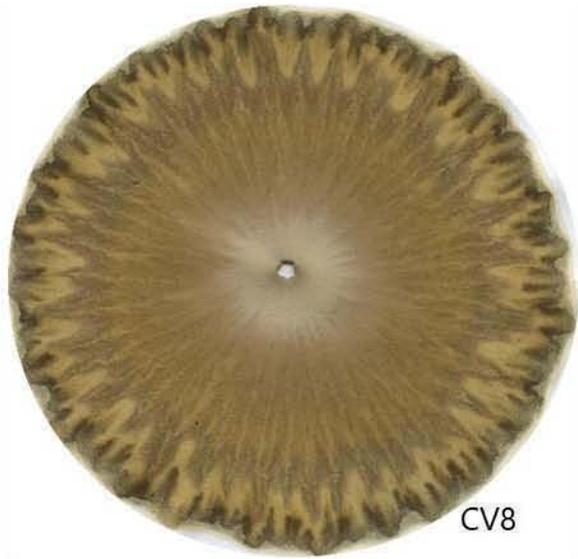
FGN4

b. Cromatogramas de café, Veracruz, México.

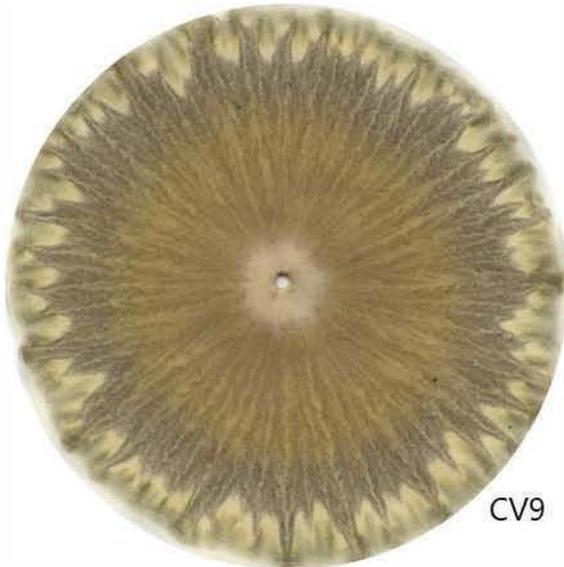




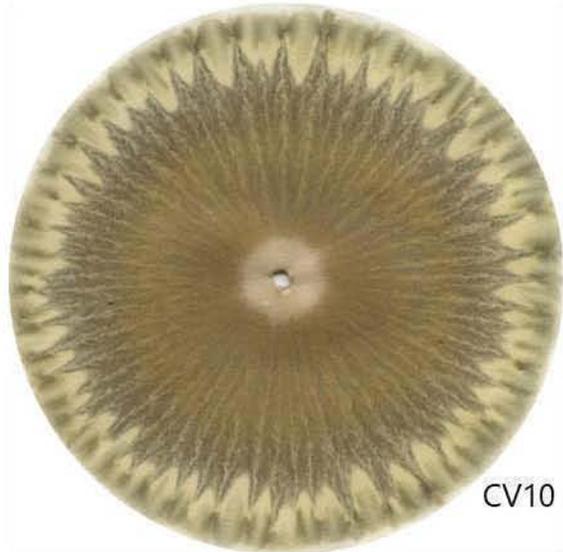
CV7



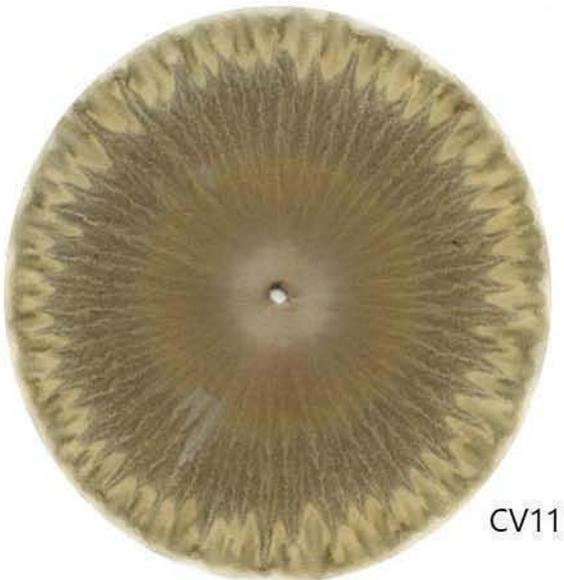
CV8



CV9



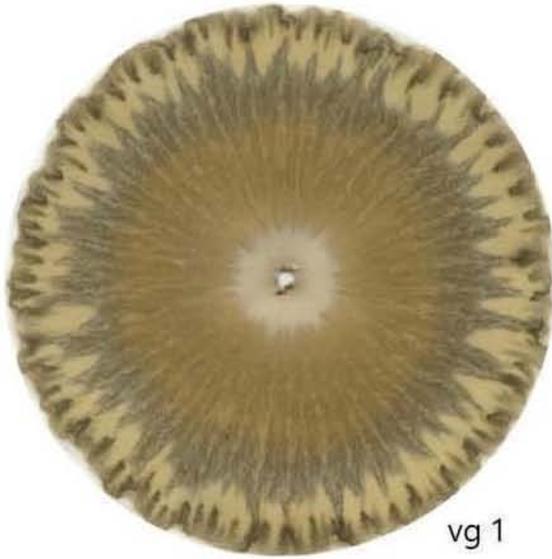
CV10



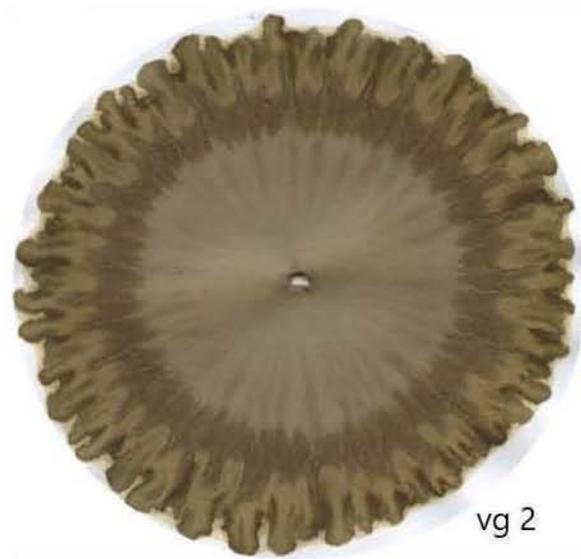
CV11



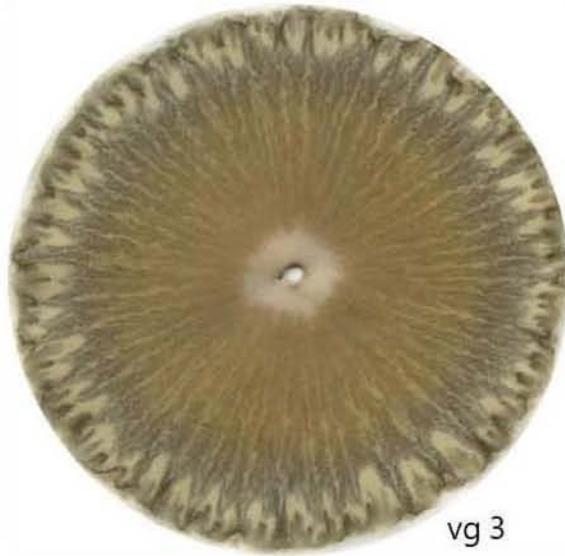
CV12



vg 1

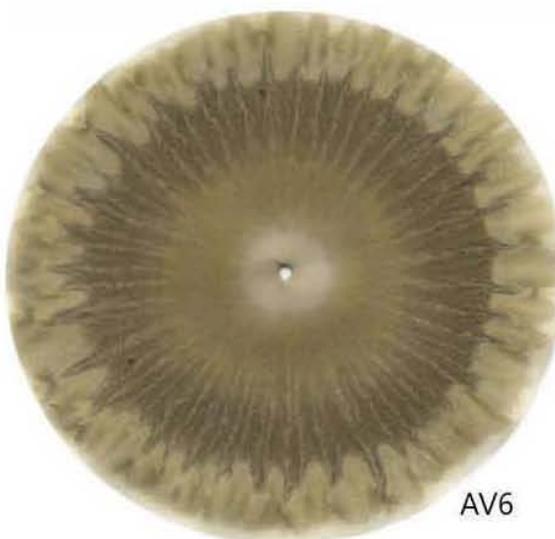
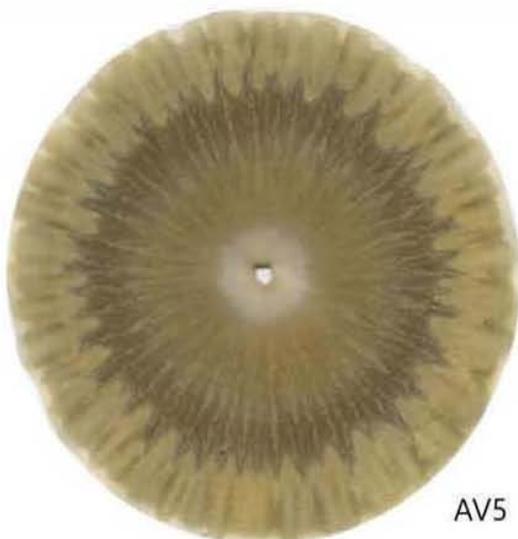
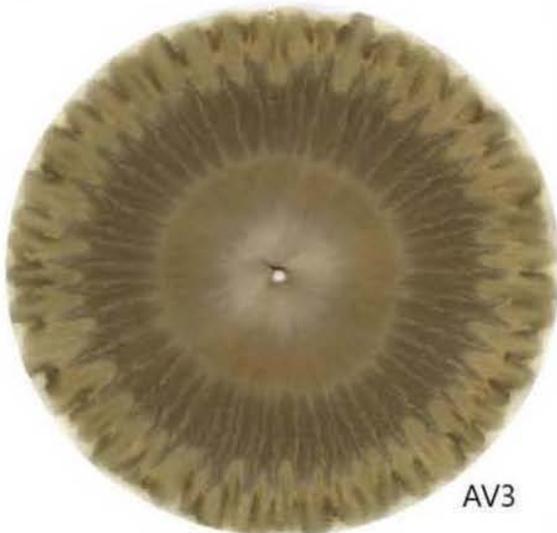
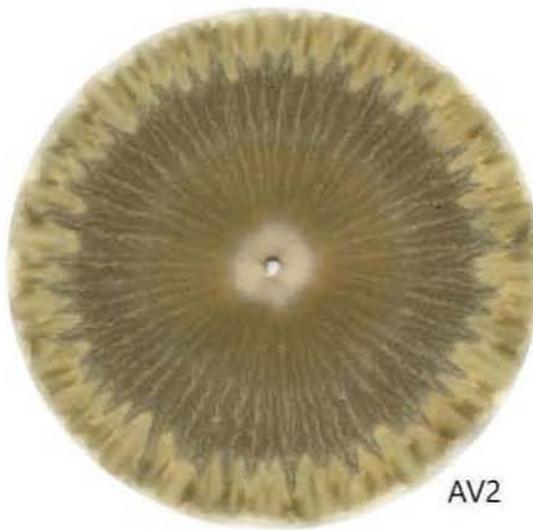
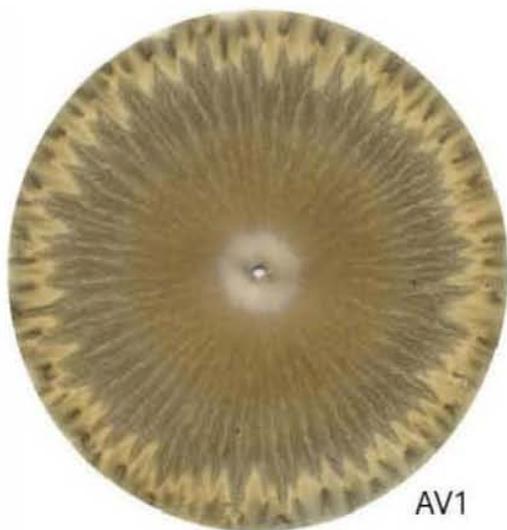


vg 2



vg 3

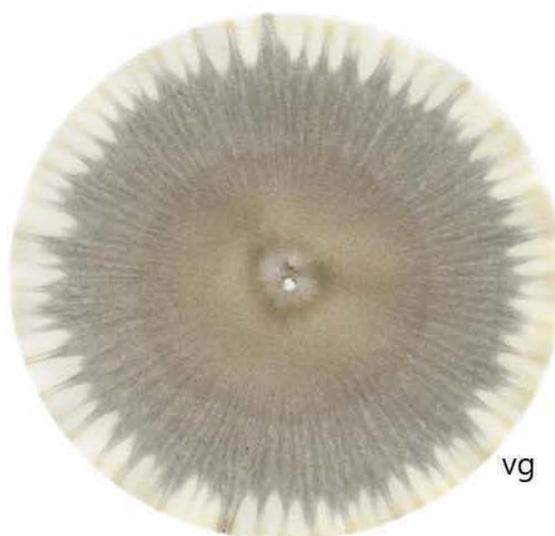
c. Cromatogramas de aguacate, Veracruz, México.





vg

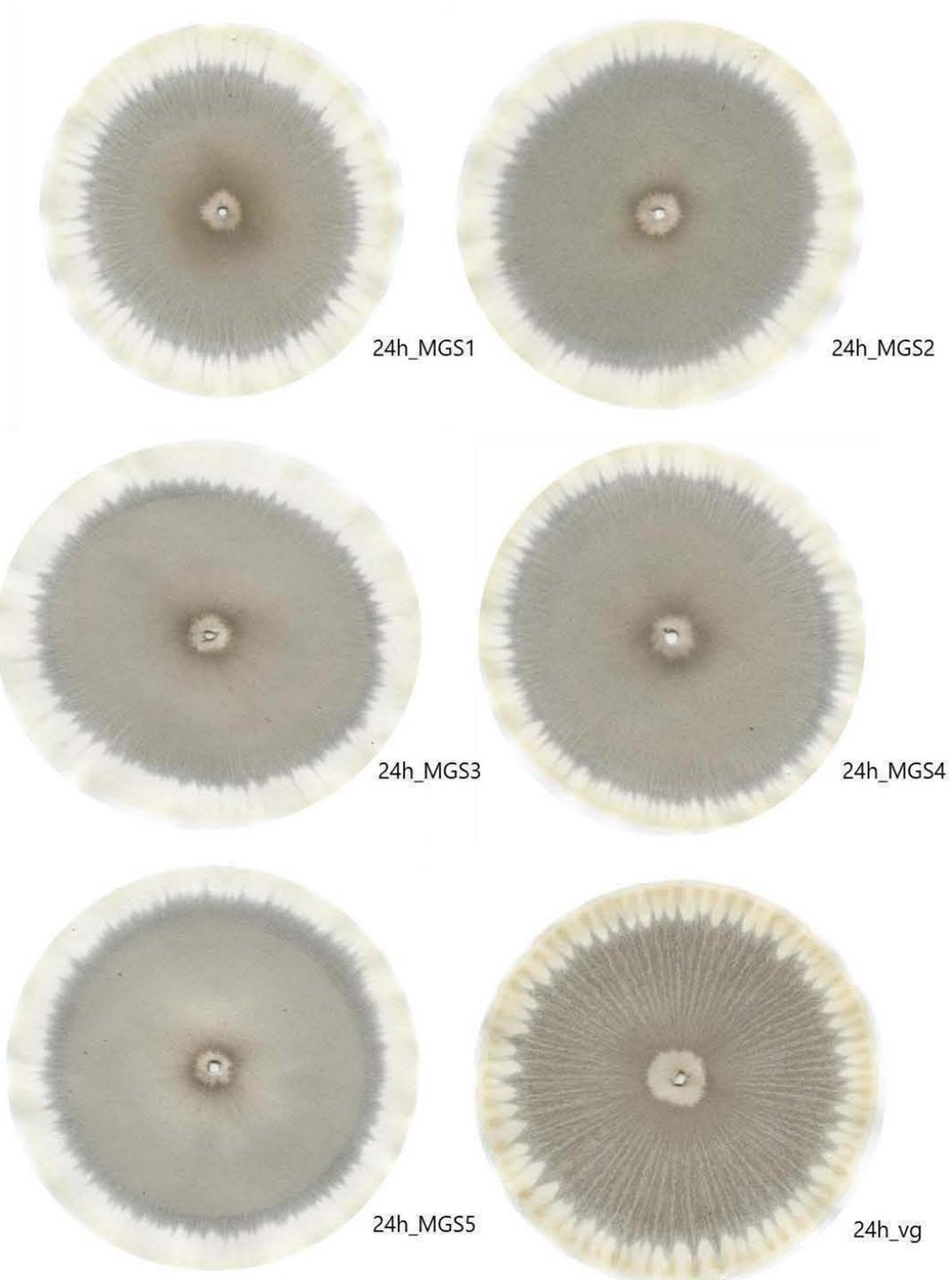
d. Cromatogramas de maíz de Guarapo, Guanajuato, México



## Anexo 2

Ensayos para suelos de maíz y frijol en Guarapo, Guanajuato, México.

1. Cromatogramas obtenidos con 24 horas de extracción de material orgánico para muestras de maíz y frijol de Guarapo, Guanajuato, México.





24h\_FGS1



24h\_FGS2



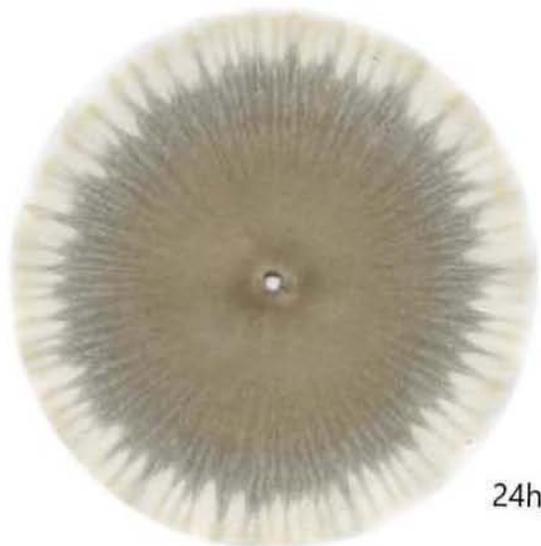
24h\_FGS3



24h\_FGS4

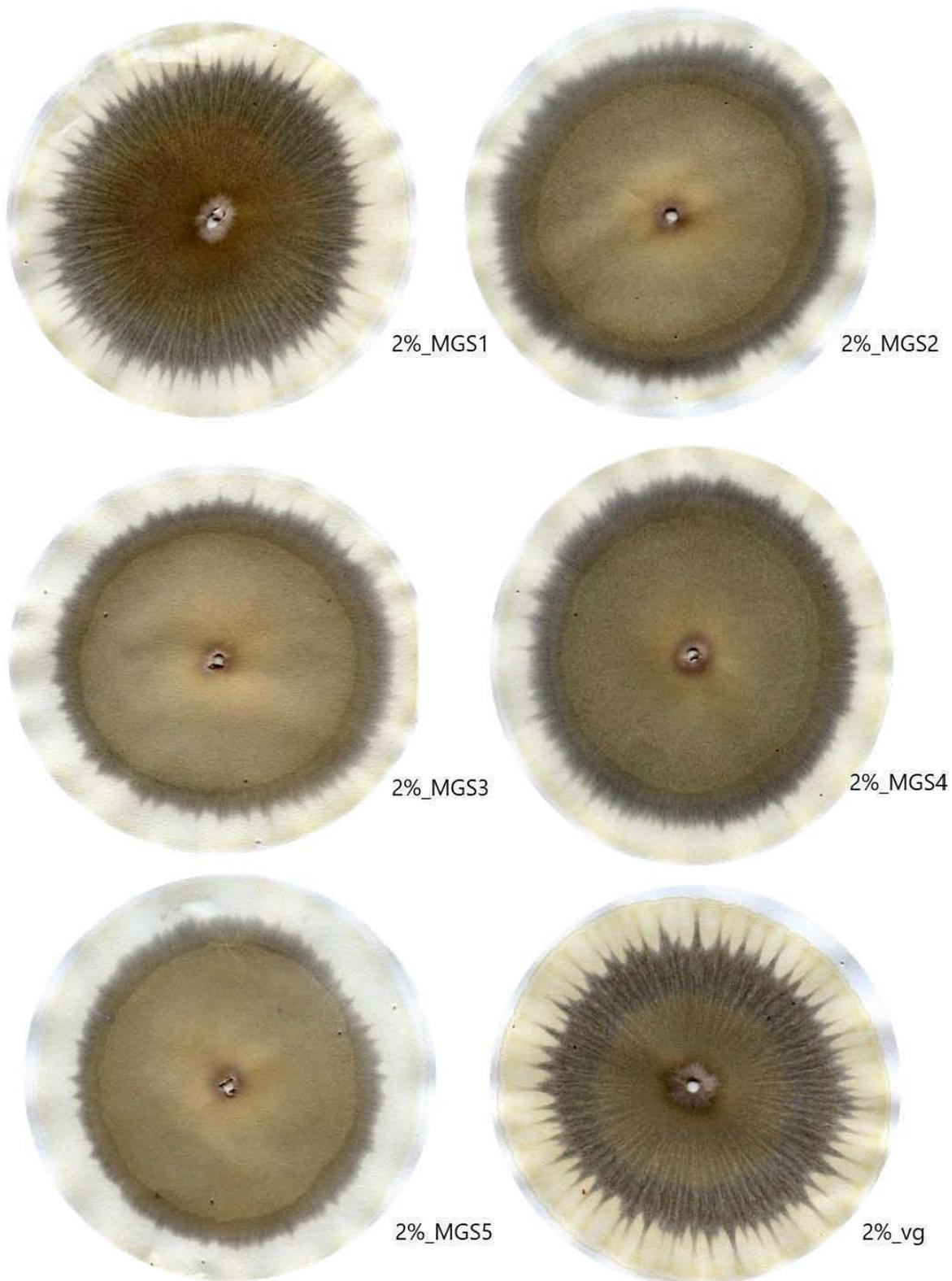


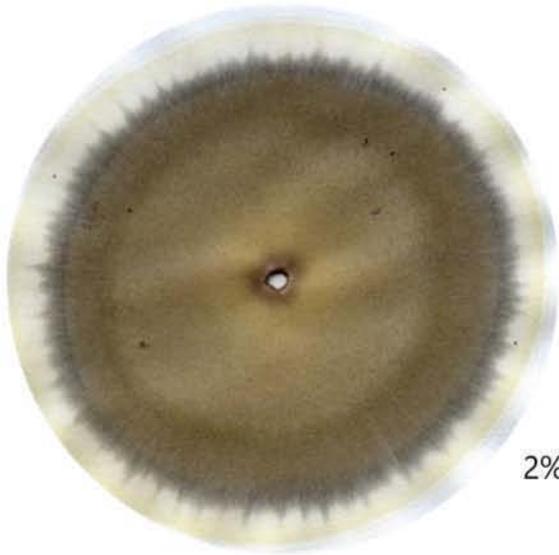
24h\_FGS5



24h\_FGS6

2. Cromatogramas obtenidos con NaOH 2% para muestras de maíz y frijol de Guarapo, Guanajuato, México.





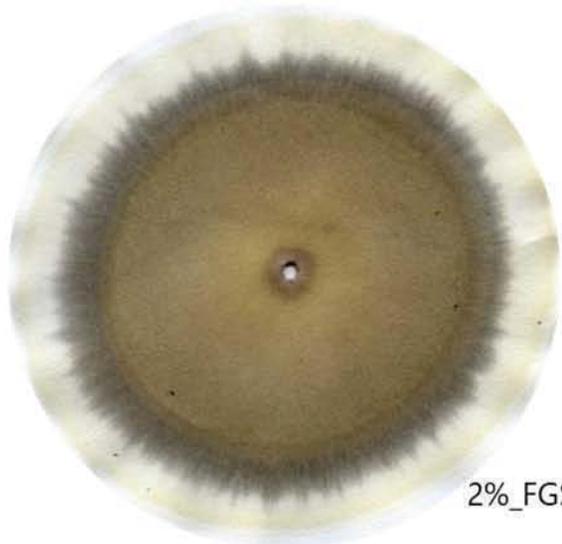
2%\_FGS1



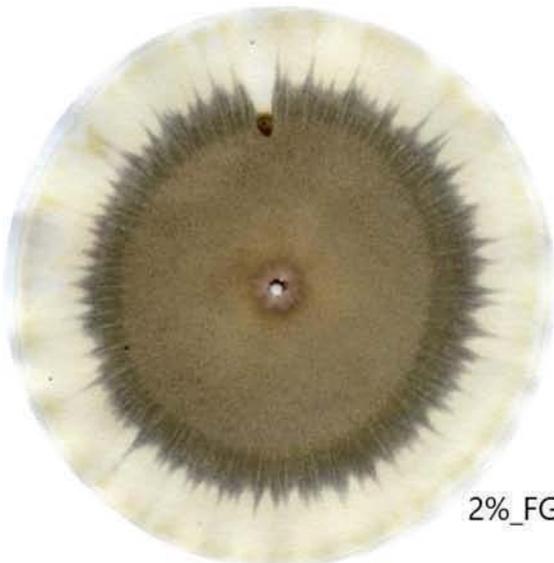
2%\_FGS2



2%\_FGS3



2%\_FGS4



2%\_FGS5



2%\_FGS6

Anexo 3

Datos de características físicas químicas y biológicas obtenidos por los laboratorios de la Dra. Ana Elena Escalante (LANCIS, UNAM), el Dr. Julio Campo (IE, UNAM) y el Dr. Víctor Peña (Instituto de Geología, UNAM)

muestra	arcilla	limo	arena	humedad	PED	DA	CE	CMRA	Nt	Pt	MO	CO	PH	BGLC	POX	LEU	NAC	FOS	DBs	DBc
O1	34	18	48	4.787	50	0.6	281.4	2.6	1.104	0.029	6.688	3.879	6.267	2.453	0.943	1.258	1.059	5.577	5.314	732.667
O2	32	18	50	4.39	0	0.5	296.2	12	0.871	0.015	4.285	2.485	4.4	1.071	0.631	0.486	0.648	3.879	5.442	1040.269
O3	36	20	44	4.007	0	0.6	328.7	8.9	0.519	0.008	3.282	1.903	5.287	1.528	0.59	0.962	1.114	5.637	5.821	1119.075
CV1	40	22	38	3.49	3	0.6	114.8	8.9	0.473	0.02	3.461	2.007	3.603	1.041	0.421	0.416	0.404	2.985	5.313	791.178
CV2	42	34	24	3.43	40	0.6	233.7	7	0.567	0.015	3.771	2.187	5.157	0.481	0.386	0.358	0.484	2.891	5.965	1110.764
CV3	42	26	32	3.53	40	0.7	408	5	0.66	0.04	3.462	2.008	4.807	0.779	0.368	0.506	0.767	3.485	5.634	1008.251
CV4	52	14	34	3.057	0	0.8	191.3	11.2	0.438	0.01	3.072	1.782	3.587	0.153	0.641	0.462	0.389	2.506	5.801	1148.279
CV5	50	28	22	3.453	1	0.6	313.8	11.3	0.439	0.024	3.843	2.229	4.09	1.184	0.563	0.79	0.706	4.072	6.158	1319.342
CV6	42	30	28	2.73	0	0.6	297.3	6.5	0.433	0.02	3.364	1.951	4.2	0.351	0.434	0.369	0.274	1.597	5.98	1191.141
CV7	30	24	46	4.933	0	0.5	200.4	8.8	1.136	0.047	7.018	4.071	3.67	3.198	4.922	2.684	1.55	14.442	5.167	867.372
CV8	40	24	36	4.187	0	0.6	581	4.1	0.946	0.025	4.504	2.612	4.457	2.526	1.013	1.694	2.604	10.372	5.972	1297.336
CV9	62	16	22	2.857	0	0.8	143.8	16.2	0.389	0.005	3.239	1.878	3.567	0.296	0.605	0.319	0.795	2.453	5.872	1176.231
CV10	58	16	26	3.265	0	1	233.5	9.4	0.429	0.014	2.972	1.724	4.19	0.349	0.428	0.403	0.82	2.44	6.065	1334.332
CV11	52	24	24	3.095	0	0.9	169.2	14.9	0.418	0.011	3.578	2.075	4.56	0.22	0.682	0.386	0.69	2.541	6.126	1484.605
CV12	28	32	40	4.103	0	0.5	418.5	4.7	0.639	0.053	4.991	2.895	4.703	0.412	0.85	0.506	0.207	3.207	5.826	1193.568
AVO	40	40	20	4.321	0	0.6	328.7	8.9	0.236	0.142	3.342	1.938	6.603	0.664	0.401	0.655	0.455	3.971	5.659	858.054
AV1	40	20	40	4.411	0	0.6	131.5	17.2	0.155	0.124	3.117	1.808	7.2	0.551	0.402	0.561	0.301	2.368	5.867	831.409
AV2	36	26	38	3.698	0	0.8	170.8	10.5	0.216	0.044	2.049	1.188	5.58	0.576	0.428	0.543	0.309	2.539	5.706	965.204
AV3	32	12	56	4.372	0	0.5	418.5	4.7	0.185	0.059	4.357	2.527	5.817	0.552	0.543	0.475	0.29	1.384	5.468	895.144
AV4	30	12	58	4.874	0	0.4	123	4.3	0.201	0.061	4.648	2.696	5.493	2.802	2.727	1.929	0.864	9.604	5.361	816.968
AV5	28	20	52	3.943	1	0.6	157.1	3.4	0.11	0.067	2.114	1.226	6.73	0.435	0.44	0.528	0.317	2.4	5.84	1041.267
AV6	32	16	52	4.199	0	0.6	196.3	11	0.13	0.049	2.081	1.207	6.793	0.231	0.429	0.408	0.232	1.738	5.45	802.203
OGN	24	16	60	0.276	40	0.9	279.2	11.9	0.279	0.014	3.18	1.845	5.847	0.627	0.103	0.172	0.198	1.153	5.623	850.007
MGN1	34	20	46	0.549	3	1.3	59.5	13.6	0.18	0.009	1.634	0.948	6.78	0.381	0.375	0.172	0.192	0.775	6.081	1012.565
MGN2	26	14	60	0.357	3	1.1	75	10.6	0.113	0.009	1.822	1.057	7.023	0.257	0.389	0.167	0.101	0.579	6.398	1681.543
MGN3	30	18	52	0.664	5	1.2	222.6	10.8	0.156	0.008	2.099	1.218	6.357	0.383	0.208	0.164	0.144	0.622	6.119	1367.812
MGN4	32	20	48	1.222	5	1.3	237	14.7	0.122	0.01	1.987	1.152	6.473	0.331	0.208	0.179	0.172	0.766	6.137	1070.24
MGN5	31	18	52	1.007	3	1.2	316.8	12.2	0.254	0.006	2.369	1.374	6.62	0.344	0.297	0.16	0.181	0.685	6.366	1589.419
FGN1	36	20	44	0.827	3	1.3	59.5	13.6	0.18	0.006	1.759	1.02	7.193	0.346	0.385	0.17	0.124	0.769	6.119	973.199
FGN2	36	18	46	0.65	3	1.1	75	10.6	0.127	0.008	2.03	1.178	6.353	0.35	0.299	0.232	0.139	0.46	6.187	1341.423
FGN3	32	22	46	0.397	5	1.2	222.6	10.8	0.157	0.012	2.063	1.197	6.443	0.357	0.261	0.22	0.188	0.821	6.301	1423.757
FGN4	30	24	46	0.507	5	1.3	237	14.7	0.332	0.008	2.067	1.199	6.557	0.313	0.341	0.232	0.1	0.505	6.376	1452.671











