



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

MINERALIZACIÓN DEL NITRÓGENO
EN UN ECOSISTEMA EXTREMO,
EL SUELO SALINO-SÓDICO
DEL EX-LAGO DE TEXCOCO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARCELO ROJAS OROPEZA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Nathalie Cabriol

COMITÉ TUTORAL: Dra. Irma Rosas Pérez
Dr. Luc Dendooven

MÉXICO, D.F. AGOSTO de 2012



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.



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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de mayo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno ROJAS OROPEZA MARCELO con número de cuenta 87042687 con la tesis titulada: "MINERALIZACIÓN DEL NITRÓGENO EN UN ECOSISTEMA EXTREMO, EL SUELO SALINO-SÓDICO DEL EX-LAGO DE TEXCOCO.", realizada bajo la dirección de la DRA. NATHALIE CABIROL:

Presidente:	DRA. SILKE CRAM HEYDRICH
Vocal:	DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA
Secretario:	DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ
Suplente:	DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO
Suplente	DR. LUC DENDOOVEN

De acuerdo con lo anterior, el alumno se acogió a la nueva normatividad, con base en el Artículo QUINTO TRANSITORIO en apego a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (29 septiembre de 2006).

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 30 de julio de 2012.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del interesado.

A GRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por la oportunidad de realizar mi formación doctoral dentro de su programa de estudios. Especialmente a la Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga por devolverme al seno de la vida académica en el Posgrado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios, de igual forma por el apoyo financiero con el cual inicié este proyecto. A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo financiero (PAPIIT) otorgado para la realización de la estancia en el laboratorio "*Microbiologie des sols*" del INRA Dijon, Francia (*Institut National de Recherche Agronomique*).

Gracias a los miembros de mi Comité Tutorial quienes estuvieron conmigo en todos los sobresaltos de este escabroso camino:

Dra. Nathalie Cabirol (Tutor principal)

Dra. Irma Aurora Rosas Pérez (Miembro del comité tutorial)

Dr. Luc Dendooven (Miembro del comité tutorial)

A GRADECIMIENTOS

Al INRA Dijon por las facilidades otorgadas durante mi estancia, mi profundo reconocimiento y agradecimiento por haberme proporcionado los insumos, acceso irrestricto en los laboratorios y asesoría técnica en beneficio de mi formación y del proyecto; de igual manera por hacer de mi estancia una gran experiencia académica y de vida por las reuniones, congresos, ponencias, el alojamiento y en general la vida diaria dentro de esta gran institución.

Al laboratorio divisional de Biología molecular, de la división Ciencias biológicas y de la Salud de la UAM Iztapalapa por realizar las secuenciaciones de los amplificadores del experimento 4.

La UNAM es una casa de encuentro del conocimiento y este siempre será una cualidad de nuestra comunidad. Allí encontré y conocí también oportunidades de crecimiento como persona que son indudable valor de mi formación y activo para mi trabajo en bien de nuestro país. Ya he iniciado el camino de trabajar por el bien de los sectores productivos del campo mexicano, y mi trincherera esta tanto en el campo con la gente, como en los laboratorios y las aulas. Eternamente agradecido con mi alma mater, espacio vital en donde he sido tan feliz, sus jardines, edificios, horas de cine, clases, de tiempos compartidos con los amigos en horas nunca rutinarias y muy alegres. He crecido en ella.

A GRADECIMIENTOS

Muchos fueron los apoyos para la realización de este trabajo, siempre francos, entusiastas y motivadores. Gracias por ello. Especialmente para las personas que con mayor energía impulsaron y creyeron en esta mi labor.

A la Dra. Nathalie Cabirol, le agradezco su entusiasmo y firme confianza en toda la ejecución de este trabajo lleno de tantos sobresaltos, y que a pesar de ello y por su espíritu perseverante que contagia, confluyo en la feliz conclusión del proyecto.

A la Dra. Irma Rosas Pérez quien desde el nacimiento de este proyecto me dio su confianza, compartió conocimiento, instrucción y jalones de orejas con la esperanza de contribuir a forjar una bien nutrida formación de Doctor. A la Dra. Silke Cram, quien tiene un muy agudo sentido pedagógico y contribuyo enorme y perdurablemente en mi formación, gracias por sus otras contribuciones académicas y técnicas en proyectos personales de tipo social. A la Dra. Christina Siebe, por darme la oportunidad de iniciar este proyecto y guiarme durante el primer año.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino por sus siempre certeros comentarios para fortalecer mi espíritu de investigador, pero ante todo gracias por la amistad. Al Dr. Laurent Philippot por su paciencia y enseñanzas en las artes de la biología molecular, también por su innegable interés y paciencia para mostrarme el “*terroir*” de su hermoso país, Francia. Al Dr. Luc Dendooven quien tiene ese tacto para dar certeza y confianza a sus alumnos que desean volar alto en los cielos de la investigación, gracias por su amistad. Al Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza por su valiosa aportación a este trabajo, y gracias por transportarme durante nuestra charla a mi tiempo como estudiante de licenciatura en Iztacala.

D

EDICATORIAS

A mi esposa e hijos

Compañera inseparable en todo momento, te agradezco por ser tan mía como yo lo soy para ti. Creíste en mí, en mi sueño y lo hiciste tuyo, le diste aliento y continuo apoyo. Tu amor dio a nuestras vidas la mayor bendición, Marco Ulises y Brian Jair nuestro mayor tesoro. Es mi deseo que tengan sus propios sueños y luchan incansables y seguros por hacerlos su realidad. Su esfuerzo propio en esta tarea los forjará como hombres libres y felices.

A mis padres

Por su infinito amor, paciencia, y deseo de brindarme su apoyo en todo momento de mi vida. Gracias por mostrarme el valor de enfrentar la vida con la verdad y la sabiduría para regocijarme de ella a cada instante con sus maravillas, aun cuando no lo parezcan.

A mis hermanos

Por compartir sus vidas tan llenas conmigo, aprendiendo a crecer cada día y proporcionando ese valor ante cada adversidad vivida.

A mis abuelos

Pilares de comprensión, bondad, ternura y el más reconfortante amor paternal.

INDICE

LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	6
1. EL SUELO COMO SOPORTE DE LOS AMBIENTES EXTREMOS.....	6
1.1. SALINIZACIÓN.....	7
1.2. SODICACIÓN	8
1.3. PROCESOS DE DEGRADACIÓN MÁS IMPORTANTES DEL SUELO Y POTENCIAL SALINIZACIÓN	10
2. ECOLOGÍA MICROBIANA DE SUELOS SALINO-SÓDICOS: CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES.....	11
2.1. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA DE LAS BACTERIAS HALOTOLERANTES	12
2.2. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA DE LAS ARQUEAS Y BACTERIAS HALÓFILAS ERICTAS	14
2.3. FISIOLÓGÍA DE LAS BACTERIAS HALOTOLERANTES	14
2.4. FISIOLÓGÍA DE LAS ARQUEAS HALÓFILAS	14
3. CICLO DEL NITRÓGENO.....	15
3.1. GENERALIDADES.....	15
3.2. NITRIFICACIÓN.....	18
<i>Reacciones energéticas de las bacterias nitrificantes</i>	18
<i>Oxidación anóxica del amonio (Anammox)</i>	19
3.3. DESNITRIFICACIÓN.....	19
4. EXPERIENCIAS EN DIFERENTES PARTES DEL MUNDO DE LA APLICACIÓN DE BIOSÓLIDOS COMO MEJORADORES DEL SUELO.....	20
4.1. USO BENÉFICO DE LOS BIOSÓLIDOS	21
4.2. COMPOSICIÓN DEL BIOSÓLIDO Y SUS EFECTOS COMO MEJORADOR DE SUELO	22
4.3. MEJORAMIENTO DE SUELOS DEGRADADOS	24
5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE COMUNIDADES MICROBIANAS CON TÉCNICAS MOLECULARES.....	24
5.1. SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS (PRIMERS).....	25
5.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE COMUNIDADES MICROBIANAS CON TÉCNICAS MOLECULARES (ADN).....	26
<i>Separación por electroforesis en gradiente de gel desnaturalizante o térmico (DGGE, TGGE: Denaturing/Thermal gradient gel electroforesis)</i>	26
6. CUANTIFICACIÓN DE POBLACIONES POR TÉCNICAS MOLECULARES.....	28
6.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR, POLYMERASE CHAIN REACTION) CUANTITATIVA	28
7. EN RESUMEN, LA BIOLOGÍA MOLECULAR COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA MICROBIANA.....	30

JUSTIFICACIÓN	31
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	32
8. LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	32
9. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	33
10. CARACTERIZACIÓN DEL BIOSÓLIDO.....	33
11. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	33
11.1. EXPERIMENTO 1: MINERALIZACIÓN DEL CARBONO Y NITRÓGENO DESPUÉS DE LA DISPOSICIÓN DE DIFERENTES CANTIDADES DE BIOSÓLIDO EN UN SUELO DE ALTA SALINIDAD (SALINIDAD 3).	33
11.2. EXPERIMENTO 2: DINÁMICA MICROBIANA DESPUÉS DE LA DISPOSICIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO EN UN SUELO DE ALTA SALINIDAD (SALINIDAD 3).	35
11.3. EXPERIMENTO 3: MINERALIZACIÓN DEL CARBONO Y NITRÓGENO DESPUÉS DE LA DISPOSICIÓN DE UN BIOSÓLIDO A UNA CANTIDAD DADA, EN SUELOS CON DIFERENTES SALINIDADES.	36
11.4. EXPERIMENTO 4: ESTUDIO PRELIMINAR DE LA DIVERSIDAD FUNCIONAL, NITRIFICANTE, DESNITRIFICANTE Y ANAMMOX, EN SUELOS CON DIFERENTES SALINIDADES. 36	
12. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DEL SUELO	36
12.1. PORCENTAJE DE HUMEDAD.....	36
12.2. CONCENTRACIÓN DE SALES.....	37
12.3. pH.....	37
12.4. RESPIRACIÓN DEL SUELO.....	37
12.5. CARBONO TOTAL.....	37
12.6. ANÁLISIS DE LAS DIFERENTES FORMAS DE NITRÓGENO.....	37
12.7. EXTRACCIÓN DE ADN.....	38
12.8. RISA.....	38
12.9. AMPLIFICACIÓN DE GENES DE FUNCIÓN Y TGGE.....	39
12.10. ANÁLISIS DE DATOS MOLECULARES.....	41
12.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
RESULTADOS	42
13. MINERALIZACIÓN DEL CARBONO Y NITRÓGENO DESPUÉS DE LA DISPOSICIÓN DE DIFERENTES CANTIDADES DE BIOSÓLIDO EN UN SUELO DE ALTA SALINIDAD (SALINIDAD 3).....	42
13.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL BIOSÓLIDO	42
13.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL SUELO ESTUDIADO.....	42
13.3. MINERALIZACIÓN DEL CARBONO Y NITRÓGENO.....	43
14. DINÁMICA MICROBIANA DESPUÉS DE LA DISPOSICIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO EN UN SUELO DE ALTA SALINIDAD (SALINIDAD 3).....	45

15. MINERALIZACIÓN DEL CARBONO Y NITRÓGENO DESPUÉS DE LA DISPOSICIÓN DE UN BIOSÓLIDO A UNA CANTIDAD DADA, EN SUELOS CON DIFERENTES SALINIDADES.....	49
15.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS SUELOS ESTUDIADOS	49
15.2. MINERALIZACIÓN DEL CARBONO Y NITRÓGENO.....	49
16. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA DIVERSIDAD FUNCIONAL, NITRIFICANTE, DESNITRIFICANTE Y ANAMMOX EN SUELOS CON DIFERENTES SALINIDADES.	52
16.1. FUNCIÓN ñNITRIFICACIÓNñ, CON LOS GENES AMOA Y PMOA.....	53
16.2. FUNCIÓN ñDESNITRIFICACIÓNñ, CON LOS GENES NARG Y NOSZ	55
16.3. FUNCIÓN ñOXIDACIÓN ANAEROBIA DEL AMONIOñ (ANAMMOX), CON EL GEN HZOA	56
16.4. DINÁMICA DEL NITRÓGENO Y FUNCIÓN MICROBIANA EN EL EX LAGO DE TEXCOCO	57
DISCUSIÓN	59
17. MINERALIZACIÓN DEL CARBONO Y NITRÓGENO DESPUÉS DE LA DISPOSICIÓN DE DIFERENTES CANTIDADES DE BIOSÓLIDO EN SUELO DE ALTA SALINIDAD (SALINIDAD 3).....	59
18. DINÁMICA MICROBIANA DESPUÉS DE LA DISPOSICIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO EN EL SUELO DE ALTA SALINIDAD (SALINIDAD 3).....	61
19. MINERALIZACIÓN DEL CARBONO Y NITRÓGENO DESPUÉS DE LA DISPOSICIÓN DE UN BIOSÓLIDO A UNA CANTIDAD DADA, EN SUELOS CON DIFERENTES SALINIDADES.....	62
20. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA DIVERSIDAD FUNCIONAL, NITRIFICANTE, DESNITRIFICANTE Y ANAMMOX EN SUELOS CON DIFERENTES SALINIDADES.	63
21. DISCUSIÓN GENERAL.....	64
CONCLUSIONES.....	70
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXO 1.....	83
DIAGRAMAS DE CAJA PARA EL EXPERIMENTO 1	83
DIAGRAMAS DE CAJA PARA EL EXPERIMENTO 3	85
ANEXO 2.....	86
ARTÍCULO PUBLICADO Y ARBITRADO EN REVISTA DE CIRCULACIÓN INTERNACIONAL INDEXADA	87

Lista de tablas

Tabla 1-1 Tipos de suelos basados sobre sus valores de pH (Tan, 2000).....	8
Tabla 1-2 Tipos de suelos basados sobre sus valores salinidad y alcalinidad (FitzPatrick, 1987).....	9
Tabla 1-3 Distribución mundial de lagos y desiertos sódicos.....	10
Tabla 2-1 Clasificación de varias bacterias halotolerantes y/o halófilas, alcalófilas en base a la clasificación propuesta en el Manual Bergey de Holt y Krieg (1989).....	13
Tabla 3-1 Estados de oxidación de compuestos nitrogenados clave (Madigan et al., 2004)	17
Tabla 4-1 Uso benéfico de los biosólidos en diferentes países.	21
Tabla 4-2 Límites máximos permisibles de patógenos y parásitos en biosólidos según las normas de los Estados Unidos de América y los de México, respectivamente.	22
Tabla 9-1 Aspecto morfológico del pasto salado en las tres zonas de salinidad.	33
Tabla 11-1 Condiciones de los tratamientos que constituyen cada unidad.	34
Tabla 11-2 Condiciones de los tratamientos que constituyen cada unidad.	36
Tabla 12-1 Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de función.....	40
Tabla 13-1 Características fisicoquímicas del biosólido.....	42
Tabla 13-2 Características fisicoquímicas del suelo (experimento 1).....	42
Tabla 13-3 Comparación de las formas de nitrógeno con aplicación de diferentes cantidades de biosólido. F y p-value después del análisis de varianza.....	44
Tabla 13-4 Velocidad de mineralización del nitrógeno calculados para un periodo de 14 días (experimento 1).	45
Tabla 15-1 Características fisicoquímicas de los suelos estudiados (experimento 3).....	49
Tabla 15-3 Velocidades de mineralización del nitrógeno en un periodo de 15 días (experimento 3).....	50
Tabla 15-4 Nitrógeno disponible del biosólido.	52

Lista de figuras

Figura 1-1 Sistema ternario de aniones (FitzPatrick, 1987)	8
Figura 3-1 Esquema general del ciclo del nitrógeno. Las anchuras de las flechas representan aproximadamente las tasas relativas de los procesos (adaptado de Atlas y Bartha, 2002; Smith y Smith, 2002; Saricheewin et al., 2010).	16
Figura 5-1 Operón ribosomal bacteriano.....	27
Figura 6-1 Esquema de construcción del estándar interno: el fragmento de 444 pb es digerido por <i>HindIII</i> generando 3 fragmentos, los cuales se vuelven a ligar mediante la T4 ligasa. El fragmento de 372 pb con las dos regiones de los <i>primers</i> es purificado y clonado, con el fin de usarlo como estándar interno. PI, <i>primer</i> iniciador; PF, <i>primer</i> final (Lleó et al., 1999).....	29
Figura 8-1 Localización y vista general del área de estudio en el ex-lago de Texcoco.....	32
Figura 11-1 Diagrama experimental para el estudio fisicoquímico de la dinámica del nitrógeno. (Experimentos 1 y 3).....	34
Figura 11-2 Diagrama experimental para el estudio molecular de la dinámica microbiana. (Experimentos 2 y 4).....	35
Figura 13-1 Producción de CO ₂ (mg C kg ⁻¹ suelo seco) del suelo sin biosólido (C0, ○) y del suelo con 66 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C1, ◆), 132 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C2, ■) o 265 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C3, ▲).....	43
Figura 13-2 Volatilización de NH ₃ (mg N kg ⁻¹ suelo seco) del suelo sin biosólido (C0, ○) y del suelo con 66 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C1, ◆), 132 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C2, ■) o 265 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C3, ▲).....	43
Figura 13-3 Concentración de a) N-NH ₂ /NH ₄ ⁺ , b) NH ₄ ⁺ , c) NO ₂ ⁻ y d) NO ₃ ⁻ (mg N kg ⁻¹ suelo seco) en el suelo sin biosólido (C0, ○) y en el suelo con 66 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C1, ◆), 132 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C2, ■) o 265 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C3, ▲).....	44
Figura 14-1 Comparación de los patrones RISA obtenidos del biosólido (Bios), del suelo sin biosólido (0) y del suelo añadido con 66 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo seco. M: marcador y por encima de los carriles se da los tiempos de muestreo en días.....	46
Figura 14-2 Comparación de los patrones RISA obtenidos del suelo añadido con 132 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo seco y 265 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo seco. M: marcador y por encima de los carriles se da los tiempos de muestreo en días.....	47
Figura 14-3 Comparación de los rangos ponderados de riqueza (<i>Rr</i>) del suelo sin biosólido (C0, ○) y del suelo con 66 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C1, ◆), 132 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C2, ■) ó 265 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C3, ▲).....	47
Figura 14-4 Perfiles de electroforesis RISA de los fragmentos del intergen ADN _r 16S y 23S ITS/IGS, <i>Moving Window Analysis</i> (MWA) y valores de la tasa de cambio porcentual (Δ_t), expresados como el promedio + desviación estándar, para evaluar el nivel de dinamismo de la comunidad bacteriana del suelo sin biosólido (C0, ○) y del suelo con 66 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C1, ◆), 132 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C2, ■) ó 265 mg biosólido-N kg ⁻¹ suelo (C3, ▲).....	48
Figura 15-1 Producción de CO ₂ (mg C kg ⁻¹ suelo seco) del suelo Salinidad 1 con CEs 34.2 dS m ⁻¹ (S1, ◆), Salinidad 2 con CEs 63.4 dS m ⁻¹ (S2, ■) o Salinidad 3 con CEs 129.2 dS m ⁻¹ (S3, ▲), Testigo Salinidad 1(×), Testigo Salinidad 2 (★) y Testigo Salinidad 3 (●).	50

Figura 15-2 Volatilización de NH ₃ (mg N kg ⁻¹ suelo seco) del suelo Salinidad 1 con CEs 34.2 dS m ⁻¹ (S1, ◆), Salinidad 2 con CEs 63.4 dS m ⁻¹ (S2, ■) o Salinidad 3 con CEs 129.2 dS m ⁻¹ (S3, ▲), Testigo Salinidad 1(×), Testigo Salinidad 2 (*) y Testigo Salinidad 3 (●).....	50
Figura 15-3 Concentración de a) N-NH ₂ /NH ₄ ⁺ , b) NH ₄ ⁺ , c) NO ₂ ⁻ y d) NO ₃ ⁻ (mg N kg ⁻¹ suelo seco) del suelo Salinidad 1 con CEs 34.2 dS m ⁻¹ (S1, ◆), Salinidad 2 con CEs 63.4 dS m ⁻¹ (S2, ■) o Salinidad 3 con CEs 129.2 dS m ⁻¹ (S3, ▲), Testigo Salinidad 1(×), Testigo Salinidad 2 (*) y Testigo Salinidad 3 (●).....	51
Figura 15-4 Balance de nitrógeno antes y después de la aplicación de biosólido en suelos de diferentes salinidades. Incubación aerobia a 25°C y humedad constante.....	52
Figura 16-1 Patrones de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) con genes de función. <i>nosZ</i> del suelo salinidad 1, ZT1; <i>nosZ</i> del suelo salinidad 2, ZT2; <i>nosZ</i> del suelo salinidad 3, ZT3; <i>amoA</i> del suelo salinidad 1, AT1; <i>amoA</i> del suelo salinidad 2, AT2; <i>amoA</i> del suelo salinidad 3, AT3; <i>pmoA</i> del suelo salinidad 1, PT1; <i>pmoA</i> del suelo salinidad 2, PT2; <i>pmoA</i> del suelo salinidad 3, PT3; <i>narG</i> del suelo salinidad 1, GT1; <i>narG</i> del suelo salinidad 2, GT2; <i>narG</i> del suelo salinidad 3, GT3; <i>hzoA</i> del suelo salinidad 1, HT1; Valores ponderados de riqueza (R _i), promedio + desviación estándar. Las líneas horizontales representan un grado de temperatura entre 56 y 66°C.	53
Figura 16-2 Dendrograma de los fragmentos del gen <i>amoA</i> y del gen <i>pmoA</i> . Comparación de secuencias de TGGE y secuencias tomadas del <i>GenBank</i> . Las distancias filogenéticas se determinaron por el análisis de Neighbor-joining. El gen ADNr 16S de <i>Xanthomonas</i> sp. JQ307187.1 fue usado como grupo externo. Las bandas del gen <i>amoA</i> son: A1, A2 aisladas de S1, S2 y S3; A3 de S2 y S3; del gen <i>pmoA</i> : P1, P3 y P4 de S1, S2 y S3; P2 de S1.....	54
Figura 16-3 Dendrograma de los fragmentos del gen <i>narG</i> . Comparación de secuencias de TGGE y secuencias tomadas del <i>GenBank</i> . Las distancias filogenéticas se determinaron por el análisis de Neighbor-joining. El gen ADNr 16S de <i>Xanthomonas</i> sp. JQ307187.1 fue usado como grupo externo. Las bandas del gen <i>narG</i> son: narG1, narG2, narG3 y narG4 aisladas de S1, S2. En S3 sólo se observa narG4.....	55
Figura 16-4 Dendrograma de los fragmentos del gen <i>nosZ</i> . Comparación de secuencias de TGGE y secuencias tomadas del <i>GenBank</i> . Las distancias filogenéticas se determinaron por el análisis de Neighbor-joining. El gen ADNr 16S de <i>Xanthomonas</i> sp. JQ307187.1 se utilizó como grupo externo. La banda del gen <i>nosZ</i> es Z1 aislada de S1, S2 y S3.....	56
Figura 16-5 Dendrograma de los fragmentos del gen <i>hzoA</i> . Comparación de secuencias de TGGE y secuencias tomadas del <i>GenBank</i> . Las distancias filogenéticas se determinaron por el análisis de Neighbor-joining. El gen ADNr 16S de <i>Xanthomonas</i> sp. JQ307187.1 fue utilizado como grupo externo. Las bandas del gen <i>hzoA</i> son: Anamx1 y Anamx2, aisladas sólo de S1.....	57
Figura 16-6 Propuesta de una posible dinámica del nitrógeno y función microbiana en el ex lago de Texcoco.	58
Figura 21-1 Diagrama de flujo y dinámica del nitrógeno en un suelo tipo molisol y el suelo salino sódico del ex lago de Texcoco. Las anchuras de las flechas representan aproximadamente las tasas relativas de los procesos.	68
Figura 21-2 Dinámica del nitrógeno y su función microbiana en el suelo salino sódico del ex lago de Texcoco. Las anchuras de las flechas representan aproximadamente las tasas relativas de los procesos.	69

RESUMEN

El antiguo lago salado de Texcoco, ubicado al noreste de la ciudad de México, a partir de su desecación se convirtió en un problema ambiental. El antiguo lecho lacustre se mantuvo sin vegetación, por lo cual se generaban tolvaneras en época de estiaje que azotaban a la ciudad de México contaminando el aire, lo cual implicaba severos problemas de salud pública. El suelo salino alcalino con valores de pH entre 9 y 10.5, y con conductividad eléctrica de 132 dS m⁻¹ impide el crecimiento de las plantas. Hace casi treinta años, la Comisión Nacional del Agua instaló un sistema de drenaje y comenzó un programa de forestación. El objetivo era evitar la erosión eólica y por lo tanto la dispersión de patógenos y partículas. Sin embargo el suelo de Texcoco es pobre en nitrógeno, por lo tanto se requiere la aplicación de fertilizantes nitrogenados para estimular el crecimiento de las plantas. Los fertilizantes orgánicos, tales como los biosólidos anaerobios generados a partir de un tratamiento de aguas residuales, sería ideal para aplicar al suelo. Los biosólidos anaeróbicos son ricos en nutrientes, especialmente nitrógeno y materia orgánica, lo que mejoraría la estructura del suelo y estimularía el crecimiento de las plantas.

El presente trabajo tuvo como finalidad probar la factibilidad de disponer biosólidos anaerobios y estudiar su efecto sobre el ciclo del nitrógeno en este ecosistema extremo salino sódico. En microcosmos aerobios, la dinámica del nitrógeno se realizó mediante el seguimiento del nitrógeno proteico, amonio, amoniaco, nitrito y nitrato durante 90 días con dos variantes consecutivas. En el primer experimento después de la disposición de tres diferentes cantidades de biosólido, resaltó que la disposición de nitrógeno resulta en un proceso de nitrificación bajo y una tasa muy elevada de pérdida de nitrógeno por volatilización de amoniaco. Este fenómeno se confirmó en el tercer experimento con disposición de biosólido en suelos con tres distintas salinidades, en donde sin importar el gradiente de salinidad que exista en este ambiente extremo, la volatilización es alta y proporcional a este mismo gradiente, en relación directa con el pH alcalino del suelo. En el segundo experimento, se determinó la dinámica microbiana mediante la técnica de RISA (*rDNA internal spacer analysis*) después de la disposición de tres diferentes cantidades de biosólido. Se observó una clara distinción entre los microorganismos del biosólido y los nativos del suelo. Además, la supervivencia de los microorganismos exógenos es corta debido a las condiciones adversas del suelo. El tiempo varía en función de la cantidad de biosólido dispuesto. El cuarto experimento consistió en un estudio preliminar de la diversidad funcional mediante la presencia de los genes de función que codifican para las enzimas de la nitrificación (enzima específica: gen *amoA*; enzima no específica: gen *pmoA*, gen específico para la oxidación del metano), de la desnitrificación (genes *narG*, *nosZ*) y de la oxidación anaerobia del amonio, ANAMMOX (gen *hzoA*) en suelos con diferentes salinidades. Se detectó la presencia de microorganismos nitrificantes de los dominios Bacteria y Archaea. También se reveló la presencia de bacterias principalmente de origen halófilico participantes en la oxidación anaerobia del amonio y la desnitrificación, lo cual se puede relacionar con una posible pérdida del nitrógeno por estos dos procesos bioquímicos. Por lo tanto la disposición de biosólido en el suelo del ex lago de Texcoco representa una técnica poca factible por los altos niveles de pérdida del nitrógeno principalmente por volatilización.

ABSTRACT

The ancient salt lake of Texcoco, located to the northeast of Mexico City, became an environmental problem after its drainage. Dust storms, which caused severe health problems in Mexico City, were formed regularly in the dry season as the former lake bed remained mostly bare. The alkaline saline soil with pH between 9 and 10.5 and electrolytic conductivity (EC) 132 dS m⁻¹ prevented plant growth. Nearly thirty years ago, 'Comisión Nacional de Agua' installed a drainage system and started a forestation program. The aim was to prevent wind erosion and the dispersion of pathogens and particles. The soil of Texcoco, however, was N depleted, so N fertilizer applications were required to stimulate plant growth. Organic fertilizer, such as anaerobic biosolids generated from a wastewater treatment, would be ideal to apply to soil. Anaerobic biosolids are rich in nutrients, especially N, and organic material, which would improve soil structure and stimulate plant growth.

This study aimed to test the feasibility of anaerobic biosolids disposal in soil of the former lake Texcoco and study its effect on nitrogen cycling in this alkaline saline ecosystem. Dynamics of mineral nitrogen (ammonium, ammonia, nitrite and nitrate) were monitored in an aerobic incubation for 90 days. In the first experiment, it was found that the nitrification rate was low and large amounts of mineral N (NH₃) volatilized. In an additional experiment, NH₃ volatilization was found to be closely related to soil pH. In the second experiment, dynamics of the microbial population were determined by the RISA (rDNA internal spacer analysis) technique. There was a clear distinction between the microorganisms in the biosolids and the native soil. The survival of the exogenous microorganisms was short due to the adverse soil conditions (high pH and EC), but dependent on the amount of biosolids applied. The third experiment, investigated the functional diversity of the soil through the presence of genes encoding for the nitrification enzymes (specific gene *amoA* of nitrification, and the non-specific enzyme of nitrification: gene *pmoA*, the gene specific for the oxidation of methane), the denitrification (genes *narG*, *nosZ*) and the anaerobic oxidation of ammonium ANAMMOX (*hzxA* gene) in soils with different salinities. Nitrifying microorganisms were detected belonging to the domains Bacteria and Archaea. Halophilic bacteria were detected that participated in the anaerobic oxidation of ammonia and the denitrification process. It can be concluded that the application of biosolids to soil of the former lake Texcoco is not a feasible option as large amounts of mineral N were lost through N-volatilization.

INTRODUCCIÓN

Cuando hablamos del suelo casi siempre nos detenemos a pensar en él como un soporte mecánico o un suelo edáfico que tiene la capacidad de producción botánica, agrícola o ganadera, tal vez lo consideramos como el resultado de un ecosistema dado. Sin embargo, pocas veces pensamos en el suelo como parte de un proceso que involucra al planeta mismo y como la razón primordial de la existencia de la vida misma, su aparición, sostén y evolución. Nuestro planeta Tierra está compuesto por un cuerpo esencialmente sólido (rocoso), con un pequeño núcleo de elementos principalmente metálicos y metaloides, posee una corteza superficial que cuenta con la cobertura de una atmosfera de volátiles enriquecida con nitrógeno, oxígeno, argón, monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxido nítrico, que permiten las condiciones idóneas de temperatura. Es vital la presencia de una hidrosfera la cual se cree fue adquirida por colisiones de cometas que trajeron el agua a la Tierra. Otros fenómenos importantes a considerar en esta conjunción de eventos en la formación del suelo son el escudo gravitacional, así como el tamaño y composición de nuestro satélite natural, la Luna. Finalmente, la Tierra se ubica a una distancia del Sol que le permite ser habitable, es decir que recibe la cantidad de energía suficiente (energía solar susceptible de ser transformada de calórica en cinética y, por vía fotosintética, pasar de energía fotónica a bioquímica) para generar la dinámica y evolución física y química de los minerales que permitió la aparición de la biosfera en toda su complejidad y diversidad (Gaidos et al., 2005; Luque et al., 2009).

La Tierra desde su inicio ha tenido una evolución geoquímica que la distingue de los demás planetas de nuestro sistema solar; desde la aparición de la vida, esa consecución evolutiva particular se ha hecho aún más compleja, generando sobre la corteza terrestre distintos tipos de suelo que condicionan y definen los ecosistemas que conforman la biosfera. Es así que desde la creación de la atmosfera primaria, su enfriamiento y el origen de la vida hasta la actualidad la Tierra ha cambiado mucho, pasando de una condición atmosférica reductora (que consideramos extrema para los estándares de la vida como hoy la conocemos) a una oxidante. Sin embargo, entre ambos extremos de la historia terrestre se presentan ambientes extremos que mantienen condiciones físicas, químicas y biológicas que las hacen únicas en su relación con los demás sistemas conocidos como modelos estándar de la vida geológica vigente (Gaidos et al., 2005; Luque et al., 2009). El concepto actual de un ambiente extremo es aquel que se relaciona con las condiciones físicas, químicas y biológicas que son hostiles a la adaptación de la vida antropogénica; o bien que esta limitada principalmente a la vida procariota y unos tantos protozoos, algas y hongos (Canganella y Wiegell, 2011). Por lo tanto, el suelo es la síntesis de una compleja interacción dinámica de fenómenos abióticos y bióticos; su mera existencia es la prueba de la dinámica evolutiva de nuestro planeta y en conjunto con el agua y la atmosfera, son un recurso vital que debe ser reconsiderado para un mejor manejo, conservación y uso.

Si se ha equiparado a la Tierra como una nave espacial anclada en nuestro sistema solar, a la vida como algo más que la suma de factores físicos y químicos, entonces el suelo es la maquinaria (*hardware*) inteligente (*software*) que mantiene nuestro viaje por el espacio en condiciones de confort. Es más que un solo soporte mecánico, pues es almacén de nutrientes, los recicla y mantiene en condiciones de disponibilidad óptima, y a veces de reserva, es un filtro y reservorio de agua, permite la acumulación y liberación controlada de ciertos compuestos tóxicos, o bien facilita su encapsulamiento, inactivación o atenuación. Es el habitáculo permanente de la mayoría de las especies del planeta, y define aún a aquellas que pareciera no tienen relación directa con el suelo (parásitos, plancton, microorganismos de ciclos rápidos y cortos, aéreos o acuáticos). Esta concepción genérica es una caja negra que en sus distintos compartimentos de estudio hace referencia a los ciclos biogeoquímicos y microorganismos autóctonos como la constitución congénita de cada suelo. Es decir, habla de los flujos de energía y materia que definen a cada ecosistema. Es aquí en donde surgen algunas preguntas *¿el movimiento de estos ciclos es siempre igual en todos los suelos?, ¿los microorganismos se encuentran y actúan por igual en todos los suelos? Y, cuando un suelo es diferente, ¿los microorganismos que viven en él son los mismos o cambian, y por lo tanto su función también?, ¿qué hace a un suelo diferente? o ¿se puede medir el grado de similitud entre un suelo y otro?, ¿también se puede evaluar su función microbiana?, ¿se puede equiparar el funcionamiento de los suelos con los flujos de energía?*

Estas y otras preguntas han sido abordadas, pero si nos enfocamos en saber *¿cuándo un suelo es diferente?*, encontraremos que una diferencia importante y fácil de reconocer resulta de aquellos suelos que soportan y definen a los ambientes que llamamos extremófilos.

Dentro de este contexto, el ex lago de Texcoco es un ambiente que se puede distinguir como un ambiente extremófilo salino sódico, y al mismo tiempo se discute si es también un ambiente oligotrófico (por su baja disponibilidad de nutrientes – por accesibilidad al nitrógeno –) (Beltrán-Hernández et al., 1999; Landwehr et al., 2002; Dong et al., 2006). Este sitio ha transitado el cambio de uso de suelo en un periodo menor a los cien años, razón por la cual ha sufrido un proceso de adecuación por eventos selectivos, en forma radical. En el momento que se decretó desecar el cuerpo de agua del ex lago de Texcoco, es decir pasar de un lecho lacustre a un suelo expuesto, este cambio de uso de suelo provocó un problema ambiental con efectos para la salud pública y ambiental tan evidente que no pudo ser indiferente a las políticas de manejo de los recursos en el Valle de México (Jazcilevich et al., 2003). La primera respuesta del gobierno a la desecación fue cubrir el suelo expuesto a la erosión eólica, mediante la reforestación del sitio, ya que las tolvaneras generaban complicaciones para la vida en la ciudad de México. El programa de reforestación ha sido exitoso después de más de 30 años de labor continua (Cruickshank, 1999). Sin embargo, las condiciones abióticas extremas imperantes en este ambiente hacen que los logros del programa de rescate de la zona federal del ex lago de Texcoco resulten vulnerables, pues son completamente dependientes de las actividades antropogénicas. Por ello, es primordial conocer más acerca de la dinámica del nitrógeno y carbono en dicho enclave, con el fin de encender una luz al conocimiento de estos ambientes extremófilos que ayude a mejorar las políticas de manejo de los recursos naturales.

El presente trabajo se enmarca en un contexto histórico de la ciudad de México (década de los noventa), cuando se planteó la necesidad de la construcción y puesta en marcha de una mega planta de tratamiento de aguas residuales que daría servicio a la ciudad y parte del área

metropolitana (hoy se encuentra en construcción en la comunidad de Atotonilco, Hidalgo). La operación generaría biosólidos que serían dispuestos sobre la superficie del ex lago para proveer nutrientes que se creía acelerarían el proceso de reforestación de los suelos salinos expuestos y de este modo aliviar los problemas para la salud pública y ambiental que esto representaba. Nuestra propuesta fue estudiar las condiciones de la dinámica del carbono y del nitrógeno en dichos suelos, considerando la microbiota nativa implicada en el flujo biogeoquímico de la materia en un ambiente extremo. Las condiciones fisicoquímicas del suelo en relación directa con la presencia de vegetación, la humedad y la temperatura ambiental, así como la precipitación pluvial resultan en una gran variabilidad tempo-espacial de la salinidad en suelo con pH alcalino de 9 a 10.5 (Fernández-Buces et al., 2006). Por lo tanto, es importante definir la concentración más adecuada de nitrógeno contenido en el biosólido, con el fin de concretar la tasa de disposición del biosólido que responda a las necesidades de la cobertura vegetal. Y también definir la dinámica del nitrógeno en función de varias salinidades del ex lago de Texcoco, que permitan predecir un método de disposición de nitrógeno en el tiempo y espacio requerido.

MARCO TEÓRICO

1. El suelo como soporte de los ambientes extremos

Un ambiente extremo es aquel que se relaciona con las condiciones físicas, químicas y biológicas que son hostiles a la adaptación de la vida antropogénica; o bien que esta limitada principalmente a la vida procariota y unos tantos protozoos, algas y hongos (Canganella y Wiegel, 2011). Los ambientes extremófilos están íntimamente ligados a los suelos que se adaptan y mantienen su extraordinario funcionamiento. Una característica distintiva es que los flujos de energía (compuestos orgánicos, temperatura, UV, etc.) son diferentes en estos ambientes y pueden ser considerados improductivos, de baja productividad o con alta acumulación de energía, pero de difícil disponibilidad (Napolitano y Shain, 2004; Stetter, 2006; Ohki et al., 2011). Una primera consideración importante es que los microorganismos son los habitantes comunes en los ambientes extremos, que no están allí en condiciones de supervivencia, sino más bien en condiciones óptimas de adaptación de sus ciclos de vida. Recordemos que Archaea y Bacteria son los primeros habitantes de la Tierra y que al remontarnos al origen de la vida las condiciones ambientales eran extremas para la vida de hoy, pero estándar para estos organismos ancestrales (Martin y Russell, 2003; Mesbah y Wiegel, 2008).

Los ambientes extremos se caracterizan porque más de un parámetro se encuentra en valores excepcionalmente por debajo o por encima de los valores que denominamos estándar: por lo tanto su punto de equilibrio y de función es diferente, es extremo. Entre los parámetros físicos podemos enumerar la radiación, temperatura y presión, algunos otros de tipo geoquímico, como la desecación, salinidad, pH, concentración de oxígeno y potencial redox. También se pueden enumerar algunos parámetros de tipo biológico, como déficit nutricional, densidad poblacional, parásitos o depredadores. Respecto a los habitantes autóctonos de estos ambientes, simplemente los llamamos extremófilos. Los microorganismos extremófilos unicelulares de los dominios Bacteria y Archaea (procariontes) son los habitantes ancestrales que aún en nuestros días habitan en las condiciones más extremas del planeta, en donde se combinan alta presión, baja disponibilidad de alimento y altísimas temperaturas, entre otros. Sin embargo, podemos encontrar especies extremófilas ampliamente representadas en todos los niveles organizacionales del dominio Eukarya. Es común encontrar ambientes extremos que tienen un tiempo geológico de existencia considerable, razón que nos permite reconocer los procesos evolutivos de adaptación poliextremófila de los distintos organismos que les confieren las aptitudes ideales para sobreponerse a las condiciones restrictivas que les impone el medio en donde se han establecido. Como es de esperarse, la clasificación de estos organismos extremófilos nos permite rápidamente reconocerlos por las características más distintivas del ambiente extremo en donde viven, de tal modo que es fácil denominarlos como acidófilos, barófilos, halófilos, xerófilos, psicrofilos o hipertermófilos (Mesbah y Wiegel, 2008; Williams y Hallsworth 2009; Amato y Christner 2009; Chakkiath et al., 2010).

En el suelo, las condiciones de habitabilidad pueden ser muy restrictivas por ser medios inundados con poca disponibilidad de materia orgánica, alta concentración de metales pesados y un *pH* ambiental de 1 a 3; tal es el caso de suelos con drenajes de algunas minas de

hierro (Aliaga Goltsman et al., 2009; Huang et al., 2011); o por el contrario, la desecación, alta incidencia solar (radiación), alcalinidad elevada y altas concentraciones de sal dan lugar a suelos secos o con cuerpos acuáticos salinos magnésicos o sódicos. Sumado a esto, se puede hablar de un parámetro adicional como la falta de disponibilidad de materia orgánica, sea por carecer de ella o porque aún a pesar de su abundancia en hidratos de carbono ésta no es disponible por la carencia de nitrógeno y fósforo (Dong et al., 2006). Sistemas semejantes reciben el nombre de ambientes oligotróficos. Es común que los sistemas oligotróficos sean marcados como ambientes “disfuncionales” porque se relaciona a una baja productividad primaria y baja diversidad de especies (Brauer et al., 2012). Sin embargo, aunque su condición no siempre es extrema, bajo ciertas condiciones pueden ser denominados extremófilos.

Existen microorganismos que pueden sobrevivir en condiciones de baja osmolaridad, como ambientes de agua destilada y embotellada para beber (ambientes oligotróficos) (Duranceau et al., 2012). Sin embargo, los ambientes de alta osmolaridad nos refieren a la osmofilia, característica de los microorganismos que son capaces de vivir en condiciones óptimas en ambientes de altas concentraciones de sal, especialmente la presión de la tensión hídrica, la deshidratación celular y la desecación. Los halófilos son organismos con distintos requerimientos iónicos para la vida en ambientes con altas concentraciones de sal. Son aspectos fisiológicamente distintos, pero ambientalmente similares (Luque et al., 2009). En el presente trabajo, es este grupo específico de microorganismos halófilos-osmófilos los que nos ocupan por sus características de adaptabilidad y función ecológica en el suelo salino sódico del ex - lago de Texcoco.

1.1. Salinización

Este fenómeno se relaciona con zonas áridas y semiáridas, zonas costeras y mantos freáticos con sales solubles. La fuente de estas sales es diversa, pero en cierto modo la fuente primordial son los minerales primarios del suelo y los productos de la intemperización de rocas expuestas, mediante procesos químicos: hidrólisis, hidratación, disolución, formación de arcillas, oxidación y reducción (FitzPatrick, 1987). Las principales sales solubles en suelos consisten en cationes de sodio (Na^+), calcio (Ca^{2+}), y magnesio (Mg^{2+}), y de aniones de cloruro (Cl^-) y sulfato (SO_4^{2-}); el catión potasio (K^+) y los aniones carbonato (CO_3^{2-}), bicarbonato (HCO_3^-), y nitrato (NO_3^-) se encuentran generalmente en concentraciones menores (Richards, 1963). Una razón es que estos iones son altamente solubles en agua, a diferencia de sus formas compuestas por ejemplo el yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). La acumulación y concentración de sales puede también favorecerse por el transporte en solución, transporte eólico en la brisa marina, problemas de drenaje, e irrigación de aguas salobres o de mala calidad que se agravan por los procesos de evaporación y transpiración. Sin embargo, el fenómeno más importante es la precipitación pluvial anual insuficiente para lixiviar los suelos y que los mantos freáticos se localicen a poca profundidad, en donde la humedad asciende a la superficie llevando con ella sales que se quedan en este sitio tras evaporarse la humedad (Richards, 1963; FitzPatrick, 1987; Aguirre, 1993).

Dependiendo de la concentración de cationes en los suelos, y con base en el pH de los mismos, los suelos pueden ser definidos de la siguiente forma (Tabla 1-1).

Tabla 1-1 Tipos de suelos basados sobre sus valores de pH (Tan, 2000).

Reacción del suelo	pH
Ligeramente alcalino	7.0 ó 8.0
Moderadamente alcalino	8.0 ó 9.0
Fuertemente alcalino	9.0 ó 10.0
Muy fuertemente alcalino	10.0 ó 11.0

Sin embargo, para poder tomar en cuenta las variaciones en la proporción de los iones presentes (en particular la de aniones) se usa también un sistema ternario en el que se toman en cuenta las coordenadas con los porcentajes de cloruros, sulfatos, carbonatos y bicarbonatos (Figura 1-1).

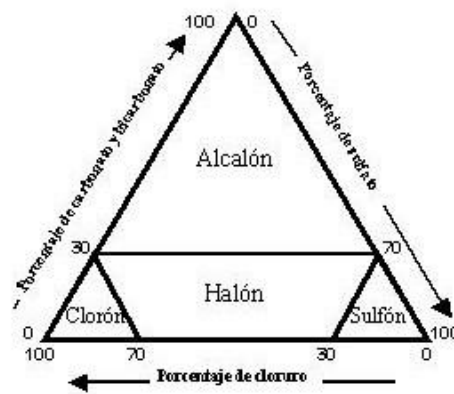


Figura 1-1 Sistema ternario de aniones (FitzPatrick, 1987)

En estos suelos la vegetación principal son plantas halófilas en diversos grados. La acumulación de sales en los suelos provoca una alta heterogeneidad espacial, que puede a su vez ocasionar la aparición de costras de sales y de manchones de cobertura vegetal (FitzPatrick, 1987; Aguirre, 1993).

Esta limitante al potencial edáfico del suelo se debe, primero, a la perturbación de los procesos de asimilación de agua y nutrientes por las plantas, debido al efecto osmótico causado por la concentración total de las sales y a la poca disponibilidad de nutrientes causada por las desfavorables relaciones iónicas y, segundo, por los efectos causados por la estructura del suelo, principalmente los suelos no-salinos sódicos, los cuales tienden a exhibir condiciones físicas muy desfavorables a bajos niveles electrolíticos. Si el contenido de arcillas es alto, el suelo muestra propiedades de expansión-contracción excesivas al humectarse y secarse, las propiedades de drenaje y aireación propician problemas para el asentamiento de plantas (Richards, 1963; FitzPatrick, 1987; Aguirre, 1993).

1.2. Sodicación

La sodicación es un proceso que conduce al incremento en las relaciones $\text{Ca}, \text{Na}^+/\text{CO}_3^{2-}$ y $\text{Ca}, \text{Na}/\text{CO}_3^{3-}$, con el riesgo de una reducción en la estabilidad estructural o de dispersión del material arcilloso. Este fenómeno conduce a la expansión y dispersión de las arcillas, debidas a una concentración progresiva de las sales y al incremento en la cantidad de Na^+ intercambiable. Existen dos procesos por los cuales se puede llegar a este fenómeno: el

primero ocurre en un suelo no salino, que es salinizado por sodio (aporte de Na por aporte hídrico u eólico). A medida que se acumula el sodio, se incrementa el contenido de cationes de Na⁺ intercambiable, pero al mismo tiempo las altas concentraciones de sales disueltas favorecen el remplazamiento de los cationes divalentes intercambiables generando un suelo sódico. El segundo proceso resulta de un aporte relativamente bajo de sodio (condiciones biogeoquímicas de su formación incluye material rocoso rico en sodio y pobre en calcio y magnesio), pero que ocurre en un suelo alcalino con una alta tasa de evaporación y pocos cationes divalentes. En la práctica, la alcalinidad y los cationes divalentes están representados principalmente por los iones HCO₃⁻ y por el Ca²⁺, respectivamente. Por lo cual después de la evaporación de una solución con alcalinidad residual $[HCO_3^-] - 2[Ca^{2+}] > 0$, el CaCO₃ precipita hasta que la mayor parte del Ca²⁺ disuelto desaparece, mientras que el NaHCO₃ y el Na₂CO₃ son acumulados en la solución. El aumento en las concentraciones de bicarbonato y carbonatos disueltos incrementan aun más la precipitación del CaCO₃, promoviendo el remplazamiento más efectivo del Ca²⁺ intercambiable por Na⁺ y provocándose la sodicación del suelo (Aguirre, 1993; Sorokin y Kuenen, 2005). En la Tabla 1-2 se muestra la clasificación de suelos salinos y sódicos.

Tabla 1-2 Tipos de suelos basados sobre sus valores salinidad y alcalinidad (FitzPatrick, 1987).

Grado de salinidad	Conductividad Eléctrica (CE) mmhos cm-1	Grado de alcalinidad	Porcentaje de Na⁺ (%) intercambiable
Ligeramente salino	2 - 4	Ligeramente alcalino	menos del 20
Moderadamente salino	4 - 8	Moderadamente alcalino	20 -50
Fuertemente salino	8 - 15	Fuertemente alcalino	más del 50
Muy fuertemente salino	mayor a 15		

En forma natural los sistemas de suelos salinos y salinos sódicos (pH ≥ 11.5) se encuentran distribuidos en todo nuestro planeta, siendo además ecosistemas muy estables a lo largo del tiempo. Los lagos sódicos son los más abundantes y, por consecuencia, los más estudiados, como lo reportan Baumgarte (2003) y Sorokin y colaboradores (2011) (Tabla 1-3):

Tabla 1-3 Distribución mundial de lagos y desiertos sódicos
(Adaptado de Baumgarte, 2003 y Sorokin et al., 2011).

Localización	Lagos y desiertos
América	
Canadá	Manito
Estados Unidos	Alcali Valley, Albert Lake, Lake Leonore, Soap Lake, Big Soda Lake, Owens Lake, Mono Lake, Searles Lake, Deep Springs, Rhodes Marsch, Harney Lake, Summer Lake, Surprise Valley, Pyramid Lake, Walter Lake.
México	Texcoco
Venezuela	Valle Lagunilla
Chile	Antofagasta
Europa	
Hungría	Lago Fehér
Yugoslavia	Pecena Slatina
Rusia	Kulunda Steppe, Sistema de lagos Tanatar, Karakul, Sistema de lagos Bitter, Araxes plain, Chita, Barnaul, Slavgerod, Lagos de Tuvá, Lago sódico Cock
Región rusa de Transbaikal	Lago Hilganta, Lago Hadyn, Ulan-Nor, Lago Norbunka
Asia	
Turquía	Van
India	Lago Looner, lago Sambhar
China	Qinhgai Hu, Sui-Yian, Heilungkiang, Kirin, Jehol, Chahar, Shansi, Shensi, Kansu
Tibet	Lago Soda
Noreste de Mongolia	Lago Hotontyn, Lago Shar-Burdiin, Dzun-Uldziit, Baga-Nur
Africa	
Libia	Lago Fezzan
Egipto	Lago Wadi Natrun, (lagos: Rozita, Beida, Gaar, Fazda, Zugm, Hamra, Umm-Risha y Khadra)
Etiopía	Lago Aranguadi, Lago Kilotes, Lago Abiata, Lago Shala, Lago Chilú, Lago Hertale, Lago Metahara
Sudán	Lagos Dariba
Kenia	Lago Bogoria, Lago Nakuru, Lago Elmentieta, Lago Magadi, Lago Simbi, Lago Sonachi, Lago Crater
Tanzania	Lago Natron, Lago Embagi, Lago Magad, Lago Manyara, Lago Balangida, Lago Basuto Crate, Lago Kusare, Lago Tulusia, El Kekhooito, Lagos Momela, Lago Lekandiro, Lago Reshitani, Lago Lgarya, Lago Ndotu, Lago Ruckwa North
Uganda	Lago Katwe, Lago Mahega, Lago Kikorongo, Lago Nyamunuka, Lago Munyanayange
Chad	Lago Bodu, Lago Rombou, Lago Djikare, Lago Momboio, Lago Yoan
Australia	
	Lago Coranmagite, Lago Red Rock, Lago werowrap, Lago Chidnup

1.3. Procesos de degradación más importantes del suelo y potencial salinización

El fenómeno más destructivo del mundo natural es la erosión del suelo. Los procesos de degradación del suelo traen siempre consigo efectos dañinos sobre el bienestar de las poblaciones humanas. Y ha sido siempre un potencial desintegrador de asentamientos del hombre, provocados por la infertilidad y aridez. Es por causas antropogénicas que hoy

existen un mayor numero de suelos y ambientes alcalinos, salinos y sódicos. Los procesos de degradación más importantes del suelo pueden enumerarse como sigue a continuación (Brady y Weil, 1996):

1. Erosión
 - Hídrica
 - Eólica
2. Salinización
 - Cuenca endorreica
 - Manto freático muy somero
 - Riego
 - Aplicación de fertilizantes
 - Brisa marina e invasión de aguas de mar
3. Pérdida de materia orgánica
4. Sellamiento de la superficie
5. Contaminación
 - Hidrocarburos
 - Pesticidas
 - Materia orgánica (aguas de granja o industria alimenticia)
 - Dioxinas, óxidos de nitrógeno, de sulfuro, PCB, CFC
 - Metales
6. Compactación

2. Ecología microbiana de suelos salino-sódicos: características estructurales y funcionales

Los microorganismos hipersalinos son aquellos que se desarrollan exitosamente en los ambientes hipersalinos, casi cercanos al punto de saturación para llevar a cabo su metabolismo y un pH óptimo de 10 o más (Atlas y Bartha, 2002). Para definir un valor elevado de concentración salina es aceptado marcar como límite mínimo de requerimiento una concentración de 1.5 M (alrededor de 9%) para que un organismo pueda crecer, aunque la gran mayoría de las especies requiere concentraciones de 2-4 M de NaCl (12-23%) para su crecimiento óptimo. En la naturaleza, todos los halófilos extremos requieren concentraciones de 5.5 M de NaCl (32%, el límite de saturación), aun cuando a estos niveles los microorganismos tienen un crecimiento muy lento (Mesbah y Wiegel, 2008). Cabe mencionar que en estos ambientes extremos se encuentran aún bacterias halotolerantes, las cuales toleran las concentraciones elevadas de sal (Li et al., 2008; Alcántara-Hernández et al., 2009; Sorokin et al., 2011).

Las Archaeas halófilas extremas y las alcalófilas, que requieren concentraciones muy elevadas de sal, se encuentran representados en gran número en estos ambientes y juegan un rol muy importante en muchos de los procesos biológicos que se llevan a cabo en ellos, siendo responsables en gran numero de reacciones bioquímicas vitales para la vida y crecimiento de las plantas. Uno de los efectos más importantes es su papel en el flujo y dinámica de los ciclos biogeoquímicos, ya que poseen gran parte de las herramientas bioquímicas que controlan la

totalidad del comportamiento del ecosistema al ser microorganismos únicos de alta diversidad metabólica y gran diversidad de asociaciones químicas (función) con la matriz en donde interaccionan (Tan, 2000; Luna-Guido y Dendooven, 2001; Jellison, 2005; Nicol et al., 2008).

Un ejemplo de hábitat hipersalino es el de las salinas marinas o charcas de evaporación lagunas que se llenan con agua de mar para favorecer la evaporación y la concentración de sales de valor comercial como el NaCl. En ellas es particular la aparición de los halófilos extremos: conforme la salina va adquiriendo el nivel mínimo de salinidad para los halófilos extremos, esta va adquiriendo una tonalidad rojiza que señala la presencia masiva de arqueas halófilas. Este mismo fenómeno ocurre en el ex lago de Texcoco dentro de los charcos presentes durante el periodo de sequía, así como a nivel del caracol usado antiguamente para la explotación de la sal. Esta coloración es debida a la presencia de carotenoides y pigmentos propios de estas procariontes halófilas estrictas. Por lo tanto, durante esta concentración de sal, se separarán ecológicamente las procariontes halófilas estrictas de las halotolerantes. Las halófilas extremas también se han aislado a partir de alimentos salados, como salchichas, salazones y otros embutidos de cerdo (Grant y Tindall, 1986; Madigan et al., 2004; Luque et al., 2009).

2.1. Taxonomía y morfología de las bacterias halotolerantes

Estas bacterias crecen de manera óptima en ambientes con 3 a 15% de NaCl, clasificados como ligeramente salino. Aunque las arqueas halófilas pertenecen al mismo *Orden* Halobacteriales, las bacterias halotolerantes con algunas halófilas estrictas representan un grupo heterogéneo que taxonomica- y morfológicamente está bien representado en los hábitats salinos (Garabito et al., 1997). Dicho grupo incluye microorganismos *Gram* positivos y *Gram* negativos, como se presenta en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1 Clasificación de varias bacterias halotolerantes y/o halófilas, alcalófilas en base a la clasificación propuesta en el Manual Bergey de Holt y Krieg (1989).

Phylum	Sección/Clase	Género	Especie	Ref.	
Gram + de bajo contenido en G+C	Sección 13, bacilos formadores de endosporas	<i>Bacillus</i>	<i>B. halophilus</i> , <i>B. salexigens</i> , <i>B. marinus</i> , <i>B. cohnii</i>	Garabito et al., 1997; Martins et al., 2001	
		<i>Halobacillus</i>	<i>H. litoralis</i> , <i>H. trueperi</i>	Garabito et al., 1997 Onstott et al., 2009	
	Sección 12, cocos	<i>Halothiobacillus</i>			
		<i>Nesterenkonia</i>	<i>N. halobia</i>	Martins et al., 2001	
Gram + de alto contenido en G+C	Clase Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	<i>M. halobius</i>	Martins et al., 2001	
		<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acnes</i>	Yakimov et al., 2002	
		<i>Actinopolyspira</i>	<i>A. halophila</i>	Antón et al., 2000	
		<i>Nocardiosis</i>	<i>N. quinghaiensis</i> sp. nov. <i>N. alkalitolerans</i>	Chen et al., 2008	
Proteobacteria (Gram -)		<i>Roseinatronobacter</i>	<i>R. thiooxidans</i> cepa AHO 1	Sorokin et al., 2000b	
		<i>Nitrobacter</i>	<i>N. alkalicus</i> sp. nov.	Sorokin et al., 1998	
		<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. marina</i> , <i>N. halophila</i> , ¹ <i>N. eutropha</i> , ¹ <i>N. europea</i> , cepa env.S003 (¹ <i>N. cryotolerans</i>)	Ward et al., 2000; Yakimov et al., 2002	
		<i>Halomonas</i> ²	<i>H. denitrificans</i> , <i>H. magadii</i> , <i>H. desiderata</i> <i>H. korlensis</i> sp. nov.	Kim et al., 2007 Li et al., 2008	
		<i>Methylomicrobium</i>	Cepa AMO1 (¹ <i>M. pelagicum</i>), <i>M. alcaliphilum</i>	Sorokin et al., 2000a; Yakimov et al., 2002 ; Kalyuzhnaya et al., 2008	
		<i>Pseudomonas</i>	<i>P. gessardii</i>	Yakimov et al., 2002	
		<i>Thioalkalimicrobium</i> ²	<i>T. aerophilum</i> , <i>T. sibiricum</i>	Sorokin et al., 2001	
		<i>Thioalkalivibrio</i> ²	<i>T. nitratis</i> , <i>T. versutus</i> , <i>T. denitrificans</i>	Sorokin et al., 2001	
		<i>Fundibacter</i>	<i>F. jadensis</i>	Yakimov et al., 2002	
		<i>Marinobacter</i>	<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	Yakimov et al., 2002	
		<i>Ectothirhodospira</i>	<i>E. haloalkaliphila</i> , <i>E. mobilis</i> , <i>E. halophila</i> <i>F. maritimus</i>	Grant y Tindall, 1986 Yakimov et al., 2002	
		Bacteroidetes (Gram -)	Cytophagia	<i>Flexibacter</i>	
Order II Incertae sedis	<i>Salinibacter</i> ²		<i>S. ruber</i>	Mongodin et al., 2005	
Firmicutes	Clostridia	<i>Halobacteroides</i> ²	<i>H. halobius</i>	Gales et al., 2011	
		<i>Halanaerocella</i> ²	<i>H. petrolelaria</i> gen. sp. nov.	Gales et al., 2011	
		<i>Halanaerobaculum</i> ²	<i>H. tunisiense</i> gen. sp. nov.	Hedi et al., 2009	

¹ de muy alta similitud con; ² halófilas estrictas

2.2. Taxonomía y morfología de las arqueas y bacterias halófilas estrictas

La supervivencia de estos microorganismos requiere de 32% de NaCl, el límite de saturación, grado de salinidad presentes ya en ambientes clasificados de moderado a muy fuertemente salino. Mediante la secuenciación del ácido ribonucleico ribosomal 16S, principalmente, y otros estudios se han definido 8 géneros en el dominio Archaea: *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Halobaculum*, *Natronobacterium* y *Natronococcus*. *Halobacterium* es el género más estudiado del grupo, pero *Natronobacterium* y *Natronococcus* se diferencian de los otros halófilos por ser más bien alcalofílicos y halofílicos. Para las natronobacterias su crecimiento óptimo se da a bajas concentraciones de Mg²⁺ y elevado pH, de 9-11 (Cytryn et al., 2000; Madigan et al., 2004; Cui et al., 2006). Dentro del dominio Bacteria, se encuentran varias bacterias halófilas estrictas, ubicadas en los géneros tal como *Nocardiopsis*, *Halomonas*, *Halobacteroides*, *Halanaerobaculum* y *Halanaerocella* (Tabla 2-1).

Las arqueas halófilas carecen de peptidoglicano en la pared celular, contienen lípidos unidos a éter, y poseen ARN polimerasas arqueanas. Son insensibles a la mayoría de los antibióticos y presentan las características clásicas de los representantes de este dominio (Madigan et al., 2004). Todas las arqueas halófilas son Gram negativas, se reproducen por fisión binaria y no forman esporas ni estructuras de reposo. La mayoría carecen de motilidad, aunque algunas cepas lo hacen ligeramente mediante flagelos lofotricos (grupos polares). La rareza genómica de *Halobacterium* y *Halococcus* estriba en la presencia frecuente de grandes plásmidos, que contienen hasta un 25-30% del ADN celular total, y cuyo porcentaje de GC (57-60%) es muy diferente al del ADN cromosómico (66-68%). El tamaño de los plásmidos es de los mayores que se conocen. Además de la gran cantidad de ADN no cromosómico, el genoma de *Halobacterium* contiene una elevada proporción de ADN repetitivo, cuya función se desconoce (Woese, 1987; Li et al., 2008; Onstott et al., 2009).

2.3. Fisiología de las bacterias halotolerantes

Provenientes de un grupo heterogéneo, las bacterias halotolerantes presentan diferentes metabolismos energéticos y carbonados: pueden ser quimiorganoheterotrofas, como es el caso de *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Roseinatronobacter*, o quimiolitautotrofas (organismo que utiliza compuestos inorgánicos como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono) como es el caso de *Nitrosomonas* o *Roseinatronobacter* (con el H₂), así como fotolitautotrofas (organismo capaz de utilizar la luz como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono) en el caso de *Ectrorhodospira* (Grant y Tindall, 1986; Garabito et al., 1997; Sorokin et al., 2000b; Yakimov et al., 2002). Dentro de las -proteobacterias se incluye la mayoría de las proteobacterias oligotróficas, aquellas que son capaces de crecer con niveles bajos de nutrientes, lo cual puede ser el caso de un medio extremo (Li et al., 2008). El metabolismo respiratorio de estas bacterias puede ser aerobio, anaerobio facultativo o anaerobio estricto, como por ejemplo *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Ectrorhodospira*, respectivamente (Grant y Tindall, 1986; Garabito et al., 1997; Yakimov et al., 2002).

2.4. Fisiología de las arqueas halófilas

Todas ellas son quimiorganoheterotrofas (organismo que utiliza compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono) y la mayoría de las especies aerobias obligadas. Casi todas las halobacterias usan aminoácidos o ácidos orgánicos como fuentes de energía y requieren de algunos factores de crecimiento (principalmente vitaminas) para un crecimiento óptimo.

Algunas especies de *Halobacterium* oxidan carbohidratos, aunque es una habilidad poco frecuente. La cadena de transporte de electrones, que contiene citocromos *a*, *b* y *c*, está presentes en *Halobacterium* y la energía se conserva durante el crecimiento aeróbico vía una fuerza protonmotriz que se origina a partir de un proceso quimiosmótico mediado por la membrana plasmática (Prescott et al., 2000; Nicol et al., 2008).

Algunas especies de halófilos extremos pueden generar ATP a partir de la excitación lumínica, sin intervención de los pigmentos clorofílicos. Esto es posible porque en condiciones de baja aireación sintetizan e insertan en su membrana una proteína llamada bacteriorrodopsina, con características muy semejantes a la del pigmento de la retina, la rodopsina. Esta bacteriorrodopsina combinada con otra molécula, el retinal, un carotenoide que absorbe la luz y que puede catalizar y transferir los protones a través de la membrana plasmática, provocan cambios de coloración en las células cuando existe poca aireación en el medio. La bacteriorrodopsina es de color púrpura (morado) y se inserta al azar en la superficie de la pared celular de *Halobacterium*, pasando ligeramente de tonos anaranjados a morado (Madigan et al., 2004; Mesbah y Wiegel, 2008).

La bacteriorrodopsina absorbe la luz fuertemente a 570 nm. La excitación de dicha molécula permite un transporte de protones, lo cual induce la síntesis de ATP. Es así como *Halobacterium* se puede mantener en desarrollo en condiciones anaeróbicas, en presencia de luz (Madigan et al., 2004; Mesbah y Wiegel, 2008).

3. Ciclo del nitrógeno

Como ya se mencionó anteriormente, la comunidad microbiana desempeña un papel fundamental dentro de los ciclos biogeoquímicos. Es soporte esencial en la transformación de los nutrientes a través de distintos procesos biológicos y químicos que permiten el desarrollo y crecimiento de plantas y animales de los niveles superiores de las redes tróficas. Gran parte de estos procesos bioquímicos consisten en reacciones de oxido-reducción que producen cambios en las características físicas y químicas de los nutrientes más importantes, como el carbono, nitrógeno, hierro y azufre. Entre los elementos más importantes esta el nitrógeno, cuyo ciclo incluye las reacciones bioquímicas de *fijación de nitrógeno*, *amonificación*, *nitrificación* y *desnitrificación*. Éste es parte esencial del ciclo de nutrientes, aun cuando en algún momento se encuentra estrechamente relacionado con la mineralización (Tan, 2000).

3.1. Generalidades

El nitrógeno en estado gaseoso (N_2) está en su forma termodinámicamente más estable en la naturaleza y es en este estado físico como predomina en la composición de la atmósfera terrestre (lo cual significa que ésta es el reservorio más importante de la tierra para la vida). El nitrógeno es un elemento esencial para la generación de las estructuras básicas en la formación de los organismos y se encuentra ligado, entre otros, al esqueleto carbonado de los aminoácidos. La capacidad para reciclarlo e involucrarlo en la cadena de los seres vivos reviste gran importancia ecológica, puesto que solamente un reducido grupo de microorganismos posee la capacidad de reducirlo en un proceso conocido como fijación de nitrógeno. Se requiere una gran cantidad de energía para poder romper el triple enlace $N\equiv N$ del nitrógeno molecular (Eisle y Kroneck, 2004). El ciclo biogeoquímico del nitrógeno depende en gran medida de la actividad de los microorganismos: la Figura 3-1 muestra un esquema general de los procesos que intervienen en el ciclo del nitrógeno. De esta forma el

nitrógeno se desplaza por los distintos ambientes acuáticos y terrestres, influyendo y determinando la diversidad productiva ecológica de los ambientes terrestres.

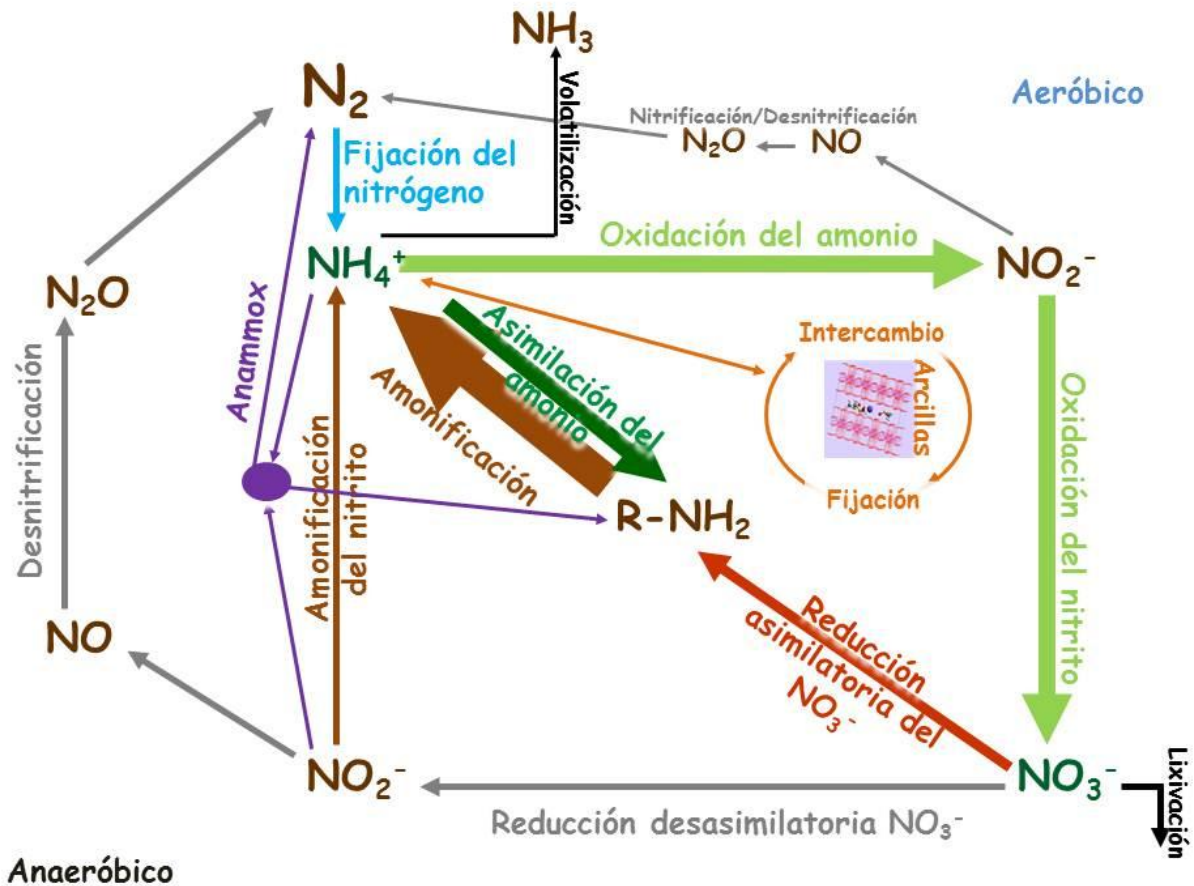
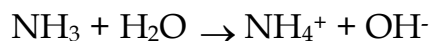
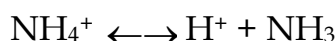


Figura 3-1 Esquema general del ciclo del nitrógeno. Las anchuras de las flechas representan aproximadamente las tasas relativas de los procesos (adaptado de Atlas y Bartha, 2002; Smith y Smith, 2002; Saricheewin et al., 2010).

Entre los procesos involucrados en el ciclo del nitrógeno, la nitrificación y desnitrificación, que nos ocupan en el presente trabajo, se encargan de movilizar el nitrógeno a través del ambiente terrestre y acuático hacia los organismos vivos o la atmósfera. No es un proceso directo: la nitrificación requiere dos fases intermedias y la desnitrificación depende de la nitrificación. El proceso anterior a la nitrificación, la amonificación, convierte el nitrógeno orgánico en amonio (NH_4^+) o amoníaco (NH_3). El nitrógeno de la materia muerta se encuentra principalmente en forma amino reducida y en ambientes acuáticos ácidos o neutros, como lo es el caso de los biosólidos producto de la digestión anaerobia, el amoníaco se encuentra en forma de iones de amonio y con ello accesible a los microorganismos y raíces de las plantas (Atlas y Bartha, 2002). Este efecto se explica por la siguiente reacción:



El incremento del amonio en solución depende de la presión parcial del gas amoníaco. Alta presión parcial conlleva un incremento del amonio en solución; baja presión parcial del gas amoníaco supone una baja concentración del amonio en solución. Esto puede ser aun más complejo: por ejemplo, en presencia de arcillas con cargas negativas, mayor cantidad de los iones amonio serán adsorbidos sobre la superficie de los complejos de arcillas, haciéndose intercambiables (Tan, 2000). Por otra parte, cuando el amoníaco producto de la amonificación se encuentra en ambientes alcalinos se pierde por volatilización hacia la atmósfera, de acuerdo a como se indica en la relación siguiente:



El valor pK_a de la reacción de disociación es de 9.26; cuando el medio está a un pH de 9.26 esta disociación se produce lo mismo en concentraciones de amoníaco y amonio (fenómeno que ocurre en los suelos alcalinos y sódicos, como es el caso de los suelos del ex-lago de Texcoco). El amoníaco que se precipita sobre todo el planeta se ha calculado entre 38 y 85 millones de toneladas por año (Tan, 2000; Atlas y Bartha, 2002). Condiciones de anoxia o la acidez en los suelos son también fuertes inhibidores de la nitrificación. También es posible que si se añaden al suelo materiales orgánicos ricos en proteínas como el estiércol, aguas residuales o biosólidos se aumente su tasa de nitrificación (Schwartzbrod, 1996; Fernandes et al., 1997; Payet et al., 1999; Madigan et al., 2004; Rojas-Oropeza et al., 2001).

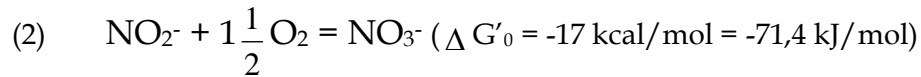
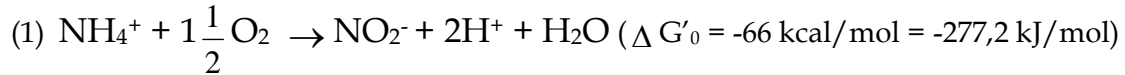
El nitrógeno se encuentra en varios estados de oxidación y existen dos estados del nitrógeno en los cuales es más fácilmente convertible, el amoníaco y el nitrato (Tabla 3-1). Se debe señalar que los iones de amonio son fácilmente asimilables por una gran variedad de plantas y microorganismos, que los incorporan rápidamente a sus aminoácidos y a otros compuestos bioquímicos nitrogenados. Además, los compuestos nitrogenados inorgánicos comúnmente usados como donadores de electrones son el amoníaco (NH_3) y el nitrito (NO_2^-), que se oxidan aeróbicamente por las bacterias nitrificantes, las cuales son quimiolitotrofas y están muy ampliamente distribuidas por el suelo y el agua. Este proceso se realiza en dos partes consecutivas, la primera se realiza por la oxidación del amoníaco a nitrito y es llevado a cabo por bacterias (uno de cuyos géneros representativos es *Nitrosomonas*). Un segundo grupo realiza la oxidación del nitrito a nitrato, llevado a cabo por un grupo en el que destaca el género *Nitrobacter*. La oxidación completa de nitrito a nitrato requiere en total la pérdida de ocho electrones (Madigan et al., 2004).

Tabla 3-1 Estados de oxidación de compuestos nitrogenados clave (Madigan et al., 2004)

Compuesto	Estado de Oxidación
Nitrógeno orgánico (R-NH ₂)	-3
Amoníaco (NH ₃)	-3
Amonio (NH ₄ ⁺)	-3
Gas nitrógeno (N ₂)	0
Óxido nitroso (N ₂ O)	+ 1 (medida por N)
Óxido de nitrógeno (NO)	+2
Nitrito (NO ₂ ⁻)	+3
Dióxido de nitrógeno (NO ₂)	+4
Nitrato (NO ₃ ⁻)	+5

3.2. Nitrificación

Durante la nitrificación, el amoníaco y los iones de amonio se oxidan a iones nitrito (Ecuación 1) y éstos son transformados a iones nitrato (Ecuación 2)



Al parecer, el proceso de nitrificación sólo está limitado en su mayor parte a un número restringido de bacterias autótrofas (Tan, 2000).

Reacciones energéticas de las bacterias nitrificantes

Los electrones de los compuestos nitrogenados entran en una cadena de transporte de electrones, y el flujo de electrones establece un potencial de membrana y una fuerza protón motriz que está ligada a la síntesis de ATP. Sin embargo, debido al potencial de sus donadores de electrones, las bacterias nitrificantes enfrentan los mismos problemas bioenergéticos que los quimiolitotrofos del azufre. El E_o' del par $\text{NH}_2\text{OH}/\text{NH}_3$, el primer paso en la oxidación del NH_3 , es de 0 V. El E_o' del par $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ es muy alto, +0.43 V, aproximadamente. Estos potenciales de reducción relativamente altos indican que las bacterias nitrificantes deben ceder los electrones a sus cadenas de transporte de electrones a nivel de los últimos pasos. Esto es una limitante importante en la cantidad de ATP que pueden producir con cada par de electrones introducido (Madigan et al., 2004).

Entre las enzimas relacionadas con la oxidación de compuestos nitrogenados reducidos, las bacterias oxidadoras de amoníaco lo hacen mediante la *amoníaco monooxigenasa*, con la cual producen NH_2OH y H_2O . Posteriormente, con la *hidroxilamina oxidorreductasa* oxidan NH_2OH a NO_2^- , extrayendo cuatro electrones durante el proceso. La amoníaco monooxigenasa es una proteína integral de la membrana, mientras que la hidroxilamina oxidorreductasa es periplásmica.

En la reacción llevada a cabo por la amoníaco monooxigenasa:



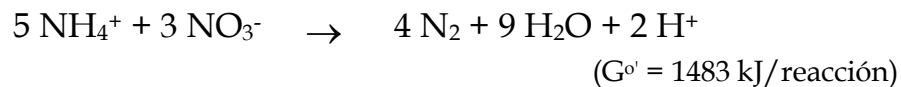
Se requiere el suministro exógeno de dos electrones para reducir un átomo de oxígeno a agua. Estos electrones se originan en la oxidación de la hidroxilamina y son suministrados a la amoníaco monooxigenasa a partir de la hidroxilamina oxidorreductasa por medio del citocromo *c* y de la ubiquinona. Así, por cada cuatro electrones generados por la oxidación de NH_3 a NO_2^- , sólo dos llegan realmente a la oxidasa terminal, los citocromos aa_3 (Madigan et al., 2004).

Las bacterias oxidadoras de nitritos emplean la enzima *nitrito oxidasa*, para oxidar nitrito a nitrato, con los electrones circulando a través de una cadena de electrones muy corta (debido al potencial del par $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) hasta la oxidasa terminal. En las cadenas de transporte de electrones de los oxidantes de nitritos están presentes citocromos de tipo *a* y *c*, y la generación

de la fuerza motriz de protones (que, en definitiva, dirige la síntesis de ATP) ocurre por la acción de los citocromos aa₃. Esta pequeña ganancia de energía explica el bajo crecimiento neto de las bacterias nitrificantes (Madigan et al., 2004).

Oxidación anóxica del amonio (Anammox)

Las amonio oxidasas, pueden agruparse en tres grupos monofiléticos distintos con base en sus secuencias de ARNr 16S: una contiene linajes de *Nitrosococcus oceanus* y *Nitrosococcus halophilus* (en las γ -proteobacteria), otro comprende especies de *Nitrosomonas* y *Nitrospira* (las cuales comprenden linajes anteriormente clasificados como *Nitrosolobus* y *Nitrosovibro* (en las β -proteobacteria) y el último comprende especies de *Planctomycetes* (Saricheewin et al., 2010). Las bacterias nitrificantes clásicas como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* son bacterias aerobias estrictas quimiolitotróficas cuando crecen en presencia de amonio o nitritos, pero también pueden oxidar el amoniaco en condiciones anóxicas. Las aguas de desecho en condiciones de anoxia o los fangos suplementados con nitrato para estimular la desnitrificación también oxidan el amonio a N₂. Esta reacción es dependiente del nitrito y presenta la siguiente estequiometría:



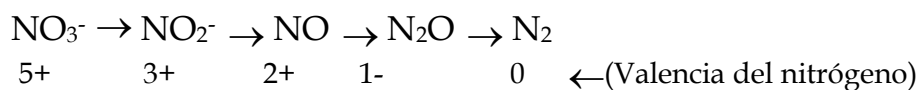
Esta reacción de oxidación anóxica del amonio es muy exotérmica, liberando una gran cantidad de energía que se supone ligada a la conservación de energía en el organismo responsable. La microbiología de esta reacción aún no es bien conocida, pero el proceso no parece deberse a actividades metabólicas anaerobias de bacterias nitrificantes conocidas. Esto ha echado por tierra la suposición de que el amonio es estable en condiciones anóxicas y que solo puede ser oxidado por las bacterias nitrificantes aerobias (Madigan et al., 2004).

3.3. Desnitrificación

Los iones de nitrato se pueden incorporar a la materia orgánica por gran variedad de organismos, mediante un proceso conocido como *reducción asimilatoria de los nitratos*. Un grupo heterogéneo de microorganismos, que comprende muchas especies de bacterias, de hongos y de algas, puede realizar dicho proceso. En este proceso intervienen varios sistemas enzimáticos, entre ellos las reductasas de nitratos y nitrito, que forman amonio que se puede incorporar a los aminoácidos. Parece ser que estos sistemas contienen metaloproteínas solubles y necesitan cofactores reducidos, como el dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido (NADPH). Los sistemas estudiados en bacterias, algas y hongos se inactivan en presencia de amoníaco o de metabolitos orgánicos nitrogenados reducidos. Las concentraciones atmosféricas no parecen inhibir los sistemas enzimáticos de las reductasas asimilatorias de nitrato. La reducción asimilatoria de nitrato no causa la acumulación de cantidades elevadas de iones de amonio extracelulares ya que el amonio se incorpora de una manera relativamente rápida a la materia orgánica. Un exceso de amonio causaría un efecto de retroalimentación negativa que interrumpiría la reducción del nitrato (Tan, 2000; Atlas y Bartha, 2002).

La desnitrificación es la conversión de nitratos a N₂O y gas N₂, y representa el último paso del ciclo total del nitrógeno. Por este proceso el nitrógeno es retornado a la atmósfera en forma de gas. En ausencia de oxígeno, los iones de nitrato pueden actuar como aceptores

finales de electrones, este proceso se conoce como *respiración de nitrato* o *reducción desasimilatoria de nitrato*. En esta ruta el nitrato se transforma en diferentes productos reducidos y, simultáneamente, se produce oxidación de la materia orgánica. Existen dos tipos de *reducción desasimilatoria de nitrato*; diversas bacterias anaerobias facultativas como *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Spirillum*, *Staphylococcus* y *Vibrio* reducen el nitrato a nitrito en condiciones anóxicas. El nitrito producido por estas especies se excreta, o bien en condiciones apropiadas algunos de estos microorganismos reducen el nitrito a amonio por la vía de la hidroxilamina (amonificación del nitrato). Estos organismos no producen nitrógeno gaseoso, es decir, no son desnitrificadores. Los reductores de nitrato desnitrificadores, como *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans* y diversas *pseudomonodaceas* tienen una ruta de reducción mucho más compleja que les permite convertir el nitrato sucesivamente a nitrito, óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) y, finalmente, nitrógeno molecular. Este proceso también es llamado desnitrificación enzimática (Tan, 2000; Atlas y Bartha, 2002; Delorme et al., 2003), y la secuencia de reducción puede graficarse de la manera siguiente:



El incremento de NO, N₂O y gas N₂ producido dependen de varios factores, por ejemplo, pH, oxígeno, nitrito y nitrato presentes, así como de los microorganismos involucrados (Tan, 2000). Cuanto más bajo es el pH de un hábitat mayor es la proporción de óxido nitroso formado. La formación de nitrógeno molecular se ve favorecida por un suministro adecuado, o un exceso, de sus equivalentes reducidos. La nitrificación y desnitrificación suelen presentarse en el mismo lugar, de modo que mucho del NO₃⁻ producto de la nitrificación se difunde hacia la zona de desnitrificación y termina reducido a N₂. En algunas bacterias como *Paracoccus denitrificans*, al parecer restringida a condiciones de anoxia, si se produce una condición de cambio de respiración de aerobia a anaerobia, se produce una situación de estrés y en respuesta la bacteria cambia su ruta hacia la desnitrificación. Esta fase se inicia por un aumento en la concentración del ARNm que codifica para las enzimas de la desnitrificación. Este proceso finaliza cuando el sistema ambiental se restablece (Atlas y Bartha, 2002; Philippot y Hallin, 2006).

La nitrificación se da normalmente en suelos neutros y bien drenados y es inhibida en suelos anóxicos y muy ácidos. La actividad asimilatoria de la nitrato reductasa es reprimida por el amoníaco y la nitrato reductasa desasimilatoria lo es por el oxígeno. Además, estos fenómenos son estacionales y varían durante el año (Figura 3-1) (Atlas y Bartha, 2002).

4. Experiencias en diferentes partes del mundo de la aplicación de biosólidos como mejoradores del suelo

Los lodos producidos en la depuración de las aguas residuales constituyen una suspensión concentrada de los contaminantes presentes en el agua residual cruda y, en consecuencia, contienen microorganismos patógenos y parásitos, así como una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos, algunos de ellos tóxicos en mayor o menor grado (Rojas-Oropeza et al., 2001). El grado de contaminación de los lodos puede variar en relación con su origen. Generalmente, los lodos provenientes de aguas de desecho municipales típicas no presentan problemas de contaminación por metales, aunque puede darse el caso; sin embargo, se

caracterizan por presentar problemas de malos olores y atracción de vectores debido a la presencia de componentes orgánicos, con alto contenido de carbono, nitrógeno y fósforo, elementos trazas, y componentes tóxicos inorgánicos y orgánicos. Entre los problemas más graves, se encuentra la presencia de microorganismos patógenos y parásitos (Lue-Hing et al., 1998).

Con el fin de eliminar dichos problemas y responder a las normatividades de cada país, el tratamiento de lodos es indispensable, lo cual presenta como objetivos: reducir su volumen de vertido y modificar la naturaleza del lodo con el fin de volverlo inofensivo para el ambiente. Esto implica separar las fases agua-sólido para hacer su transporte más económico, estabilizar la materia orgánica para eliminar el riesgo de putrefacción, destruir los microorganismos patógenos (incluidos microorganismos del tipo protozoos y huevos de helminto), controlar el problema de malos olores y de atracción de vectores de enfermedades, así como remover compuestos tóxicos si los hubiere (EPA, 1996a). En este contexto, los lodos de desecho que ya han sido tratados reciben el nombre de biosólidos.

4.1. *Uso benéfico de los biosólidos*

Una vez que los lodos han sido tratados pueden ser aprovechados según los preceptos del desarrollo sustentable, el cual accede al libre intercambio de materia y energía necesario para mantener en equilibrio dinámico al sistema a través de los ciclos biogeoquímicos. De este modo se asegura la disminución de la sobrecarga del medio, al retener y circular los nutrientes necesarios para cubrir las necesidades energéticas del desarrollo. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA, 1996b), en su apartado 503, establece los requerimientos para el reuso y disposición de los biosólidos cuando:

- Son aplicados como fertilizantes para cultivos agrícolas u otro tipo de vegetación (uso benéfico),
- Se descargan en un sitio de disposición final (en rellenos sanitarios o vertido al mar),
- Son incinerados.

La proporción de biosólido en uso benéfico es mayor en general que la descarga en rellenos sanitarios, al mar o a la incineración (Tabla 4-1).

Tabla 4-1 Uso benéfico de los biosólidos en diferentes países.

Uso (%)	EUA	UE	África del Sur
Aplicación en suelos	41	37	61
Otros	8	6	13
Total, <i>Uso benéfico</i>	50	43	74
Descarga	17	46	23
Incineración	22	11	-
No especificados	11	-	3

EUA, Estados Unidos de América; UE, Unión Europea; (Matthews, 1997)

El uso benéfico de los biosólidos se subdivide en 5 formas de aprovechamiento del producto: agricultura, reforestación, uso paisajista (áreas públicas), sustrato tipo composta (macetas de jardines) y recuperación de áreas degradadas. Esta última forma es la única que realmente se entiende como técnica de mejoramiento de suelos, ya que en las otras el biosólido se usa en suelos no degradados que sólo requieren un abono orgánico para una producción intensiva de cultivos varios (Andreoli et al., 2001). Sin embargo, para que estén aprovechados por

cualquier forma benéfica presentada, el biosólido requiere cumplir con ciertos criterios de calidad contenidos en las normatividades. Por ejemplo la regla 503 de la EPA (1996b), una de la más estrictas del mundo, indica que los biosólidos podrán ser dispuestos en cualquier lugar y para cualquier cultivo (ej.: hortalizas) si presentan las características de la clase “A” de acuerdo a los requerimientos de eliminación de patógenos y parásitos (Tabla 4-2), de metales pesados y de contaminantes orgánicos; adicionalmente, hay restricciones de sitio para los biosólidos de clase “B” cuando son aplicados al suelo, dependiendo del tipo de cultivo o la exposición pública. Los tiempos permitidos para cosechas o acceso al público varían de treinta días a dos años después de la aplicación de los biosólidos.

Tabla 4-2 Límites máximos permisibles de patógenos y parásitos en biosólidos según las normas de los Estados Unidos de América y los de México, respectivamente.

CLASE	PATÓGENOS		PARÁSITOS
	Coliformes fecales NMP/gST	<i>Salmonella</i> sp. NMP/4 gST	Huevos de Helmintos viables/4 gST
A	Menos de 1,000	Menor de 3	Menor de 1
B	Menor de 2,000,000	ND	ND

Fuente: EPA Apartado 503 de la Norma para el uso y disposición de los lodos de desecho, 1996b

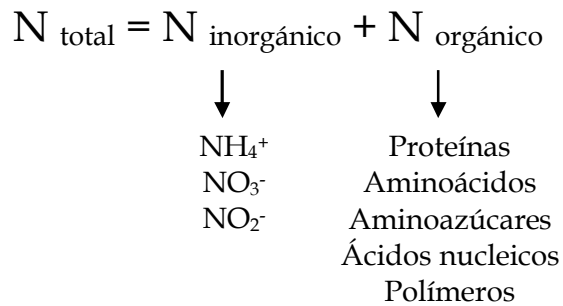
CLASE	PATÓGENOS		PARÁSITOS
	Coliformes fecales NMP/ g en base seca	<i>Salmonella</i> sp. NMP/ g en base seca	Huevos de Helmintos totales/g en base seca
A	Menos de 1,000	Menor de 3	Menor de 1(a)
B	Menor de 1,000	Menor de 3	Menor de 10
C	Menor de 2,000,000	Menor de 300	Menor de 35

(a) huevos de helmintos viables - Fuente: Norma Oficial Mexicana NOM-04-SEMARNAT-2002, publicada en el Diario Oficial del 15/08/2003.

4.2. Composición del biosólido y sus efectos como mejorador de suelo

Los biosólidos tienen cantidades significativas de nutrientes, y sus concentraciones dependen de su origen, otorgándoles propiedad de fertilizantes. Estos nutrientes son el nitrógeno, el fósforo (los dos en mayor cantidad), el potasio (cantidad media), el calcio y el magnesio (los dos en pequeñas cantidades). En general, una gran proporción de los mismos se encuentra en forma asimilable por las plantas. También los microelementos están presentes: el cobre, el zinc, el manganeso (los tres en cantidades apreciables), el boro, el molibdato y el cloro (los tres en cantidades menores). Estos microelementos se encuentran siempre en cantidades suficientes para las plantas (Andreoli et al., 2001).

Uno de los nutrientes más importantes y contenido en los abonos orgánicos es el nitrógeno, elemento indispensable para el crecimiento de las plantas. Es el elemento de mayor valor económico del biosólido. En un biosólido, el nitrógeno total se divide en dos partes como lo siguiente:



En general, el nitrógeno orgánico representa 70 a 90% del nitrógeno total (Andreoli et al., 2001). En el caso de los biosólidos anaerobios no se encuentra nitrato. Estos biosólidos aportan el nitrógeno en dos formas principales: aproximadamente el 67% del nitrógeno orgánico y el 33% del amonio, listos para ser fácilmente integrados al suelo (Mosey and Foulkes, 1984). En el suelo la nitrificación se desarrolla *in situ*, permitiendo una disponibilidad de nitratos asimilables por las plantas. Antes de aplicar una primera vez el biosólido, se tiene que definir la cantidad de nitrógeno disponible en referencia a su ciclo biogeoquímico:

$$N_{\text{disponible}} = f_{\text{org}} (N_{\text{org}}) + f_{\text{vol}} (N_{\text{NH}_4^+}) + N_{\text{NO}_3^-} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde f_{org} = porcentaje de mineralización del biosólido en el suelo estudiado

$f_{\text{vol}} = 1 -$ porcentaje de volatilización del amonio (NH₄⁺) en amoníaco (NH₃)

La fracción orgánica f_{org} está directamente relacionada con la velocidad de mineralización, la cual depende de la temperatura, de la humedad, de tipo de suelo y de su actividad microbiana (Hernández et al., 2002). No hay un valor universal, y puede variar de 20 a 70%. La fracción de volatilización f_{vol} depende del tipo de suelo (Andreoli et al., 2001). El nitrato (NO₃⁻) es directamente asimilable por las plantas, aunque presenta un riesgo de lixiviación, dependiente del suelo.

Puesto que los biosólidos contienen nitrógeno orgánico, esta fracción de “reserva” se desplaza lentamente a la fracción del nitrógeno asimilable por las plantas (NH₄⁺; NO₃⁻), lo cual presenta un interés en su aplicación que puede ser en una sola vez: después de una sola disposición del biosólido, se considera en general que el 30 a 50% del nitrógeno estará disponible el primer año, 10 a 20% el segundo año y 5 a 10% el tercer año (Andreoli et al., 2001). El tipo de estabilización del lodo residual influye sobre las características de este recurso: por ejemplo, se demostró una disponibilidad de 45 a 85% del nitrógeno en el primer año después de la disposición de biosólidos líquidos, producto de la digestión anaerobia, mientras que sólo es del 15% con biosólidos provenientes de la estabilización con cal (Pike and Davis, 1984). Además, el nivel de deshidratación del biosólido influye sobre la eficiencia de la nitrificación: cuanto más líquido es el biosólido, el amonio es más soluble y permite un inicio más rápido de la nitrificación (Smith et al., 1998).

Dentro de los nutrientes, el fósforo es otro elemento importante; su origen proviene de las células de microorganismos y de detergentes. En general, los biosólidos presentan de 40 a 80% del fósforo total disponible. La cantidad necesaria para las plantas es baja pero la capacidad de fijación del suelo es alta: según diferentes suelos, se dispusieron biosólidos entre 100 y 2,500 kg P_{tot}/ha, de los cuales sólo 0.1 a 1 kg P_{tot}/ha fue asimilable por las plantas. Lo demás fue fijado por los suelos, tanto por precipitación como por adsorción (Andreoli et al., 2001).

El contenido del biosólido en materia orgánica estabilizada permite mejorar las características fisicoquímicas del suelo. Por medio de la materia orgánica, el biosólido promueve una mayor agregación de sus partículas, mejorando su estructura; por lo tanto facilita el desarrollo del sistema radicular, así como aumenta la capacidad de retención del agua del suelo (lo que reduce el riesgo de lixiviación). También disminuye la plasticidad del suelo. Todo lo anterior favorece el crecimiento de las plantas, permitiendo una cobertura vegetal sobre el suelo. Por lo tanto, el suelo resiste más a la erosión (Hinkle, 1982; Andreoli et al., 2001). La presencia de materia orgánica permite aún aumentar la capacidad de intercambio catiónico (CIC), lo que resulta en la obtención de una mayor reserva y disponibilidad de nutrientes para las plantas (Munn et al., 2000); el poder amortiguador (*buffer*) del suelo se mejora, lo cual favorece la actividad microbiana del suelo (Andreoli et al., 2001). En Australia, la disposición de biosólidos contaminados con metales pesados resultó en la disminución de la disponibilidad del nitrógeno; sin embargo, este efecto negativo fue cuantitativamente inferior al efecto positivo del aumento de la concentración en nitrógeno total y del CIC, resultando en la intención de las autoridades subir los límites de metales pesados (Munn et al., 2000).

4.3. Mejoramiento de suelos degradados

Los biosólidos pueden ser una buena opción para el mejoramiento de suelos degradados por erosión, como por ejemplo suelos salino-sódicos en proximidad de ciudades (Ej.: Ex-lago de Texcoco) o rehabilitación de minas (Hinkle, 1982; Beltrán-Hernández et al., 1999). En estos tipos de suelos contaminados y/o degradados, la gran variabilidad en sus características puede dificultar la aplicación del biosólido en diversos aspectos, como la preparación del terreno, la estimación de la tasa de aplicación óptima, la revegetación (selección de especies que pueden prosperar en esas condiciones), el monitoreo y la evaluación de la recuperación del sitio (EPA, 1995). Hinkle (1982) observó que en suelos cercanos a zonas mineras, las áreas que fueron adicionadas con lodos tienen un mayor porcentaje de superficie cubierta por vegetación y presentan mayores rendimientos que aquellas sin adición.

En suelos salino-sódicos, después de la disposición directa de un lodo activado residual (sin estabilización), no se observó un aumento de la actividad microbiana por inmovilización de la materia orgánica (Beltrán-Hernández et al., 1999). Sin embargo, Smith y colaboradores (1998) demostraron que un lodo no estabilizado disminuye la nitrificación, ya que favorece la inmovilización de la materia orgánica. La disposición de un biosólido estabilizado por cal favoreció la disminución del porcentaje de sodio en un suelo salino-sódico, ya que se intercambiaron los iones *sodio* con los *calcio* (Beltrán-Hernández, 2001).

5. Métodos de análisis de comunidades microbianas con técnicas moleculares.

Tradicionalmente, el análisis de las comunidades microbianas en el ambiente se realizaba con técnicas clásicas de cultivo, para lo cual se dispone de una gran variedad de medios. Sin embargo, sólo del 0.001 al 15% de los microorganismos fueron estudiados por estos métodos (Hill et al., 2000; Spring et al., 2000; Smith et al., 2001). Además, con estas técnicas se puede favorecer el crecimiento de otros grupos microbianos poco representativos del ecosistema estudiado, sin realmente aislar los más importantes, lo cual influye sobre la interpretación ecológica. En otros términos, los métodos de cultivo no permiten estudiar objetivamente la estructura y función de las comunidades microbianas, ya que en general se altera el número y las actividades de los microorganismos de manera negativa o positiva (Atlas y Bartha, 2002).

En la actualidad se dispone de métodos más sensibles para el análisis de comunidades microbianas en la naturaleza. Uno de los mejores procedimientos es el que se basa en la detección de los ácidos nucleicos. La aplicación de estas técnicas moleculares en muestras ambientales otorgó avances más importantes a la ecología microbiana en los últimos años. El desarrollo de estas técnicas permite detectar poblaciones microbianas concretas y sus actividades sin necesidad de cultivar los microorganismos (Atlas y Bartha, 2002; Madigan et al., 2004). Los métodos moleculares se basan en sondas o secuencias de ácidos nucleicos, que pueden ser un pequeño fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ribonucleico (ARN) (en general de 20 nucleótidos) complementario con la secuencia de bases, de un gen, objeto de estudio.

5.1. Sondas de ácidos nucleicos (primers)

De las varias técnicas moleculares para estimar la composición y diversidad de las comunidades microbianas en hábitats complejos, el gen más utilizado es el que codifica para el ARN ribosomal (ARNr) 16S en los procariotas y el ARNr 5S o 18S en los eucariotas (Hill et al., 2000; Madigan et al., 2004). Dicho gen presenta diferentes ventajas gracias a su contenido de regiones altamente conservadas junto a otras variables a hipervariables, las cuales permiten diferenciar desde el nivel dominio hasta el de especie (Woese, 1987; García-Martínez et al., 1999). La información filogenética dada por la subunidad pequeña ribosómica (ARNr SSU) aumenta debido a su tamaño relativamente largo (alrededor de 1.5 kb en el caso del ADNr 16S) y la presencia de un dominio estructural secundario (Hill et al., 2000; Madigan et al., 2004). Además, la base de datos de secuencias de ARNr disponibles es muy amplia, lo cual facilita la identificación de los microorganismos: por ejemplo, el sitio de Internet del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) contiene ya más de 83,000 secuencias de ADNr 16S (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (García-Martínez et al., 1999; Madigan et al., 2004). El análisis de este gen permite caracterizar más de 90% de microorganismos sin cultivarlos, lo cual refuerza el interés de las técnicas moleculares (Hill et al., 2000).

Otros genes o regiones moleculares específicas se pueden elegir como base para sondas de ácidos nucleicos. Dentro del operón ribosomal, que se compone de sus diferentes subunidades ordenadas de la manera siguiente 16S-23S-5S, la región intergénica 16S-23S presenta interés en el análisis de la diversidad microbiana, muy útil para un método de análisis llamado *rDNA internal spacer analysis* (RISA), que se describirá posteriormente (García-Martínez et al., 1999). También, las secuencias de genes metabólicos específicos pueden usarse para evaluar una población dada dentro de una comunidad microbiana. En el caso del estudio de un ambiente contaminado que sea suelo o agua, existen más de 100 sondas moleculares para genes involucrados en la biotransformación de 40 moléculas químicas diferentes (White et al., 1998). En el caso del estudio de la nitrificación, existen 4 *primers* específicos para el gen que codifica la amonio monooxigenasa (*amo*), enzima de las bacterias oxidantes del amonio (Alzerreca et al., 1999; Kowalchuk y Stephen, 2001).

La utilización de sondas de ácidos nucleicos de tipo ADN o ARN tiene dos alcances diferentes. El seguimiento de las comunidades microbianas mediante las secuencias de tipo ADN permite la detección de los microorganismos implicados sin obtener indicación de su estado fisiológico, aunque mediante el uso de las sondas de tipo ARN se evalúa la actividad de dichos microorganismos. Por lo tanto, en el caso del gen ribosomal 16S se puede estudiar la diversidad microbiana por medio del ARNr directamente. Dicha secuencia presenta ventajas

frente a su propio gen (ADNr): en las células, las secuencias ARNr se encuentran en un número mayor de copias que su gen correspondiente, lo cual favorece su detección; adicionalmente se detecta solamente las células activas (Wintzingerode et al., 1997; Hill et al., 2000). Sin embargo, la extracción del ARN total de un ecosistema ambiental requiere de una atención especial: el ARN es altamente susceptible a la degradación por las enzimas *RNasas*, enzimas muy resistentes a la temperatura (Wintzingerode et al., 1997). En conjunto, el análisis del ADN y ARN provee información complementaria. Por ejemplo, la comparación de la intensidad en perfiles moleculares de tipo ADN y ARN permite relacionar la actividad con la presencia y cantidad celular (Hill et al., 2000). También, esta comparación puede evaluar una dinámica microbiana, los microorganismos muertos recientemente (Giraffa y Neviani, 2001). En este informe, se describirán únicamente las técnicas relacionadas con el ADN.

5.2. Métodos de análisis de comunidades microbianas con técnicas moleculares (ADN)

Las técnicas de extracción de ADN total se basan en los métodos desarrollados los últimos 20 años. Con el objetivo de analizar las comunidades microbianas y detectar los microorganismos, desde los más hasta los menos representativos, la cantidad del ADN total obtenido de una muestra ambiental se tiene que aumentar. Para ello, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar de manera exponencial una secuencia diana por replicación *in vitro* de secuencias de ADN definidas por medio de *primers* (Atlas y Bartha, 2002). La PCR detecta y amplifica desde pequeñas cantidades de ADN, lo que hizo posible el estudio de microhabitats como los intestinos de termitas, las micorrizas, etc. (Wintzingerode et al., 1997). Una vez que el ADN total de la comunidad microbiana estudiada es amplificado por PCR a partir de la muestra ambiental, los *amplicones* individuales (es decir en este caso los diferentes fragmentos amplificados), deben ser separados para poder distinguir y secuenciar cada uno (Hill et al., 2000). Para separar el producto obtenido por PCR existen diferentes métodos de análisis de la diversidad.

Separación por electroforesis en gradiente de gel desnaturizante o térmico (DGGE, TGGE: *Denaturing/Thermal gradient gel electrophoresis*)

La electroforesis en gradiente de gel desnaturizante (DGGE) y la electroforesis en gradiente de gel térmico (TGGE) fueron introducidas hace seis años en microbiología ambiental y son ahora usadas de manera rutinaria como método molecular para el estudio de comunidades microbianas y de dinámica de población en ecología microbiana (Muyzer et al., 1993; Giraffa and Neviani, 2001). Cytryn y colaboradores (2000) estudiaron la diversidad dentro del dominio Archaea en muestras de un lago hipersalino usando una sonda de ADNr 16S; Duinevel y colaboradores (2001) evaluaron la presencia y la actividad del ecosistema de una rizosfera de *Chrysanthemum* por comparación de los perfiles obtenidos a partir de ADNr 16S y de ARNr 16S. Como ejemplos de estudios de dinámica de población, se pueden mencionar los seguimientos de las bacterias nitrificantes (Kowalchuk et al., 1998; Bruns et al., 1999; Kowalchuk et al., 2000; Laverman et al., 2001; Nicolaisen y Ramsing, 2002).

DGGE y TGGE consisten en la diferente separación de los fragmentos de ADN amplificados, debida a cambios conformacionales de estas moléculas generados por el gradiente de desnaturización. La separación se basa en la disminución de movilidad electroforética de los fragmentos de ADN parcialmente fusionados o de doble cadena en un gel de electroforesis con un gradiente lineal de desnaturizante químico de ADN (DGGE) o un

gradiente lineal de temperatura (TGGE) (Giraffa y Neviani, 2001). El gradiente permite, por medio del fenómeno de fusión (*melting*) de las cadenas bicatenarias, que moléculas de ADN de la misma longitud y con diferentes secuencias (y, por lo tanto, su propio comportamiento de fusión) detengan su migración en diferentes posiciones en el gel (Giraffa y Neviani, 2001; Madigan et al., 2004).

El análisis del espacio intergénico de los genes 16S y 23S (RISA, *rDNA internal spacer analysis*) corresponde a la amplificación por PCR de dicho espacio intergénico ITS/IGS (Figura 5-1).

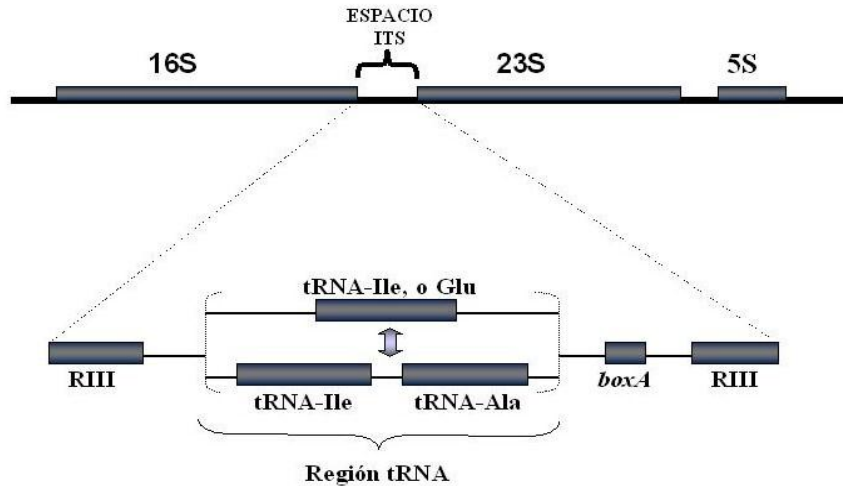


Figura 5-1 Operón ribosómico bacteriano

El espacio intergénico ITS/IGS tiene un nivel de evolución diez veces más elevado que el gen ADN_r 16S, lo cual permite realizar una identificación sin problema a partir de un aislamiento ambiental. El análisis de esta región puede revelar eventos evolutivamente recientes (Åakra et al., 1999). La región ITS/IGS es extremadamente variable en tamaño y secuencia, aún dentro de un grupo taxonómico (García-Martínez et al., 1999) y esta variabilidad de tamaño permite separar directamente el producto de PCR proveniente de Bacteria o Archaea. Esta técnica ha sido reportada en distintos estudios, como por ejemplo de diversidad total microbiana en microagregados de suelo o de biodiversidad de Archaea (Ranjard et al., 2000; Benlloch et al., 2001). También se ha usado para estudios de poblaciones específicas, como en el caso del estudio de una población bacteriana reductora del mercurio y de la población nitrificante (Åakra et al., 1999; Canstein et al., 2001).

La principal característica de esta técnica es la variabilidad en su longitud: así, la RISA se basa en un polimorfismo natural, sin necesidad de usar enzimas de restricción (García-Martínez et al., 1999). Dentro de los métodos basados en el polimorfismo de tamaño, la RISA es de fácil realización, permitiendo un rápido examen de la composición y complejidad de la comunidad bacteriana. Permite también su realización sin equipo específico y costoso (Ranjard et al., 2000). En efecto, no requiere de enzimas de restricción, disminuyendo el costo y el tiempo de realización, ya que el producto de PCR se separa directamente en gel de electroforesis de agarosa sin tratamiento previo.

Sin embargo, para la identificación de cada banda, se requiere de la técnica de clonación y secuenciación como también es el caso por ejemplo de ARDRA, RFLP clásica, y RAPD. Con el fin de evitar una laboriosa tarea que representa esta última etapa, existe una **variante automatizada de la RISA** denominada **ARISA**. Como en la T-RFLP, se usa un *primer* iniciador marcado, lo cual permite tratar la muestra directamente en un secuenciador automático (Giraffa y Neviani, 2001). El limitante actual de esta técnica es la escasa disponibilidad de secuencias registradas en base de datos en Internet (Åakra et al., 1999); sin embargo, se estima que en uno o dos años se podrá superar esta carencia.

La RISA presenta también una ventaja para estudios en ambientes extremos. Los microorganismos han habitado prácticamente todas las superficies existentes en la tierra y con ello han dado lugar a una gran diversidad de estrategias metabólicas, una enorme biodiversidad de microorganismos y también de microbiotas (Marshall, 1993; Madigan et al., 2004). Esta gran biodiversidad es el resultado del éxito de adaptación a factores ambientales muy heterogéneos. Y se debe, desde su inicio, a la supervivencia de microorganismos en condiciones extremas que son desfavorables para la gran mayoría de las especies existentes. Estos microorganismos se ubican principalmente dentro del dominio Archaea, que a diferencia de Bacteria y Eucariota han evolucionado muy lentamente y son considerados como los primeros habitantes verdaderos de la tierra. Puesto que la región del ADNr 16S tiene una evolución menor que la del espacio intergénico 16S-23S, la RISA permite detectar una mayor biodiversidad en los ambientes extremos (Åakra et al., 1999).

6. Cuantificación de poblaciones por técnicas moleculares.

Las técnicas moleculares de cuantificación de comunidad microbiana son principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) cuantitativa y la hibridación *in situ* fluorescente (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*). También, la técnica de hibridación en membrana puede permitir la cuantificación de población microbiana.

6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) cuantitativa

La técnica de PCR es muy eficaz, ya que permite amplificar fragmentos específicos de ADN en un factor de 10^6 en pocas horas, lo cual soluciona la detección de poblaciones específicas con cantidades limitadas. Se reconoce que la PCR puede usarse para la detección de números muy bajos de bacterias específicas, a pesar de que la muestra presente un ambiente heterogéneo de procariontas y eucariotas, así como de material orgánico (Lleó et al., 1999). Una variante de la PCR es la **PCR competitiva (cPCR, *competitive PCR*)**, la cual permite no sólo la detección de poblaciones, sino también la cuantificación de éstas poblaciones, en general no-cultivables (Lleó et al., 1999; Phillips et al., 2000; Giraffa y Neviani, 2001). Por medio de un estándar interno, fragmento de ADN sintetizado a partir del ADN diana, la PCRc es capaz de detectar y cuantificar este ADN diana (Lleó et al., 1999). La construcción del estándar interno se hace de la manera siguiente, presentada en la Figura 6-1. La PCRc consiste en un PCR clásica con un termociclador tradicional, sólo que se añade una cantidad conocida del estándar interno, de un tamaño inferior al fragmento de ADN diana: Los productos de amplificación se separan y diferencian durante la electroforesis y la cantidad relativa de cada uno se determina mediante un analizador de imagen, comparando posteriormente las dos bandas de cada fragmento (Lleó et al., 1999; Phillips et al., 2000).

La PCRc no es la única PCR cuantitativa; también se conoce la **PCR de tiempo real (Real-Time PCR)**, llamada también PCR *TaqMan* (Grüntzig et al., 2001; Bach et al., 2002; Stubner, 2002). El método requiere el diseño de los *primers* iniciador y final (de reversa), además de una sonda de hibridación interna. Dicha sonda está marcada en sus dos extremidades por fluorescencia: el marcaje fluorescente de la extremidad 5' sirve de indicador, ya que su espectro de emisión se inactiva por el marcaje de la extremidad 3' de la sonda. Durante la etapa de extensión de los *primers* en cada ciclo de PCR, la polimerasa rompe la sonda marcada mediante su actividad nucleasa en 5'. Así, el indicador fluorescente será detectado, la separarse del marcador inactivador, lo que resulta en el aumento de la emisión de fluorescencia. Esta fluorescencia aumenta de manera logarítmica durante el proceso de PCR de tiempo real: la fluorescencia dentro de la fase logarítmica equivale a la cantidad de ADN diana inicial, correspondencia obtenida mediante una curva estándar realizada extemporáneamente. La única desventaja de esta PCR cuantitativa, es que se necesita un termociclador especial para desarrollarla (Grüntzig et al., 2001; Bach et al., 2002).

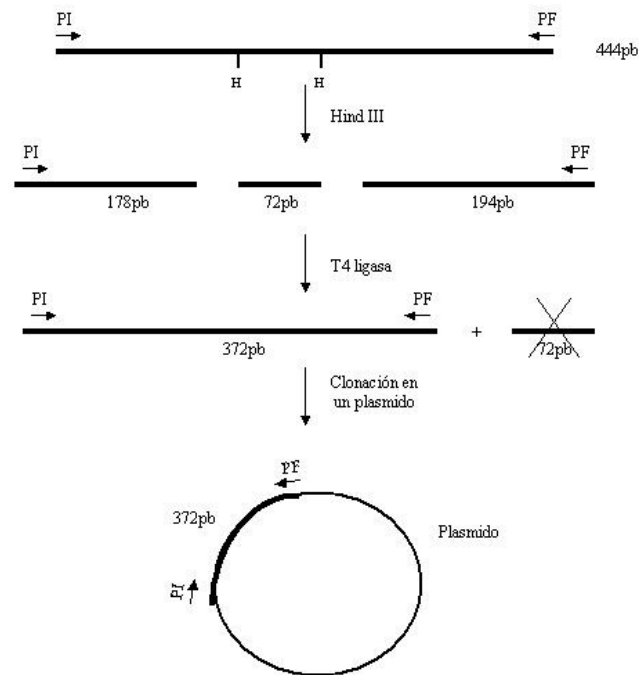


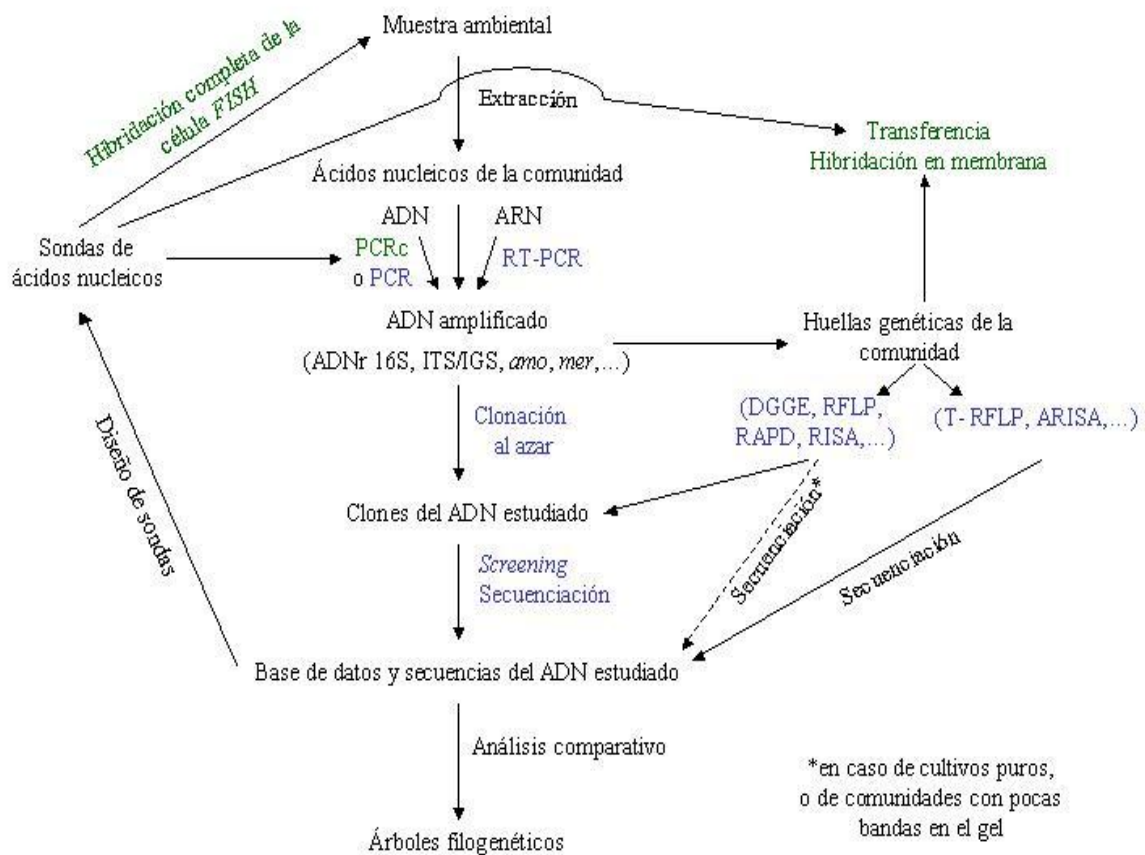
Figura 6-1 Esquema de construcción del estándar interno: el fragmento de 444 pb es digerido por *HindIII* generando 3 fragmentos, los cuales se vuelven a ligar mediante la T4 ligasa. El fragmento de 372 pb con las dos regiones de los *primers* es purificado y clonado, con el fin de usarlo como estándar interno. PI, *primer iniciador*; PF, *primer final* (Lleó et al., 1999).

Estos dos tipos de PCR cuantitativa son eficaces y frecuentemente se utilizan para cuantificar poblaciones dentro de comunidades microbianas, por ejemplo bacterias nitrificantes, desnitrificantes o sulfatorreductoras (Phillips et al., 2000; Hermansson y Lindgren, 2001; Grüntzig et al., 2001; Stubner, 2002). También, existe la técnica de **Número Más Probable PCR (NMP-PCR)**, la cual consiste en realizar una serie de diluciones y amplificar cada dilución: el número de fragmentos del ADN diana se obtiene mediante la tabla estadística de

McGrady. Sin embargo, este método resulta ser laborioso, tardado y limitante, ya que sólo se puede tratar un número limitado de muestras de cada vez (Phillips et al., 2000; Bach et al., 2002).

7. En resumen, la biología molecular como herramienta de estudio de la ecología microbiana

Las relaciones filogenéticas de los microorganismos en muestras ambientales pueden determinarse sin realizar cultivos de células viables, analizando los ácidos nucleicos de la muestra. Las técnicas de estudio de la diversidad total o de poblaciones específicas dentro de comunidades microbianas, permiten obtener huellas genéticas de la comunidad. Estos métodos, tanto los realizados a partir de ADN como los de ARN, considerando aún la cuantificación, pueden resumirse de la siguiente manera:



Esquema general para el análisis de la diversidad total o de poblaciones específicas de comunidades microbianas: detección (en azul), cuantificación (en verde) e identificación (RT-PCR: PCR con la Transcriptasa Reversa). Adaptado de Atlas y Bartha (2002).

JUSTIFICACIÓN

El suelo del ex lago de Texcoco necesita una cobertura vegetal como respuesta a un problema de tolvaneras asociado a problemas de contaminación ambiental y de salud pública. Por otro lado, en la década de los 90s se planteó ubicar en esta zona federal una megaplanta para el tratamiento de las aguas residuales de la ciudad de México. Esta megaplanta generaría biosólidos y los suelos del ex lago harían la función de un mega monorelleno para los biosólidos. En un principio se argumentó que la disposición continua de biosólidos generaría un ambiente propicio para la vegetación introducido en el sitio. Nuestra propuesta fue estudiar las condiciones de dinámica del carbono y nitrógeno en dichos suelos, considerando la microbiota nativa implicada en el flujo biogeoquímico de la materia orgánica en un ambiente extremo. Los biosólidos propuestos fueron los generados por procesos de digestión anaerobia termofílica con características de calidad, tipo A, con alto contenido de nitrógeno en forma orgánica e inorgánica. Dicho estudio aportará conocimientos básicos y aplicados para mejorar las políticas de manejo de recursos en esta zona federal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la factibilidad de disponer biosólidos de origen biológico anaerobio y su efecto sobre el ciclo del nitrógeno en un ecosistema extremo salino sódico: caso particular del suelo del ex lago de Texcoco.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Evaluar la mineralización del carbono y nitrógeno después de la disposición de diferentes cantidades de biosólido en el suelo de alta salinidad.
- ✓ Determinar la cantidad de nitrógeno disponible en el biosólido estudiado.
- ✓ Evaluar la dinámica microbiana después de la disposición de diferentes cantidades de biosólido en el suelo de alta salinidad, en función del tiempo.
- ✓ Determinar cambios por métodos moleculares en la comunidad microbiana nativa de un suelo salino sódico, antes y después de la disposición de un biosólido.
- ✓ Evaluar la mineralización del carbono y nitrógeno después de la disposición de un biosólido a una cantidad dada, en suelos con diferentes salinidades.
- ✓ Estudiar de manera preliminar, la diversidad funcional mediante la presencia de los genes de función que codifican para las enzimas de la nitrificación (enzima específica: gen *amoA*; enzima no específica: gen *pmoA*, mismo gen específico para la comunidad metanótrofa), de la desnitrificación (genes *narG*, *nosZ*) y de la oxidación anaerobia del amonio, ANAMMOX (gen *hzoA*) en suelos con diferentes salinidades del ex lago de Texcoco.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

8. Localización del área de estudio

La región de estudio pertenece al área conocida como el Valle de Anáhuac; constituye una de las cuencas endorreicas que caracterizan esta planicie y se localiza al oriente del Valle de México. La región estudiada (altitud 2237 msnm) está situada en el centro de la zona federal de lo que se conoce como el lago de Texcoco. Limita al norte con la compañía Sosa Texcoco (actualmente cerrada); al sur con la autopista Peñon- Texcoco; al este, con el Canal Colector; y al oeste, con el Dren General, que su vez limita con la zona federal del Ex-lago de Texcoco. La zona de muestreo está ubicada dentro de la misma región antes mencionada, de coordenadas N 19°29'39.61'', O 99°00'04.18'', como se muestra en la Figura 8-1.

Esta zona fue elegida por su alta variabilidad espacial de concentración de sales dentro de una misma área, factor necesario en el presente experimento; también, fue elegida por considerarse como una de las menos perturbadas por las anteriores obras de rehabilitación (Fernández-Buces et al., 2006). El suelo superficial tiene en general un aspecto de sequedad y quebradizo al contacto, además de la presencia de grietas en algunas zonas sin vegetación. Cabe señalar que en esta zona se encuentra establecida una población de pasto salado, llamado *Distichlis spicata*, la cual varía en cobertura, crecimiento y asociación con otras especies de plantas en relación con la salinidad del suelo (Figura 8-1).

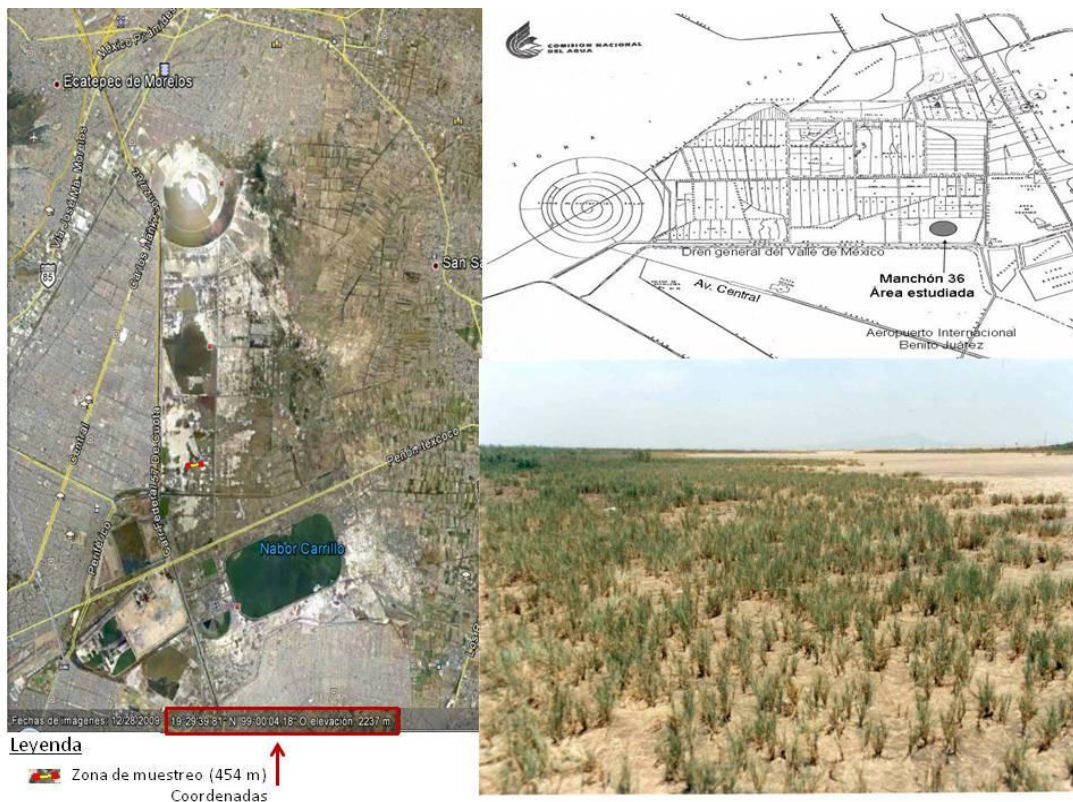


Figura 8-1 Localización y vista general del área de estudio en el ex-lago de Texcoco.

9. Recolección de la muestra

El suelo muestreado de la zona de estudio antes mencionada fue recolectado en dos etapas: la primera en Agosto de 2001 para los experimentos 1 y 2; la segunda en Enero del 2002 para los experimentos 3 y 4. Las muestras colectadas fueron muestras compuestas de la parte superficial del suelo con aproximadamente 10 cm de profundidad, en un metro cuadrado; en cada punto de muestreo se quitó la costra superficial de sal (1 cm de profundidad) y se tomaron aproximadamente 5 kg de suelo (sin costra) en bolsas de polietileno.

Para los experimentos 3 y 4, las tres zonas de salinidad fueron elegidas mediante la observación morfológica del pasto salado (Tabla 9-1), así como mediante la determinación directa de la conductividad eléctrica (dilución 1:10). Cabe mencionar que para el experimento 1, se recolectó suelo de la zona "Salinidad 3".

Tabla 9-1 Aspecto morfológico del pasto salado en las tres zonas de salinidad.

Suelo	CE _s dS.m ⁻¹	<i>Distichlis spicata</i>	
		Altura (cm)	Cobertura
Salinidad 1	34.2	40	abundante
Salinidad 2	63.4	20	abundante a regular
Salinidad 3	129.2	15	escasa a nula

Salinidad 1 a 3: de la menor a la mayor salinidad

Posteriormente, en el laboratorio la muestra se almacenó en las bolsas abiertas durante una semana en un lugar cerrado y a la sombra, permitiendo así la estabilidad del suelo. Transcurrido este tiempo, la muestra fue tamizada con un tamiz de número 8 y número 10, marca Mont. Una vez homogeneizado el suelo, se llevó a cabo su caracterización fisicoquímica: pH, conductividad eléctrica del extracto saturado, % de humedad, carbono total, N-NH₂ (nitrógeno proteico), NH₄⁺, NO₂⁻ y NO₃⁻.

10. Caracterización del biosólido

El biosólido utilizado en este trabajo provino de la estabilización de lodos biológicos por digestión anaerobia termofílica, realizada en el laboratorio 1 del Instituto de Ingeniería de la UNAM. Dicho biosólido es de clase A, en relación con los límites de coliformes fecales permitidos, establecidas por la Norma Oficial Mexicana (NOM-004-SEMARNAT-2002) (1000 NMP CF/g ST) (NMP, Número Más Probable) (Rojas Oropeza et al., 2001; Cabirol et al., 2002).

Para conocer las características del biosólido necesarias en el experimento, se requirió el análisis de los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH, conductividad eléctrica, % de humedad, carbono total, N-NH₂ (nitrógeno proteico), NH₄⁺, NO₂⁻ y NO₃⁻.

11. Protocolo experimental

11.1. Experimento 1: Mineralización del carbono y nitrógeno después de la disposición de diferentes cantidades de biosólido en un suelo de alta salinidad (salinidad 3).

El diseño experimental para estudiar el comportamiento químico del proceso de nitrificación después de la disposición de un biosólido en un suelo salino sódico, consiste en simular a escala laboratorio el sistema suelo-biosólido (microcosmos). La unidad experimental utilizada

fue 50 g de suelo contenido en un frasco de vidrio de 100 ml, al cual le fue adicionado una cantidad determinada de biosólido, denotadas como: C1, C2 y C3 de nitrógeno (Concentración 1, Concentración 2 y Concentración 3). Con el objetivo de captar la producción de CO₂ y la volatilización en forma amoniacal (NH₃), se adecuaron dos trampas, una con hidróxido de sodio y la otra con ácido bórico, respectivamente. Finalmente el sistema compuesto por los tres frascos anteriormente mencionados (sistema de bioensayo), se guardó dentro de un cuarto frasco de 2 l, el cual se mantuvo cerrado la mayor parte del experimento para evitar pérdidas de los gases medidos; sin embargo, fue abierto regularmente para mantenerlos en condiciones de aerobiosis. Cada unidad experimental fue hecha por triplicado y está constituida como se explica en la Figura 11-1 y la Tabla 11-1.

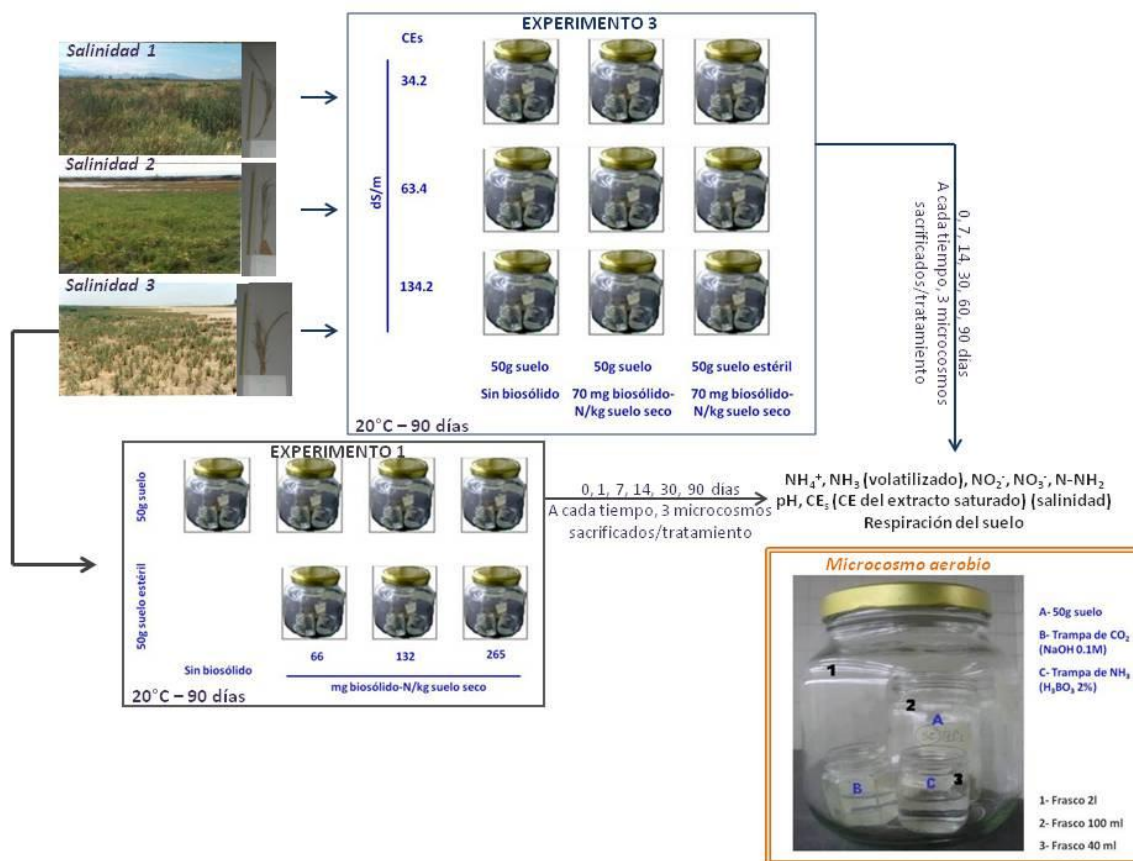


Figura 11-1 Diagrama experimental para el estudio fisicoquímico de la dinámica del nitrógeno. (Experimentos 1 y 3).

Tabla 11-1 Condiciones de los tratamientos que constituyen cada unidad.

Tratamiento	Suelo (g)	Suelo estéril (g)	Biosólido (mg N/kg suelo seco)	Biosólido (kg N/ ha)
Testigo*	50	0	0	0
Control estéril 1	0	50	66	130
Control estéril 2	0	50	132	260
Control estéril 3	0	50	265	520
C1	50	0	66	130
C2	50	0	132	260
C3	50	0	265	520

* El testigo fue ajustado con agua hasta alcanzar el % de humedad de cada unidad adicionada con biosólido.

Cada unidad experimental se incubó a temperatura y humedad, constantes de 20°C y 20%, respectivamente, en cuartos controlados del laboratorio de cámaras de temperaturas controladas de la Facultad de Ciencias, UNAM. Los tiempos en que se realizó cada medición fueron 0, 1, 7, 14, 30 y 90 días. A cada tiempo, tres unidades experimentales de cada tratamiento fueron sacrificadas para realizar la medición de los parámetros estudiados (Figura 11-1).

11.2. Experimento 2: Dinámica microbiana después de la disposición de diferentes concentraciones de nitrógeno en un suelo de alta salinidad (salinidad 3).

Las condiciones de los microcosmos en este experimento y el uso de biosólido fueron similares a las del experimento 1, presentado anteriormente. Para cada tratamiento, 5 submuestras de suelo de 200 g fueron agregadas a los frascos de 350 ml e incubadas durante 150 días (Figura 11-2). Después de 0, 1, 7, 14, 30, 90 y 150 días, 3 submuestras de 1 g de suelo fueron recolectadas de cada frasco y las poblaciones microbianas se analizaron por la técnica de RISA (*rDNA internal spacer analysis*).

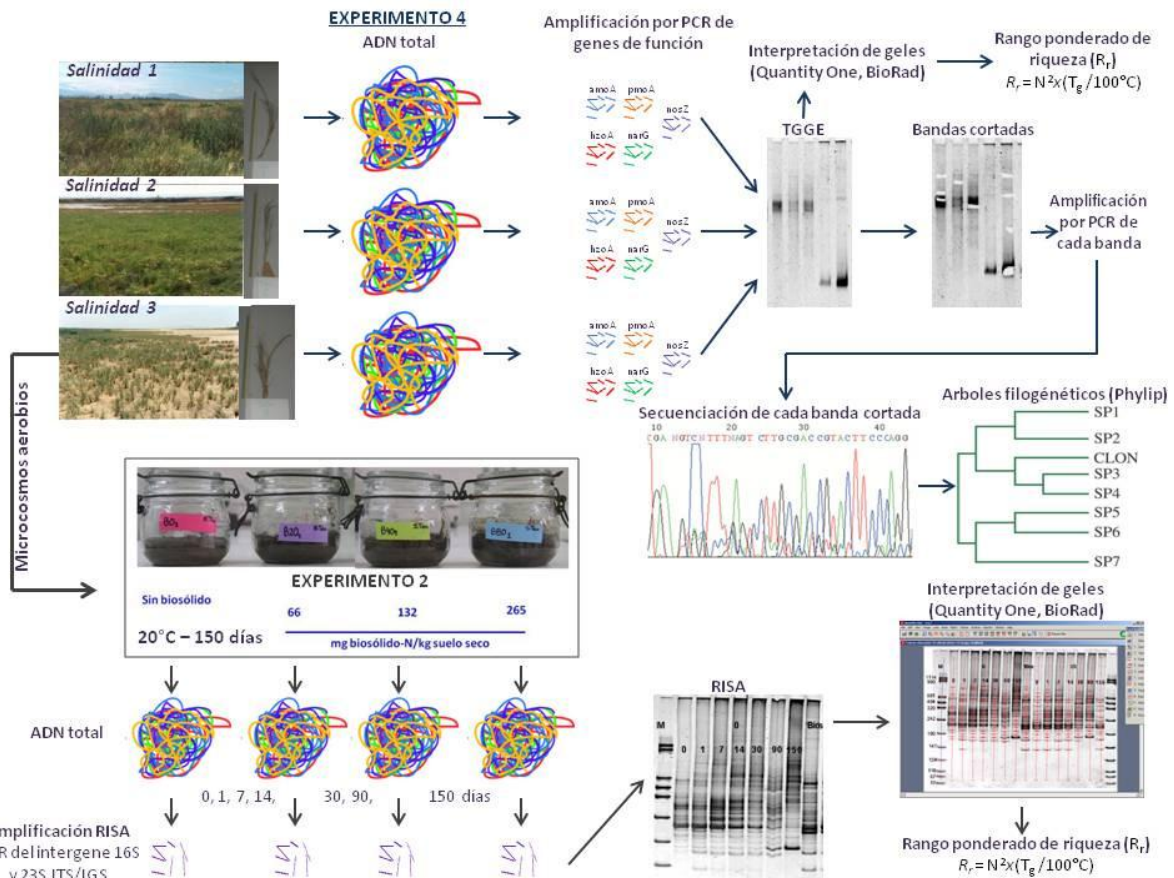


Figura 11-2 Diagrama experimental para el estudio molecular de la dinámica microbiana. (Experimentos 2 y 4).

11.3. Experimento 3: Mineralización del carbono y nitrógeno después de la disposición de un biosólido a una cantidad dada, en suelos con diferentes salinidades.

En este tercer experimento, se utilizó la misma unidad experimental del experimento 1 (Figura 11-1). Sin embargo, el factor variable estudiado fue la concentración de sales, manteniéndose constante la cantidad de biosólido dispuesto. Dicha concentración de biosólido fue de 70 mg N kg⁻¹ de suelo seco, equivalente a 136.5 kg N ha⁻¹.

Tabla 11-2 Condiciones de los tratamientos que constituyen cada unidad.

Tratamiento	Suelo (g)	Suelo estéril (g)	CE_s (dS/m)	Biosólido (mg N/kg suelo seco)
Testigo1*	50	0	34.2	0
Testigo2*	50	0	63.4	0
Testigo3*	50	0	134.2	0
Control estéril 1	0	50	34.2	70
Control estéril 2	0	50	63.4	70
Control estéril 3	0	50	134.2	70
Salinidad 1	50	0	34.2	70
Salinidad 2	50	0	63.4	70
Salinidad 3	50	0	134.2	70

* El testigo fue ajustado con agua hasta alcanzar el % de humedad de cada unidad adicionada con biosólido.

Cada unidad experimental se incubó a temperatura y humedad, constantes de 20°C y 20%, respectivamente, en cuartos controlados del laboratorio de cámaras de temperaturas controladas de la Facultad de Ciencias, UNAM. Los tiempos en que se realizó cada medición fueron 0, 7, 14, 30, 60 y 90 días. En cada tiempo, tres unidades experimentales de cada tratamiento fueron sacrificadas para realizar la medición de los parámetros estudiados (Tabla 11-2; Figura 11-1).

11.4. Experimento 4: Estudio preliminar de la diversidad funcional, nitrificante, desnitrificante y ANAMMOX, en suelos con diferentes salinidades.

En el suelo de cada salinidad, se investigaron la presencia de los genes de función que codifican para las enzimas de la nitrificación (enzima específica: gen *amoA*; enzima no específica: gen *pmoA*, mismo gen específico para la comunidad metanótrofa en el ciclo del C), de la desnitrificación (gen *narG*, *nosZ*) y de la oxidación anaerobia del amonio, ANAMMOX (gen *hzoA*). Un acercamiento de la diversidad de cada función se realizó por medio de la técnica de huella genética, TGGE y secuenciación de las diferentes bandas obtenidas (Figura 11-2).

12. Análisis fisicoquímicos y biológicos del suelo

12.1. Porcentaje de humedad

Para determinar la cantidad de agua contenida tanto en el suelo como en el biosólido, se tomaron 10 g de suelo o 10 ml de biosólido, los cuales fueron deshidratados en una estufa a 120°C durante 12 horas. Este análisis se realizó para cada muestra al inicio de cada experimento.

12.2. Concentración de sales

La conductividad eléctrica (CE) de la muestra es indicador de la salinidad del suelo. Se usó un equipo marca Orion, modelo 1230, electrodo Orion 013010. En campo, la CE directa se midió a partir de una dilución del suelo de 1:10. En laboratorio, se realizó un extracto saturado de cada suelo, de los cuales se midió su CE real (que depende en parte de la capacidad de campo, de su densidad y textura). El extracto saturado se preparó de la manera siguiente: se tomaron 100 gramos de suelo, el cual fue humectado hasta la saturación adicionando agua destilada en poca cantidad, 1 hora después se filtró por vacío y se midió la CE al filtrado. Este análisis se realizó para cada muestra al inicio de cada experimento.

12.3. pH

La medición de este parámetro fue realizada con un equipo Orion modelo 1230, electrodo Orion pH Triode 9107WP. Este análisis se efectuó para cada muestra al inicio y al final de cada experimento.

12.4. Respiración del suelo

Se cuantificó el CO₂ producido por medio de una trampa de NaOH 0.1 N dentro de un microcosmo (Dendooven et al., 2000). La respiración del suelo se midió mediante un testigo denominado control estéril, para lo cual se preparó la unidad experimental con suelo previamente esterilizado. Este control estéril nos permitió diferenciar la producción de CO₂ resultante de la respiración microbiana del suelo y la del biosólido. Se midió el CO₂ producido (S + B) en cada microcosmo "tratamiento" (suelo tamizado con biosólido) y el CO₂ producido (B) en cada microcosmo "control estéril". Mediante el siguiente calculo, se obtiene la producción de CO₂ específica de la biomasa microbiana autóctona del suelo: (S+B)-(B)=S, donde S corresponde a la respiración de la biomasa microbiana del suelo, y B a la respiración de la biomasa microbiana del biosólido.

12.5. Carbono total

El carbono total fue determinado por la digestión con ácido sulfúrico y fosfórico, titulándose posteriormente con sulfato ferroso amoniacal. Se usó como indicador a la o-fenantrolina (Harris, 1992).

12.6. Análisis de las diferentes formas de nitrógeno

Para poder realizar los siguientes análisis en el suelo, se requirió realizar previamente una extracción del suelo con K₂SO₄ 0.5 M en una relación 1:4 para ser posteriormente agitado y filtrado con papel filtro Whatman N°40. Cabe señalar que estos parámetros fueron medidos para cada tiempo establecido en los experimentos, además de ser previamente estandarizados y calibrados para las condiciones del laboratorio.

Nitrógeno Kjeldahl: El nitrógeno total fue determinado mediante esta técnica (Jackson, 1980), utilizándose una unidad de digestión marca Buchi modelo 435 (APHA/AWWA/WPCF, 1995).

Nitrógeno proteico: El nitrógeno orgánico fue medido por el método fotocolorimétrico con reactivo de ninhidrina (Jorgensen y Brookews, 1990). El equipo usado fue un espectrofotómetro marca Beckman modelo DU 650.

Nitrógeno amoniacal: El nitrógeno amoniacal fue determinado a partir de una destilación en medio básico, para la cual fue utilizada una unidad de destilación marca Buchi, modelo 323 (Bremner y Keeney, 1966).

Nitrito: El método para medir el nitrito fue colorimétrico, utilizando un espectrofotómetro marca Beckman modelo DU 650 (con reactivo α -naftilamina y EDTA) (APHA/AWWA/WPCF, 1995).

Nitrato: El nitrato fue medido, mediante una técnica espectrofotométrica, con el reactivo fenil disulfónico (APHA/AWWA/WPCF, 1995).

Amoniaco volatilizado: Se cuantificó el amoniaco volatilizado por medio de una trampa de ácido bórico al 2% (Beltrán-Hernández et al., 1999).

12.7. Extracción de ADN

La extracción de ADN de cada suelo se realizó como se describió por Martin-Laurent y colaboradores (2001). Se añadió a 250 mg del suelo, 1 ml de una solución 100 mM Tris (pH 8,0), 100 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, 1% (peso/vol) polivinilpirrolidona, y 2% (peso/vol) de sulfato dodecil sódico (SDS) en un tubo de 2 ml que contiene 0.5 y 0.1 g de perlas de vidrio de 106 μ m y 2 mm de diámetro, respectivamente. Las muestras fueron homogeneizadas durante 30 s a 1600 rpm en una cámara de nylon para el microdesmembrador (Mikro-Dismembrator S, B. Braun Biotech International). Las muestras se centrifugaron a 14000 \times g, a 4°C durante 1 min. Los sobrenadantes recuperados se incubaron con 5 M acetato sódico (1:10) en hielo durante 10 min y se centrifugó a 14000 \times g durante 5 min. Después de la precipitación con 1 volumen de isopropanol enfriado con hielo, los ácidos nucleicos se lavaron con etanol al 70% y se purificaron utilizando una columna de Sepharose 4B. La calidad y el tamaño de los ADNs de suelo se verificaron por electroforesis en geles de agarosa 1%. El ADN se cuantificó usando un Biofotómetro a una longitud de onda de 260 nm (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se utilizaron tres repeticiones para la evaluación del ADN.

12.8. RISA

La región intergénica ITS/IGS del espaciador entre las subunidades pequeñas y grandes de los genes ribosomales fue amplificada a partir de 50 ng de ADN extraídos de suelo con un volumen total de 50 μ l usando 1 μ l de los *primers* universales 38r (59-CCG GGT TTC CCC ATT CGG-39) y 72f (59-TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT-39) y 2.5 U de la Taq ADN polimerasa (Appligene), bajo las condiciones siguientes: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, y 2 min a 72°C, más un ciclo adicional de 15 min a 72°C. Los *primers* y las condiciones de PCR fueron los reportados por Martin-Laurent y colaboradores (2001). Alícuotas de 15 μ l fueron separadas en una electroforesis de un gel de acrilamida al 6%, en 8 mA durante 17 h. Se usó un marcador molecular de tamaño "VIII" de Boehringer Mannheim. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes fueron documentadas con el analizador de geles *Gel-Doc 2000 System* de Bio-Rad, y los perfiles de los geles fueron analizados con el software *Quantity One*® de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc.) (INRA, Dijon).

Este concepto de separación de bandas por variación de tamaño del espacio intergénico puede ser expresado matemáticamente, definiéndose un índice para los rangos ponderados

de riqueza (R_r) y describiendo la diversidad total de la muestra analizada, de acuerdo a la siguiente formula: $R_r = N \times [(L_b - C_b) / 100]$, donde el número total de bandas (N) multiplicado por la fracción entre la diferencia de migración por tamaño, que comprende entre la primera y la última banda del patrón y 100, que teóricamente es el número máximo de desnaturalización (Marzorati et al., 2008).

Se realizó una matriz de similitud de las curvas densitométricas de cada patrón de bandas, calculando el coeficiente de correlación de Pearson (producto-momento) y los resultados fueron utilizados para realizar un análisis de “ventana-corrediza” (*Moving-Window Analysis*, MWA). El MWA consiste en unir los puntos, en una grafica de evolución en el tiempo, de los valores de correlación de dos fechas consecutivas analizadas y es útil cuando se evalúa la estabilidad de una comunidad microbiana. El promedio de la tasa de cambio porcentual (Δ_t) fue calculado como el promedio y desviación estándar de los valores de la curva del MWA, sustraídos de los valores de similitud 100%. Cuanto más grandes son los valores de similitud de los patrones de RISA de un tiempo con respecto al anterior, más bajos son los puntos en el MWA y menores los valores de Δ_t (Possemiers et al., 2004; Wittebole et al., 2005).

12.9. Amplificación de genes de función y TGGE

Los genes de función estudiados fueron:

- *amoA* (gen de la amonio monooxigenasa, primera etapa de la nitrificación),
- *pmoA* (gen de la metano monooxigenasa, metanotrofia o nitrificación alterna),
- *narG* (gen de la nitrato reductasa, primera etapa de la desnitrificación),
- *nosZ* (gen de la óxido nitroso reductasa, última etapa de la desnitrificación),
- *hzoA* (gen de la hidrazina óxidoreductasa, oxidación anaerobia del amonio).

Cada gen fue amplificado a partir de 50 ng de ADN extraídos de cada suelo de salinidad 1, salinidad 2 y salinidad 3, con un volumen total de 25 μ l usando concentraciones de 0.7 ml de los *primers* específicos y 2.5 U de la Taq ADN polimerasa (Appligene) bajo las condiciones siguientes de PCR mejorado (se usó una técnica de rampeo): para *amoA*, 5 min a 94°C, 1 min a 80°C (TaqPol), 42 ciclos de 1 min a 94°C, 1.5 min a 60°C, y 1.5 min a 72°C, más un ciclo adicional de 10 min a 72°C; para *pmoA*, 5 min a 94°C, 1 min a 80°C (TaqPol), 35 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 56°C, y 1 min a 72°C, más un ciclo adicional de 7 min a 72°C; para *narG*, 5 min a 94°C, 1 min a 80°C (TaqPol), 1 ciclo de 30s a 94°C, 30s a 60°C, y 45s a 72°C, 8 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 59°C*, y 45s a 72°C, 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 56°C, y 45s a 72°C, más un ciclo adicional de 6 min a 72°C; para *nosZ*, 5 min a 94°C, 1 min a 80°C (TaqPol), 35 ciclos de 30s a 94°C, 1 min a 52°C, y 1 min a 72°C, más un ciclo adicional de 10 min a 72°C; para *hzoA*, 5 min a 94°C, 1 min a 80°C (TaqPol), 1 ciclo de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, y 1 min a 72°C, 10 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 55°C*, y 30s a 72°C, 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 52.5°C, y 30s a 72°C, más un ciclo adicional de 10 min a 72°C (el símbolo * denota un decremento de 0.5°C por cada ciclo). Los *primers* usados se presentan en la Tabla 12-1.

Con las condiciones descritas y después de obtener las amplificaciones, estas mismas reacciones se utilizaron como molde y se hicieron amplificaciones con un primer reverso que tiene en el extremo 5' una grapa G-C (Tabla 12-1), que le permitirá mantener unidas la doble cadena de ADN durante la electroforesis de gradiente de temperatura (TGGE).

Tabla 12-1 Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de función

Primer	Posición	Secuencia (5'-3') ^d
<i>amoA</i> -F ^a	332-349	TTTCTACTGGTGGT
<i>amoA</i> -F GC ^b	332-349	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGGGGTT TCTACTGGTGGT
<i>amoA</i> -R ^a	802-822	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC
<i>pmoA</i> -F ^a	189-206	GGAGACTGGGACTTCTGG
<i>pmoA</i> -F GC ^b	189-206	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGGGAGA CTGGGACTTCTGG
<i>pmoA</i> -R ^a	682-700	GAAAGCCGAGAAGAACGC
<i>narG</i> -F ^a	1960-1977	TAYGTSGGSCARGARAA
<i>narG</i> -F GC ^b	1960-1977	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGTAYGTS GGSCARGARAA
<i>narG</i> -R ^a	2650-700	TTYTCRTACCABGTBGC
<i>nosZ</i> -F ^a	1169-1188	CGY TGT TCM TCG ACA GCC AG
<i>nosZ</i> -R ^a	1849-1869	CAT GTG CAG NGC RTG GCA GAA
<i>nosZ</i> -R GC ^b	1849-1869	CGG CGC GCC GCC CGC CCC GCC CCC GTC GCC CAT GTG CAG NGC RTG GCA GAA
<i>hzoA</i> -F ^a	9118-9138	TATGGGTATGTCGATGGCTGA
<i>hzoA</i> -F GC ^b	9583-9604	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGTATGGG TATGTCGATGGCTGA
<i>hzoA</i> -R ^a	9583-9604	CAACCAACGATCCATACCGAA

^a La posición de los oligonucleótidos en el gen *amoA* se expresa con referencia a la secuencia de *Nitrosomonas europaea*, basado en Rotthauwee et al., 1997; para el gen *pmoA* con referencia a la secuencia de *Methylococcus* sp., basado en Bourne et al., 2001; para el gen *narG*, basado en Philippot et al., 2002; para el gen *nosZ* se expresa con referencia a la secuencia de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 (número de acceso X65277), basado en Throbäck et al., 2004; para el gen *hzoA* se expresa con referencia a la secuencia de *Planctomycete* KSU-1, basado en nuestro diseño.

^b Oligonucleótidos con grapa

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

Para los análisis de TGGE, las amplificaciones con grapa de cada gen fueron aplicadas en geles de acrilamida; se utilizó un gradiente 56–66°C con 6% de acrilamida:*bis*-acrilamida (37.5:1) durante 13 h a 60 V. Posterior a la electroforesis, los geles fueron revelados en un baño de SYBR-Gold® con una dilución 1:1000 v/v durante 1 h. Las imágenes digitales fueron analizadas en el software *Quantity One*® de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc.). Posteriormente se cortaron las bandas visibles, se resuspendieron en 20 µl de agua destilada, se incubaron durante 24 h a 4°C y finalmente se realizaron amplificaciones con los oligonucleótidos específicos. Los productos de PCR se purificaron con el kit *Wizard*® *SV Gel and PCR Clean-Up System*, bajo las indicaciones del fabricante, y los amplificados posteriormente se secuenciaron por el método Dideoxy chain-termination, en un secuenciador modelo ABI 373A (Applied Biosystems, Perkin-Elmer) (Laboratorio divisional de Biología molecular, UAM Iztapalapa).

El porcentaje del contenido de GC en los genes puede variar entre 45 y 65%. De este modo, el patrón podrá mostrar un número determinado de bandas con variabilidad en la concentración de GC (tanto en términos de porcentaje como de la posición de los fragmentos

de GC en el gen) dependiendo de la variabilidad genética y la capacidad de carga del ambiente estudiado, este concepto también se expresó matemáticamente para describir la diversidad total de la muestra analizada. Los rangos ponderados de riqueza (R_r) se calcularon de la manera siguiente: $R_r = N^2 \times (T_g / 100^\circ\text{C})$, donde el cuadrado del número total de bandas (N) multiplicado por la fracción entre el gradiente de temperatura (T_g), que comprende entre la primera y la última banda del patrón y 100°C , que teóricamente es la temperatura máxima de desnaturalización. R_r se representó como el promedio y la desviación estándar para cada uno de los patrones de TGGE, en donde los rangos establecidos son: $R_r < 10$ se refiere a un nivel de riqueza bajo, cuando el valor de R_r se encuentra entre 10 y 30 el nivel de riqueza es medio y si $R_r > 30$ el nivel de riqueza de la comunidad será alto (Marzorati et al., 2008).

12.10. Análisis de datos moleculares

Las secuencias obtenidas fueron estudiadas con el programa *Bellerophon* que determina la posible existencia de quimeras (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-bel3_interface.cgi), descartándose esa posibilidad en las secuencias obtenidas. A continuación fueron comparadas mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con las secuencias contenidas en la base de datos *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). El alineamiento de las secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos se realizó mediante los programas BioEdit 3.2 y Phylip 4.0 (Jukes y Cantor, 1969; Guindon et al., 2010), respectivamente. Los árboles filogenéticos fueron trazados con el programa *Tree View* (Page, 1996).

12.11. Análisis estadístico

Los resultados experimentales fueron evaluados estadísticamente con un análisis de varianza seguido por una prueba de DUNCAN, usando el software SAS *Statistical Analysis* ANOVA MANOVA V.6.

RESULTADOS

13. Mineralización del carbono y nitrógeno después de la disposición de diferentes cantidades de biosólido en un suelo de alta salinidad (salinidad 3).

13.1. Caracterización fisicoquímica del biosólido

Para poder definir la cantidad de biosólido a disponer en el suelo, se necesitó caracterizar previamente el biosólido en relación con el nitrógeno, resultados que se presentan en la Tabla 13-1.

Tabla 13-1 Características fisicoquímicas del biosólido.

Parámetros medidos	Resultados
pH	7.2
Contenido de agua	970 g kg ⁻¹ biosólido
% de humedad	97
Nitrógeno total	11.5 g kg ⁻¹ biosólido seco
Nitrógeno amoniacal	4.52 g kg ⁻¹ biosólido seco
Carbono total	158.2 g kg ⁻¹ biosólido seco

El pH es neutro: el biosólido proviene de un tratamiento por digestión anaerobia termofílica. El biosólido es líquido, confirmado por el alto contenido en agua. El nitrógeno amoniacal representa 39.3% del nitrógeno total.

13.2. Caracterización fisicoquímica del suelo estudiado

Las características del suelo del área de estudio denominada "Salinidad 3" se presentan en la Tabla 13-2:

Tabla 13-2 Características fisicoquímicas del suelo (experimento 1).

Parámetros medidos	Resultados
pH	10.4
CE del extracto saturado	134.2 dS m ⁻¹
% de humedad	25
Densidad	1.3 g cm ⁻³
Nitrógeno total	1.12 g kg ⁻¹ suelo seco
Nitrógeno amoniacal	0.46 g kg ⁻¹ suelo seco
Carbono total	28.68 g kg ⁻¹ suelo seco

El pH revela la fuerte alcalinidad del suelo considerado y su alta conductividad eléctrica corrobora también una fuerte salinidad. La relación C/N equivale a 25.6:1, valor muy alto: en efecto en un suelo agrícola dicha relación es de 10:1. Se observa una baja concentración de amonio, que representa el 41.07% del nitrógeno total.

13.3. Mineralización del carbono y nitrógeno

El pH inicial de las muestras de suelo estudiado para los bioensayos fue 10.4 y este valor no cambió después de la adición de biosólidos. Sin embargo, se incrementó la conductividad eléctrica con la aplicación de biosólidos en el inicio del experimento, el cual se mantuvo constante posteriormente, a 134.2 dS m⁻¹.

La tasa de producción de CO₂ aumentó con la aplicación cada vez mayor de biosólido (Figura 13-1). Las emisiones de CO₂ derivan de la mineralización del biosólido: es decir, después de 90 días, la producción de CO₂ en el suelo adicionado con biosólido menos el suelo sin biosólido, fue de 366, 1232 y 2548 mg kg⁻¹suelo seco para los tratamientos C1, C2 y C3, respectivamente. Por lo tanto, un promedio de 59% del C orgánico en el biosólido se mineraliza en 90 días.

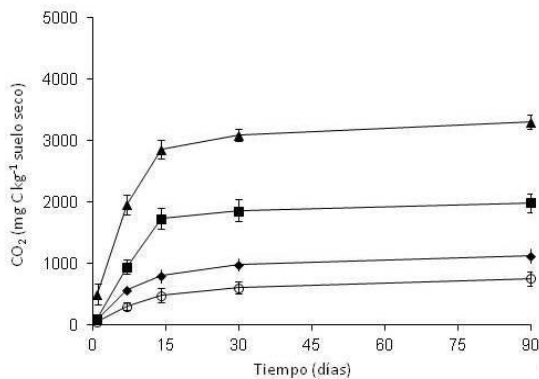


Figura 13-1 Producción de CO₂ (mg C kg⁻¹ suelo seco) del suelo sin biosólido (C0, ○) y del suelo con 66 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo (C1, ◆), 132 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo (C2, ■) o 265 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo (C3, ▲).

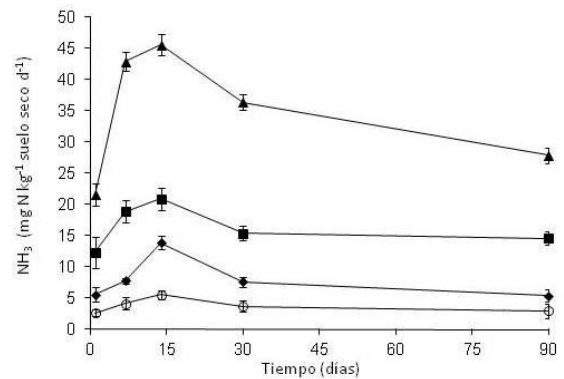


Figura 13-2 Volatilización de NH₃ (mg N kg⁻¹ suelo seco d⁻¹) del suelo sin biosólido (C0, ○) y del suelo con 66 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo (C1, ◆), 132 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo (C2, ■) o 265 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo (C3, ▲).

La tasa de volatilización de NH₃ también aumentó de forma directamente proporcional con el aumento de aplicación de biosólido (Figura 13-2). La concentración total de NH₃ volatilizado después de 90 días fue de 40.3, 82.2 y 174.4 mg N- NH₃ kg⁻¹ suelo seco para los tratamientos C1, C2, y C3, respectivamente.

Respecto al seguimiento de la dinámica del nitrógeno, el estudio estadístico de los promedios reveló una diferencia significativa entre cada tratamiento para las siguientes formas de nitrógeno: NH₃, N-NH₂, NH₄⁺ y NO₃⁻ (Tabla 13-3). En el caso del NO₂⁻, los bioensayos con biosólidos son diferentes del testigo, sin embargo no hay diferencia entre las tres concentraciones de biosólidos. La diferencia entre los tratamientos se confirma por el estudio estadístico representado por los diagramas de caja (Anexo 1).

Tabla 13-3 Comparación de las formas de nitrógeno con aplicación de diferentes cantidades de biosólido. F y p-value después del análisis de varianza.

	Control	C1	C2	C3	F	p-value
NH ₄ ⁺	22.96 ^a ±2.86	52.38 ^b ±2.92	113.58 ^c ±4.41	132.68 ^d ±4.31	578.54	0.00001
NO ₂ ⁻	3.42 ^a ±0.051	4.82 ^b ±0.269	4.76 ^b ±0.030	5.34 ^b ±0.400	34.22	0.001
NO ₃ ⁻	15.21 ^a ±0.416	17.84 ^b ±0.498	21.14 ^c ±0.312	22.94 ^d ±0.416	205.95	0.0001
NH ₃	23.22 ^a ±0.232	78.97 ^b ±0.712	157.47 ^c ±1.97	316.78 ^d ±12.60	1198.03	0.000001

(Medias con el mismo índice son estadísticamente iguales)

El seguimiento de las diferentes formas químicas del nitrógeno se presenta en la Figura 13-3. Después de la disposición del biosólido, se observó una mineralización del nitrógeno, ya que disminuyó la concentración de N-NH₂. La mineralización se observó más activa hasta el día 14, intervalo de tiempo en el cual se calcularon las velocidades de mineralización para cada tratamiento (Tabla 13-4). Después de este tiempo, la amonificación para cualquier concentración de biosólido disminuyó (Figura 13.3a).

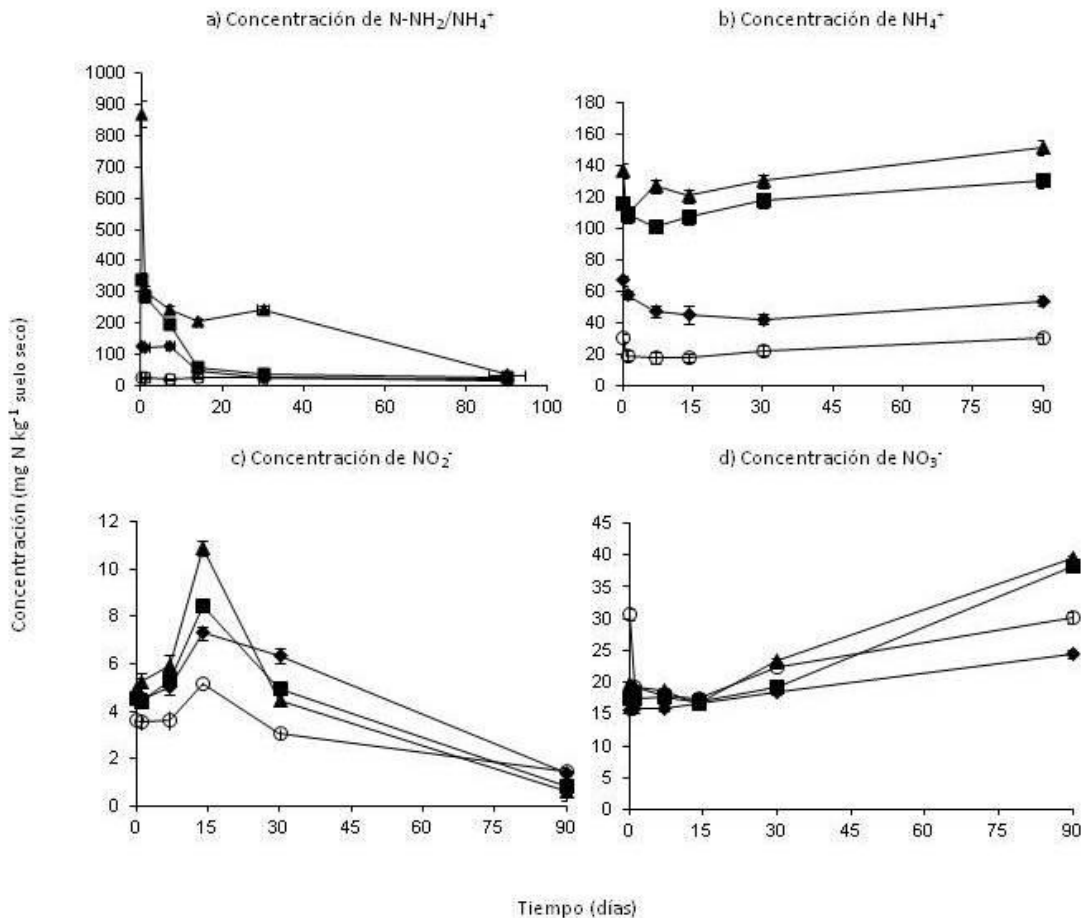


Figura 13-3 Concentración de a) N-NH₂/NH₄⁺, b) NH₄⁺, c) NO₂⁻ y d) NO₃⁻ (mg N kg⁻¹ suelo seco) en el suelo sin biosólido (C0, ○) y en el suelo con 66 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo (C1, ◆), 132 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo (C2, ■) o 265 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo (C3, ▲).

Tabla 13-4 Velocidad de mineralización del nitrógeno calculados para un periodo de 14 días (experimento 1).

Tratamiento	Porcentaje de N-NH ₂ mineralizado (%)	Tasa de mineralización (mg N kg ⁻¹ suelo seco d ⁻¹)	Coefficiente de Correlación (r ²)
C1	78.6	-5.39	0.746
C2	89.8	-19.11	0.986
C3	71.9	-32.33	0.447

Es importante señalar que a partir de 15-30 días los valores de NH₄⁺ son más altos que los de N-NH₂/NH₄⁺. En este caso, debe tenerse en cuenta el tipo de técnica analítica utilizada para su evaluación (análisis colorimétrico para N-NH₂/NH₄⁺ y análisis volumétrico de NH₄⁺), las cuales tienen una sensibilidad diferente en la determinación. Es probable que durante la titulación del NH₄⁺, los valores pudieran haber sido sobrestimados.

En cada uno de los tratamientos, las concentraciones de NH₄⁺ disminuyeron desde los primeros días de la incubación y aumentaron posteriormente (Figura 13.3b). Las concentraciones medias de NH₄⁺ aumentaron con la mayor aplicación del biosólido. Las concentraciones de NO₂⁻ aumentaron en cada uno de los tratamientos hasta los 14 días y disminuyeron después (Figura 13.3c). La media de concentración de NO₂⁻ fue 1.4 veces más grande en los tratamientos C1 y C2 y 1.6 veces mayor en el tratamiento C3, en comparación con el suelo sin biosólido. Las concentraciones de NO₃⁻ disminuyeron considerablemente en cada tratamiento durante el primer día y no cambiaron hasta el día 14 (Figura 13.3d). Las concentraciones de NO₃⁻ después de 14 días aumentaron en cada tratamiento: el mayor incremento se encuentra en el tratamiento C3 y el más bajo en el suelo sin biosólido.

La concentración de nitrógeno disponible en el biosólido presentó un valor promedio de 9.91 g kg⁻¹ biosólido seco (± 0.5), lo que representó el 86.4% de la cantidad total de nitrógeno contenido en el biosólido.

14. Dinámica microbiana después de la disposición de diferentes concentraciones de nitrógeno en un suelo de alta salinidad (salinidad 3).

Las figuras 14.1 y 14.2 muestran los cambios en la estructura y dinámica de la comunidad microbiana del suelo y su diversidad, a partir de la aplicación del biosólido. Los patrones de bandas del suelo y del biosólido fueron distintos. Por ejemplo, las bandas 140 y 170 pb son específicas del biosólido, mientras que la de 180 pb es específica para el suelo. Por otra parte, hay bandas que pueden ser comunes (como la 220 pb) pero presentan un comportamiento diferente. En el suelo, la intensidad de la banda 180 pb aumentó a partir del día 90, mientras que la intensidad de la banda 220 pb disminuyó. La banda 140 pb sólo fue detectable el día 1 (Figura 14.1).

En el suelo con biosólido a 66 y 132 mg de N-biosólido, la banda 180 pb apareció después de 90 días, aunque con una intensidad menor que en el suelo sin biosólido. Esta banda no apareció en el suelo adicionado con 265 mg de N-biosólido. La

intensidad de la banda 220 pb aumentó cuando la concentración de biosólido fue mayor. La presencia de las bandas 140 y 170 pb fue constante hasta 30 días con una intensidad mayor y proporcional al aumento de concentración del biosólido (Figura 14.2).

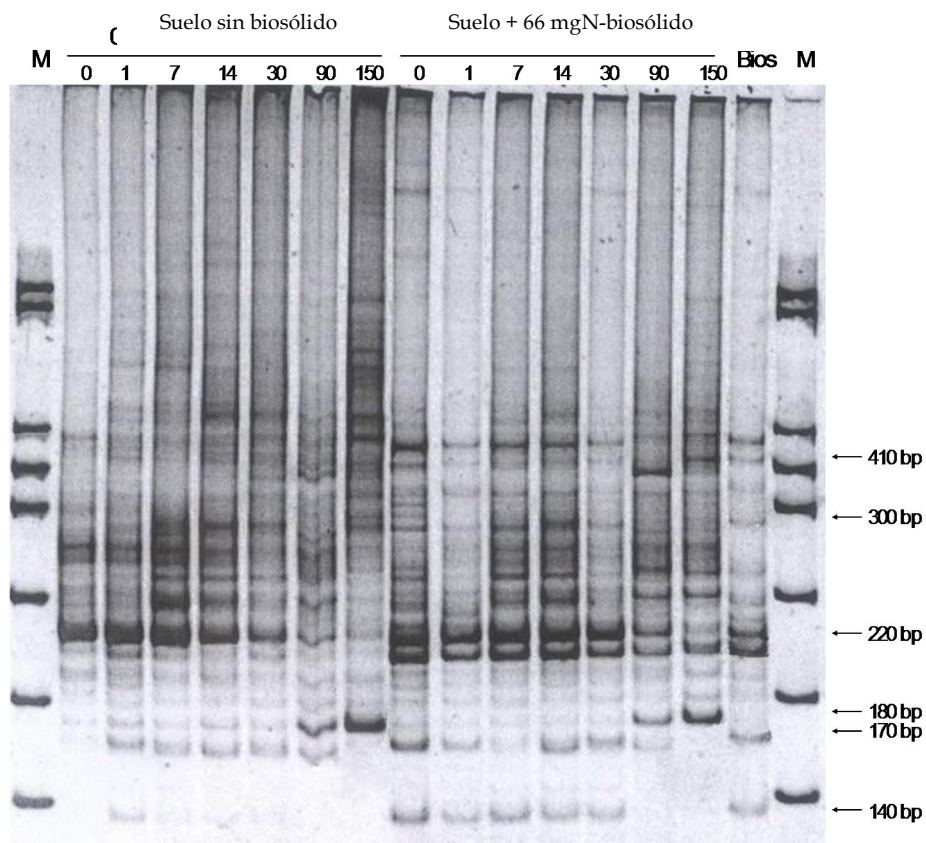


Figura 14-1 Comparación de los patrones RISA obtenidos del biosólido (Bios), del suelo sin biosólido (0) y del suelo añadido con 66 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo seco. M: marcador y por encima de los carriles se da los tiempos de muestreo en días.

El patrón de bandas del suelo tratado con 66 mg de N-biosólido fue una mezcla de los patrones del suelo y del biosólido (Figura 14.1). Esta observación se confirmó por comparación con los suelos adicionados con 132 y 265 mg de N-biosólido. La presencia del patrón de bandas del biosólido sobre el suelo aumentó al incrementar la carga de biosólido. Los cambios estructurales en las comunidades microbianas se relacionaron con la cantidad de biosólido dispuesto sobre el suelo. El gel RISA mostró que el patrón típico del suelo tratado con 132 mg de N-biosólido se alcanza después de 90 días. Sin embargo, 150 días no fueron suficientes para obtener el patrón típico del suelo en el patrón de bandas del suelo tratado con 265 mg de N-biosólido (Figura 14.2).

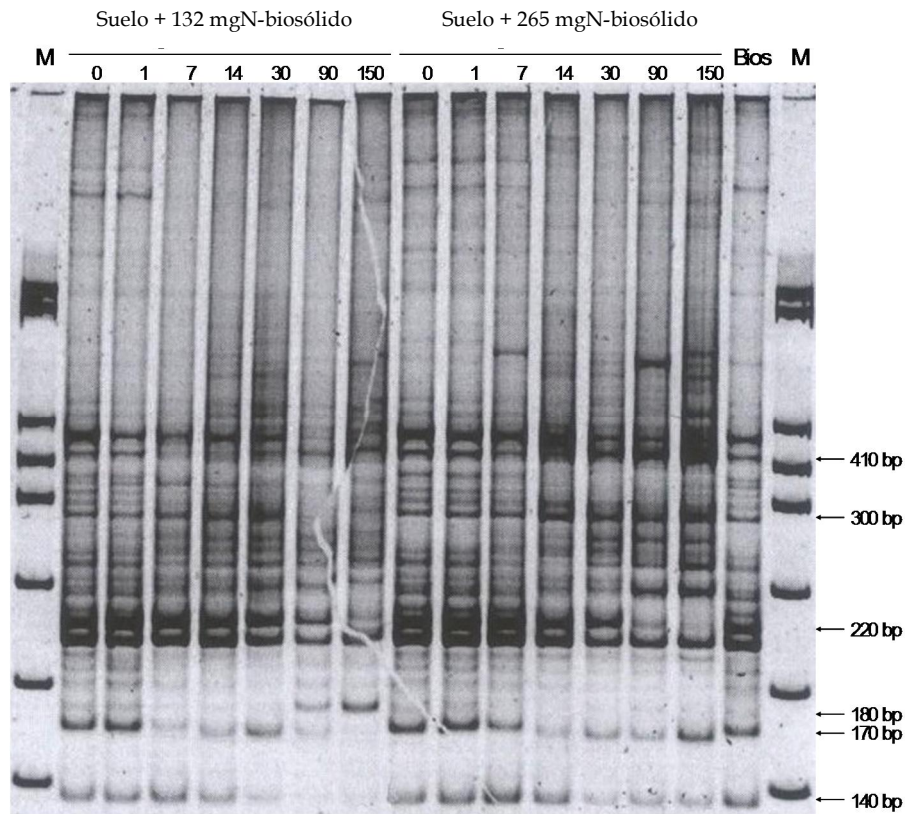


Figura 14-2 Comparación de los patrones RISA obtenidos del suelo añadido con 132 mg biosólido-N kg^{-1} suelo seco y 265 mg biosólido-N kg^{-1} suelo seco. M: marcador y por encima de los carriles se da los tiempos de muestreo en días.

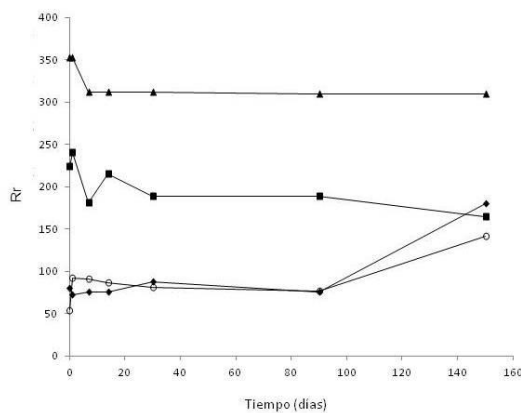


Figura 14-3 Comparación de los rangos ponderados de riqueza (R_r) del suelo sin biosólido (C0, ○) y del suelo con 66 mg biosólido-N kg^{-1} suelo (C1, ◆), 132 mg biosólido-N kg^{-1} suelo (C2, ■) ó 265 mg biosólido-N kg^{-1} suelo (C3, ▲).

El suelo sin biosólidos, así como el suelo con las diferentes concentraciones de biosólido presentaron una diversidad microbiana muy alta, ya que los rangos ponderados de riqueza (R_r) fueron superiores a 30 (Marzorati et al., 2008). También el biosólido obtuvo un R_r alto, de 353.

Los R_r indican que la mayor aplicación de biosólido (C3) aumentó la diversidad microbiana para todo el experimento al nivel de diversidad del biosólido. Sin embargo, la aplicación intermedia de biosólido (C2) tuvo sólo un efecto temporal, hasta el día 90 (Figura 14.3).

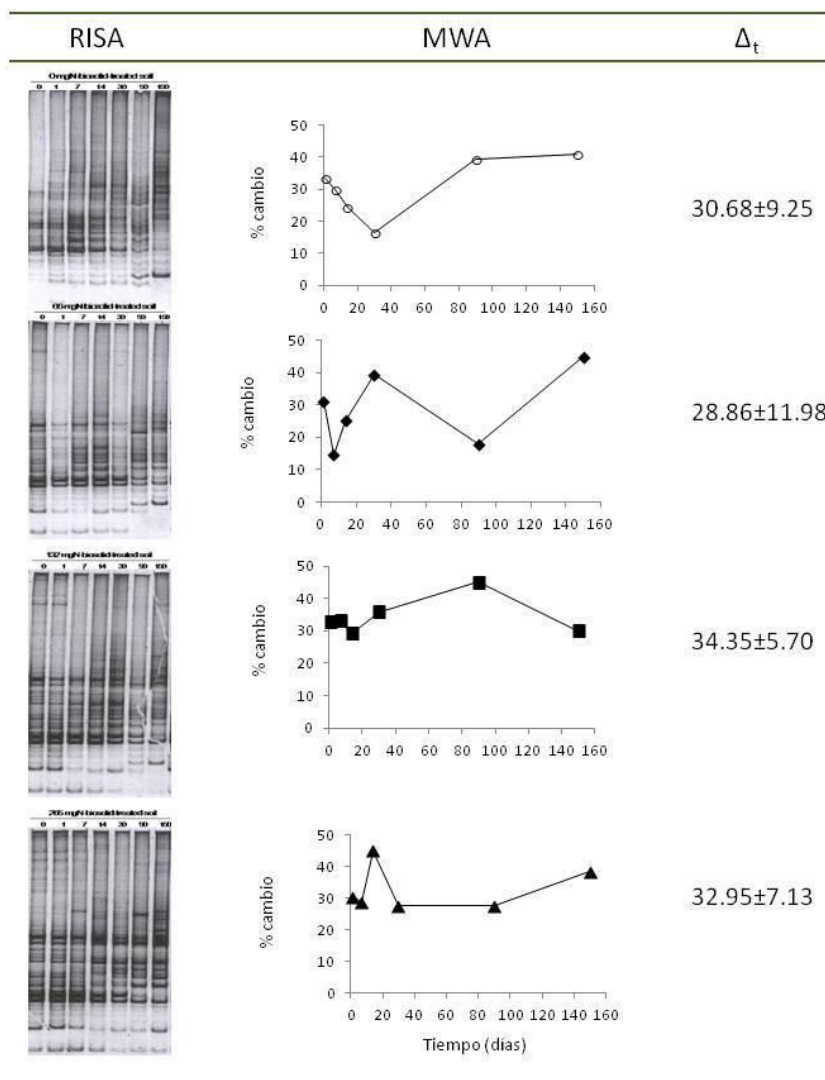


Figura 14-4 Perfiles de electroforesis RISA de los fragmentos del intergen ADN_r 16S y 23S ITS/IGS, *Moving Window Analysis* (MWA) y valores de la tasa de cambio porcentual (Δ_t), expresados como el promedio \pm desviación estándar, para evaluar el nivel de dinamismo de la comunidad bacteriana del suelo sin biosólido (C0, ○) y del suelo con 66 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo (C1, ◆), 132 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo (C2, ■) ó 265 mg biosólido-N kg⁻¹ suelo (C3, ▲).

Los niveles de la dinámica presentaron valores de tasa de cambio porcentual (Δ_t) mayores al 20% en cada patrón de bandas, del suelo y de los suelos tratados con 66, 132 y 265 mg de N-biosólido. Estos valores se correspondieron en todos los tratamientos con una dinámica alta (Figura 14.4). La aplicación intermedia de biosólido (C2) presentó una tasa porcentual de cambio mayor que para C1 y C3. Sin embargo, las desviaciones estándar no permiten diferenciar estadísticamente las tasas porcentuales de cambio de los tres tratamientos.

15. Mineralización del carbono y nitrógeno después de la disposición de un biosólido a una cantidad dada, en suelos con diferentes salinidades.

15.1. Caracterización fisicoquímica de los suelos estudiados

Las muestras de suelos obtenidas del área de estudio requirieron la determinación de las siguientes características por cada zona de estudio, los resultados de estos análisis se presentan en la Tabla 15-1.

Tabla 15-1 Características fisicoquímicas de los suelos estudiados (experimento 3).

	pH	CE _s dS.m ⁻¹	Porcentaje humedad %	Nitrógeno total	NH ₄ ⁺ -N g kg ⁻¹ suelo seco	Carbono total
Salinidad 1	9.6	34.2	28	1.09	0.75	48.7
Salinidad 2	10.2	63.4	19	1.16	0.69	37.8
Salinidad 3	10.4	134.2	25	1.12	0.46	28.68

CE_s Conductividad eléctrica en el extracto saturado

Los tres sitios elegidos para el presente estudio son fuertemente alcalinos. El menor valor de pH se presenta en el sitio 1 (*Salinidad 1*), el cual exhibe diversidad vegetal con una buena cobertura (Tabla 9-1). Por otra parte, en los sitios 2 y 3 se presenta una sola especie, el pasto salado *Distichlis spicata* que presenta características morfológicas y de densidad menores (Tabla 9-1).

Acerca de la conductividad eléctrica, en relación directa con la salinidad, los valores se corresponden con un suelo fuertemente salino. Existe entre los tres sitios un gradiente de concentración, el sitio 1 corresponde con la menor y el 3 con la mayor salinidad. Este gradiente también se observa en la diversidad y densidad vegetal de cada sitio.

La relación C/N presenta valores muy altos en comparación con un suelo agrícola: los valores del sitio 1 al 3 son, respectivamente, 44.6:1, 32.6:1 y 25.6:1. También la concentración de amonio representa una proporción elevada del nitrógeno total: 68.8, 59.5 y 40%, respectivamente.

Aunque el muestreo se hizo en dos estaciones climáticas diferentes, época de lluvia para el primer experimento y época de estiaje para el segundo, el sitio 3 presentó el mismo porcentaje de humedad. Cabe señalar que se registró escasa precipitación pluvial desde el primer muestreo.

15.2. Mineralización del carbono y nitrógeno

La cantidad de CO₂ presentó un incremento constante hasta los 90 días, debido a la adición de biosólido como ya se observó en el experimento 1 (Figura 15.1). La producción total de CO₂ de los suelos con biosólido fue de 6670, 7400 y 9810 mg kg⁻¹ suelo seco para los suelos S1, S2 y S3 respectivamente. 17.6, 19.6 y 26%, respectivamente, del carbono orgánico del biosólido se mineralizaron a lo largo de 90

días. Como ya se observó anteriormente, también en este experimento hubo una gran cantidad de NH_3 volatilizado (Figura 15.2). La volatilización total de NH_3 fue de 150.2, 208.6 y 244.8 mg kg^{-1} suelo seco para S1, S2 y S3, respectivamente.

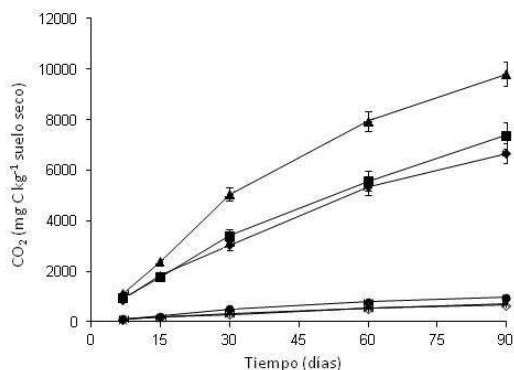


Figura 15-1 Producción de CO_2 (mg C kg^{-1} suelo seco) del suelo Salinidad 1 con CEs 34.2 dS m^{-1} (S1, ◆), Salinidad 2 con CEs 63.4 dS m^{-1} (S2, ■) o Salinidad 3 con CEs 129.2 dS m^{-1} (S3, ▲), Testigo Salinidad 1 (×), Testigo Salinidad 2 (*) y Testigo Salinidad 3 (●).

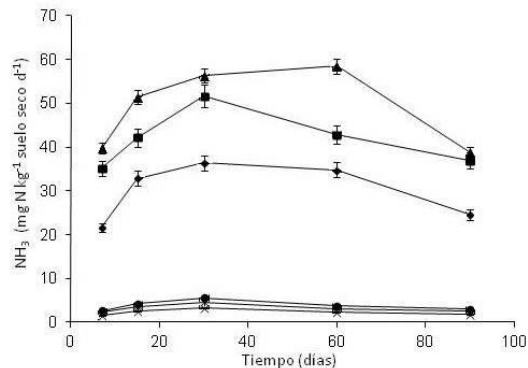


Figura 15-2 Volatilización de NH_3 (mg N kg^{-1} suelo seco d^{-1}) del suelo Salinidad 1 con CEs 34.2 dS m^{-1} (S1, ◆), Salinidad 2 con CEs 63.4 dS m^{-1} (S2, ■) o Salinidad 3 con CEs 129.2 dS m^{-1} (S3, ▲), Testigo Salinidad 1 (×), Testigo Salinidad 2 (*) y Testigo Salinidad 3 (●).

Después de la disposición del biosólido, se observó mineralización del N-NH_2 en los tres sitios (Figura 15.3a). La fase de amonificación más rápida se presentó desde el día inicial hasta el día 15, intervalo de tiempo en el cual se calcularon las velocidades de mineralización (Tabla 15-2). Particularmente para S1 y S2, se observó una mayor rapidez de mineralización del nitrógeno, así como un porcentaje de mineralización superior. Sin embargo, el suelo S3 (aunque más lento que los otros dos sitios) presentó una amonificación de N-NH_2 . También se apreció un equilibrio en los valores de NH_4^+ en el sitio 3, ya que su concentración varió poco, siendo diferente el comportamiento en S1 y S2, en los que hay un evidente consumo de amonio durante los primeros 30 días (Figura 15.3b). La acumulación de NO_2^- desaparece después de 14 días, y se correlaciona con el aumento simultáneo en la concentración de NO_3^- , como también se observó en el experimento 1. Al día 15, en el suelo S3 la concentración de NO_2^- fue mucho mayor que en los otros dos suelos, aún en los testigos: S3 presentó un incremento de acumulación de 315% *vs.* S1 y de 155% *vs.* S2.

Tabla 15-2 Velocidades de mineralización del nitrógeno en un periodo de 15 días (experimento 3).

Tratamiento	Porcentaje de N-NH_2 mineralizado (%)	Tasa de mineralización (mg N kg^{-1} suelo seco d^{-1})	Coefficiente de Correlación (r^2)
S1	70.4	-17.77	0.886
S2	75.0	-15.25	0.767
S3	68.5	-9.63	0.954

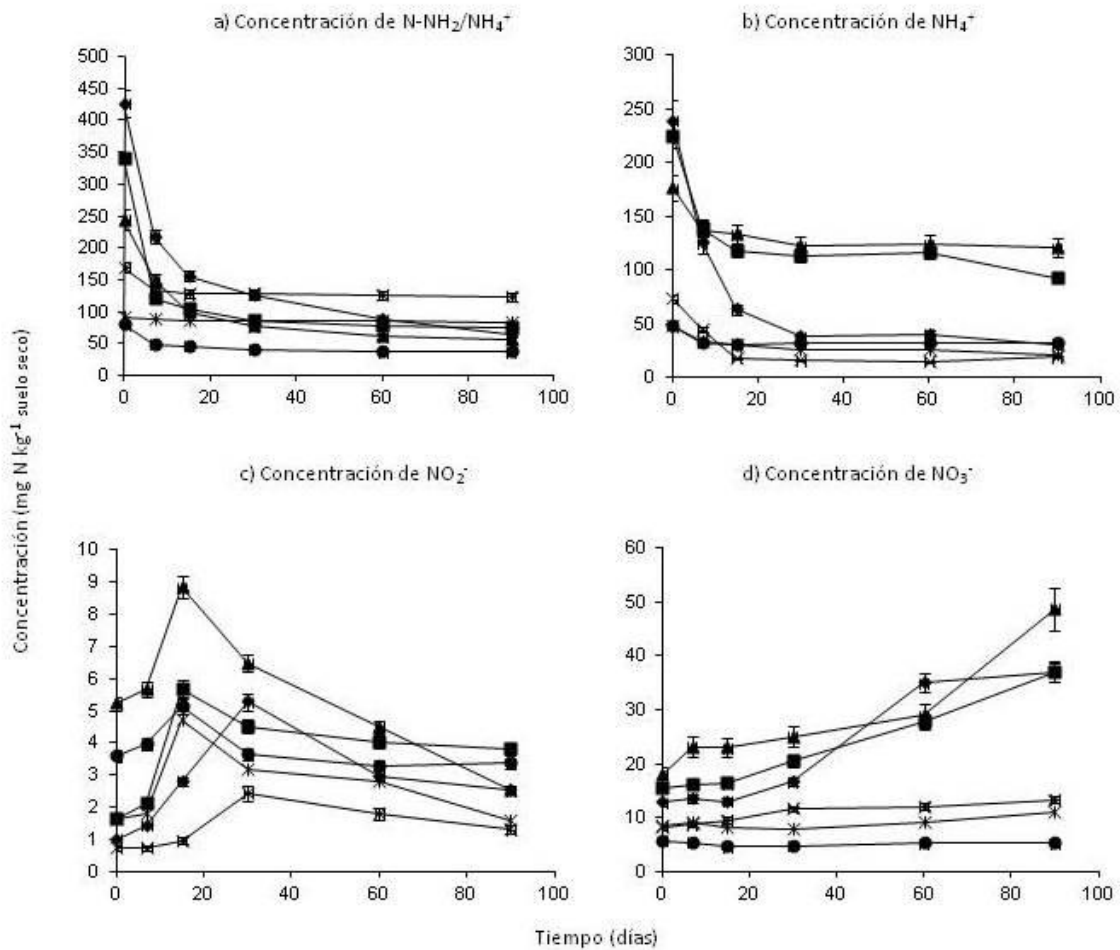


Figura 15-3 Concentración de a) $\text{N-NH}_2/\text{NH}_4^+$, b) NH_4^+ , c) NO_2^- y d) NO_3^- (mg N kg^{-1} suelo seco) del suelo Salinidad 1 con CE 34.2 dS m^{-1} (S1, \blacklozenge), Salinidad 2 con CE 63.4 dS m^{-1} (S2, \blacksquare) o Salinidad 3 con CE 129.2 dS m^{-1} (S3, \blacktriangle), Testigo Salinidad 1 (\times), Testigo Salinidad 2 ($*$) y Testigo Salinidad 3 (\bullet).

Respecto a la concentración de NO_3^- obtenido, ésta tendió a incrementarse en los últimos 40 días posteriores a la disposición del biosólido. El estudio estadístico permitió demostrar una producción global de NO_3^- mayor en el suelo S3, aun cuando la cantidad inicial de N-NH_2 fuera menor ($165.07 \text{ mg N kg}^{-1}$ suelo seco en S3 contra 256.68 y $247.17 \text{ mg N kg}^{-1}$ suelo seco en S1 y S2 respectivamente) (Figura 15.3a-d). El estudio estadístico mediante diagramas de caja revela una diferencia significativa entre cada bioensayo (S1, S2 y S3) y su testigo respectivo, para todas las formas medidas de nitrógeno. También, cada uno de estos tratamientos (S1, S2 y S3) son diferentes, con excepción de uno: en el caso del NH_4^+ , los bioensayos S2 y S3 no presentan diferencias significativas (Anexo 1).

Lo anteriormente dicho se confirmó mediante la elaboración de un balance para cada sitio entre los días de inicio y fin del experimento (Figura 15.4). De una misma aportación de N inicial se obtuvo un porcentaje final de NO_3^- equivalente a 5, 3.8 y 9% para S1, S2 y S3, respectivamente. También, para los sitios S1 y S2 se observó un porcentaje elevado de nitrógeno no medido.

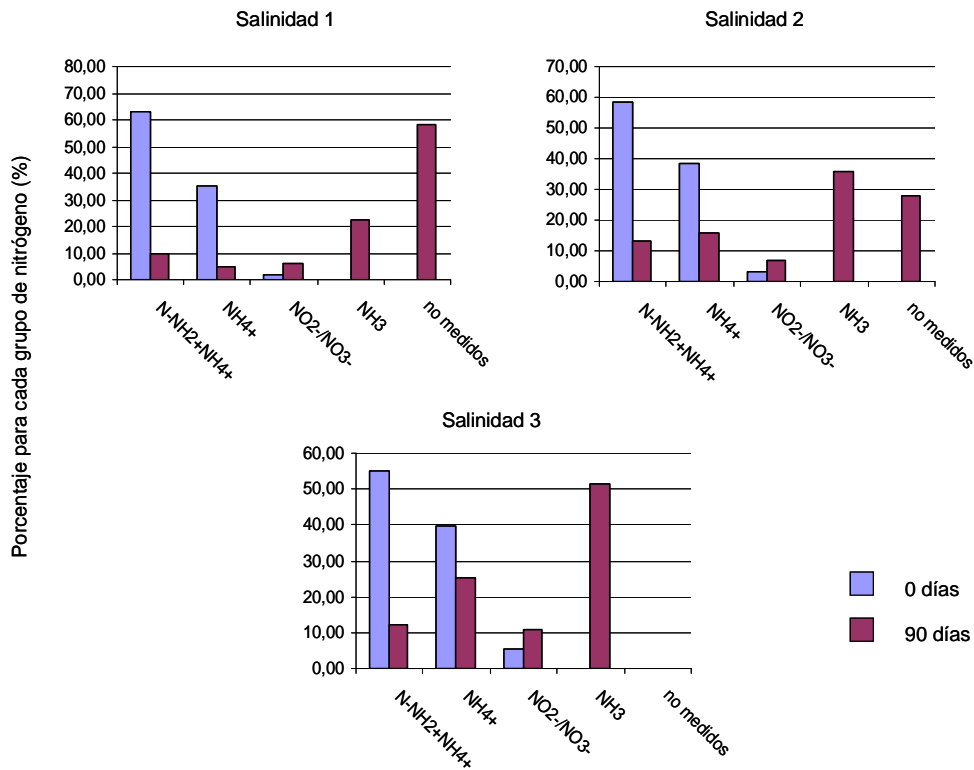


Figura 15-4 Balance de nitrógeno antes y después de la aplicación de biosólido en suelos de diferentes salinidades. Incubación aerobia a 25°C y humedad constante.

Para cada suelo, la cantidad de nitrógeno disponible en el biosólido fue similar, aunque el valor fue ligeramente inferior para S3, sitio de mayor salinidad (Tabla 15-3).

Tabla 15-3 Nitrógeno disponible del biosólido.

Tratamiento	N Disponible * (g.kg ⁻¹ biosólido seco)
S1	11.03
S2	11.19
S3	10.45

*(Ecuación 1 p.23)

16. Estudio preliminar de la diversidad funcional, nitrificante, desnitrificante y ANAMMOX en suelos con diferentes salinidades.

En cada muestra de suelo se identificó la presencia de los genes de función que codifican para las enzimas de la nitrificación (enzima específica: gen *amoA*; enzima no específica: gen *pmoA*, mismo gen específico para la comunidad metanótrofa), de la desnitrificación (genes *narG*, *nosZ*) y de la oxidación anaerobia del amonio, ANAMMOX (gen *hzoA*) (Figura 16.1). Los rangos ponderados de riqueza de cada gen de función estudiado fueron muy bajos, lo cual correspondería a una diversidad baja.

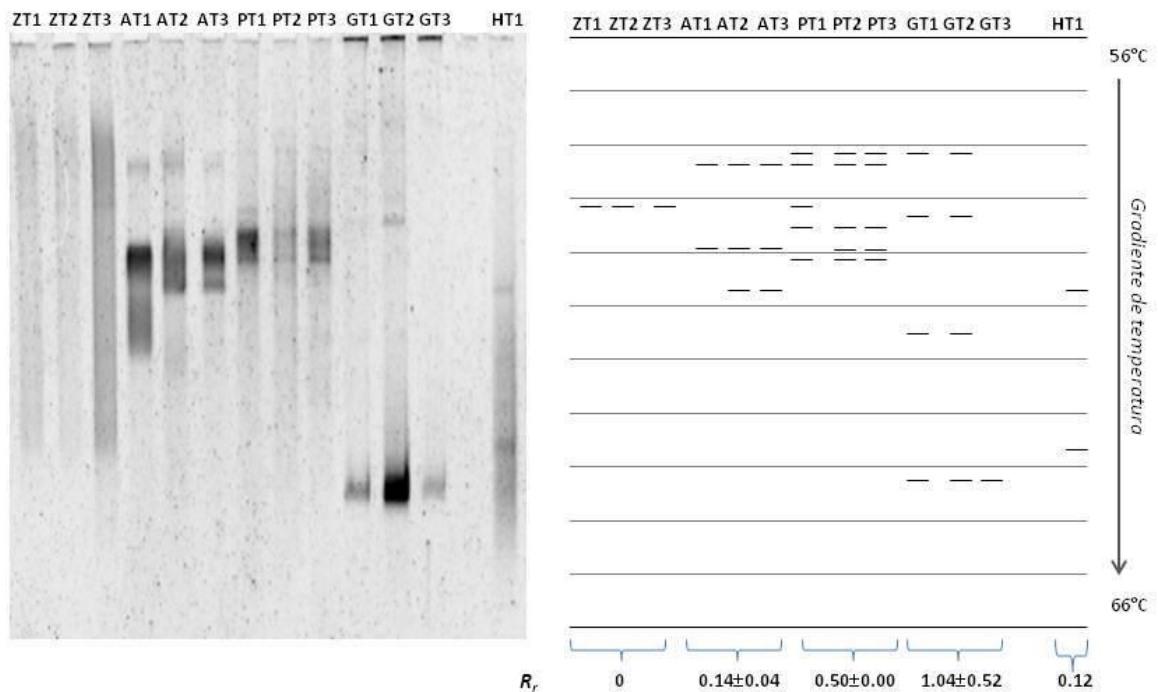


Figura 16-1 Patrones de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) con genes de función. *nosZ* del suelo salinidad 1, ZT1; *nosZ* del suelo salinidad 2, ZT2; *nosZ* del suelo salinidad 3, ZT3; *amoA* del suelo salinidad 1, AT1; *amoA* del suelo salinidad 2, AT2; *amoA* del suelo salinidad 3, AT3; *pmoA* del suelo salinidad 1, PT1; *pmoA* del suelo salinidad 2, PT2; *pmoA* del suelo salinidad 3, PT3; *narG* del suelo salinidad 1, GT1; *narG* del suelo salinidad 2, GT2; *narG* del suelo salinidad 3, GT3; *hzoA* del suelo salinidad 1, HT1; Valores ponderados de riqueza (R_r), promedio \pm desviación estándar. Las líneas horizontales representan un grado de temperatura entre 56 y 66°C.

Para cada gen de función, se cortaron y amplificaron las bandas obtenidas mediante TGGE. Posteriormente, se purificaron y secuenciaron. Los detalles para cada gen de función se presentan a continuación.

16.1. Función *Í nitrificación*, con los genes *amoA* y *pmoA*

Se obtuvieron 3 secuencias parciales del gen *amoA* y 4 del gen *pmoA*. Estas secuencias fueron analizadas individualmente mediante BLAST, para obtener secuencias con los mayores niveles de similitud que permitieran la construcción del dendrograma (Figura 16.2).

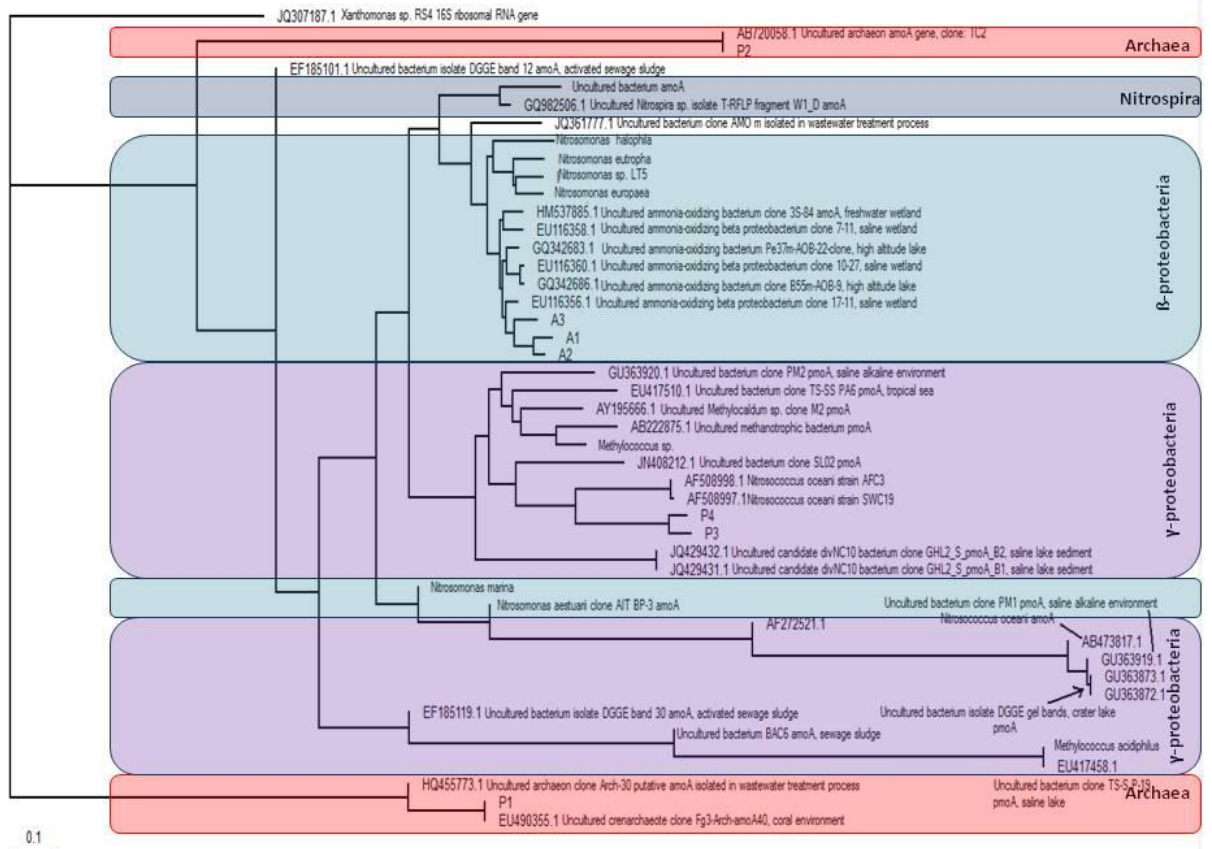


Figura 16-2 Dendrograma de los fragmentos del gen *amoA* y del gen *pmoA*. Comparación de secuencias de TGGE y secuencias tomadas del *GenBank*. Las distancias filogenéticas se determinaron por el análisis de Neighbor-joining. El gen ADNr 16S de *Xanthomonas* sp. JQ307187.1 fue usado como grupo externo. Las bandas del gen *amoA* son: A1, A2 aisladas de S1, S2 y S3; A3 de S2 y S3; del gen *pmoA*: P1, P3 y P4 de S1, S2 y S3; P2 de S1.

La diversidad del gen *amoA* es baja, ya que presenta un rango ponderado de riqueza de 0.14. No hay variación notable entre los 3 sitios analizados. Las 3 bandas aisladas (A1, A2 y A3) son vecinas en el dendrograma, y ellas mismas emparentadas con clonas de la clase β -proteobacterias aisladas de suelos salinos o de altitud elevada.

La diversidad del gen *pmoA* es baja y similar en los 3 sitios de salinidad diferente, ya que presenta un rango ponderado de riqueza de 0.50. Sin embargo, dicha diversidad es diferente y más alta que la del gen *amoA*. P1, una de las 4 bandas aisladas se acerca con el phylum Crenarchaeota del dominio Archaea, por el gen *amoA* de una clona proveniente de un ambiente marino. P2 se acerca también con el dominio Archaea por el gen *amoA* de una clona proveniente de un ambiente de composta. P3 y P4 pertenecen al mismo grupo (*cluster*) dentro del dominio Bacteria y de la clase γ -proteobacteria, siendo vecino de *Nitrosococcus oceani*. Aunque las bandas aisladas de *pmoA* son emparentadas con secuencias del gen *amoA* tomadas en el *GenBank*, no se ubican en los mismos *clusters* que las bandas aisladas de *amoA* de los suelos del ex lago de Texcoco.

16.2. Función *Í desnitrificación*, con los genes *narG* y *nosZ*

Se obtuvieron 4 secuencias parciales del gen *narG*. Estas secuencias fueron analizadas individualmente mediante BLAST, para obtener secuencias con los mayores niveles de similitud que permitieran la construcción del dendrograma (Figura 16.3).

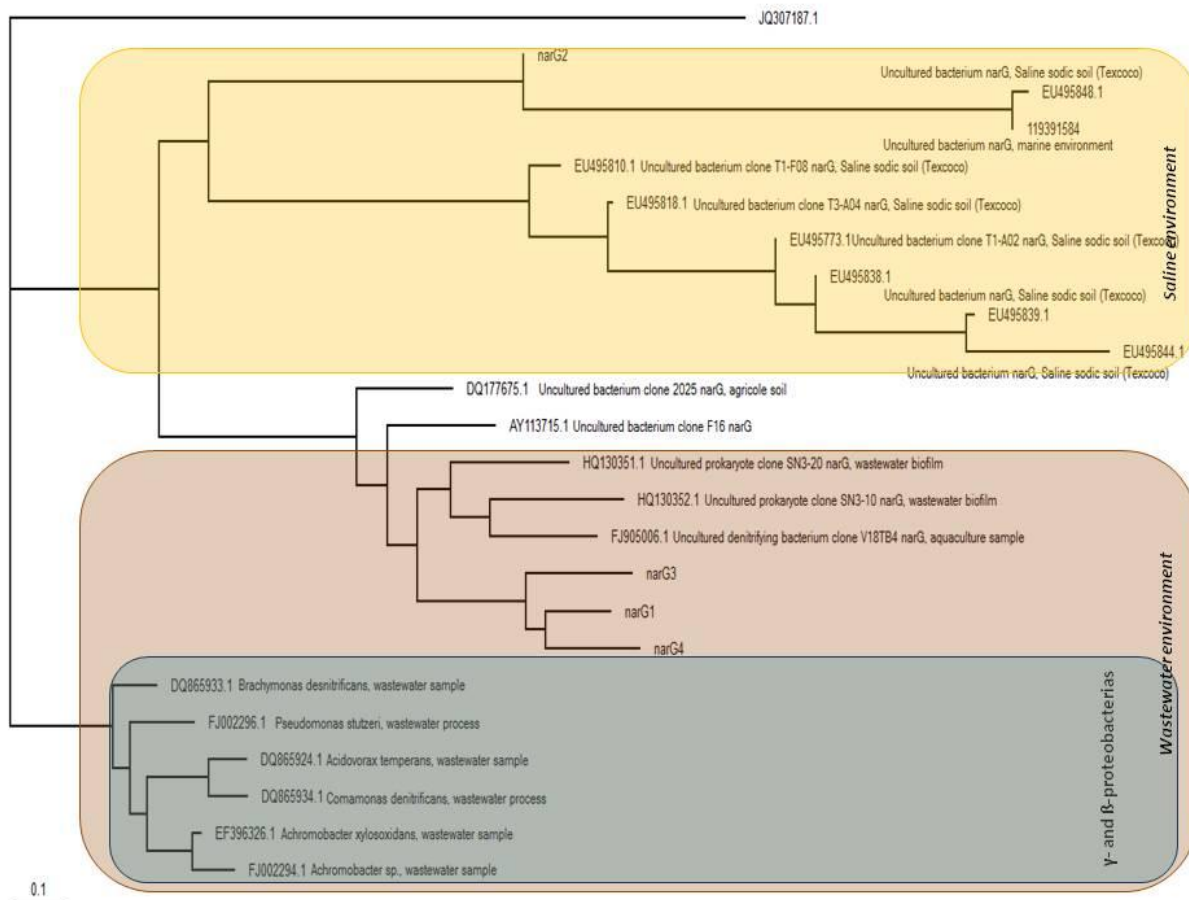


Figura 16-3 Dendrograma de los fragmentos del gen *narG*. Comparación de secuencias de TGGE y secuencias tomadas del *GenBank*. Las distancias filogenéticas se determinaron por el análisis de Neighbor-joining. El gen ADN_r 16S de *Xanthomonas* sp. JQ307187.1 fue usado como grupo externo. Las bandas del gen *narG* son: *narG1*, *narG2*, *narG3* y *narG4* aisladas de S1, S2. En S3 sólo se observa *narG4*.

La diversidad del gen *narG* es baja, ya que presenta un rango ponderado de riqueza de 1.04. Sin embargo, es el gen que presenta mayor diversidad de los estudiados. El suelo de salinidad más alta (salinidad 3) permitió la obtención sólo de una banda (*narG4*), mientras que las otras dos salinidades inferiores permitieron detectar a los 4 aislados. No fue posible emparentar las bandas analizadas con microorganismos identificados taxonómicamente; sin embargo, se pudieron establecer *clusters* en función del origen de las muestras ambientales. Tres de las bandas aisladas (*narG1*, *G3* y *G4*) son vecinas en el dendrograma dentro del dominio Bacteria, y ellas mismas pertenecen a un *cluster* grande de bacterias aisladas de ambientes de aguas residuales. La banda *narG2* se avecina en el *cluster* del gen *narG* a bacterias provenientes de clonas obtenidas en el ex lago de Texcoco.

En el caso del gen *nosZ*, se obtuvo sólo 1 secuencia parcial. Esta secuencia fue analizada individualmente mediante BLAST, para obtener secuencias con los mayores niveles de similitud que permitieran la construcción del dendrograma (Figura 16.4).

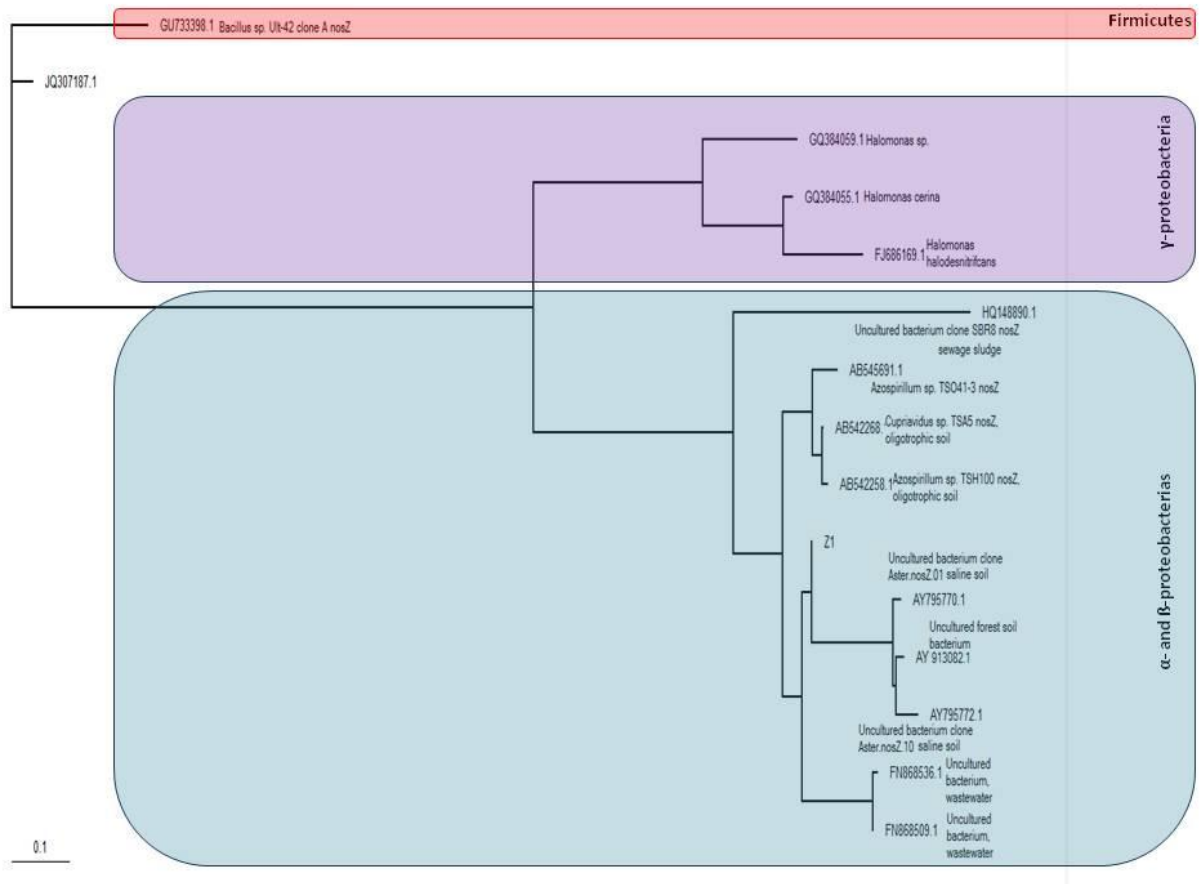


Figura 16-4 Dendrograma de los fragmentos del gen *nosZ*. Comparación de secuencias de TGGE y secuencias tomadas del *GenBank*. Las distancias filogenéticas se determinaron por el análisis de Neighbor-joining. El gen ADN_r 16S de *Xanthomonas* sp. JQ307187.1 se utilizó como grupo externo. La banda del gen *nosZ* es Z1 aislada de S1, S2 y S3.

La diversidad del gen *nosZ* es muy baja, ya que presenta sólo una unidad taxonómica. La banda aislada Z1 estuvo presente en los 3 suelos y es vecina de una bacteria de ambientes salinos, dentro de un *cluster* pertenecientes al phylum Proteobacteria ubicada en las clases α - o β -proteobacteria. Las bacterias emparentadas provienen de muestras de suelos oligotróficos, unos forestales, otros salinos, así como de aguas residuales.

16.3. Función Óxidación anaerobia del amonio (ANAMMOX), con el gen *hzoA*

Se obtuvieron 2 secuencias parciales del gen *hzoA*. Estas secuencias fueron analizadas individualmente mediante BLAST, para obtener secuencias con los mayores niveles de similitud que permitieran la construcción del dendrograma (Figura 16.5).

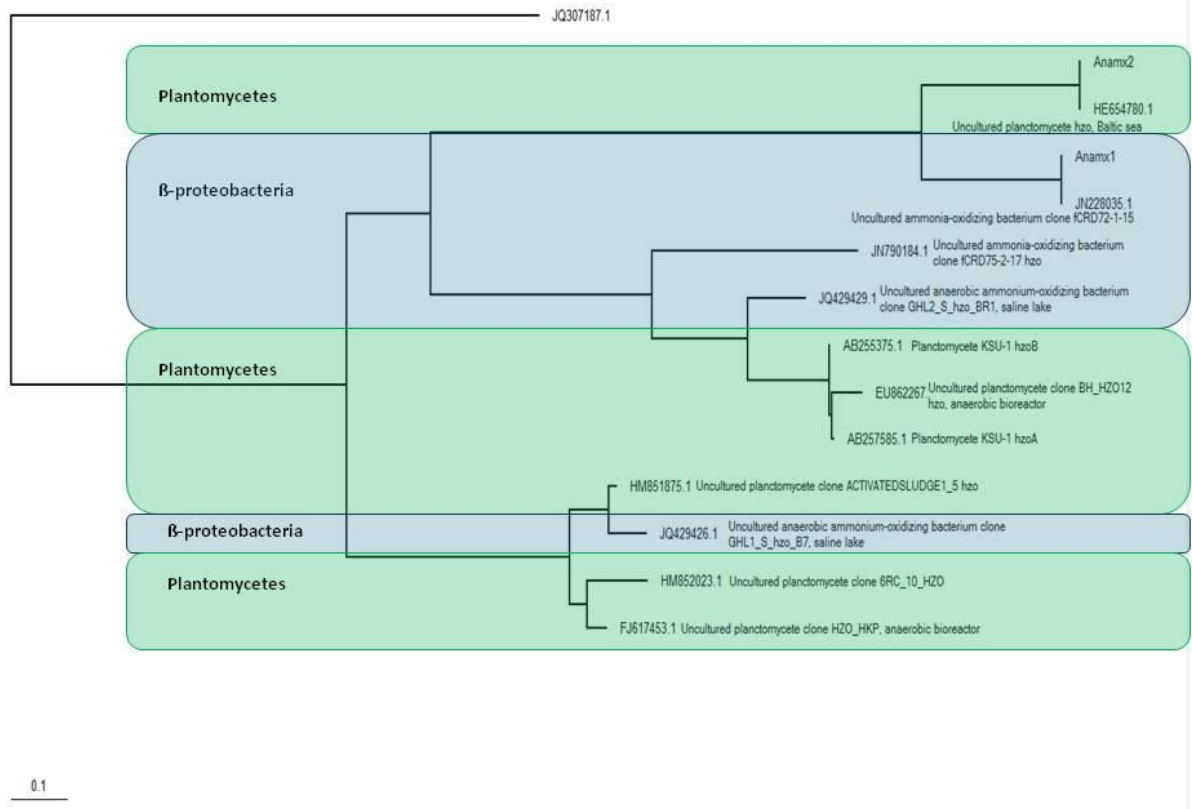


Figura 16-5 Dendrograma de los fragmentos del gen *hzoA*. Comparación de secuencias de TGGE y secuencias tomadas del *GenBank*. Las distancias filogenéticas se determinaron por el análisis de Neighbor-joining. El gen ADN_r 16S de *Xanthomonas* sp. JQ307187.1 fue utilizado como grupo externo. Las bandas del gen *hzoA* son: Anamx1 y Anamx2, aisladas sólo de S1.

La diversidad del gen *hzoA* es baja, ya que presenta un rango ponderado de riqueza de 0.12: es de los genes estudiados con la menor diversidad. Además sólo se pudo presenciar en el suelo de salinidad más baja (salinidad 1). Anamx1 es filogenéticamente cercana a una bacteria del orden Nitrosomonadales de la clase β -proteobacteria, proveniente de un ambiente marino (JN228035.1). Anamx2 está, por su parte, próxima a una bacteria del phylum Planctomycetes, de la clase Planctomycetia y del orden Planctomycetales, provenientes de un ambiente marino (HE654780.1).

16.4. Dinámica del nitrógeno y función microbiana en el ex lago de Texcoco

A partir de los resultados anteriores, se presenta una propuesta resumida de la dinámica del nitrógeno junto con la función microbiana en el suelo salino estudiado (Figura 16.6).

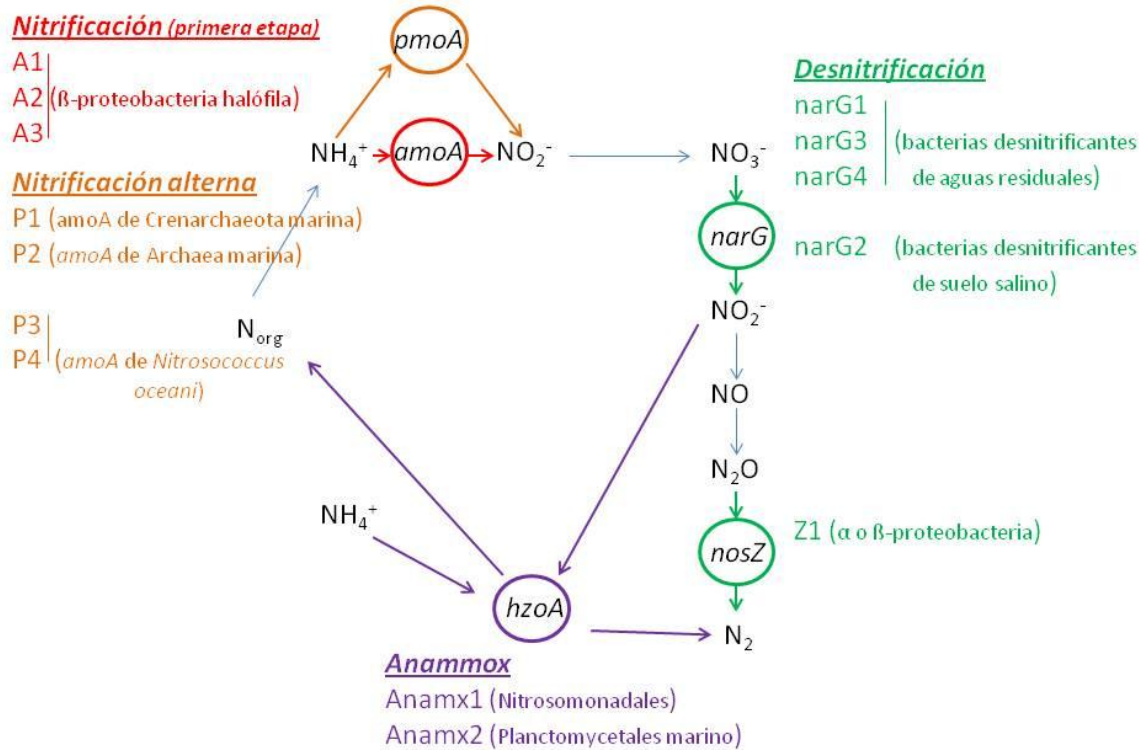


Figura 16-6 Propuesta de una posible dinámica del nitrógeno y función microbiana en el ex lago de Texcoco.

Se observa la presencia de microorganismos de los dominios Archaea y Bacteria con la característica de ser halófilos estrictos, así como la presencia de microorganismos del dominio Bacteria provenientes de ambientes tal como aguas residuales o biosólidos. Los genes representados en el diagrama expresan una función ecológica y sus repercusiones en un ambiente salino como lo es el ex lago de Texcoco.

La dificultad de amplificar algunos genes puede estar relacionada con el nivel de representación en la muestra ambiental, además de la presencia de sales, ácidos fúlvicos. Por otra parte, la baja densidad de genes en una muestra ambiental puede estar relacionada a una población funcional que tiene un bajo flujo de sustrato, en este caso el nitrato y el amonio.

DISCUSIÓN

17. Mineralización del carbono y nitrógeno después de la disposición de diferentes cantidades de biosólido en suelo de alta salinidad (salinidad 3).

La aplicación de biosólido en el suelo aumenta a menudo la conductividad eléctrica (CE) en el inicio de la incubación (Andreoli et al., 2001), como también se encontró en este experimento. Aproximadamente, el 60% del biosólido se mineralizó en 90 días. Los niveles más altos de mineralización fueron reportados por Beltrán-Hernández y colaboradores (1999), quienes encontraron que el 90% de biosólidos (incorporados al suelo de Texcoco) se mineralizó después de 70 días cuando se ajustó a 40% de la capacidad de retención de agua (CRA) y se incubó a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Franco-Hernández y colaboradores (2003) reportaron que el 28% de los biosólidos añadidos se mineralizaron en un suelo agrícola, cuando se incubaron a 40% CRA a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 42 días. Las diferencias en los porcentajes de mineralización podrían ser debidas a las condiciones de incubación, por ejemplo temperatura, composición de materia orgánica en los biosólidos y las características del suelo. Además, existe la posibilidad de un "efecto iniciador" (*Priming effect*), que se define como un cambio repentino y rápido de la materia orgánica del suelo debido a un tratamiento relativamente moderado, tal como la adición de un sustrato o microorganismos, la manipulación del suelo o incluso el incremento o la disminución de la humedad del suelo (Seybold et al., 1999; Kuzyakov et al., 2000). Este fenómeno ha sido ya descrito para los suelos del ex Lago de Texcoco, y puede haber contribuido a la mayor producción de CO_2 (Luna-Guido et al., 2001; Conde et al., 2005). Una parte del C orgánico de los biosólidos se mineraliza por microorganismos autóctonos (Wong y Lai, 1996; Coyne, 2000), mientras que el resto podría ser inmovilizado por los mismos microorganismos o retenido por el suelo (Beltrán-Hernández et al., 1999).

Cinco procesos diferentes (volatilización del NH_3 , fijación del NH_4^+ por arcillas, inmovilización del NH_4^+ por la biomasa microbiana, nitrificación y oxidación anaerobia del NH_4^+) afectan a las concentraciones de NH_4^+ en el suelo. A partir de la disposición de biosólido, grandes cantidades de NH_3 se volatilizaron en el suelo por su alto pH (Flowers y Arnold, 1983; Kirchmann y Witter, 1989; Tan, 2000). Si se considera que en el suelo añadido con biosólido, todo el NH_3 volatilizado se originó a partir del biosólido, entonces en promedio el 63% del N agregado se perdió en 90 días. Vega-Jarquín y colaboradores (2003) encontraron que aproximadamente $50 \text{ mg NH}_4^+\text{-N kg}^{-1}$ fueron adsorbidos en la matriz del suelo cuando se añadieron $200 \text{ mg NH}_4^+\text{-N}$, efecto que pudo ser debido a la presencia de silicatos (Orlov, 1992; Tan, 2000). La fijación de NH_4^+ en el suelo en el presente trabajo parece ser mucho menor, ya que la mayoría del NH_4^+ añadido era extraíble al comienzo de la incubación.

Algunos de los iones NH_4^+ se oxidaron a NO_2^- y NO_3^- , indicando la probable presencia de bacterias nitrificantes en el suelo. Sin embargo, la actividad funcional "nitrificación" fue baja. El aumento de la concentración de NO_3^- fue bajo, es decir, $<20 \text{ mg NO}_3^-\text{-N}$ en suelo seco, y grandes concentraciones de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ fueron detectadas a lo largo de la incubación. La actividad de las bacterias oxidantes de amonio (BOA), que son responsables de la primera etapa de nitrificación, es precedida de la de las bacterias

oxidantes de nitrito (BON). El aumento inicial de las concentraciones de NO_2^- se puede relacionar con un período de latencia de la actividad BON, es decir que no existe una conexión íntima entre éstas y las BOA. De Boer y Kowalchuk (2001) argumentaron que una asociación íntima entre las BOA y las BON permite facilitar la transferencia del NO_2^- para prevenir los posibles efectos tóxicos. Sin embargo, es necesario recordar que a un pH alto la disociación del ácido nítrico es prácticamente inexistente, por lo que la toxicidad del NO_2^- para los microorganismos es mínima (Sorokin y Kuenen, 2005). En lagos salinos sódicos, Sorokin y colaboradores (1998), así como Ward y O'Mullan (2000) han reportado BOA, como *Nitrosomonas halophila*, *N. europaea* y BON como *Nitrobacter alkalicus* sp. nov. y *N. winogradskyi*, respectivamente. El NO_2^- , por lo general, no se acumula en el suelo, ya que la oxidación del NH_4^+ es seguida inmediatamente por la oxidación del NO_2^- (Buckman y Brady, 1985; Madigan et al, 2004). Beltrán-Hernández y colaboradores (1999) observaron la misma acumulación de NO_2^- en suelos salinos sódicos sometidos a riego durante 5 años. Las grandes concentraciones de sal se sabe que inhiben la oxidación de NO_2^- (Oren, 2002). Además, las grandes concentraciones de NH_4^+ podrían haber inhibido la oxidación de NO_2^- (Buckman y Brady, 1985; Rice y Tiedje, 1989). Los aumentos de concentración de NO_2^- también podrían haberse debido a la desnitrificación en el inicio de la incubación, ya que el contenido de agua del suelo fue alto (especialmente en los tratamientos C2 y C3). Este parámetro también podría explicar la fuerte caída de las concentraciones de NO_3^- en el primer día.

El 60% de C añadido con el biosólido se mineralizó en 90 días, pero no dio lugar a grandes aumentos en la cantidad de N inorgánico; no obstante, el 86% del contenido total de N se encontró en una fracción fácilmente disponible. El biosólido tuvo una relación C/N de 13.7, que normalmente favorece la mineralización y no la inmovilización (Buckman y Brady, 1985). Sin embargo, en el suelo de Texcoco el N se encuentra agotado, por lo que parte del N mineralizado fue inmovilizado en la biomasa microbiana (Ramírez-Fuentes et al., 2002). Además, no pueden excluirse las pérdidas de NO_3^- debido a la desnitrificación durante los tres primeros días, ya que el contenido de agua fue alto después de la adición del biosólido.

El aumento de la producción de CO_2 se relacionó con la gran parte del biosólido que se descompone fácilmente. Esta producción es un reflejo del aumento de la actividad de la microbiota en presencia de nuevos nutrientes, y es seguida por una caída en la dinámica de la población debida al agotamiento de los nutrientes. Ekschmitt y Griffiths (1998) utilizaron la dinámica de respuesta para explicar este fenómeno, lo cual establece que las comunidades se desarrollan en un ambiente fluctuante en relación con su diversidad. Lenski y Riley (2002), así como Elena y Lenski (2003) observaron el mismo fenómeno en la evolución experimental realizado en un quimiostato. Encontraron que hubo un "óptimo metabólico" para el ecosistema con capacidad de carga, después de lo cual el microcosmo sufrió una adecuación en su estructura y diversidad microbiana, la cual disminuyó debido a la competencia de la población de rápido crecimiento con el resto de la comunidad.

18. Dinámica microbiana después de la disposición de diferentes concentraciones de nitrógeno en el suelo de alta salinidad (salinidad 3).

Los patrones de bandas RISA para el suelo y el biosólido fueron diferentes, lo que indica que, como era de esperar, la comunidad microbiana del suelo era diferente a la del biosólido. Los biosólidos mostraron una diversidad microbiana rica, ya que presenta un rango ponderado de riqueza (R_r) muy elevado de 353, basado en los intervalos propuestos para el gen ARNr 16S por Marzorati y colaboradores (2008). La diversidad incluso podría ser mayor, ya que el método de huella genética utilizado en este estudio tiene limitaciones, tales como (i) en el perfil de la comunidad sólo se representa a las poblaciones más abundantes, (ii) varias secuencias pueden estar contenidas en una sola banda de RISA y (iii) un solo organismo podría estar representado por varias bandas de RISA (Ranjard et al., 2000; Ben-Dov et al., 2006). Por lo tanto, el método de huella genética debe ser considerado sólo como un indicador del grado de diversidad de una comunidad bacteriana y no como una medida absoluta (Marzorati et al., 2008).

El patrón de bandas del biosólido se superpone a la del suelo de salinidad 3 (CE_s 134.2 $dS\ m^{-1}$). En la mayor concentración de biosólido, el patrón de este último predomina más intensamente. El R_r del biosólido es similar al del suelo con la concentración mayor de biosólido (C3). Martin-Laurent y colaboradores (2001) observaron también una modificación en la biodiversidad del suelo después de la aplicación de biosólidos. Los filotipos con baja densidad, específicos para el patrón de bandas del biosólido (140 y 170 pb), tienden a desaparecer en el suelo tratado con biosólido (C1 y C2). Este fenómeno está relacionado con la corta supervivencia de los microorganismos exógenos en el suelo, debido a su competición por los sustratos o por el nicho con los microorganismos autóctonos. Las condiciones fisicoquímicas del suelo (por ejemplo, la alcalinidad, salinidad y sodicidad) también fueron diferentes a las del biosólido, por lo que los microorganismos del biosólido (incluyendo los posibles agentes patógenos) podrían no haberse adaptado a las condiciones extremas del suelo estudiado (Oren, 2002).

Cuando diferentes cantidades del biosólido se añadieron se encontraron bandas similares, aunque con intensidades diferentes. Esta característica podría relacionarse con la abundancia relativa de las diferentes poblaciones, aunque la PCR no es cuantitativa (Cytryn et al., 2000). Por ejemplo, la desaparición de las bandas de 140 y 170 pb se dio de forma progresiva en el suelo tratado con 66 o 132 mg de N-biosólido (C1 y C2), pero no en el de 265 mg de N-biosólido (C3): en este caso, fue necesario un tiempo mayor a 150 días para que desaparecieran. Cualquiera que sea la cantidad de biosólido añadido, las bacterias provenientes del biosólido persistieron durante varios meses en el suelo, como lo indica el seguimiento de los R_r . Esto fue más evidente cuanto mayor fue la cantidad de biosólido añadido. Estas bandas estarían probablemente relacionadas con una "población activa" que metabolice sustrato carbonado fácilmente descomponible, sustrato abundante en el biosólido. Tal vez esta población activa sea la responsable de la producción instantánea de CO_2 al inicio de la incubación, y disminuiría cuando el sustrato fácilmente descomponible se hubo consumido. Posteriormente, llega a ser dominante una población (asociada con la banda de 180 pb) que consume materia orgánica menos degradable o productos de degradación de la materia orgánica de fácil descomposición. Estos cambios, observados especialmente en

la concentración C2, se confirmaron con una tasa porcentual de cambio mayor a la de las otras dos concentraciones. Sin embargo, la aplicación de sustrato que se descompone fácilmente en el tratamiento C3 fue tal que la banda 180 pb no apareció. La respuesta observada puede estar relacionada con la resiliencia del suelo (capacidad de un suelo para recuperarse de la perturbación): los cambios en la diversidad no siempre se asocian con el cambio de la tasa de descomposición (Griffiths et al., 2004; Girvan et al., 2005). Sería interesante investigar con los recursos económicos suficientes, a qué grupo de bacterias corresponde esta banda en particular, usando la clonación y secuenciación de ADN, y comparar esta información con las bibliotecas disponibles de la región RISA.

19. Mineralización del carbono y nitrógeno después de la disposición de un biosólido a una cantidad dada, en suelos con diferentes salinidades.

La respiración del suelo con mayor salinidad (sitio 3) fue superior durante los 90 días a la de los otros suelos, lo que puede ser indicador de una mayor densidad y diversidad de microorganismos autóctonos en el sitio 3 (Hofman et al., 2003). Aun así, deben considerarse los límites de la técnica usada para evaluar la respiración, por lo que se podría haber agregado otro control adicional: determinar la producción de CO₂ en un microcosmos constituido por suelo con aplicación de biosólido estéril. No existe, sin embargo, una técnica de medida de la respiración totalmente confiable, lo que hace que la interpretación de nuestros resultados deba hacerse con mucha precaución, aun considerando que el coeficiente de CO₂ producido como un buen parámetro indicador de la calidad del suelo (Bol et al., 2003; Hofman et al., 2003). El fenómeno de “efecto iniciador” no se observó en este experimento, ya que la cantidad de biosólido fue menor a la Concentración 3 y los tiempos de medición empezaron a partir del día 7.

Durante el tiempo de experimentación, se observó la volatilización del NH₃ (especialmente en los sitios 2 y 3, donde el aumento de volatilización fue del 138 y 163%, respectivamente). El pH alcalino del suelo, mayor para S2 y S3, favoreció este fenómeno, que se relaciona con el valor pK_a de la reacción de disociación de NH₄⁺/NH₃, el cual es de 9.26 (Flowers y Arnold, 1983; Kirchman y Witter, 1989; Tan, 2002).

En la dinámica del N, la disminución de la velocidad de mineralización observada está probablemente relacionada con el gradiente de salinidad desde el sitio 1 al 3, lo que podría influir sobre la actividad microbiana. Sin embargo, la tasa de mineralización en los tres sitios es similar, por lo que los tres suelos presentan actividad amonificante. Se ha descrito que la disponibilidad de los nutrientes, y en sí los aceptores y donadores de electrones, es muy baja en estos tipos de suelos (Beltrán-Hernández et al., 1999; Rojas-Oropeza et al., 2010). Tampoco la existencia de un gradiente de cualquier compuesto parece influir tanto sobre un cambio en la diversidad microbiana (Foti et al., 2008; Abed Raeid et al., 2012). Por lo tanto, es muy probable que la actividad amonificante, en este caso, sea la misma en los tres sitios, aunque más rápida en el suelo con salinidad más alta. Como en el experimento 1, la amonificación observada del N-NH₂ no resultó en el sitio 3 en una variación de la concentración de NH₄⁺. Sin embargo, sí se observó una disminución de NH₄⁺ en los sitios 1 y 2 (aunque menos en e este último caso). Esto se explica mediante el recambio entre la parte oxidada por la actividad bacteriana nitrificante (mayor en los sitios 1 y 2), la volatilizada debido a las condiciones químicas

del suelo y la producida por la actividad microbiana amonificante (sin olvidar la fijación del NH_4^+ , inmovilización del NH_4^+ y la oxidación anaerobia del NH_4^+).

Respecto de la producción observada de NO_2^- (acumulación de NO_2^- hasta los 14 días), en ambos experimentos se revela una actividad de las BOA, bacterias responsables de la primera etapa de la nitrificación (De Boer y Kowalchuk, 2001). La acumulación de NO_2^- se relaciona muy probablemente con un tiempo de latencia de la actividad de las BON: este tiempo de respuesta sería debido al medio extremo de este suelo, ya que una conductividad eléctrica elevada afecta a las BON (Jiménez-Morales y Dendooven, 2001). Esto puede explicar por qué a los 15 días, la concentración de NO_2^- en el suelo con salinidad S3 es mucho mayor que en los otros suelos. Sin embargo, no parece destacar una posible inhibición por las altas concentraciones de NH_4^+ o la producción de NO_2^- por desnitrificación.

En este experimento, la mayor producción global de NO_3^- ocurrió en el suelo S3, probablemente debida a la presencia de bacterias halófilas alcalófilas nitrificantes. Sorokin y colaboradores (1998) lograron aislar 5 cepas de bacterias halotolerantes capaces de oxidar nitrito en nitrato a partir de sedimentos de tres lagos sódicos (Kunkur Steppe, Siberia, lago de un cráter y Lago Nakuru, Kenya): dichas bacterias fueron identificadas dentro del género *Nitrobacter*. Además, el balance de N confirmó una mayor función nitrificante con la mayor salinidad. Es posible que en nuestro caso se esté observando la actividad nitrificante del consorcio autóctono extremo, necesariamente debida a las BOA y BON conocidas de proteobacteria (Nicol et al., 2008).

Mediante la elaboración de un balance de N entre los días inicial y final se observó en general un porcentaje elevado de nitrógeno no medido, que corresponde a una pérdida de nitrógeno durante el análisis que podría relacionarse con la desnitrificación, la lixiviación (Nicol et al., 2008), la oxidación anaerobia del NH_4^+ (Saricheewin et al., 2010) y/o, por otra parte, con la fijación de NH_4^+ a partículas del suelo como los silicatos (Rojas-Oropeza et al., 2010). Cabe mencionar que el extracto de suelo obtenido tiene capacidad de recuperar el NH_4^+ soluble e intercambiable, por lo que se excluiría el NH_4^+ fijado. Durante el experimento 3, el microcosmo con suelo muestreado en el sitio 3 no presentó pérdida de NH_4^+ como en el experimento 1 (datos no mostrados). Esto pudo deberse a que la aireación del suelo pudo ser mayor en el experimento 3, disminuyendo la respiración anaerobia del nitrógeno (la desnitrificación) y la oxidación anaerobia del NH_4^+ . Sin embargo, para confirmar esa hipótesis, hubiera sido necesario determinar el flujo de oxígeno o el potencial redox del suelo.

20. Estudio preliminar de la diversidad funcional, nitrificante, desnitrificante y ANAMMOX en suelos con diferentes salinidades.

Los rangos ponderados de riqueza (R_r) de cada gen de función estudiado mostraron una diversidad microbiana baja, ya que presentan valores inferiores a 10 (Marzorati et al., 2008). Sin embargo, la diversidad podría ser mayor, por varias razones (i) los intervalos citados por Marzorati y colaboradores (2008) son para el gen universal ADNr 16S, (ii) el método de huella genética utilizado en este estudio tiene las mismas limitaciones descritas anteriormente para RISA (Ranjard et al., 2000; Ben-Dov et al., 2006), y (iii) la técnica de librería de clonas presenta una mayor sensibilidad para la

identificación de cada filotipo (Alcántara-Hernández et al., 2009). Sin embargo, el método de huella genética es un buen acercamiento para el estudio de una comunidad bacteriana, sin ser una representación completa (Marzorati et al., 2008). Cabe destacar que el gen *narG* presenta una diversidad baja, pero mayor a la de los otros genes estudiados, lo cual se relaciona con la alta repartición de dicho gen en el ambiente (Philippot et al., 2002). El gradiente de salinidad tampoco se pudo relacionar con una diversidad microbiana distinta.

En el caso de la función “nitrificante”, se identificaron tres filotipos con la función *amoA* pertenecientes a la clase β -proteobacteria. Probablemente, estas clonas representan a microorganismos autóctonos, ya que se asemejan a clonas aisladas de suelos salinos (Dorador et al., 2008). Dos filotipos con la función *pmoA* fueron asociados con el dominio Archaea, y una especialmente con el phylum Crenarchaeota. Es importante resaltar la importancia del dominio Archaea: estudios de metagenoma han revelado la importancia funcional de crenarqueas mesofilicas en la oxidación aerobia del amonio (Prosser y Nicol, 2008). Otros dos filotipos con la función *pmoA* se asociaron al dominio Bacteria, en específico con la clase γ -proteobacteria. Probablemente estos 4 microorganismos son igualmente nativos del sitio del ex lago de Texcoco, ya que se emparentan con microorganismos marinos (Ward y O'Mullan, 2002; Siboni et al., 2008).

En el caso de la función “desnitrificante”, se aislaron cuatro filotipos con la función *narG* pertenecientes al dominio Bacteria; sin embargo no fue posible una identificación más precisa. Probablemente un filotipo representaría a un microorganismo autóctono, ya que se asocia cercano con clonas aislados de suelos salinos de la zona irrigada del ex lago de Texcoco (Marsch-Moreno et al., 2008); los otros tres provienen del riego de aguas residuales del sitio, ya que se agrupan con bacterias de aguas residuales (Mohanakrishnan et al., 2010). Un filotipo con la función *nosZ* es del dominio Bacteria, del phylum Proteobacteria. Probablemente este microorganismo es autóctono del sitio del ex lago de Texcoco, ya que se emparenta con microorganismos marinos y otros de suelos oligotróficos (Eilmus et al., 2004; Ishii et al., 2011).

En el caso de la función “oxidación anaerobia del amonio”, se identificaron dos filotipos con la función *hzoA* pertenecientes al dominio Bacteria: uno del orden Nitrosomonadales del phylum Proteobacteria y el otro del orden Planctomycetales del phylum Planctomycetes. Probablemente, los dos filotipos representarían a microorganismos autóctonos, ya que se agrupan con microorganismos marinos y por lo tanto muy probablemente halófilos (Kong et al., 2011; Klawonn et al., 2012).

21. Discusión general

El suelo del ex lago de Texcoco es un ambiente extremo, es salino sódico y tiene por tanto condiciones restrictivas para el asentamiento de la vida. El presente estudio pretendió trabajar con un sitio de mayor concentración de sal, representativo de un ambiente hipersalino, por lo tanto se buscó el punto más bajo del antiguo lago para intentar esclarecer las condiciones de vida en este tipo de ambiente, teniendo como modelo la dinámica de los microorganismos ligados intrínsecamente al ciclo del nitrógeno. Una de las condicionantes de los ambientes extremos es la disponibilidad de nutrientes, que ligado a otros parámetros estresantes componen los factores selectivos para el asentamiento de los microorganismos autóctonos (los encargados y capacitados

para movilizar todos los ciclos biogeoquímicos que darán el soporte a las formas de vida superior de estos ambientes).

Los resultados han mostrado que en estos suelos el nitrógeno disponible tiende a ser bajo, no importando cuánto nitrógeno se disponga sobre los suelos. Por ejemplo, se observa que en el experimento 1 se mineralizó el 60% del biosólido, sin que esto diera lugar a grandes aumentos en el N inorgánico (aunque el 86% del contenido total de N era fácilmente disponible). Parte de este nitrógeno pudo pasar a NH_3 volatilizado (posiblemente el 63% del N agregado), otra parte como NH_4^+ adsorbido en la matriz del suelo por efecto de los silicatos (Vega-Jarquín et al., 2003), otra parte del N mineralizado pudo ser inmovilizado en la biomasa microbiana (Ramírez-Fuentes et al., 2002; Alcántara-Hernández, 2009), además de las posibles pérdidas de NO_3^- debido a la desnitrificación o de NH_4^+ por oxidación anaerobia durante los tres primeros días.

Según el análisis de los resultados obtenidos, se propone un diagrama de flujo y dinámica del nitrógeno en el suelo salino sódico del ex lago de Texcoco, el cual comparamos con el ciclo del nitrógeno en un suelo de tipo molisol: según la taxonomía de suelos de USDA (USDA, *United States Department of Agriculture*) se caracteriza por tener horizontes superiores de pH neutro, ricos en materia orgánica, profundos, oscuros, granulares, blandos y ricos en bases; se encuentra principalmente en ecosistemas de grandes praderas (Smith y Smith, 2002). La mayor diferencia entre estos dos ecosistemas es la volatilización muy alta del NH_3 en el suelo extremo del ex lecho lacustre de Texcoco junto probablemente con la mayor fijación del NH_4^+ a los silicatos presentes (Figura 21-1).

Los suelos con diferentes grados de salinidad tratados con altas concentración de nitrógeno en los biosólidos mostraron solamente un proceso de reacción transitiva (en periodos de hasta cinco meses), tanto en los análisis fisicoquímicos, el comportamiento de las comunidades microbianas autóctonas (análisis con RISA) y el análisis de los genes de función (*amoA*, *narG*, *nosZ*, *hzoA*, *pmoA*). Dicha transición se puede conjuntar a la capacidad de resiliencia del suelo para responder y restablecer su estado inicial, después de la acción de cualquier parámetro de estrés (Girvan et al., 2005).

Los sistemas salinos sódicos son ambientes extremos con una diversidad microbiana de media a alta pero muy estables en función del tiempo. Al instante de agregar aguas residuales o bien biosólidos sobre los suelos del ex lago de Texcoco, se esta realizando una adición de nutrientes pero también una inoculación de microorganismos que en su mayoría son heterótrofos, incapaces de adecuarse y sobrevivir a las condiciones extremas del suelo. El patrón de bandas del biosólido se superpone al del suelo por lo menos durante 3 meses, tiempo que varía en función de la concentración del biosólido añadido. El regreso progresivo al patrón de bandas del suelo confirma la estabilidad de la microbiota del ambiente extremo (Martin-Laurent et al., 2001). Sin embargo, durante este tiempo de sobrevivencia de los microorganismos exógenos, podría existir un fenómeno de transferencia horizontal de genes (Jones et al., 2008; Rojas-Oropeza et al., 2012).

El análisis de los genes de función (*amoA*, nitrificación; *narG*, *nosZ*, desnitrificación; *hzoA*, oxidación anaerobia del amonio; *pmoA*, oxidación del metano, actividad

nitrificante no específica) ha revelado la existencia de microorganismos emparentados con microorganismos salinos o marinos, por lo cual podrían ser microbiota autóctona, como se ha observado también en el trabajo de Alcántara-Hernández y colaboradores (2009). Se confirmó la existencia de la función nitrificante por el aislamiento de siete bandas (*amoA*, *pmoA*), con probablemente una actividad baja, de acuerdo al seguimiento fisicoquímico en los microcosmos. La posible pérdida de nitrógeno por desnitrificación o por oxidación anaerobia de amonio, citado anteriormente, se podría confirmar mediante la existencia de bacterias desnitrificantes (*narG*, *nosZ*) y de bacterias ANAMMOX (*hzsA*), respectivamente (Figura 21.2). La detección de esta última función aporta una gran originalidad a este trabajo, ya que es la primera vez que se detecta en suelos extremos salinos sódicos. Sería importante el aislamiento por métodos microbiológicos tradicionales de representantes de este grupo funcional, con el fin de identificar y caracterizar metabólicamente estos microorganismos para su posible clasificación como bacterias extremas, halófilas u oligotróficas, o todo a la vez.

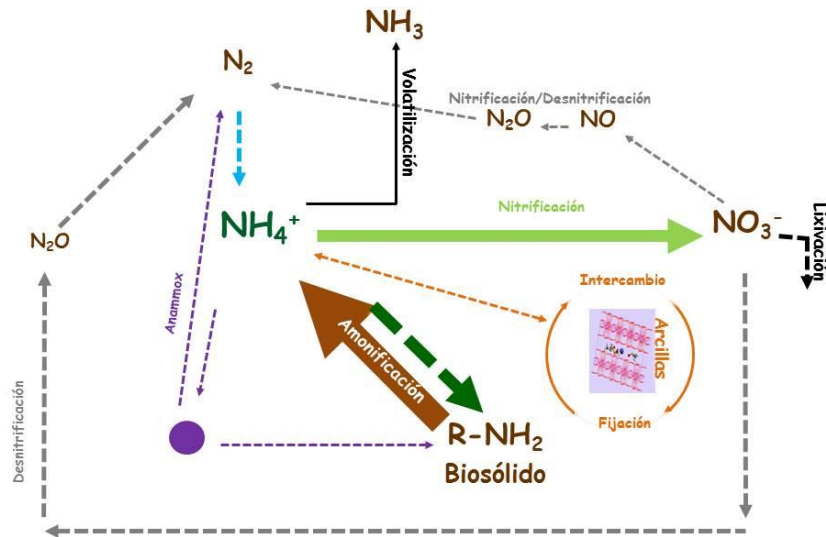
La presencia del dominio Archaea en la función nitrificante confirma la importancia de este dominio en el ciclo del N. En términos ecológicos, en ambientes alcalinos y halófilos no puede predominar específicamente un grupo microbiano de función nitrificante, como sucede en los suelos con pH ligeramente alcalinos, neutros o ligeramente acidófilos. En los ambientes neutros y ácidos el amonio se mantiene estable y disponible durante más tiempo, permitiendo una población nitrificante (Nicol et al., 2008). Es posible que la función nitrificante se traduzca en la fortaleza bioquímica extendida de varios grupos microbianos (la maquinaria genética de muchos de los microorganismos les permite ser capaces de efectuar el proceso de nitrificación-desnitrificación) o bien la capacidad de usar moléculas de óxidos de nitrógeno como aceptores de electrones y ser multifuncionales en la optimización de los recursos en condiciones extremas. Un ejemplo de ello es el que observaron Sorokin y colaboradores (2012), en el cual bacterias reductoras del azufre usaron el nitrito, nitrato y óxido nitroso como aceptores de electrones.

El suelo, pues, muestra una gran capacidad de resiliencia, hay evidencia de que las condiciones imperantes del suelo permiten: i) a la microbiota nativa mantenerse a lo largo de todo el proceso invasivo de especies exógenas, ii) la alta actividad microbiana medida al momento de la adición de materia orgánica, se debe también a que mientras se mantiene una alta humedad los microorganismos exógenos tienen la oportunidad de mantenerse activos, iii) la disponibilidad de nitrógeno tiende a ser baja debido a las condiciones fisicoquímicas del suelo, iv) los microorganismos autóctonos, al tener periodos de crecimiento muy bajos, no serán estimulados hacia tasas rápidas de actividad aun cuando hubiera una alta disponibilidad del nitrógeno y, v) las variaciones espaciales de gradientes de salinidad y la presencia de un mayor número de especies vegetales se debe al ininterrumpido proceso de aporte de aguas negras (nutrientes e inóculo exógeno) durante más de treinta años.

La alta volatilización de nitrógeno en forma amoniacal revela una baja factibilidad de aprovechamiento por parte del suelo después de la disposición del biosólido, pero este mismo principio se generaliza a la aplicación de otro tipo de abono orgánico de origen natural o sintético, inclusive el continuo aporte de aguas negras. Destaca un gran riesgo ambiental y de salud pública por la emisión de este gas nocivo, ya que en

concentraciones elevadas irrita y daña las vías respiratorias y los ojos. Durante la pretensión de construir la mega planta de tratamiento de aguas residuales en esta zona federal, los promotores de este proyecto asumían que el aporte continuo del biosólido generaría en un lapso de 10 años un importante horizonte de materia orgánica que terminaría por mejorar las condiciones del suelo para el establecimiento seguro y definitivo de una cobertura vegetal con fines paisajistas e incluso de producción forestal. Es muy probable que el sodio ascienda a la superficie por fenómenos de capilaridad, manteniendo la existencia de esta condición salina. Por lo tanto si la Comisión Nacional del Agua abandonará las tareas de riego con aguas negras que mantienen la cobertura vegetal existente, es de esperar que esta se pierda a corto plazo.

Suelo de pradera (molisol)



Suelo salino sódico del ex lago de Texcoco

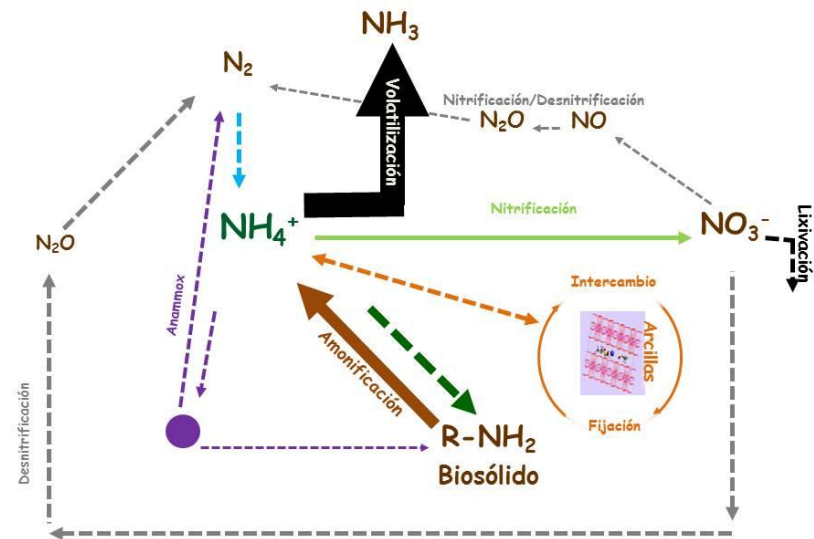


Figura 21-1 Diagrama de flujo y dinámica del nitrógeno en un suelo tipo molisol y el suelo salino sódico del ex lago de Texcoco. Las anchuras de las flechas representan aproximadamente las tasas relativas de los procesos.

Suelo salino sódico del ex lago de Texcoco

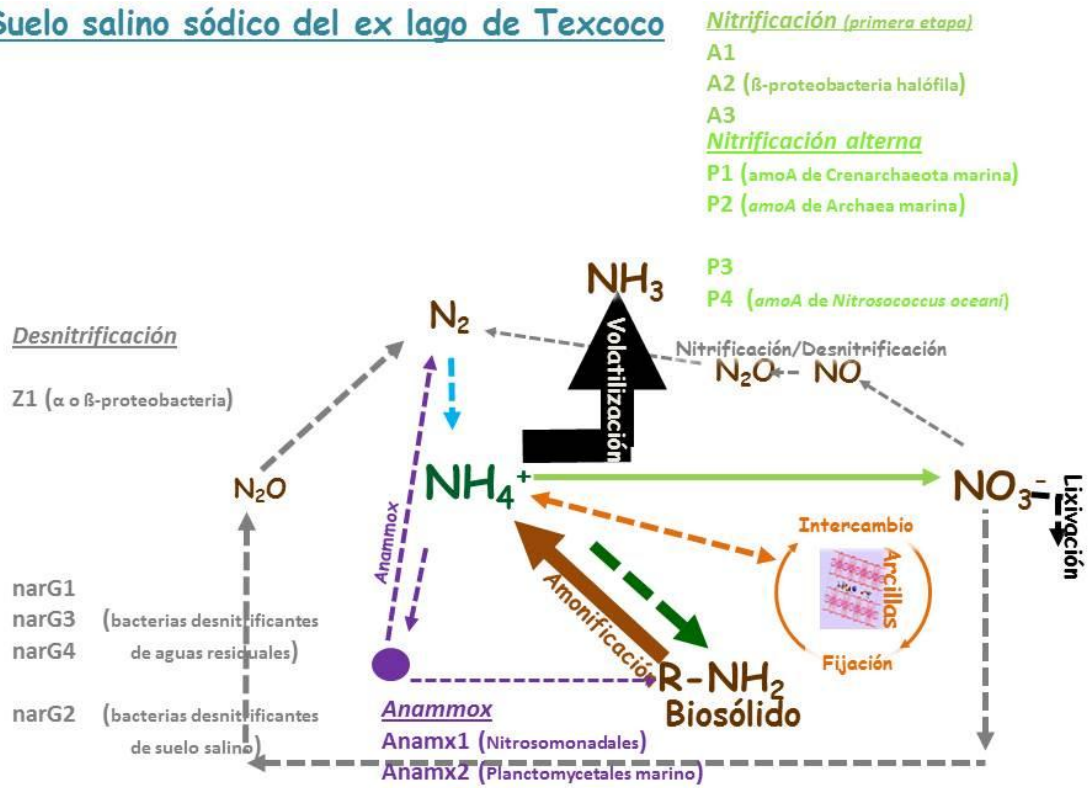


Figura 21-2 Dinámica del nitrógeno y su función microbiana en el suelo salino sódico del ex lago de Texcoco. Las anchuras de las flechas representan aproximadamente las tasas relativas de los procesos.

CONCLUSIONES

La disposición de nitrógeno mediante la aplicación de biosólido en el ex lago de Texcoco resulta en una tasa muy alta de pérdida de nitrógeno por fenómeno de volatilización de amoniaco, fijación del amonio sobre arcillas, desnitrificación u oxidación anaerobia del amonio. Este fenómeno se observa sin importar el gradiente de salinidad que exista en este ambiente extremo.

Los microorganismos presentes en los biosólidos se distinguen de la población nativa y su supervivencia es corta, debido a las condiciones adversas del suelo. El tiempo de dicha supervivencia varía en función de la cantidad de biosólido dispuesto.

Se confirma la presencia de microorganismos nitrificantes de los dominios Bacteria y Archaea y que la actividad del proceso de nitrificación es baja. Respecto de la oxidación anaerobia del amonio (anammox) y la desnitrificación, se detectó la presencia de bacterias principalmente de origen halofílico, lo cual confirma el carácter distinto del flujo de nutrientes en estos ambientes extremos.

Consecuentemente la disposición de biosólido en el suelo del ex lago de Texcoco representa costos económicos y políticas permanentes de manejo de los recursos, para mantener como un éxito vulnerable, la cobertura vegetal de pastizal, vocación artificial de este tipo de ambiente. El conflicto siempre presente es la permanencia del sodio.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

La experiencia adquirida en el presente trabajo dicta las pautas para optimizar y abordar el estudio del ciclo del nitrógeno. Por una parte, es vital implementar técnicas de aislamiento y de crecimiento de microorganismos halófilos a partir de muestras ambientales del suelo del ex lago de Texcoco en sitios con gradientes de salinidad alta. A partir de estos cultivos sería posible diseñar *primers* taxonómicos y de función con mayor sensibilidad y precisión que los utilizados como universales (esto permitiría determinar el ensamble de los diversos subprocesos del ciclo del N y, al mismo tiempo, tener la certeza que son aislamientos de microorganismos nativos), permitiendo incorporarlos a los ceparios y bases de datos moleculares con su descripción morfológica y bioquímica. Por otra parte, sería necesario diseñar experimentos para la cuantificación de las diversas actividades funcionales: por ejemplo, se podrían evaluar por medio de la extracción del ARNm asociado con la realización de PCR de tiempo real u otras técnicas como la hibridación *in situ*.

También es importante elucidar de manera precisa el flujo y la disponibilidad del N en este ambiente. Entre las posibilidades, podría destacarse el diseño de experimentos con el uso de N marcado, y determinar las especies disponibles y fijadas de N.

Por último sería deseable reconsiderar la política de manejo de la zona federal del ex lago de Texcoco, puesto que por un lado se le otorga el carácter de rescate de un suelo con una vocación lacustre que representa un problema de salud pública y de contaminación ambiental con altos costos económicos. Mientras que por otro lado desde un punto de vista de conservación, un rescate significaría devolverle su condición de lago, en un ambiente de humedal con los servicios ecosistémicos que benefician a la ciudad de México.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Åakra A., Utaker JB., Nes IF. 1999. RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: a phylogenetic approach, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:123-130.
2. Abed Raeid MM., Ramette A., Hübner V., Deckker De P., Beer de D. 2012. Microbial diversity of eolian dust sources from saline lake sediments and biological soil crusts in arid Southern Australia, *FEMS. Microbiol. Ecol.* 80:294-304.
3. Aguirre GA. 1993. Química de los suelos de inundación y perenes, FES-Cuautitlán, UNAM, México. pp.273.
4. Alcántara-Hernández RJ. 2009. Reducción de nitrato en suelos salino alcalinos del exlago de Texcoco. Tesis de doctorado. CINVESTAV.
5. Alcántara-Hernández RJ., Valenzuela-Encinas C., Zavala-Díaz de la Serna FJ., Rodríguez-Revilla J., Dendooven L., Marsch R. 2009. Haloarchaeal assimilatory nitrate-reducing communities from a saline alkaline soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 298:56-66.
6. Aliaga Goltsman DS., Denev VJ., Singer SW., VerBerkmoes NC., Lefsrud M., Mueller RS., Dick GJ., Sun GJ., Wheeler KE., Zemla A., Baker BJ., Hauser L., Land M., Shah MB., Thelen MP., Hettich RL., Banfield JF. 2009. Community genomic and proteomic analyses of chemoautotrophic community genomic and proteomic analyses of chemoautotrophic "Leptospirillum ferrodiazotrophum" (Group III) bacteria in acid mine drainage biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4599-4615.
7. Alzerreca JJ., Norton JM., Klotz H.. 1999. The *amo* operon in marine, ammonia-oxidizing γ -proteobacteria, *FEMS Microbiol. Lett.* 180:21-29.
8. Amato P., Christner BC. 2009. Energy metabolism response to low-temperature and frozen conditions in *Psychrobacter cryohalolentis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:711-718.
9. Andreoli CV., Sperling VM., Fernández F. 2001. Lodo de esgotos: Tratamiento e disposição final, Desa. SANEPAR. 6. pp.484.
10. Antón J., Rosselló-Mora R., Rodríguez-Valera F., Amann R. 2000. Extremely halophilic *Bacteria* in crystalizer ponds from solar salterns, *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3052-3057.
11. APHA/AWWA/WPCF. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. Washington.
12. Atlas RM., Bartha R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental, Pearson Educación, Madrid, pp.696.
13. Bach HJ., Tomanova J., Schloter M., Munch JC. 2002. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification, *J. Microbiol. Meth.* 49:235-245.
14. Baumgarte S. 2003. Microbial diversity of soda lake habitats, Ph-D Universitat Carolo Birmenlina, pp.186.
15. Beltrán-Hernández RI. 2001. Descomposición de lodos residuales en suelos del ex-Lago de Texcoco. Tesis de doctorado. CINVESTAV.

16. Beltrán-Hernández RI., Coss-Muñoz E., Luna-Guido ML., Mercado-García F., Siebe C., Dendooven L. 1999. Carbon and nitrogen dynamics in alkaline saline soil of the former Lake Texcoco (Mexico) as affected by application of sewage sludge, *Europ. J. Soil Sci.* 50:601-608.
17. Ben-Dov E., Shapiro OH., Siboni N., Kushmaro A., 2006. Advantage of using inosine at the 3' termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6902-6906.
18. Benlloch S, Acinas SG, Antón J, Lopéz-Lopéz, Luz SP Rodríguez-Valera F. 2001. Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR, *Microb. Ecol.* 41:12-19.
19. Bol R., Toyoda S., Yamulki S., Hawkins JMB., Cardenas LM., Yoshida N. 2003. Dual isotope and isotopomer ratios of N₂O emitted from a temperate grassland soil after fertilizer application. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17:2550-2556.
20. Bourne DG., McDonald IR., Murrell JC. 2001. Comparison of pmoA PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Appl Environ. Microbiol.* 67:9:3802-3809.
21. Brady NC., Weil RR. 1996 The nature and properties of soils. 7^a ed. Prentice Hall International edition. New Jersey. USA. pp.740.
22. Brauer VS., Stomp M., Huisman J. 2012. The nutrient-load hypothesis: patterns of resource limitation and community structure driven by competition for nutrients and light. *Am Nat.* 179:6:721-40.
23. Bremner, JM., Keeney, DR. 1966. Determination and isotope- ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: 3. Exchangeable ammonium nitrate, and nitrite by extraction-distillation methods. *Soil Science Society of America Proceedings*, 30:557-582.
24. Bruns MA, StephenJR, Kowalchuk GA, Prosser JI, Paul EA. 1999. Comparative diversity of ammonia-oxidizer 16S rRNA gene sequence in native, tilled, and successional soils, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2994-3000.
25. Buckman HO., Brady NC. 1985. Naturaleza y propiedades del suelo. UTEXA, Mexico.
26. Cabirol N., Rojas Oropeza M., Noyola, A., 2002. Removal of helminth eggs and fecal coliforms by anaerobic thermophilic sludge digestion. *Wat. Sci. Technol.* 45, 269-274.
27. Canganella F., Wiegel J. 2011. Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond, *Naturwissenschaften* 98:253-279.
28. Canstein VHF., Li Y., Felske A., Wagner-Döbler I. 2001. Long-term stability of mercury-reducing microbial biofilm communities analyzed by 16S-23S rDNA interspacer region polymorphism, *Microb. Ecol.* 42:624-634.
29. Chakkiath PA., Kumaresan D., Ferrando L., Boden R., Moussard H., Fernández - Scavino A., Shouche YS., Murrell JC. 2010. Active methylotrophs in the sediments of Lonar Lake, a saline and alkaline ecosystem formed by meteor impact. *ISME J.* 4:1470-1480.
30. Chen YG., Cui XL., Kroppenstedt RM., Stackebrandt E., Wen ML., Xu LH., Jiang CL. 2008. *Nocardiosis quinghaiensis* sp. nov., isolated from saline soil in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:699-705.
31. Conde E., Cardenas M., Ponce-Mendoza A., Luna-Guido ML., Cruz-Mondragón C., Dendooven L. 2005. The impacts of inorganic nitrogen application on

- mineralization of ^{14}C -labelled maize and glucose, and on priming effect in saline alkaline soil. *Soil Biol. Biochem.* 37, 681-691.
32. Coyne, M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Paraninfo, Madrid.
 33. Cruickshank GG. 1999. Recuperación hidroecológica del ex-Lago de Texcoco; Conservación y restauración de suelos. In: Siebe, C., Rodarte, H. C., Toledo, G., Etchevers, J. Oleschko, C. (Ed.), Programa Universitario del Medio Ambiente (PUMA), UNAM, México, pp. 473-488.
 34. Cui HL., Tohty D., Zhou PJ., Liu SJ. 2006. *Halorubrum lipolyticum* sp. nov. and *Halorubrum aidingense* sp. nov., isolated from two salt lakes in Xin-Jiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:1631-1634.
 35. Cytryn E., Minz D., Oremland RS., Cohen Y. 2000. Distribution and diversity of Archaea corresponding to the limnological cycle of a hypersaline stratified lake (Solar lake, Sinai, Egypt), *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3269-3276.
 36. De Boer W., Kowalchuk GA. 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 33, 853-866.
 37. Delorme S., Philippot L., Edel-Hermann V., Deulvot C., Mougel C., Lemanceau C. 2003. Comparative genetic diversity of the *narG*, *nosZ*, and 16S rDNA genes in fluorescent pseudomonas. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1004-1012.
 38. Dendooven L., Murphy E., Powlson DS. 2000. Failure to stimulate C and N mineralization in soil using biomass C-to-N ratios as measured by the fumigation extraction method?. *Soil Biol. Biochem.* 32:659-668.
 39. Dong H., Zhang G., Jiang H., Yu B., Chapman LR., Lucas CR., Fields M. 2006. Microbial diversity in sediments of saline Qinghai Lake, China: linking geochemical controls to microbial ecology. *Microb. Ecol.* 51 :65-82.
 40. Dorador C., Busekow A., Vila I., Imhoff JF., Witzel KP. 2008. Molecular analysis of enrichment cultures of ammonia oxidizers from the Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile, *Extremophiles* 12: 405-414.
 41. Duckworth AW., Grant WD., Jones BE., Meijer D., Márquez MC., Ventosa A. 2000. *Halomonas magadii* sp. nov., a new member of the genus *Halomonas*, isolated from a soda lake of the East African Rift Valley, *Extremophiles*. 4:53-60.
 42. Duinevel BM., Kowalchuk GA., Keijzer A., van Elsas JD., van Veen JA. 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of *Chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as web as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:172-178.
 43. Duranceau SJ., Emerson HP., Wilder RJ. 2012. Impact of bottled water storage duration and location on bacteriological quality. *Int J Environ Health Res.* 22.
 44. Eilmus S., Roesch C., Bothe H. 2004. Prokaryotic Diversity of an Island Salt Habitat Investigated by using Two Different Molecular Approaches, *Unpublished*.
 45. Eisle O., Kroneck PMH. 2004. Structural basis of denitrification. *Biol. Chem.* 385:875-883.
 46. Ekschmitt K., Griffiths GS. 1998. Soil biodiversity and its implications for ecosystem functioning in a heterogeneous and variable environment. *Appl. Soil Ecol.* 10:201-215.
 47. Elena SF., Lenski RE. 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Rev. Gen.* 4, 457-469.

48. Environmental Protection Agency. 1995. Process Design Manual. Land application of sewage sludge and domestic septage. Estados Unidos de América.
49. Environmental Protection Agency. 1996a. A guide to the Biosolids Risk Assessments for the EPA Part 503 Rule. Estados Unidos de América.
50. Environmental Protection Agency. 1996b. A plain English Guide to the EPA Part 503 Biosolids Rule. Estados Unidos de América.
51. Fernandes F., Andreoli CV., Domaszak SC., de Lara AI. 1997. Manual técnico para utilizacio agrícola do lodo de esgoto no Paraná, Companhia de Saneamento do Paraná, SANEPAR, Brazil, pp.96.
52. Fernández-Buces N., Siebe C., Cram S., Palacio J.L. 2006. Mapping soil salinity using a combined spectral response index for bare soil and vegetation: A case study in the former lake Texcoco, Mexico. *J. Arid Environ.* 65:4:644-667.
53. FitzPatrick EA. 1987. Suelos: su formación, clasificación y distribución, 3ªed., Continental. México. pp 430.
54. Flowers, T.H., Arnold, P.W., 1983. Immobilization and mineralization of nitrogen of soils incubated with pig slurry or ammonium sulphate. *Soil Biol. Biochem.* 15, 329-335.
55. Franco-Hernández, O., Mckelligan-González, A.N., Lopez-Olguin, A.M., Espinosa-Ceron, F., Escamilla-Silva, E., Dendooven, L., 2003. Dynamics of carbon, nitrogen and phosphorus in soil amended with irradiated, pasteurized and limed biosolids. *Biores. Technol.* 87:93-102.
56. Gaidos E., Deschenes B., Dundon L., Fagan K., McNaughton C., Menviel-Hessler L., Moskovitch N., Workman M. 2005. Beyond the principle of plentitude: a review of terrestrial planet habitability. *Astrobiol.* 5:100-127.
57. Gales G., Chehider N., Joulian C., Battaglia-Brunet F., Cayol JL., Postec A., Borgomano J., Neria-Gonzalez I., Lomans BP., Ollivier B., Alazard D. 2011. Characterization of *Halanaerocella petrolearia* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic moderately halophilic fermentative bacterium isolated from a deep subsurface hypersaline oil reservoir: New taxa: Firmicutes (Class Clostridia, Order Halanaerobiales, Halobacteroidaceae, Halobacteroides). *Extremophiles.* 15:565-571.
58. Garabito MJ, Arahall DR, Mellado E, Márquez MC and Ventosa A. 1997. *Bacillus salexigens* sp. nov., a new moderately halophilic *Bacillus* species, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:735-741.
59. García-Martínez J., Acinas SG., Antón AI., Rodríguez-Valera F. 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity, *J. Microbiol. Meth.* 36:55-64.
60. Giraffa G, Neviani E. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems, *Int. J. Food Microbiol.* 67:19-34.
61. Girvan MS., Campbell C D., Killham K., Prosser JI., Glover LA. 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ. Microbiol.* 3, 301-313.
62. Grant WD., Tindall BJ. 1986. The alkaline saline environment, In: *Microbes in Extreme Environments.* Society for General Microbiology. Ed. Herbert RA and Codd GA, Dundee, UK, 25-54.

63. Griffiths BS., Kuan HL., Ritz K., Glover LA., McCaig AE., Fenwick C. 2004. The relationship between microbial community structure and functional stability, tested experimentally in an upland pasture soil. *Microb. Ecol.* 47, 104-113.
64. Grüntzig V., Nold SC., Zhou J., Tiedje JM. 2001. Nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR, *Appl. Environ. Microbiol.* 67:760-768.
65. Guindon S., Dufayard J F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59:307-321.
66. Harris, CD. 1992. Chemical analysis of soils. International Publishers. UTECA.192-195.
67. Hedi A., Fardeau ML., Sadfi N., Boudabous A., Ollivier B., Cayol JL. 2009. Characterization of *Halanaerobaculum tunisiense* gen. nov., sp. nov., a new halophilic fermentative, strictly anaerobic bacterium isolated from a hypersaline lake in Tunisia. *Extremophiles* 13:313-319.
68. Hermansson A., Lindgren PE. 2001. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:972-976.
69. Hernández T., Moral R., Perez-Espinosa A., Moreno-Caselles J., Perez-Murcia MD., García C. 2002. Nitrogen mineralisation potential in calcareous soils amended with sewage sludge, *Biores. Technol.* 83:213-219.
70. Hill GT., Mitkowski NA., Aldrich-Wolfe L., Emele LR., Jurkonie DD., Ficke A., Maldonado-Ramirez S., Lynch ST., Nelson EB. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities, *Appl. Soil Ecol.* 15:25-36.
71. Hinkle KR. 1982. Use of municipal sludge in the reclamation of abandoned pyrite mines in Virginia, In: Land reclamation and biomass production with municipal wastewater and sludge. Ed. Sopper WE, Seaker EM and Bastian RK. The Pennsylvania State University Press. 421-432.
72. Hofman J., Bezchlebová J., Dušek L., Doleža L., Holoubek I., Anděl P., Ansorgová A., Maly S. 2003. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. *Environ. Int.* 28, 771-118.
73. Holt JG., Krieg NR. 1989. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, Ed. Williams and Wilkins Company. Baltimore.
74. Huang LN., Zhou WH., Hallberg KB., Wan CY., Li J., Shu WS. 2011. Spatial and temporal analysis of the microbial community in the tailings of a Pb-Zn mine Generating Acidic Drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5540-5544.
75. Ishii S., Ashida N., Otsuka S., Seno K. 2011. Isolation of oligotrophic denitrifiers carrying previously uncharacterized functional gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 338-342.
76. Jackson, ML. 1964. *Análisis de Suelos*. Ed. Omega. Barcelona, España.
77. Jazcilevich AD., García AR., Ruiz-Suárez LG. 2003. An air pollution modeling study using three surface coverings near the new international airport of Mexico City. *J Air Waste Manag Assoc.* 53(10):1280-1287.
78. Jellison R. 2005. IX international conference on Salt Lake research: Research opportunities and management challenges. *Saline Systems* 2005, 1:12-17.
79. Jiménez-Morales RJM., Dendooven L. 2001. Detection of nitrifiers bacteria in soil of the former lake Texcoco (Mexico) by PCR. 9th International Symposium on Microbial Ecology, Amsterdam, 02-011.

80. Joergensen, RG. y Brookes, PC. 1990. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5M K₂SO₄ soil extracts. *Soil Biol. Biochem.* 22:8:1023-1027.
81. Jones MC., Stres B., Rosenquist M., Hallin S. 2008. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Mol. Biol. Evol.* 25:1955-1966.
82. Jukes TH., Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules, In: Mammalian protein metabolism, Vol. III. Ed. Munro HN. Academic Press. NY. 21-132.
83. Kalyuzhnaya MG., Khmelenina V., Eshinimaev B., Sorokin D., Fuse H., Lidstrom M., Trotsenko Y. 2008. Classification of halo(alkali)philic and halo(alkali)tolerant methanotrophs provisionally assigned to the genera *Methylomicrobium* and *Methylobacter* and emended description of the genus *Methylomicrobium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:591-596.
84. Kim KK., Jin L., Yang HC., Lee ST. 2007. *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:675-681.
85. Kirchmann H., Witter E. 1989. Ammonia volatilization during aerobic and anaerobic manure decomposition. *Plant Soil* 115, 35-36.
86. Klawonn I., Edlund A., Bruchert V., Plough H. 2012. Biogeochemical fluxes of carbon and nitrogen in the Baltic Sea, *Unpublished*.
87. Kong L., Kataoka T., Jing H., Guo C., Liu H. 2011. Molecular evidence for novel hydrazine oxidoreductase (*hzo*) gene sequences in the OMZ off Costa Rica, Gen Bank JN790184.1.
88. Kowalchuk GA., Stephen JH. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology, *Annu. Rev. Microbiol.* 55:485-529.
89. Kowalchuk GA., Bodelier PLE., Heilig GHJ., Stephen JR., Laanbroek HJ. 1998. Community analysis of ammonia-oxidizing bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridization, *FEMS Microbiol. Ecol.* 27:339-350.
90. Kowalchuk GA., Stienstra AW., Heilig GHJ., Stephen JR., Woldendorp JW. 2000. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands), *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:207-215.
91. Kuzyakov Y., Friedel J.K., Stahr K. 2000. Review of mechanism and quantification of priming effect. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1485-1498.
92. Landwehr M., Hildebrandt U., Wilde P., Nawrath K., Tóth T., Biró B., Bothe H. 2002. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. *Mycorrhiza* 12:199-211.
93. Laverman AM., Speksnijder AGCL., Braster M., Kowalchuk GA., Verhoef HA., van Verseveld HW. 2001. Spatiotemporal stability of an ammonia-oxidizing community in a nitrogen-saturated forest soil, *Microb. Ecol.* 42:35-45.
94. Lenski RE., Riley MA. 2002. Chemical warfare from an ecological perspective. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Ed.) 99:556-558.
95. Li HB., Zhang LP., Chen SF. 2008. *Halomonas korlensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying bacterium isolated from saline and alkaline soil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:2582-2588.

96. Lleó DMM., Tafi MC., Signoretto C., Cero CD., Canepari P. 1999. Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water, *FEMS Microbiol. Ecol.* 30:345-353.
97. Lue-Hing C., Zens DR., Tata P., Kuchenrither R., Malina JFF., Sawyer B. 1998. Municipal sludge management: a reference text on processing, utilization and disposal. 2^a Ed. Technomic Publishing Co., Inc. U.S.A. 4. pp.790.
98. Luna-Guido ML., Dendooven L. 2001. Simulating the dynamics of glucose and NH_4^+ in alkaline saline soil of the former lake Texcoco with Detran model, *Eur. J. Soil Sci.* 52:269-277.
99. Luna-Guido ML., Beltrán-Hernández RI., Solís-Ceballos NA., Hernández-Chavez N., Mercado-García F., Olalde-Portugal V., Catt JA., Dendooven L. 2001. Chemical and biological characteristics of alkaline saline soils from the former Lake Texcoco as affected by artificial drainage. *Biol. Fertil. Soils* 32:102-108.
100. Luque B., Ballesteros F., Márquez A., González M., Agea A., Lara L. 2009. Astrobiología: Un puente entre el Big Bang y la vida, Ed. Aikal, pp.335.
101. Madigan MT., Martinko JM., Parker J. 2004. Biología de los microorganismos, 10^a ed., Prentice Hall Iberia, Madrid.
102. Marsch-Moreno R., Alcántara-Hernández R., Valenzuela-Encinas C., Dendooven L. 2008. Design of PCR primers targeting periplasmic and membrane nitrate reductase, *Unpublished*.
103. Marshall KC. 1993. Microbial ecology: Whither goest thou?, In: Trends in Microbial Ecology. *Proceedings of the Sixth International Symposium on Microbial Ecology*. Ed. Guerrero and Pedrós-Alió. Spanish society of Microbiology. Barcelona.
104. Martin W., Russell MJ. 2003. On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358:59-85.
105. Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J. C., Soulas G., Catroux G., 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 7, 2354-2359.
106. Martins RF., Davids W., Al-Soud WA., Levander F., Rådström P., Hatti-Kaul R. 2001. Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes, *Extremophiles*. 5:135-144.
107. Marzorati M., Wittebolle L., Boon N., Daffonchio D., Verstraete W. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environ. Microbiol.* 10, 1571-1581.
108. Matthews P. 1997. A global atlas of wastewater sludge and biosolids use and disposal, Ed. International Association on Water Quality. London, pp.197.
109. Mesbah NM., Wiegel J. 2008. Life at extreme limits: The anaerobic halophilic alkalithermophiles, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1125: 44-57
110. Mohanakrishnan J., Kofoed MVW., Barr J., Yuan Z., Schramm A., Meyer RL. 2010. Microbial response of a sulfidogenic wastewater biofilm to nitrate exposure. Gen Bank GQ324647.1.
111. Mongodin EF., Nelson KE., Daugherty S., Deboy RT., Wister J., Khouri H., Weidman J., Walsh DA., Papke RT., Sanchez Perez G., Sharma AK., Nesbo CL., Macleod D., Baptiste E., Doolittle WF., Charlebois RL., Legault B., Rodriguez-Valera F. 2005. The genome of *Salinibacter ruber*: convergence and gene

- exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:18147-18152.
112. Mosey FE., Foulkes M. 1984. Control of the anaerobic digestion process, In: Sewage Sludge Stabilisation and Disinfection. A.M. Bruce, Water Research Center, Ellis Horwood Limited, Chichester, 174-195.
 113. Munn KJ., Evans J., Chalk PM. 2000. Mineralization of soil and legume nitrogen in soils treated with metal-contaminated sewage sludge, *Soil Biol. Biochem.* 32:2031-2043.
 114. Muyzer G., De Waal EC., Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
 115. Napolitano MJ., Shain DH. 2004. Four kingdoms on glacier ice: convergent energetic processes boost energy levels as temperatures fall. *Proc. R. Soc. Lond. B. (Suppl.)* 271:S273-S276.
 116. Nicol GW., Leininger S., Schleper C., Prosser JI. 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ. Microbiol.*, 10:2966-2978.
 117. Nicolaisen MH., Ramsing NB. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria, *J. Microbiol. Meth.* 50:189-203.
 118. NOM-004-SEMARNAT-2002. Protección ambiental.- lodos y biosólidos.- Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. In: Diario Oficial de la Federación, 15 de agosto de 2003, México, pp. 18-60.
 119. Ohki K., Yamada K., Kamiya M., Yoshikawa S. 2011. Morphological, phylogenetic and physiological studies of pico-cyanobacteria isolated from the halocline of a saline meromictic Lake, Lake Suigetsu, Japan. *Japan. Soc. Microb. Ecol.* doi:10.1264/jsme2.ME11329.
 120. Onstott TC., McGrown DJ., Bakermans C., Ruskeeniemi T., Ahonen L., Telling J., Soffientino B., Piffner SM., Sherwood-Lollar B., Frape S., Stotler R., Johnson EJ., Vishnivetskaya TA., Rothmel R., Partt EJ. 2009. Microbial communities in subpermafrost saline fracture water at the Lupin Au Mine, Nunavut, Canada. *Microb. Ecol.* 58:786-807.
 121. Oren A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 56-63.
 122. Orlov DS. 1992. Soil chemistry. Balkema AA, Rotterdam, Brookfield.
 123. Page RDM. 1996. Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358.
 124. Payet C., Mignotte Cardiergues B., Morel JJ., Schwartzbrod L. 1999. Agronomic properties and levels pathogen microorganisms of stored and planted sewage sludge, In Disposal and Utilisation of Sewage Sludge: Treatment Methods and Application Modalities, Athens Greece, IAWQ. 385-392.
 125. Philippot L., Piutti S., Martin-Laurent F., Hallet S., Germon JC. 2002. Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:6121-6128.

126. Philippot L., Hallin S. 2006. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:234-239.
127. Phillips CJ., Paul EA., Prosser JI. 2000. Quantitative analysis of ammonia oxidising bacteria using competitive PCR, *FEMS Microbiol. Ecol.* 32:167-175.
128. Pike EB., Davis RD. 1984. Stabilisation and disinfection - their relevance to agricultural utilisation of sludge, In: Sewage Sludge Stabilisation and Disinfection. A.M. Bruce, Water Research Center, Ellis Horwood Limited, Chichester, 61-84.
129. Possemiers S., Verthe K., Uyttendaele S., Verstraete W. 2004. PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49: 495-507.
130. Prescott LM., Harley JP., Klein DA. 2000. Microbiología, 4ª ed., MacGraw Hill, Interamericana de España, Madrid, pp.1005.
131. Prosser JI., Nicol GW. 2008. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonio oxidation in the environment, *Environ. Microbiol.* 10:2931-2941.
132. Ramírez-Fuentes E., Ponce-Mendoza A., Luna-Guido ML., Van den Broeck E., Dendooven L. 2002. Incorporation of glucose-¹⁴C and NH₄⁺ in microbial biomass of alkaline saline soil. *Biol. Fertil. Soils* 36:269-275.
133. Ranjard L., Poly L., Combrisson J., Richaume A., Gourbière F., Thioulouse J., Nazaret S. 2000. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA), *Microb. Ecol.* 39:263-272.
134. Rice CW., Tiedje JM. 1989. Regulation of nitrate assimilation by ammonium in soil and isolated microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 21:597-602.
135. Richards LA. 1963. Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos, 2ª ed., Secretaría de Agricultura y Ganadería. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México. pp.172.
136. Rojas-Oropeza M., Cabirol N., Ortega S., Castro Ortiz LP., Noyola A. 2001. Removal of fecal indicator organisms and parasites (fecal coliforms and helminth eggs) from municipal sludge by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion, *Wat. Sci. Technol.* 44:97-101.
137. Rojas-Oropeza M., Dendooven L., Garza-Avendaño L., Souza V., Philippot L., Cabirol N. 2010. Effects of biosolids application on nitrogen dynamics in a saline-sodic soil of the former lake Texcoco (Mexico) and on its microbial structure change by DNA fingerprinting approach (RISA). *Bioresour. Technol.* 101:2491-2498.
138. Rojas-Oropeza M., Fernández FJ., Dendooven L., Cabirol N. 2012. Effect of methylparathion on nitrous oxide production: a laboratory study. *J. Environ. Manag.* 95:S25-S30.
139. Rotthauwe JH., Witzel KP., Liesack W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ. Microbiol.* 63:12:4704-12.
140. Saricheewin K., Sirivithayapakorn S., Noophan P., Wantawin C., Techkarnjanaruk S., Munukata-Marr J. 2010. Nitrogen removal of anammox cultures under different enrichment conditions, *J. Environ. Sci. Health Part A.* 45:1832-1838.

141. Schwartzbrod J. 1996. Tratamiento des eaux usées de Mexico en vue d'une Reutilisation à des Fins Agricoles. Reunión de Expertos para el Análisis del Proyecto de Saneamiento del Valle de México. Instituto de Ingeniería UNAM, pp.86.
142. Seybold C.A., Herrick J.K., Bredja J.J., 1999. Soil resilience: a fundamental component of soil quality. *Soil Sci.* 164, 224-234.
143. Siboni N., Ben-Dov E., Kushmaro A. 2008. Global diversity and distribution of coral associated Archaea and their possible role in coral nitrogen cycle. GenBank EU490367.1.
144. Smith SR., Woods V., Evans TD. 1998. Nitrate dynamics in biosolids-treated soils. I. Influence of biosolids type and soil type. *Biores. Technol.* 66:139-149.
145. Smith Z., McCaig AE., Stephen JR., Embley TM., Prosser JI. 2001. Species diversity of uncultures and cultured populations of soil and marine ammonio oxidizing bacteria. *Microb. Ecol.* 42:228-237.
146. Smith RL., Smith TM. 2002. Ecología. Ed. Addison Wesley. España. Pp.641.
147. Sorokin DY., Kuenen JG. 2005. Chemolithotrophic haloalkaliphiles from soda lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52:287-295.
148. Sorokin DY., Muyzer G., Brinkhoff T., Kuenen JG, Jetten MSM. 1998. Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N. alkalicus* sp.nov., *Arch. Microbiol.* 170:345-352.
149. Sorokin DY., Jones BE., Kuenen JG. 2000a. An obligate methylotrophic, methane-oxidizing *Methylomicrobium* species from a highly alkaline environment, *Extremophiles.* 4:145-155.
150. Sorokin DY., Tourova TP., Kuenen JG. 2000b. A new facultatively autotrophic hydrogen- and sulfur-oxidizing bacterium from an alkaline environment, *Extremophiles.* 4:237-245.
151. Sorokin DY., Lysenko AM., Mityushina LL., Jones BE., Rainey FA., Robertson LA., Kuenen GJ. 2001. *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov. and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:565-580.
152. Sorokin DY., Kuenen JG., Muyzer G. 2011. The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes, *front. Microbiol.* 2:1-16.
153. Sorokin DY., Zacharova EE., Pimenov NV., Tourova TP., Panteleeva AN., Muyzer G. 2012. Sulfidogenesis in hypersaline chloride-sulfate lakes of Kulunda Steppe (Altai, Russia). *FEMS Microbiol. Ecol.* 79:445-453.
154. Spring S., Schulze R., Overmann J., Schleifer KH. 2000. Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies, *FEMS Microbiol. Rev.* 24:573-590.
155. Stetter KO. 2006. History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles* 10:357-362.
156. Stubner S. 2002. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybGreen™ detection, *J. Microbiol. Meth.* 50:155-164.
157. Tan KH. 2000. Environmental soil science, 2ª ed. Marcel Dekker, Inc., New York. NY. pp. 452.

158. Throbäck IN., Enwall K., Jarvis A., Hallin S. 2004. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK y nos Z genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49:401-417.
159. Vega-Jarquín C., García-Mendoza M., Jablonowski AN., Luna-Guido M., Dendooven L. 2003. Rapid immobilization of applied nitrogen in alkaline saline soils. *Plant Soil* 256, 379-388.
160. Ward BB., Martino DP., Diaz MC., Joye SB. 2000. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline mono lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2873-2881.
161. Ward BB., O'Mullan GD. 2002. Worldwide distribution of *Nitrosococcus oceani*, a marine ammonia-oxidizing gamma-proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16S rRNA and *amoA* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4153-4157.
162. White DC., Flemming CA., Leung KT., Macnaughton SJ. 1998. *In situ* microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. *J. Microbiol. Meth.* 32:93-105.
163. Williams JP., Hallsworth JE. 2009. Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function? *Environ. Microbiol.* 11:3292-3308.
164. Wintzingerode FV., Göbel UB., Stackebrandt E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rDNA analysis, *FEMS Microbiol. Rev.* 21:213-229.
165. Wittebolle L., Boon N., Vanparys B., Heylen K., De Vos P., Verstraete W. 2005. Failure of the ammonia oxidation process in two pharmaceutical wastewater treatment plants is linked to shifts in the bacterial communities. *J. Appl. Microbiol.* 99: 997-1006.
166. Woese CR. 1987. Bacterial evolution, *Microbiol. Rev.* 51:221-271.
167. Wong JWC., Lai KM. 1996. Effect of artificial soil mix from coal fly ash and sewage sludge on soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils* 23, 420-424.
168. Yakimov MM., Giuliano L., Crisafi E., Chernikova TN., Timmis KN., Golyshin PN. 2002. Microbial community of a saline mud volcano at San Biagio-Belpasso, Mt. Etna (Italy). *Environ. Microbiol.* 4:249-256.

ANEXO 1

Diagramas de caja para el experimento 1

Fig. 2 Diagramas de caja para NH₄.

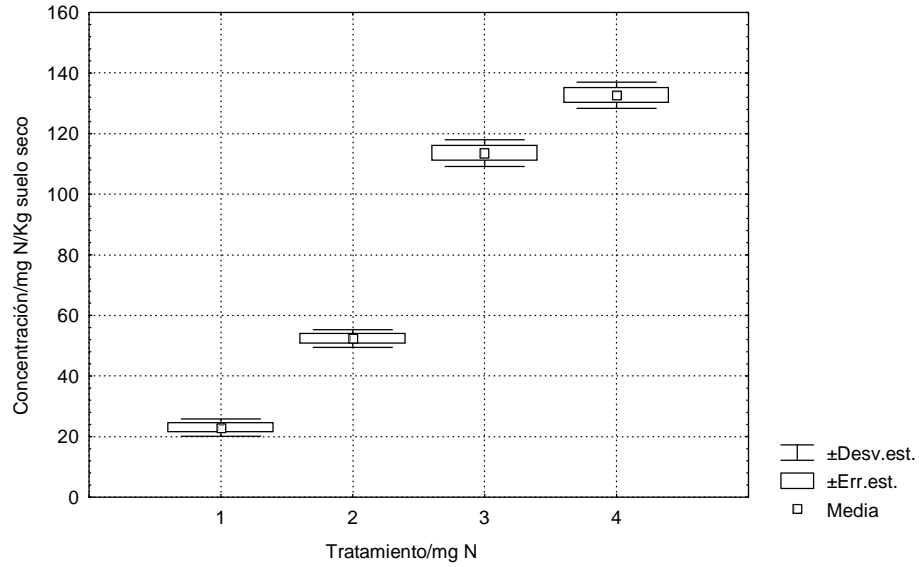


Fig. 3 Diagramas de caja para NO₂⁻.

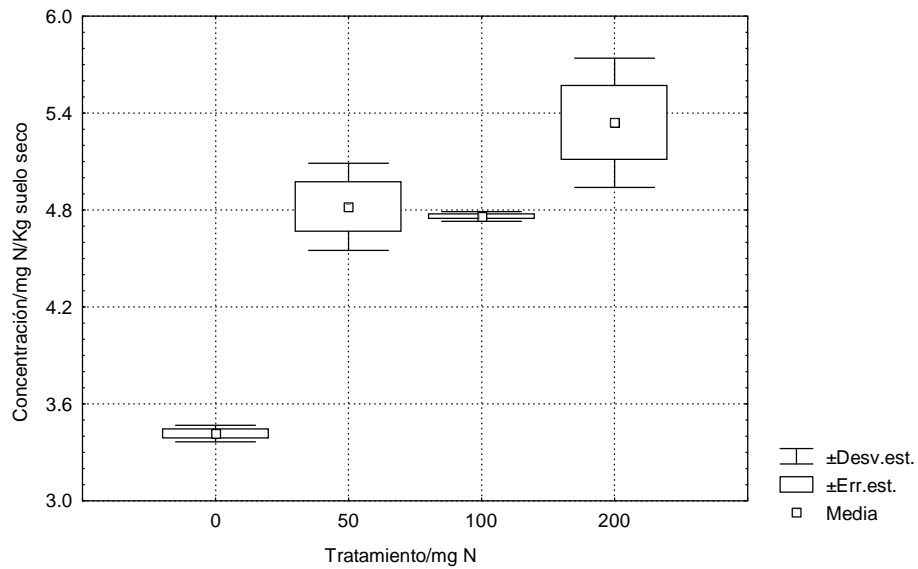


Fig. 4 Diagramas de caja para NO₃⁻.

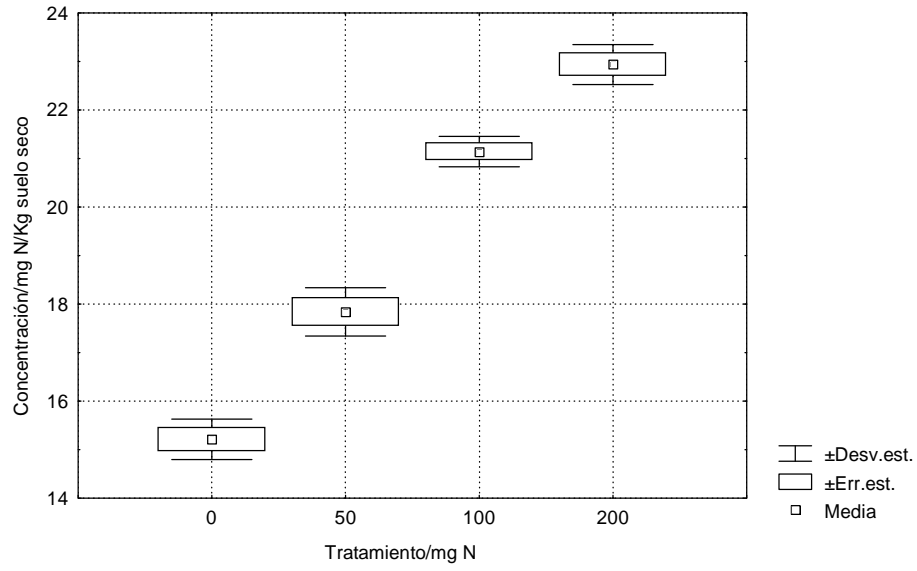
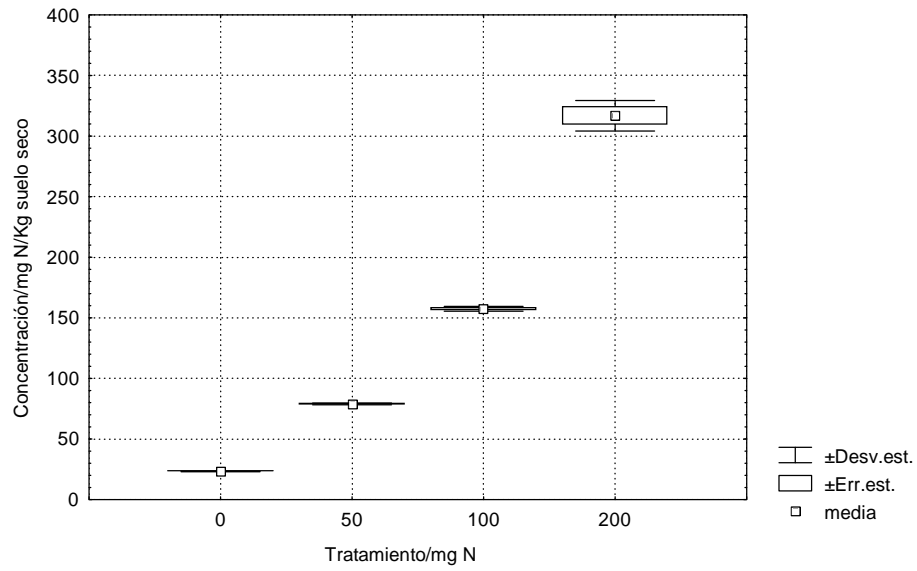


Fig. 5 Diagramas de caja para N-NH₂.



Diagramas de caja para el experimento 3

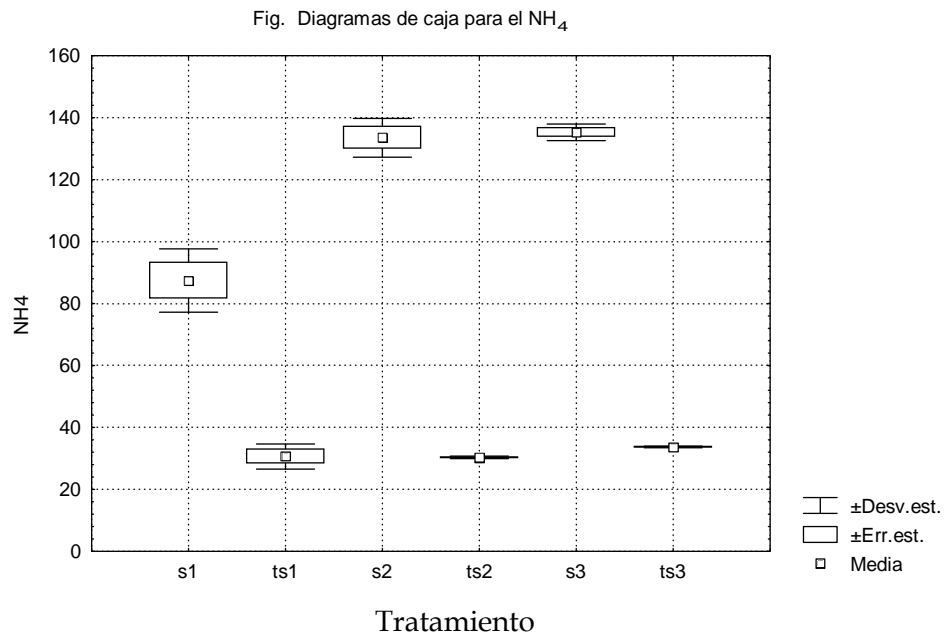
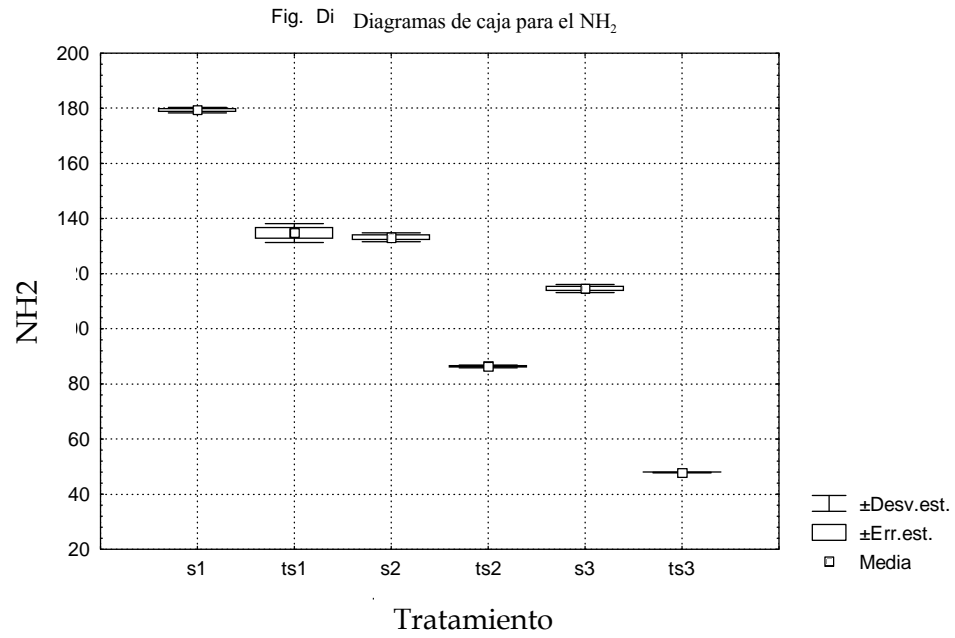


Fig. Diagramas de caja para NO_2

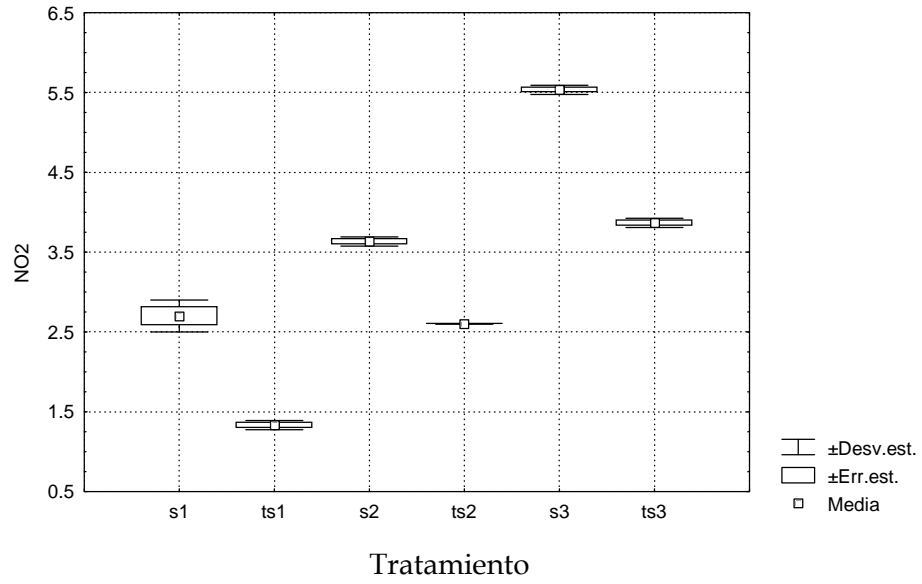
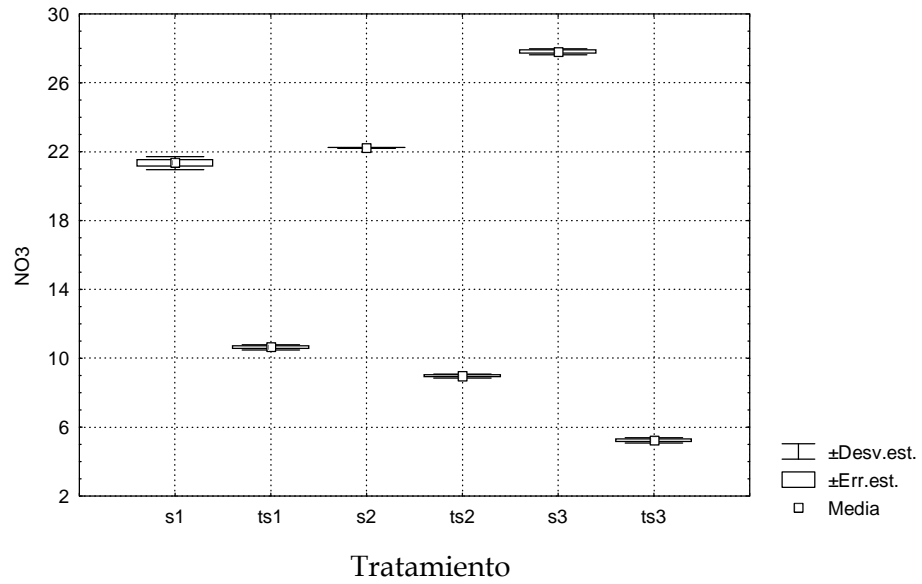


Fig. Diagramas de caja para NO_3



ANEXO 2

Artículo publicado y arbitrado en revista de circulación internacional indexada

En este artículo, se presenta gran parte de los experimentos 1 y 2.

Rojas-Oropeza M, Dendooven L, Garza-Avendaño L, Souza V, Philippot L, Cabirol N. Effects of biosolids application on nitrogen dynamics in a saline-sodic soil of the former lake Texcoco (Mexico) and on its microbial structure change by DNA fingerprinting approach (RISA). Biores. Technol. 101:2491-2498, 2010. Impact factor: 4.453, ISSN 0960-8524.

Citas (3): Brisolara KF, Qi Y. Biosolids and Sludge Management. WATER ENVIRONMENT RESEARCH 83 (10): 1351-1375. 2011.

Read S, Marzorati M, Guimaraes BCM, et al. Microbial Resource Management revisited: successful parameters and new concepts. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY 90 (3): 861-871. 2011.

King GM. Enhancing soil carbon storage for carbon remediation: potential contributions and constraints by microbes. TRENDS IN MICROBIOLOGY 19 (2): 75-84. 2011.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Effects of biosolids application on nitrogen dynamics and microbial structure in a saline–sodic soil of the former Lake Texcoco (Mexico)

M. Rojas-Oropeza^a, L. Dendooven^b, L. Garza-Avedaño^a, V. Souza^c, L. Philippot^d, N. Cabriol^{a,*}

^aInstituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, Mexico

^bLaboratory of Soil Ecology, Department of Biotechnology and Bioengineering, CINVESTAV-IPN, Avenida Politécnico Nacional 2508, CP 07000 Mexico City, Mexico

^cInstituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, Mexico

^dInstitut National de la Recherche Agronomique, UMRA111, Microbiologie des Sols-Césoles, 21065 Dijon Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2008

Received in revised form 27 October 2009

Accepted 28 October 2009

Available online 5 December 2009

Keywords:

Ammonification

Biosolids application

Nitrification

RISA

Saline–sodic soil of Texcoco

ABSTRACT

The saline–sodic soil of the former Lake Texcoco, a large area exposed to desertification, is a unique environment, but little is known about its microbial ecology. The objective of this study was to examine bacterial community structure, activity, and function when biosolids were added to microcosms. The application rates were such that 0, 66, 132, or 265 mg total N kg⁻¹ were added with the biosolids (total C and N content 158 and 11.5 g kg⁻¹ dry biosolids, respectively). Approximately 60% of the biosolids were mineralized within 90 days. Microbial respiration and to a lesser extent ammonification and nitrification, increased after biosolids application. The rRNA intergenic spacer analysis (RISA) patterns for the biosolids and unamended soil bacterial communities were different, indicating that the microorganisms in the biosolids were distinct from the native population. It appears that the survival of the allochthonous microorganisms was short, presumably due to the adverse soil conditions.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lake Texcoco, which lies to the east of Mexico City, was drained from the 17th century onwards to limit flooding in the city (O'Hara and Metcalfe, 1997). Nowadays, it is a large area of lacustrine bed exposed to desertification. The alkaline soil is of volcanic origin with saline–sodic characteristics and a potential evaporation rate larger than rainfall (1800 mm and 570 mm per year, respectively). It has limited halophilic vegetation leaving large parts of the lake bed exposed to wind erosion. Easterly winds caused large pollution problems in Mexico City that were aggravated by pathogens carried with the dust particles (CNA, 1996; Cruickshank, 1999).

Starting in the 70's, a hydraulic and ecological project was started to solve the environmental pollution problems and to rehabilitate the soils for forestation and, to a lesser extent, for agriculture. Irrigation works were started to drain away the salts using wastewater and to improve aeration in the root zone. The addition of biosolids (treated sewage sludge) (Kao et al., 2006; Sullivan et al., 2006) was also proposed as fertilizer to improve the vegetation cover (Cruickshank, 1999).

The saline–sodic soil of the former Lake Texcoco is a unique environment (Beltrán-Hernández et al., 1999; Ramírez-Fuentes

et al., 2002), but little is known about the microbiota. It is known that the dynamics of the nutrients in the biogeochemical cycles depend on the composition and structure of the native soil microbial community. It is also well known that the agronomic quality of soil and its resilience to stress factors is determined by the microbial community, its abundance, enzymatic activity and diversity (Seybold et al., 1999; Griffiths et al., 2001; Hofman et al., 2003; Hollender et al., 2003).

Studying the microbial diversity and the dynamics of the biogeochemical processes will help to understand the changes in available nutrients after addition of biosolids. This is especially critical in extreme soils where the microbial communities are under severe stress (Bengtsson, 1998; Brock, 2000). Hypersaline environments can be expected to have a relatively simple ecosystem structure as the number and metabolic diversity of the known microorganisms adapted to life at high salt concentrations are limited (Oren, 2002). In a sodic lake in Mongolia ammonia oxidizing bacteria were isolated (Sorokin et al., 2001). Ammonia oxidation has also been reported in the soil of the former Lake Texcoco with electrolytic conductivity (EC) > 30 dS m⁻¹ (Beltrán-Hernández et al., 1999; Ramírez-Fuentes et al., 2002).

Until recently our understanding of microbial populations was limited to those that were cultivable. The advent of cloning-based techniques or community fingerprinting techniques, such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) or rRNA intergenic spacer

* Corresponding author. Address: Av. Universidad, 2014, Unidad Latinoamericana, HAITI G4, Col. Copilco Universidad, Deleg. Coyoacán, 04350 México D.F., Mexico. Tel.: +52 55 56 22 36 00x8696; fax: +52 55 56 16 27 98.

E-mail addresses: nca@pumas.i.unam.mx, natcabriol@yahoo.com (N. Cabriol).

analysis (RISA), has contributed substantially to our understanding of microbial community dynamics (Benlloch et al., 2001; Brodie et al., 2002; Casamayor et al., 2002). RISA fingerprinting, which relies on the length polymorphism of the intergenic spacer between the small (16S) and large (23S) subunit rRNA genes, was used in this study because it is easy to perform, allows the rapid examination of complex bacterial communities, and can be done without the use of specific and expensive equipment (Privitera et al., 1998; Fisher and Triplett, 1999; Ranjard et al., 2000).

The objective of this study was to examine the structure and activity of the soil bacterial community, as well as the activity of the nitrifying population when biosolids were added. A range of techniques, including both molecular and physicochemical ones, were used.

2. Methods

2.1. Sampling sites

The study area, called the former Lake Texcoco, is situated in the Valley of Mexico at an altitude of 2210 m above sea level, along the northeast part of Mexico City (Beltrán-Hernández et al., 1999). The sampling area (southeast of the former lake) is one of the least disturbed by drainage and irrigation. The superficial soil appears dry, is brittle to the touch, and often contains cracks and salt crusts. The dominant vegetation on the site is the saline grass, *Distichlis spicata*. The grass in the sampling area was <15 cm high and sparsely distributed or absent due to the high salinity and sodicity. The sandy soil (USDA classification) with pH 10.4 had a total carbon (C) and nitrogen (N) content of 28.7 and 1.12 g kg⁻¹ dry soil, respectively.

2.2. Biosolids

Biosolids (treated sewage sludge) were produced by thermophilic anaerobic digestion of municipal biological sewage sludge (wastewater treatment plant of *Cerro de la Estrella*, Mexico City) in the laboratory of the *Instituto de Ingeniería* (Engineering institute, UNAM, Mexico City). Such biosolids are classified as "class A" (Official Mexican Standard: NOM-004-SEMARNAT-2002, based on the same criteria as the US EPA regulation) (Rojas Oropeza et al., 2001; Cabriol et al., 2002). The biosolids had the following characteristics: pH 7.2, water content 970 g kg⁻¹ biosolids, total C and N content 158 and 11.5 g kg⁻¹ dry biosolids, and 4.52 NH₄⁺-N g kg⁻¹ dry biosolids.

2.3. C and N dynamics after the application of different concentrations of biosolids

Soil was sampled from the first 10 cm of the surface layer after removing the superficial salt crust (1 cm depth) on 23 August 2001. The samples of approximately 5 kg were kept in 50 l PVC drums at 4 °C under aerobic conditions for a week.

In each of the experimental units (one microcosm), 50 g soil were added to a 100 ml flask and amended with different concentrations of biosolids. Additionally, three sub-samples of soil treated with different concentrations of biosolids were autoclaved three times for 30 min with an interval of 1 day to study abiotic factors that might affect C and N dynamics (Wolf and Skipper, 1994). The application rates were such that 0 mg total N kg⁻¹ (C0 treatment), 66 mg total N kg⁻¹ (C1 treatment), 132 mg total N kg⁻¹ (C2 treatment), or 265 mg total N kg⁻¹ (C3 treatment) were added with the biosolids. Considering a soil density of 1.3 g cm⁻³ and a 20 cm soil layer, an equivalent of 0, 130, 260, or 520 kg N would have been added per ha. At the onset of the incubation, the water

content of the soil was 25% and addition of biosolids increased it to 39% for C1, to 54% for C2 and to 82.5% for C3. The soil was allowed to dry to 20% within 3 days to avoid anaerobic conditions and maintained at 20% by adding distilled water.

Each 100 ml flask was added to a 2 l jar containing two vessels: one with 0.1 M sodium hydroxide (NaOH) solution to trap carbon dioxide (CO₂) evolved and the other with 2% boric acid (H₃BO₃) to trap volatilized ammonia (NH₃). The jars were closed and incubated at 20 °C for 90 days. Jars were opened every week to maintain aerobic conditions. After 0, 1, 7, 14, 30 and 90 days three jars were selected at random for analysis of the soil and gases. The soil was analyzed for pH, EC in the saturated extract, and water content, while 25 g was extracted for ammonium (NH₄⁺), nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) with 200 ml 0.5 M K₂SO₄.

2.4. Characterization of the soil and biosolids

The quantity of N available in the biosolids was calculated according to Andreoli et al. (2001):

$$N_{\text{available}} = f_{\text{org}}(N_{\text{org}}) + f_{\text{vol}}(N_{\text{NH}_4}^+) + N_{\text{NO}_3} \quad (1)$$

with: f_{org} = percentage of biosolid mineralized in the studied soil over a 1 month period, N_{org} = organic N, $f_{\text{vol}} = 1 - \text{percentage of NH}_4^+$ volatilized to NH₃.

Soil pH was measured in 1:2.5 soil–H₂O suspension using a glass electrode (Thomas, 1996). Large concentrations of Cl⁻ might affect the determination of C by wet oxidation (Nelson and Sommers, 1996) so the organic C in soil was determined by oxidation with potassium dichromate. The evolved CO₂ in 20 ml of 1 M NaOH was titrated with 0.1 M HCl (Jenkinson and Powelson, 1976; Amato, 1983). Inorganic C in the soil was determined by adding 20 ml of 1 M HCl solution to 1 g air-dried soil. Total N was measured by the Kjeldhal method using concentrated H₂SO₄, K₂SO₄ and HgO to digest the sample (Bremner, 1996). NH₄⁺, NO₂⁻ and NO₃⁻ in the 0.5 M K₂SO₄ extracts were determined colourimetrically (Mulvaney, 1996).

2.5. Changes in the microbial structure of the soil amended with biosolids as determined by DNA Fingerprinting Approach (RISA)

The conditions of the microcosms in this experiment and the application of biosolids were similar to those in the previous experiment. For each treatment, five sub-samples of 200 g soil were added to 350 ml flasks and incubated for 150 days as described before. After 0, 1, 7, 14, 30, 90, and 150 days, three sub-samples of 1 g soil were collected from each flask and the microbial populations were analyzed by RISA.

2.6. Direct DNA extraction of soil

Extraction of DNA from soil was done as described by Martin-Laurent et al. (2001). One milliliters of a solution containing 100 mM Tris (pH 8.0), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% (wt/vol) polyvinylpyrrolidone, and 2% (wt/vol) sodium dodecyl sulphate was added to 250 mg soil in a 2 ml mini-bead-beater tube containing 0.5 and 0.1 g 106 mm- and 2 mm-diameter glass beads, respectively. Samples were homogenized for 30 s at 1600 rpm in a mini-bead-beater cell disruptor (Mikro-Dismembrator S; B. Braun Biotech International). The samples were centrifuged at 14,000g at 4 °C for 1 min. The collected supernatants were incubated with 5 M sodium acetate (1:10) on ice for 10 min and centrifuged at 14,000g for 5 min. After precipitation with one volume of ice-cold isopropanol, the nucleic acids were washed with 70% ethanol and purified using a Sepharose 4B spin column. The quality and the size of the soil DNAs were checked by electrophoresis on 1% agarose

gels. DNA was quantified using a BioPhotometer at 260 nm (Eppendorf, Hamburg, Germany). Three replicates were used for DNA evaluation.

2.7. RISA amplification

The intergenic spacer region between the small and large subunits of the ribosomal genes was amplified from 50 ng of DNA extracted from soil with a total volume of 50 μ l by using 1 mM concentrations of the universal primers 38r (59-CCG GGT TTC CCC ATT CCG-39) and 72f (59-TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT-39), and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Appligene) under the following conditions: 5 min at 94 °C, 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, and 2 min at 72 °C, plus an additional 15-min cycle at 72 °C; primers and PCR conditions were reported by Martin-Laurent et al. (2001). Aliquots of 15 μ l were separated by electrophoresis on a native 6% acrylamide gel run at 8 mA for 17 h. The VIII molecular size marker from Boehringer Mannheim was used and gels were stained with ethidium-bromide. Images were documented with the Gel Doc 2000 System from Bio-Rad, and digital pictures were analysed with the Quantity One software from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc.). The range-weighted richness (Rr) is a mathematical value used to describe the total diversity of the sample analysed, according to the following formula, modified from Marzorati et al. (2008): $Rr = \text{total number of bands} \times [(L_b - S_b)/100]$, where L_b is the longest band in terms of base pairs (bp), while S_b is the shortest one.

2.8. Statistical analyses

The experimental units were the microcosms, so results were analyzed statistically using factorial variance and DUNCAN analysis with SAS Statistical Analysis ANOVA MANOVA V.6 (1989).

3. Results

3.1. C and N mineralization

The initial pH of the soil samples used for the bioassays was 10.4, and this value did not change after addition of biosolids (data not shown). The EC, however, increased with the application of biosolids at the onset of the experiment, but remained constant thereafter at 134.2 dS m⁻¹.

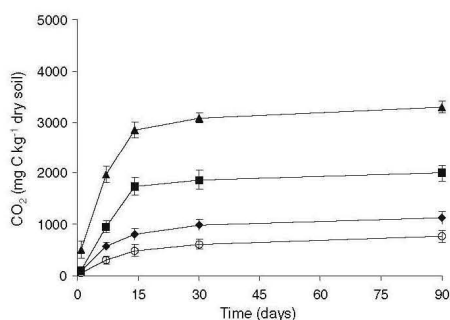


Fig. 1. CO₂ production (mg C kg⁻¹ dry soil) from unamended soil (C0, ○) and soil amended with 66 mg biosolid-N kg⁻¹ soil (C1, ◆), 132 mg biosolid-N kg⁻¹ soil (C2, ■) or 265 mg biosolid-N kg⁻¹ soil (C3, ▲).

The CO₂ production rate increased with increased application of biosolids (Fig. 1). The CO₂ derived from the mineralization of biosolids, i.e. the production of CO₂ in the soil added with biosolids minus the unamended soil, after 90 days was 366 mg kg⁻¹ dry soil, 1232 mg kg⁻¹ dry soil and 2548 mg kg⁻¹ dry soil for treatment C1, C2 and C3, respectively. As such, an average of 59% of the organic C in the biosolids was mineralized within 90 days.

The NH₃ volatilization rate increased proportionally with increased application of biosolids (Fig. 2). The total amount of NH₃ volatilized after 90 days was 40.3, 82.2 and 174.4 mg NH₃-N kg⁻¹ dry soil for treatments C1, C2, and C3, respectively.

In each of the treatments, the concentrations of NH₄⁺ decreased in the first days of the incubation and increased thereafter (Fig. 3a). Mean concentrations of NH₄⁺ increased with increased application of biosolids. Concentrations of NO₂⁻ increased in each of the treatments until 14 days and decreased thereafter (Fig. 3b). The mean concentration of NO₂⁻ was 1.4-times larger in the C1 and C2 treatments and 1.6-times larger in the C3 treatment compared to the unamended soil. Concentrations of NO₃⁻ sharply decreased in each of the treatments during the first day and did not change until 14 days (Fig. 3c). Concentrations of NO₃⁻ after 14 days increased in each of the treatments with the largest increase found in treatment C3 and the lowest in the unamended soil.

The mean amount of available N in the biosolids was 9.91 g kg⁻¹ dry biosolids (1), which was 86.4% of the total N content of the biosolids.

3.2. Microbial structure changes as determined by RISA

RISA was used to analyze the temporal changes in the diversity of the soil community after biosolids application (Fig. 4). The patterns generated from DNA amplified from extracts of unamended soil and biosolids were different. In the unamended soil, the intensity of the phylotype 180 bp-band in the RISA pattern increased after 90 days while the intensity of the 220 bp-band decreased. The 140 bp-band was only detectable at 1 day. The intensity of the 170, 300, and 410 bp-bands were constant between 1 and 150 days, although the 410 bp-band had a low intensity. The 180 bp-band appeared in the soil amended with 66 and 132 mg N-biosolid after 90 days (C1 and C2 treatment), although at a lower intensity than in the unamended soil (C0 treatment). This band did not appear in the soil amended with 265 mg N-biosolid (C3 treatment).

The pattern of C1 was a mixture of the biosolid and the unamended soil patterns. This observation was confirmed using soil

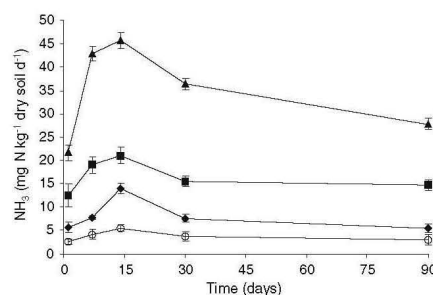


Fig. 2. NH₃ volatilization (mg N kg⁻¹ dry soil) from unamended soil (C0, ○) and soil amended with 66 mg biosolid-N kg⁻¹ soil (C1, ◆), 132 mg biosolid-N kg⁻¹ soil (C2, ■) or 265 mg biosolid-N kg⁻¹ soil (C3, ▲).

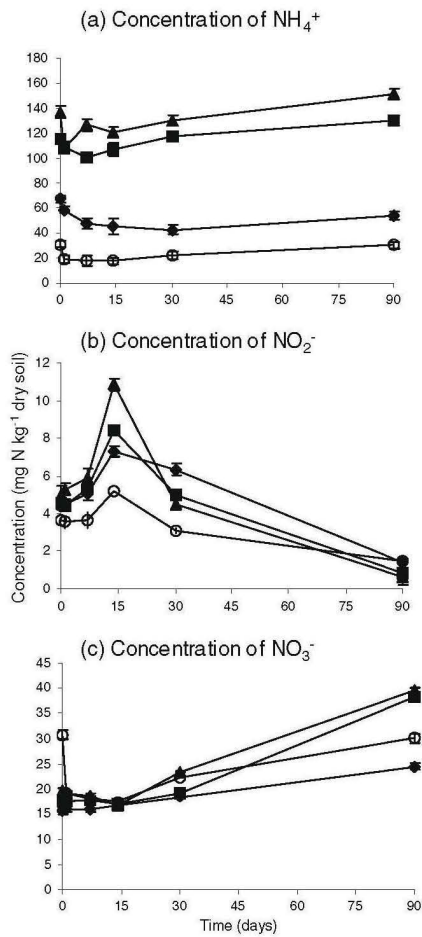


Fig. 3. Concentrations of (a) NH_4^+ , (b) NO_2^- and (c) NO_3^- (mg N kg^{-1} dry soil) in unamended soil (○, ○) and soil amended with 66 $\text{mg biosolid-N kg}^{-1}$ soil (C1, ◆), 132 $\text{mg biosolid-N kg}^{-1}$ soil (C2, ■) or 265 $\text{mg biosolid-N kg}^{-1}$ soil (C3, ▲).

added with C2 and C3. In addition the presence of the biosolid patterns increased with higher biosolids loading. The temporal evolution was related to the quantity of biosolids. In the unamended soil and soil added with 66 mg N-biosolid (C1 treatment), the intensity of bands increased in two fingerprints: the 180 and 300 bp-band (Fig. 4). In soil of treatments C2 and C3, the intensity of two specific bands, the 140 bp and 170 bp-bands, decreased (Fig. 5). The RISA fingerprint showed that the typical pattern of soil in treatment C2 began to appear after only 90 days; however, 150 days were not sufficient to obtain the typical pattern of soil in treatment

C3. The values of range-weighted richness (Rr) indicated that the application of the largest amount of sludge (C3) increased the microbial diversity for the entire experiment, but application of lower amounts had only a temporary effect, i.e. until day 30 (Fig. 6).

4. Discussion

4.1. C and N mineralization

Application of biosolids to soil often increases EC at the onset of the incubation as was found in this experiment (Andreoli et al., 2001). Approximately 60% of the biosolids was mineralized within 90 days. Higher levels of mineralization were reported by Beltrán-Hernández et al. (1999). They found that 90% of the biosolids added to the soil of Texcoco mineralized after 70 days when adjusted to 40% of the water-holding capacity (WHC) and incubated at 22 ± 2 °C. Franco-Hernández et al. (2003) reported that 28% of added biosolids mineralized in an agricultural soil incubated at 40% WHC and 22 ± 2 °C for 42 days. Differences in percentages of mineralization might be due to incubation conditions, e.g. temperature, composition of organic matter in the biosolids and soil characteristics. Additionally, there is the possibility of a "priming effect", which is defined as a sudden and rapid change in the soil organic matter due to a comparatively moderate treatment, such as the addition of a substrate or microorganisms, soil manipulation or even increase and decrease in soil humidity (Seybold et al., 1999; Kuzyakov et al., 2000). This phenomenon has been described for soils of the former Lake Texcoco, and may have contributed to the increased production of CO_2 (Luna-Guido et al., 2001; Conde et al., 2005). Part of the biosolid organic C is mineralized by indigenous microorganisms (Wong and Lai, 1996; Coyne, 2000), while the remaining part might be immobilized by the same microorganisms or retained by the soil (Beltrán-Hernández et al., 1999).

Five different processes (NH_3 volatilization, NH_4^+ fixation, NH_4^+ immobilization, N mineralization and nitrification) affected the concentrations of NH_4^+ in soil. Large amounts of NH_3 volatilized in biosolid-amended soil as the high soil pH favoured NH_3 emission (Flowers and Arnold, 1983; Kirchmann and Witter, 1989; Tan, 2000). If we assume that all of the NH_3 volatilized in the biosolid-amended soil originated from the biosolids, then on average 63% of the added N was lost within 90 days. Vega-Jarquín et al. (2003) found that approximately 50 $\text{mg NH}_4^+-\text{N kg}^{-1}$ was adsorbed onto the soil matrix when 200 $\text{mg NH}_4^+-\text{N}$ was added, which may be the effect of silicates (Orlov, 1992; Tan, 2000). Fixation of NH_4^+ in this experiment appeared to be much lower as most of the NH_4^+ added at the onset of the incubation was extractable.

Some of the NH_4^+ was oxidized to NO_2^- and NO_3^- indicating the presence of nitrifiers in the soil, but nitrification was low. The increase in concentration of NO_2^- was low, i.e. <20 $\text{mg NO}_2^--\text{N dry soil}$, and large concentrations of NH_4^+-N were detected throughout the incubation. The activity of ammonia oxidizing bacteria (AOB), which are responsible for the first stage of nitrification, preceded that of nitrite oxidizing bacteria (NOB). The initial increase in NO_2^- concentrations was due to a lag in NOB activity, i.e. it was not intimately linked to AOB. De Boer and Kowalchuk (2001) argued that an intimate association between AOB and NOB may facilitate the transfer of nitrite, thus preventing the build up of toxic compounds. It has to be remembered, however, that at high pH undissociated nitric acid is virtually absent so the toxicity of NO_2^- for microorganisms is minimal (Sorokin and Kuenen, 2005). In saline-sodic lakes, Sorokin et al. (1998) and Ward et al. (2000) have reported AOB such as *Nitrosomonas halophila*, *Nitrosomonas europaea* and the NOB *Nitrobacter alkalicus* sp. nov., *Nitrobacter winogradskyi*, respectively. NO_2^- does normally not accumulate in soil as

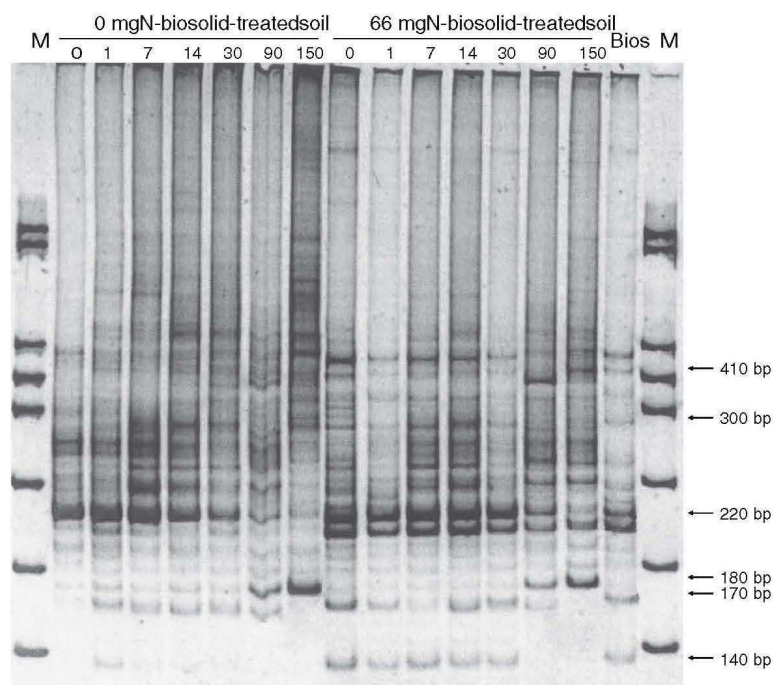


Fig. 4. Comparison of the RISA patterns obtained from the biosolids (Bios), the unamended soil (C0) or soil amended with 66 mg biosolid-N kg⁻¹ dry soil (C1). M: marker and above the lanes the time of sampling is given in days.

oxidation of NH_4^+ is immediately followed by oxidation of NO_2^- (Buckman and Brady, 1985; Madigan et al., 2003). Beltrán-Hernández et al. (1999) observed the same accumulation in saline-sodic soils irrigated during 5 years. Large salt concentrations are known to inhibit NO_2^- oxidation (Oren, 2002). Additionally, large concentrations of NH_4^+ might have further inhibited oxidation of NO_2^- (Buckman and Brady, 1985; Rice and Tiedje, 1989). Increases in NO_2^- concentration might also have been due to denitrification at the onset of the incubation, as the water content of the soil was high, especially in treatments C2 and C3. It might also explain the sharp drop in concentrations of NO_2^- at day one.

Sixty percent of C added with the biosolids was mineralized within 90 days, but that did not result in large increases in inorganic N, although 86% of the total N content was easily available. The biosolids had a C-to-N ratio of 13.7, which normally favours mineralization and not immobilization (Buckman and Brady, 1985). The soil of Texcoco, however, is N depleted so part of the mineralized N was immobilized into the microbial biomass (Ramírez-Fuentes et al., 2002). Additionally, losses of NO_2^- due to denitrification during the first 3 days could not be excluded as water content upon addition of the biosolids was high.

The increase in CO_2 production was related to the large easily decomposable fraction of the biosolids. This production is a reflection of increased activity of the microbiota in the presence of new nutrients, and is followed by a crash in the population dynamics

due to the exhaustion of the nutrients. Ekschmitt and Griffiths (1998) used response dynamics to explain this phenomenon, which states that communities develop in a fluctuating environment in relation to their diversity. Lenski and Riley (2002), and Elena and Lenski (2003) observed this same phenomenon in experimental evolution done in a chemostat. They found that there was a "metabolic optimum" for the ecosystem carrying capacity, after which the microcosm suffered a turnover and the diversity diminished due to the competition of the fast-growing population with the rest of the community.

4.2. Microbial structure changes as determined by RISA

The RISA patterns for biosolids and unamended soil were different, indicating that the soil microbial community was different from that of the biosolids. The biosolids showed a rich microbial diversity. However, the diversity might even be higher as the fingerprinting method used in this study has limitation such as (i) only the most abundant populations were represented in the community profile, (ii) several sequences are contained in one RISA band, and (iii) a single organism could be represented by several RISA bands (Ranjard et al., 2000; Ben-Dov et al., 2006). Therefore, the fingerprinting method is an indicator of the degree of diversity of a bacterial community and not an absolute measurement (Marzorati et al., 2008).

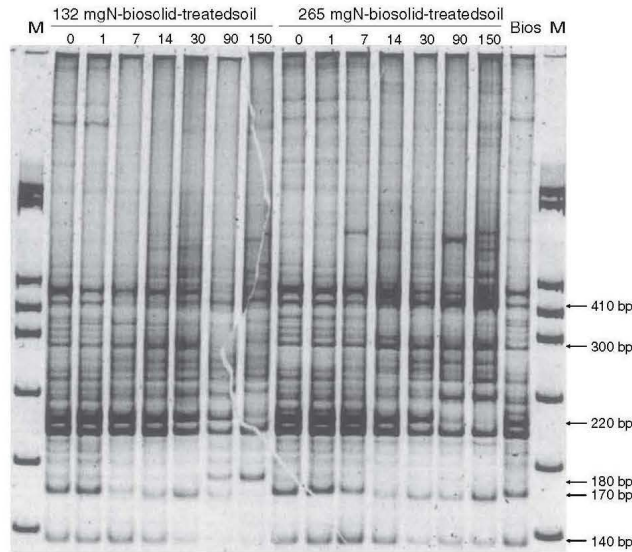


Fig. 5. Comparison of the RISA patterns obtained from soil amended with 132 mg biosolid-N kg⁻¹ dry soil (C2) or 265 mg biosolid-N kg⁻¹ dry soil (C3). M: marker and above the lanes the time of sampling is given in days.

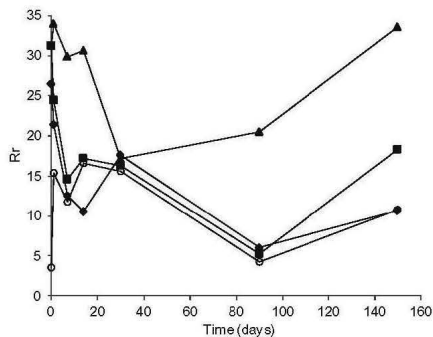


Fig. 6. Comparison of the range-weighted richness obtained from unamended soil (C0, ○) and soil amended with 66 mg biosolid-N kg⁻¹ soil (C1, ◆), 132 mg biosolid-N kg⁻¹ soil (C2, ■) or 265 mg biosolid-N kg⁻¹ soil (C3, ▲).

The biosolid fingerprint superimposed itself on that of the soil. In the higher concentration of biosolids, the more intense fingerprint was superimposed. Martin-Laurent et al. (2001) also observed a modification in soil biodiversity after biosolids application. The phylotypes with a low density (140 and 170 bp) disappeared in biosolid-treated soil. This phenomenon is related to the short survival of exogenous microorganisms in soil due to their competition with indigenous microorganisms. The physico-chemical conditions of the soil were also different from those in the biosolids, e.g. alkalinity, sodicity, and salinity, so the microorganisms of the biosolids (including possible pathogens) could not adapt to the extreme conditions of the studied soil (Oren, 2002).

Similar bands were found when different concentrations of biosolids were added, but with different intensities. The different intensities of the bands were related to the relative abundance of the different populations (Cytryn et al., 2000). For example, the disappearance of the 140 bp- and 170 bp-bands occurred progressively in C1 and C2 treatment, but not in C3 treatment: in this case, more time (>150 days) would be necessary for it to disappear. Whatever the quantity of added biosolids, the biosolid bacteria persisted for many months in the soil (Fig. 6). This was more evident when higher quantities of biosolids were added. It might be that these bands, presumably, are related to an “active population” metabolizing easily decomposable C substrate abundant in the biosolids. Perhaps this active population induced the flush in CO₂ production at the onset of the incubation and decreased when the easily decomposable substrate was consumed. Subsequently, a population (the 180 band) that consumed more resistant organic material or products of the decomposition of the easily decomposable organic material became dominant. The application of easily decomposable substrate in the C3 treatment was such, however, that the 180 band did not appear. The observed response may be related to the soil resilience (ability of a soil to recover from perturbation): changing diversity is not always associated with changing decomposition rate (Griffiths et al., 2004; Girvan et al., 2005). Future work should investigate which group of bacteria comprises this particular band using cloning and sequencing of DNA, and comparing this information with available libraries of the RISA region.

It was concluded that the microbial activity evidenced by respiration, and, to a lesser extent, by ammonification and nitrification, increased after biosolids application. Adding biosolids to the lake bed would improve its nutrient content thereby favoring vegetation growth. The microorganisms in the biosolids were distinct from the native population and the survival of the allochthonous

microorganisms was short, presumably due to adverse soil conditions.

Acknowledgements

The authors thank DGAPA-PAPIIT for financially supporting the project; A. Andrade Cetto for use of the incubating chambers at the Faculty of Science (UNAM); M. Galván, C. Vega, S. Hallet, A. Durán and M.G. Sanchez-Nahuacatl for technical support. M.R.-O. received grant-aided support from CONACYT (Mexico) and DGAPA-PAPIIT (Mexico).

References

- Amato, M., 1983. Determination of carbon ^{13}C and ^{14}C in plant and soil. *Soil Biol. Biochem.* 20, 107–114.
- Andreo, C.V., Sperling, V.M., Fernández, F., 2001. Lodo de esgotos: tratamiento e disposición final. DESA SANEPAR, Paraná.
- Beltrán-Hernández, R.L., Coss-Muñoz, E., Luna-Guido, M.L., Mercado-García, F., Siebe, C., Dendooven, L., 1999. Carbon and nitrogen dynamics in alkaline soil of the former Lake Texcoco (Mexico) as affected by application of sewage sludge. *Eur. J. Soil Sci.* 50, 601–608.
- Ben-Dov, E., Shapiro, O.H., Siboni, N., Kushmaro, A., 2006. Advantage of using *fosM* at the 3' termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6902–6906.
- Bengtsson, J., 1998. Which species? What kind of diversity? Which ecosystem function? Some problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function. *Appl. Soil Ecol.* 10, 191–199.
- Benloch, S., Acinas, S.G., Antón, J., López-López, A., Luz, S.P., Rodríguez-Valera, F., 2001. Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. *Microb. Ecol.* 41, 12–19.
- Bremner, J.M., 1996. Nitrogen—Total. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis Part 3: Chemical Methods*. Soil Science Society of America Inc., American Society of Agronomy Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 1085–1121.
- Brook, J.P., 2000. The evolution of adaptive systems. Academic Press, London.
- Brodie, E., Edwards, S., Clipson, N., 2002. Bacterial community dynamics across a floristic gradient in a temperate upland grassland ecosystem. *Microb. Ecol.* 44, 260–270.
- Buckman, H.O., Brady, N.C., 1985. *Naturaleza y propiedades del suelo*. UTEXA, México.
- Cabriel, N., Rojas Oropeza, M., Noyola, A., 2002. Removal of helminth eggs and fecal coliforms by anaerobic thermophilic sludge digestion. *Water Sci. Technol.* 45, 269–274.
- Casamayor, E.O., Massana, R., Benloch, S., Ovreás, L., Díez, B., Goddard, V.J., Gasol, J.M., Joint, I., Rodríguez-Valera, F., Pedros-Alió, C., 2002. Changes in archaeal, bacterial, eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ. Microbiol.* 4, 338–348.
- NA, C., 1996. Estudio de Impacto Ambiental asociado al Proyecto de Saneamiento de las aguas negras que se producen en el Valle de México. Comisión Nacional del Agua, México.
- Conde, E., Cardenas, M., Ponce-Mendoza, A., Luna-Guido, M.L., Cruz-Mondragón, C., Dendooven, L., 2005. The impacts of inorganic nitrogen application on mineralization of ^{14}C -labelled maize and glucose, and on priming effect in saline alkaline soil. *Soil Biol. Biochem.* 37, 681–691.
- Coyne, M., 2000. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Paraninfo, Madrid.
- Cruickshank, G.G., 1999. Recuperación hidroecológica del ex-Lago de Texcoco: Conservación y restauración de suelos. In: Siebe, C., Rodarte, H.C., Toledo, G., Echeverys, J., Oleschko, C. (Eds.), *Programa Universitario del Medio Ambiente (PUMA)*. UNAM, México, pp. 473–488.
- Cytryn, E., Minz, D., Oremland, R.S., Cohen, Y., 2000. Distribution and diversity of Archaea corresponding to the limnological cycle of a hypersaline stratified lake (Solar lake, Sinai, Egypt). *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3269–3276.
- De Boer, W., Kowalchuk, G.A., 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 33, 853–866.
- Ekschmitt, K., Griffiths, B.S., 1998. Soil biodiversity and its implications for ecosystem functioning in a heterogeneous and variable environment. *Appl. Soil Ecol.* 10, 201–215.
- Elena, S.F., Lenski, R.E., 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat. Rev. Gen.* 4, 457–469.
- Fisher, M.M., Triplett, E.W., 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4630–4636.
- Flowers, T.H., Arnold, P.W., 1983. Immobilization and mineralization of nitrogen of soils incubated with pig slurry or ammonium sulphate. *Soil Biol. Biochem.* 15, 329–335.
- Franco-Hernández, O., Mckelligan-González, A.N., López-Olguin, A.M., Espinosa-Coron, F., Escamilla-Silva, E., Dendooven, L., 2003. Dynamics of carbon, nitrogen and phosphorus in soil amended with irradiated, pasteurized and limed biosolids. *Bioresour. Technol.* 87, 93–102.
- Girvan, M.S., Campbell, C.D., Killham, K., Prosser, J.I., Glover, L.A., 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ. Microbiol.* 7, 301–313.
- Griffiths, B.S., Bonkowski, M., Roy, J., Ritz, K., 2001. Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Appl. Soil Ecol.* 16, 49–61.
- Griffiths, B.S., Kuan, H.L., Ritz, K., Glover, L.A., McCaig, A.E., Fenwick, C., 2004. The relationship between microbial community structure and functional stability, tested experimentally in an upland pasture soil. *Microb. Ecol.* 47, 104–113.
- Hofman, J., Bezchlebová, J., Dušek, L., Doležal, L., Holoubek, I., Andl, P., Ansorgová, A., Malý, S., 2003. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. *Environ. Int.* 28, 118–171.
- Hollender, J., Althoff, K., Mundi, M., Dott, W., 2003. Assessing the microbial activity of soil samples, its nutrient limitation and toxic effects of contaminants using a simple respiration test. *Chemosphere* 53, 269–275.
- Jenkinson, D.S., Powlson, D.S., 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* 8, 209–213.
- Kao, P.H., Huang, C.C., Hsueh, Z.Y., 2006. Response of microbial activities to heavy metals in a neutral loamy soil treated with biosolid. *Chemosphere* 64, 63–70.
- Kirchmann, H., Witter, E., 1989. Ammonia volatilization during aerobic and anaerobic manure decomposition. *Plant Soil* 115, 35–36.
- Kuzaykov, V., Friedel, J.K., Stahr, K., 2000. Review of mechanism and quantification of priming effect. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1485–1498.
- Lenski, R.E., Riley, M.A., 2002. Chemical warfare from an ecological perspective. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, pp. 556–558.
- Luna-Guido, M.L., Beltrán-Hernández, R.L., Solís-Ceballos, N.A., Hernández-Chavez, N., Mercado-García, F., Olalde-Portugal, V., Catt, J.A., Dendooven, L., 2001. Chemical and biological characteristics of alkaline saline soils from the former Lake Texcoco as affected by artificial drainage. *Biol. Fertil. Soils* 32, 102–108.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2003. *Biología de los microorganismos*, 10^a ed. Prentice Hall, Iberia, Madrid.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., Cairoux, G., 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 7, 2354–2359.
- Marzorati, M., Wittebole, L., Boun, N., Daffonchio, D., Verstraete, W., 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environ. Microbiol.* 10, 1571–1581.
- Mulvaney, R.L., 1996. Nitrogen-inorganic forms. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods Part 3*. Soil Science Society of America Inc., American Society of Agronomy Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 1123–1184.
- Nelson, D.W., Sommers, L.E., 1996. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods Part 3*, third ed. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 961–1010.
- NOM-004-SEMARNAT-2002, 2003. Protección ambiental— lodos y biosólidos.— Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. In: *Diario Oficial de la Federación*, 15 de agosto de 2003, México, pp. 18–60.
- O'Hara, S.L., Metcalfe, S.E., 1997. The climate of Mexico since the Aztec period. *Quatern. Int.* 43, 25–31.
- Oren, A., 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 56–63.
- Orlov, D.S., 1992. *Soil Chemistry*. Balkema AA, Rotterdam, Brookfield.
- Privitera, A., Rappazzo, G., Sangari, P., Gianninò, V., Licciardello, L., Stefani, S., 1998. Cloning and sequencing of a 16S/23S ribosomal spacer from *Haemophilus parainfluenzae* reveals an invariant, mosaic-like organisation of sequence blocks. *FEMS Microbiol. Lett.* 164, 289–294.
- Ramírez-Fuentes, E., Ponce-Mendoza, A., Luna-Guido, M.L., Van den Broeck, E., Dendooven, L., 2002. Incorporation of glucose- ^{14}C and NH_4^+ in microbial biomass of alkaline saline soil. *Biol. Fertil. Soils* 36, 269–275.
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., Gourbière, F., Thioulouse, J., Nazaret, S., 2000. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb. Ecol.* 39, 263–272.
- Rice, C.W., Tiedje, J.M., 1989. Regulation of nitrate assimilation by ammonium in soil and isolated microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 21, 597–602.
- Rojas Oropeza, M., Cabriel, N., Ortega, S., Castro Ortiz, L.P., Noyola, A., 2001. Removal of fecal indicator organisms and parasites (fecal coliforms and helminth eggs) from municipal biologic sludge by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion. *Water Sci. Technol.* 44, 97–101.
- Seybold, C.A., Herrick, J.K., Bredja, J.J., 1999. Soil resilience: a fundamental component of soil quality. *Soil Sci. Soc. Am.* 63, 224–234.
- Sorokin, D.Y., Kuenen, J.G., 2005. Chemolithotrophic haloalkaliphiles from soda lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 287–295.
- Sorokin, D.Y., Muzzer, G., Brinkhoff, T., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., 1998. Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N. Alkalitus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 170, 345–352.
- Sorokin, D., Tourova, T., Schmid, M.C., Wagner, M., Koops, H.P., Kuenen, J.G., Jetten, M., 2001. Isolation and properties of obligately chemolithoautotrophic and extremely alkali-tolerant ammonia-oxidizing bacteria from Mongolian soda lakes. *Arch. Microbiol.* 176, 170–177.

- Sullivan, T.S., Stromberger, M.E., Paschke, M.W., 2006. Parallel shifts in plant and soil microbial communities in response to biosolids in a semi-arid grassland. *Soil Biol. Biochem.* 38, 449–459.
- Tan, K.H., 2000. *Environmental soil science*, 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York.
- Thomas, G.W., 1996. Soil pH and soil acidity. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods Part 3*. Soil Science Society of America Inc., American Society of Agronomy Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 475–490.
- Vega-Jarquín, C., García-Mendoza, M., Jablonowski, A.N., Luna-Guido, M., Dendooven, L., 2003. Rapid immobilization of applied nitrogen in alkaline saline soils. *Plant Soil* 256, 379–388.
- Ward, B.B., Martino, D.P., Diaz, M.C., Joye, S.B., 2000. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline mono lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2873–2881.
- Wolf, D.C., Skipper, H.D., 1994. Soil sterilization. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, P.S. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. Number 5 in the Soil Science Society of American Book Series*. American Society of Agronomy, Madison, pp. 41–44.
- Wong, J.W.C., Lai, K.M., 1996. Effect of artificial soil mix from coal fly ash and sewage sludge on soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils* 23, 420–424.