



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores

Zaragoza

Instituto de Geología UNAM

Efecto del riego con agua residual sobre la eficiencia de la simbiosis

Sinorhizobium sp.-alfalfa (*Medicago sativa*)

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA:

Campiran Martínez Estefany Jacqueline

Directora de tesis: Dra. Christina Desireé Siebe Grabach

Asesor interno: Dr. Arcadio Monroy Ata

Ciudad de México, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **CAMPIRAN MARTÍNEZ ESTEFANY JACQUELINE**, con número de cuenta **306045499**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **27 de febrero de 2018** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. ESTHER MATIANA GARCÍA AMADOR
VOCAL Dra. CHRISTINA DESIREÉ SIEBE GRABACH*
SECRETARIO Dr. ARCADIO MONROY ATA
SUPLENTE Biól. ELVIA GARCÍA SANTOS
SUPLENTE M. en C. DORA ALICIA LONGARES MÉNDEZ

Esther M. García Amador
Christina Siebe Grabach
Arcadio Monroy Ata
Elvia García Santos
Dora Alicia Longares Méndez

El título de la tesis que presenta es: **Efecto del riego con agua residual sobre la eficiencia de la simbiosis *Sinorhizobium sp.*- alfalfa (*Medicago sativa*).**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 23 de enero de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

*Aquí estamos los soñadores, los ingenuos. Los que aún.
creemos en la fuerza de las palabras .*

Dedicatoria

Con todo mi amor a mis padres este logro no es solo mío, también es de ustedes, gracias por todo su amor, confianza y por su apoyo en todo momento, Le agradezco Dios por darme los padres que tengo y ser mi gran ejemplo. Gracias mamá por que haz sido mi motor a lo largo de mi vida, por tus consejos porque sin ti esto no habría sido posible, por apoyarme y darme fuerzas en momentos difíciles, por todo tu amor. Te amo mamá. Gracias papá por todo tu amor, por creer en mi, por tu apoyo por sentirte tan orgulloso de mi, porque desde niña me hiciste creer que yo podía, por todas tus enseñanzas. Te amo papá.

A mis Hermanos, por ser parte de mi vida, gracias por estar ahí, porque se que puedo contar con ustedes. Porque este logro no es mío, este logro es nuestro. Los amo!

A Itzel Banda, Karla Baltazar, Michel Cortes, Luis Hernández, Tenoch González, Liliana Aguilar, por su amistad por estar en mis mejores momentos pero también en los momentos difíciles, esto también es para ustedes. A todos eso amistades que a lo largo de mi vida se han sumado o restado gracias a todos ustedes por ser parte de esta historia.

A mi familia paterna y materna, por su cariño y porque estar en cada etapa de mi vida.

A mis abuelos (Q.P.D.)

Esta Tesis también esta dedicada a todos los maestros que hicieron posible este trabajo y a todos esos maestros que con su conocimiento logran cambiar la vida sus alumnos.

A todas esas personas que tienen un sueño y que día a día trabajan para alcanzarlo, aunque sea despacito, pensando que un día lo van a lograr.

Agradecimientos

A la Dra. Christina Siebe, por haberme aceptado en su grupo de trabajo, por su apoyo, comprensión, paciencia, enseñanzas y motivación durante la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Georgina Hernández y al Dr. Alfonso Leija por sus aportaciones y colaboración desde el inicio y hasta el final en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Lucy Mora y a la M. en C. Kumiko Shimada por su apoyo en el laboratorio y colaboración de este trabajo.

A la M. en C. Iris Suarez, por su asistencia proporcionada en el invernadero.

A Mario y Katia, por su ayuda en la recolección de muestras y resolver mis dudas en el laboratorio y a todos los integrantes del laboratorio de edafología ambiental del instituto de geología.

A los dueños de las parcelas por permitirme hacer la toma de mis muestras.

A mis sinodales Dr. Arcadio Monroy Dra. Esther Matiana García Biol. Elvia García y M. en C. Dora Alicia Longares, por sus aportaciones durante la elaboración de la tesis.

A todos a aquellas personas que de manera directa o indirectamente hicieron posible este trabajo.

A la UNAM por permitirme ser parte de esta casa de estudios.

Contenido

Resumen	3
Introducción.....	5
2. Objetivos	9
2.1 General.....	9
2.2 Específicos.....	9
3. Hipótesis	10
4. Marco teórico	11
4.1 Ciclo del nitrógeno.....	11
4.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno	13
4.3 Simbiosis.....	15
4.3.1 Factores que afectan a la simbiosis	15
4.3.2 Proceso de nodulación	15
4.4 Fijación de nitrógeno.....	17
4.5 Métodos para evaluar la fijación de nitrógeno atmosférico	19
4.6 Alfalfa.....	22
4.7 Agua residual en el Valle del Mezquital	22
5. Método	24
5.1 Descripción de la zona de estudio	24
5.2 Muestreo y caracterización del suelo	25
5.3 Muestreo de agua	27
5.3.1 Características del agua residual.....	28
5.4 Germinación de semillas de alfalfa.....	28
5.5 Diseño experimental	29
5.5.1 Siembra y riego	30
5.5.3 Supervivencia	32
5.5.4 Cosecha	32
5.5.5 Análisis de la actividad de nitrogenasa por el método de reducción del acetileno	32
5.5.6 Análisis de nitratos y amonio extractable en los suelos	34

5.5.7 Carbono y nitrógeno totales en tejidos vegetales aéreos (tallos y hojas).....	36
5.5.8 Análisis estadísticos.....	37
6. Resultados.....	38
6.1 Supervivencia.....	38
6.2 Altura.....	39
6.3 Biomasa.....	42
6.4 Peso de nódulos.....	44
6.6 Relación Carbono-Nitrógeno en biomasa aérea.....	45
6.4 Actividad de la nitrogenasa.....	47
6.5 Nitrógeno disponible en el suelo.....	48
7. Discusión.....	50
8. Conclusiones.....	56
9. Referencias.....	57
Anexos.....	62

Resumen

El Valle del Mezquital, es la zona agrícola más grande del mundo regada con agua residual. Esta práctica le proporciona al suelo cantidades considerables de nutrientes, que son aprovechadas por las plantas. Si bien el nitrógeno es el elemento más abundante en la atmósfera, suele ser el principal factor limitante del crecimiento vegetal, y de la productividad primaria de cualquier ecosistema. Su presencia en el suelo se debe en primera instancia a la fijación biológica, que es llevada a cabo mayoritariamente por pocos tipos de procariontes que establecen una simbiosis con algunas especies vegetales. Esta asociación le permite a la planta adquirir nitrógeno beneficiando a los microorganismos con carbohidratos a través de la fotosíntesis. La fijación biológica de nitrógeno es el principal aporte de este elemento a ecosistemas sin fertilización química pero se puede ver disminuida por la presencia de contaminantes como metales pesados, o por el exceso de nutrientes, ambos presentes en las aguas residuales. Debido a lo anterior el objetivo de esta tesis fue medir la eficiencia de las bacterias del género *Sinorhizobium* para fijar nitrógeno a través de la enzima nitrogenasa, en alfalfa regada con agua residual cruda, y compararla con la de alfalfa regada con agua de pozo. También se evaluaron los factores que afectan la fijación de nitrógeno en la simbiosis.

Este trabajo se realizó en condiciones de invernadero, utilizando como tratamientos dos clases de agua (agua residual proveniente de canales de riego y agua potable) y dos tipos de suelo. Los suelos se obtuvieron de dos parcelas que llevan más de 80 años bajo riego con agua residual, y de dos parcelas regadas con agua de pozo; requisito para la selección de parcelas fue que se hayan cultivado con alfalfa previamente. Las variables a medir fueron supervivencia, altura, biomasa área y biomasa de raíz y contenido de C y de N en plantas, además de la actividad enzimática de la nitrogenasa, el peso y tamaño de los nódulos y las concentraciones de amonio y nitrato extractables del suelo.

Los resultados obtenidos reflejan que la cantidad de biomasa depende de las características de los suelos. Se observó un incremento en el crecimiento de las

plantas de alfalfa donde los suelos han sido irrigados por más de 80 años, ya que esto mejoró su contenido de C y N y su porosidad. La fijación de nitrógeno no se vió inhibida por la concentración de nitrógeno disponible en el suelo, ni por los contaminantes que pueden estar presentes, ya que fue mayor en suelos regados con agua residual. La simbiosis se vió afectada por el cambio de la calidad del agua, tanto en suelos regados con agua residual, como en suelos regados previamente con agua de pozo, lo que sugiere que las bacterias fijadoras de nitrógeno sean altamente funcionales en adaptadas a su respectivo medio.

Introducción

El 70% de los recursos hídricos del mundo son utilizados en el riego agrícola (Silva *et al.*, 2006). Las aguas residuales son una importante fuente adicional para satisfacer la alta demanda de agua, a causa de la limitada disponibilidad de agua potable para cubrir la demanda urbana. Los bajos costos, el aporte de nutrientes y la disminución de la descarga en corrientes de agua superficial son algunos de los beneficios del reúso agrícola del agua residual (Silva *et al.*, 2008). Una zona beneficiada por el reúso de agua residual ha sido el Valle del Mezquital donde el aporte de agua y el alto contenido de nutrientes ha ayudado a mejorar los rendimientos y la estructura del suelo (CNA, 1995). Aquí, el agua destinada para los cultivos proviene en un 57% de las descargas domésticas de los habitantes de la Ciudad de México, mientras el 43% restante corresponde a descargas industriales y del sector de servicios (Pérez *et al.*, s.f.). Sin embargo, las aguas residuales no tratadas contienen organismos patógenos y otros contaminantes que pueden provocar daños en el ambiente natural contaminando suelos, cultivos, aguas subterráneas, ríos y lagos, y degradando irreversiblemente los ecosistemas. Estos perjuicios pueden a su vez repercutir en la salud y la calidad de vida de las poblaciones que habitan en las zonas degradadas (Plevich *et al.*, 2012).

En México se riegan 186,000 ha con agua residual (Vázquez *et al.*, 2001). En el Valle del Mezquital, Hidalgo, se usa agua residual para riego agrícola de aproximadamente 90,000 has desde hace más de 100 años. Hoy en día esta zona representa la extensión más grande del mundo irrigada con agua residual urbana del mundo (Vázquez *et al.*, 2001). El agua que llega aquí proviene de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM), y es la fuente principal de agua para el desarrollo agrícola de esta región semi-árida, debido a la escasez de agua de primer uso. En esta región, la alfalfa es el cultivo forrajero más importante (Fundación Hidalgo Produce A.C., 2009). En el 2010, el estado de Hidalgo fue el tercer productor de alfalfa en el ámbito nacional con una superficie sembrada de 48,243.5 ha. El rendimiento promedio en esta región es de 103.2 ton ha⁻¹ de masa fresca. Este rendimiento es alto comparado con otros estados que tienen un rendimiento de 77.06 ton ha⁻¹ (SIAP, consulta del 13 de marzo de 2015). Esta alta productividad se debe a que el riego con aguas

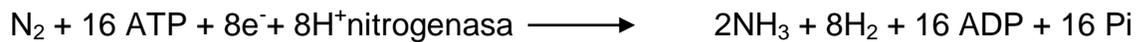
residuales no sólo proporciona el recurso hídrico sino también cantidades considerables de nutrientes (Cifuentes *et al.*, 1994; Siebe, 1998), mejorando además la calidad del suelo mediante el aumento de materia orgánica y aportando macro y micronutrientes (Siebe, 1994).

Entre los nutrientes, el más importante es el nitrógeno, ya que es indispensable para la formación de aminoácidos, nucleótidos, clorofila y otros compuestos nitrogenados (Curtis, 2006; Mayz, 2004), que son indispensables para la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas (Urzua, 2005). Su alto contenido en el agua (44.0 mg/L; Hernández *et al.*, 2016) permite a los agricultores ahorrar fertilizante. Un problema del aporte de N por el agua residual es que las demandas de N no siempre coinciden con los requerimientos del cultivo, de tal forma que el exceso de N puede llegar a ser perjudicial para los cultivos o para el ambiente (Ramos, 1997).

Si bien el nitrógeno es el elemento más abundante en la atmósfera, suele ser el principal factor limitante del crecimiento vegetal (Curtis, 2006; Ondarza, 2006), ya que la molécula inerte de N₂ (nitrógeno atmosférico) no es utilizable para la mayoría de los sistemas biológicos (Dickson, 2000). Sólo pocos microorganismos pueden asimilar el N₂, pero ningún animal o planta superior tiene la enzima necesaria para catalizar la reacción.

Por ello, el proceso de fijación biológica de nitrógeno adquiere importancia al ser responsable de la transformación de N₂ atmosférico a formas utilizables por las plantas (Valles *et al.*, 2002). Esta fijación es llevada a cabo por pocos tipos de procariotas que incluyen dos variantes: los fijadores simbióticos que establecen asociación con algunas especies vegetales y los no simbióticos (asimbióticas) o de vida libre que proporcionan al medio compuestos nitrogenados como amonio, aprovechados por los vegetales (Fiasconaro *et al.*, 2012; Hernández, 1998; Zuberer, 1998). La simbiosis más importante en cuanto a la cantidad total de nitrógeno fijado, es la que se establece entre las plantas leguminosas (ejemplos: alfalfa, frijol, soja) y las bacterias de la familia *Rhizobiaceae*. Esta asociación le permite a la planta adquirir nitrógeno de la atmósfera mientras que los organismos mencionados se favorecen de los carbohidratos que la planta genera a través de la fotosíntesis. Estos organismos

invaden las raíces de las leguminosas e inducen la formación de nuevas estructuras, llamadas nódulos. En éstos, las bacterias se multiplican formando bacteroides que fijan el nitrógeno molecular (N₂) convirtiéndolo en dos moléculas de amonio mediante el complejo enzimático de la nitrogenasa (Jamet *et al.*, 2003 cita a Lerouge *et al.*, 1990; Stougaard, 2000). El amonio es aprovechado por las plantas y éstas a cambio le aportan carbohidratos y un micro hábitat a la bacteria (Valencia, 2010). La transformación del N₂ a NH₃ corresponde a un proceso de reducción química y para crear este ambiente reductor, la planta genera una proteína denominada leghemoglobina, que protege a la nitrogenasa del oxígeno, indispensable para la respiración celular, pero que debe estar ausente en este paso bioquímico. Cabe destacar que para llevar a cabo esta asociación el consumo energético es muy elevado. La siguiente ecuación expresa la reacción por la cual el nitrógeno atmosférico es fijado por las bacterias:



A pesar del gasto energético (16 ATP), la planta leguminosa logra un balance positivo por la enorme cantidad de nitrógeno fertilizante equivalente que produce (Urzua, 2005). Sin embargo, la fijación biológica de nitrógeno se ve disminuida significativamente si el contenido de N mineral en el suelo es alto, producto de las transformaciones naturales a partir del N orgánico proveniente de residuos vegetales y animales, de la materia orgánica del suelo o de la fertilización nitrogenada excesiva (Urzúa, 2005).

No se conocen reportes sobre el efecto que pudiera tener sobre la simbiosis el uso indiscriminado de agua residual en la agricultura. Si bien todas las formas de nitrógeno mineral influyen negativamente en la fijación de N₂, la inhibición puede ser particularmente afectada por la presencia de nitrógeno en forma de NO₃⁻, NH₄⁺ o urea (Gan *et al.*, 2004). Otros factores que pueden inhibir la nodulación son la temperatura, el pH y la salinidad. De igual forma se ha demostrado que la presencia de metales pesados en concentraciones relativamente bajas influye adversamente en los microorganismos, afectando su crecimiento, su abundancia y morfología (Stan *et al*

., 2011 cita a Castro *et al.*, 1997; Chaudhary *et al.*, 2004; Lakzian *et al.*, 2002; Smith., 1997).

Dado que las aguas residuales contienen no solo nitrógeno, sino también sales solubles y diversos contaminantes como metales pesados, es de esperarse que el proceso de fijación biológica de nitrógeno en alfalfa se vea afectado por el mismo. El presente estudio se realizó para conocer mejor cómo y en qué magnitud se afecta este proceso. Para ello se usaron suelos regados con agua residual y agua de pozo provenientes del Valle del Mezquital y ambos suelos fueron regados tanto con agua residual que se usa para riego de cultivos de alfalfa en dicha región, como con agua limpia.

2. Objetivos

2.1 General

Comparar la eficiencia de la simbiosis entre alfalfa (*Medicago sativa*) y *Sinorhizobium* sp., en función de la calidad del agua de riego (agua residual y agua de la llave o de abastecimiento), en dos suelos distintos. Uno de estos suelos se ha regado por más de 80 años con agua residual mientras que el otro se ha regado por 20 años con agua de pozo.

2.2 Específicos

- Evaluar el crecimiento (biomasa aérea y radical) de las plantas en los diferentes tratamientos.
- Medir indicadores de la fijación de N: la actividad de la nitrogenasa y el número de nódulos en los diferentes tratamientos.
- Determinar los contenidos de nitrato y amonio extractables en los suelos y relacionarlos con la actividad de la nitrogenasa.

3. Hipótesis

El aporte de agua residual al suelo durante más de 80 años añade exceso de nitrógeno a los suelos. Lo anterior afecta negativamente la simbiosis *Sinorhizobium* sp. -alfalfa, de tal forma que se espera:

- Al adicionar agua residual a suelos irrigados habrá un menor desarrollo nodular y por lo tanto una menor eficiencia de la enzima nitrogenasa, comparado con suelos regados con agua de pozo.
- A mayor concentración de N disponible en el suelo será menor la fijación de nitrógeno y por lo tanto también habrá una menor nodulación.
- En suelos que han sido regados con agua de pozo por mucho tiempo, pero que en el experimento se regarán con agua residual, se verá disminuida la fijación de nitrógeno a causa del aporte suficiente de nitrógeno para el desarrollo de la planta.
- En suelos que han sido regados con agua residual durante mucho tiempo, pero que durante el experimento se regarán con agua de la llave, se observará un aumento en la fijación de nitrógeno.

4. Marco teórico

4.1 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno constituye el 78% de la atmósfera del planeta; es un gas inerte y constituye un depósito inagotable de este elemento (Manahan, 2007). Sin embargo este elemento es un factor limitante para la producción primaria de muchos ecosistemas, ya que los depósitos geológicos que contienen nitrógeno combinado fácilmente disponible son escasos (Atlas y Bartha, 2002). Biológicamente el nitrógeno es el elemento indispensable para la formación de ácidos nucleicos y la formación de proteínas indispensables para la vida.

En la naturaleza existen diferentes reservorios de este elemento: por ejemplo, los iones de nitrógeno, amonio, nitrito y nitrato se encuentran como sales solubles en agua forman pequeños reservorios de nitrógeno disponible. El humus constituye una reserva de nitrógeno aunque sólo llega a estar disponible tras una mineralización, la cual depende de las condiciones ambientales, como la temperatura, la humedad, la acidez, entre otros (Manahan, 2007). La actividad volcánica, la radiación ionizante y las descargas eléctricas aportan formas complementarias de nitrógeno a la atmósfera; cuando estos elementos se precipitan con la lluvia, el nitrógeno queda disponible, pero se calcula que el nitrógeno fijado abióticamente sólo representa de un 10 a 20 por ciento de la cantidad fijada biológicamente (Atlas y Bartha, 2002).

Sin embargo, existe otra forma de fijación del nitrógeno: ésta es llevada a cabo por bacterias que usan la enzima nitrogenasa y que tienen la capacidad de aprovechar el nitrógeno atmosférico (figura 1). Estas bacterias pueden ser de vida libre en el suelo o vivir en simbiosis formando nódulos con las raíces de ciertas plantas, principalmente leguminosas. Otro grupo son las cianobacterias acuáticas (algas verdeazuladas) y las bacterias quimiosintéticas, como las del género Nitrosomas y Nitrosococcus, que juegan un papel muy importante en el ciclo de este elemento, al transformar el amonio en nitrito (Manahan, 2007).

Otro proceso dentro del ciclo es la amonificación que es la transformación de los desechos orgánicos en amoníaco por los descomponedores. Muchas bacterias

descomponedoras y hongos heterótrofos del suelo y agua utilizan los compuestos nitrogenados inorgánicos, los transforman y liberan amoniaco (Manahan, 2007).

La nitrificación es otro proceso dentro del ciclo del nitrógeno, donde el amoniaco y los iones amonio se oxidan a iones nitrito y éstos son transformados a iones nitrato. Este proceso tiene gran importancia ya que provoca un cambio en la carga de la molécula, que de positiva pasa a ser negativa, ya que a pesar de poder ser aprovechados por las plantas, al tener una carga negativa puede ser arrastrada con el agua de percolación a través de la columna del suelo, representando una pérdida para el suelo.

Mientras unos microorganismos se encargan de fijar nitrógeno, o transformarlo para ser aprovechado, existen otras bacterias que revierten estas acciones regresando el nitrógeno a la atmósfera en forma gaseosa. Este proceso llamado desnitrificación ocasiona una pérdida de nitrógeno para el ecosistema; ocurre donde existe un exceso de materia orgánica soluble y las condiciones son anaerobias, además de que hay un alto pH. Este proceso se ve favorecido además por el abuso de fertilizantes químicos (Manahan, 2007). La desnitrificación (figura 1) se debe a que en condiciones de mucha humedad en el suelo, la falta de oxígeno obliga a ciertos microorganismos a emplear nitrato en vez de oxígeno en su respiración.

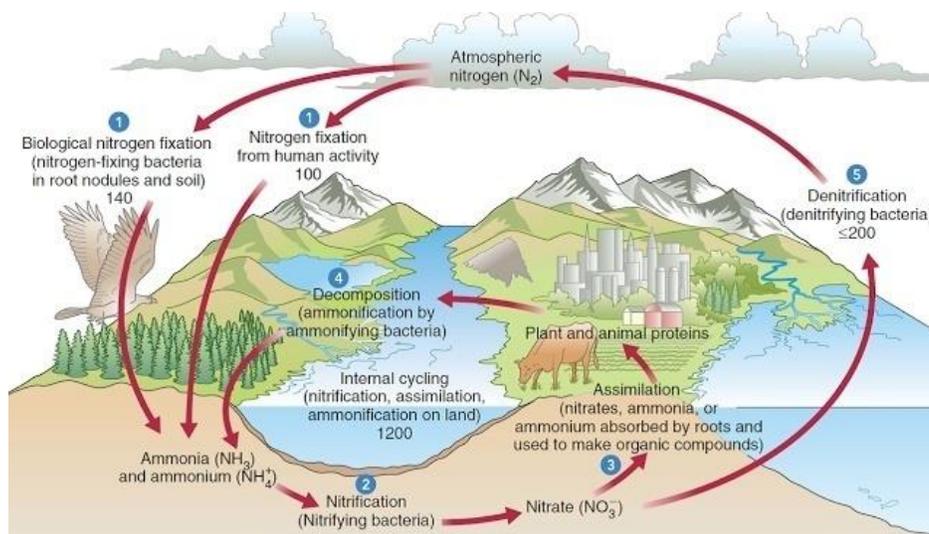


Figura 1. Ciclo del nitrógeno. (1) Fijación del nitrógeno por bacterias o de manera industrial, (2) nitrificación, (3) asimilación y absorción por parte de plantas y luego animales, (4) Descomposición y retorno a la forma de amoniaco/amonio, (5) desnitrificación (tomado de <http://cienciasdejoseleg.blogspot.mx/2013/07/el-ciclo-del-nitrogeno.html>)

4.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno

La familia *Rhizobiaceae* se encuentra dentro del filo de las *Protobacterias*, perteneciente al orden Rhizobiales y a la subdivisión α -Proteobacterias que se caracterizan por ser bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Hernández *et al.*, 2012). Son gram-negativas, no forman esporas, son bacilos aerobios de 0.5 a 0.9 μm de ancho y de 1.2 a 3.0 μm de largo (Alexander, 1980; Hernández *et al.*, 2012). Las bacterias fijadoras de nitrógeno incluyen seis géneros: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Allorhizobium* (Laguerre *et al.*, 2001 cita a de Lajudie *et al.*, 1998). Estas bacterias tienen un grado alto de especificidad, es decir, cada especie de bacteria tiene un huésped específico (Tabla1).

Tabla 1. Clasificación para rizobios según el hospedero

Planta hospedera	Nódulos producidos por
Alfalfa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
Trébol	<i>Rhizobium leguminosarum biovar trifolii</i>
Chícharo	<i>Rhizobium leguminosarum biovar viciae</i>
Frijol	<i>Rhizobium leguminosarum biovar phaeoli</i>
Soya	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Bradyrhizobium elkani</i> <i>Sinorhizobium fredii</i>

Las ventajas de esta simbiosis son múltiples:

Las plantas pueden aumentar su contenido de proteína al abastecerse de nitrógeno atmosférico, puede aportar nitrógeno a plantas que se encuentren a su alrededor diferentes a las leguminosas, pueden dejar nitrógeno disponible en el suelo para la siguiente rotación, la eficiencia de la utilización del nitrógeno fijado por parte de la planta es cercana al 100% (Coyne, 2000).

Las cantidades de nitrógeno fijadas por las leguminosas, suelen ser diferentes. En general, las leguminosas de grano fijan menos nitrógeno que las usadas para forraje, puesto que son cultivadas por periodos más breves y tienen menos raíces en las que pueden formarse los nódulos (Coyne, 2000).

La alfalfa y el trébol están entre los fijadores de N₂ más vigorosos (Alexander, 1980) (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidades de nitrógeno fijadas por diferentes leguminosas (Tomada de Alexander, 1980).

	kg ha ⁻¹ año ⁻¹
Alfalfa	125-335
Trébol rojo	85-190
Chícharo	80-150
Soya	65-115

Aproximadamente 250 millones de toneladas métricas de nitrógeno son añadidas al suelo cada año, de las cuales 200 millones son de origen biológico proporcionados por bacterias tanto simbióticas como de vida libre. Los otros 50 millones de toneladas corresponden principalmente a fertilizantes químicos producidos por procesos comerciales de fijación de nitrógeno en los cuales la energía requerida es obtenida de combustibles fósiles (Curtis, 2006).

4.2.1 Género *Sinorhizobium*.

Son bacilos que miden 0.5-1.0x1.2-3.0 µm. El nombre genérico *Sinorhizobium* fue propuesto por primera vez para designar a las bacterias de rápido crecimiento aisladas en China que nodulan a la soya. Posteriormente se separó este género de *Rhizobium* principalmente debido a las diferencias en las secuencias de genes 16S rRNA. Las ocho especies dentro de este género crecen rápidamente y producen ácido en medio

YMA. La especie tipo, *S. meliloti* fue transferida del género *Rhizobium* (Tao Wang, Martínez Romero, & López Lara, s.f.).

4.3 Simbiosis

La simbiosis ha sido definida como una vida en común, para denominar la asociación física tan íntima entre especies.

4.3.1 Factores que afectan a la simbiosis

Diversos factores pueden afectar la fijación de nitrógeno por simbiosis. Para que esto suceda las plantas deben de estar abastecidas de cantidades adecuadas de fósforo, potasio, sulfuro y micronutrientes. Entre éstos el más importante es el molibdeno, seguido del cobre ya que estos micronutrientes son fundamentales en la síntesis de leghemoglobina. La presencia de nitratos en el suelo puede inhibir o retardar la fijación de N por simbiosis (Bogdan, 1997). El pH en el suelo es otro factor importante; sus límites extremos se encuentran en pH de 5 y 10. Otro factor que puede influir es la temperatura; a temperaturas debajo de 0°C o por encima de los 50°C los microorganismos se ven seriamente afectados (Navarro Blaya & Navarro Garcia, 2003).

4.3.2 Proceso de nodulación

Las bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* poseen la capacidad de invadir las raíces de plantas leguminosas, causando la formación de un nuevo órgano, el nódulo, en el cual establecen una simbiosis que fija nitrógeno atmosférico. El establecimiento de estas bacterias en una leguminosa es bastante específica, el reconocimiento es el resultado de diversos acontecimientos que incluyen: a) multiplicación de las bacterias en la rizósfera del hospedero; b) reconocimiento de la combinación adecuada de organismos, tanto por parte de la planta como de la bacteria, y adherencia de la bacteria a los pelos radicales; c) invasión del pelo radical y formación de un canal (o hilo) de infección; d) desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal a través del canal de infección; e) diferenciación de las bacterias en bacteroides, dentro de las células de la planta, y desarrollo del estado de fijación de nitrógeno (Tao *et al.*,s.f.).

El tipo y estructura nodular es dependiente de la planta hospedera, así se tienen: a) nódulos determinados, en los cuales la actividad meristemática cesa temprano en su formación y su aspecto final resulta del alargamiento de las células. Este tipo de desarrollo origina nódulos esféricos o globosos, que pueden organizarse alrededor de la raíz para formar los denominados nódulos en collar (Mayz, 1997). b) nódulos indeterminados, los cuales presentan un meristema persistente, que puede producir nódulos ramificados. Este tipo de desarrollo da lugar a nódulos elongados o cilíndricos y ramificados. La utilización del nitrógeno atmosférico en la simbiosis, requiere de la integración de las vías metabólicas de la fijación (bacteroides) y de la asimilación (planta hospedera) del nitrógeno. La bacteria emplea compuestos carbonados oxidables suplidos por la planta para su metabolismo y desarrollo y para la síntesis de ATP y del poder reductor usados en la reacción de fijación catalizada por la nitrogenasa, la cual genera el nitrógeno asimilable (NH_4^+), que es metabolizado en las células nodulares a amidas o ureidos, que luego son exportados vía xilema al resto de la planta, donde son usados (Mayz, 1997). El primer producto de la reacción de fijación es NH_3 (amoníaco), pero éste es rápidamente protonado, formándose NH_4^+ , lo cual es favorecido por el pK (9,25) de la reacción, de tal manera que amonio es la especie predominante a los pHs fisiológicos y la que toma parte en las reacciones de asimilación (Sprent y Sprent, 1990).

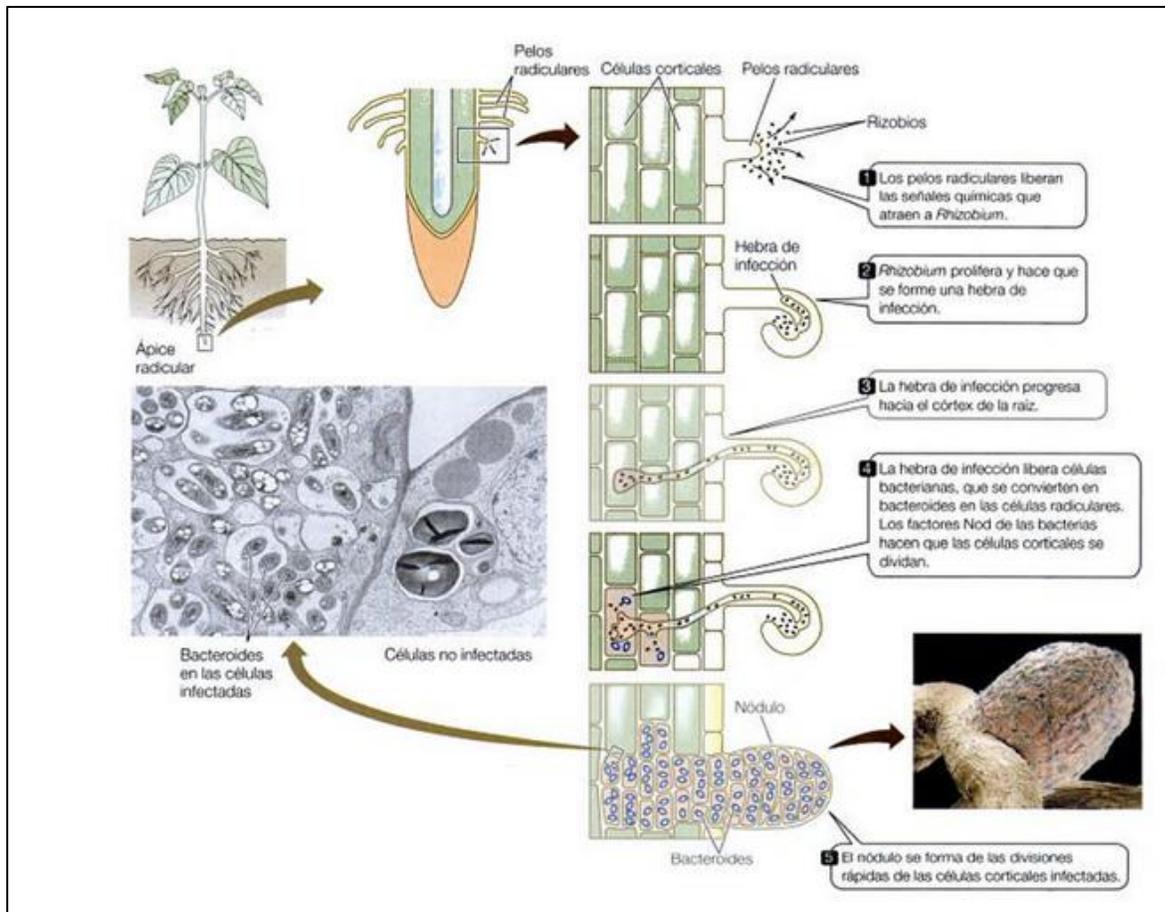


Figura 2. Formación de nódulo. (Tomado Savada, Heller, Orians, Purves, & Hillis, Vida: La ciencia de la Biología, 2008 pag.790)

4.4 Fijación de nitrógeno

Todos los microorganismos que convierten el N_2 en amoníaco lo hacen gracias a la actividad del complejo enzimático de la nitrogenasa. En este proceso la enzima requiere de la colaboración de dos proteínas llamadas ferredoxina y flavodoxina; éstas actúan como donadores de electrones y reductores naturales de la nitrogenasa. Este complejo enzimático "Nasa", que cataliza la reducción del N_2 en amoníaco, está constituido por dos metaloproteínas, y contiene tres tipos de grupos prostéticos. La proteína I es llamada también dinitrogenasa o "Fierromolibdeno-proteína". El otro componente, la proteína II, es igualmente nombrada dinitrogenasa reductasa o "Fierro-

proteína”. Para su funcionamiento, el complejo requiere un donador de electrones de bajo potencial, de la hidrólisis de ATP y de un ambiente estrictamente anaerobio. La proteína I es un tetrámero de alrededor de 220,000 Da, formado por dos tipos de subunidades $\alpha_2 \beta_2$, de masa molecular semejante, y que son los productos de los genes nifDK. Esta proteína contiene el cofactor con hierro y molibdeno (FeMo-Co). La composición metálica global de la proteína I es de 2Mo, 30 Fe y 30S. Por lo tanto, la proteína contiene además dos grupos prostéticos diferentes: cuatro grupos 4Fe-4S, llamados grupos P ligados de manera covalente a residuos de cisteína de las subunidades α y β y los dos grupos FeMoCo unidos a la subunidad α , donde se propone que son transportados los electrones y es reducido el N_2 . La proteína II es un dímero de alrededor de 68,000 Da, formado por dos subunidades idénticas unidas por un grupo prostético único de 4Fe-4S. El gene responsable de la síntesis de esta proteína es nifH. Esta proteína tiene la función de transportar los electrones del donador fisiológico de electrones (ferrodoxina o flavodoxina), hacia la proteína I para llevar a cabo la reducción de la molécula de N_2 . La nitrogenasa es sumamente frágil a la inactivación por el O_2 ; de hecho, para su purificación se requieren condiciones anaeróbicas estrictas debido a que el cofactor FeMoCo es irreversiblemente desnaturalizado y oxidado. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso que requiere un gasto considerable de energía, de ahí que su biosíntesis esté sometida a una estricta regulación. Ha sido determinado que, bajo condiciones de laboratorio, se requieren 16 moléculas de Mg-ATP y se produce además una molécula de H_2 . La ecuación global es:



En condiciones naturales se ha estimado que la demanda energética es mucho mayor de 20-30 moléculas de ATP. Por esta razón, los microorganismos han seleccionado mecanismos para inactivar a la enzima cuando está disponible el nitrógeno combinado; esto le permite mantener las necesidades del microorganismo y evitar un gasto energético inútil. La hidrólisis de ATP está acoplada a la transferencia de electrones (e^-) hacia la proteína I; dos moléculas de ATP son hidrolizadas por cada par de e^- transferidos. Se piensa que los grupos P tienen una función en la

transferencia de e⁻. De manera similar, el complejo de la Nasa cataliza igualmente la reducción de análogos estéricos del N, en particular el acetileno, que es reducido a etileno. Esta propiedad es la base de un método relativamente sencillo para analizar la actividad de la Nasa por cromatografía en fase gaseosa. Este método ha permitido también el descubrimiento de otros diazótrofos utilizando el sencillo medio de cultivo sin nitrógeno llamado nfb (nitrogen fixation biological), descrito en Brasil por Joanna Döbereiner. En este medio se adiciona una fuente de carbono y algunas sales, la fuente de N es el N molecular, por lo tanto los únicos microorganismos que se desarrollarán serán aquellos que sean capaces de fijación biológica de nitrógeno. Se inocula al medio una porción de raíz, del nódulo o bien la bacteria ya aislada por picadura y el desarrollo del microorganismo se realizará en la zona en la cual exista una pO₂ menor a 0.02% (microaerofilia) debido a que, como ya se mencionó, la enzima es sumamente sensible a este gas. Este método ha permitido aislar e identificar diazótrofos de diferentes hábitats.

4.5 Métodos para evaluar la fijación de nitrógeno atmosférico

4.5.1 Método de la diferencia total de N

En este método se establecen dos especies de plantas, una leguminosa y una planta de referencia que crecen en el mismo suelo. La substracción del N en la planta de referencia de aquel en la planta fijadora dará un estimado de N₂ fijado. Peoples y Herridge (1990 citado en Valles *et al.*, 2002) hacen referencia a dos requerimientos para este método. 1) El N de la planta de referencia solo debe de provenir del suelo y, 2) que la planta de referencia y la leguminosa absorban la misma cantidad de nitrógeno del suelo. Ellos sugieren que las plantas deben de tener la misma capacidad de expandir sus raíces y así tener una capacidad similar de extraer N. Una observación que se le ha hecho a este método es que al compararlo con otros métodos al cuantificar el nitrógeno fijado, la diferencia de N muestra valores más bajos. Debido a que este método depende del rendimiento de las plantas es considerado poco confiable (Valles *et al.*, 2002).

4.5.2 Método de ureidos

Este método es aplicable a las leguminosas de grano, pero no a muchas leguminosas forrajeras. Tiene como principio las diferencias en las formas principales de N transportadas en el xilema de leguminosas noduladas y no noduladas; es posible utilizar la abundancia de los ureidos. Muchas leguminosas tropicales transportan los productos de la fijación de N_2 desde los nódulos a otras partes de las plantas en forma de ureidos, alantoina y ácido alantico. La abundancia de los ureidos en la savia del xilema fungen como medida indirecta de la proporción de N de la planta derivada de la fijación de N_2 . La ventaja de este método es que se puede analizar por métodos colorimétricos, no requiere equipos costosos y se pueden analizar varias muestras en un día. Sin embargo, es un método donde se tiene que tomar en cuenta la edad de las plantas ya que requiere calibración para diferentes edades. También se presentan variaciones diurnas para la concentración del soluto y volumen y finalmente el método solo es válido para algunas leguminosas que exportan ureidos (Valles *et al.*, 2002).

4.5.3 Método de la abundancia natural del ^{15}N

Este método es una variación de la técnica de dilución de isótopos, basada en pequeñas diferencias (δ)¹⁵ en la abundancia natural de ^{15}N entre el N_2 atmosférico y el N del suelo. Shearer y Kohl (1986) mencionan que los suelos están más enriquecidos en ^{15}N en comparación con el N_2 de la atmósfera y este enriquecimiento se debe a la discriminación isotópica en los procesos de volatilización de amonio, nitrificación, desnitrificación y otras transformaciones del N en el suelo. Ya que el ^{15}N es más pesado que el ^{14}N , los compuestos con el primero tienden a reaccionar más lentamente. El efecto neto es que a través del tiempo el suelo se vuelve ligeramente más enriquecido con ^{15}N , y estas diferencias, en plantas fijadoras y de referencia, son usadas para calcular el N_2 fijado.

La ventaja de este método es que no requiere adicionar ^{15}N , sin embargo se requiere un espectrofotómetro de masas preciso y procedimientos analíticos muy exactos. Esta técnica es insensible si el (δ)¹⁵ del suelo es cercano al (δ)¹⁵ del aire. Una diferencia

del método de abundancia natural de ^{15}N es que una pequeña variación en el δ^{15} corresponde comparativamente a una diferencia en la fijación de N_2 (Valles *et al.*, 2002).

4.5.4 Método Isótopo ^{15}N

Este método ha sido muy utilizado para medir la capacidad que tienen los microorganismos para fijar nitrógeno, para estudiar los factores que afectan la fijación de nitrógeno y medir el desplazamiento del nitrógeno fijado. La abundancia de ^{15}N en cualquier medio es medida mediante el análisis de una planta no fijadora de N_2 lo cual es totalmente dependiente del N disponible en el suelo. La fijación de N_2 es determinada por los cambios en el enriquecimiento de ^{15}N en una planta fijadora debido a la asimilación de N_2 de bajo enriquecimiento. La ventaja de este método es que no depende del rendimiento de las plantas cosechadas, sin embargo en este método existen algunas limitaciones: 1) disponibilidad de espectrómetros de masas; 2) restricción para el uso de ^{15}N en fase gaseosa en experimentos de largo plazo; 3) altos costos de equipo para medir ^{15}N así como el fertilizante enriquecido (Valles *et al.*, 2002).

4.5.5 Método por reducción del acetileno

La fijación de nitrógeno se puede cuantificar por cromatografía de gases a través de la lectura de picos de la concentración de etileno a partir del complejo enzimático de la nitrogenasa que es el encargado de la reducción de nitrógeno molecular a amonio. La nitrogenasa no es específica para el N_2 , también puede reducir compuestos como el cianuro y el acetileno. La reducción del acetileno por la nitrogenasa es un proceso en el que intervienen dos electrones y se produce etileno. Este método es un medio sencillo y rápido para ensayar la actividad de sistemas fijadores de N_2 , porque es relativamente fácil medir la reducción de acetileno a etileno por cromatografía de gases.

4.6 Alfalfa

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) representa un importante cultivo de leguminosas forrajeras en todo el mundo. Es una de las especies leguminosas más cultivadas e importantes para la ganadería, tanto por la cantidad de forraje obtenido por superficie cultivada como por su valor nutritivo (Juscafresa, 1980).

La alfalfa es una planta normalmente erecta, con flores de colores que suelen variar del amarillo al violeta, sus raíces alcanzan hasta cinco metros de profundidad.

Tiene un ciclo de vida de aproximadamente cinco años. Es considerada como planta resistente a la sequía. Sin embargo, no quiere decir que no precise de importantes cantidades de agua para su desarrollo y producción; la cantidad de agua depende de las condiciones del clima y tipo de suelo (Del Pozo, 1977).

En México la alfalfa tiene como uso principal forraje para ganado, sobre todo para vacas lecheras debido a su valor proteico. En México este forraje se produce principalmente en Hidalgo, Guanajuato y Durango; dichos estados concentran 53% de la producción nacional (Ojeda Ledesma, 2011). En 2014 a nivel nacional SIAP reportó una superficie sembrada de 387,571.81 has. En el estado de Hidalgo, después del cultivo del maíz, la alfalfa es el cultivo forrajero más cultivado con una superficie sembrada de 47,488.50 has. En el Valle del Mezquital la alfalfa recibe entre 10 y 12 irrigaciones por año, esta irrigación varía entre 15 y 25 mm dependiendo de la humedad del suelo (Hernández Martínez *et al.*, 2016).

4.7 Agua residual en el Valle del Mezquital

La escasez de agua y la cada vez mayor dependencia del riego para la producción agrícola han incrementado a nivel internacional el interés por reutilizar el agua (Cifuentes *et al.*, 1994). Mara (1978) define el agua residual como: "el líquido que proviene del sistema de abastecimiento de agua de una población, después de haber sido modificada por diversos usos en actividades domésticas, industriales y comunitarias".

En el Valle del Mezquital se descargan 40 000 y hasta 75 000 litros de agua residual por segundo, de una mezcla de orina, heces fecales, detergentes, metales pesados, grasas y agua de lluvia. Estas aguas residuales, de quedarse en la ciudad de México se convertirían en un problema de salud pública. En poco más de 100 años el árido Valle del Mezquital, en Hidalgo, se ha transformado en un campo de alta producción, pues las aguas residuales, al ser ricas en nitrógeno y fósforo, son el detonante de altos rendimientos de cosechas de maíz, frijol, col, cilantro, rábano, chile verde y alfalfa, entre otras (De Alba, 2013).

5. Método

Se montó un experimento en invernadero en el que se evaluó el crecimiento y la nodulación en plantas de alfalfa que fueron cultivados en cuatro parcelas con suelos distintos (dos con historia de 100 años de riego con agua residual, y dos con historia de al menos dos décadas de riego con agua de pozo). Las plantas fueron regadas durante el experimento con dos clases de agua: agua residual y agua de la llave de abastecimiento. A continuación se describen los diversos pasos que se siguieron para montar el experimento, darle seguimiento y también para el análisis posterior de las muestras, tanto de nódulos, raíces y parte aérea de la planta, como de las muestras de suelo antes y después del experimento.

5.1 Descripción de la zona de estudio

Los sitios seleccionados para llevar a cabo la presente investigación se encuentran en el municipio de Tlahuelilpan y de Actopan en el estado de Hidalgo al centro de la República Mexicana, específicamente en el Valle de Tula conocido coloquialmente como el Valle del Mezquital. Esta región se encuentra a 100 km al norte de la ciudad de México, se caracteriza por tener un clima semiárido con lluvias en verano, una temperatura media de 18.3 °C, una precipitación media anual de 536 mm y una evapotranspiración media anual de 1750 mm. La época de lluvias se limita a los meses de junio a septiembre (Cervantes *et al.*, 2004). Debido a las bajas precipitaciones, desde hace más de 100 años se ha aprovechado el agua residual que proviene de la ciudad de México para el riego con fines agrícolas (Cervantes *et al.*, 2004; Romero 1997). Esta zona considerada antiguamente como una zona árida se ha convertido en una zona altamente productiva principalmente de cultivos como maíz y alfalfa (CGPASVM 2008; Siebe, 1994). El agua residual que llega al Valle del Mezquital se descarga a los distritos de riego 003 Tula, 100 Alfayucan y 112 Ajacuba por medio de una importante red de canales. De esta manera, el agua residual permea a través del suelo modificando así las condiciones naturales del mismo y filtrando partículas suspendidas y disueltas en el agua (Jiménez *et al.*, 2004). El Distrito de

Riego 03, en el Estado de Hidalgo, tiene una extensión de 51,825 ha (CONAGUA, 2010), el riego se realiza por inundación (Siebe, 1998). La aplicación de agua varía de 1500 a 2200 mm ha⁻¹ año⁻¹ (Vivianco *et al.*, 2001; Siebe 1998) para alfalfa.

Los suelos se clasifican como leptosoles, feozems y vertisoles. Los leptosoles son suelos poco profundos (0 a 30 cm), lo que limita el desarrollo de las raíces, la capacidad de retener agua y el contenido de nutrientes. La vegetación natural se limita a las partes montañosas y se compone de matorrales xerófilos, principalmente mezquites (*Prosopis juliflora*), huizaches (*Acacia farnesiana*), yucas (*Yuccasp.*) así como una gran diversidad de cactáceas (González, 1968). Los valles están dedicados a la agricultura donde el maíz y la alfalfa representan de 60 a 80%, dependiendo del ciclo agrícola. En segundo término se cultiva avena, cebada, frijol, y en menor proporción trigo y hortalizas (chile, calabacita y betabel, entre otros) (Jiménez *et al.*, 2004).

En función de la calidad del agua usada para el riego en el Valle del Mezquital, se pueden distinguir tres diferentes zonas: la primera ubicada en el sur del valle, donde se utiliza básicamente agua residual; la segunda en la parte media del valle donde se utiliza una mezcla de aguas residuales, aguas pluviales y retornos de riego; la tercera zona hacia Actopan, que corresponde a agua de retornos de riego mezclada con agua de manantiales y pozos profundos (Carmona Paredes & Muñiz Arcila, 2014).

5.2 Muestreo y caracterización del suelo

Se colectaron suelos de parcelas de dos localidades diferentes que fueron Rancho Las Palmas (municipio de Tlahuelilpan) con coordenadas UTM: X= 477912 E, Y= 222541 N con una altitud de 2091msnm y Cañada Chica (municipio de Actopan) con coordenadas UTM: X 504881 E, Y=2244856.59 N con una altitud de 2019 msnm, en el estado de Hidalgo (Figura 1). Los criterios para seleccionar los sitios fueron los siguientes: dos parcelas cultivadas con alfalfa que hayan sido regadas con agua (suelo vertisol) residual con una antigüedad mayor a 80 años y dos parcelas cultivadas con alfalfa que hayan sido regadas con agua de pozo por varios años (suelo leptosol). En ambos casos las muestras de suelo se tomaron a una profundidad de 0

a 30 cm, que corresponde a la profundidad arable y en la cual se presenta el mayor desarrollo de raíces finas.

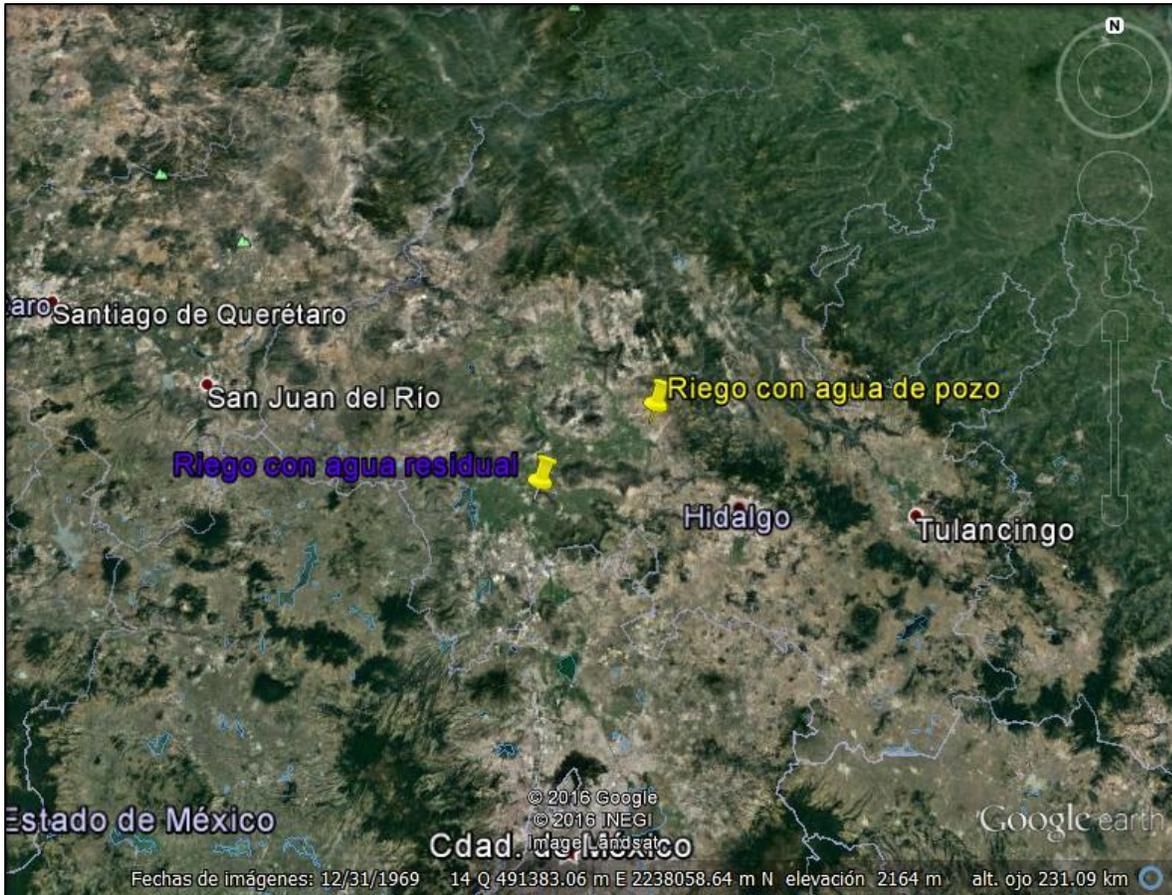


Figura 3. Localización de los puntos de muestreo en los municipios de Tlaxiuelilpan (suelos regados con agua residual en el rancho Las Palmas) y Actopan (suelos regados con agua de pozo en Cañada Chica).

Las muestras se transportaron al Laboratorio de Edafología Ambiental ubicado en el Instituto de Geología. Posteriormente los suelos a humedad de campo se pasaron por un tamiz de 5mm de apertura de malla. Las características de las muestras de suelo se muestran en la Tabla 3 y como valores de referencia para metales pesados la tabla 3.1.

Tabla 3. Características físicas y químicas de los suelos antes de recibir los tratamientos.

	pH	Conductividad eléctrica dS m ⁻¹	% C total	%C orgánico	% C inorgánico	% N total	C org/N	Densidad aparente (g cm ⁻³)
Suelo Cañada Chica 1 (SP1) Leptosol	7.6	1.13	2.96	2.09	0.87	0.19	11.24	1.09
Suelo Cañada Chica2 (SP2) Leptosol	7.5	1.46	2.49	1.06	0.88	0.13	11.95	1.06
Suelo Tlahuelilpan1 (SR1) Vertisol	7.6	0.67	2.24	2.16	0.07	0.20	10.57	0.91
Suelo Tlahuelilpan2 (SR2) Vertisol	6.8	0.56	2.72	2.62	0.10	0.24	10.79	0.90

Tabla 3.1 Contenido de metales pesados en dos localidades del Valle del Mezquital. Tomados de Siebe, (1994)

Metales pesados	Cañada chica (Leptosol)	Bojayito Chico (vertisol)
	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹
Pb	5.75 ±	29.25±
Cd	< 0,2	1.02±
Cu	6.25 ±	25.5±
ZN	32.25±	104.2±
Mn	248±	431.5±
Fe	12.4±	16.6±

5.3 Muestreo de agua

El agua residual se colectó del canal principal de riego que aporta agua al municipio de Tlahuelilpan, que es el Canal Tlamaco-Juandhó. Se recolectaron 40L en dos envases de 20L cada uno; fueron almacenados en refrigeración a una temperatura de 4° C durante 2 meses los valores se muestran en la tabla 4.

5.3.1 Características del agua residual

Tabla 4. Características del agua residual aplicada en 2014 en el Valle del Mezquital, tomado de Hernández Martínez (*et al.*, 2016).

pH	7.78(0.19)
DO, mg L⁻¹	0.2(0.2)
Eh, mV	-52.2 (32.2)
NH₄⁺-N, mg L⁻¹	26.0 (4.0)
NO₃⁻ - N, mg L⁻¹	0
Nt,mg L⁻¹	44.0 (4.2)
DOC	50 (1.3)
Cl⁻, mg L⁻¹	172.7 (17.7)

Promedio y desviación estándar (entre paréntesis) de tres muestras por riego.

DO: oxígeno disuelto

Eh: potencial óxido-reducción

Nt: nitrógeno total

DOC: Carbono orgánico disuelto

5.4 Germinación de semillas de alfalfa

Las semillas se compraron en casa COBO ubicada en la central de abastos de la ciudad de México. Se compraron semillas variedad Valenciana sin ningún pretratamiento. Éstas fueron desinfectadas colocándolas en etanol al 70% por 30

segundos y posteriormente en hipoclorito de sodio al 1.2% durante dos minutos. Después se lavaron con agua destilada y finalmente se transfirieron a cajas Petri para su germinación por hidratación. Figura 5-A y 5-B.

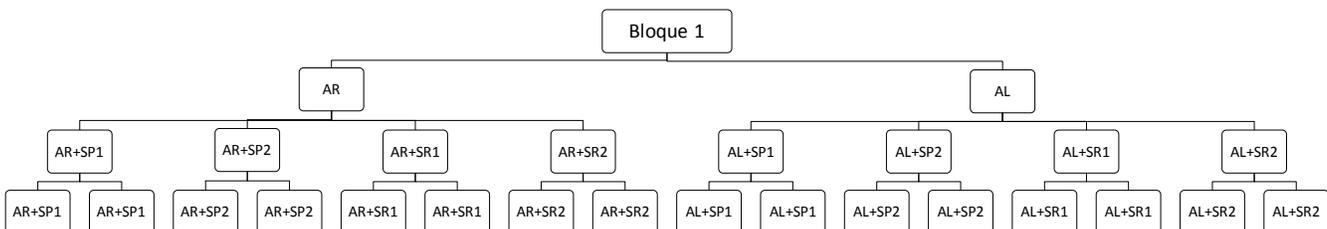
Se trasplantaron las plántulas germinadas a las macetas después de 3 días seleccionando a aquellas que presentaban cotiledones.

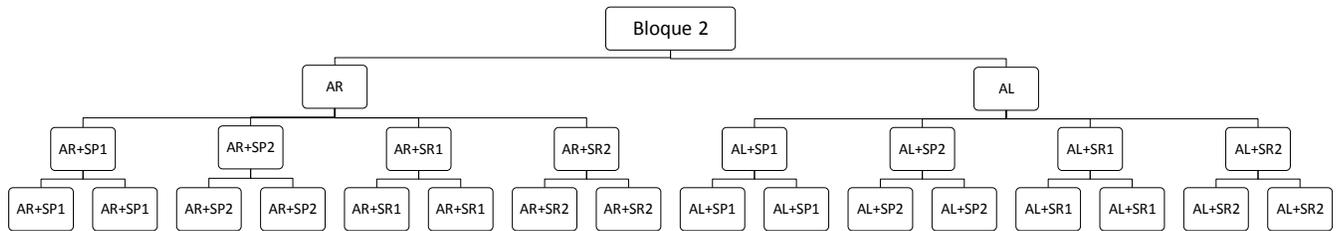
5.5 Diseño experimental

El experimento se realizó en macetas con capacidad de 1 kg, con el siguiente diseño experimental: Como se mencionó anteriormente, se colectó suelo de 4 parcelas distintas, dos regadas con agua residual (SR) y dos regadas con agua de pozo (SP). A cada tipo de suelo se le aplicaron dos tipos de agua: agua residual muestreada en el Valle del Mezquital (AR) y agua de la llave de abastecimiento de agua potable (AL). Se puede observar en la figura 4 el diseño experimental.

Cada tratamiento se realizó con cuatro réplicas, divididas en dos bloques. El primer bloque se implementó en el mes de julio y se cosechó en el mes de octubre de 2014, mientras que el segundo se implementó en el mes de agosto y se cosechó en el mes de noviembre de 2014.

Figura 4. Diseño experimental montado en macetas, bloque 1 y bloque 2





El diseño experimental consistió en un diseño bifactorial que considera dos clases de suelo a las que se les aplicó dos tipos de agua, replicado dos veces en dos bloques, como se muestra en la Figura 4.

5.5.1 Siembra y riego

Las plántulas obtenidas se trasplantaron a las macetas con una densidad de 25 plantas por maceta. Los suelos se humedecieron al 50% de humedad a capacidad de campo según el método descrito en el "manual de procedimientos analíticos" del laboratorio de física de suelos del Instituto de Geología. Para determinar la cantidad de agua a agregar a cada maceta se pesaron 20g de suelo secado al aire, se colocaron en filtros de papel Whatman del número 40, se saturó el suelo con agua destilada y se filtró dos veces; seguido de esto se dejó reposar por dos horas y posteriormente se registró su peso. También se corrieron dos blancos, es decir dos filtros sin suelo saturados con agua, que se dejaron reposar durante 10 minutos y se registró su peso.

La capacidad de campo (cc) se calculó con la siguiente fórmula:

$$cc = 1 - \left(\frac{(Sa+F)-F}{Se} \right)$$

S_a = peso del suelo saturado

F = peso del filtro saturado

S_e = peso del suelo seco

A partir del resultado se calculó el volumen de agua que se debe aplicar para que 1kg de suelo esté a 50% de su capacidad de campo. Para esto se consideró el contenido de humedad del suelo que se determinó en una alícuota de cada suelo por gravimetría. Se mantuvo esta humedad pesando las macetas periódicamente dos veces por semana y añadiendo la cantidad de agua faltante (Figura 5-C).



Figura 5. A) semillas de alfalfa desinfectadas. B) semillas de alfalfa germinadas. C) peso de las macetas para calcular la cantidad de agua a aplicar antes de cada riego D) trasplante de las semillas de alfalfa E) vista general del experimento.

5.5.2 Crecimiento de las plantas

Las plantas estuvieron durante 2 meses bajo condiciones de invernadero a una temperatura media de 21.9 °C y una humedad relativa media de 52.74%. Cada maceta fue regada con agua de la llave o con agua residual según el tratamiento dos veces por semana con el volumen de agua necesario para mantener un contenido de humedad del 50%. Durante el experimento se llevaron a cabo dos mediciones de altura de las plántulas; una a los 40 días y otra a los 60 días después del trasplante con una regla.

5.5.3 Supervivencia

La supervivencia se midió a partir de las plantas sembradas por tratamiento al inicio del experimento (25 plantas por maceta igual al 100%).

5.5.4 Cosecha

Las macetas se transportaron al Centro de Ciencias Genómicas donde se realizó la cosecha. Se cortó con tijeras la parte aérea (hojas y tallos), que se colocaron en bolsas de papel estraza y se llevaron directamente a estufa a una temperatura de 50° C durante 48 hrs. Secadas las muestras se pesaron en una balanza analítica para registrar su peso seco y después se molieron en un Molino Fritsch Pluverisette para su posterior análisis de C y N.

Además se separaron las raíces del suelo y se colocaron en frascos de 70 ml que se cerraron con un tapón de hule (Figura 6 B) para el posterior análisis de nitrogenasa. Cabe mencionar que las raíces del segundo bloque de plantas a diferencia del primero, al momento de la cosecha se lavaron con agua de la llave antes de colocarlos dentro de los frascos.

5.5.5 Análisis de la actividad de nitrogenasa por el método de reducción del acetileno

La actividad de la nitrogenasa se determinó según el método descrito por Hardy *et al.* (1968). Esta actividad específica se expresa como nmol de etileno h⁻¹ g⁻¹ de peso seco de nódulos.

Inmediatamente después de la cosecha (Figura 6A), las raíces de cada tratamiento se colocaron en frascos de vidrio de 70 ml que se sellaron con un tapón de hule (Figura 6B). Dependiendo de la biomasa radical, se colocaron entre 3 y 5 raíces en cada frasco, de tal forma que se obtuvieron entre 3 y 5 frascos por maceta. Después se extrajo el 1.4% del volumen del aire de cada frasco y se reemplazó por la misma

cantidad de acetileno al 100% de pureza. Los frascos se dejaron reposar mínimo por 20 minutos a temperatura ambiente (Figura 6C).

Posteriormente se extrajeron 0.4 ml de aire de cada frasco, para ser analizados en el cromatógrafo de gases marca Varian 3300, utilizando un detector de ionización de llama y una columna a 95° C, la entrada de inyección se ajustó a 95°C y el detector a 105°C (Figura 6D). Después de la lectura en el cromatógrafo de gases, de forma manual se separaron los nódulos de la raíz y se secaron en la estufa a una temperatura de 60°C durante por lo menos 48 horas. Después se cuantificó el peso seco de los nódulos. La actividad específica de la enzima nitrogenasa se calculó con las siguientes fórmulas:



Figura 6. Método reducción del acetileno para determinar la fijación de nitrógeno. A) Raíces de alfalfa, B) frascos con raíces, C) raíces con acetileno, D) lectura en cromatógrafo de gases.

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{unidades totales}}{\text{g peso seco de nódulo}}$$

$$\text{Unidades totales} = \frac{\frac{\text{área del pico de etileno}}{1 \times 10^6}}{\text{tiempo (minutos)}} \text{ (factor (0.0039))}$$

5.5.6 Análisis de nitratos y amonio extractable en los suelos

El suelo de cada maceta se almacenó en bolsas de plástico y éstas se trasladaron al Instituto de Geología, donde se pasaron por un tamiz de 5 mm de apertura de malla para homogenizar las muestras.

Se analizó el contenido de nitrato extractable según el método descrito por Monteiro *et al.* (2003) y el contenido de amonio extractable según el método estandarizado por Zúñiga Lagunes (2007).

Previo a la extracción se determinó en una alícuota de cada muestra el porcentaje de humedad, pesando 10 g de suelo y dejándolo en la estufa por 48h a 105°C y determinando el contenido de humedad por diferencia de peso antes y después de secar la muestra.

Después se procedió a pesar la masa de suelo equivalente a 10 g de suelo seco la cual se colocó en botellas de polietileno de 250 ml. Se le adicionaron 100 ml de KCl 2M y durante 30 minutos se dejó en agitación a 120 rpm. Posteriormente se filtró el sobrenadante a través de filtros Whatman del No.40, se le agregaron dos gotas de cloroformo a los filtrados para eliminar la actividad microbiana.

La concentración de nitrato en los filtrados se determinó con el método de salicilato. Éste se basa en la formación de iones NO_2^- bajo condiciones de acidez y calor, los cuales reaccionan con el salicilato bajo condiciones alcalinas para formar un compuesto nitrobenzónico de color amarillo. La absorbancia de este compuesto amarillo se puede cuantificar en un espectrofotómetro a 430 nm.

En matraces Erlenmeyer se agregaron 10 ml del extracto del suelo y 40 ml de agua desionizada. Se preparó salicilato de sodio y se le adicionó 1 ml por cada muestra, se dejó secar a 105°C en la estufa hasta su evaporación.

Ya evaporado se agregó 1ml de H_2SO_4 concentrado, finalizada la reacción se adicionaron 50ml de agua Milli-Q y se agregaron 7 ml por muestra de solución de tartrato y sodio potásico, se aforó con agua a un volumen de 100ml (Figura 7).

Finalmente se leyeron las muestras en un espectrofotómetro marca Spectronic 20 Genesys a 430nm.

La curva patrón se elaboró a partir de un estándar de NO_3 siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente. (Las concentraciones de la curva patrón se muestran en el anexo uno).



Figura 7. Determinación de nitratos.

La cuantificación de amonio se fundamenta en la formación de indofenol, a partir de la reacción del fenol con el amonio. Ésta se lleva a cabo en dos etapas: inicialmente se forman moléculas de cloramina y posteriormente de indofenol, favorecido por el ion hipoclorito en condiciones alcalinas, catalizada por el nitroprusiato de sodio ($\text{Na}_2(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}) \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), formándose un complejo de color azul cuya absorbancia puede ser leída en un espectrofotómetro a 640 nm.

Para la determinación de amonio se utilizaron tubos de cristal con tapa, a éstos se les adicionaron 2.5 ml del extracto de KCl 2M, posteriormente se le adicionaron los siguientes reactivos en el siguiente orden: 0.2ml de solución de fenol, 0.2ml de solución de nitroprusiato, 0.3ml de la solución oxidante. En seguida se colocaron en un contenedor con tapa para mantener la reacción en oscuridad en un agitador durante diez minutos y un tiempo de espera de veinte minutos para que se termine de generar

la reacción, se sacaron las muestras y se leyeron en un espectrofotómetro marca Spectronic 20 Genesysa una longitud de onda de 655nm. La elaboración de las soluciones y curva de calibración el método se describe en el anexo 2.

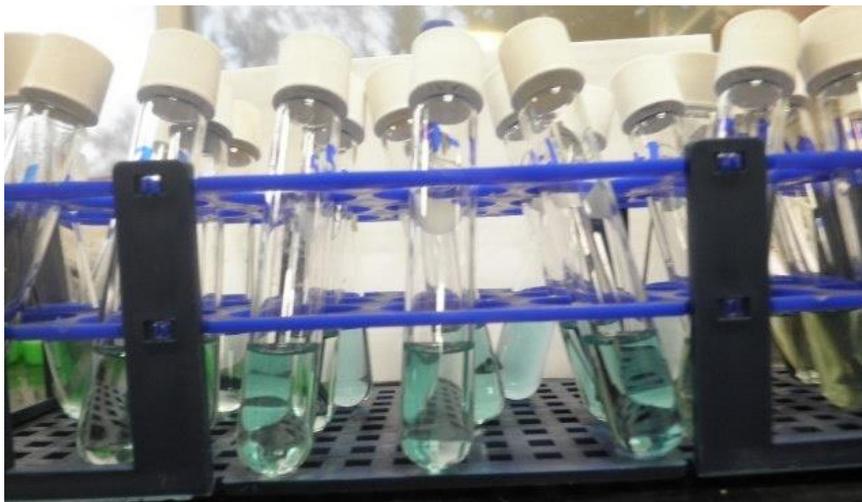


Figura 8. Determinación de amonio.

5.5.7 Carbono y nitrógeno totales en tejidos vegetales aéreos (tallos y hojas).

Se utilizó un analizador elemental CNHS/O Perkin Elmer 2400 serie II con las siguientes condiciones: Helio como gas acarreador, temperatura de combustión 980 °C y temperatura de reducción 640 °C, un detector de conductividad térmica, acetanilida como compuesto de calibración y se utilizó un material de referencia de hojas de fresa LGC7162.

5.5.8 Análisis estadísticos

Las variables a evaluar fueron: altura máxima, número de nódulos, peso seco de nódulos, relación C/N en plantas, relación biomasa aérea/ biomasa subterránea, actividad específica de la nitrogenasa, amonio y nitrato en suelo. Para determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos de las variables mencionadas se realizó la prueba estadística ANOVA de dos factores (SigmaPlot 12.3), teniendo como factor uno, el tipo de agua, como factor dos el tipo de suelo y la interacción entre factores. Posteriormente se aplica la prueba de Tukey. El valor de significancia a considerar fue de $p \leq 0.056$.

6. Resultados

6.1 Supervivencia

La supervivencia varió entre el 26 y el 100% (Anexo 1). Se observó que la supervivencia de las plantas dependió sobre todo de las características de los suelos y solo en un tratamiento se observó un efecto del tipo de agua. En el suelo Cañada Chica 2 mostró la menor supervivencia (< 50%) comparada con los otros tipos de suelo, y esta diferencia resultó estadísticamente significativa. Este suelo es el que tiene concentraciones relativamente altas de sales solubles y el que tiene los menores contenidos de N total y C orgánico. También tiene la mayor densidad aparente (Tabla 3). Solo el suelo Las Palmas1 mostró una diferencia en la supervivencia por el tipo de agua p (<0.05), teniendo un mayor porcentaje de supervivencia aquellos tratamientos que fueron regados con agua de la llave (60% con agua residual y 90% con agua de la llave) (Figura 9).

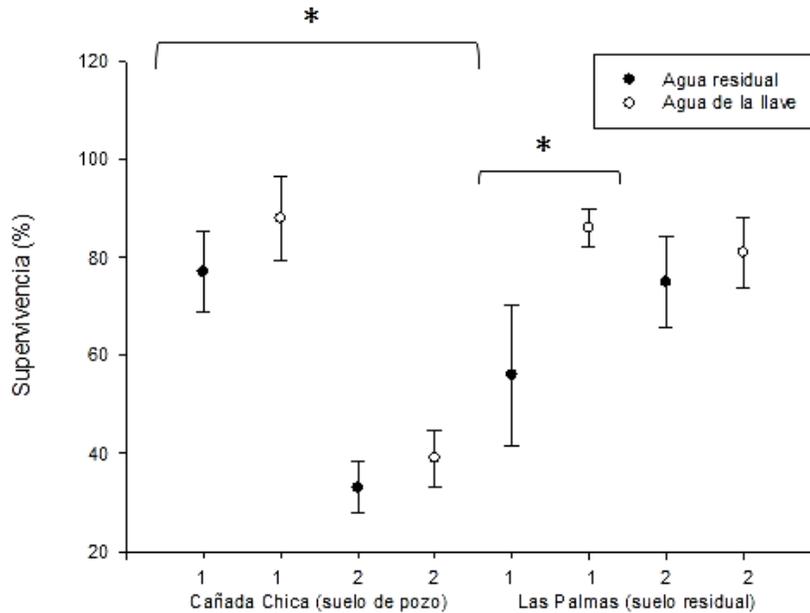


Figura 9. Supervivencia de las plantas de alfalfa (promedio de los dos bloques y barra de error estándar, n=4) en los distintos tratamientos después de 60 días. Se indican con asterisco a aquellos tratamientos que resultaron estadísticamente diferentes.

6.2 Altura

La altura de las plantas se midió a los 40 y 60 días después de haber hecho el trasplante. A los 40 días sólo las plantas en el suelo Cañada Chica 2 muestran diferencias estadísticamente significativas en altura por efecto del tipo de agua usada para regar (Figura 10), teniendo una mayor altura aquellas plantas regadas con agua limpia $p (<0.05)$. En general las plantas muestran mayores alturas en los tratamientos de suelo Las Palmas. A los 60 días la altura de las planta depende sobre todo del tipo de suelo (Figura 11), ya que no existe una diferencia significativa $p (<0.05)$ entre los suelos de Cañada Chica regados con los dos tipos de agua (Suelo Cañada Chica 1 vs. Suelo Cañada Chica 2), ni entre los suelos del rancho Las Palmas regados con los dos tipos de agua (Suelo Las Palmas1 vs. Suelo LasPalmas2), pero los tratamientos de Las Palmas muestran alturas significativamente mayores que los suelos de Cañada Chica. Sólo en el suelo de Cañada Chica2 se observó nuevamente una diferencia por el tipo de agua teniendo una mayor altura aquellas plantas que fueron regadas con agua limpia.

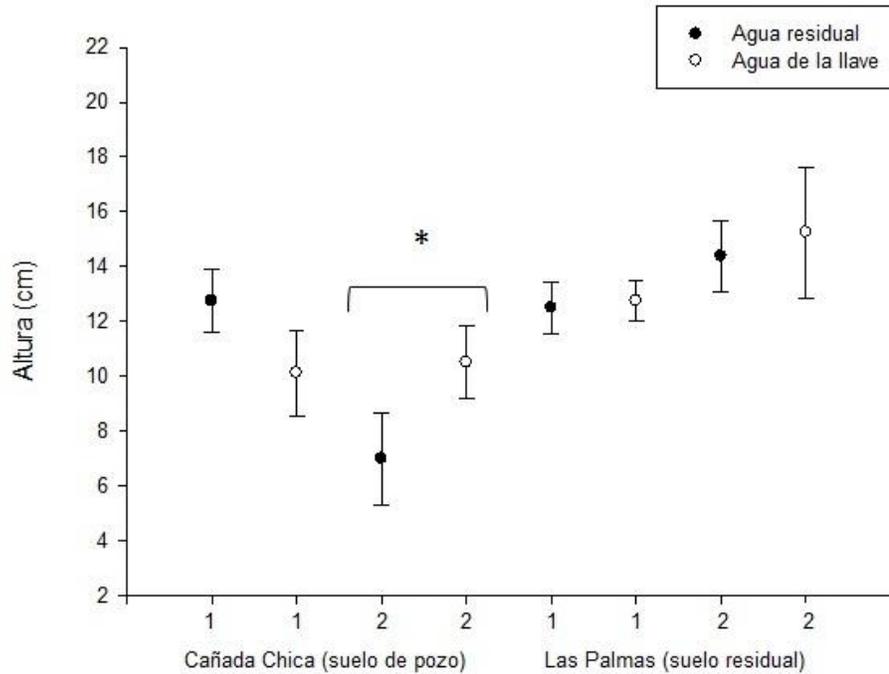


Figura 10. Altura de las plantas de alfalfa en los distintos tratamientos después de 40 días (promedio de los dos bloques y barra de error estándar, n=4). Se indican con asterisco aquellos tratamientos que resultaron estadísticamente diferentes.

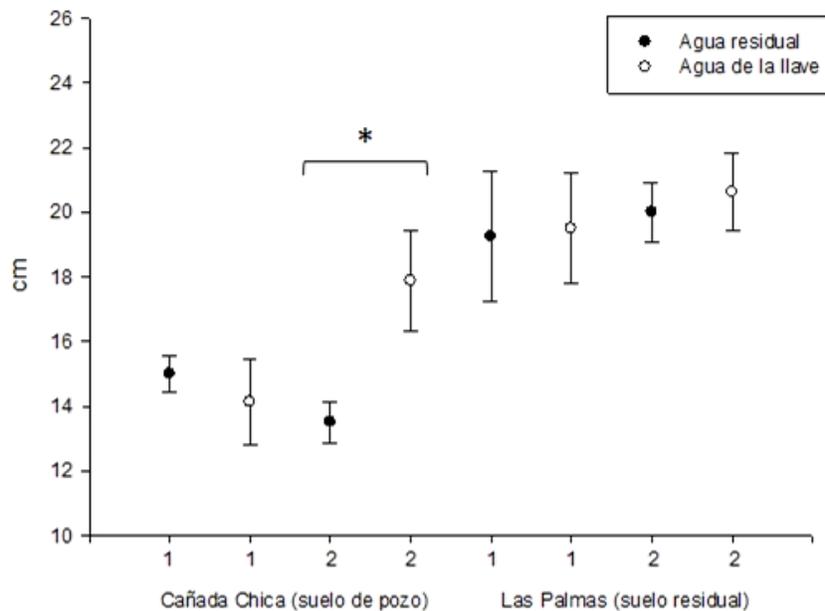


Figura 11. Altura de las plantas de alfalfa en los distintos tratamientos después de 60 días (promedio de los dos bloques y barra de error estándar, n=4). Se indican con asterisco a aquellos tratamientos que resultaron estadísticamente diferentes.

En la Figura 12 se muestran fotografías de las macetas de todos los tratamientos, donde puede apreciarse que las plantas sembradas en suelos del rancho Las Palmas (regados por mucho tiempo con agua residual) muestran estar más vigorosas que aquellas sembradas en suelos de Cañada Chica (regados con agua de pozo). Particularmente en el suelo Cañada Chica 2, que es el que tienen mayores concentraciones de sales solubles y menos materia orgánica, las plantas crecen mucho menos.

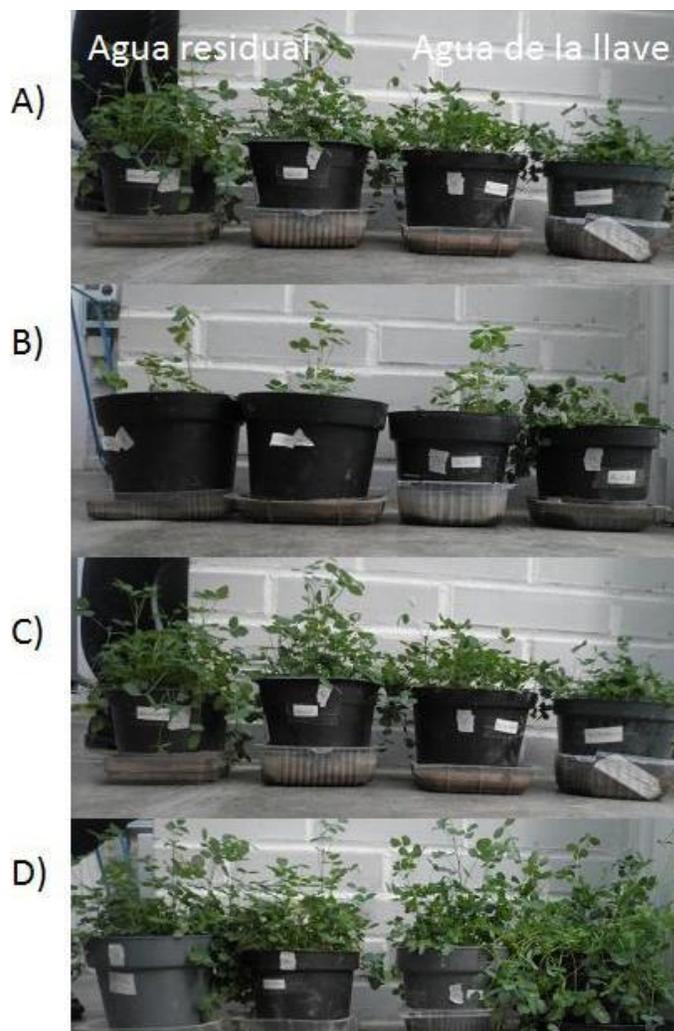


Figura 12. Altura y biomasa de las plantas del bloque 1 de alfalfa antes de la cosecha. A) Plantas de alfalfa sembradas en suelos Cañada Chica 1, a la izquierda regadas con agua residual, a la derecha tratadas con agua de la llave. B) Plantas de alfalfa sembradas en suelos de Cañada Chica2 a la izquierda regadas con agua residual a la derecha regadas con agua de la llave. C) Plantas de alfalfa sembradas en suelo Las Palmas1 a la izquierda tratadas con agua residual, a la derecha tratadas con agua de la llave. D) Plantas de alfalfa sembradas en suelos Las Palmas2 a la izquierda tratadas con agua residual a la derecha tratadas con agua de la llave.

6.3 Biomasa

El crecimiento de las plantas se analizó comparando no sólo la biomasa aérea, sino también la subterránea (Figura 13), así como la relación entre ambas (Figura 14). La biomasa aérea y la subterránea depende de las características del suelo, ya que no hubo una diferencia significativa entre la calidad del agua $p (<0.5)$. Los tratamientos donde las plantas fueron sembradas en suelos del rancho Las Palmas con una larga historia de riego con agua residual muestran una mayor biomasa, tanto aérea como subterránea, mientras que las plantas sembradas en suelos de Cañada Chica presentan un menor desarrollo de raíz y por lo tanto un menor desarrollo foliar.

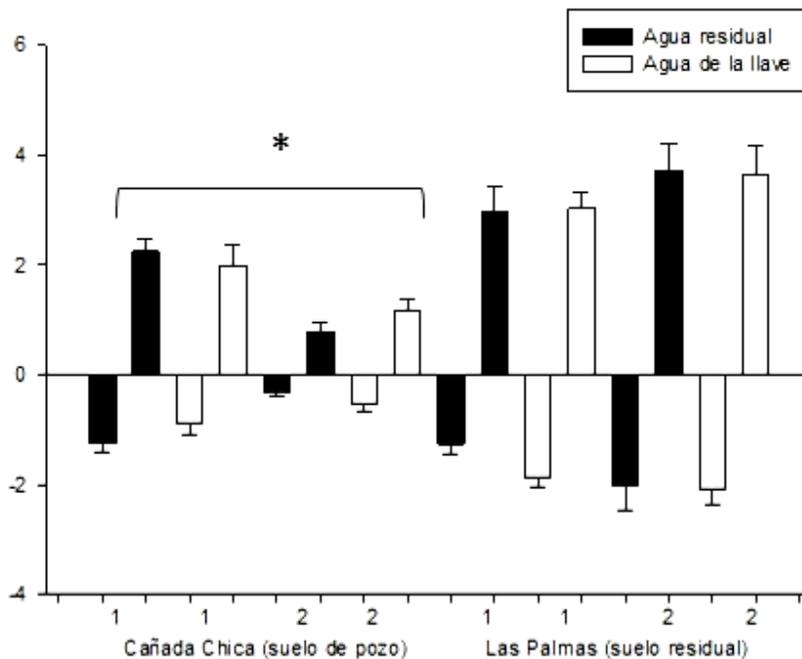


Figura 13. Biomasa de área y subterránea de las plantas de alfalfa en los distintos tratamientos (promedio de los dos bloques y barra de error estándar, $n=4$). Se indican con asterisco a aquellos tratamientos que resultaron estadísticamente diferentes.

Biomasa aérea/ subterránea

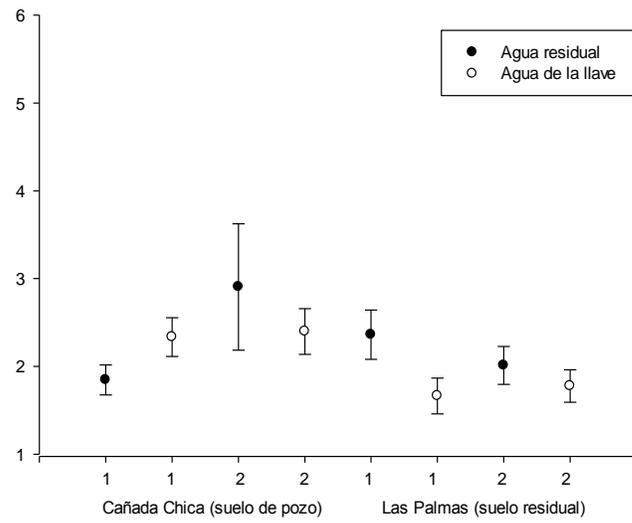


Figura 14. Relación de biomasa aérea/subterránea de las plantas de alfalfa en los distintos tratamientos (promedio de los dos bloques y barra de error estándar, n=4).

6.4 Peso de nódulos

En la Figura 15 se muestra el peso de nódulos por tratamiento, donde se observa que los nódulos desarrollados en los suelos de la localidad de Las Palmas mostraron una mayor biomasa al regarse con agua limpia. Los nódulos de los tratamientos de Cañada Chica no mostraron diferencias entre tratamientos.

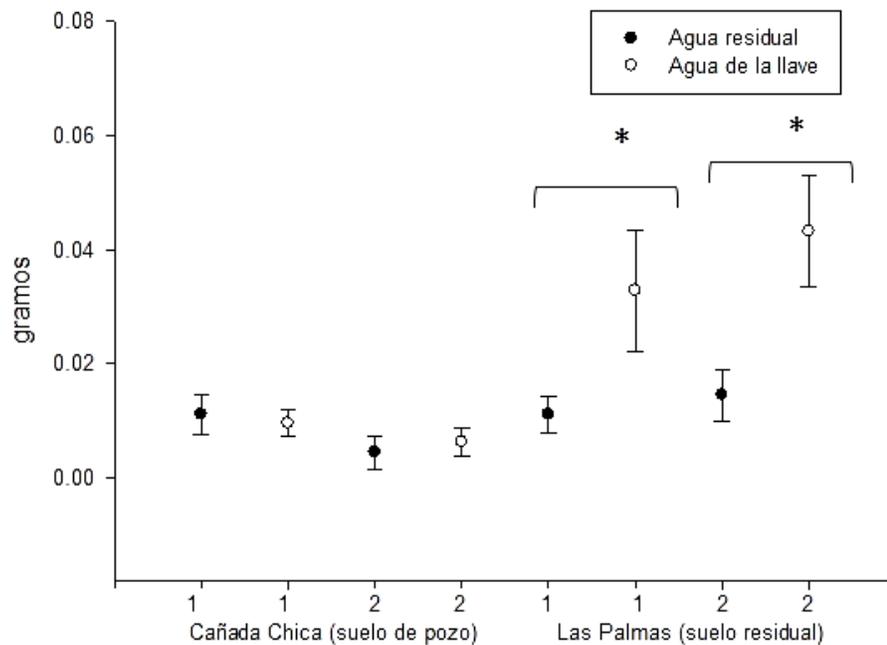


Figura 15. Peso de los nódulos de las plantas de alfalfa en los distintos tratamientos (promedio de los dos bloques y barra de error estándar, n=4). Se indican con asterisco a aquellos tratamientos que resultaron estadísticamente diferentes.

6.6 Relación Carbono-Nitrógeno en biomasa aérea

El porcentaje de nitrógeno en la biomasa aérea no mostró diferencias entre tratamientos, $p < 0.05$ (Figura 16). Sin embargo, el porcentaje de carbono en las plantas se ve influenciado por el tipo de agua (Figura 17); aquellos tratamientos donde se aplicó agua de la llave mostraron generalmente un aumento en el porcentaje de carbono, con excepción del tratamiento sembrado en suelo de Cañada Chica 1, el cual no mostró un efecto del tipo de agua usada para regar.

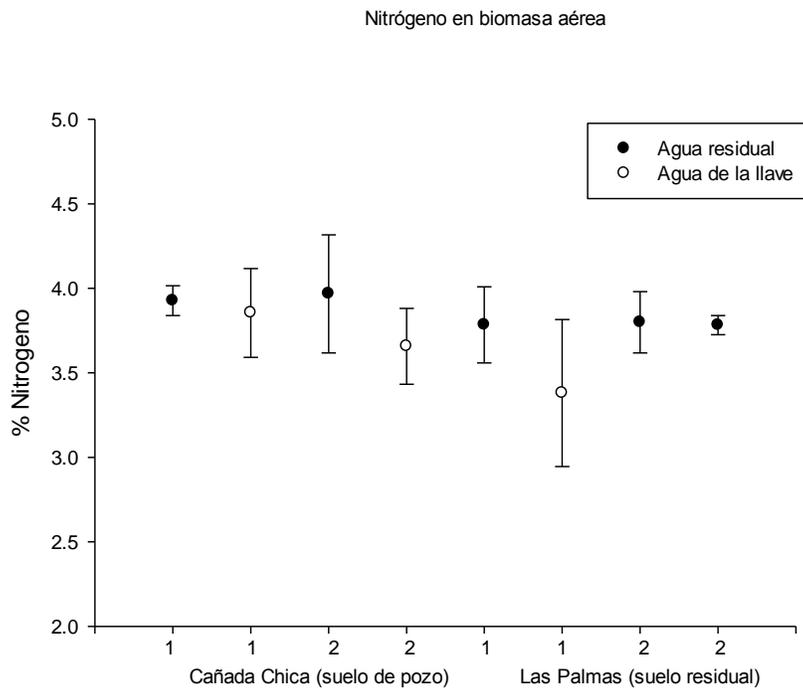


Figura 16. Contenido de nitrógeno en la biomasa aérea de las plantas de alfalfa en los distintos tratamientos. (Promedio de los dos bloques y barra de error estándar, $n=4$).

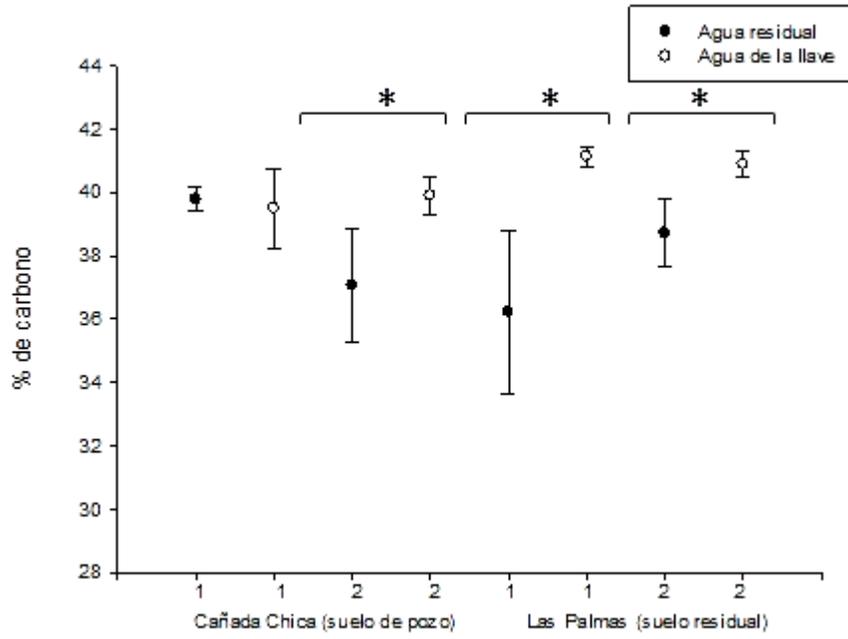


Figura 17. Contenido de carbono en la biomasa aérea de las plantas de alfalfa en los distintos tratamientos (promedio de los dos bloques y barra de error estándar, n=4). Se indican con asterisco a aquellos tratamientos que resultaron estadísticamente diferentes.

6.4 Actividad de la nitrogenasa

Los resultados muestran que la fijación atmosférica del nitrógeno en los diferentes tratamientos es influenciada por el tipo de suelo y por el tipo de agua. Sólo las bacterias que se desarrollaron en suelos de Cañada Chica 1 no mostraron diferencias significativas mientras que los suelos de Cañada Chica 2 muestran una menor fijación en el tratamiento donde fueron regados con agua residual. Mientras que las bacterias desarrolladas en suelos del rancho Las Palmas mostraron una mayor fijación al continuarse regado con agua residual, y una menor fijación al regarlos con agua de la llave (Figura 18).

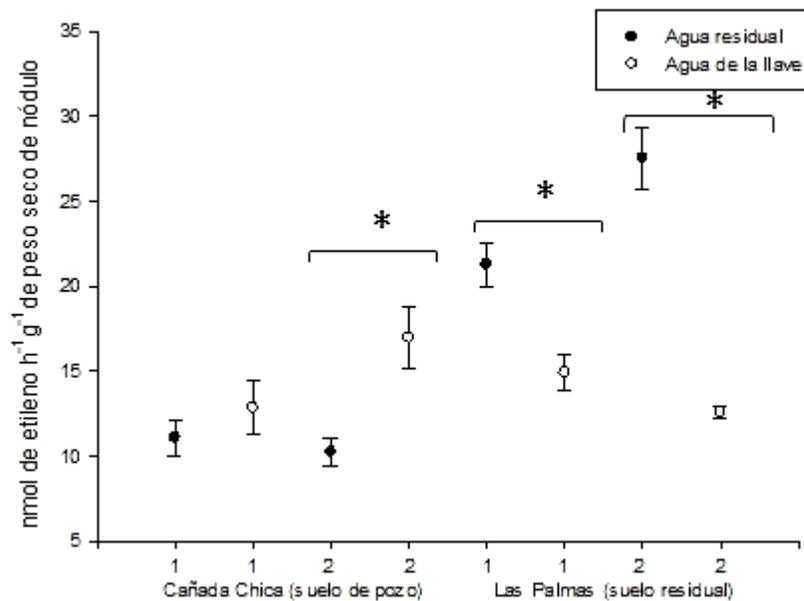


Figura 18. Actividad enzimática de la nitrogenasa en los distintos tratamientos. (Promedio de los dos bloques y barra de error estándar, n=4). Se indican con asterisco aquellos tratamientos que resultaron estadísticamente diferentes.

6.5 Nitrógeno disponible en el suelo

Se analizó la concentración de nitrato (NO_3^-) (Figura 18) y amonio (NH_4^+) (Figura 19) extractable en todos los tratamientos después de haber realizado la cosecha. Sólo se observa un aumento significativo de la concentración de nitrato del suelo 2 de Cañada Chica al adicionarles agua residual, aunque el promedio de nitrato extractable siempre fue ligeramente mayor en suelos regados con agua residual, que en suelos regados con agua de la llave.

La concentración de NH_4^+ suele ser variable en los diferentes tratamientos; los valores van desde cero hasta 6 mg/kg, pero no se observan diferencias significativas entre tratamientos (Figura 19).

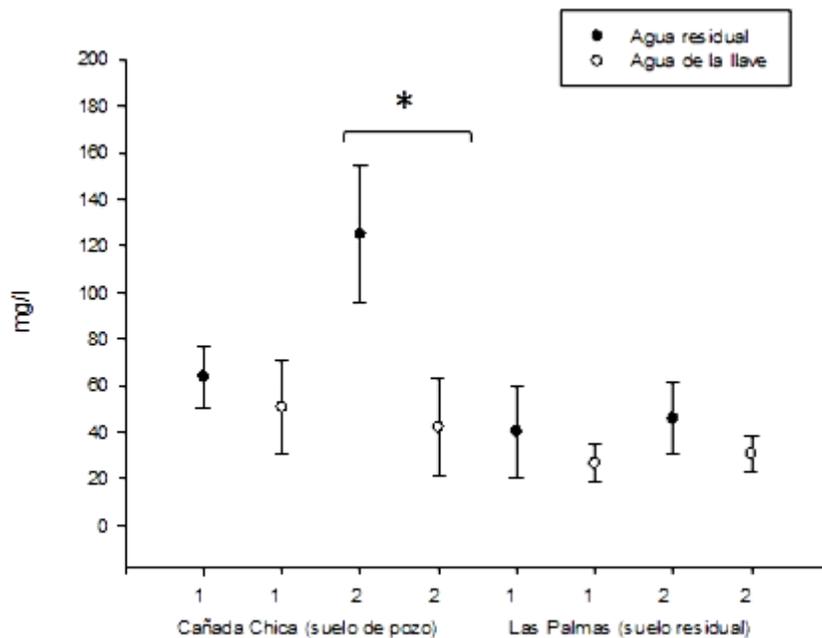


Figura 18. Promedios y error estándar ($n=4$) de las concentraciones de nitrato extractable en los diferentes tratamientos y en los dos bloques del experimento. Se indican con asterisco aquellos tratamientos que resultaron estadísticamente diferentes.

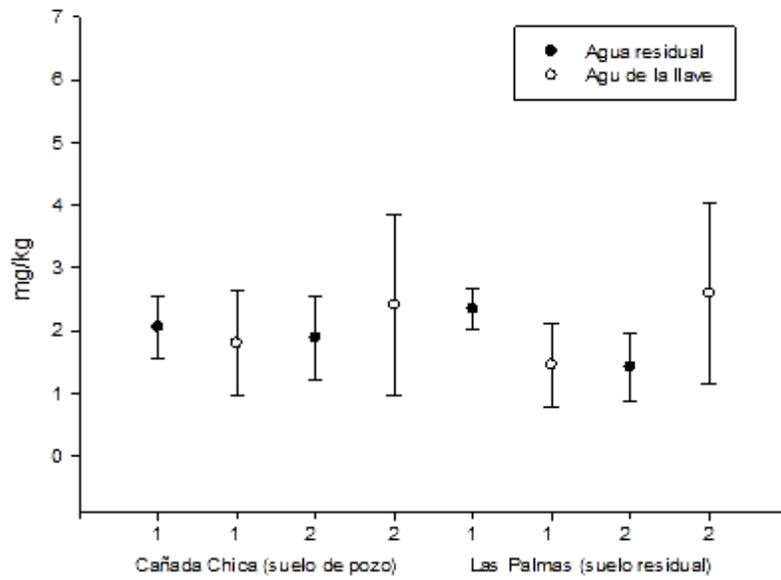


Figura 19. Promedios y error estándar (n=4) de las concentraciones de amonio extractable en los diferentes tratamientos y en los dos bloques del experimento.

7. Discusión

Uno de los factores limitantes para el crecimiento de las plantas es la disponibilidad de nitrógeno. La simbiosis más importante para la fijación de nitrógeno es la asociación simbiótica entre una leguminosa y una bacteria fijadora de nitrógeno. Con el objetivo de comparar la eficiencia de la simbiosis entre alfalfa (*Medicago sativa*) y *Sinorhizobium* sp., en función de la calidad del agua de riego (agua residual y agua de la llave o de abastecimiento), en dos suelos distintos, (uno de estos suelos se ha regado por más de 80 años con agua residual mientras que el otro se ha regado por 20 años con agua de pozo), se realizó un cultivo en invernadero para con base en diferentes parámetros indicadores determinar el efecto del agua residual sobre la simbiosis.

Supervivencia, altura y biomasa de las plantas

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre el rendimiento, se midieron la supervivencia, altura y biomasa de las plantas. Los resultados muestran que las plantas sembradas en los suelos de las Palmas, tienen mayor rendimiento y un mayor porcentaje de supervivencia, independientemente de las características del agua con la que se hayan regado. Al parecer, esto está relacionado con la porosidad y la estructura de los suelos, ya que los suelos de Cañada Chica tienen una mayor densidad aparente (1.06 a 1.09 g cm^{-3}) que los de Las Palmas (0.9 g cm^{-3}). También en otros estudios se ha observado que los suelos regados por periodos largos con agua residual en el Valle del Mezquital están mejor estructurados y tienen más poros (Lueneberg-Rodríguez, 2013). Además, los suelos de Cañada Chica tienen un mayor contenido de sales solubles, como lo indica la conductividad eléctrica (1.13 a 1.46 dS/m), que los suelos de Las Palmas ($<0.7 \text{ dS/m}$). De acuerdo con Santamaria *et al.*, (2004) las sales solubles, disminuyen la productividad de la alfalfa hasta en 40% del rendimiento potencial.

También se reporta en la literatura que suelos regados por largos periodos de tiempo tienen mayores contenidos de materia orgánica y sobre todo de fósforo extractable (Siebe, 1998), beneficiando el rendimiento de los cultivos. Los suelos de Las Palmas

tienen los contenidos más altos de carbono orgánico (2.2 y 2.6%, respectivamente). Y el suelo de Cañada Chica 2 tiene un bajo contenido de carbono orgánico (1.06%), lo cual explica por qué en este suelo se obtuvieron los menores rendimientos de todos los tratamientos.

En la localidad de Las Palmas tras varias décadas de riego con agua residual, la estructura de los suelos se ha visto favorecido mediante el aumento de la materia orgánica, y además el riego aporta macro y micronutrientes. En estos suelos el contenido de N total es mayor y el contenido de C inorgánico es visiblemente bajo. Estos datos coinciden con lo reportado por Siebe (1994), quien además muestra que el riego con agua residual provee P aprovechable para las plantas y micronutrientes como Cu y Zn. Por ello la productividad de la alfalfa se mostró favorecida al tener un mayor peso en biomasa aérea y subterránea, visualmente mostrando una mejor cobertura (Figura 12). Esto se puede observar en la Tabla 3.

Los suelos de Cañada Chica son poco profundos lo que limita el desarrollo de las raíces y la capacidad de retener agua así como los almacenes de nutrientes. Además estos suelos contienen carbonato de calcio. Esto se reflejó en la altura y en la biomasa de las plantas, la cual fue inferior comparada con la localidad de Las Palmas. Si bien el agua residual no mostró un efecto entre las plantas, los resultados obtenidos muestran que los suelos de Cañada Chica contienen un mayor contenido de carbono inorgánico en forma principalmente de carbonato de calcio ($SP_1 = 0.87\%C$, $SP_2 = 0.88\%C$), lo cual puede dificultar la absorción de K y de Fe (Marschner, 1988).

Indicadores de la fijación biológica de N

En este proyecto se planteó como hipótesis que al adicionar agua residual a suelos habría un menor desarrollo nodular y por lo tanto una menor eficiencia en la enzima nitrogenasa, comparada con el riego con agua de pozo, dado que el agua residual aporta nitrógeno suficiente para el desarrollo del cultivo. Sin embargo, es notable que en el suelo con mayor historia de riego con agua residual (Las Palmas), se mantuvo activa la enzima nitrogenasa, pero solo si se continuaba regando con agua residual. Las bacterias que ocupan este nicho, aún con las adiciones no solo de N, sino también

de sales solubles y de metales pesados (Siebe, 1994), siguen fijando N atmosférico. Una importante fijación biológica de N por la simbiosis alfalfa-*Sinorhizobium* ha sido documentada en la zona también por Wagner (2004), quien encontró mediante la técnica de delta ^{15}N que alfalfa regada por más de 70 años con agua residual fija hasta 300 kg de N al año.

En el experimento realizado se observó que al cambiar la calidad del agua, en este caso por agua libre de nutrientes y de contaminantes, la actividad de la nitrogenasa se ve disminuida. Lo anterior quiere decir que en este sitio en particular las bacterias han creado un proceso de adaptación y resistencia a contaminantes presentes en el suelo y agua, contrario a la hipótesis planteada anteriormente.

De acuerdo con Vitousek 2002 (citado en Méndez *et al.*, 2015) el factor principal que controla la fijación del nitrógeno es la abundancia de nitrógeno inorgánico en el suelo. Así, en ambientes pobres en nitrógeno se espera que los organismos fijadores de nitrógeno atmosférico tengan ventajas que les permiten suplir la deficiencia de nitrógeno (Vitousek y Howarth 1991). Varios autores citan que el nitrato inhibe la nodulación y la fijación de nitrógeno. Al parecer la inhibición de la nodulación se debe a que el nitrato se une a algún receptor específico del *Rhizobium* sobre la raíz de la leguminosa impidiendo la nodulación, aunque esto no ha sido totalmente demostrado (Fernández *et al.*, 2002).

Sin embargo Teuber *et al.*, 1984 citado en Oliveira *et al.*, (2004) dicen que las plantas leguminosas necesitan nitrógeno para el mantenimiento durante la germinación inicial, antes de que comience el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico; este N es suministrado inicialmente por la semilla, después es suministrado por el suelo. Oliveira *et al.*, (2004) realizaron un experimento en invernadero para evaluar la eficiencia de la bacteria en presencia de nitrógeno disponible en un rango de 0 a 16 mmol L⁻¹. Los resultados que obtuvieron indican que en aquellas plantas con la mayor concentración de nitrógeno disponible (16 mmol L⁻¹) al igual que en aquellas plantas con ausencia de nitrógeno la nodulación y el crecimiento de las plantas fueron menores, la mayor actividad de nitrogenasa se reflejó en las plantas con el tratamiento con menor adición de N, es decir 2 mmol L⁻¹ de N.

De acuerdo con Cihacek (1994), independientemente de la concentración de nitrógeno en el suelo, una fertilización nitrogenada de 17 a 28 kg ha⁻¹ para el establecimiento de alfalfa beneficia a la planta hasta que se establezca la simbiosis, pero esta fertilización podría ser dispensada debido a la alta capacidad de la alfalfa de extraer el nitrógeno existente en el suelo.

Fernández *et al.*, (2002) observaron que el aplicar 20 mM de nitrato provoca una disminución de la actividad nitrogenasa y de la respiración del sistema radicular, así como el incremento de la resistencia a la difusión del oxígeno, además de que la aplicación de nitrato produce alteraciones en la morfología de la corteza nodular. Fernández *et al.*, 2002 indican que los principales factores limitantes para la fijación de nitrógeno son los fotosintatos y el oxígeno, ya que ambos factores son imprescindibles para la obtención de energía por parte de la nitrogenasa. En el presente trabajo, los suelos Cañada Chica 2, y Las Palmas 1 y 2 mostraron menores contenidos de C en biomasa, si se regaron con agua residual, los cuales aumentaron al regarlos con agua limpia.

Diversos estudios han detectado que la supervivencia, competitividad y establecimiento de la simbiosis se ve limitada en ambientes con acidez de suelo, deficiencia o toxicidad de P, Ca, Mo y Al, salinidad alta (Fernández *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 2002; o exceso de agua, presencia de nitrógeno combinado (Gan *et al.*, 2004), el clima, herbicidas, temperatura y humedad del suelo a nivel biológico (Navarro Blaya y Navarro Garcia, 2003).

Otras investigaciones han destacado la tolerancia de algunas leguminosas ante contaminantes de productos derivados del petróleo, y las proponen como plantas fitorremediadoras de suelos. Sangabriel *et al.*, (2006) en un estudio realizado para evaluar la tolerancia y la capacidad de fitoremediación de tres especies de leguminosas por combustóleo, observó que algunas especies de leguminosas como *Phaseolus coccineus*, en presencia de contaminantes en el suelo, estimulaban la población microbiana de la rizosfera contaminada (27.0 UFC x10⁶ g⁻¹), comparada

con aquellas plantas de la misma especie en suelos libres de contaminates ($17.6 \text{ UFC} \times 10^6 \text{ g}^{-1}$) aunque no se analizó el papel de *Rhizobium* como fijador de nitrógeno.

Carrasco *et al.*, 2005 en un estudio para determinar la tolerancia de metales pesados como el As y Pb, en la simbiosis alfalfa-*Sinorhizobium melliloti*, encontró que algunas cepas aisladas (Cepa Med4D y Al f12) son resistentes a los elementos antes mencionados, siendo totalmente simbióticamente efectiva bajo condiciones de contaminación, evidencia contradictoria sobre el efecto tóxico de los metales pesados sobre la fijación de nitrógeno, considerado como un factor inhibitorio y reportado por otros autores, Stan *et al.*, 2011 cita a Castro *et al.*, 1997; Chaudhary *et al.*, 2004; Lakzian *et al.*, 2002; Smith., 1997).

Estudios previos en la zona del Valle del Mezquital demuestran que el riego con agua residual provoca una acumulación de metales pesados en la capa arable (Siebe, 1994, Flores Delgadillo *et al.*, 1992). Suelos regados con agua residual por más de 80 años tienen de 1.3 (Fe) hasta 5.1 (Pb) veces más metales pesados totales que suelos regados con agua de pozo (Siebe, 1994). Aunque estos metales solo se encuentran disponibles para las plantas en cantidades moderadas, la alfalfa que crece en suelos regados por más de 80 años, contiene 5.1 veces más metales pesados, en particular Cd y 3.2 veces más Zn, que aquella que crece en suelos regados con agua de pozo (Siebe, 1994). La moderada absorción de los metales por las plantas concuerda con la alta capacidad filtro y amortiguadora de los suelos de la zona, los cuales muestran pH neutros a alcalinos, contenidos medios a elevados de materia orgánica, texturas limosas y capacidades de intercambio catiónico de medias a altas (Flores Delgadillo *et al.* 1992, Siebe 1994). Lo anterior podría explicar porque no se observó una disminuida actividad enzimática en los suelos regados con agua residual por periodos prolongados de tiempo. Otro aspecto podría ser que las cepas de bacterias en suelos regados por largo periodo se encuentren adaptadas a la presencia de metales pesados.

Un factor que puede limitar el rendimiento de los cultivos es el exceso de sal. El contenido de sales se estimó por medio de la conductividad eléctrica en extractos de

saturación de suelo. De acuerdo con Mass y Hofman (1977, citado en Santamaria *et al.*, 2004), la alfalfa tolera una conductividad eléctrica hasta de 2.0 dS m^{-1} , por lo que la presencia de sal en todos los tratamientos no debería ser un factor que limite fuertemente el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, los suelos de Cañada Chica tienen una mayor conductividad eléctrica ($SP_1= 1.13$, $SP_2=1.46 \text{ dS m}^{-1}$) que los de Las Palmas ($SR_1 0.67$ $SR_2=0.56 \text{ dS m}^{-1}$), lo cual podría explicar las diferencias encontradas en los indicadores de crecimiento entre ambos suelos.

Se dice que a mayor concentración de N disponible en el suelo será menor la fijación de nitrógeno por lo que se esperaba una menor nodulación, sin embargo en este experimento este proceso no se observó un efecto del N disponible sobre la nodulación, ya que amonio se oxida rápidamente y no se encontró tampoco una diferencia significativa entre tratamientos en las concentraciones de nitrato extracable.

8. Conclusiones

En esta tesis se analizó si el aporte de nitrógeno a través del riego con agua residual al suelo durante más de 80 años afecta negativamente la simbiosis *Sinorhizobium* sp.–alfalfa. Los resultados indican que, al contrario de lo esperado, las plantas que crecieron en suelos con una larga historia de riego con agua residual y que siguieron regándose con esta misma agua, mostraron una mayor fijación de nitrógeno en comparación con plantas regadas con agua limpia. Las plantas desarrolladas en suelos con historia de riego con agua de pozo mostraron una menor actividad de la enzima nitrogenasa al adicionar el agua residual, en comparación con plantas regadas con agua residual. Se planteó la hipótesis de que el exceso de nutrientes y la presencia de contaminantes como sales y metales pesados afectarían la simbiosis entre *Sinorhizobium* sp.–alfalfa. No obstante, en este trabajo se observó que las bacterias han creado una funcionalidad y resistencia a algunos contaminantes, de tal forma que al mejorar la calidad del agua, mostraron una disminución de su actividad enzimática. El tratamiento en el cual se observó la mayor supervivencia y cantidad de biomasa fue el regado con agua residual en suelos con una larga historia de riego, lo que se relaciona con el aporte continuo de nutrientes, la mayor agregación del suelo y su alto contenido de materia orgánica.

9. Referencias

- Alexander, M. (1980). Introducción la microbiología del suelo. AGT editor, S.A
- Atlas, R. M., y Bartha, R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. Madrid: Addison Wesley.
- Bogdan, A. V. (1997). Pastos tropicales y plantas de forraje. Londres: AGT editor, S.A.
- Carmona Paredes, R. B., y Muñiz Arcila, F. (2014). Contaminación emergente en el valle del Mezquital. XXIII Congreso nacional de hidráulica.
- Carrasco, J. A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M. A., López, R., y otros. (2005). Isolation and characterisation of symbiotical effective Rhizobium resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1131-1140.
- Cervantes A. y M.A. Armienta. (2004). Influence of faulting on groundwater quality in Valle del Mezquital, México. *Geofísica internacional*. 43:477-493.
- CGPASVM Coordinación general de los proyectos de agua potable y saneamiento del valle de México Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Atotonilco de Tula, Estado de Hidalgo, Memoria del Proyecto, CONAGUA, México, D.F. 2008.
- Cifuentes, E. (1994). Escenario epidemiológico del suelo agrícola del agua residual: El Valle del Mezquital, México. *Salud Publica* 36: 3-9.
- Cihacek, I.J. (1994) Alfalfa nutrient needs and fertilization. in: Workshop sobre o potencial forrageiro de alfalfa (medicago sativa L.) Nos trópicos, Juiz de Fora, Anais. Juiz de Fora: EMBRAPA, CNPGL, p.93-97.
- Comisión Nacional Del Agua. (1995). Programa de Saneamiento de la cuenca de México Informe Ejecutivo. México. D.F.
- Coyne, M., (2000). Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio, Madrid: Paraninfo.
- Curtis, H., (2006). Biología, México. Panamericana.
- De Alba, R. (2013). Aguas residuales el oro negro del Valle del Mezquital. Crónica ambiental.
- Del Pozo Ibañez, M. (1977). La alfalfa su cultivo y aprovechamiento. Madrid: Mundi Prensa.
- Dickson, T., (2000). Química enfoque ecológico, Limusa.
- FAO, ISRIC Y SICS. (1999). Base referencial mundial del recurso del suelo. Roma
- Fernández Pascual, M., Nuria de, M., y Felipe, M. (2002). Fijación biológica del nitrógeno: factores limitantes. *Ciencia y medio ambiente*, 195-202.
- Fernández Pascual M., C. de Lorenzo, M.R. de Felipe, S. Rajalakshmi, A.J. Cordón, B.J. Thomas B.J. y F.R. Minchin. (1996). Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. Multolupa. *Journal. Experimental Botany*. Vivo A., 47:1709-1716.

- Fiasconaro, M. L., Gogorcena Y., Muñoz, F., Andueza D., Sánchez, M. y Antolína C., 2012. Effects of nitrogen source and water availability on stem carbohydrates and cellulosic bioethanol traits of alfalfa plants. *Plant Science* 191:16-23.
- Fundación Hidalgo Produce A.C. (enero de 2009). Recuperado el marzo de 2015, de <http://www.siac.org.mx/planeacion/AGENDA2009hgo.pdf>
- Gan Y., Stulen I., Keulen H. y Kuiper P.J.C. (2004). Low concentration of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N₂ fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DW g⁻¹ root dry weight) and specific N₂ fixation (N_{fixed} g⁻¹ root dry weight) in the soybean. *Plant and Soil* 258: 281-292.
- Hardy RW, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC. (1968). The acetylene ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43: 1185–1207.
- Hernández Martínez, J. L., Prado, B., Cayetano Salazar, M., Bischoff, W. A., y Siebe, C. (2016). Ammonium-nitrate dynamic in the critical zone during single irrigation events with untreated sewage effluents. *Soils Sediments*
- Hernández, J. L., Cubillos-Hinojosa, J. G. y Milan, P. E. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp. asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, 2(2): 52-58.
- Hernández Mendoza, E. (2009). Hernández Mendoza, E. A. (2009). Aislamiento e identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en la rizosfera de plantas tolerantes a metales pesados. Ciudad de México. Maestría. Instituto Politécnico Nacional.
- Hernández, Y. (1998). La fijación biológica del nitrógeno. *Rev Cubana de Ciencias Agrícola*, 32.
- Jamet, A., Sigaud, S., Van de Syde, G., Puppo, A., y Hérouart D., (2003). Expression of the Bacterial Catalase Genes During *Sinorhizobium meliloti*–*Medicago sativa* Symbiosis and their crucial role during the infection Process. *MPMI* 16(3): 217–225.
- Jimenez C., B., Siebe G., C., y Cifuentes G., E. (2004). El reúso internacional y no internacional del agua en el valle de Tula. En B. Jiménez, y L. Marín (Coord), *El agua en México visto desde la academia* (pp. 33-55). Ciudad de México: Academia mexicana de las ciencias.
- Juscáfresa, B. (1980). Forrajes fertilizantes y valor nutritivo, Barcelona : AEDO
- Laguerre, G., M. Nour, S., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., y Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* (147), 981-993.
- Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., 9 other authors (1998) *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. Nov., nitrogen-fixing bacterial that efficiently nodulate *Neptunia nantans* in Senegal. *Int J Syst Bacteriol* 48, 1277-1290
- León, A.R. (1991). Nueva Edafología, regiones tropicales y áreas templadas de México 2da edición corregida y aumentada. Fontamara S.A. México. pp 364

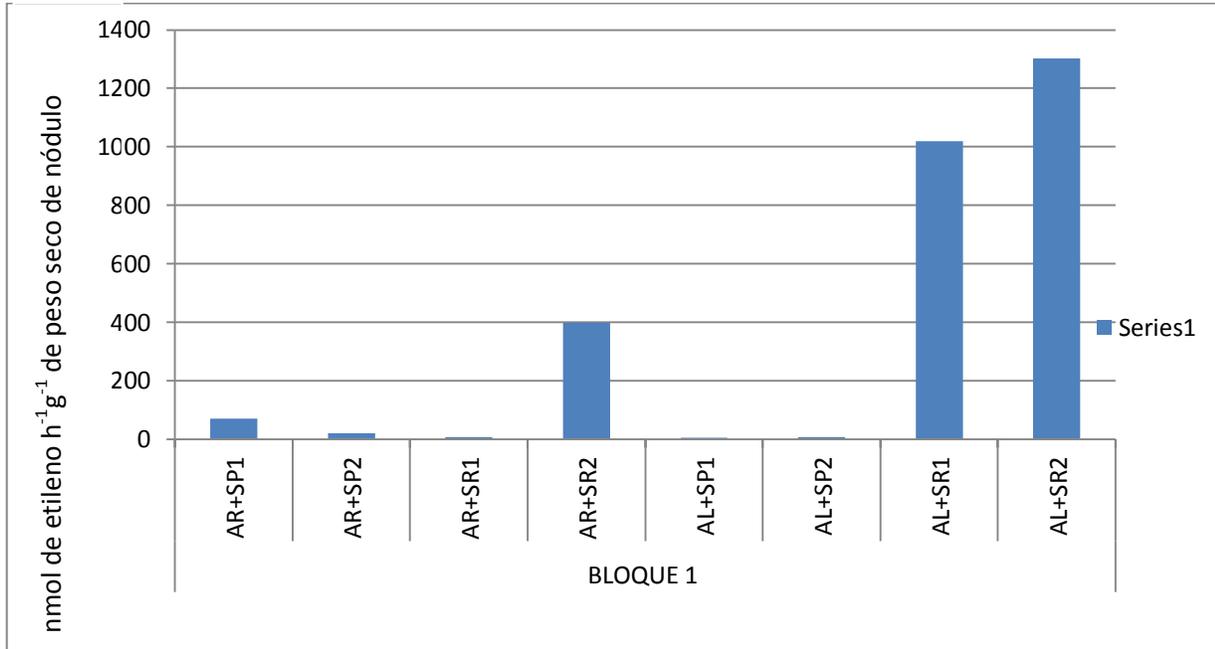
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J. C., y Denarie, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344:781-784.
- López Jurado, G., (1987). Efectos nutricionales sobre la nodulación y sobre la función del nódulo. *Ciencias agrícolas*, 10(3): 254-263.
- Maas, E.V. y G.J. Hoffman. (1977). Crop salt tolerance current assessment. *J. Irrig. Drain. Div. American Society of Civil Engineering* 103 (IR2): 115-134.
- Manahan, E. E. 2007. *Introducción a la química ambiental*. México: Reverte, S.
- Mara, D.D.(1978). *Sewage Treatment in Hot Climates*, John Wiley and Sons, Londres.
- Mayz, J. (1997). *Simbiosis Leguminosas/Rizobia*. Ediciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias IIAPUDO. Universidad de Oriente. Núcleo de Monagas. Maturín. Venezuela. 113 p.
- Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *UDO Agrícola* 4(1):1-20
- Méndez, C., Bilbao, B. (2015). Fijación simbiótica de nitrógeno en *Dimorphandramacrostachya* de los bosques del altiplano de la Guayana Venezolana. *Bosques* 36(2): 331-335.
- Monteiro, M. I.C., Ferreira, F. N., Oliveira, N. M. M. y Ávila, A. K.(2003). Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. *ELSEVIER, Acta* 477, pp. 125-129.
- Navarro Blaya, S., y Navarro García, G. (2003). *Química agrícola (Segunda edición ed.)*. Madrid: Mundi Prensa.
- Ojeda Ledesma, J. R. (05 de mayo de 2011). Alfalfa, negocio forrajero. Recuperado el 2016, de El economista: <http://eleconomista.com.mx/columnas/agro-negocios/2011/05/05/alfalfa-negocio-forrajero>
- Oliveira, Wladecir Salles de, Oliveira, Patrícia Perondi Anchão, Corsi, Moacyr, Duarte, Fábio Rodrigo Sanches, y Tsai, Siu Mui. (2004). Alfalfa yield and quality as function of nitrogen fertilization and symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. *Scientia Agrícola*, 61(4), 433-438. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000400013>
- Ondarza, R. N. (2006). *Biología moderna. La célula, bioquímica, genética y biología molecular, biología general*. Ciudad de México: Trillas.
- Pérez Acosta, G. R., Ramírez Cortina, C. R., Vázquez González, K. A., y Ortiz Gallarza, S. M. (s.f.). *Impacto al agro por los recursos hídricos en el Valle del Mezquital*, Hidalgo. México.
- Plevich, J. O., Delgado, A., Saroff, C., Tarico, J. C., Crespi, R. J., y Baroto, O. M. (2012). El cultivo de la alfalfa utilizando agua de perforación, agua residual y precipitaciones. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 1353-1358.
- Ramos, C. (1997) El uso de aguas residuales en riegos localizados y en cultivos hidropónicos. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. *Apdo. Oficial*, 46113 Moncada.

- Sangabriel, W., Ferrera Cerrato, R., Trejo Aguilar, D., Mendoza López, M., Cruz Sánchez, J., López Ortiz, C., y otros. (2006). Tolerancia y fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 22(2), 63-73.
- Santamaria , J., Figueroa, U., y Medina, M. (2004). Productividad de la alfalfa en condiciones de salinidad en el distrito de riego 017, comarca lagunera. *Terra, latinoamericana*, 22(3), 343-349.
- Savada, D., Heller, G., Orians, G., y Hillis, D. (2009). *Vida. La ciencia de la biología* (octava edición ed.). Madrid, España: Panamericana.
- Servicio de Información Agroalimentaria Y Pesquera (SIAP), 2007. Anuario estadístico de producción Agropecuaria. <http://www.siap.gob.mx/>
- Shearer, G., y D. H. Kohl.(1986). N₂ fixation in field settings -Estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Australian J. Plant Physiol.* 13: 699-756.
- Siebe, C., (1998). Nutrient inputs to soils and their uptake by alfalfa through long-term irrigation with untreated sewage effluent in México. *Soil Use Manage*, 13: 1-5.
- Siebe Grabach, C. (1994). Akkumulation, Mobilität and Verfügbarkeit von Schwermetallen in langjährig mit städtischen Abwässern bewässerten Böden in Zentralmexiko. Universität Hohenheim.
- Siebe, C., (1994) Acumulación y disponibilidad de metales pesados en suelos regados con agua residual en el distrito de riego 03, Tula Hidalgo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 10 (1) 15-21.
- Silva, J., Torres, P., y Madera, C.(2008). Reuso de aguas residuales domésticas en agricultura. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 26(2): 347-359.
- Sprent, J. I. y Sprent, P. (1990). *Nitrogen Fixing Organisms. Pure and Applied Aspects.* London, U.K.:Chapman-Hall. 256 p.
- Stan, V., Gament, E., Cornea, C., Voaides, C., Dusa, M. y Plopeanu, G. (2011). Effects of Heavy Metal from Polluted Soils on the Rhizobium Diversity. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(1), 88-95.
- Stougaard, J. (2000). Regulators and regulation of legume root nodule development. *PlantPhysiol.* 124:531-540.
- Tao Wang, E., Martínez Romero, J., y López Lara, I. M. (s.f.). *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. En CIFN, Microbios. Ciudad de México.
- Teuber, L.R., Levin, R.P., Sweeney, T.C.; Phillips, D.A.(1984). Selection for N concentration and forage yield in alfalfa. *Crop Science*, v.24, p.553-558,
- Urzua, H.(2005). Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. *Ciencias e Investigación Agraria*, 32(2): 133-150.
- Valencia Zapata, H. A.(2010). *Manual de prácticas de microbiología del suelo*, Bogotá: s.n.
- Valles de la Mora, B., G. Cadish y A. Aluja. (2002). Comparison of isotope methodologies to assess N₂ fixation and its fate in plants and soils. *Agrociencias* 37:117-128.

- Vázquez-Alarcón, A., Justin-Cajuste, L., Siebe-Grabach, C., y Alcántar-González, G. (2001). Cadmium, Nickel and concentrations in wastewater, soil and crops in the Mezquital Valley, Hidalgo, México. *Agrociencia*, 35(3): 267-274.
- Vivianco, R.A., F. Gavi., J. J. Peña y J. de J. Martínez (2001). Flujo de nitrógeno en suelo cultivado con forrajes y regado con agua residual urbana. *Terra* 19: 301-308.
- Wagner, A. (2005). Nitrattiefenverteilung von Rieselfeldböden MexikoCitys in Abhängigkeit von BodenundKultur, Diplomarbeit, TU Berlin (tesis de maestría, Universidad Técnica de Berlin).
- Zuberer, D. (1998). Biological Dinitrogen Fixation: Introduction and Nonsymbiotic. In principles and applications of soil microbiology. New Jersey: Prentice Hall.
- Zuñiga Lagunes, S. R., (2007). Análisis de amonio total. Método de azul de indofenol, Técnica estándar para microplaca.

Anexos

Anexo 1 Grafica de la actividad enzimática del bloque 1



Anexo 2. Supervivencia de las plantas de alfalfa divididos por bloques. Se reporta el número de plántulas en cada réplica y el porcentaje (Total de plántulas plantadas = 25).

	Tratamiento	R1	R2	Promedio	%
BLOQUE 1	AR+SP1	19	14	16.5	66
	AR+SP2	6	7	6.5	26
	AR+SR1	10	6	8.0	32
	AR+SR2	14	16	15.0	60
	AL+SP1	16	22	19.0	76
	AL+SP2	8	9	8.5	34
	AL+SR1	22	24	23.0	92
	AL+SR2	17	18	17.5	70
BLOQUE 2	AR+SP1	20	24	22.0	88
	AR+SP2	8	12	10.0	40
	AR+SR1	19	21	20.0	80
	AR+SR2	24	21	22.5	90
	AL+SP1	25	25	25.0	100
	AL+SP2	8	14	11.0	44
	AL+SR1	20	20	20.0	80
	AL+SR2	28	21	24.5	98

Agua residual (AR)

Agua de la llave (AL)

Suelos Cañada chica:

Suelo que ha sido regado con agua de pozo parcela 1 (SP1)

Suelo que ha sido regado con agua de pozo parcela 2(SP2)

Suelo Las palmas:

Suelo regado con agua residual parcela 1(SR1)

Suelo regado con agua residual parcela 2(SR2)

Anexo 3 . Altura de las plantas de alfalfa a los 40 días después del trasplante medida en centímetros

	Tratamiento	R1	R2	Promedio	Desviación
BLOQUE 1	AR+SP1	10.0	12.0	11.0	1.4
	AR+SP2	3.0	8.0	5.5	3.5
	AR+SR1	10.5	12.0	11.3	1.1
	AR+SR2	11.5	13.0	12.3	1.1
	AL+SP1	7.0	8.0	7.5	0.7
	AL+SP2	9.0	8.0	8.5	0.7
	AL+SR1	12.0	12.0	12.0	0.0
	AL+SR2	13.0	10.0	11.5	2.1
BLOQUE 2	AR+SP1	13.5	15.5	14.5	1.4
	AR+SP2	11.0	6.0	8.5	3.5
	AR+SR1	12.5	15.0	13.8	1.8
	AR+SR2	16.0	17.0	16.5	0.7
	AL+SP1	13.5	12.0	12.8	1.1
	AL+SP2	11.0	14.0	12.5	2.1
	AL+SR1	15.0	12.0	13.5	2.1
	AL+SR2	21.0	17.0	19.0	2.8

Anexo 4 . Altura de las plantas de alfalfa a los 60 días después del trasplante medida en centímetros

	Tratamiento	R1	R2	Promedio	Desviación
BLOQUE 1	AR+SP1	16	14	15.0	1.4
	AR+SP2	12	14	13.0	1.4
	AR+SR1	21	17	19.0	2.8
	AR+SR2	22.0	21.0	21.5	0.7
	AL+SP1	17.0	15.5	16.3	1.1
	AL+SP2	19.5	21.0	20.3	1.1
	AL+SR1	24.0	16.0	20.0	5.7
	AL+SR2	17.0	21.5	19.3	3.2
BLOQUE 2	AR+SP1	16	14	15.0	1.4
	AR+SP2	15	13	14.0	1.4
	AR+SR1	15	24	19.5	6.4
	AR+SR2	19	18	18.5	0.7
	AL+SP1	11	13	12.0	1.4
	AL+SP2	14	17	15.5	2.1
	AL+SR1	20	18	19.0	1.4
	AL+SR2	22	22	22.0	0.0

Anexo 5. Biomasa subterránea, peso total reflejado en gramos.

	Tratamiento	Repetición	1	2	3	4	5	6	7	Peso total (g)
BLOQUE 1	AR+SP1	R1	0.323	0.241	0.187	0.180				1.90
		R2	0.338	0.319	0.313					
	AR+SP2	R1	0.172							0.48
		R2	0.185	0.120						
	AR+SR1	R1	0.442	0.362	0.417					2.12
		R2	0.451	0.452						
	AR+SR2	R1	0.244	0.338	0.560	0.280				2.52
		R2	0.362	0.373	0.361					
	AL+SP1	R1	0.208	0.192	0.108					1.09
		R2	0.130	0.093	0.100	0.258				
	AL+SP2	R1	0.130	0.241						0.83
		R2	0.179	0.282						
	AL+SR1	R1	0.509	0.310	0.215	0.387	0.420	0.413	0.133	4.09
		R2	0.491	0.159	0.337	0.281	0.287	0.281		
AL+SR2	R1	0.503	0.362	0.336	0.654	0.391			3.76	
	R2	0.429	0.380	0.453	0.256					
BLOQUE 2	AR+SP1	R1	0.307	0.317	0.270	0.513				3.09
		R2	0.328	0.296	0.298	0.403	0.355			
	AR+SP2	R1	0.310	0.245						0.73
		R2	0.077	0.054	0.048					
	AR+SR1	R1	0.304	0.449	0.437	0.562				2.90
		R2	0.239	0.272	0.249	0.386				
	AR+SR2	R1	0.550	0.475	0.547	0.690	0.943			5.49
		R2	0.515	0.437	0.412	0.718	0.204			

AL+SP1	R1	0.365	0.315	0.289	0.254	0.204		2.49
	R2	0.208	0.238	0.216	0.220	0.183		
AL+SP2	R1	0.214	0.110					1.30
	R2	0.406	0.357	0.215				
AL+SR1	R1	0.442	0.338	0.362	0.492			3.22
	R2	0.194	0.383	0.356	0.650			
AL+SR2	R1	0.394	0.489	0.518	0.547	0.511	0.386	4.57
	R2	0.456	0.480	0.522	0.267			

Anexo 6. Biomasa aérea, peso total reflejado en gramos.

	Tratamiento	Repetición	Biomasa (g)	Peso total g
BLOQUE 1	AR+SP1	R1	2.19	3.81
		R2	1.62	
	AR+SP2	R1	0.34	1.15
		R2	0.81	
	AR+SR1	R1	3.01	4.64
		R2	1.63	
	AR+SR2	R1	3.21	5.88
		R2	2.67	
	AL+SP1	R1	1.52	2.78
		R2	1.26	
	AL+SP2	R1	1.07	2.07
		R2	1	
	AL+SR1	R1	3.07	6.41
		R2	3.34	
AL+SR2	R1	2.85	6.12	
	R2	3.27		
BLOQUE 2	AR+SP1	R1	2.457	5.172
		R2	2.715	
	AR+SP2	R1	1.097	1.994
		R2	0.897	
	AR+SR1	R1	3.635	7.187
		R2	3.552	
	AR+SR2	R1	4.681	8.996
		R2	4.315	
	AL+SP1	R1	2.955	5.19

	R2	2.235	
AL+SP2	R1	0.896	2.629
	R2	1.733	
AL+SR1	R1	3.54	5.726
	R2	2.186	
AL+SR2	R1	5.192	8.401
	R2	3.209	

Anexo 7. Peso de biomasa en nódulos , peso total representado en gramos.

	Tratamiento	Repetición	1	2	3	4	5	6	7	Peso total g	
BLOQUE 1	AR+SP1	R1	0.0061	0.0014	0.0011	0.0016				0.017	
		R2	0.0016	0.0024	0.003						
	AR+SP2	R1	0.0007								0.002
		R2	0.0001	0.0009							
	AR+SR1	R1	0.006	0.0076	0.0048						0.023
		R2	0.0025	0.002							
	AR+SR2	R1	0.0032	0.0013	0.0026	0.003					0.015
		R2	0.0025	0.0009	0.0016						
	AL+SP1	R1	0.0024	0.0015	0.0004	0.0001					0.013
		R2	0.0017	0.0019	0.0023	0.0024					
	AL+SP2	R1	0.0005	0.0001							0.006
		R2	0.0055								
	AL+SR1	R1	0.0086	0.0079	0.0093	0.0084	0.0095	0.0097	0.0028		0.094
		R2	0.0087	0.0047	0.0058	0.0079	0.0049	0.0059			
AL+SR2	R1	0.0071	0.0065	0.0036	0.0106	0.0057				0.059	
	R2	0.0082	0.0063	0.0073	0.0036						
BLOQUE 2	AR+SP1	R1	0.0012	0.0006	0.0023	0.0018					0.027
		R2	0.0021	0.0052	0.0036	0.0034	0.0071				
	AR+SP2	R1	0.0018	0.0011							0.016
		R2	0.005	0.008	0.0001						
	AR+SR1	R1	0.0018	0.0036	0.005	0.0043					0.021
		R2	0.001	0.003	0.0011	0.0014					
	AR+SR2	R1	0.0086	0.0045	0.0041	0.0088					0.043
		R2	0.0053	0.0045	0.0032	0.0027	0.0011				

AL+SP1	R1	0.0038	0.0023	0.0049	0.0015	0.003	0.025	
	R2	0.003	0.0007	0.0008	0.0037	0.0015		
AL+SP2	R1	0.0047	0.0011				0.019	
	R2	0.0043	0.0063	0.0025				
AL+SR1	R1	0.006	0.007	0.0116	0.0077		0.037	
	R2	0.0013	0.001	0.0001	0.0022			
AL+SR2	R1	0.0072	0.0075	0.0118	0.0211	0.0162	0.0061	0.114
	R2	0.0135	0.0136	0.011	0.0057			

Anexo 8. Porcentaje de carbono en biomasa aérea.

	Tratamiento	1	2	3	4	Promedio	Desviación
BLOQUE 1	AR+SP1	39.84	39.48	40.87	40.79	40.2	0.7
	AR+SP2	39.17	39.20	40.50	40.14	39.8	0.7
	AR+SR1	29.41	29.08	39.86	40.10	34.6	6.2
	AR+SR2	40.76	40.64	40.46	40.28	40.5	0.2
	AL+SP1	41.22	40.99	40.61	40.41	40.8	0.4
	AL+SP2	39.40	39.37	40.48	40.22	39.9	0.6
	AL+SR1	40.62	40.01	42.02	41.62	41.1	0.9
	AL+SR2	41.48	41.30	41.70	41.76	41.6	0.2
BLOQUE 2	AR+SP1	39.61	39.69	38.98	38.95	39.3	0.4
	AR+SP2	32.31	32.25	36.40	36.47	34.4	2.4
	AR+SR1	35.17	35.40	40.41	40.31	37.8	2.9
	AR+SR2	37.05	36.93	36.84	36.73	36.9	0.1
	AL+SP1	35.75	35.80	40.80	40.35	38.2	2.8
	AL+SP2	38.53	38.49	41.40	41.27	39.9	1.6
	AL+SR1	41.25	41.43	40.97	41.22	41.2	0.2
	AL+SR2	39.81	39.93	40.60	40.51	40.2	0.4

Anexo 9. Porcentaje de Nitrógeno en biomasa aérea

	Tratamiento	1	2	3	4	Promedio	Desviación
BLOQUE 1	AR+SP1	3.93	3.86	4.14	4.16	4.02	0.2
	AR+SP2	4.62	4.73	4.30	4.22	4.47	0.2
	AR+SR1	3.49	3.47	4.41	4.44	3.95	0.5
	AR+SR2	4.14	4.12	4.07	4.11	4.11	0.0
	AL+SP1	4.35	4.43	4.27	4.09	4.29	0.1
	AL+SP2	3.83	3.91	4.00	4.08	3.95	0.1
	AL+SR1	4.13	3.82	4.39	4.15	4.13	0.2
	AL+SR2	3.69	3.73	3.86	4.00	3.82	0.1
BLOQUE 2	AR+SP1	3.94	3.94	3.70	3.74	3.83	0.1
	AR+SP2	3.03	3.03	3.89	3.91	3.47	0.5
	AR+SR1	3.45	3.45	3.77	3.79	3.62	0.2
	AR+SR2	3.54	3.56	3.42	3.43	3.49	0.1
	AL+SP1	3.25	3.25	3.62	3.57	3.42	0.2
	AL+SP2	3.01	3.02	3.70	3.72	3.36	0.4
	AL+SR1	2.62	2.72	2.58	2.61	2.63	0.1
	AL+SR2	3.67	3.70	3.79	3.81	3.74	0.1

Anexo 10. Porcentaje de Carbono y Nitrógeno disponible en los diferentes suelos.

S	% C total		PROMEDIO	% N total		PROMEDIO
SP 1	3.05	3.03	3.04	0.22	0.21	0.21
SP 2	2.43	2.47	2.45	0.16	0.16	0.16
SR 1	2.56	2.55	2.56	0.25	0.25	0.25
SR 2	2.81	2.80	2.80	0.28	0.28	0.28

Anexo 11. Concentración de NO₃ del Bloque 1, expresado en mg /kg.

BLOQUE 1							
Etiqueta	abs	dilucion	(mg/l)	NO3 (mg/kg) corregid	peso suelo seco (g)	NO ₃ (mg/kg) Promedio	desv
AR+SP1	0.042	5	4.2	50.95	8.22	96.2	41.7
	0.087	5	8.6	104.51	8.22		
	0.111	5	10.9	133.08	8.22		
AR+SP1	0.075	5	7.4	90.41	8.20	72.5	30.0
	0.031	5	3.1	37.93	8.20		
	0.074	5	7.3	89.22	8.20		
AR+SP2	0.163	5	16.0	187.38	8.55	179.4	24.5
	0.132	5	13.0	151.92	8.55		
	0.173	5	17.0	198.82	8.55		
AR+SP2	0.245	5	24.1	269.07	8.94	168.0	87.6
	0.103	5	10.2	113.63	8.94		
	0.11	5	10.8	121.29	8.94		
AR+SR1	0.03	5	3.0	42.20	7.14	43.1	20.6
	0.046	5	4.6	64.12	7.14		
	0.016	5	1.6	23.02	7.14		
AR+SR1	0.035	5	3.5	45.94	7.62	70.3	49.4
	0.112	5	11.0	144.76	7.62		
	0.073	5	7.2	94.71	7.62		
AR+SR2	0.025	5	2.5	33.10	7.63	65.2	45.7
	0.094	5	9.3	121.63	7.63		
	0.075	5	7.4	97.25	7.63		
AR+SR2	0.042	5	4.2	54.79	7.64	57.3	24.4
	0.026	5	2.6	34.31	7.64		

	0.064	5	6.3	82.95	7.64		
AL+SP1	0.068	5	6.7	81.92	8.22	87.1	24.8
	0.054	5	5.4	65.25	8.22		
	0.095	5	9.4	114.06	8.22		
AL+SP1	0.063	5	6.2	71.65	8.71	82.9	11.8
	0.072	5	7.1	81.76	8.71		
	0.084	5	8.3	95.24	8.71		
AL+SP2	0.032	5	3.2	37.03	8.67	31.8	15.4
	0.038	5	3.8	43.80	8.67		
	0.012	5	1.3	14.45	8.67		
AL+SP2	0.054	5	5.4	59.60	9.00	79.7	46.9
	0.14	5	13.8	153.15	9.00		
	0.091	5	9.0	99.85	9.00		
AL+SR1	0.027	5	2.7	36.50	7.45	48.8	14.0
	0.034	5	3.4	45.69	7.45		
	0.048	5	4.8	64.07	7.45		
AL+SR1	0.025	5	2.5	31.14	8.11	27.5	3.6
	0.019	5	1.9	23.90	8.11		
	0.022	5	2.2	27.52	8.11		
AL+SR2	0.023	5	2.3	32.49	7.17	39.8	6.5
	0.032	5	3.2	44.78	7.17		
	0.03	5	3.0	42.05	7.17		
AL+SR2	0.034	5	3.4	46.18	7.37	46.6	16.6
	0.047	5	4.7	63.43	7.37		
	0.022	5	2.2	30.26	7.37		

Anexo 12. Concentración de NO₃ del Bloque 2, expresado en mg /kg.

BLOQUE 2							
Etiqueta	abs	dilución	(mg/l)	NO ₃ (mg/kg) corregido	peso suelo seco (g)	NO ₃ (mg/kg) Promedio	desv
AR+SP1	0.033	2	1.3	17.93	7.38	34.54	20.30
	0.107	2	4.2	57.17	7.38		
	0.053	2	2.1	28.53	7.38		
AR+SP1	0.137	2	5.4	71.91	7.5	51.21	30.17
	0.124	2	4.9	65.13	7.5		
	0.031	2	1.2	16.59	7.5		
AR+SP2	0.13	2	5.1	68.26	7.4	94.79	50.25
	0.288	2	11.3	152.75	7.4		
	0.119	2	4.7	63.36	7.4		
AR+SP2	0.121	2	4.8	64.42	7.57	57.25	7.19
	0.11	2	4.3	57.29	7.57		
	0.096	2	3.8	50.05	7.57		
AR+SR1	0.036	2	1.4	19.03	6.59	15.77	3.34
	0.026	2	1.0	15.92	6.59		
	0.02	2	0.8	12.35	6.59		
AR+SR1	0.008	2	0.3	5.23	6.38	6.57	2.18
	0.014	2	0.6	9.08	6.38		
	0.008	2	0.3	5.40	6.38		
AR+SR2	0.039	2	1.6	24.42	6.89	24.54	3.69
	0.049	2	1.9	28.29	6.89		
	0.036	2	1.4	20.90	6.89		
AR+SR2	0.033	2	1.3	19.20	7	16.95	2.40
	0.025	2	1.0	14.43	7		

	0.03	2	1.2	17.22	7		
AL+SP1	0.038	2	1.5	21.69	8.25	14.60	6.15
	0.022	2	0.9	10.82	8.25		
	0.023	2	0.9	11.29	8.25		
AL+SP1	0.034	2	1.4	16.51	8.58	17.30	0.82
	0.039	2	1.6	18.16	8.58		
	0.037	2	1.5	17.24	8.58		
AL+SP2	0.038	2	1.5	17.70	7.8	17.88	1.51
	0.032	2	1.3	16.46	7.8		
	0.038	2	1.5	19.47	7.8		
AL+SP2	0.032	2	1.3	16.46	8.12	13.94	4.22
	0.018	2	0.7	9.06	8.12		
	0.033	2	1.3	16.29	8.12		
AL+SR1	0.032	2	1.3	15.81	6.61	19.20	3.60
	0.031	2	1.2	18.83	6.61		
	0.038	2	1.5	22.97	6.61		
AL+SR1	0.017	2	0.7	10.54	6.63	10.52	1.77
	0.02	2	0.8	12.28	6.63		
	0.014	2	0.6	8.74	6.63		
AL+SR2	0.037	2	1.5	22.31	6.82	20.94	1.22
	0.034	2	1.4	19.97	6.82		
	0.035	2	1.4	20.55	6.82		
AL+SR2	0.029	2	1.2	17.10	6.6	14.71	3.15
	0.018	2	0.7	11.15	6.6		
	0.026	2	1.0	15.89	6.6		

Anexo 13. Concentración de NH₄ del Bloque 1, expresado en mg/kg)

BLOQUE 1						
Etiqueta	KCL 2M	NH ₄	NH ₄ (mg/kg)	peso suelo seco (g)	NH ₄ prom (mg/kg)	desv
	abs	con (mg/l)				
AR+SP1	0.122	0.17	2.05	8.22	1.9	0.32
	0.095	0.13	1.58	8.22		
	0.13	0.18	2.19	8.22		
AR+SP1	0.223	0.31	3.81	8.20	3.4	0.34
	0.187	0.26	3.18	8.20		
	0.192	0.27	3.27	8.20		
AR+SP2	0.221	0.31	3.62	8.55	2.9	0.73
	0.134	0.19	2.17	8.55		
	0.174	0.24	2.83	8.55		
AR+SP2	0.19	0.27	2.97	8.94	2.8	0.22
	0.184	0.26	2.87	8.94		
	0.164	0.23	2.55	8.94		
AR+SR1	0.111	0.15	2.14	7.14	2.0	0.24
	0.112	0.15	2.16	7.14		
	0.091	0.12	1.74	7.14		
AR+SR1	0.131	0.18	2.38	7.62	2.5	0.45
	0.12	0.17	2.17	7.62		
	0.166	0.23	3.03	7.62		
AR+SR2	0.099	0.14	1.78	7.63	2.2	0.36
	0.138	0.19	2.51	7.63		
	0.12	0.17	2.17	7.63		
AR+SR2	0.111	0.15	2.00	7.64	2.5	1.05

	0.105	0.14	1.89	7.64		
	0.205	0.29	3.75	7.64		
AL+SP1	0.143	0.20	2.41	8.22	2.2	0.23
	0.119	0.16	2.00	8.22		
	0.122	0.17	2.05	8.22		
AL+SP1	0.273	0.38	4.40	8.71	4.0	0.66
	0.202	0.28	3.24	8.71		
	0.27	0.38	4.35	8.71		
AL+SP2	0.144	0.20	2.30	8.67	2.1	0.18
	0.122	0.17	1.94	8.67		
	0.129	0.18	2.06	8.67		
AL+SP2	0.417	0.59	6.54	9.00	6.6	0.91
	0.361	0.51	5.66	9.00		
	0.476	0.67	7.48	9.00		
AL+SR1	0.103	0.14	1.90	7.45	2.2	0.29
	0.133	0.18	2.47	7.45		
	0.114	0.16	2.11	7.45		
AL+SR1	0.164	0.23	2.81	8.11	3.0	0.19
	0.185	0.26	3.18	8.11		
	0.172	0.24	2.96	8.11		
AL+SR2	0.387	0.55	7.61	7.17	6.2	1.28
	0.285	0.40	5.59	7.17		
	0.268	0.38	5.25	7.17		
AL+SR2	0.242	0.34	4.60	7.37	3.7	0.94
	0.196	0.27	3.71	7.37		
	0.145	0.20	2.73	7.37		

Anexo 14. Concentración de NH₄ del Bloque 2, expresado en mg/kg)

BLOQUE 2						
Etiqueta	KCL 2M	NH4	NH₄ (mg/kg)	peso suelo seco (g)	NH₄ prom (mg/kg)	desv
AR+SP1	0.147	0.18	2.49	7.38	1.9	1.34
	0.161	0.21	2.83	7.38		
	0.059	0.03	0.35	7.38		
AR+SP1	0.063	0.03	0.44	7.5	1.0	0.48
	0.103	0.10	1.40	7.5		
	0.089	0.08	1.06	7.5		
AR+SP2	0.069	0.04	0.59	7.4	1.9	1.89
	0.083	0.07	0.93	7.4		
	0.211	0.30	4.03	7.4		
AR+SP2	0	-0.08	-1.05	7.57	-0.8	0.46
	0.034	-0.02	-0.25	7.57		
	0	-0.08	-1.05	7.57		
AR+SR1	0.124	0.14	2.16	6.59	1.7	0.83
	0.07	0.05	0.69	6.59		
	0.122	0.14	2.11	6.59		
AR+SR1	0.141	0.17	2.71	6.38	3.2	0.71
	0.144	0.18	2.79	6.38		
	0.186	0.25	3.97	6.38		
AR+SR2	0.061	0.03	0.43	6.89	0.6	0.12
	0.069	0.04	0.64	6.89		
	0.069	0.04	0.64	6.89		
AR+SR2	0.028	-0.03	-0.42	7	0.1	0.93
	0.091	0.08	1.19	7		

	0.028	-0.03	-0.42	7		
AL+SP1	0.006	-0.07	-0.83	8.25	0.0	0.92
	0.083	0.07	0.84	8.25		
	0.014	-0.05	-0.66	8.25		
AL+SP1	0.097	0.09	1.10	8.58	0.6	0.87
	0.097	0.09	1.10	8.58		
	0.025	-0.03	-0.40	8.58		
AL+SP2	0.055	0.02	0.24	7.8	1.0	0.81
	0.08	0.06	0.82	7.8		
	0.125	0.14	1.85	7.8		
AL+SP2	0.013	-0.06	-0.69	8.12	0.0	0.31
	0.041	-0.01	-0.07	8.12		
	0.022	-0.04	-0.49	8.12		
AL+SR1	0.056	0.02	0.31	6.61	0.3	0.22
	0.049	0.01	0.12	6.61		
	0.065	0.04	0.56	6.61		
AL+SR1	0.059	0.03	0.39	6.63	0.2	0.48
	0.032	-0.02	-0.33	6.63		
	0.066	0.04	0.58	6.63		
AL+SR2	0.1	0.10	1.46	6.82	0.1	1.28
	0.034	-0.02	-0.27	6.82		
	0.005	-0.07	-1.03	6.82		
AL+SR2	0.047	0.00	0.07	6.6	0.0	0.65
	0.016	-0.05	-0.77	6.6		
	0	-0.08	-1.20	6.6		

Anexo 15. Actividad enzimatica de la nitrogenasa bloque 2

Clave	Tiempo min	Area	Total	Ajuste	Blanco	Minutos	X 0.0039	Peso seco	Act. Espec	# plantas	ACT/#plantas	Promedio	Desv
1AR+Sp1	37	854	631975	1351.31928	1351.31928	36.5221426	0.14243636	0.0023	61.9	5	12.4	11.7	2.5
1AR+Sp1	33	654	615087	1063.26422	1063.26422	32.2201279	0.1256585	0.0018	69.8	5	14.0		
2AR+Sp1	39	996	680792	1463.00192	1463.00192	37.5128696	0.14630019	0.0021	69.7	5	13.9		
2AR+Sp1	41	1529	624391	2448.7861	2448.7861	59.7264902	0.23293331	0.0052	44.8	5	9.0		
2AR+Sp1	45	1024	575734	1778.59914	1778.59914	39.5244254	0.15414526	0.0034	45.3	5	9.1		
5AR+Sp2	49	781	599856	1301.97914	1301.97914	26.5710029	0.10362691	0.0018	57.6	5	11.5	10.2	1.4
5AR+Sp2	52	379	818228	463.196077	463.196077	8.90761687	0.03473971	0.0011	31.6	3	10.5		
6AR+Sp2	54	202	670329	301.344564	301.344564	5.58045488	0.02176377	0.0005	43.5	5	8.7		
9AR+SR1	60	1661	559023	2971.25521	2971.25521	49.5209201	0.19313159	0.0018	107.3	5	21.5	21.3	2.5
9AR+SR1	70	5422	710302	7633.37285	7633.37285	109.048184	0.42528792	0.0043	98.9	4	24.7		
10AR+SR1	72	1021	585018	1745.24545	1745.24545	24.2395201	0.09453413	0.001	94.5	5	18.9		
10AR+SR1	74	3751	658551	5695.83829	5695.83829	76.9707877	0.30018607	0.003	100.1	5	20.0		
13AR+SR2	82	5844	490130	11923.3673	11923.3673	145.406918	0.56708698	0.0041	138.3	5	27.7	27.6	4.1
13AR+SR2	80	14737	730104	20184.7956	20184.7956	252.309945	0.98400879	0.0088	111.8	5	22.4		
14AR+SR2	93	14019	817922	17139.7762	17139.7762	184.298668	0.71876481	0.0045	159.7	5	31.9		
14AR+SR2	95	7517	776813	9676.71756	9676.71756	101.860185	0.39725472	0.0032	124.1	4	31.0		
14AR+SR2	97	7187	864359	8314.83215	8314.83215	85.719919	0.33430768	0.0027	123.8	5	24.8		
17AI+Sp1	102	3733	670218	5569.82952	5569.82952	54.6061717	0.21296407	0.0038	56.0	5	11.2	12.8	3.6
17AI+Sp1	107	6998	882141	7932.97217	7932.97217	74.1399268	0.28914571	0.0049	59.0	5	11.8		
17AI+Sp1	110	1416	791684	1788.59242	1788.59242	16.2599311	0.06341373	0.0015	42.3	5	8.5		
18AI+Sp1	125	8649	957953	9028.62667	9028.62667	72.2290133	0.28169315	0.0037	76.1	5	15.2		
18AI+Sp1	128	3216	744956	4317.03349	4317.03349	33.7268241	0.13153461	0.0015	87.7	5	17.5		
21AI+Sp2	137	7620	683569	11147.375	11147.375	81.3677009	0.31733403	0.0047	67.5	5	13.5	17.0	3.1
22AI+Sp2	130	8983	643371	13962.3949	13962.3949	107.403038	0.41887185	0.0043	97.4	5	19.5		
22AI+Sp2	132	10897	714340	15254.6406	15254.6406	115.565459	0.45070529	0.0063	71.5	4	17.9		
25AI+SR1	120	14584	945612	15422.8161	15422.8161	128.523468	0.50124152	0.006	83.5	5	16.7	14.9	2.4
25AI+SR1	122	14046	795735	17651.6051	17651.6051	144.685288	0.56427262	0.007	80.6	5	16.1		
25AI+SR1	125	19262	836452	23028.2192	23028.2192	184.225754	0.71848044	0.0116	61.9	5	12.4		
25AI+SR1	127	14689	681687	21548.0125	21548.0125	169.66939	0.66171062	0.0077	85.9	5	17.2		
26AI+SR1	130	2034	766887	2652.28124	2652.28124	20.4021634	0.07956844	0.0013	61.2	5	12.2		
29AI+SR2	140	9313	529405	17591.447	17591.447	125.653193	0.49004745	0.0075	65.3	5	13.1	12.6	0.9
29AI+SR2	142	25723	1070965	24018.5253	24018.5253	169.144545	0.65966372	0.0118	55.9	5	11.2		
29AI+SR2	144	25411	528748	48058.8106	48058.8106	333.74174	1.30159279	0.0211	61.7	5	12.3		
29AI+SR2	148	6710	798726	8400.8784	8400.8784	56.7626919	0.2213745	0.0061	36.3	3	12.1		
30AI+SR2	150	21784	638904	34095.8892	34095.8892	227.305928	0.88649312	0.0135	65.7	5	13.1		
30AI+SR2	155	21552	720683	29904.9652	29904.9652	192.935259	0.75244751	0.011	68.4	5	13.7		