



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

**ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y DINÁMICA MICROBIANA DE SUELOS AGRÍCOLAS
DEPENDIENTES DE LA CALIDAD DEL PULSO HIDRÁULICO EN EL ALBERTO,
IXMIQUILPAN, HIDALGO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VIRIDIANA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM
DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., OCTUBRE, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

**ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y DINÁMICA MICROBIANA DE SUELOS AGRÍCOLAS
DEPENDIENTES DE LA CALIDAD DEL PULSO HIDRÁULICO EN EL ALBERTO,
IXMIQUILPAN, HIDALGO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VIRIDIANA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM
DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/406/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Evolutiva, Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **18 de mayo de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Ecología** de la estudiante **MARTÍNEZ MARTÍNEZ VIRIDIANA** con número de cuenta **308124334** con la tesis titulada "**Estructura, función y dinámica microbiana de suelos agrícolas dependientes de la calidad del pulso hidráulico en el Alberto, Ixmiquilpan, Hidalgo**", realizada bajo la dirección de la **DRA. NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DRA. SILKE CRAM HEYDRICH**
Vocal: **DRA. MARÍA GUADALUPE BARAJAS GUZMÁN**
Secretario: **DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA**
Suplente: **DRA. MARÍA SOLEDAD VÁSQUEZ MURRIETA**
Suplente: **DR. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 02 de octubre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por brindarme la oportunidad de continuar mi preparación profesional dentro de su programa de estudios a nivel de Maestría, en espacios y con académicos de excelente nivel.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el periodo 2017 – 2019.

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT IN224716) por el financiamiento del proyecto.

A la Dra. Nathalie Cabirol, mi tutora, a quien quiero reconocer y agradecer especialmente, por brindarme atinados consejos y observaciones además de su apoyo, tiempo y conocimiento necesario y enriquecedor para guiarme a la culminación de este proyecto.

A la Dra. Irma Aurora Rosas Pérez y a la Dra. María del Pilar Ortega Larrocea, miembros del Comité Tutoral, quienes me apoyaron sabiamente durante el desarrollo del proyecto en su estructuración aportando comentarios constructivos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis hermanas, por estar siempre para mí, ofreciendo apoyo, cariño y cuidado. Gracias por ser un soporte en el que puedo acudir en cualquier momento o situación.

A mis tías Cecy y Agus, por ser segundas madres para mí, brindando apoyo y cariño durante tanto tiempo.

A mis amigos, por motivar, a veces “forzar” y sobre todo por las risas en alusión a mí y a este proyecto, mitigando cualquier duda.

Al grupo de trabajo de Ecología Microbiana Funcional del Suelo y Protección Ambiental de la Facultad de Ciencias por permitirme formar parte de él.

Al Dr. Marcelo Rojas Oropeza, por mostrarme un área totalmente desconocida para mí. Además de fomentar siempre la observación e intercomunicación. También, agradecer la formación y acompañamiento en los muestreos tanto de suelos como de las aguas de riego.

A las autoridades de El Alberto, por brindarme la autorización y apoyo en la obtención de muestras esenciales para el presente proyecto. En especial a Miguel Agustín, Rosalío García Simón y Mario Pérez Benítez dueños de las parcelas agrícolas usadas.

A Bety y Toño, de El Alberto, por abrir su casa y permitir nuestro alojamiento durante las jornadas de muestreo.

A Mariana González Macedo, miembro del equipo de trabajo, por brindarme su apoyo en las jornadas de muestreo y en el trabajo de campo. También, agradecerle por la compañía y amistad, resultante de las largas jornadas de trabajo en el laboratorio.

A Arantza Becerril, Marco Córdoba, Kevin y Jessica por su apoyo en distintas jornadas de muestreo.

A la Dra. Laura Delgado Balbuena, a la M. en C. Hortencia Guarneros Manoatl y a Cinthia Pasindo Pompa por la asesoría en el muestro y análisis de suelos.

A la LCT. Victoria Andrea Ortega Morgado, por el asesoramiento en la capacitación del uso del multiparamétrico portátil.

A la M. en C. María del Socorro Galicia Palacios por la capacitación experimental para los análisis de materia orgánica y nitrógeno total en suelos.

Al Dr. Marco Luna Guido del Laboratorio de Ecología de Suelos del CINVESTAV, por el apoyo técnico en la cuantificación de amonio, nitrato y nitrito en suelos.

A la Dra. Rosalía Ramos Bello, por la determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) en suelos.

DEDICATORIA

En memoria a mi mamá

Por ser un ejemplo de entrega total a cualquier meta. Por tu eterno cariño que siempre acompaña a la familia.

A mi papá

Por su total apoyo y comprensión incondicional durante toda la vida, más aún en esta etapa de crecimiento. Sin duda alguna, su ejemplo de dedicación ha sido fundamental para cualquier logro obtenido.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	I
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	6
<i>El suelo</i>	6
<i>Fertilidad, calidad y salud del suelo</i>	7
<i>Ecología microbiana en suelos</i>	8
<i>Ecología microbiana en agua</i>	10
<i>Calidad de agua</i>	11
<i>Estudio de comunidades microbianas</i>	12
<i>Técnicas moleculares en el estudio de la estructura microbiana</i>	12
Técnicas de huella genética (fingerprinting)	14
<i>Ciclo del nitrógeno</i>	18
<i>Generalidades</i>	18
<i>Comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno y nitrificantes</i>	20
ANTECEDENTES	21
<i>Reutilización de aguas residuales</i>	21
<i>Comunidades microbianas en suelos agrícolas con riego</i>	23
Estudios microbianos en suelos con riego con agua residual a nivel mundial	23
<i>Comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno y nitrificantes en suelos con riego</i>	25
<i>Valle del Mezquital</i>	25
<i>Recurso hídrico en la actividad agrícola</i>	27
<i>Río Tula</i>	29
Estudios microbianos en el Valle del Mezquital	29
<i>El Alberto</i>	30
JUSTIFICACIÓN	32
OBJETIVOS	33
<i>Objetivo general</i>	33
<i>Objetivos particulares</i>	33
HIPÓTESIS	34
METODOLOGÍA	35

Muestreo	35
Suelos	35
Aguas de riego	37
Caracterización fisicoquímica de suelos y aguas de riego	40
Fertilidad de suelos	40
Calidad de las aguas de riego	41
Análisis de datos fisicoquímicos	42
Estructura y dinámica microbiana	42
Extracción de DNA total	42
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	43
Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura (TGGE)	45
Análisis de datos de huella genética	45
RESULTADOS	47
Fertilidad de suelos	47
Calidad de las aguas de riego	49
Estructura y dinámica microbiana	54
Estructura y dinámica total	54
Dominio Bacteria: RNAr 16S	54
Dominio Archaea: RNAr 16S	59
Estructura y dinámica funcional	63
Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN): <i>nifH</i>	63
Bacterias oxidantes de amonio (BOA): <i>amoA</i>	67
DISCUSIÓN	71
Fertilidad de suelos	71
Calidad de las aguas de riego	75
Estructura y dinámica microbiana	77
Estructura y dinámica total	78
Dominio Bacteria: RNAr 16S	78
Dominio Archaea: RNAr 16S	80
Estructura y dinámica funcional	81
Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN): <i>nifH</i>	81
Bacterias oxidantes de amonio (BOA): <i>amoA</i>	84
CONCLUSIONES	87
CONSIDERACIONES FINALES	88
REFERENCIAS	89
ANEXOS	101

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1 Estudios microbianos en ambientes acuáticos.</i>	10
<i>Tabla 2 Indicadores de calidad de agua.</i>	11
<i>Tabla 3. Comparación entre técnicas de huella genética y técnicas de secuenciación de nueva generación.</i>	14
<i>Tabla 4 Estudios del efecto del uso de aguas residuales en suelos agrícolas.</i>	24
<i>Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos elegidos como indicadores de fertilidad.</i>	40
<i>Tabla 6. Parámetros de calidad de agua elegidos.</i>	41
<i>Tabla 7 Cabadores específicos empleados en las PCRs para los genes de interés.</i>	44
<i>Tabla 8. Condiciones de PCR para cada gen de estudio.</i>	44
<i>Tabla 9. Gradientes de temperatura empleados en TGGE</i>	45
<i>Tabla 10 Parámetros fisicoquímicos indicadores de fertilidad para el suelo sin riego y los suelos regados con diferentes aguas de riego.</i>	47
<i>Tabla 11. Mediciones de los parámetros de calidad en las aguas de riego para uso agrícola en El Alberto.</i>	51
<i>Tabla 12 Riqueza ponderada por rango (Rr) para las aguas de riego y suelos en ambos tiempos de estudio.</i>	55

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 Funciones y servicios ecosistémicos del suelo.</i>	6
<i>Figura 2 Esquema general de las herramientas de estudio empleadas en la ecología microbiana.</i>	13
<i>Figura 3 Esquema general de la técnica de electroforesis en gel con gradiente de temperatura.</i>	16
<i>Figura 4 Ciclo del nitrógeno.</i>	18
<i>Figura 5 Climas del estado de Hidalgo.</i>	26
<i>Figura 6 Principales componentes del sistema de riego en el Valle del Mezquital.</i>	28
<i>Figura 7 Ubicación de El Alberto.</i>	31
<i>Figura 8 Esquema de trabajo para este proyecto de investigación.</i>	35
<i>Figura 9 Aspecto del estado de cada suelo estudiado para el tiempo antes del riego (izquierda) y después del riego (derecha).</i>	36
<i>Figura 10 Aspecto del sitio de muestreo para cada agua de riego.</i>	38
<i>Figura 11 Sitios de muestreo.</i>	39
<i>Figura 12 a) Porcentaje de materia orgánica en suelos. b) Porcentajes de nitrógeno total en suelos.</i>	48
<i>Figura 13 a) Concentraciones de amonio en suelos b) concentración de nitrato en suelos.</i>	49
<i>Figura 14 Concentración de nitrógeno amoniacal en las tres aguas de riego.</i>	52
<i>Figura 15 Concentración de nitrato en las tres aguas de riego.</i>	52
<i>Figura 16 a) Oxígeno disuelto presente en las tres aguas de riego. b) Demanda química de oxígeno para las tres aguas de riego.</i>	53
<i>Figura 17 Perfil de huella genética en geles de poliacrilamida generados por TGGE para el dominio Bacteria usando el gen RNAr 16S.</i>	56
<i>Figura 18 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs bacterianos del gen RNAr 16S de las aguas de riego.</i>	57
<i>Figura 19 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs bacterianos del gen RNAr 16S de los suelos de El Alberto para el tiempo antes del riego y las aguas de riego.</i>	57
<i>Figura 20 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs bacterianos del gen RNAr 16S de los suelos de El Alberto para el tiempo después del riego y las aguas de riego.</i>	58
<i>Figura 21 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs bacterianos del gen RNAr 16S de los suelos de El Alberto para ambos tiempos (antes y después del riego) y las aguas de riego.</i>	58
<i>Figura 22 Perfil de huella genética en geles de poliacrilamida generados por TGGE para el dominio Archaea usando el gen RNAr 16S.</i>	60
<i>Figura 23 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para arquea usando RNAr 16S de las aguas de riego.</i>	61

<i>Figura 24 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para arquea usando RNAr 16S de los suelos de El Alberto para el tiempo antes del riego y las aguas de riego.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 25 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para arquea usando RNAr 16S de los suelos de El Alberto para el tiempo después del riego y las aguas de riego.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 26 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para arquea usando RNAr 16S de los suelos de El Alberto de ambos tiempos (antes y después del riego) y las aguas de riego.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 27 Perfil de huella genética en geles de poliacrilamida generados por TGGE para BFN usando el gen nifH.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 28 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BFN usando el gen nifH de las aguas de riego.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 29 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BFN usando el gen nifH de los suelos de El Alberto para el tiempo antes del riego y las aguas de riego.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 30 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BFN usando el gen nifH de los suelos de El Alberto para el tiempo después del riego y las aguas de riego.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 31 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BFN usando el gen nifH de los suelos de El Alberto de ambos tiempos (antes y después del riego) y las aguas de riego.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 32 Perfil de huella genética en geles de poliacrilamida generados por TGGE para BOA usando el gen amoA.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 33 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BOA usando el gen amoA de las aguas de riego.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 34 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BOA usando el gen amoA de los suelos de El Alberto para el tiempo antes del riego y las aguas de riego.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 35 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BOA usando el gen amoA de los suelos de El Alberto para el tiempo después del riego y las aguas de riego.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 36 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BOA usando el gen amoA de los suelos de El Alberto para ambos tiempos (antes y después del riego) y las aguas de riego.....</i>	<i>70</i>

RESUMEN

La agricultura es el primer sector a nivel mundial de consumo de agua dulce. Por consiguiente, no es de sorprenderse, en diferentes partes del mundo se ha optado por el uso de fuentes alternas de agua, principalmente en regiones áridas y semiáridas; dejando en otro plano de importancia la calidad hídrica. Para los suelos agrícolas, la fertilidad depende en gran parte de la acción de microorganismos en el flujo de nutrientes.

El presente trabajo tuvo como propósito estudiar a las comunidades microbianas del dominio Bacteria y Archaea, además de los grupos funcionales de fijación de nitrógeno (BFN) y de oxidación aerobia del amonio (BOA) en suelos agrícolas de El Alberto, Ixmiquilpan, Hidalgo regados con distintas calidades de pulso hidráulico (manantial, de río Tula y residual) a través de su estructura microbiana antes y después de una temporada de riego. Por medio del uso de los genes marcadores *RNAr 16S* Bacteria, *RNAr 16S* Archaea, *nifH* y *amoA*, respectivamente y la técnica de análisis de huella genética por Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura (TGGE). La parte microbiana en las aguas de riego se estudió de la misma manera. De manera complementaria al objetivo principal, se requirió conocer el estado fisicoquímico tanto de suelos (fertilidad) como de las aguas de riego (calidad). En el diseño experimental, se seleccionó un suelo agrícola por cada agua de riego y un suelo sin riego, considerado como control al recibir solo agua de lluvia.

Los resultados de fertilidad presentaron diferencias significativas entre suelos agrícolas para pH, materia orgánica, nitrógeno total y nitrato, indicando al suelo con riego de agua residual como el más fértil. No obstante, con el manejo agrícola variable recibido por más de 40 años, no se puede afirmar que esta condición se deba completamente al riego con agua residual.

En el caso de las aguas de riego y su calidad asociada, conforme a lo obtenido con la DQO, no hay diferencias estadísticas entre el agua de río Tula y el agua residual, calificándolas como aguas contaminadas. De las tres aguas de riego, ninguna resultó ser apta para el uso de riego agrícola.

La calidad del pulso hidráulico sin importar la historia de riego ha diferenciado la estructura microbiana total de Archaea y la estructura funcional de las BFN (tiempo antes del riego). Mientras que el pulso hidráulico dependiente de la calidad tras una temporada de riego fue determinante para la estructura de Bacteria, Archaea y BOA. La estructura microbiana del suelo con riego de río Tula y el de riego con agua residual fue similar para Archaea y BOA, en cada tiempo de estudio.

Conforme a la riqueza ponderada para el tiempo antes del riego, la calidad del pulso hidráulico no ha diferenciado a ninguna comunidad microbiana, sea Bacteria, Archaea, BFN o BOA. No obstante, la calidad del pulso hidráulico en el tiempo después del riego generó un cambio (dinámica) en la riqueza ponderada para la estructura solo de algunos suelos: suelo con riego de manantial para Bacteria, suelo con riego de río Tula y suelo con riego de agua residual para Archaea, y el suelo control para BOA.

En el caso de las aguas de riego, cada calidad fue determinante para la estructura de Archaea y BFN, pero para el dominio Bacteria y BOA las aguas con aportes residuales, agua de río Tula y agua residual, no presentaron una estructura específica.

ABSTRACT

Agriculture is the first sector in the world in freshwater consumption. Therefore, it is not surprising that in different parts of the world the use of alternative water sources has been chosen, mainly in arid and semi-arid regions, sidelining water quality. In agricultural soils, fertility depends largely on the action of microorganisms in the flow of nutrients.

The objective of this work was to study the microbial communities of the Bacteria and Archaea domains, additionally the functional groups of nitrogen fixation (BFN) and aerobic oxidation of ammonium (BOA) in agricultural soils of El Alberto, Ixmiquilpan, Hidalgo irrigated with different qualities of hydraulic pulse (groundwater, Tula river and residual) through its structure before and after an irrigation season. Through the use of the marker genes RNAr 16S Bacteria, RNAr 16S Archaea, *nifH* and *amoA*, respectively, and the fingerprinting analysis technique by Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE). The microbial part in irrigation water was studied the same way. Complementary to the main objective, it was required to know the physicochemical state of both soils (fertility) and irrigation water (quality). In the experimental design, an agricultural soil was selected for each irrigation water and a soil without irrigation, considered as control since it receives only rainwater.

The fertility results showed significant differences between agricultural soils for pH, organic matter, total nitrogen and nitrate, indicating the soil with residual water irrigation as the most fertile. However, with the variable agricultural management received for more than 40 years, it cannot be said that this condition is completely due to irrigation with wastewater.

In the case of irrigation water and its associated quality, according to the COD obtained, there are no statistical differences between the water from the Tula river and the wastewater, qualifying them as contaminated water. Of the three irrigation waters, none turned out to be suitable for agricultural irrigation use.

Regardless the irrigation history, the quality of the hydraulic pulse has differentiated the total Archaea microbial structure and the BFN functional structure of (time before irrigation). While, after an irrigation season, the quality-dependent hydraulic pulse was decisive for

Bacteria, Archaea and BOA structures. The microbial structure of the soil with irrigation from the Tula River and the soil with wastewater irrigation was similar for Archaea and BOA, in each study time.

According to the weighted richness for the time before irrigation, the quality of the hydraulic pulse has not differentiated any microbial community, for Bacteria, Archaea, BFN or BOA. However, the quality of the hydraulic pulse in time after irrigation generated a change (dynamics) in the weighted richness for the structure in only some soils: groundwater irrigation soil for Bacteria, Tula river irrigation soil and wastewater irrigation soil for Archaea.

In the case of irrigation waters, each quality was decisive for the structure of Archaea and BFN, but for the Bacteria domain, and BOA the waters with residual inputs, Tula river water, and wastewater, did not present a specific structure.

INTRODUCCIÓN

Los suelos son sistemas heterogéneos con una gran complejidad, en donde convergen factores abióticos y bióticos de la biosfera, atmósfera, litosfera e hidrosfera que interactúan entre sí, dando a cada suelo, características propias (Cruz-Martínez, 2012; Voroney y Heck, 2015).

La función de las comunidades microbianas de un ecosistema es imprescindible; al ser los microorganismos los principales actores de los ciclos biogeoquímicos y de procesos de reciclaje de nutrientes (en especial del nitrógeno) tienen una enorme trascendencia en el equilibrio biológico de ecosistemas (Singh *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2007). La dinámica de las comunidades microbianas se encuentra sujeta a la competencia inter- e intraespecífica de sus poblaciones ante los recursos y factores ambientales. Esta dinámica puede determinar el tamaño, abundancia y actividad de las poblaciones, llegando a modificar en ciertos momentos la estructura y función de las comunidades (Lipson *et al.*, 1999).

Para los suelos agrícolas, la fertilidad es la característica de mayor importancia para la producción primaria, que depende en gran medida de los microorganismos que llevan a cabo el flujo de nutrientes. Las comunidades microbianas están presentes en todos los ecosistemas con una gran biodiversidad de bacterias, arqueas, hongos y virus, en donde juegan papeles fundamentales (Singh *et al.*, 2006; Fierer *et al.*, 2007; Fierer y Lennon, 2011; Morris y Blackwood, 2015). Las comunidades microbianas se pueden describir por su estructura, función y dinámica. La fertilidad de suelos agrícolas está determinada por la relación microorganismos-nutrientes, así como la disponibilidad de estos últimos, sujeta a características fisicoquímicas del suelo. Los microorganismos presentan condiciones de hábitat óptimas dentro de límites de tolerancia, por lo que, factores bióticos y abióticos influyen en su estructura, función y dinámica dentro del suelo, haciendo modificar con ello la fertilidad (Lauber *et al.*, 2009; Cruz-Martínez *et al.*, 2012). El resultado de una perturbación puede ser la pérdida de fertilidad, tal problemática se presenta con regularidad en suelos agrícolas con un manejo de suelo y riego inadecuado.

MARCO TEÓRICO

El suelo

Como se ha mencionado anteriormente, los suelos son sistemas heterogéneos con una gran complejidad. Poseen cinco componentes, que determinaran sus características, estos son: minerales, materia orgánica, biota, aire y agua. Cada uno es importante por sí mismo, pero lo fundamental es el equilibrio adecuado de estos en cuanto a calidad y cantidad para realizar funciones ambientales (FAO, 1996).

El suelo es uno de los principales proveedores de diversos servicios ecosistémicos de provisión, regulación y culturales que son el resultado de las funciones ecológicas que realizan en un contexto global (Figura 1). He aquí su importancia de estudio y su debida protección. Hoy en día a nivel mundial, el 33% de los suelos se encuentra degradado, ya sea por salinización, erosión, acidificación o por contaminación química (FAO y GTIS, 2016).

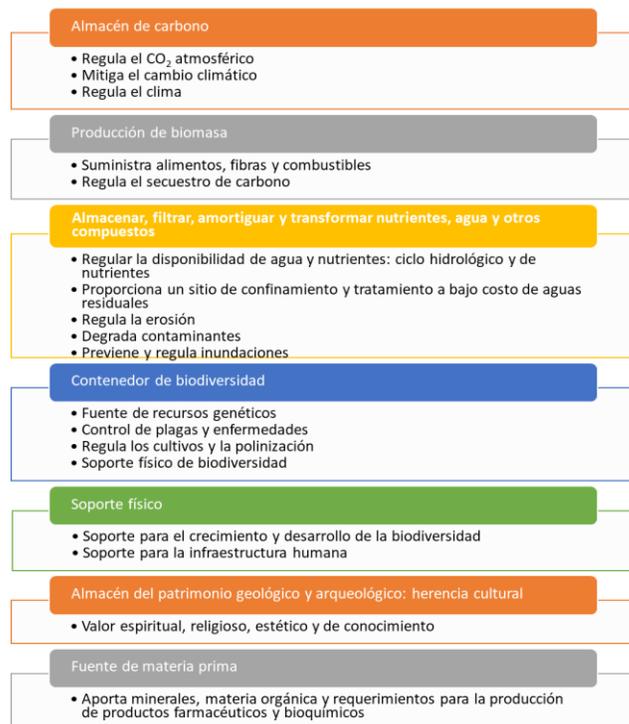


Figura 1 Funciones y servicios ecosistémicos del suelo.

En los cuadros con fondo sólido se muestran las funciones mientras que en los cuadros con fondo blanco los servicios ecosistémicos asociados a estos (FAO, 2015b; Adhikari y Hartemink, 2016).

Fertilidad, calidad y salud del suelo

El concepto tradicional de fertilidad es la capacidad del suelo para suministrar nutrientes esenciales suficientes en cantidades adecuadas y en equilibrio adecuado para el crecimiento y desarrollo de plantas (Brady, 1990). Sin embargo, esta definición tiene muchas ambigüedades, pues el crecimiento vegetal no solo está limitado por nutrientes. Stockdale y colaboradores (2006) proponen un concepto más global, considerándola como la capacidad que tiene el suelo de proporcionar las condiciones requeridas para el crecimiento de las plantas; siendo resultado de los procesos físicos, químicos y biológicos que en conjunto proporcionan nutrientes, agua, aire y estabilidad a la planta en cantidades debidas y con un balance adecuado para su crecimiento cuando otros factores, tales como luz, temperatura y propiedades fisicoquímicas del suelo son favorables.

En suelos, otro término de importancia es la calidad, también referida como salud del suelo, indistintamente. Este es un concepto integrador relacionado con las distintas funciones ecológicas y antrópicas que puede realizar un suelo de acuerdo con un uso específico; definiéndose como la capacidad del suelo para funcionar como un sistema de vida primordial, dentro de los ecosistemas naturales o manejados, para promover la productividad animal y vegetal, mantener o incrementar la calidad del agua, del aire y apoyar la salud y habitación humana (Doran y Zeiss, 2000; Bautista-Cruz *et al.*, 2004). Dependiendo de la persona o entidad que evalúe un suelo, éste tendrá distintas calidades, por ejemplo, para personas con una visión ambientalista el suelo de calidad será aquel que mantenga y mejore la biodiversidad, calidad del agua y producción primaria, mientras que para los agricultores será aquel que sea y se mantenga, productivo para maximizar ganancias propias o comunitarias.

Los indicadores biológicos claves en la salud del suelo son aquellos que registran la alteración de la diversidad en la comunidad microbiana de arqueas, bacterias y hongos, además de la biota en general como nemátodos, ácaros, colémbolos y lombrices de tierra, ya que responden con sensibilidad a la perturbación antropogénica como son los regímenes de manejo agrícola (Doran y Zeiss, 2000).

Ecología microbiana en suelos

La ecología microbiana estudia la diversidad, distribución y actividad específica de los microorganismos, así como sus interacciones bióticas y abióticas, y el efecto que tienen sobre los ecosistemas (Gray y Head, 2008).

En las comunidades microbianas, podemos identificar su estructura o perfil; que hace referencia a su diversidad determinada por los parámetros de riqueza y abundancia de cada población particular, además de su distribución en el espacio físico (Morris y Blackwood, 2015; Faure y Joly, 2016). Las condiciones ambientales, los recursos y el grado de tolerancia de las poblaciones determinan su abundancia, distribución y actividad específica (Gray y Head, 2008).

Otro aspecto de importancia en la ecología de comunidades es el estudio de la dinámica, que indica el cambio en la estructura, sea en el espacio o el tiempo. Este cambio puede ser el reflejo del efecto potencial que tendría un disturbio o la entrada de algún elemento externo. Por ello, los microorganismos pueden considerarse como indicadores ecológicos de alteración en el ambiente (Collins y Qualset, 1999).

El análisis de la estructura de las poblaciones microbianas es esencial para comprender la ecología de cualquier ecosistema; de igual forma, es crucial el estudio de la función y dinámica para entender los procesos que afectan a los ciclos biogeoquímicos, recordando que estos son en gran parte responsables de la fertilidad y productividad de sistemas terrestres y acuáticos.

Es importante recalcar que los microorganismos son modificadores de su entorno siendo parte esencial de su funcionamiento y de procesos clave que regulan a la Tierra, con especial mención, los ciclos biogeoquímicos (Kuramae *et al.*, 2012).

Los suelos poseen una inmensa diversidad microbiana; se ha estimado, en un gramo de suelo puede haber entre 10^8 a 10^{10} células procariontes (Portillo *et al.*, 2013). Por lo tanto, no es de sorprenderse que su estudio desde sus inicios sea un gran reto metodológico y de análisis

que a cada paso va revelando los enigmas más sorprendentes. Los impulsores ecológicos de diversidad microbiana del suelo son variados dependiendo en gran medida de las condiciones ambientales específicas del sitio, factores abióticos, como temperatura, grado de aridez, gradiente de luz, propiedades fisicoquímicas del suelo por ejemplo pH, humedad, materia orgánica, salinidad (Norris *et al.*, 2002; Lauber *et al.*, 2009; Canfora *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017), pero también factores bióticos como interacciones entre especies, afectan la estructura microbiana de los suelos, como es el tipo de vegetación asociada, entre otras más (Gray y Head, 2008; Kivlin y Hawkes, 2016; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018). En resumen, a lo anterior, las comunidades microbianas en suelos se interrelacionan estrechamente con las características físicas y químicas del suelo, y de la cobertura vegetal que sostiene (Corneo *et al.*, 2013). En suelos asociados con actividades antropogénicas se altera la estructura, función y dinámica microbiana, en primera instancia por el tipo de uso de suelo; en el caso de suelos agrícolas, el manejo y prácticas empleadas pueden modificar las condiciones del suelo, posibilitando la alteración de los puntos antes mencionados (Carbonetto *et al.*, 2014).

Ecología microbiana en agua

La diversidad, distribución y actividad de las comunidades microbianas existentes en prácticamente todos los sistemas acuáticos dulceacuícolas, salobres y marinos depende en gran medida de la calidad del agua a nivel fisicoquímico y microbiano, influenciada por los factores ambientales y las actividades humanas (Kemp y Aller, 2004; Joshi *et al.*, 2016). La diversidad microbiana en agua se ha estudiado en cuerpos superficiales tanto lénticos como lóticos, en aguas de lastre, portuarias y oceánicas encontrando diferencias de riqueza y abundancias asociadas con el estado trófico, principalmente de nitrógeno y fosforo (Ionescu *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2015). En la Tabla 1 se reúnen algunos estudios microbianos realizados en distintos ambientes acuáticos.

Tabla 1 Estudios microbianos en ambientes acuáticos.

Referencia/ País	Ecosistema acuático	Objetivo	Parámetros fisicoquímicos	Parámetros biológicos
Ng <i>et al.</i> , 2015/ Singapur	Aguas de lastre	Composición microbiana	T, pH, salinidad y turbidez	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> spp., genes de resistencia: <i>sul1</i> , <i>dfrA</i> , <i>cfr</i> y diversidad microbiana usando el gen RNAr 16S
Topalcengiz <i>et al.</i> , 2017/ EE.UU.	Estanques agrícolas	Indicadores patógenos	T, pH, CE y turbidez	Coliformes totales, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp.
Jiménez y Landa, 1998/ México	Aguas residuales de la CDMX	Caracterizar el estado del agua	Turbidez, pH, CE, NT, Fe, Pb, NH ₄ ⁺ , P total y DQO	Huevos de helmintos y coliformes fecales
Wang <i>et al.</i> , 2016/ China	Río Ganjiang	Caracterizar la comunidad bacteriana y las variables fisicoquímicas dominantes	Caudal, T media, CE NH ₄ ⁺ , P total y carbono orgánico disuelto (COD)	Diversidad microbiana
Ionescu <i>et al.</i> , 2012	Manantiales submarinos de agua dulce en el mar muerto.	Caracterizar la comunidad microbiana	COD, NT disuelto, Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Br ⁻ , densidad, pH, NH ₄ ⁺ y NO ₃ ⁻	Diversidad microbiana
Draper <i>et al.</i> , 2016/ EE. UU.	Agua superficial de riego	Indicadores microbianos y características fisicoquímicas	pH, turbidez, CE, T del agua y del aire	Coliformes fecales, coliformes totales, enterococos, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>
Contreras <i>et al.</i> , 2017/ México	Aguas residuales de la CDMX	Evaluación de patógenos y su relación con diarrea en niños de la comunidad agrícola.	pH, CE, T, Potencial redox, NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , MO	Coliformes fecales, enterococos fecales, <i>E. coli</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Giardia lamblia</i>
Fonseca-Salazar <i>et al.</i> , 2016	Aguas residuales de la CDMX	Calidad microbiológica		Coliformes fecales, enterococos fecales, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , protozoos patógenos.

Calidad de agua

La evaluación de la calidad del agua hace uso de indicadores o parámetros que permitan calificar las cualidades del agua. Estos indicadores pueden ser químicos, físicos y biológicos (Tabla 2). Los más empleados son la temperatura, pH, conductividad, potencial redox, turbidez, oxígeno disuelto, demanda bioquímica de oxígeno, y demanda química de oxígeno (DQO). Sin embargo, dependiendo de los objetivos de estudio deben de elegirse los indicadores adecuados (Topalcengiz *et al.*, 2017; Yin y Patel, 2018).

El monitoreo de la calidad microbiana en aguas de riego debe ser primordial para cualquier sistema productivo agrícola. En la práctica los estudios concernientes a las aguas usadas en el riego se han centrado en indicadores patógenos y entéricos, ya que el agua entra en contacto con la futura porción comestible, la matriz suelo y los trabajadores del campo siendo así de interés el monitoreo del riesgo potente a la salud (Draper *et al.*, 2016; Fonseca-Salazar *et al.*, 2016; Contreras *et al.*, 2017; Topalcengiz *et al.*, 2017).

Tabla 2 Indicadores de calidad de agua.

Tipo de indicador	Indicador o parámetro	Referencia.
Físicos	Temperatura, conductividad eléctrica, turbidez, sólidos suspendidos totales, sólidos disueltos, sólidos sedimentables, color,	(del Mar Alguacil <i>et al.</i> , 2012; Draper <i>et al.</i> , 2016; Topalcengiz <i>et al.</i> , 2017; Yin y Patel, 2018)
Químicos	pH, potencial de oxido reducción, salinidad, oxígeno disuelto, demanda bioquímica de oxígeno, demanda química de oxígeno, nutrientes (nitrógeno total, nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal, fosfatos, sulfatos), dureza, metales, cloro residual, etc.	(Jain y Singh, 2003; del Mar Alguacil <i>et al.</i> , 2012; Draper <i>et al.</i> , 2016; Topalcengiz <i>et al.</i> , 2017)
Biológicos	Coliformes fecales, coliformes totales, <i>Escherichia coli</i> , actividad enzimática, presencia de grupos bacterianos particulares.	(Cheung <i>et al.</i> , 2015; Rames <i>et al.</i> , 2016; Eregno <i>et al.</i> , 2018; Stadler <i>et al.</i> , 2019)

Estudio de comunidades microbianas

El abordaje de la ecología microbiana, durante mucho tiempo, se caracterizó por lo problemático de identificar y cuantificar a las poblaciones. Esta se limitaba a la descripción de la estructura de las comunidades, principalmente, con la identificación de tipos bacterianos, a través de su crecimiento en medios de cultivos en laboratorio (Hastings, 1999; Cabirol *et al.*, 2011). La identificación con medios de cultivo se restringe a los organismos de crecimiento óptimo, en las condiciones y los recursos proporcionados en el medio. Los microorganismos divisados con estas técnicas son los menos dominantes en su hábitat natural, representando solo el 0.001-15% de la diversidad del ecosistema estudiado (Spring *et al.*, 2000). A este tipo de identificación, se relacionan mediciones inexactas de diversidad, propiciadas por la plasticidad genética desarrollada de los microorganismos, además de favorecer a ciertos grupos microbianos sobre otros (Gray y Head, 2008; Cabirol *et al.*, 2011).

Con el progreso de la biología molecular de las últimas décadas, se han realizado los verdaderos avances en el estudio de la ecología microbiana, en particular de la diversidad de las comunidades, sin la necesidad de aislar a los microorganismos. Con enfoques moleculares, los resultados obtenidos llegan a ser 1 o 2 órdenes de magnitud mayor, que los obtenidos con medios de cultivo tradicionales (Gray y Head, 2008). Aún con ello, las técnicas de cultivo son imprescindibles para evaluar el potencial funcional de genes desconocidos y obtener información fenotípica de los microorganismos, además hay grupos microbianos no detectables por técnicas moleculares sin una técnica previa de cultivo. Por lo tanto, el estudio de las comunidades microbianas puede hacer uso tanto de las técnicas de cultivo como de técnicas moleculares, dependiendo del objetivo de estudio (Prakash *et al.*, 2013).

Técnicas moleculares en el estudio de la estructura microbiana

Las técnicas moleculares se basan en el uso del material genético, sea ácido desoxirribonucleico (DNA) o ácido ribonucleico (RNA) (Cabirol *et al.*, 2011). Hay diferentes técnicas, cada una con ventajas y limitantes. Entre las técnicas moleculares independientes de cultivo, se pueden diferenciar dos grupos: a) aquellas que se basan en la extracción de ácidos nucleicos y b) las técnicas de diseño de sondas con tinciones a partir de secuencias de

ácidos nucleicos, para la visualización, identificación y cuantificación microscópica de los microorganismos, tal como la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) (Gray y Head, 2008).

Las técnicas que requieren la extracción de ácidos nucleicos dependen de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), usada para amplificar exponencialmente una región específica de DNA o RNA (Gray y Head, 2008). Ejemplos son las técnicas de huella dactilares o genéticas (fingerprinting). Un esquema general de las herramientas disponibles para el estudio de la ecología microbiana se muestra en Figura 2.

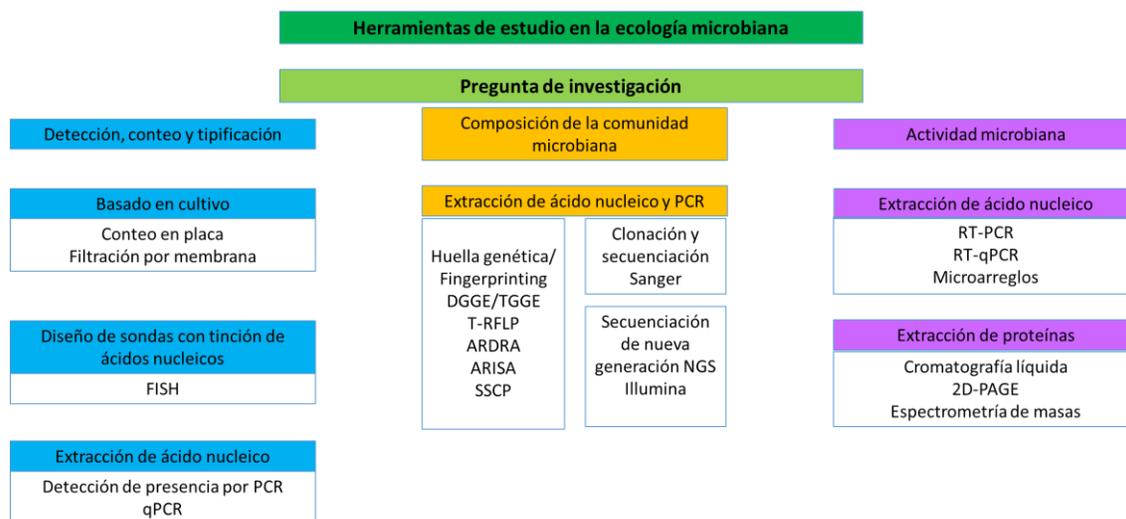


Figura 2 Esquema general de las herramientas de estudio empleadas en la ecología microbiana.

En la Tabla 3 se muestran algunas características y ejemplos de técnicas de huella genética y de Secuenciación de Nueva Generación (NGS); se puede notar que las primeras son un buen conjunto de opciones para los laboratorios de bajo presupuesto, ya que la mayoría son fáciles de realizar y económicas, al restar el costo de la secuenciación. En adición a lo anterior, el análisis rápido de datos hace factible el estudio comparativo entre diferentes muestras de distintos sitios o tiempos, permitiendo el estudio de la dinámica de comunidades a partir del análisis estadístico de múltiples perfiles (Gray y Head, 2008).

Las estimaciones de la riqueza de especies se pueden realizar con análisis comparativos de genes conservados con regiones variables que permiten la discrepancia entre especies (Gray y Head, 2008). Los primeros enfoques moleculares se centraron en estudios filogenéticos con el gen RNAr 16S (Rodicio y Mendoza, 2004; Throbäck *et al.*, 2004; Knittel *et al.*, 2005).

Recientes estudios, en los últimos 15 años, han apostado por probar nuevas perspectivas tales como el análisis funcional de comunidades microbianas empleando genes de función metabólica, permitiendo una mayor exploración del funcionamiento de las comunidades, aportando un panorama particular de diversidad (Gray y Head, 2008; Rojas-Oropeza *et al.*, 2012; Siqueira *et al.*, 2017). Este tipo de enfoque es útil cuando se pretende relacionar presencia, diversidad y abundancia de grupos bacterianos particulares con procesos ambientales, por ejemplo, ciclos biogeoquímicos (Gray y Head, 2008).

Tabla 3. Comparación entre técnicas de huella genética y técnicas de secuenciación de nueva generación.

	Técnicas de huella genética (fingerprinting)	Técnicas de Secuenciación de Nueva Generación (NGS)
Extracción de ADN	*	*
PCR	*	Una ronda extra para la adición del barcoding.
Tiempo de análisis	Rápido	Depende del número de secuencias generadas.
Costo	Bajo 20-100 dólares	Alto 300-15 500 dólares
Tipos de estudio	Diversidad Capacidad metabólica	Diversidad Capacidad metabólica Identificación taxonómica Relaciones filogenéticas Estructura genética y transcriptómica
Ventajas	Análisis de la dinámica. Perfilado rápido espacio-tiempo Análisis simultaneo de un gran número de muestras.	Identificación de las poblaciones además de la posible obtención de la abundancia de estas.
Desventajas	Se puede sobre o subestimar diversidad. Sesgo asociado a la PCR Sin identificación taxonómica directa	Los costos pueden limitar la comparación de varias muestras.
Enfoques complementarios	Clonación NGS Metabólicos	Transcriptómica Proteómica Metabólicoma
Ejemplos	TGGE DGGE T-RFLP ARDRA ARISA RAPD	SoliD GeneReader Ion Torrent Illumina SoliD Wildfire

(Goodwin *et al.*, 2016; Marzorati *et al.*, 2008; Quail *et al.*, 2012)

Técnicas de huella genética (fingerprinting)

Las técnicas de fingerprinting como su nombre lo indica, dan una huella o patrón de diversidad característico para la comunidad bacteriana estudiada, ya que cada componente

resultante del patrón corresponde a una especie o grupo, dependiendo del gen estudiado (Thompson *et al.*, 2014; Siqueira *et al.*, 2017).

Los métodos de huella genética son buenos indicadores del grado de diversidad de una comunidad microbiana, hablando de riqueza y abundancia, a grandes rasgos, sin llegar a una identificación precisa o absoluta. Sin embargo, estas técnicas se pueden acoplar con herramientas de secuenciación, posibilitando así la identificación de la diversidad encontrada con fingerprinting (Thompson *et al.*, 2014; Green *et al.*, 2015).

El uso de técnicas de fingerprinting aunque en menor presencia, sigue siendo vigente en estudios de diversidad microbiana de diferentes ecosistemas y en condiciones particulares, obteniendo buenos resultados que permiten realizar inferencias a distintos niveles; los más empleados son la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés) y la técnica de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal (T-RLFP), la primera no requiere un proceso de adición de fluorocromo (Vendan *et al.*, 2012).

Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura (TGGE)

Una variante de la técnica de fingerprinting DGGE, es la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE). Ambas permiten la separación de amplicones de similar o igual tamaño, entre 200 a 700 pb, pero con distinta secuencia de nucleótidos, en teoría pueden discernir entre secuencias que difieren en una sola base, generando un perfil de bandeo característico (Muyzer *et al.*, 1993; Green *et al.*, 2015). TGGE tiene el mismo principio que DGGE, la diferencia radica en el componente desnaturizante; en este último, el gradiente de desnaturización es químico por medio de un gradiente de urea, mientras que en TGGE se da por una concentración constante de urea y un aumento gradual de la temperatura durante la electroforesis (Yoshino *et al.*, 1991).

Con TGGE se puede realizar el análisis de huellas dactilares de comunidades microbianas, obteniendo información de diversidad (Green *et al.*, 2015), ya que cada banda que genera supone que corresponde a un grupo microbiano diferente (Thompson *et al.*, 2014); permitiendo un análisis cualitativo y semicuantitativo de las principales poblaciones

microbianas (Muyzer *et al.*, 1993). El nivel de resolución de bandeo llega a corresponder hasta un nivel de resolución taxonómico de género y especie (Bukowska *et al.*, 2014). No obstante, puede que una banda esté compuesta por más de una especie, que migra simultáneamente o bien, algunas especies contribuyan con más de una banda, cuando poseen múltiples copias diferentes del mismo gen estudiado (Thompson *et al.*, 2014). Por lo anterior, es preferible usar el término Unidad Taxonómica Operacional (OTU), considerando a cada banda como un filotipo distinto en la comunidad (Rosas *et al.*, 2004). El número de bandas informa de la riqueza de OTUs en la comunidad, mientras que la intensidad de las bandas puede ser un reflejo de la abundancia de la secuencia o grupo en la comunidad (Muyzer *et al.*, 1993; Kuffner *et al.*, 2004; Rosas *et al.*, 2004).

La TGGE posee las ventajas de ser una técnica relativamente rápida, económica, reproducible y capaz de examinar simultáneamente un conjunto de múltiples muestras, permitiendo así el estudio de la dinámica espacial y temporal (Muyzer *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 2014; Green *et al.*, 2015). La identidad de los componentes de la comunidad se puede conocer con la escisión y secuenciación de las bandas (Thompson *et al.*, 2014; Green *et al.*, 2015). Un esquema general del flujo de trabajo en la TGGE se muestra en la Figura 3.

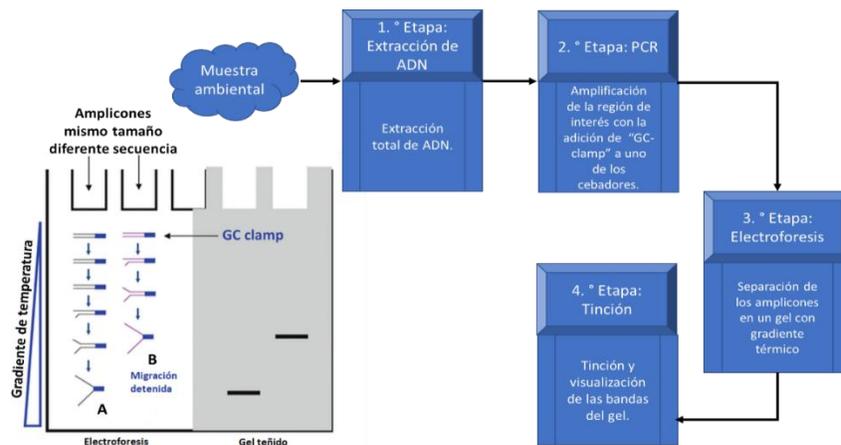


Figura 3 Esquema general de la técnica de electroforesis en gel con gradiente de temperatura.

A pesar de los avances en los análisis de secuenciación de alto rendimiento, las técnicas de huella genética como TGGE siguen siendo una técnica importante; que permite un análisis inmediato y exploratorio de las comunidades (Muyzer *et al.*, 1993; Green *et al.*, 2015).

También puede emplearse como técnica de verificación rápida del éxito de un experimento, antes de tomar alguna decisión (Green *et al.*, 2015).

La TGGE se ha empleado en diversos estudios de ecología microbiana, con el propósito de estudiar la complejidad de las comunidades, ejemplos son los distintos trabajos de diversidad, estructura y dinámica realizados en suelos, aguas residuales, estanques, manglares, y demás ambientes (Zhang *et al.*, 2008; Vendan *et al.*, 2012; Bevivino *et al.*, 2014).

Ciclo del nitrógeno

Generalidades

El nitrógeno (N) es un nutriente esencial para la vida en el planeta, que limita el crecimiento de las plantas y con ello afecta sustancialmente a las redes tróficas del sistema. Además de ser componente estructural de biomoléculas de importancia fisiológica y genética como los aminoácidos monómeros de proteínas, de las bases nitrogenadas que constituyen a los ácidos nucleicos, y de nucleótidos tales como AMP, ADP, ATP, NAD y NADPH, entre otras moléculas más.

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno es una compleja red de reacciones de oxidación-reducción, en las cuales el N sufre una serie de transformaciones, resultando en la formación de distintas especies químicas asociadas a compuestos orgánicos e inorgánicos; una representación de este con los principales procesos se muestra en la Figura 4. Algunas reacciones se realizan de manera espontánea, pero algunas otras son realizadas por hongos, bacterias (en su mayoría) y arqueas que participan en distinto grado y momento del ciclo (Coskun *et al.*, 2017).

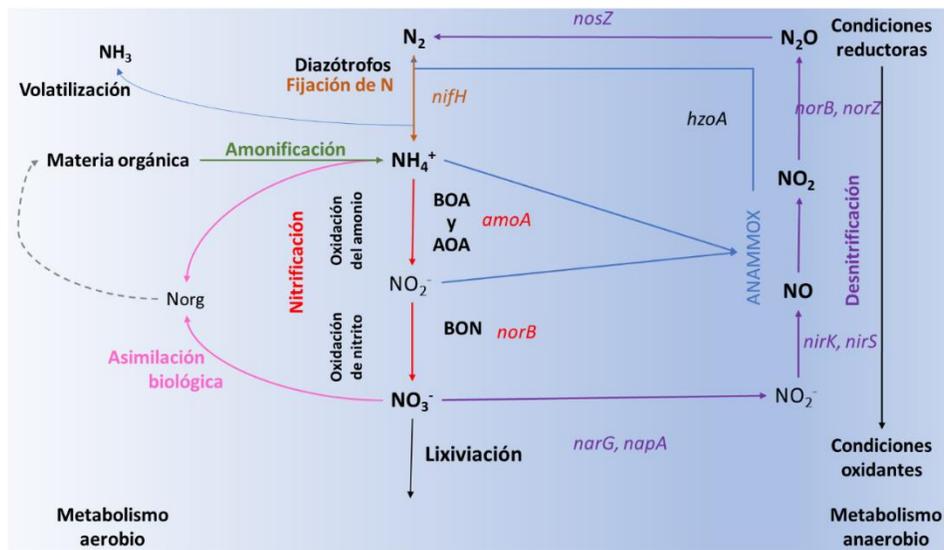


Figura 4 Ciclo del nitrógeno.

Se muestra las diferentes formas químicas del N y el camino que tienen en el ciclo. En cursivas se observan los genes funcionales de cada etapa. Bacterias oxidantes de amonio (BOA), arqueas oxidantes de amonio (AO) y bacterias oxidantes de nitrito (BONA). Elaboración propia.

La atmosfera es el principal reservorio de N en el planeta, representando el 78% de su composición. En su gran mayoría se encuentra en forma de gas dinitrógeno (N_2) o nitrógeno atmosférico, un gas inerte altamente estable por presentar un triple enlace (Fields, 2004). Para que los organismos tengan acceso al N, es necesario se encuentre disponible, física- y químicamente. Las plantas absorben N reactivo principalmente en forma de nitratos (NO_3^-) y iones amonio (NH_4^+) y raramente en forma orgánica (Krapp, 2015).

Un primer paso para que el N se encuentre disponible, es la fijación de nitrógeno atmosférico a la biosfera, en la cual el N_2 se reduce a NH_4^+ . Los diazotrofos, organismos procariontes (bacterias (BFN) o arqueas) de vida libre o en asociaciones simbióticas, son los responsables de realizar tal acción. En este punto, el NH_4^+ se puede absorber por las plantas u oxidarse secuencialmente a nitrito (NO_2^-) y NO_3^- en una serie de reacciones que requieren oxígeno molecular, denominadas en conjunto nitrificación (Zerkle y Mikhail, 2017). Este proceso se puede dividir en dos etapas, oxidación de amonio y oxidación de nitrito, realizadas por microorganismos quimiolitótrofos, entre los que se pueden distinguir a las bacterias oxidantes de amonio (BOA), arqueas oxidantes de amonio (AOA) y bacterias oxidantes de nitrito (BON). Recientemente se han descrito a las bacterias anammox que en condiciones anaerobias realizan la oxidación del amonio a N_2 utilizando NO_2^- como aceptor de electrones para producir NH_4^+ a NO_3^- (Daims *et al.*, 2015).

El nitrógeno fijado vuelve a la atmosfera con la acción microbiológica de la desnitrificación, que consiste en la reducción de NO_3^- y NO_2^- con la consecutiva producción de óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y al final N_2 en suelos y sedimentos marinos con un ambiente mínimo de oxígeno (Zerkle y Mikhail, 2017). Con la acción de desnitrificación, hay una pérdida neta de nitrógeno en los sistemas terrestres y marinos, afectando sustancialmente en la producción de biomasa del sistema, teniendo un gran impacto principalmente en los sistemas agrícolas.

Comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno y nitrificantes

Los microorganismos del suelo son actores clave en los ciclos biogeoquímicos en especial en el ciclo del nitrógeno, en el que participan prácticamente en todas las etapas (Pajares y Bohannan, 2016).

Las comunidades microbianas de los suelos son muy variables en lo que respecta a funcionalidad y filogenia, permitiendo la diversidad de BFN, BOA, AOA, BON, anammox y bacterias desnitrificantes. Para entender eficazmente a las comunidades microbianas, es primordial conocer el funcionamiento de estas, y los factores que influyen de forma positiva o negativa en su estructura, para así realizar análisis adecuados de la respuesta de estas ante distintas condiciones, como los presentes en sistemas agrícolas.

Las comunidades de diazótrofos catalizan la reacción de reducción del N_2 a NH_4^+ con la nitrogenasa, compuesta por tres proteínas codificadas por los genes *nifH*, *nifD* y *nifK*. Una gran parte de los estudios sobre la estructura de las comunidades de BFN han empleado como herramienta el gen *nifH*, que codifica la parte reductora de la enzima, permitiendo la obtención de información sobre diversidad.

Las BOA que participan en el primer paso de la nitrificación se han clasificado en los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* y *Nitrosococcus* con base en sus relaciones filogenéticas del gen RNAr 16S (Head *et al.*, 1993). La velocidad de nitrificación se limita por la oxidación de amonio, catalizada por la amonio monooxigenasa (AMO), codificada por el operón *amo* que contiene los genes *amoC*, *amoA* y *amoB* (Norton *et al.*, 2002). Los estudios de las BOA en su mayoría se han dirigido al gen *amoA* que codifica para la subunidad α , la cual contiene el sitio activo de la enzima (Scott *et al.*, 2015). El análisis con este gen además de proporcionar información de la estructura de la comunidad microbiana, aporta más información de la función de las comunidades en el sistema al tener una resolución fina para distinguir grupos nitrificantes con la región carboxilo terminal, que los obtenidos con el uso del gen RNAr 16S (Purkhold *et al.*, 2000; Levy-Booth *et al.*, 2014).

ANTECEDENTES

Reutilización de aguas residuales

El agua es un compuesto esencial para la vida en la Tierra, desde un enfoque biológico por ser partícipe en muchos de los procesos metabólicos, y en un enfoque antropológico en el cual el crecimiento demográfico exige cada vez más el recurso hídrico para satisfacer las demandas inmediatas y de desarrollo humano (Jahren y Sui, 2017). Sin embargo, es poca la cantidad de agua disponible capaz de ser empleada en procesos naturales y antropogénicos; se registra que solo el 2.5% del total de agua tiene baja concentración de sal, proporción presente en su mayoría en estado sólido, es decir en forma de hielo en un 68.7%, dejando menos del 1.7% del total realmente disponible para los distintos usos (Shiklomanov, 1993).

La falta de agua en ciertas regiones ha sido más aguda dada la posición geográfica dado que se distribuye de forma irregular en la corteza terrestre; esta escasez puede incrementarse por la sobreexplotación por distintas actividades (Bodnar *et al.*, 2013). La agricultura es el principal sector en la extracción de agua dulce a nivel mundial con un 70% (FAO, 2015); en México el 77% de la extracción hídrica corresponde a este sector, seguida muy distantemente por el sector municipal con un 14% (FAO, 2016). Dependiendo del suministro de agua al cultivo, se tienen dos tipos de agricultura: a) de temporal o de secano, por la lluvia y b) de riego (Vanschoenwinkel y Van Passel, 2018). La agricultura de riego emplea el agua disponible más fácilmente, sea una fuente subterránea, superficial, además de otras no convencionales como las aguas residuales transportadas a través de alguna infraestructura (Santa Olalla Mañas *et al.*, 2005; FAO, 2015a).

En México, las aguas residuales fueron definidas en 1981 dentro de la Ley Federal de Derechos como aquellas “de composición variada provenientes de las descargas municipales y no municipales, tales como las industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarias, domésticas, incluyendo fraccionamientos y, en general, de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas”.

Son varios los beneficios del uso de aguas residuales, algunos de ellos son el reducir o aminorar la extracción de agua dulce, la disposición a bajo costo de aguas residuales, la reducción en la descarga de efluentes a ecosistemas abiertos sin monitoreo, el sustentar la ausencia o deficiencia de fuentes alternativas de agua y proveer al suelo de una importante cantidad de nutrientes incrementando la productividad agrícola, por el reciclaje de nutrientes dada la gran proporción de materia orgánica (Becerra-Castro *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2015). El riego con agua residual es una práctica extendida en varias zonas agrícolas del mundo, que se ha requerido emplear por la escasez de agua que presentan ciertas regiones, principalmente las áridas; actualmente, son muchos los países a nivel mundial en distintas regiones que emplean aguas residuales para riego, los principales son China, México, India, Israel, España, entre otros más (Becerra-Castro *et al.*, 2015). Este reuso a conciencia se remonta a principios del siglo XX, al noroeste de El Cairo donde se idearon los primeros “campos de aplicación” (Braatz y Kandiah, 1996).

Por lo mencionado anteriormente y por el inminente agotamiento de agua dulce, las aguas residuales han pasado a considerarse como un recurso valioso y no de desecho. Sin embargo, estos beneficios pueden eclipsarse por los riesgos de salubridad que implican su uso, al contener y ser vehículo de transporte de microorganismos patógenos y parasitarios, así como por la contaminación de suelos con detergentes, grasas, metales pesados y fármacos (Lopes *et al.*, 2015). Una solución a estas problemáticas es el tratamiento de las aguas residuales por procesos físicos, químicos y biológicos que permitan conservar las propiedades benéficas para la agricultura; es decir, la carga de nutrientes y eliminar los componentes perjudiciales (Venkatesan y Halden, 2015). Para ello, las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) requieren de un planeamiento estratégico para su construcción y operación con el fin de responder a las necesidades de la población. En México recientemente, en diciembre de 2017 inició operaciones la PTAR (CGPAS, 2018), considerada la más grande en el mundo y la tercera con mayor capacidad de tratamiento; se espera beneficie a más de 700 mil habitantes de la región del Valle del Mezquital al dar tratamiento al 60% de las aguas residuales que genera el Valle de México (OCAVM, 2018).

Comunidades microbianas en suelos agrícolas con riego

El estudio del impacto del riego con agua residual en las comunidades microbianas de suelos es y debe de ser de interés, recordando que estas son pieza angular de los ciclos biogeoquímicos. La diversidad dentro de las comunidades microbianas de suelos agrícolas es afectada por el manejo de suelos y las propias prácticas agrícolas, incluyendo las referentes al agua, que le dan propiedades fisicoquímicas particulares al suelo (Nannipieri *et al.*, 2003; Lauber *et al.*, 2013; Bevivino *et al.*, 2014; Carbonetto *et al.*, 2014; Ghimire *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). La calidad del agua, el tiempo de riego y el tipo de irrigación influyen en la riqueza y abundancia microbiana: en primera, por la introducción de microbiota exógena que competiría con los microorganismos autóctonos, y en segunda, por el posible cambio en las propiedades fisicoquímicas del suelo que llevan a las comunidades microbianas a disturbios (Becerra-Castro *et al.*, 2015). Por tanto, en los suelos agrícolas con riego se experimentan dos perturbaciones con referencia a un suelo nativo: el cambio de uso de suelo y el empleo de agua de riego.

Estudios microbianos en suelos con riego con agua residual a nivel mundial

Como se ha mencionado, el riego con agua residual es una práctica que se realiza a nivel mundial, por tanto, su estudio en relación a comunidades microbianas es amplia y variada (Becerra-Castro *et al.*, 2015). La tendencia del efecto del riego con agua residual no se ha identificado claramente, dado que los parámetros fisicoquímicos y microbianos del suelo se incrementan, mantienen o hasta disminuyen, en la Tabla 1 se presentan algunos efectos observados del riego con agua residual en suelos.

Tabla 4 Estudios del efecto del uso de aguas residuales en suelos agrícolas.

Referencia/ País	Suelo/ cultivo	Agua residual/ irrigación (años)	Otras aguas de riego	Efectos en parámetros físicoquímicos	Efectos en comunidades microbianas (diversidad y actividad)	Conclusiones
Ndour <i>et al.</i> , 2008/ Senegal	Agrícola/ lechuga	U/15	sub	pH, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , Corg y W	Estructura de la comunidad bacteriana, comunidad de BOA.	Estimula la comunidad de BOA.
Gelsomino <i>et al.</i> , 2006/ Italia	Agrícola/ avellana.	U/20		Corg, NT y pH	Estructura de la comunidad bacteriana, en específico de BOA.	A largo plazo afecta la diversidad bacteriana.
García-Orenes <i>et al.</i> , 2015/ España	Agrícola/ naranja	U, ts/45	P	Corg y Pd	Biomasa microbiana, abundancia relativa de bacterias Gram- positivas, actividad BG, PA y DH.	Modifica la abundancia relativa de grupos microbianos, pero no la biomasa microbiana total.
Hidri <i>et al.</i> , 2010/ Túnez	Agrícolas/ naranja	U, ts/4, 8, 16 y 26		Corg, pH, Ni, Cr y Co	Abundancia microbiana.	Modifica la estructura genética de las comunidades microbianas, efecto correlacionado positivamente con la historia de riego.
Guo, <i>et al.</i> , 2018/ China	Agrícola/ tomate	U, ts/5	P	pH	Abundancia de gemmatimonadetes, actinobacteria, firmicutes y nitrospirae, diversidad bacteriana.	Altera la estructura de la comunidad bacteriana, en términos de abundancia.
Bastida <i>et al.</i> , 2017/ España	Agrícola/ toronja	U, tne/7	c	EC, Corg	Abundancia de proteobacterias y bacteriodetes, biomasa microbiana, actividad BG, PA y UR.	Altera la estructura de la comunidad bacteriana.
Guo <i>et al.</i> , 2017/ China	Mesocosmos	U, ts/3 m	P	EC y W .	Abundancia de proteobacterias, gemmatimonadetes y bacteroidetes.	El tipo de agua tiene una mayor influencia en la estructura de la comunidad microbiana que la fertilización con N.
Frenk <i>et al.</i> , 2018/ Israel	Mesocosmos	U, ts/3 s U/3s	P y Pf	Corg	Abundancia de proteobacterias.	Condiciones de alta disponibilidad de carbono estimulan la abundancia de proteobacterias.
Wafala <i>et al.</i> , 2015/ EE. UU.	Agrícolas/ canola, maíz, soja, heno y sorjo.	U, ts/13- 30		pH, W, MO, CBM	Abundancia relativa de betaproteobacteria, gammaproteobacteria, actinobacteria y gremios desnitrificantes.	La dinámica de la comunidad microbiana del suelo y sus roles funcionales están influenciados por la aplicación de aguas residuales.
Huang <i>et al.</i> , 2016/ China	Agrícolas/ maíz	U/13	sub y r		Diversidad alfa y riqueza bacteriana, abundancia relativa de bacterias desnitrificantes, abundancia relativa de bacterias nitrificantes.	Tiene un impacto modificador sobre las comunidades microbianas.
Farhadkhani <i>et al.</i> , 2018/ Irán	Invernadero	U, ts/1	P	EC, MO, pH	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> .	Afecta débilmente la calidad microbiana de suelos.
Elifantz <i>et al.</i> , 2011/ Israel	Agrícolas/ caqui	U, ts/4	P	Corg, NO ₃ ⁻	Biomasa microbiana, actividad DH e HD, abundancia bacteriana, diversidad de actinobacteria.	Afecta la composición y función bacteriana.
Chevremont <i>et al.</i> , 2013/ Francia	Microcosmos	U, ts/1	P	MO	Actividad lacasa, proteasa y UR, diversidad funcional.	La diversidad funcional no es dependiente de la calidad de agua.
Frenk <i>et al.</i> , 2014/ Israel	Agrícola/ caqui	U, ts/3	P	MO	Diversidad bacteriana, abundancia de actinobacterias gammaproteobacteria.	La comunidad bacteriana del suelo es resistente a largo plazo, pero la composición a corto plazo (riego) se ve modificada.

U, urbana; ts, tratamiento secundario, tt, tratamiento terciario, tne, tratamiento no especificado; m, meses, s, semanas; sub, subterránea, P, potable, Pf, potable fertilizada, c, canal fluvial, r, río; P d, fósforo disponible, M, metales, CBM, carbono de la biomasa microbiana, DH, deshidrogenasa, HD, hidrolasa, BG, beta-glucosidasa, UR, ureasa, PA, fosfatasa alcalina, UR, ureasa **incrementa, no se altera, disminuye.**

Comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno y nitrificantes en suelos con riego

La dinámica de las comunidades microbianas de relevancia para el presente trabajo, BFN y BOA, se asocia con variaciones temporales y espaciales de las tasas de fijación y nitrificación; además de las condiciones del suelo, disponibilidad de formas reactivas de N y la adición de N (Levy-Booth *et al.*, 2014; Pajares y Bohannan, 2016). Para la comunidad diazotrófica, no hay estudios centrados en suelos que reciban alguna agua de riego. Sin embargo, se ha documentado la adición de fertilizantes puede mantener, aumentar o disminuir la diversidad diazotrófica (Tang *et al.*, 2012; Sharma y Singh, 2017; Liao *et al.*, 2018). Respecto a las comunidades de bacterias nitrificantes, en el trabajo de Oved y colaboradores (2001) de suelos de huerto de toronja regados con agua residual, empleando DGGE y el gen *amoA* se encontró como dominantes a las BOA del género *Nitrosomonas*, *N. nitrosa* y *N. europea*, sobre *Nitrospira* el grupo más diverso de BON; con la misma técnica se detectó una diversidad general alta de BOA en suelos con riego de agua residual, pero no así para los de riego con agua subterránea (Ndour *et al.*, 2008). Con pirosecuenciación del RNAr 16S, Frenk y colaboradores (2015) relacionaron una mayor actividad en los suelos con cultivo de olivo regados durante dos años con agua residual en comparación a los suelos de temporal, relacionándolo con el mayor contenido de nitrógeno, detectando una mayor abundancia de *N. nitrosa* en el suelo regado con agua residual. Sin embargo, Ibekwe y colaboradores (2017) en suelos regados con agua residual tratada, usando el mismo enfoque de estudio encontraron una mayor riqueza para bacterias nitrificantes del género *Nitrospira* que de *Nitrosomonas*.

Valle del Mezquital

El Valle del Mezquital es una región geográfica semiárida y cultural que se localiza al suroeste del estado de Hidalgo (ASRVM A.C., 2010; Reséndiz-Cruz *et al.*, 2017). En ella se desarrollan como principales actividades económicas la agricultura, ganadería y el turismo, aunque una gran parte del ingreso familiar proviene de divisas enviadas por migrantes (García-Hernández y Tovar-García, 2012).

Presenta suelos que se han clasificado como Leptosoles, Vertisoles y Phaeozems (Siebe, 1998). En éstos, se desarrolla principalmente una vegetación nativa xerófila representada por mezquites (*Prosopis laevigata*), cactáceas (ej. garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*), biznaga (*Echinocactus platyacanthus*)) y algunos integrantes del género *Agave* y *Yucca*; aunque en mayor medida en zonas planas y en algunas otras, se ha desmontado la vegetación dando paso a la infraestructura agrícola con parcelas agrícolas y canales de riego (Rodarte García *et al.*, 2012).

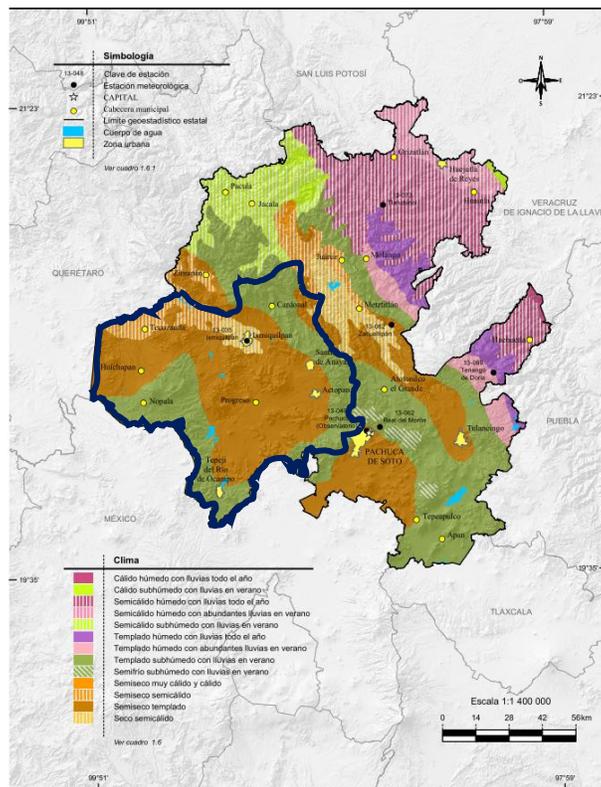


Figura 5 Climas del estado de Hidalgo.

Se muestra delimitado con línea azul el Valle del Mezquital. Tomado y modificado de INEGI, 2016.

El clima de esta región se clasifica como semiseco semicálido (BS1h) y semiseco templado (BS1k) (Figura 5). Presenta una temperatura media anual de 24 °C y una precipitación media anual de 350 a 500 mm repartidos entre junio a septiembre, con un cociente de P/T mayor a 22.9 (INEGI, 2016). En consecuencia, desde sus inicios como zona agrícola se buscó una fuente de agua alternativa, dada su poca disponibilidad natural en la zona y el aumento de la urbanización que demanda agua de mayor calidad, resultando así en el reúso de aguas residuales para uso agrícola.

Recurso hídrico en la actividad agrícola

En el Valle de Mezquital confluyen tres distritos de riego: el Distrito de Riego 003 Tula (DR-03), el Distrito de Riego 100 Alfajayucan (DR-100) y el Distrito de Riego Ajacuba (DR-112) (Siebe *et al.*, 2016). El área de riego de la zona cubre más de 900 km² (Siemens *et al.*, 2008); su principal fuente de abastecimiento son las aguas residuales no tratadas provenientes de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) con un volumen anual estimado de 1.6 millones de m³/año (Raschid-Sally y Jayakody, 2008; Siemens *et al.*, 2008; Burns, 2009).

El sistema de riego consta de nueve presas, de las que tres reciben aguas superficiales y las restantes sirven de depósito de aguas residuales tal como la presa Endhó y Requena (Fonseca-Salazar *et al.*, 2016; SEMARNAT, 2016). Los ríos Salado y el Salto forman parte del sistema al funcionar como recolectores de aguas residuales de la ZMVM transportadas por el Emisor Central, el Gran Canal del Desagüe y el Interceptor Poniente hacia el río Tula, que es el principal aporte de agua a las presas (Lesser-Carrillo *et al.*, 2011); en la Figura 6 se observan los principales componentes del sistema de riego en el Valle del Mezquital. Las aguas mezcladas de estas fuentes se distribuyen en una extensa red de canales de más de 850 km, en su mayoría abiertos, algunos con revestimiento y otros sin él, hacia las parcelas agrícolas (Lesser-Carrillo *et al.*, 2011; Fonseca-Salazar *et al.*, 2016; SEMARNAT, 2016). Los principales canales son El Salto-Tlamalco, de Fuerza, Dendhó, Endhó y Requena (Lesser-Carrillo *et al.*, 2011). Dentro de la región, el riego se realiza principalmente por inundación laminar o por surcos (Prado *et al.*, 2015).

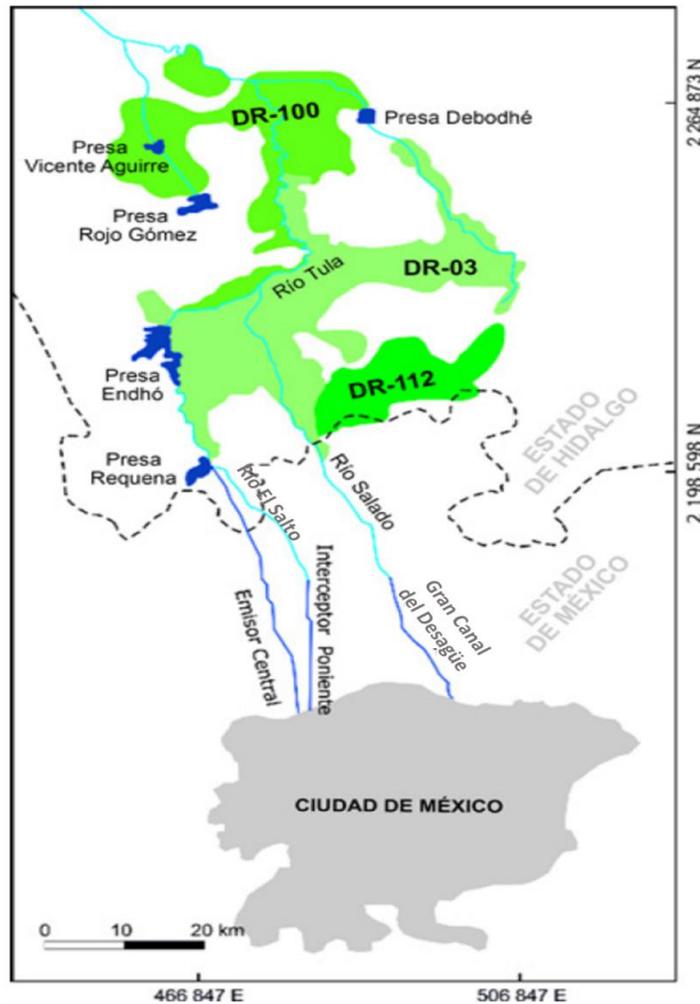


Figura 6 Principales componentes del sistema de riego en el Valle del Mezquital.

Distrito de Riego 003 Tula (DR-03), Distrito de Riego 100 Alfajayucan (DR-100) y Distrito de Riego Ajacuba (DR-112), en los tres se utilizan aguas residuales para riego agrícola. Tomado y modificado de Siebe *et al.*, 2016

El Valle del Mezquital es el área más grande en el mundo con riego de aguas residuales con una historia de riego de más de 100 años, comenzando en 1912 (Cruz Campa, 1965; Jiménez y Chávez, 2004; Siemens *et al.*, 2008; Dalkmann *et al.*, 2012).

El constante transporte, así como el intenso riego con agua residual, han generado la recarga de los acuíferos; lo que resultó en la elevación de los niveles piezométricos del agua del subsuelo por una infiltración 13 veces mayor a la recarga natural, originando así el afloramiento de manantiales con un flujo de 40 a 600 L/s (Jiménez *et al.*, 1999).

Río Tula

Hidrológicamente, el Valle del Mezquital se encuentra dentro de la Región Hidrológica Número 26 Pánuco que se divide en dos subregiones hidrológicas: Río Panuco y Valle de México – Río Tula. En este último se encuentra anexado la microcuenca del río Tula. Su origen hidrológico se encuentra en el cerro de la Bufa, siendo conocido en este sitio como río Tepeji o San Jerónimo. En sus inicios pasa por la presa Requena para llegar a la presa Endhó. Entre ambos puntos se anexan los afluentes de aguas residuales de la ZMVM transportados por los ríos El Salto y Salado. Cuando el río Tula recibe las aguas del río San Juan pasa a tomar el nombre de río Moctezuma (SEMARNAT, 2018).

Estudios microbianos en el Valle del Mezquital

En el Valle del Mezquital se sabe desde los noventas del riesgo a la salud por la exposición y uso de aguas residuales por la incidencia elevada de enfermedades entéricas en la población agrícola (Pérez *et al.*, 2009; Lara-Figueroa y García-Salazar, 2019). Sin embargo, son pocos los estudios que caracterizan a las aguas residuales desde un enfoque microbiológico, todos centrándose y encontrando la presencia de indicadores fecales y patógenos entéricos (Jiménez y Landa, 1998; Pérez *et al.*, 2009; Fonseca-Salazar *et al.*, 2016; Contreras *et al.*, 2017).

En los tres principales suelos del Valle del Mezquital, estudios anteriores han encontrado un aumento en la abundancia relativa de gamma-proteobacterias como *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacilli* y *Acinetobacter* spp. (Broszat *et al.*, 2014). Por otro lado, Friedel y colaboradores (2000) concluyeron que el riego a largo plazo (80 años) en suelos (Vertisoles y Leptosoles) conlleva un aumento significativo de la actividad deshidrogenasa y biomasa microbiana. Recientemente, se ha encontrado que la comunidad bacteriana de suelos regados con aguas residuales es susceptible a cambios ambientales a nivel taxonómico, pero funcionalmente resistente por la redundancia funcional de la comunidad (Lüneberg *et al.*, 2018).

El estudio con otros microorganismos como con hongos micorrízicos arbusculares ha revelado la inhibición de la esporulación y la alteración de su diversidad conllevando a su

disminución; sin embargo en este grupo también se observó una comunidad que se ha adaptado con el tiempo, siendo también funcionalmente resistente (Ortega-Larrocea *et al.*, 2001). También se ha documentado el riego prolongado con aguas residuales ha provocado un aumento del gen de resistencia *sulf1*, *int11*, *qacE* y una acumulación de sulfametoxazol, ciprofloxacina y carbamezepina (Dalkmann *et al.*, 2012; Jechalke *et al.*, 2015)

El Alberto

El Alberto es una comunidad hñahñu, con una superficie de 2224.30 ha (Elías-Lara, 2018), perteneciente al municipio de Ixmiquilpan, dentro de la región del Valle del Mezquital en Hidalgo, México (Figura 7). El Alberto de acuerdo con datos de la Secretaría de Bienestar antes SEDESOL (2010) tiene un grado de marginación alto con un tamaño poblacional de 834 habitantes. Su principal actividad económica es el ecoturismo, con el parque EcoAlberto conformado por la infraestructura de dos secciones: el Balneario y el Gran Cañón. En este último se realizan diversas actividades de aventura, como tirolesa, paseo en lancha por el río Tula y una caminata nocturna, que da un homenaje a los migrantes que cruzan la frontera (Elías-Lara, 2018).

En la comunidad afloran los manantiales conocidos por los habitantes como El Huanthe, La Presita, Toxhi, “Casa de Mario”, “Río Tula” y “Canal Parshall” que sirven como abastecimiento de servicios a el Balneario y el Gran Cañón (Elías-Lara, 2018). Algunos de ellos se usan como fuente de agua de riego en ciertas parcelas agrícolas. Al pertenecer al Valle de Mezquital, El Alberto no desarrolla una agricultura de temporal, usando así también, las aguas residuales que recibe del Distrito de Riego 003-Tula al que pertenece y las del río Tula que se encuentra dentro del perímetro del poblado. Los residentes cultivan principalmente para autoconsumo maíz, tomate, chile, calabaza, alfalfa, haba, y en menor cantidad cebolla, cilantro, ajo, perejil y yerbabuena.

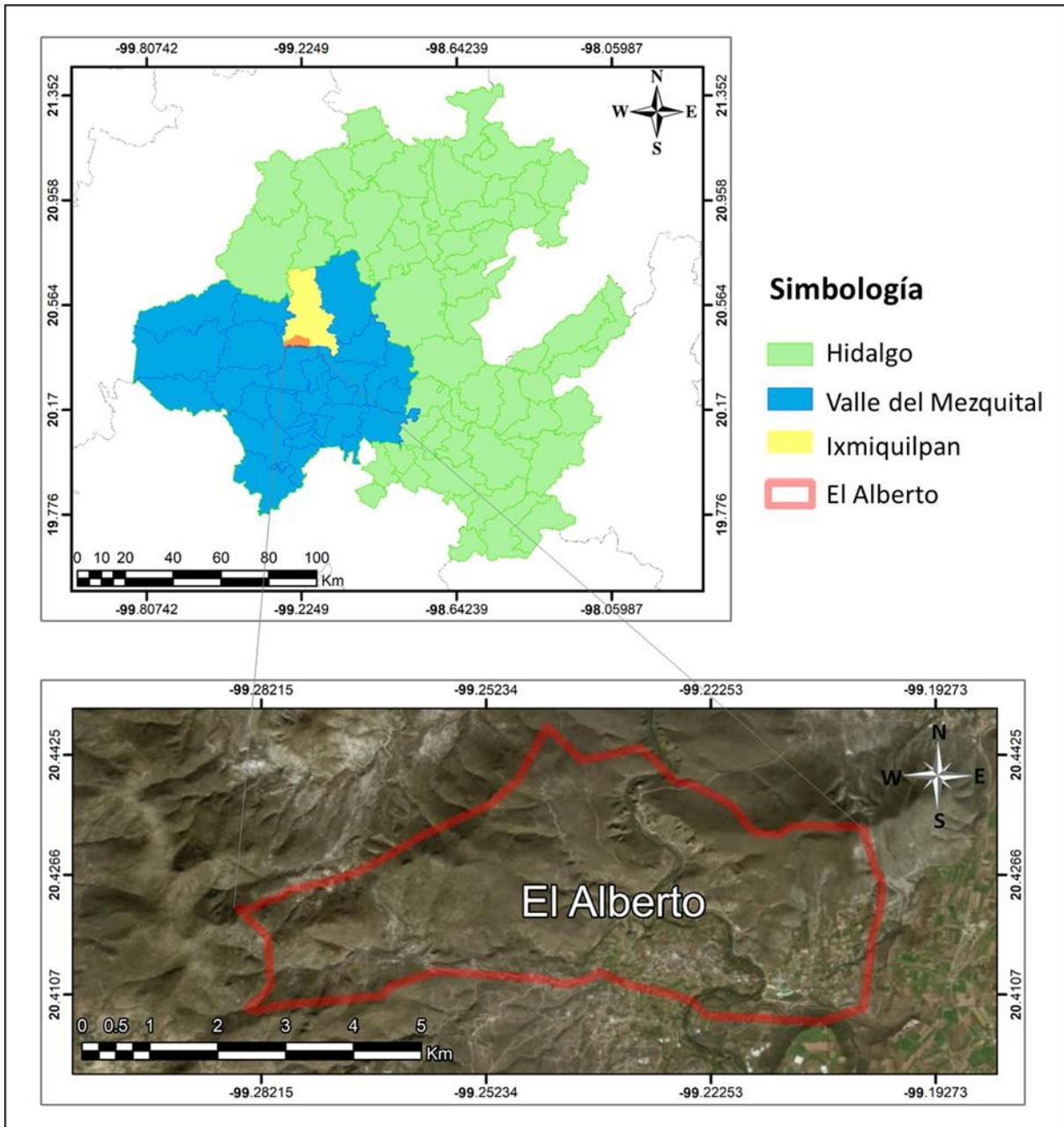


Figura 7 Ubicación de El Alberto

Estado de Hidalgo, con la región del Valle del Mezquital y el municipio de Ixmiquilpan; se destaca y amplía la comunidad de El Alberto. Elaboración propia con el software Arcgis 10.

JUSTIFICACIÓN

En el Valle del Mezquital, la agricultura principalmente es de riego dadas las condiciones ambientales. Las aguas de riego de esta zona son de distintas calidades, abasteciéndose de las disponibles del río Tula, del DR-03, DR-100 y DR-112 compuestas de aguas residuales y en algunos sitios de aguas subterráneas, que emergen como manantiales. La comunidad de El Alberto en Ixmiquilpan, Hidalgo hace uso de tres aguas de riego: manantiales, de río Tula y residuales provenientes de la presa Endhó.

La variedad de información acerca de los efectos de la calidad de riego en la diversidad del dominio Bacteria y de BOA, así como la escasa de información para el dominio Archaea y de BFN en suelos, y su impacto en la fertilidad hacen evidente la necesidad de una mayor investigación, principalmente en suelos que han sido regados con aguas residuales. Por lo tanto, los suelos agrícolas de El Alberto representan un buen escenario de estudio, al permitir la comparación de las comunidades microbianas en suelos regados con agua de manantial, agua de río Tula y agua residual.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar las comunidades microbianas de suelos agrícolas de El Alberto, Ixmiquilpan, Hidalgo regados con distintas calidades de pulso hidráulico: manantial, río Tula y residual.

Objetivos particulares

1. Determinar y comparar las características fisicoquímicas de fertilidad de suelos con riego de tres aguas de riego distintas, con los parámetros enlistados en la NOM-021-SEMARNAT-2000, además de nitrito, nitrato y amonio.
2. Determinar y comparar la calidad de las tres aguas de riego conforme a parámetros de calidad, elegidos de la NOM-001-SEMARNAT-1996.
3. Identificar y comparar la estructura microbiana total y funcional de los suelos agrícolas, antes y después de una temporada de riego, y también de las aguas de riego; a través del análisis del gen RNAr 16S (dominio Bacteria y Archaea), además de *nifH* y *amoA* para BFN y BOA, respectivamente; estudiados por huella genética (TGGE).
4. Determinar y comparar la riqueza ponderada de OTUs para Bacteria, Archaea, BFN y BOA de suelos agrícolas, antes y después de una temporada de riego, y las aguas de riego.

HIPÓTESIS

La calidad del pulso hidráulico de las aguas de riego modificará la estructura para la comunidad de bacteria y arquea, y de manera específica las comunidades funcionales de BFN y BOA en suelos agrícolas de El Alberto en Ixmiquilpan, Hidalgo, propiciado una fertilidad diferencial entre ellos, principalmente en términos de MO y compuestos nitrogenados.

1. El suelo con riego de agua residual tendrá una mayor fertilidad, en términos de MO y compuestos nitrogenados (amonio y nitrato), por los múltiples aportes orgánicos acarreados en el agua de riego.
2. La calidad fisicoquímica del agua del río Tula y la residual, será más similar que la del agua de manantial, ya que recibe aportes residuales. Sin embargo, la DQO indicará mayor concentración de MO para el agua residual.
3. La calidad semejante del agua residual y la del río Tula hará que la estructura total y funcional de las comunidades microbianas de los suelos agrícolas que son regados con estas aguas sean semejantes entre sí, y diferentes al suelo con riego con agua de manantial.
4. La diversidad en términos de riqueza ponderada de OTUs para BFN será mayor en los suelos con concentraciones bajas de nitrógeno, probablemente los de manantial; mientras que la riqueza de las BOA aumentará conforme asciende la disponibilidad de amonio en los suelos con riego de agua de río Tula y agua residual.

METODOLOGÍA

El trabajo de investigación teniendo como área de estudio a la comunidad de El Alberto, Ixmiquilpan consistió en tres etapas principales. En las primeras dos, se requirió caracterizar el estado de los suelos y las aguas de riego con determinaciones de parámetros fisicoquímicos para fertilidad y calidad, respectivamente. Finalmente se trabajó en el estudio de la estructura microbiana por huella genética con TGGE de ambos sistemas de estudio (suelos y aguas de riego). Para suelos se consideraron dos tiempos de estudio: “antes del riego” para la estructura microbiana específica de cada suelo de acuerdo con la calidad del pulso hidráulico tras varios años de historia de irrigación con un manejo agrícola, y “después del riego” para la dinámica microbiana luego de una temporada de riego. En la Figura 8 se muestra un esquema del flujo de trabajo.

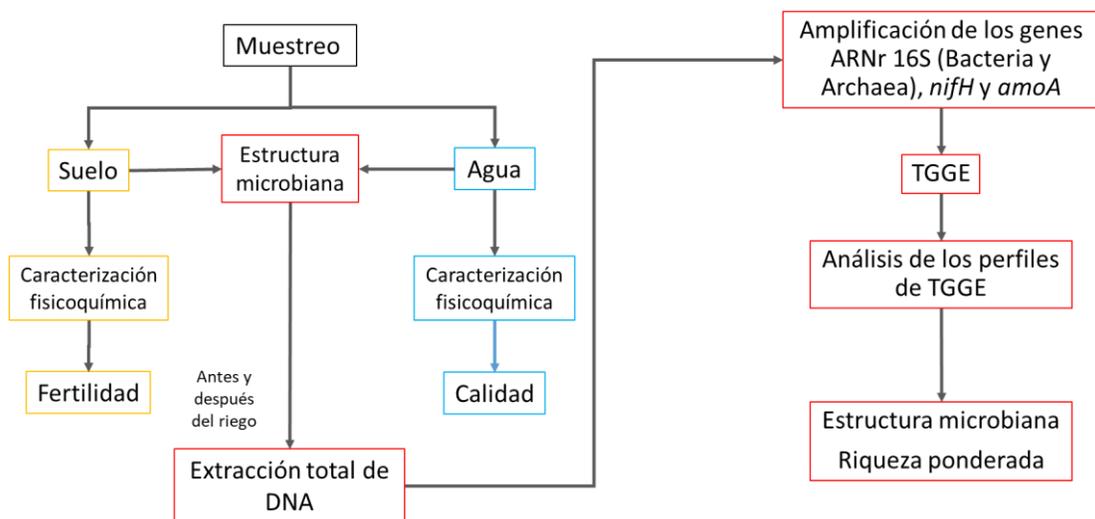


Figura 8 Esquema de trabajo para este proyecto de investigación.

Muestreo

Suelos

Los suelos de El Alberto son de tipo Vertisol (INEGI, 2005) y se eligieron porque se riegan con distintas aguas de riego: residual, río Tula y de manantial (subterránea). Se seleccionó un suelo agrícola de pequeña propiedad con una superficie de 1 – 2 ha por cada agua de riego, con el propósito de aminorar los factores que puedan interferir con la diversidad microbiana (como diferentes cultivos y prácticas de manejo), además de la dificultad de encontrar suelos con características semejantes, y un suelo control, sin riego de tierra comunal ubicada en un

área sin cambio de uso de suelo, es decir es un suelo conservado que solo recibe agua de lluvia, condición presente también en los suelos agrícolas.

Se realizaron dos jornadas de muestreo de suelos: la primera, en un tiempo sin riego en marzo de 2018, tiempo antes del riego y la segunda, en un tiempo tras la temporada de riego en junio del mismo año, tiempo después del riego. En la Figura 9 se muestra el aspecto de cada uno de los suelos al realizarse los muestreos, además de referir las características de cada uno.

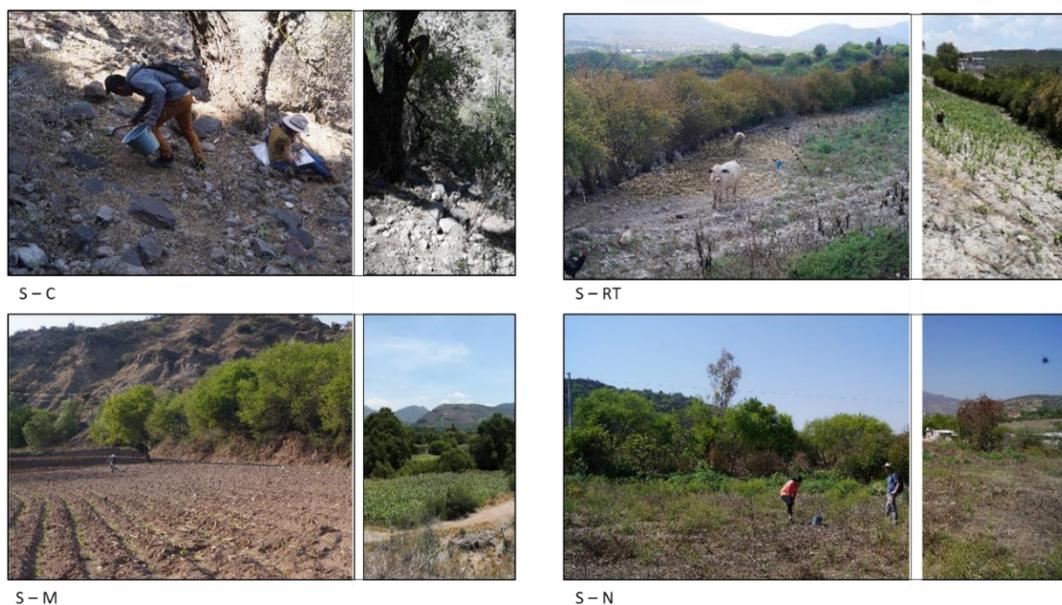


Figura 9 Aspecto del estado de cada suelo estudiado para el tiempo antes del riego (izquierda) y después del riego (derecha).

S-C: suelo en área conservada muy rocosa con presencia de *Prosopis laevigata* en una pendiente mayor a 20°. S-M: historia de riego de 22 años con agua de manantial, cercano al río Tula, adicionado con estiércol y urea. S-RT: historia de riego de 12 años con agua del río Tula, adicionado con estiércol y urea, además de la presencia de ganado. S-N: historia de riego de 40 años con agua residual, suelo en barbecho por lo menos 10 años y la presencia de ganado (Fotografías N. Cabirol y V. Martínez Martínez).

Para la recolección de muestras, se obtuvieron las autorizaciones pertinentes de los propietarios. El muestreo de cada suelo se realizó dividiendo cada parcela en tres cuadrantes, de cada uno de los cuales se tomó una muestra compuesta de 20 submuestras tomadas al azar, a una profundidad de 0 – 20 cm, evitando la zona rizosférica (de malezas y de maíz, frijol y chile para el tiempo después del riego), con un peso final aproximado de 1 kg. Se obtuvieron un total de tres muestras por suelo para cada agua de riego, por consiguiente 12 muestras por tiempo de estudio. Estas se transportaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas: suelo control sin riego o suelo conservado (S-C), suelo con riego

de agua de manantial (S-M), suelo con riego de agua de río Tula (S-RT) y suelo con riego de agua residual, de la presa Endhó (S-N), bajo condiciones de refrigeración al laboratorio de Edafología de la Facultad de Ciencias, UNAM, donde se procesaron para los distintos análisis. Las muestras para el estudio de estructura microbiana se mantuvieron a -70 °C hasta realizarse la extracción de DNA.

Aguas de riego

El sitio de muestreo para el agua de manantial correspondió al denominado “Canal Parshall” que pasa previamente por las albercas del balneario y que abastece a la parcela agrícola elegida. Este ha sido clasificado como tipo hipotermal de uso no energético, con reacción alcalina y helocreno (Ortega–Morgado, 2017). El agua de río Tula se recolectó en un canal de distribución dentro de El Alberto conocido como sifón, en donde hay una mayor cantidad de agua.

La recolección de agua de manantial y de río Tula para el estudio de estructura microbiana se realizó en tiempo de secas o estiaje (marzo de 2018); es importante mencionar que en este tiempo, el agua residual no llegó a la comunidad pues tuvo un tiempo de retraso por el inicio de operaciones de la PTAR Atotonilco, esto forzó a realizar el muestreo de esta agua de riego en época de lluvias (junio 2018) en la matriz receptora y distribuidora, la Presa Endhó en Tula de Allende la cual ya ha recibido aguas tratadas de la PTAR Atotonilco. De cada agua de riego de la porción media de cada reservorio se recolectaron 20 L de agua en un bidón que se transportó bajo refrigeración al laboratorio, para su procesamiento para el estudio de estructura microbiana.

Para el análisis de calidad de las aguas de riego, los análisis *in situ*, así como la recolección de muestras y su acidificación a pH <2 (para análisis fisicoquímico en laboratorio) se realizaron en el tiempo de lluvias (octubre de 2018) en los sitios antes detallados, observados en la Figura 10.



Figura 10 Aspecto del sitio de muestreo para cada agua de riego.

A-M: agua de riego de manantial, con presencia de trabajos de mantenimiento para el balneario; A-RT: agua de riego de río Tula, sifón, corresponde a un canal de distribución con agua desviada del río Tula; A-N: agua de riego residual, "Presas Endhó", el muestreo se realizó en el punto medio de la presa (Fotografías N. Cabirol y M. Córdoba Agudelo).

Los sitios de muestreo tanto de suelos como de las aguas de riego se observan en la Figura 11. En el *Anexo 1* se encuentran las coordenadas de los sitios de muestreo.

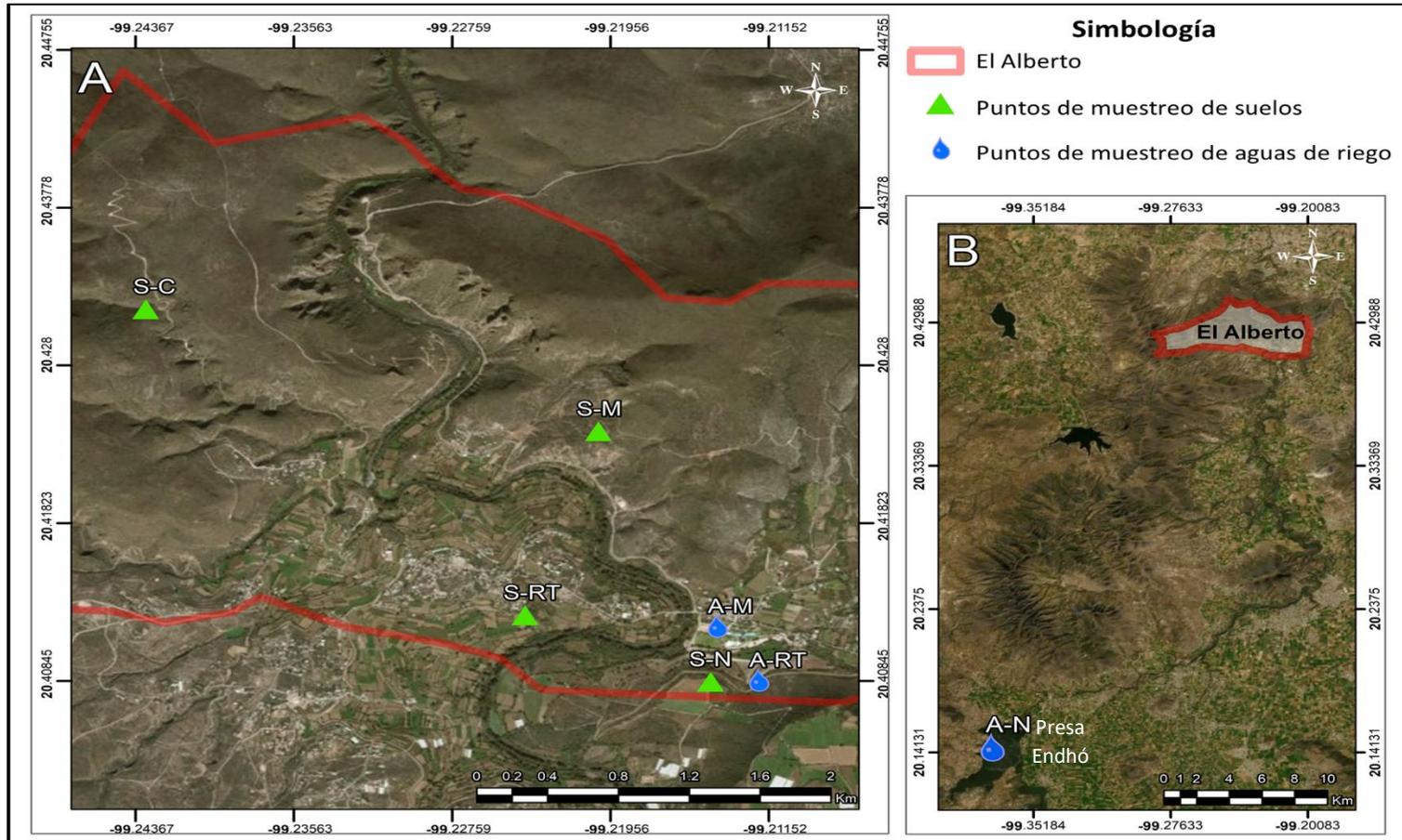


Figura 11 Sitios de muestreo.

A. Ubicación de los sitios de muestreo para los suelos de estudio y las aguas de riego de manantial y de río Tula dentro de El Alberto. **B:** referencia del sitio de muestreo del agua de riego residual en la presa Endhó respecto a la ubicación de El Alberto. S-C: suelo control sin riego, S-M: suelo con riego de agua de manantial, S-RT: suelo con riego de agua de río Tula, S-N: suelo con riego de agua residual, A-M: agua de riego de manantial, A-RT: agua de riego de río Tula y A-N: agua de riego residual. Elaboración propia con el software Arcgis 10.

Caracterización fisicoquímica de suelos y aguas de riego

Fertilidad de suelos

La determinación fisicoquímica de fertilidad para cada suelo se realizó con las tres muestras del tiempo antes del riego, es decir una $n = 3$ por cada suelo. En el laboratorio las muestras se procesaron para el análisis de algunas propiedades edáficas del suelo que señala la NOM-021-SEMARNAT-2000 (que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis) y mediciones de la concentración de NO_2^- , NO_3^- y NH_4^+ . En la Tabla 5 se muestra el listado de los parámetros seleccionados como indicadores de fertilidad, así como el método de análisis empleado.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos elegidos como indicadores de fertilidad.

	Análisis	Método
Físicas	Textura	Por el procedimiento de Bouyoucos; con una previa eliminación de materia orgánica, con el fin de eliminar los agregados y la floculación por cationes de calcio y magnesio, usando peróxido de hidrógeno al 30%.
	Densidad aparente	Con el método volumétrico o de la probeta, considerando los pesos de una probeta de 10 ml vacía y con suelo hasta la marca máxima de medición.
	Densidad real	A través del método del picnómetro considerando todos los componentes sólidos del suelo: minerales y materia orgánica.
	Contenido de humedad	Por el método gravimétrico. Realizando el cálculo del contenido de humedad en porcentaje con las mediciones realizadas inmediatamente tras la recolecta. Se utilizaron 5 g de suelo del cual se volvió a medir su peso seco tras 24 h a 105 °C en una mufla.
Químicas	pH	Medición por el procedimiento estándar electrométrico en agua destilada con una relación 1:2 (peso:volumen), usando un potenciómetro OHAUS STARTER modelo ST2100-F.
	Materia orgánica y carbono orgánico	Se empleó el método diseñado por Walkley y Black y nombrado de la misma forma que permite la obtención del porcentaje de materia orgánica y carbono orgánico, mediante la oxidación de carbono orgánico con dicromato de potasio y la adición de ácido sulfúrico concentrado valorando la solución con sulfato ferroso. El carbono orgánico se calculó dividiendo los valores de MO entre el factor de Van Benmelen (1.724), indicado en la norma oficial.
	Capacidad de intercambio catiónico	Se utilizó el método de Tiurea de Plata; se usó una solución de AgTU 0.01 M para la completa saturación de las cargas negativas de las partículas del suelo.
	Nitrógeno total	Por el método de Kjeldahl que consiste en la oxidación de la materia orgánica, para la liberación del nitrógeno orgánico, por la adición de ácido sulfúrico y una mezcla digestora (Na_2SO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y Selenio metálico) que actúa como catalizador en la digestión realizada en una unidad Buchi 426 y la seguida destilación de amonio con el equipo de destilación Buchi B-316, terminando con la valoración de la solución con HCl 0.01N.
	Nitrito Nitrato Amonio	Los compuestos nitrogenados se cuantificaron por fotometría a partir de un extracto de suelo con K_2SO_4 0.5 M, siguiendo el método modificado de Peña-López (2016). Se usó un analizador automático San Plus System-Skalar (R) en el laboratorio de Ecología Molecular, CINVESTAV, unidad Zacatenco.

Los análisis de contenido de humedad, NO_2^- , NO_3^- y NH_4^+ se realizaron inmediatamente después del muestreo. Para los demás parámetros se requirió que las muestras se secaran, colocándolas en un lugar cerrado durante 48 h, se homogenizaron y tamizaron por un tamiz metálico de malla de 2 mm.

Calidad de las aguas de riego

La calidad de las tres aguas de riego se estudió analizando distintos parámetros que dictamina la NOM-01-SEMARNAT-1996 (que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales) y otros parámetros fisicoquímicos seleccionados (Tabla 6).

Se midieron *in situ* diez parámetros fisicoquímicos (Tabla 6), en cada punto de muestreo, usando un equipo multiparamétrico portátil HANNA modelo HI9829. En cuanto a la determinación de nitrógeno total (NT), sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos sedimentables (SSe) estas se realizaron a través del laboratorio acreditado IDECA, S. A. de C.V. Por otro lado, el estudio de las concentraciones de nitrógeno amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$), NO_2^- , NO_3^- y Demanda Química de Oxígeno (DQO) se realizó en el laboratorio con las muestras de agua acidificadas y transportadas bajo refrigeración dentro de las 48 h tras el muestreo, usando un fotómetro multiparamétrico HANNA modelo 83099 y los respectivos reactivos de detección HANNA.

Tabla 6. Parámetros de calidad de agua elegidos.

Parámetro	NOM-01- SEMARNAT-1996	Sitio de análisis	Método
Temperatura (T)	*	<i>in situ</i>	
pH		<i>in situ</i>	
Potencial Oxido reducción (ORP)		<i>in situ</i>	
Conductividad Eléctrica (EC)		<i>in situ</i>	
Resistividad Eléctrica (RES)		<i>in situ</i>	
Sólidos Disueltos Totales (TDS)		<i>in situ</i>	
Salinidad		<i>in situ</i>	
Presión atmosférica		<i>in situ</i>	
Oxígeno Disuelto (O.D.)		<i>in situ</i>	Norma 4500-AG, EPA 360.1
Turbidez (Turb)		<i>in situ</i>	
Nitrógeno Total (NT)	*	IDECA, S. A. de C. V	EPA-351 .2-1993
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	*	IDECA, S. A. de C. V	NMX-AA-034-SCFI-2015
Sólidos Sedimentables (SSe)	*	IDECA, S. A. de C. V	NMX-AA-004-SCFI-2013
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	*	Laboratorio	Adaptación del método 410.4 de la EPA.
Nitrógeno amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$)		Laboratorio	Adaptación del método de Nessler
Nitrito (NO_2^-)		Laboratorio	Adaptación del método 354.1 de diazotización de la EPA
Nitrato (NO_3^-)		Laboratorio	Adaptación del método de reducción de cadmio.

Análisis de datos fisicoquímicos

En primera instancia los datos de cada variable fisicoquímica tanto de suelos como de aguas de riego se examinaron con un análisis descriptivo, en el cual se visualizaron gráficamente y se calcularon medidas de tendencia central y de dispersión. Los datos se sometieron a análisis de normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Prueba de Levene). Posteriormente, se llevó a cabo un análisis comparativo entre grupos para cada variable con un análisis de varianzas (ANOVA), sea suelos o aguas de riego. En los casos en los que se determinó diferencias significativas se realizaron pruebas post hoc: Tukey – Kramer. También se realizó una prueba de *t* de Student de una vía a la derecha para investigar si los datos encontrados de S-N son mayores a S-RT. Todos los análisis se realizaron en el software NCSS (2007), con un nivel de significancia de 0.05.

Estructura y dinámica microbiana

El estudio de la estructura microbiana tanto de suelos (24 muestras: 12 antes del riego y 12 después del riego) como de las tres aguas de riego consistió en orden cronológico en: la extracción total de DNA; la amplificación por PCR de los genes RNAr 16S dominio Bacteria y Archaea, *nifH* para BFN y *amoA* para BOA; la separación de los productos de PCR por electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) y el análisis de los perfiles de TGGE para la obtención de unidades taxonómicas operacionales (OTUs).

Extracción de DNA total

Suelos

El DNA de cada muestra de suelo se extrajo utilizando tres protocolos: kit *Power Soil Isolation DNA* (MO BIO®) siguiendo las instrucciones del fabricante, Cabirol *et al.*, 1998 y Valenzuela-Encinas *et al.*, 2008. En cada método, se procesó 1 g de suelo. El DNA obtenido de los tres protocolos de extracción para cada muestra se mezcló en un pool, el cual se empleó como molde para las amplificaciones de los genes de interés.

Aguas de riego

La porción microbiana se concentró por ultrafiltración en filtros de membrana tipo GVWP (mezcla de esteres de celulosa, acetato de celulosa y nitrato de celulosa) con un tamaño de

poro de 0.22 μm . Por cada agua de riego se hicieron nueve filtrados de 1 L de agua, congelando inmediatamente los filtros a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta realizarse la extracción de DNA. Para las aguas de riego la extracción de DNA se realizó con el protocolo descrito por Rusch y colaboradores (2007) con algunas modificaciones (*Anexo 2*), además del referido en el trabajo de Cabirol y colaboradores (1998); en ambos se procesaron tres filtros por agua de riego, al final estos se mezclaron para obtener tres pools de DNA, es decir, manantial, río Tula y residual que se emplearon en las amplificaciones. Para verificar la calidad de las extracciones de DNA (suelos y aguas de riego) se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa 0.8% a 80 V por 30 min.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación dirigida de DNA se realizó empleando los cebadores específicos para los genes de interés que se muestran en la Tabla 7. Estos se seleccionaron con base a la literatura más reciente en las técnicas de huella genética o bien, a un mayor predominio de uso.

Para la obtención de cada fragmento específico con una grapa de GC (permite mantener unida la doble cadena de DNA durante su disociación y así detener su migración en el gel) requerido para la ejecución de la TGGE, se realizaron dos rondas de amplificación, es decir, una PCR anidada que evita el cebado no específico. En la primera, se usaron los cebadores forward y reverse específicos de cada gen, del producto obtenido, 1 μl se usó como molde para la segunda PCR, donde el cebador forward en su extremo 5' contenía la grapa GC. En ambas, la mezcla de reacción tuvo un volumen final de 50 μl en los que se encontraban adicionados cebadores correspondientes a cada gen (Tabla 7) a una concentración final de 20 pM, dNTPs al 200 μM , buffer 10X, MgCl_2 al 1.5 mM y 1 U de polimerasa (Taq DNA Polymerasa (recombinat) (Thermo Scientific)); en el caso de la primera PCR se añadieron aproximadamente 50 ng de DNA. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador T100TM marca BioRad. Las condiciones de amplificación para ambas PCRs por gen fueron las mismas las cuales se muestran en la Tabla 8.

Finalmente, los productos de PCR se corroboraron a través de una electroforesis en gel de agarosa 2% a 70 V por 90 min.

Tabla 7 Cabadores específicos empleados en las PCRs para los genes de interés.

Objetivo y gen de interés	Cebador/ Posición	Secuencia (5'-3') ^e	Tamaño de fragmento (pb)	Referencia
Diversidad total de Bacteria: <i>RNAr 16S</i> Universal V3-V5	GM5F/341 – 357 ^a	cctacgggaggcagcag	585	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
	GM5F GC/341 – 357 ^a	cgcccgcgcgccccgcgccgtccgcgccccccccctacgggaggcagcag		Muyzer <i>et al.</i> , 1993
	907R/907 – 927 ^a	ccgtcaattcctttragttt		Muyzer <i>et al.</i> , 1995
Diversidad total de Archaea: <i>RNAr 16S</i> Universal V6-V8	ARC915F/915 – 934 ^b	aggaattggcggggagcac	492	Bundt <i>et al.</i> , 2001
	ARCH-915F GC/915 – 934 ^b	cgcccgcgcgcggcgggcggggcggggcagggaattggcgggggagcac		Kleikemper <i>et al.</i> , 2005
	Uni-b-rev/1390 – 140 ^b	gacggggcgtgtgtrcaa		Bundt <i>et al.</i> , 2001
Diversidad funcional: Fijación de nitrógeno, BFN → nitrogenasa <i>nifH</i>	PolF/115 – 134C	tgcgayccsaargcbgactc	360	Poly <i>et al.</i> , 2001
	PolF GC/ 115 – 134C	cgcccgcgcgcggcgggcggggcggggcacggggggtgcgayccsaargcbgactc		Zhang <i>et al.</i> , 2008
	PolR/457 – 476 ^c	atsgccatcatytrccgga		Poly <i>et al.</i> , 2001
Diversidad funcional: Nitrificación etapa 1 BOA → unidad alfa de la amonio monooxigenasa (<i>amoA</i>)	<i>amoA</i> 1F/332 – 349 ^d	ggggttttactgtgtgt	531	Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997
	<i>amoA</i> 1F GC ^d	cgcccgcgcgcggcgggcggggcggggcagggaacggggggggggttttactgtgtgt		
	<i>amoA</i> 2R/802 – 822 ^d	cccctckgsaaagccttcttc		

Posición relativa con referencia a la secuencia de los genes de estudio en: ^a *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1981), ^b *Escherichia coli* (Yu *et al.*, 2008), ^c *Azotobacter vinelandii* (M20568) (Jacobson *et al.*, 1989), ^d *Nitrosomonas europaea* (L08050) (Rotthauwe *et al.*, 1997). e Secuencias conforme a los códigos de ambigüedad de la nomenclatura IUPAC: Y = C, T; R = A, G; K = G, T; S = G, C; W = A, T; M = A, C; H = A, C, T; V = G, C, A; N = A, C, G, T; D = G, A, T; B = G, T, C.

Tabla 8. Condiciones de PCR para cada gen de estudio.

	<i>RNAr 16S</i> Bacteria		<i>RNAr 16S</i> Arquea		<i>nifH</i>		<i>amoA</i>	
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	94 °C	7 min	95 °C	5 min	95 °C	5 min
Desnaturalización	94 °C	45 s	94 °C	30 s	94 °C	30 s	95 °C	60 s
Hibridación	70 °C ↓ (1) 60 °C (2)	60 s	70 °C ↓ (1) 65 °C (2)	30 s	55 °C	30 s	57 °C	60 s
Extensión	72 °C	45 s	72 °C	60 s	72 °C	30 s	72 °C	45 s
Extensión final	72 °C	7 min	72 °C	7 min	72 °C	10 min	72 °C	5 min
Referencia	Muyzer <i>et al.</i> , 1995		Gómez-Silván <i>et al.</i> , 2010		Zhang <i>et al.</i> , 2008		Ndour <i>et al.</i> , 2008	

↓ Decremento de 0.5 °C por ciclo.

Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura (TGGE)

Los productos de PCR con grapa GC de cada gen y para cada muestra (15 µl) se analizaron separándolos con TGGE, usando un Sistema Universal de Detección de Mutaciones DCode™ (BioRad Laboratories). Para los cuatro genes se realizaron geles de poliacrilamida (acrilamida/bis 37.5:1) al 6% (p/v) con una concentración uniforme de urea, 6 M. Por cada muestra se realizaron tres corridas. Todas las electroforesis tuvieron una duración de 6 h a 60 V. El gradiente de temperatura desnaturalizante para cada gen se optimizó con corridas previas para detectar el intervalo de temperatura óptimo, los gradientes elegidos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Gradientes de temperatura empleados en TGGE

Gen	Gradiente de temperatura (°C)
RNAr 16S Bacteria	38 – 45
RNAr 16S Arquea	41 – 57
<i>nifH</i>	43 – 56
<i>amoA</i>	40 – 56

Los geles se tiñeron en una solución de Gelred® 3X durante 90 min y se documentaron en un sistema de fotodocumentación UV GelDoc XR+ (BioRad Laboratories). Algunas bandas frecuentes, únicas en el patrón y otras con intensidad resaltante (datos no mostrados) se cortaron de los geles con un bisturí estéril. Posteriormente se eluyeron en 20 µl de agua grado biología molecular durante 24 h a 4 °C y finalmente se resguardaron a -20 °C, para su posible posterior reamplificación y secuenciación.

Análisis de datos de huella genética

Los patrones de bandeo, huella genética, de cada gel se analizaron (normalizaron, compararon y agruparon) con el software BioNumerics 7.6 (Applied Maths). Las bandas se detectaron automáticamente, auxiliado por correcciones manuales permitidas en el software.

El patrón de bandas se determina por la variabilidad en la concentración de GC de cada muestra para cada gen, tanto en términos de porcentaje como por la posición de fragmentos de GC, dependiendo de la variabilidad genética y de la capacidad de carga específica del ambiente estudiado; esta concentración en los genes puede variar entre el 45 y 65%

(Marzorati *et al.*, 2008). Por tanto, el contenido de GC de cada fragmento es útil para estudiar la biodiversidad y dinámica de una comunidad microbiana, aún sin haber correlación taxonómica directa (Apajalahti *et al.*, 2001; Marzorati *et al.*, 2008). Marzorati y colaboradores (2008) expresaron matemáticamente lo antes referido en el índice de riqueza ponderada por rango (R_r), el cual se calculó para cada suelo y agua de riego para todos los genes. Se debe considerar, que la obtención del índice R_r se realiza con el número total de bandas presentes en cada patrón; asumiendo cada una, como una Unidad Taxonómica Operacional (OTU) es decir un filotipo. En consecuencia, R_r proporciona la riqueza ponderada por rango de OTUs. Un valor de R_r menor a 10 se considera una riqueza ponderada por rango baja, propia de entornos adversos o restringidos a ser colonizados, con valores entre 10 y 30 se considera una riqueza media, mientras que un valor mayor a 30 representa una riqueza ponderada por rango alta, característico de ambientes muy habitables y con una gran capacidad de carga (Marzorati *et al.*, 2008). Para mayor detalle del cálculo de R_r referirse al *Anexo 3*.

Con los valores de R_r se realizó un análisis descriptivo, calculando la media y el error estándar de la media. Para el análisis comparativo entre grupos se usó como prueba estadística el análisis de varianzas (ANOVA), realizando el análisis para suelos dentro de un mismo tiempo (antes y después del riego por separado) y para aguas de riego; en los casos de diferencia significativa se utilizó como prueba *post hoc* el análisis de Tukey – Kramer. Con el fin de encontrar un posible cambio de riqueza ponderada entre tiempos de estudio (dinámica), se realizó una prueba de t de Student pareada entre tiempos de riego en un mismo suelo. Todos los análisis se realizaron con el software NCSS (2007), con un nivel de significancia de 0.05.

La estructura microbiana obtenida de los perfiles de bandeo de TGGE se comparó con un análisis de conglomerados calculando cuatro matrices de similitud por gen, haciendo las siguientes comparaciones: aguas de riego, muestras antes del riego más aguas de riego, muestras después del riego más aguas de riego y muestras de ambos tiempos más aguas de riego. Para ello se usó un coeficiente de correlación basado en la presencia/ausencia de bandas, coeficiente DICE. En la construcción de dendogramas se utilizó el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*).

RESULTADOS

Fertilidad de suelos

A continuación, en la Tabla 10, se presentan los resultados obtenidos para los parámetros fisicoquímicos indicadores de fertilidad de los tres suelos agrícolas regados cada uno con un agua de riego distinta y el suelo control sin riego, además de las diferencias significativas encontradas entre suelos.

Tabla 10 Parámetros fisicoquímicos indicadores de fertilidad para el suelo sin riego y los suelos regados con diferentes aguas de riego.

Parámetros indicadores de fertilidad de suelos													
Suelo	Textura	DA (g/cm ³)	DR (g/cm ³)	W (%)	pH	MO (%)	Corg (%)	CIC (Cmol (+) kg ⁻¹)	NT (%)	C:N	NH ₄ ⁺ (mg/kg)	NO ₂ ⁻ (mg/kg)	NO ₃ ⁻ (mg/kg)
S-C	Arenoso franco	1.13	2.19	7.18	6.06	16.02	9.29	5.08	0.59 ±	15.62	5.40	0.07	15.49
		± 0.02	± 0.08	± 0.68	± 0.23	± 5.03	± 2.91	± 1.33	0.18		± 0.38	± 1.26	± 0.01
		B			D	A	A	A	A		A	B	B
S-M	Franco arcillo arenoso	1.25	2.27	15.15	8.05	1.89	1.10	0.14	0.10 ±	10.72	0.57	0.09	14.72
		± 0.01	± 0.12	± 7.41	± 0.06	± 0.29	± 0.17	± 0.03	0.02		± 2.02	± 0.21	± 0.07
		A			AB	D	D	C	C		B	B	B
S-RT	Arcilloso	1.09 ±	2.27	13.73	8.30	2.94	1.70	0.23	0.20 ±	8.83	0.95	0.25	7.65
		0.01	± 0.08	± 1.07	± 0.030	± 0.31	± 0.18	± 0.03	0.02		± 1.81	± 0.24	± 0.03
		C			AB	C	C	C	B		B	A	C
S-N	Franco arcillo arenoso	1.06 ±	2.45	14.06	7.54	8.78	5.09	2.30	0.48	10.74	0.71	0.29	28.38
		0.01	± 0.25	± 1.39	± 0.14	± 0.35	± 0.20	± 0.09	± 0.05		± 1.17	± 0.29	± 0.09
		C			C	B	B	A	A		B	A	A
S-N>S-RT * * * *													

Se muestra la media y la desviación estándar de las tres muestras de suelo para cada parámetro, n=3. Suelos sin letra en común son significativamente diferentes (Tukey-Kramer; α=0.05). * denota los parámetros en los cuales fue mayor S-N a S-RT (t de Student; α=0.05). (Tablas estadística en el Anexo 5).
 Densidad Aparente (DA), Densidad Real (DR), contenido de humedad (W), Materia Orgánica (MO), Carbono orgánico (Corg), Nitrógeno Total (NT), amonio (NH₄⁺), Nitrito (NO₂⁻), Nitrato (NO₃⁻); suelo control (S-C), suelo con riego de agua de manantial (S-M), suelo con riego de agua de río Tula (S-RT) y suelo con riego de agua residual (S-N).
 Bajo Medio Alto Muy Moderadamente Moderadamente Los valores de referencia de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 se muestran en el Anexo 4.
 alto ácido alcalino.

La textura para los suelos no se restringió a una sola clase textural: para S-C fue arenoso franco, franco arcillo arenoso para S-M y S-N, mientras que el suelo con riego de agua de río Tula resultó ser arcilloso.

La densidad aparente para los cuatro suelos fue baja; los suelos con riego difirieron estadísticamente a S-C; sin embargo, S-RT y S-N no fueron diferentes. En el caso de densidad real, no se encontraron diferencias significativas. Entre los cuatro suelos analizados, el suelo con riego de manantial tiene un mayor porcentaje de humedad con un valor de 15.15%. Sin embargo, no hay una diferencia estadística con S-C donde se obtuvo el menor valor, 7.18%.

De acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000, el pH fue moderadamente alcalino para todos los suelos con riego con un valor máximo de 8.30 en S-RT. Resultaron ser estadísticamente diferentes al suelo sin riego que resultó ser moderadamente ácido, 6.06.

La Capacidad en Intercambio Catiónico (CIC) resultó ser en todos los suelos muy baja (menor a 5 Cmol (+) kg⁻¹) con referencia a la NOM-021-SEMARNAT-2000. El valor más alto se obtuvo en S-C siendo estadísticamente diferente a los suelos con riego, no hubo diferencia estadística entre S-M y S-RT.

Al comparar los suelos en porcentaje de MO y Corg, los suelos con riego resultaron ser estadísticamente distintos al suelo sin riego y diferentes entre ellos. En cuanto al porcentaje de (MO), estos se clasifican por la misma norma como muy altos para S-C y S-N, a pesar de ello el primero mencionado es cerca de dos veces mayor; tanto para S-RT y S-M, los valores son medios en el rango, aun así, es mayor en S-RT.

El nitrógeno total entre los distintos suelos varió entre muy alto para S-C y S-N según la NOM-021-SEMARNAT-2000, alto para S-RT y medio para S-M representando el 17.36% del NT total de S-C. Tanto S-M y S-RT fueron estadísticamente diferentes entre ellos y a los suelos S-C y S-N, los cuales no resultaron ser diferentes entre sí. El suelo sin riego tuvo el mayor porcentaje de MO y NT mientras que los valores menores se presentaron en S-M (Figura 12).

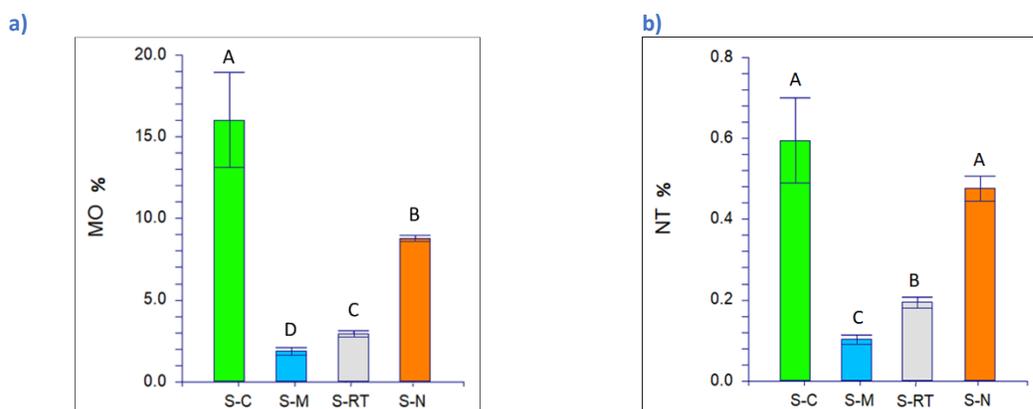


Figura 12 a) Porcentaje de materia orgánica en suelos. b) Porcentajes de nitrógeno total en suelos. Suelos sin letra en común son significativamente diferentes (Tukey-Kramer; $\alpha=0.05$). S-C: suelo control sin riego, S-M: suelo con riego de agua de manantial, S-RT: suelo con riego de agua de río Tula, S-N: suelo con riego de agua residual.

El amonio resultó ser mayor en S-C y menor en S-M (Figura 13 a); la diferencia fue significativa para todos los suelos con riego con relación a S-C, pero no fueron diferentes entre sí. Los nitritos para S-RT y S-N mostraron diferencia significativa al suelo sin riego que obtuvo un valor promedio de 0.07 mg/kg siendo el menor entre los cuatro suelos; sin embargo, al comparar S-RT y S-N no fueron diferentes. En cuanto a nitrato, en S-N, se presentó la mayor concentración promedio seguida por el suelo sin riego con valores de 28.38 mg/kg y 15.49 mg/kg, respectivamente (Figura 13 b); no se encontró diferencia significativa entre S-C y S-M, pero si para S-RT y S-N con respecto a todos los suelos.

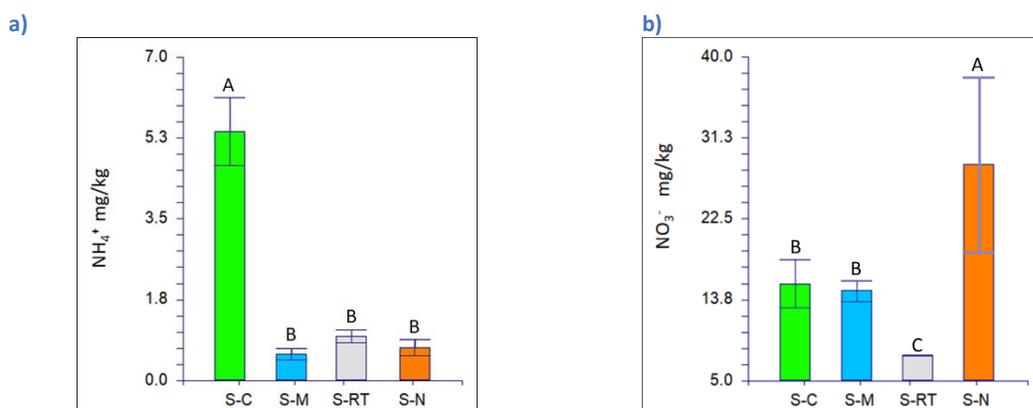


Figura 13 a) Concentraciones de amonio en suelos b) concentración de nitrato en suelos.

Suelos sin letra en común son significativamente diferentes (Tukey-Kramer; $\alpha=0.05$). S-C: suelo control sin riego, S-M: suelo con riego de agua de manantial, S-RT: suelo con riego de agua de río Tula, S-N: suelo con riego de agua residual.

El análisis de *t* de Student indicó que S-N es mayor y distinto significativamente a S-RT para MO, Corg y NT (Tabla 10).

Calidad de las aguas de riego

La calidad hídrica estudiada por parámetros fisicoquímicos da un panorama del estado general en el que se encuentra un cuerpo de agua (Akinyemi y Souley, 2014; De La Mora-Orozco *et al.*, 2017): en el ámbito agrícola es importante evaluar su idoneidad para uso de riego agrícola. En México son pocos los límites establecidos de parámetros fisicoquímicos para la calificación de la calidad de agua con uso agrícola, por ello, también se toman en consideración los límites permisibles de protección a la vida acuática con base en la Ley Federal de Derechos (LFD) y otras normativas. Los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos indicadores de calidad de agua para las tres aguas de riego se muestran en la

Tabla 11, así también en ella, se presentan los parámetros en los que se encontraron diferencias significativas entre las aguas de riego.

El pH en todas las aguas de riego resultó ser ligeramente alcalino sin rebasar los límites permisibles con un valor máximo de 7.58 en A-RT. No se encontró evidencia de diferencia entre A-M y A-RT y si para A-RT, A-M respecto a A-N.

La transparencia de A-M fue visualmente mayor a la observada en A-RT y A-N; en este último la profundidad máxima del disco de Secchi fue de 20 cm. Los SST fueron mayores en A-N, seguido por A-RT y A-M. Para todas las aguas de riego, la turbidez y los TDS fueron significativamente diferente entre ellas. La turbidez fue menor en A-M seguido de A-RT y A-N; en tanto que los TDS en todas las aguas de riego rebasaron el límite permisible estipulado para el uso 2 correspondiente al riego agrícola, en las Disposiciones Aplicables en Materia de Aguas Nacionales de la Ley Federal de Derechos (CONAGUA, 2016), siendo menor en A-N seguido de A-M y A-RT.

Para conductividad eléctrica y salinidad, las aguas de riego mostraron diferencias significativas entre ellas; para A-RT, se obtuvieron los mayores valores, 2235 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 1.15 PSU, y en A-N los menores valores, 1499.33 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 0.75 PSU.

Tabla 11. Mediciones de los parámetros de calidad en las aguas de riego para uso agrícola en El AlBERTO.

	Manantial (A-M)	Río Tula (A-RT)	Residual (A-N)	Límites permisibles	Estudios anteriores		
					Manantial	Río Tula	Residual
T (°C)	32.35 ± 0.01 A	21.73 ± 0.01 B	21.17 ± 0.01 C	40 ^a , 18 -- ^b , 35 ^d 5 – 10 ^a , 7.2 – 7.6 ^b , 6.5 – 8.5 ^c , 6.5 – 8.5 ^d , 6 – 9 ^e		19.4 (2)	21.0 (2)
pH	7.58 ± 0.06 A	7.66 ± 0.09 A	7.40 ± 0.02 B				
ORP. (mV)	139.00 ± 6.75 A	147.23 ± 1.79 A	-122.73 ± 8.69 B	-			
EC. (µS/cm)	1873.00 ± 4.36 B	2235.00 ± 3.61 A	1499.33 ± 1.53 C	-			1426 (4)
RES. (Ω*cm)	533.67 ± 1.15 B	447.67 ± 0.58 C	667.00 ± 1.00 A	-			
TDS. (ppm)	936.67 ± 2.31 B	1117.33 ± 1.53 A	749.33 ± 0.58 C	500 ^e		1.47 (2)	1.24 (2)
Salinidad (PSU)	0.94 ± 0.00 B	1.15 ± 0.00 A	0.75 ± 0.00 C	-			
Press (atm)	0.82 ± 0.00	0.81 ± 0.00	0.80 ± 0.00	-			
O.D. (mg/L)	5.16 ± 0.07 B	6.75 ± 0.05 A	3.25 ± 0.15 C	5 ^f	2.03 (1)	1.16 (2), 4.39 (1)	1.41 (2), 0.05 (4), 1.71 (1), 2.66 (6)
Turb. (FNU)	2.47 ± 0.21 C	31.47 ± 1.23 B	51.03 ± 1.56 A	5(UTN) ^b , 5 UTN ^c			
SSE (mg/L)	< 0.1 ± 0.00	< 0.1 ± 0.00	< 0.1 ± 0.00	1 ml/L ^{a,d}			
SST (mg/L)	< 10 ± 0.00	12.50 ± 0.71	58 ± 0.00	75 ^{a,d} , 50 ^e , 30 ^f			36 (5)
NT (mg/L)	2.77 ± 1.06 C	3.70 ± 2.48 B	11.28 ± 5.36 A	40 ^a , 20 ^d		0.004 (3)	7.85 (6)
NH ₄ ⁺ (mg/L)	0.17 ± 0.03 C	10.50 ± 0.09 B	17.00 ± 0.70 A				
NH ₃ -N (mg/L)	0.13 ± 0.03 C	8.14 ± 0.07 B	13.20 ± 0.53 A	0.5 ^d , 0.06 ^f	0.125 (1)	8.55 (1)	19.4 (4), 56.33 (1), 3.21(6)
NO ₂ ⁻ (mg/L)	0.06 ± 0.02 B	3.27 ± 0.25 A	0.03 ± 0.01 B	-	0.018 (1)	0.37 (1)	0.007 (1)
NO ₃ ⁻ (mg/L)	42.27 ± 9.14 A	27.87 ± 1.05 B	5.27 ± 3.11 C	-	0.350 (1)	0.73 (1)	1.03 (4), 0.83 (1)
DQO (mg/L)	0.33 ± 0.58 B	28.67 ± 9.87 A	42.33 ± 4.93 A		<10 (1)	36.00 (1)	29.00 (1), 69.20 (5), 63.96 (6)

Aguas de riego sin letra mayúsculas en común en una misma fila son significativamente diferentes (Tukey-Kramer; $\alpha=0.05$); tabla estadística en el Anexo 6. Se muestra la media y la desviación estándar para cada agua de riego a partir de tres mediciones por parámetro. T: Temperatura, ORP: Potencial de Oxido Reducción, EC: Conductividad Eléctrica, RES: Resistividad Eléctrica, TDS: Sólidos Disueltos Totales, O.D.: Oxígeno Disuelto, Turb: Turbidez, NT: Nitrógeno total, SST: Sólidos Suspendidos Totales, SSE: Sólidos Sedimentables, DQO: Demanda Química de Oxígeno, NH₃-N: Nitrógeno amoniacal, NO₂⁻: Nitrito, NO₃⁻: Nitrito. Se presentan los límites permisibles fijados en diferentes normativas: **a**: NOM-001-SEMARNAT-1996. Límites máximos permisibles para embalses naturales o artificiales con uso en riego agrícola. **b**: Norma técnica sanitaria para balnearios, parques acuáticos y establecimientos que cuenten con alberca 2008. **c**: NOM-245-SSA1-2010. Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas. **d**: Norma de calidad del agua y control de descargas. República Dominicana. 2001. Valores máximos para aguas superficiales clase A (aguas con fines agrícolas y uso recreativo). **e**: Ley Federal de Derechos. Agua, Disposiciones de Uso 2 correspondiente al riego agrícola (CONAGUA, 2016). **f**: Ley Federal de Derechos. Agua, Disposiciones de Uso 3 correspondiente a la protección a la vida acuática (CONAGUA, 2016). Se muestran datos de estudios anteriores para época de lluvias de las aguas de riego de estudio: **1**. Ortega-Morgado, 2017, **2**.Rubio-Franchini *et al.*, 2016, **3**. Bravo-Inclán *et al.*, 2008, **4**.Montelongo *et al.*, 2008, **5**. CONAGUA, 2017, **6**. CONAGUA, 2018.

Con relación a las especies de nitrógeno, no se tienen límites nacionales establecidos. Sin embargo, de acuerdo con la Normalidad de calidad del agua y control de descargas (2001) de la República Dominicana para aguas con fines agrícolas, el nitrógeno amoniacal tiene una concentración límite de 0.5 mg/L. En consecuencia, tanto A-RT como A-N superan el límite de referencia, teniendo para este último un valor de 13.2 mg/L. A-N presentó la mayor concentración de nitrógeno amoniacal mientras que el A-M resultó tener el menor valor (Figura 14). Todas las aguas de riego son diferentes entre ellas para nitrógeno amoniacal.

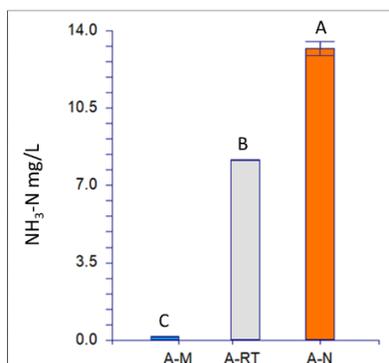


Figura 14 Concentración de nitrógeno amoniacal en las tres aguas de riego.

Aguas de riego sin letra en común son significativamente diferentes (Tukey-Kramer; $\alpha=0.05$). A-M: agua de riego de manantial, A-RT: agua de riego de río Tula, A-N: agua de riego residual.

Las concentraciones de compuestos nitrogenados oxidados, nitrito y nitrato, fue menor para A-N con valores promedio de 0.03 y 5.27 mg/L respectivamente, siendo superada en nitrito por A-M y A-RT, 0.06 y 3.27 mg/L, mientras que, para nitrato fue mayor A-M (42.26 mg/L) seguida por A-RT (27.86 mg/L) (Figura 15). Para nitrato, se encontraron diferencias significativas entre las aguas de riego, pero para nitrito, la diferencia solo fue entre A-M con A-RT y A-N con A-RT y no así para A-N con A-M.

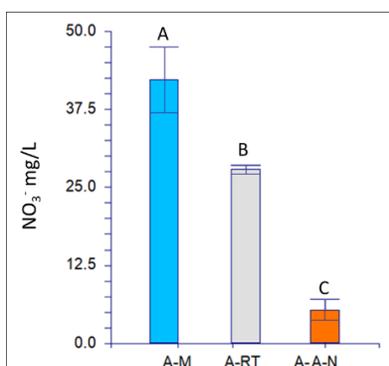


Figura 15 Concentración de nitrato en las tres aguas de riego.

Aguas de riego sin letra en común son significativamente diferentes (Tukey-Kramer; $\alpha=0.05$). A-M: agua de riego de manantial, A-RT: agua de riego de río Tula, A-N: agua de riego residual.

El O.D. fue significativamente distinto entre aguas de riego; fue mayor en A-RT (6.75 mg/L), seguido por A-M y menor A-N (3.25 mg/L) (Figura 16 a). El valor de A-N incumple la LFD con base a los límites permisibles para el uso 3 “protección a la vida acuática”. Para la DQO, no se encontraron diferencias estadísticas entre A-RT y A-N; el valor promedio fue menor en A-M (0.33 mg/L), seguida por A-RT (28.67 mg/L) y A-N (42.33 mg/L) (Figura 16 b).

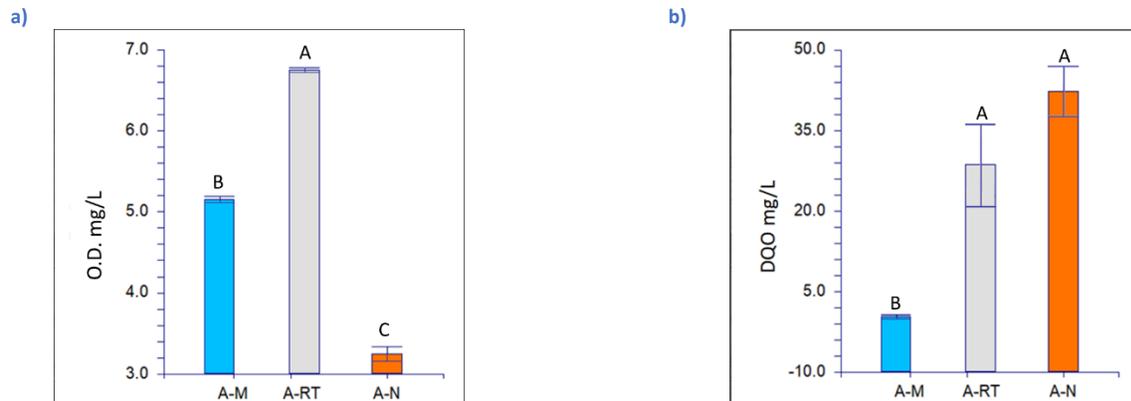


Figura 16 a) Oxígeno disuelto presente en las tres aguas de riego. b) Demanda química de oxígeno para las tres aguas de riego.

Aguas de riego sin letras en común son significativamente diferentes (Tukey-Kramer; $\alpha=0.05$). A-M: agua de riego de manantial, A-RT: agua de riego de río Tula, A-N: agua de riego residual.

Estructura y dinámica microbiana

El estudio de las comunidades microbianas de los suelos de El Alberto, así como de sus aguas de riego asociadas, se realizó estudiando los genes *RNAr 16S* dominio Bacteria y Archaea para la estructura total, y los genes *nifH* y *amoA* para la estructura funcional a nivel de fijación de nitrógeno y nitrificación, respectivamente. Con el objeto de investigar el efecto de una temporada de riego en la diversidad microbiana de los suelos, estos se estudiaron en dos tiempos de estudio: antes del riego (marzo de 2018) y después del riego (junio de 2018). Para un mejor abordaje de los dominios y grupos funcionales estudiados, y dado que la estructura y la dinámica microbiana tienen una relación de codependencia (Nemergut *et al.*, 2014), los resultados se presentan a continuación seccionados en estructura y dinámica total y funcional.

Estructura y dinámica total

Dominio Bacteria: RNAr 16S

El perfil de diversidad total descrita con el gen *RNAr 16S* para el dominio Bacteria (Figura 17) reveló el menor número de OTUs entre todos los genes. Cuatro OTUs estuvieron presentes de manera constante y dominante, en el total de muestras; la OTU 1 fue poco intensa en las muestras de suelo con riego de manantial para el tiempo después del riego.

Todos los suelos de ambos tiempos de estudio, así como las tres aguas de riego presentaron una riqueza ponderada por rango baja, es decir, valores menores a 10 (Tabla 12). Dentro del tiempo antes del riego, no se encontraron diferencias significativas entre suelos (Tabla 12). Sin embargo, tras el riego el suelo con agua de manantial, S-MD, fue diferente a los demás suelos del mismo tiempo (Tabla 12). Dentro de las aguas de riego, el agua de manantial se diferenció a las aguas con aportes residuales (Tabla 12). Por otro lado, únicamente se detectó un cambio entre tiempos de riego, en el suelo con riego de agua de manantial, donde la riqueza ponderada por rango disminuyó tras el riego (Tabla 12).

El análisis de conglomerados para estudiar la similitud entre los patrones de bandeo da un indicativo de la similitud entre la estructura microbiana de sus comunidades. En el dendograma de las aguas de riego (Figura 18), el perfilado de A-M y A-RT comparten un

57.3% de similitud, entre su diversidad estimada de OTUs, separándose de A-N por una distancia de 14.7%. El dendograma para el tiempo antes del riego (Figura 19), se constituyó de varias ramas que no agrupan muestras de acuerdo con algún suelo o agua de riego particular. Para el tiempo después del riego, las muestras con riego de manantial se asociaron con el agua de riego correspondiente con 60.6% de similitud; las muestras de suelo conservado y de riego con agua de RT y N, así como el agua de riego A-N comparten una similitud de 64.3% (Figura 20). Cuando se analizaron ambos tiempos, cada uno presentó perfiles característicos que los agrupan en ramas distintas (Figura 21), es decir, cada tiempo presenta un perfil característico. No obstante, las muestras con riego de manantial para el tiempo después formaron un clúster distante tan solo con 30% de similitud al resto.

Tabla 12 Riqueza ponderada por rango (Rr) para las aguas de riego y suelos en ambos tiempos de estudio.

	Bacteria: <i>RNAr 16S</i>	Archaea: <i>RNAr 16S</i>	BFN: <i>nifH</i>	BOA: <i>amoA</i>
A-M	2.88 (0.23) b	30.48 (2.76)	21.12 (0.74) b	31.47 (2.28) b
A-RT	6.71 (0.78) a	21.30 (3.54)	43.62 (1.21) a	53.18 (4.65) a
A-N	7.59 (0.62) a	23.60 (1.35)	23.31 (3.00) b	64.79 (6.95) a
S-CA	6.21 (1.60)	40.00 (9.04)	42.73 (6.95)	16.87 (2.78) B
S-CD	5.83 (0.82) ▪	72.47 (13.53)	37.14 (4.76)	26.05 (2.06) A
S-MA	3.46 (0.12) A	21.39 (8.17)	37.17 (0.32)	30.66 (3.05)
S-MD	1.35 (0.15) B ●	47.19 (6.16)	33.22 (14.05)	28.18 (9.35)
S-RTA	3.50 (0.54)	21.35 (2.91) B	43.28 (10.99)	46.93 (13.33)
S-RTD	5.93 (1.156) ▪	69.74 (3.95) A	45.40 (10.64)	29.83 (7.74)
S-NA	4.71 (0.92)	39.55 (12.00) A	51.62 (17.85)	29.24 (2.92)
S-ND	6.79 (0.44) ▪	80.78 (3.17) B	62.17 (1.59)	36.09 (7.12)

Aguas de riego sin letra minúscula en común son significativamente diferentes (Tukey-Kramer; $\alpha=0.05$). Suelos antes y después del riego sin letra mayúscula en común son significativamente diferentes (*t* de Student pareada; $\alpha=0.05$). Suelos dentro de un mismo tiempo de estudio sin símbolo igual son significativamente diferentes (Tukey-Kramer; $\alpha=0.05$). Se muestra la media (error estándar de la media) de las tres submuestras de cada suelo. Tablas estadísticas referirse al Anexo 7.

Suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-RTA), suelo con riego de agua residual en el tiempo antes del riego (S-NA), suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND).

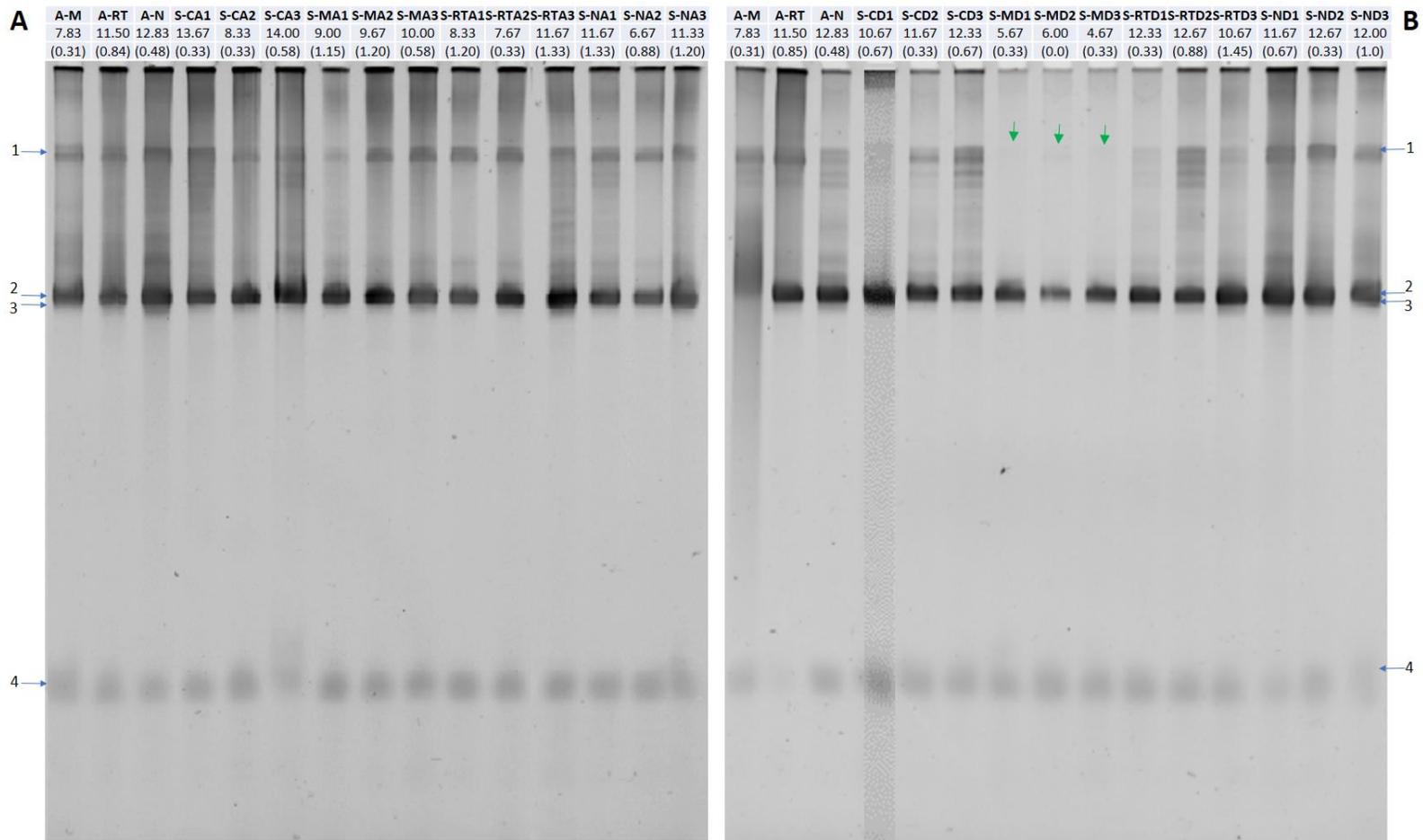


Figura 17 Perfil de huella genética en gels de poliacrilamida generados por TGGE para el dominio Bacteria usando el gen RNAr 16S.

A) Tiempo antes del riego: suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-RTA), suelo con riego de agua residual en el tiempo antes del riego (S-NA); **B) Tiempo después del riego:** suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND); números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio. En ambos perfiles se presentan las muestras de las aguas de riego: agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT) y agua de riego residual (A-N). Sobre cada muestra se presenta la media y el error estándar de tres electroforesis. Flechas azules: OTUs presentes en todas las muestras tanto de suelos como aguas de riego enumeradas, flechas verdes: OTU1 poco intensa en muestras de S-MD.

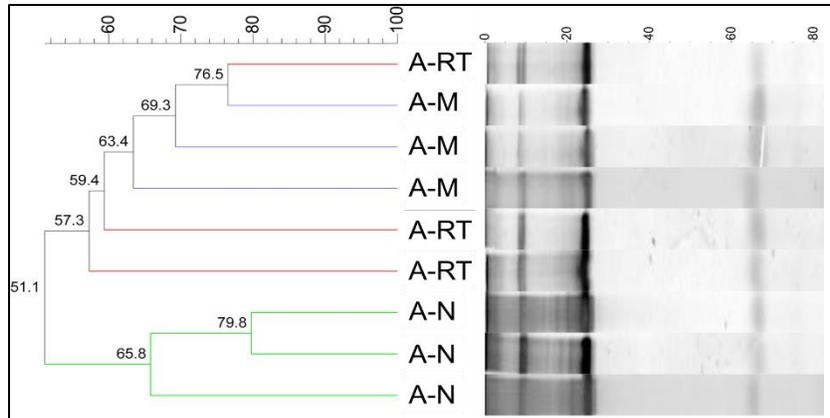


Figura 18 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs bacterianos del gen RNAr 16S de las aguas de riego. Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT) y agua de riego residual (A-N).

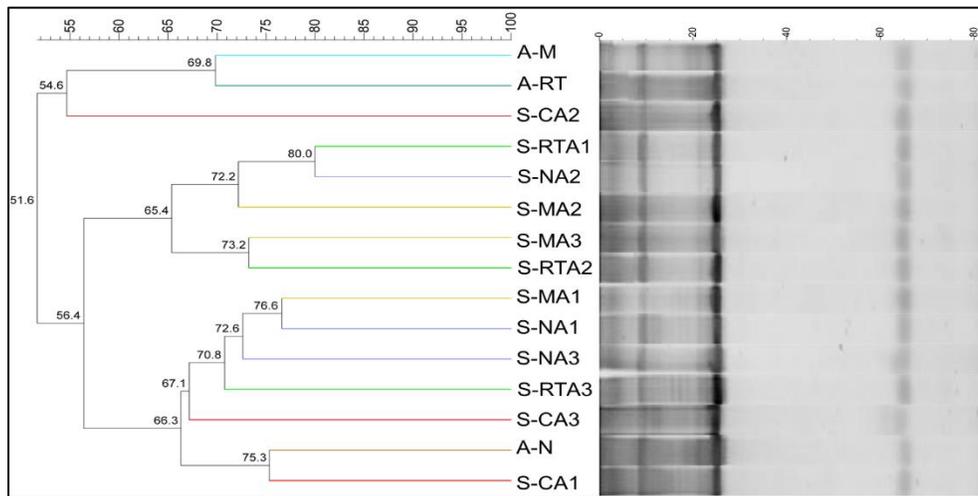


Figura 19 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs bacterianos del gen RNAr 16S de los suelos de El Alberto para el tiempo antes del riego y las aguas de riego.

Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-RTA), suelo con riego de agua residual en el tiempo antes del riego (S-NA), agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT), agua de riego residual (A-N). Números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio.

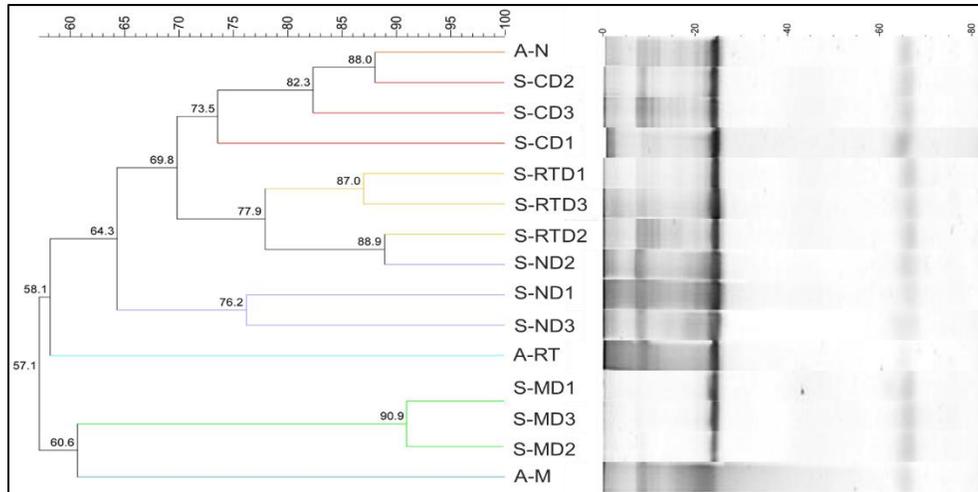


Figura 20 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs bacterianos del gen RNAr 16S de los suelos de El Alberto para el tiempo después del riego y las aguas de riego.

Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND), agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT), agua de riego residual (A-N). Números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio.

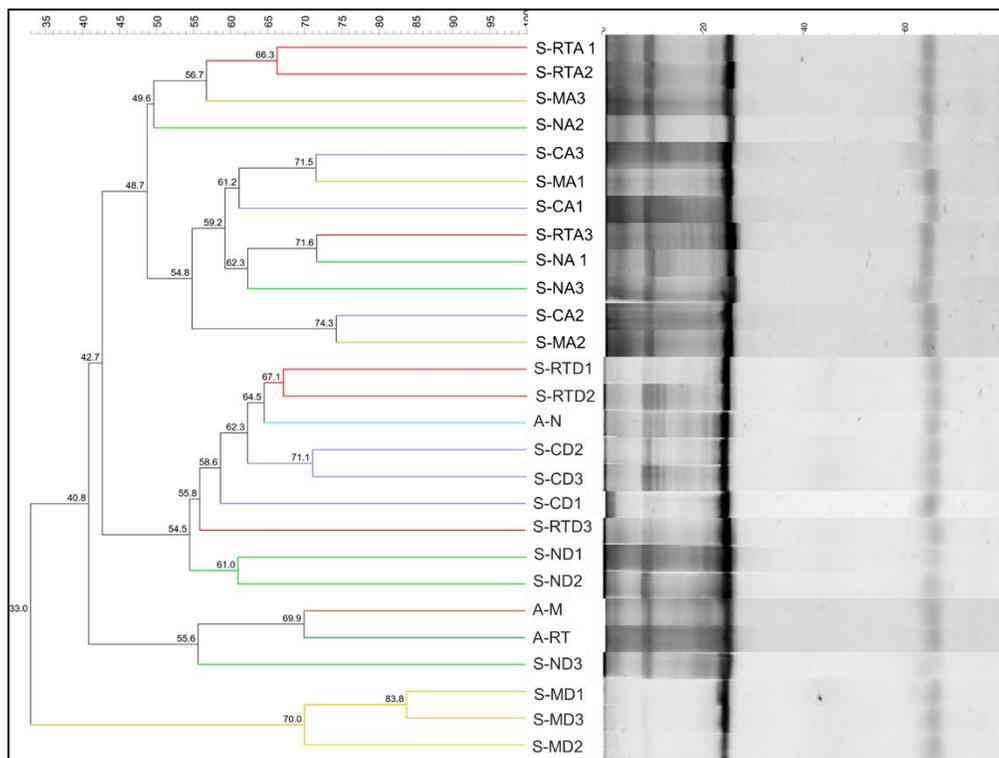


Figura 21 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs bacterianos del gen RNAr 16S de los suelos de El Alberto para ambos tiempos (antes y después del riego) y las aguas de riego.

Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-RTA), suelo con riego de agua residual en el tiempo antes del riego (S-NA), suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND), agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT), agua de riego residual (A-N). Números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio.

Dominio Archaea: RNAr 16S

El perfil de OTUs para el dominio Archaea estudiado con el gen *RNAr 16S* específico detectó 25 unidades (Figura 22). Cuatro de ellas, se mantuvieron en ambos tiempos de estudio y aguas de riego, mientras las denotadas como 5, 6 Y 7 solo se encontraron en las aguas de riego y en las muestras después del riego.

La diversidad de la comunidad de arqueas fue mayor que la integrada por bacterias, teniendo una riqueza ponderada por rango mayor. También fue la más alta entre genes de estudio (Tabla 12). En el caso del tiempo antes del riego, para los suelos con riego de M y RT fue media, mientras que, para el resto fue alta; a pesar de ello, no se encontraron diferencias entre sí (Tabla 12). Para el tiempo después del riego, todos los suelos resultaron con una riqueza ponderada alta, sin haber diferencias estadísticas entre ellos (Tabla 12). En el caso de las aguas de riego, tanto A-RT y A-N presentaron una *Rr* media, y alta en A-M (Tabla 12); no obstante, no se encontraron diferencias estadísticas significativas. La riqueza ponderada para arquea en suelos, parece tener una tendencia a aumentar tras el riego; a pesar de esto, solo fue significativo para los suelos con riego de RT y N, donde *Rr* por lo menos se duplicó (Tabla 12).

En el análisis de conglomerados de las aguas de riego, las huellas genéticas de M y RT se relacionaron cercanamente en un 68.1% de similitud; mientras N conformó un grupo distinto (Figura 23). Para el tiempo antes del riego, las muestras de suelo con riego de aguas con aportes residuales, ART y AN, presentaron una similitud de 54.8% entre sus perfiles (Figura 24). Con respecto al tiempo después del riego, los grupos de muestras de suelo con riego de RT, N y las muestras de suelo conservado (a excepción de S-CD1) forman una rama con una similitud de 79.5% entre sus huellas genéticas, no obstante, cada grupo de muestras se ubica en una rama particular (Figura 25); por otro lado, las muestras de suelo con riego de manantial forman una rama propia con 84% de similitud entre sí (Figura 25). Al analizar ambos tiempos, únicamente las muestras para el tiempo después del riego conforman un grupo distinguible y en él, los grupos de suelo (Figura 26).

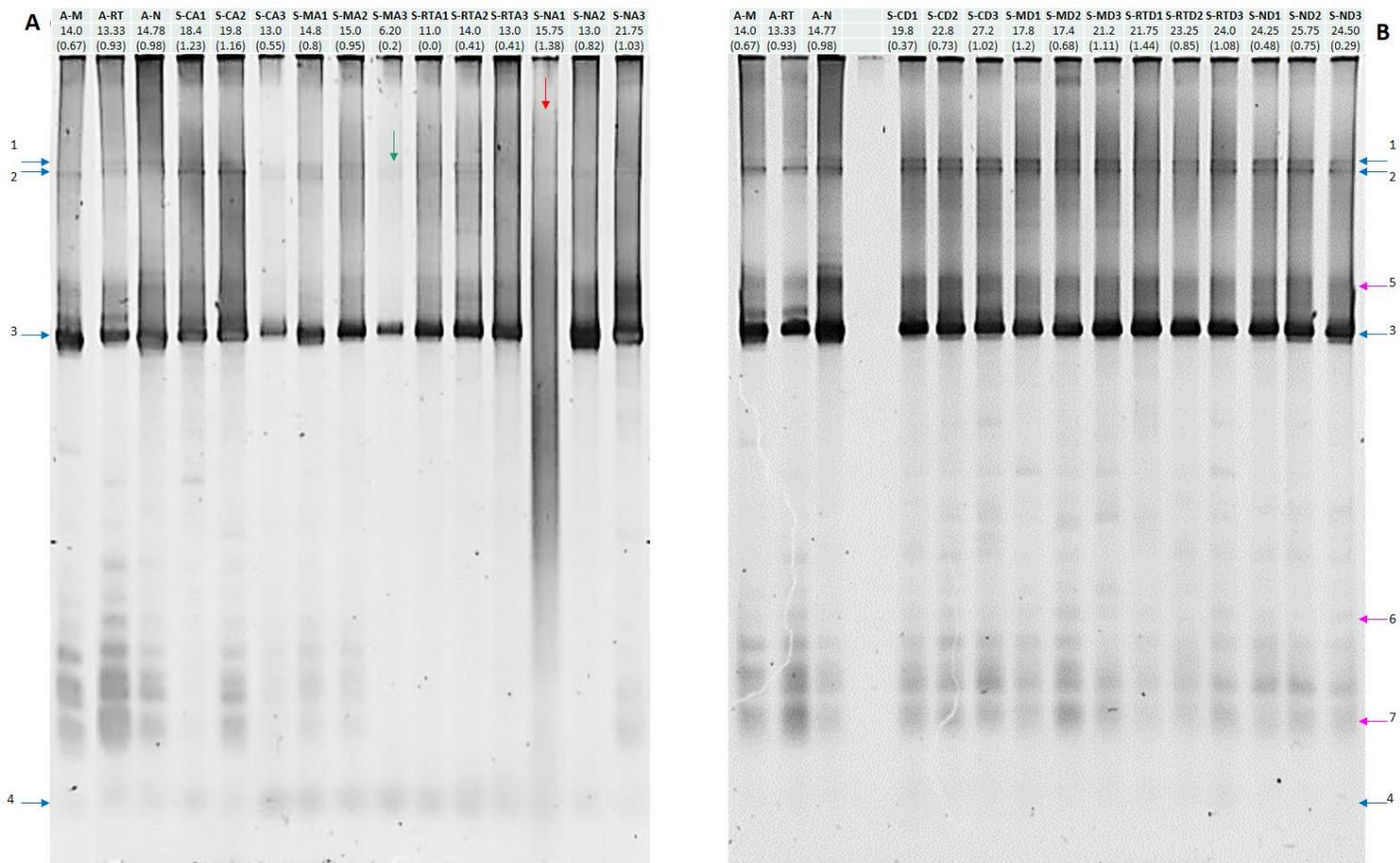


Figura 22 Perfil de huella genética en gels de poliacrilamida generados por TGGE para el dominio Archaea usando el gen RNAr 16S.

A) Tiempo antes del riego: suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-RTA), suelo con riego de agua residual en el tiempo antes del riego (S-NA); **B) Tiempo después del riego:** suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND); números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio. En ambos perfiles se presentan las muestras de las aguas de riego: agua de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT) y agua de riego residual (A-N). Sobre cada muestra se presenta la media y el error estándar de tres electroforesis. Flechas azules: OTUs presentes en todas las muestras tanto de suelos como aguas de riego enumeradas, flechas rosas: OTUs presentes solo en las aguas de riego y en los suelos después del riego, flecha verde: OTU1 y 2 poco intensa en SMA3, flecha roja: carril para S-AN1 barrido, Bionumerics 7.6 permitió detectar las bandas sustrayendo el ruido de fondo.

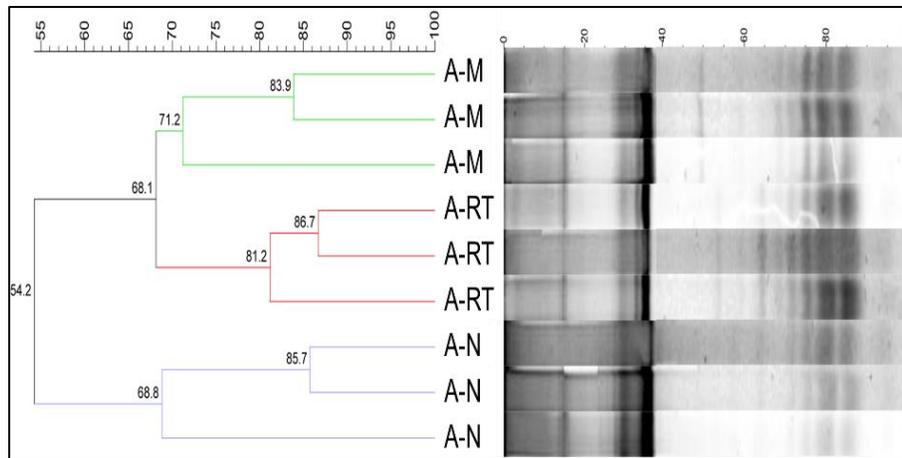


Figura 23 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para arquea usando RNAr 16S de las aguas de riego. Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT) y agua de riego residual (A-N).

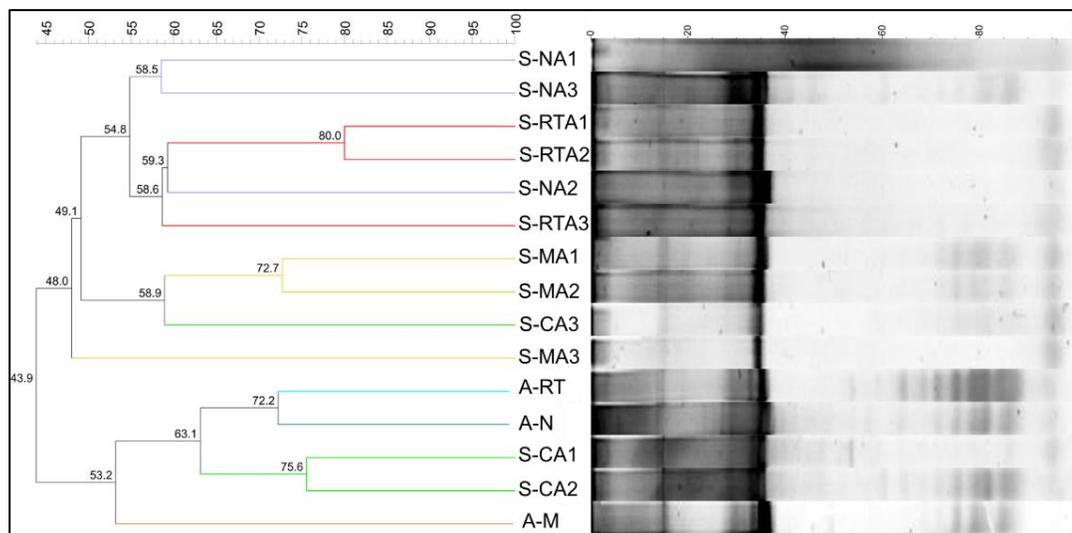


Figura 24 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para arquea usando RNAr 16S de los suelos de El Alberto para el tiempo antes del riego y las aguas de riego.

Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-RTA), suelo con riego de agua residual en el tiempo antes del riego (S-NA), agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT), agua de riego residual (A-N). Números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio.

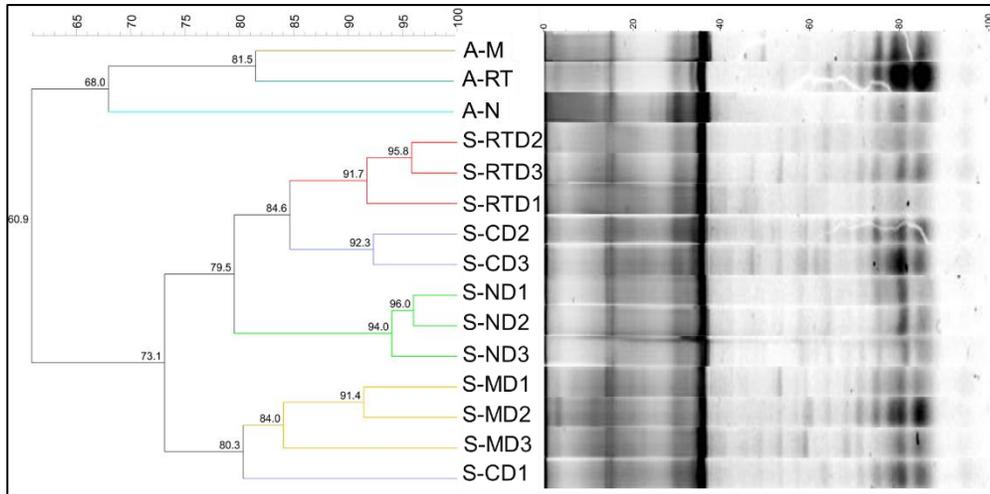


Figura 25 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para arquea usando RNAr 16S de los suelos de El Alberto para el tiempo después del riego y las aguas de riego.

Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND), agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT), agua de riego residual (A-N). Números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio.

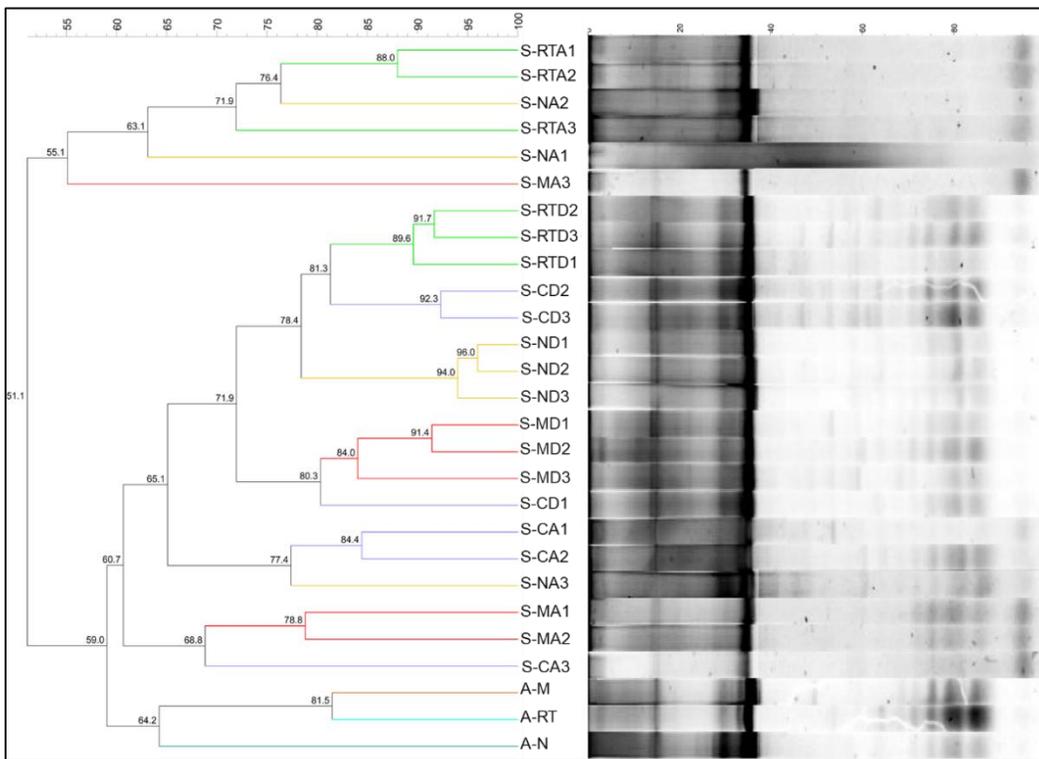


Figura 26 Dendograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para arquea usando RNAr 16S de los suelos de El Alberto de ambos tiempos (antes y después del riego) y las aguas de riego.

Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-RTA), suelo con riego de agua residual en el tiempo antes del riego (S-NA), suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND), agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT), agua de riego residual (A-N). Números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio.

Estructura y dinámica funcional

Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN): nifH

En el perfil de BFN estudiadas con el gen *nifH* se detectaron 29 OTUs (Figura 27). Solo dos estuvieron presentes en la totalidad de muestras, siendo no específicas de un entorno, tiempo de riego o suelo. La banda que representa la OTU 2 al ser muy gruesa no asegura que los fragmentos se hayan separado adecuadamente durante la electroforesis.

La diversidad de OTUs de BFN resultó ser alta en ambos tiempos de estudio, reflejada por una riqueza ponderada por rango mayor a 30 (Tabla 12). No hubo variaciones en la diversidad fijadora entre suelos de un mismo tiempo de estudio o entre tiempos para un mismo suelo (Tabla 12), al no hallarse diferencias significativas. En las aguas de riego, la diversidad de A-RT es alta, siendo diferente estadísticamente a la registrada en A-M y A-N, donde se obtuvieron valores medios de riqueza ponderada (Tabla 12).

El dendograma de las aguas de riego (Figura 28), agrupó a cada una en ramas distintas. Para el tiempo antes del riego (Figura 29), las muestras de suelo conservado se agruparon en una rama, de igual forma las muestras de suelo con riego de agua de manantial, ambas ramas se relacionaron entre sí con un nivel de similitud de 50.1%. Las muestras de suelo con riego de agua N y RT (excepto S-RTA1 y S-NA1), así también A-N formaron una rama con una similitud de 56.7%. En el tiempo después del riego, solo los suelos con riego de agua de RT formaron una rama con una relación de 60.5% a el agua de riego asociada y a dos suelos con riego de agua de N (Figura 30). Al analizar ambos tiempos de estudio (Figura 31), tanto los suelos con riego de manantial y conservado formaron una rama específica cada una, compartiendo 40.4% de similitud; por otro lado, el agua de riego RT, así también los suelos con riego de agua de RT y N se relacionaron entre sí con una similitud de 46.4%.

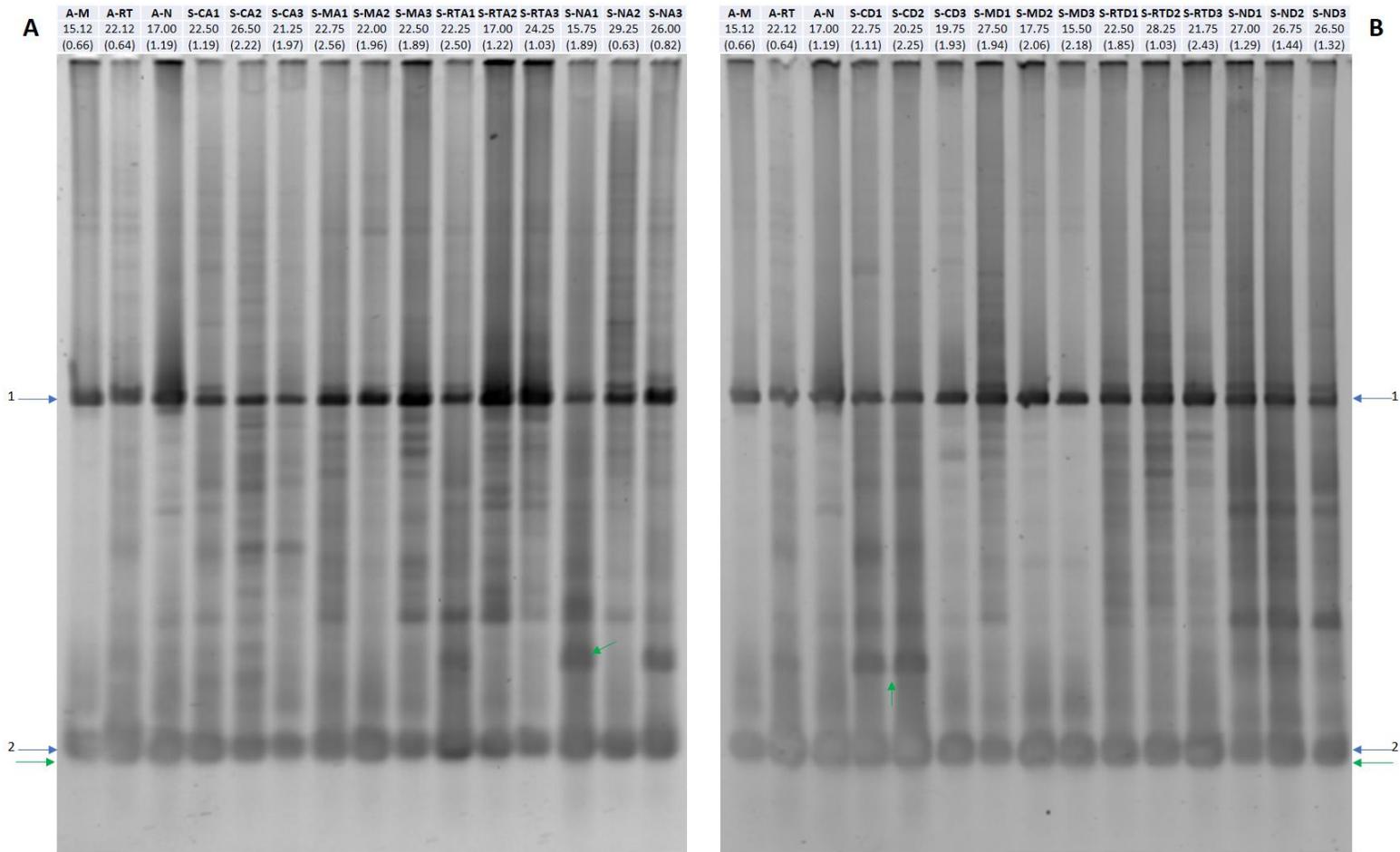


Figura 27 Perfil de huella genética en geles de poliacrilamida generados por TGGE para BFN usando el gen *nifH*.

A) Tiempo antes del riego: suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-RTA), suelo con riego de agua residual en el tiempo antes del riego (S-NA); **B) Tiempo después del riego:** suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND); números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio. En ambos perfiles se presentan las muestras de las aguas de riego: agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT) y agua de riego residual (A-N). Sobre cada muestra se presenta la media y el error estándar de tres electroforesis. Flechas azules: OTUs presentes en todas las muestras tanto de suelos como aguas de riego enumeradas, flechas rosas: OTUs presentes solo en las aguas de riego y en los suelos después del riego, flecha verde: bandas muy gruesas, es decir, posibles bandas dobles.

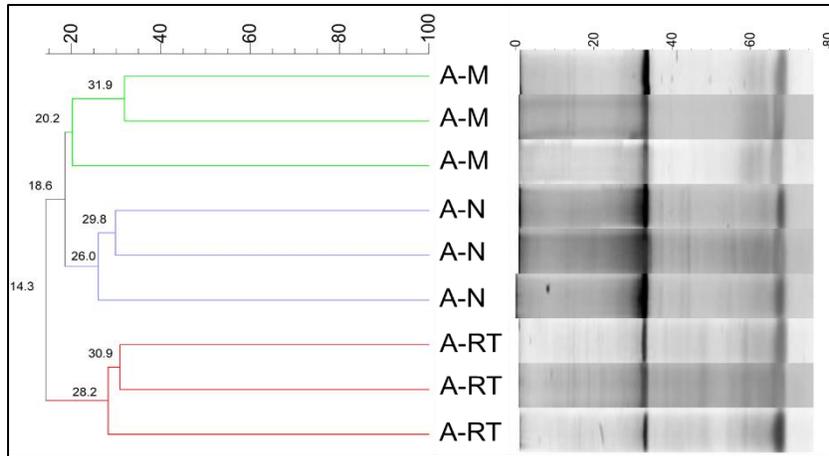


Figura 28 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BFN usando el gen *nifH* de las aguas de riego. Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT) y agua de riego residual (A-N).

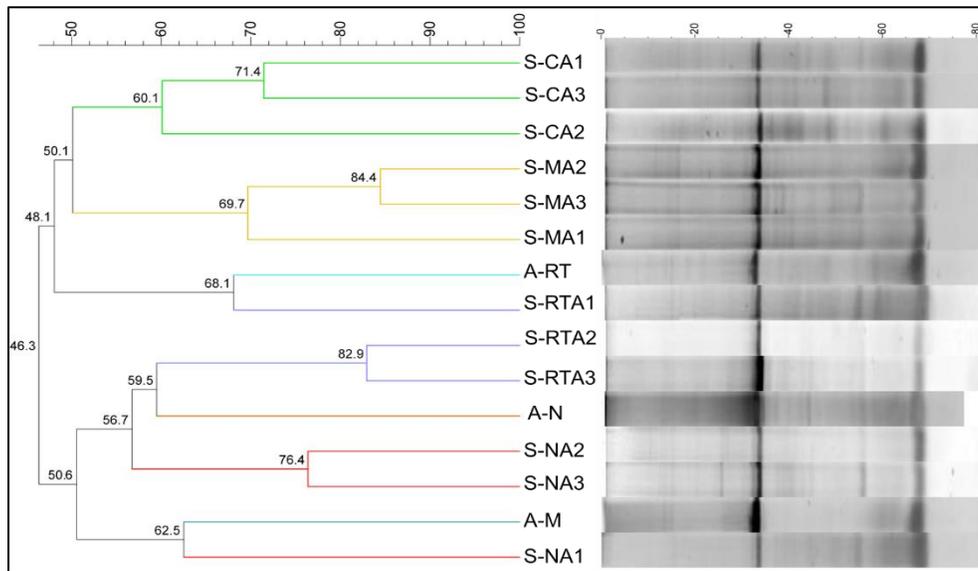


Figura 29 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BFN usando el gen *nifH* de los suelos de El Alberto para el tiempo antes del riego y las aguas de riego.

Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-RTA), suelo con riego de agua residual en el tiempo antes del riego (S-NA), agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT), agua de riego residual (A-N). Números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio.

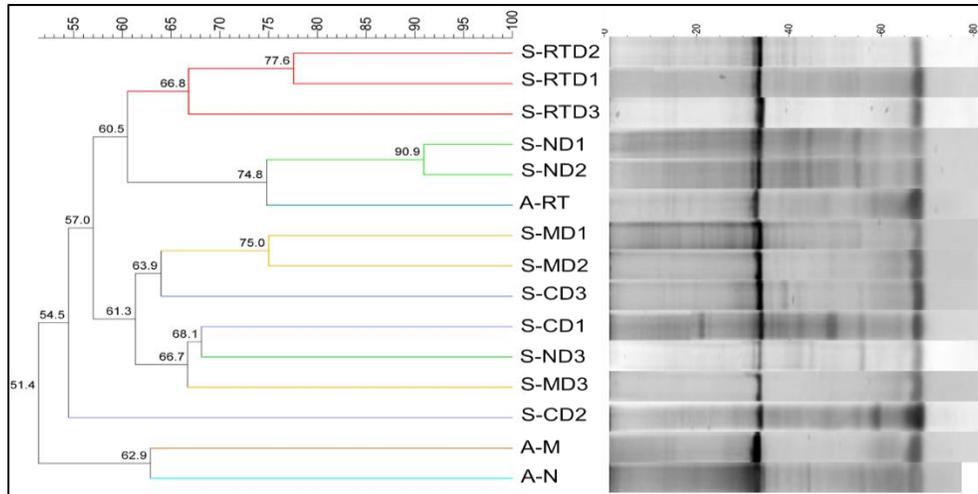


Figura 30 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BFN usando el gen *nifH* de los suelos de El Alberto para el tiempo después del riego y las aguas de riego.

Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND), agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT), agua de riego residual (A-N). Números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio.

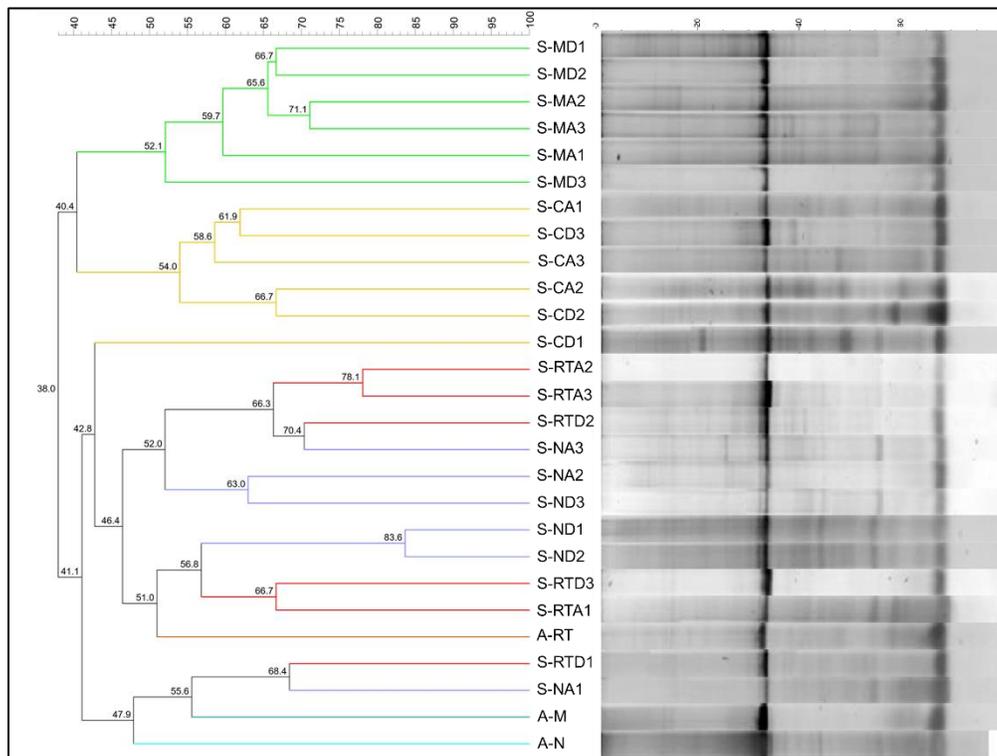


Figura 31 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BFN usando el gen *nifH* de los suelos de El Alberto de ambos tiempos (antes y después del riego) y las aguas de riego.

Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-RTA), suelo con riego de agua residual en el tiempo antes del riego (S-NA), suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND), agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT), agua de riego residual (A-N). Números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio.

Bacterias oxidantes de amonio (BOA): amoA

La huella genética de BOA descrita con el gen *amoA* estimó un máximo de 25 OTUs, solo dos estuvieron presentes en la totalidad de muestras (Figura 32). La diversidad de OTUs nitrificantes en las aguas de riego se estimó alta en todas ellas; no obstante, no hubo diferencia estadística entre la riqueza ponderada de RT y N, siendo así similares (Tabla 12). La riqueza ponderada entre suelos de un mismo tiempo no difirió estadísticamente. En el suelo control, *Rr* se mantuvo en un rango medio entre tiempos; sin embargo, se encontró un aumento significativo (Tabla 12). Tanto para el suelo con riego de manantial y río Tula, la riqueza ponderada por rango paso de ser alta a media para el tiempo después del riego; por otro lado, en el suelo con riego de agua residual, *Rr* paso de ser medio a alto; en ambos casos el cambio no fue significativo (Tabla 12).

En el dendograma de las aguas de riego (Figura 33), se formaron dos grupos: en uno se encuentra el agua de riego A-M y en el otro se agrupan las aguas de riego con aportes residuales, A-RT y A-N, con una similitud de 72.8% entre sus OTUs. Las muestras de suelo conservado en ambos análisis de conglomerados para los tiempos, antes y después del riego, forman una rama con una similitud no mayor a 50%, 45.5% y 42.3%, respectivamente (Figura 34 y 35). Por otro lado, las muestras de suelo con riego de agua, N y RT, se agrupan entre sí, a excepción de una muestra, esto nuevamente para ambos tiempos de estudio (Figura 34 y 35). En el dendograma en el que se conjugan ambos tiempos (Figura 36), las muestras de suelo conservado forman un grupo sin distinción de tiempo y no así los demás suelos; en este análisis las aguas de riego se relacionan entre sí, pero no claramente a algún tipo de suelo.

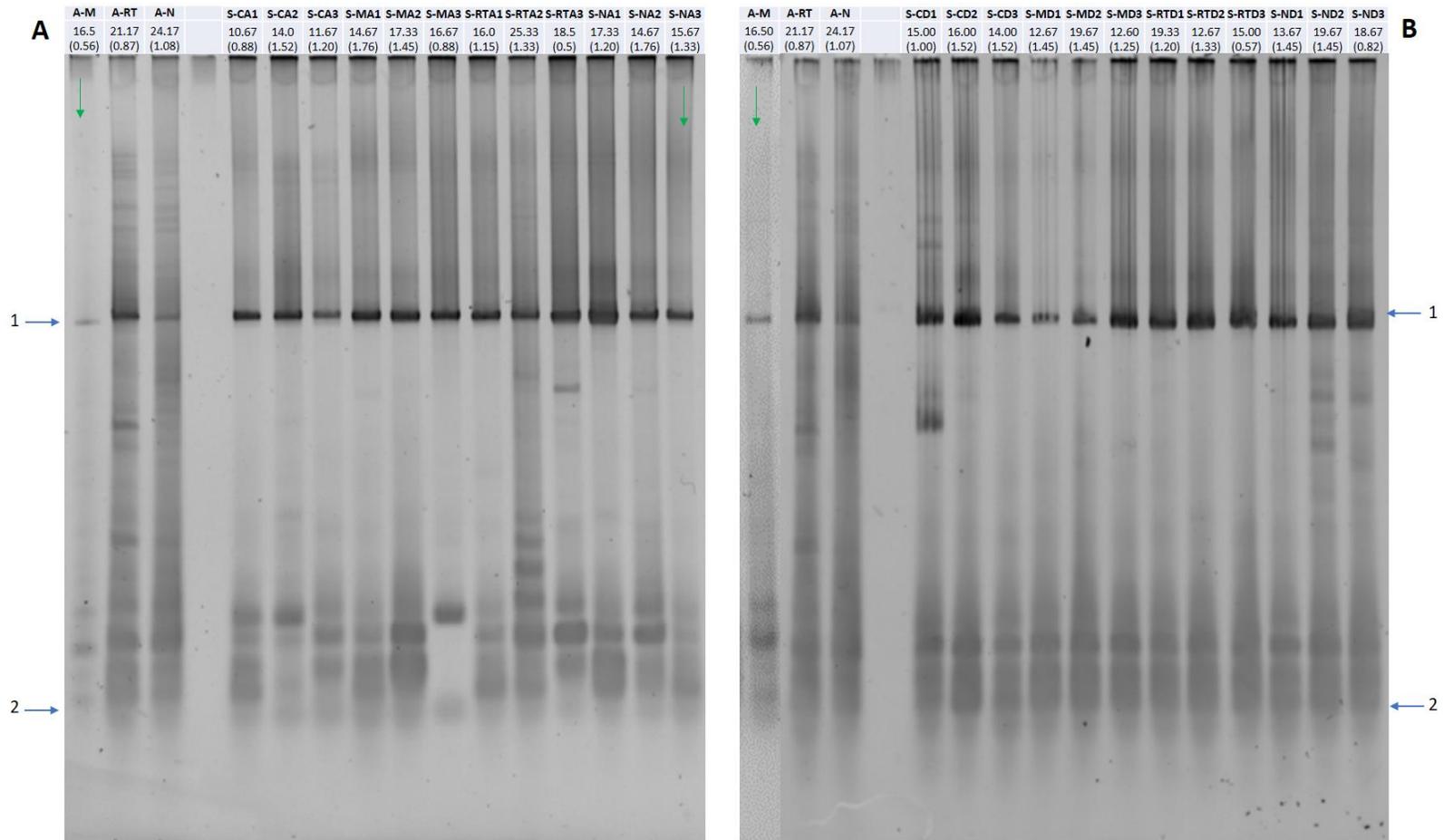


Figura 32 Perfil de huella genética en gels de poliacrilamida generados por TGGE para BOA usando el gen *amoA*.

A) Tiempo antes del riego: suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-RTA), suelo con riego de agua residual en el tiempo antes del riego (S-NA); **B) Tiempo después del riego:** suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND); números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio. En ambos perfiles se presentan las muestras de las aguas de riego: agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT) y agua de riego residual (A-N). Sobre cada muestra se presenta la media y el error estándar de tres electroforesis. Flechas azules: OTUs presentes en todas las muestras tanto de suelos como aguas de riego enumeradas, flechas verdes: indican carriles de muestras con bandas poco intensas, solo detectables con el análisis en Bionumerics 7.6.

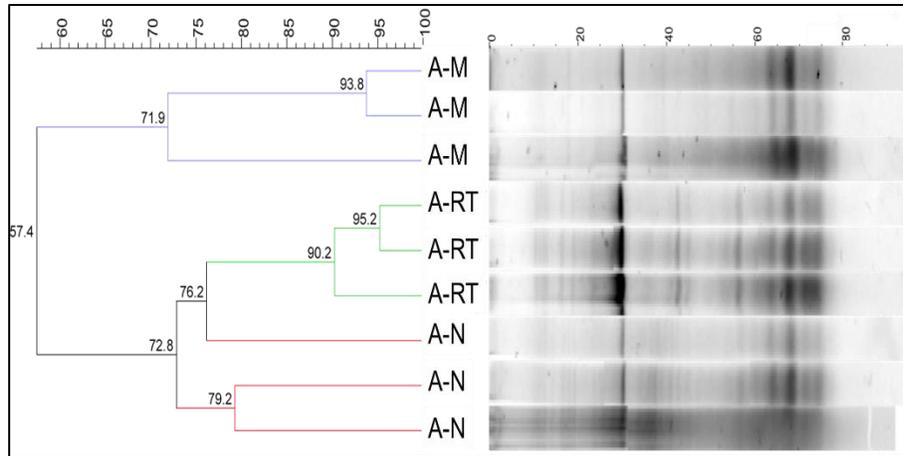


Figura 33 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BOA usando el gen *amoA* de las aguas de riego. Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT) y agua de riego residual (A-N).

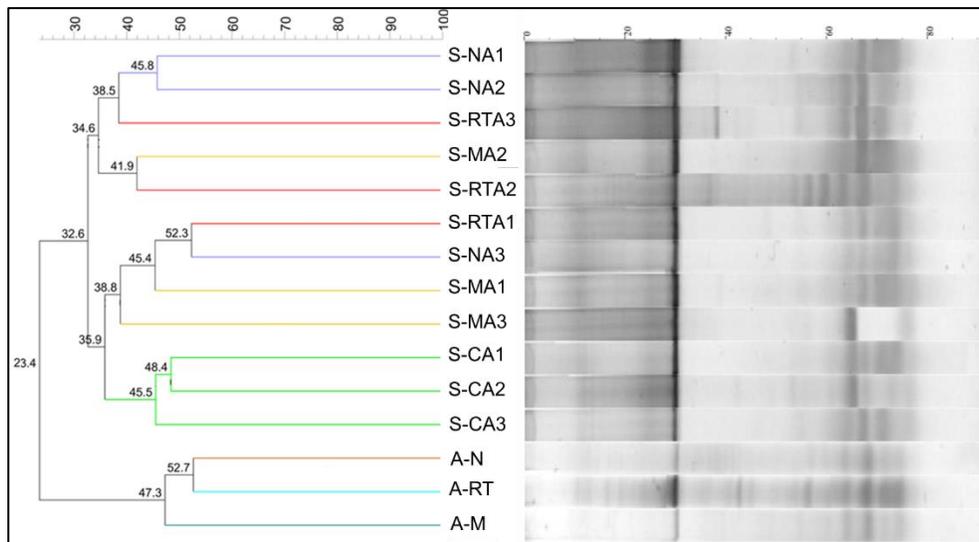


Figura 34 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BOA usando el gen *amoA* de los suelos de El Alberto para el tiempo antes del riego y las aguas de riego.

Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-NA), agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT), agua de riego residual (A-N). Números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio.

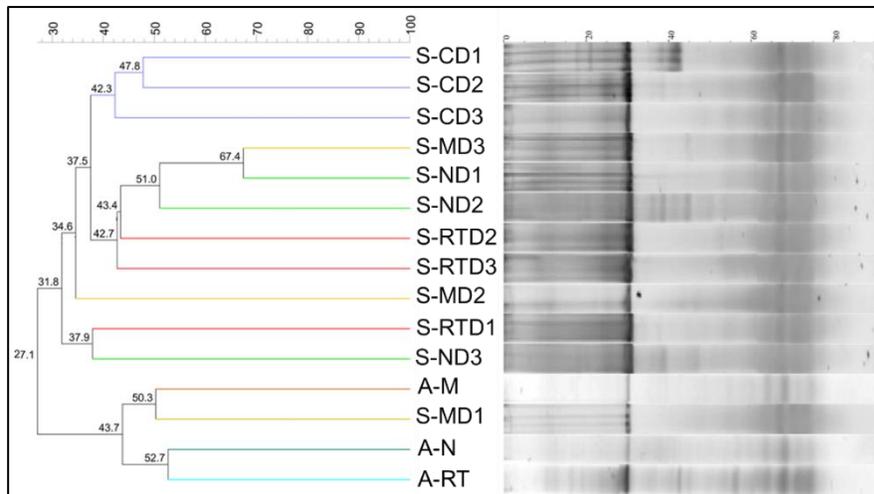


Figura 35 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BOA usando el gen *amoA* de los suelos de El Alberto para el tiempo después del riego y las aguas de riego.

Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND), agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT), agua de riego residual (A-N). Números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio.

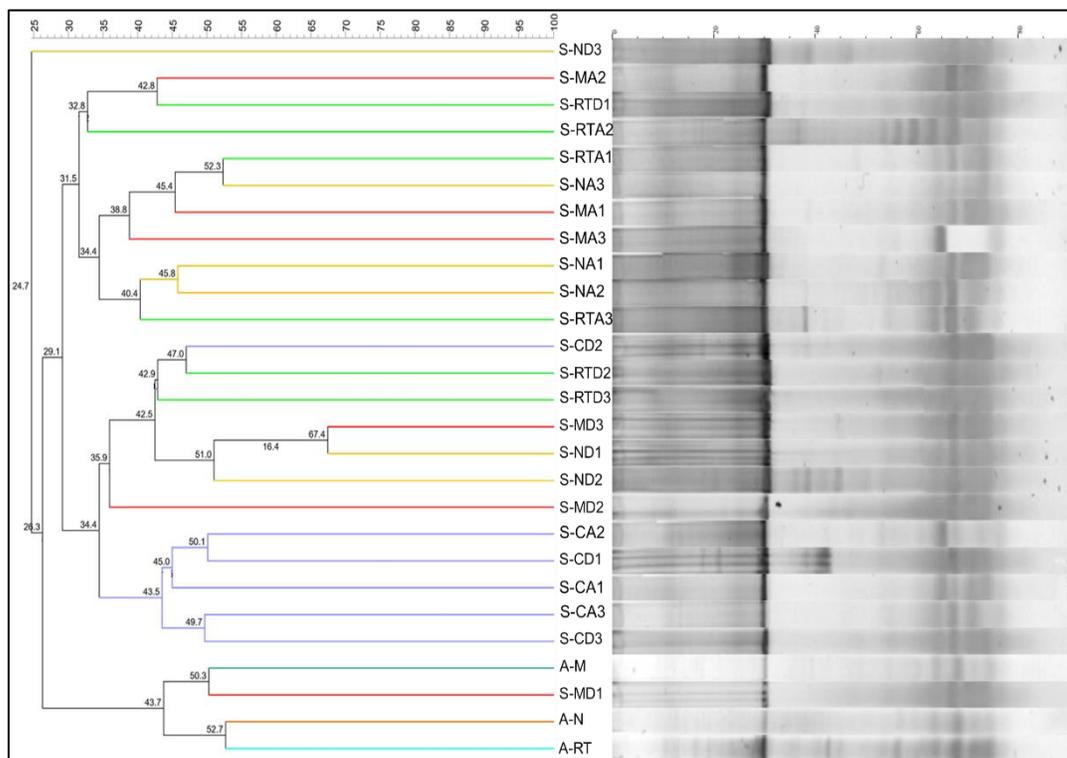


Figura 36 Dendrograma basado en la similitud de perfiles de OTUs para BOA usando el gen *amoA* de los suelos de El Alberto para ambos tiempos (antes y después del riego) y las aguas de riego.

Con el coeficiente DICE se generó la matriz de similitud, mientras que el método de agrupamiento usado fue UPGMA. Suelo control en el tiempo antes del riego (S-CA), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo antes del riego (S-MA), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo antes del riego (S-RTA), suelo con riego de agua residual en el tiempo antes del riego (S-NA), suelo control en el tiempo después del riego (S-CD), suelo con riego de agua de manantial en el tiempo después del riego (S-MD), suelo con riego de agua de río Tula en el tiempo después del riego (S-RTD), suelo con riego de agua residual en el tiempo después del riego (S-ND), agua de riego de manantial (A-M), agua de riego de río Tula (A-RT), agua de riego residual (A-N). Números 1, 2 y 3 son las tres muestras por cada suelo de estudio.

DISCUSIÓN

Fertilidad de suelos

Las propiedades edáficas en su conjunto determinan la calidad y fertilidad de los suelos con base en su uso (Delgado y Gómez, 2016). Regularmente estas propiedades son uniformes en suelos con un mismo uso y manejo (Girvan *et al.*, 2003). En el presente trabajo, hay propiedades que tienen una variabilidad inherente a los suelos estudiados en las que el tipo de manejo no tiene un efecto sobre ellas, como textura, densidad real y porcentaje de humedad. Sin embargo, hay otras que son claramente afectadas por el manejo, sea tipo de uso de suelo o calidad del pulso hidráulico (agua de riego), como densidad aparente, pH, materia orgánica, carbono orgánico, nitrógeno total, amonio, nitrito y nitrato.

Los suelos se pueden considerar como organismos vivos y dinámicos, en los cuales sus componentes les brindan características propias que responden de manera organísmica a su entorno (Harshberger, 1911), teniendo un efecto sobre sus características y funciones como: ser filtro – amortiguador – transformador de diferentes sustancias (purificador), contenedor y regulador de biodiversidad, principal sitio en el que se realiza el ciclaje de nutrientes, contenedor y fuente de carbono, además de ser zona de soporte y anclaje de vegetación entre otras funciones (Blum *et al.*, 2006).

En el suelo control, sin riego, correspondiente a un suelo conservado con presencia de mezquite (*Prosopis laevigata*), Guarneros-Manoatl (2018) encontró la presencia de sustancias húmicas, las cuales se sabe en grandes cantidades acidifican el medio, por tanto esto pudo rebasar la función amortiguadora de protones explicando el pH moderadamente ácido encontrado (Gjessing, 1994; Trevisan *et al.*, 2010), respaldado por el alto contenido de MO encontrado en este trabajo, que se sabe también acidifica el suelo (Tanaka *et al.*, 2014). Cabe señalar, que se ha reportado anteriormente, la presencia de mezquite propicia un pH ácido (Montaño-Arias *et al.*, 2006). Por otro lado, el pH alcalino de los suelos agrícolas de riego se debe en primer instancia al tipo de suelo, Vertisol, asociado a suelos con pH alcalino; también se ha reportado que la alta carga de cationes intercambiables (mayormente iones Na⁺) que suelen acarrear las aguas de riego, sobre todo las aguas residuales, tienden a

aumentar el pH en suelo (Qian y Meham, 2005; Gelsomino *et al.*, 2006). Para S-N con una historia de riego de 40 años, el pH obtenido confirma lo observado en el trabajo de Hernández-Martínez y colaboradores (2018) para el Valle del Mezquital, quienes encuentran una tendencia a aumentar ligeramente el pH en suelos con una historia de riego de 100 años. La materia orgánica es uno de los componentes más importantes del suelo que le brinda estabilidad estructural y nutrientes (Muñoz-Rojas, 2018). Por tanto, una mayor concentración de MO se traduce, en parte, a una mayor fertilidad (Murphy, 2014). El manejo del suelo, sus propiedades, además de las condiciones ecológicas incluyendo la acción del edafón tienen un efecto sobre las concentraciones presentes de MO y Corg (Ozcan *et al.*, 2006; Paz Ferreiro *et al.*, 2016). En el suelo control, la presencia de mezquite propició una mayor acumulación de MO y Corg, siendo una posible isla de fertilidad, dato previamente reportado en distintos trabajos para el Valle del Mezquital (Barth y Klemmedson, 1982; Montaña-Arias *et al.*, 2006; Siebe *et al.*, 2016; Guarneros-Manoatl, 2018). En suelos conservados, hay mayor concentración de materia orgánica, proceso natural vinculado al buen funcionamiento del ecosistema y a la no explotación antropológica del suelo. Este funcionamiento natural permite el secuestro de carbono como biomasa y otras sustancias, asegurando su reingreso al suelo (Fernandes *et al.*, 1997; Paz Ferreiro *et al.*, 2016).

En los suelos con riego, muchos más factores tienen un efecto sobre los contenidos de MO y Corg, al ser la actividad agrícola una serie de procesos de disturbios no acoplados a prácticas de manejo adecuadas. El primer disturbio es la remoción de cobertura vegetal nativa para la introducción de canales de riego, seguida de la fragmentación del área para abarcar más parcelas agrícolas, una constante labranza que acelera la mineralización, la ejecución de monocultivos, la adición de fertilizantes además de pesticidas y el uso de aguas de distintas calidades (Jones *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2014). Tomando al suelo de riego con manantial como más basal al tener los valores promedio menores de MO y Corg con respecto a los otros suelos de riego y del hecho de ser estadísticamente diferente para los mismos en comparación a S-N, se podría decir para S-N que el riego con agua residual acarrea e incorpora más carbono orgánico. Respaldado por la alta concentración de MO encontrada en el agua residual por el análisis de DQO, 42.3 mg/L, previamente documentado para suelos

del Valle del Mezquital (Friedel *et al.*, 2000). En otros trabajos, se habla de un estado estacionario de Corg tras 30 a 50 años de riego con agua residual (Chapela Lara, 2011). El valor encontrado en el presente trabajo, 5.09%, es muy superior a los reportados anteriormente para la misma región, 2.3 y 2.63% (Friedel *et al.*, 2000; Chapela Lara, 2011). Esto puede deberse a que el suelo estudiado se encuentre ya en este punto estacionario dado que se trata de una parcela con una historia de riego de 40 años. Además, presenta distintas condiciones y entradas de MO que pueden crear una suma sinérgica de las cantidades relativas de Corg como: la adición indirecta de fertilizante en forma de estiércol por la presencia de ganado, un estado en barbecho de por lo menos 10 años y la alta carga de MO por el agua de riego residual; además de la falta de salida del carbono como biomasa en la producción de cultivos. En S-RT, hay un aporte de estiércol y una constante extracción de cultivos, por lo que la entrada de MO a través del agua de riego puede que mantenga o no la concentración relativa de Corg encontrada. Para el caso de S-M, el Corg obtenido, 1.09%, es similar al reportado en un suelo con agricultura de temporal para el Valle del Mezquital: 1.1% (Friedel *et al.*, 2000). Por tanto, se podría indicar que el agua de manantial no aporta Corg al suelo estudiado.

El nitrógeno es un elemento esencial para la agricultura al ser junto con el fósforo un elemento limitante en la producción de biomasa (Ågren *et al.*, 2012). El valor obtenido de amonio en S-C respalda la función del mezquite como proveedor de nitrógeno reactivo en asociación simbiótica con BFN con la formación de nódulos (Bailey, 1976; Johnson y Mayeux, 1990; García-Sánchez *et al.*, 2012). De igual forma, el valor obtenido de nitrato podría indicar una eficaz nitrificación del amonio. Sin embargo, al ser un suelo arenoso franco de textura gruesa, podría tener una importante pérdida de nitrato por lixiviación al acuífero. Se ha documentado que el mezquite mantiene islas de fertilidad en matorrales donde el resto de la comunidad vegetal es perturbada (Montaño-Arias *et al.*, 2006). Por este motivo representa un elemento de interés para el diseño de agricultura de conservación y restauración del recurso suelo.

En cuanto a los suelos con riego, hay una clara diferencia en el porcentaje de nitrógeno total, correspondiendo al encontrado en cada agua de riego. El riego con agua residual y de río

Tula con aportes residuales aumento el nitrógeno total del suelo como se ha publicado previamente (Siebe, 1998).

Dada la alta carga de nitrato en S-N, se puede sugerir que la concentración alta de amonio en el agua de riego entra a nitrificación de forma eficiente para producir nitrato. Se ha documentado que esta nitrificación, se realiza de manera preferencial en las primeras 3 h tras el riego, disminuyendo con la saturación del suelo, momento en el cual el nitrato puede ser absorbido o desnitrificado (Hernández-Martínez *et al.*, 2018). La carga positiva del amonio permite que se adsorba a la capa difusa del suelo cuando este se encuentra saturado entrando nuevamente a nitrificación cuando el agua de los poros se drena; aportando nitrato que se mantiene en el suelo al no haber riego que los lave, explicando parcialmente una vez más el contenido de nitrato encontrado (Morell Evangelista y Hernández, 2000; Brumme *et al.*, 2009). La textura mediana del suelo analizado puede crear condiciones con oxígeno y libres de él. Por este motivo, es difícil indicar si la desnitrificación o lixiviación tenga un efecto en las concentraciones relativas de N. Para ello, se requeriría del monitoreo de la cantidad y tipo de nitrógeno entrante, además del uso de isotopos marcados como sugiere Hernández-Martínez y colaboradores (2018), quienes atribuyen en un evento de riego con aguas residuales, pérdidas de nitrógeno por adsorción al suelo, absorción por las plantas y desnitrificación. En términos generales, las aguas residuales aportan MO, Corg y N que conducen a condiciones favorables de fertilidad. Sin embargo, otros de sus componentes producen preocupación y recalcan la necesidad de control, como lo son las altas concentraciones de coliformes fecales (10^8 UFC/100 ml) (Navarro *et al.*, 2015), metales pesados (Guédron *et al.*, 2014) y trazas de compuestos farmacéuticos (Gibson *et al.*, 2007) que implican riesgos ambientales y sanitarios.

La textura de S-RT, arcilloso, le atribuye condiciones con poca aireación y una alta capacidad de retención de agua durante los eventos de riego; creando condiciones anaerobias que podrían prevalecer por mucho tiempo. Con el escenario antes planteado, es posible que parte del nitrato entrante del agua de riego se desnitrifique y tras el drenaje de los poros, el amonio retenido en las partículas del suelo entre a nitrificación, explicando así la baja concentración, pero no ausente de nitrato.

La relación de nitrato en agua de manantial y el suelo correspondiente permite suponer que la alta carga de nitrato acarreada por la matriz agua, no es retenida de forma eficiente en el suelo, saliendo del mismo por escorrentía o lixiviación antes reportados en el riego con agua residual (Jiménez y Chávez, 2004).

En resumen, en referencia a la MO, se evidencia al S-N con una mayor fertilidad, seguida de S-RT y S-M. Por otro lado, en términos de suministro de nitrógeno al ser el nitrato y amonio las principales formas en las que los cultivos absorben nitrógeno el S-N es más fértil, seguido de S-M y S-RT. Sin embargo, el riego sin importar la calidad del agua no establece mayores concentraciones de MO en los suelos agrícolas respecto al suelo control sin manejo.

Calidad de las aguas de riego

La calidad del agua en las presas presenta una tendencia al deterioro por los insumos y procesos antropológicos y naturales que crean condiciones perjudiciales (Castilla-Hernández *et al.*, 2014). El valor de oxígeno disuelto para A-N de la presa Endhó, 3.25 mg/L, es mayor al informado para el mismo sitio y época de 2016 en el trabajo de Ortega–Morgado (2017), 1.71 mg/L, y del reportado por la CONAGUA (2018) en agosto de 2017 con valor de 2.66 mg/L; por consiguiente, suponemos un cambio a corto plazo con respecto a oxígeno disuelto para la calidad del agua tras la apertura de la PTAR de Atotonilco, que supone cierto grado de remoción de materia orgánica confirmada con el valor de DQO (42.33 mg/L) encontrado en el presente estudio y el reportado en la RENAMECA en 2017, 63.96 mg/L. Aun así, estos valores siguen indicando una contaminación severa del agua de la presa Endhó, calificándola como residual. El agua de río Tula también presenta una mejora con respecto al oxígeno disuelto (6.753 mg/L) comparándolo con el valor encontrado en Ortega–Morgado (2017) (4.39 mg/L). La menor concentración de oxígeno en manantial se puede explicar por su alta temperatura que disminuye la absorción y retención de oxígeno disuelto (Kemp y Boynton, 1980).

El nitrógeno es un parámetro no conservativo que cambia rápidamente a las diferentes especies químicas, dando un panorama de la dinámica del ciclo del nitrógeno (Montilla Jiménez y Salinas Torres, 2015). El nitrógeno amoniacal es una molécula altamente tóxica en

ambientes acuáticos, además de ser un indicativo de aguas residuales con alto contenido de materia orgánica; concentraciones elevadas propician una degradación bacteriana rápida y así una inminente reducción de oxígeno disuelto (Lozano-Rivas, 2013). El monitoreo de la presa Endhó antes de la recepción de aguas tratadas se realizó en el trabajo de Ortega–Morgado (2017), teniendo para nitrógeno amoniacal un valor de 56.33 mg/L; por consiguiente, se podría inferir con el dato obtenido en el presente trabajo, 13.20 mg/L, que el tratamiento a corto plazo ha sido eficiente para disminuir las concentraciones de esta especie de nitrógeno. Sin embargo, no puede considerarse como un dato certero de la completa eficiencia del tratamiento de aguas residuales por la PTAR de Atotonilco dado que el estudio aquí realizado refleja las condiciones de un momento particular. Por tanto, es necesario realizar un seguimiento en los próximos años utilizando diversos indicadores de calidad para verificar el adecuado tratamiento de las aguas provenientes de la ZMVM.

El amoniaco y amonio son formas inestables del nitrógeno que rápidamente se asimilan u oxidan a nitrato (Ye y Thomas, 2001). Una gran cantidad de amoniaco y poco nitrato significaría una gran entrada de materia orgánica que no se esté oxidando eficientemente por la microbiota, ocasionado tal vez por deficiencia de oxígeno disuelto tras el proceso de eutroficación, como parece suceder en el agua residual de la “Presa Endhó”, o bien el nitrato es consumido rápidamente por los microorganismos anaerobios por desnitrificación. Es más probable que ocurra el segundo supuesto que está respaldado por el valor negativo del potencial de oxido-reducción, -122.733 mV, indicando un fuerte ambiente reductor (Suslow, 2004).

Tanto en manantial como en río Tula, el valor de nitrato es mayor que el de nitrógeno amoniacal teniendo con ello una menor carga de MO confirmada con los valores de DQO en comparación al agua residual. Aguas no contaminadas presentan valores de DQO menores a 20 mg/L (Jain y Singh, 2003): por consiguiente, el manantial “Canal Parshall” es agua no contaminada, mientras que el agua de río Tula y presa Endhó sí lo son.

En el caso de todas las aguas de riego, se tiene como antecedente la presencia de metales pesados (Ortega–Morgado, 2017). El presente trabajo no tuvo como objeto de estudio a

estos. Sin embargo, es importante seguir realizando el monitoreo en agua, así como el estudio de su presencia o persistencia en los suelos agrícolas ya reportado en Guédron y colaboradores (2014).

A pesar de las virtudes del uso de aguas residuales en cuanto a nutrientes, esta debe de emplearse con cautela por su composición variable que incluye componentes con posible influencia negativa como bacterias indicadoras fecales reportadas en distintos estudios como es el caso del trabajo de Yin y colaboradores (2018) quienes no recomiendan el uso de aguas residuales recuperadas por una mayor contaminación de *Escherichia coli* en hojas de espinacas crecidas en el suelo regado.

La falta de límites permisibles para ciertos parámetros fisicoquímicos de calidad y valores poco restringidos de otros, hacen indudable la necesidad de crear, revisar y en su caso, modificar las normas y leyes referentes al recurso hídrico y su relación con la agricultura. Teniendo en consideración el establecer valores adecuados conforme a su origen, uso y efecto que puedan tener, atendiendo la seguridad alimentaria, ambiental y de salud del ecosistema y las poblaciones.

Estructura y dinámica microbiana

Como se ha venido mencionando, las comunidades microbianas se ven condicionadas por factores abióticos y bióticos que tienen lugar en su hábitat; afrontando el dinamismo con diferentes estrategias, pero de igual modo son modificadores del entorno inmediato en el que se desarrollan, teniendo alcances y repercusiones globales, como los ciclos biogeoquímicos y en última instancia, el calentamiento global (Jansson y Hofmockel, 2020). El papel de los microorganismos en la agricultura es imprescindible, al ser fuente y actores en la regulación de nutrientes que limitan la productividad agrícola. Las prácticas agrícolas influyen sustancialmente en las comunidades microbianas de suelos, como se ha reportado para el cambio de uso de suelo, el uso de fertilizantes, la agricultura extensiva, así también el tipo y calidad de irrigación como el riego con aguas residuales, entre otras prácticas más (De Souza Andrade *et al.*, 2003).

En este estudio al centrarnos en la estructura microbiana del dominio Bacteria y Archaea, así como de las comunidades de BFN y BOA de un suelo conservado, tres suelos agrícolas, y las aguas de riego asociadas (manantial, río Tula, residual), encontramos distintas evidencias con referencia al efecto que estas últimas tienen en los suelos.

Estructura y dinámica total

Dominio Bacteria: RNAr 16S

De manera general, la riqueza ponderada bacteriana fue menor a los demás grupos microbianos; hecho relacionado al número bajo de OTUs obtenidos. No expresa la riqueza resultante de los grupos funcionales bacterianos estudiados (BFN: *nifH* y BOA: *amoA*) y dado que, con el mismo conjunto de primers (341F-GC/907R) en DGGE, se ha reportado la obtención de hasta 43 y 20 OTUs en suelo y agua, respectivamente (Li *et al.*, 2009; Rösel *et al.*, 2012). Se sospecha una ineficiencia en la amplificación específica de fragmentos bacterianos, a pesar de que la región V3-V5 ha sido recomendada para amplificar productos de PCR largos para análisis en DGGE y TGGE (Yu y Morrison, 2004). Sin embargo, aún con lo anterior, la riqueza ponderada entre aguas de riego y suelos parece tener concordancia. Dado que, tanto las aguas de riego con aportes residuales (río Tula y residual) y sus suelos correspondientes, no se distinguen entre sí, en cada grupo.

La calidad del pulso hidráulico no ha generado un cambio en la riqueza ponderada de suelos en términos de riqueza (tiempo antes del riego), concordando con lo descrito recientemente por Li y colaboradores (2019), quienes no encontraron diferencias significativas de diversidad entre un área con riego de aguas residuales tratadas y otra con riego de agua subterránea. Previamente, Huang y colaboradores (2016), estimaron estos mismos resultados, pero también estudiaron suelos regados con agua de río, para los cuales la diversidad fue mucho mayor, contrario a lo aquí hallado. Con respecto al agua de riego de manantial, se obtuvo la menor riqueza ponderada y dado que en el suelo respectivo, la riqueza disminuyó tras el riego, podría considerarse que el pulso hidráulico no adicionó integrantes a la comunidad o que los componentes fisicoquímicos del agua, o la falta de ellos, como materia orgánica, generaron condiciones que limitaron a la comunidad bacteriana; apoyado por la OTU 1 poco

intensa para el tiempo después del riego, siendo reflejo de su posible baja abundancia o bien de la baja eficiencia de la extracción de DNA. Al limitarse a un tiempo de estudio y suelo, es más factible que se deba al primer supuesto tras realizarse el riego. Para corroborar esta idea, sería necesario realizar PCR cuantitativa.

Si bien, a nivel de riqueza ponderada, o bien de capacidad de carga microbiana como lo cita Marzorati y colaboradores (2008), la temporada de riego ni la calidad de agua diferenció estadísticamente a los suelos exceptuando el suelo de manantial; con el dendograma de ambos tiempos es notable observar que el pulso hidráulico de una temporada (lluvia o riego) fue determinante para separar la estructura bacteriana de los suelos con base a la calidad de agua: de lluvia, manantial, río Tula y residual. Al no haber una estructura definida para cada suelo en el tiempo antes del riego, se conjetura, las comunidades bacterianas han tenido una baja resiliencia y resistencia al pulso hidráulico sin importar la calidad, concordando con un ambiente adverso de acuerdo con el rango de riqueza ponderada por rango.

La evaluación de la calidad microbiana de diferentes aguas de riego se ha limitado al estudio de la contaminación microbiana con un enfoque prevalente de seguridad alimenticia, usando indicadores fecales, como *E. coli* (Truchado *et al.*, 2016), dejando de lado el estudio de su diversidad como contribuyente microbiano a los suelos agrícolas. Dado que A-RT tiene muchos aportes residuales, como ya se ha discutido previamente, es una fuente no diferenciada a A-N; ambas teniendo una riqueza ponderada diferente y mayor a A-M. Coincidiendo con un estudio reciente de diferentes aguas de riego en España, donde la diversidad de aguas residuales es mayor a la hallada en agua potable, de presa, subterránea, de río y agua residual tratada (Rusiñol *et al.*, 2020). Sin embargo, lo anterior contrasta con la similitud resultante de la estructura de OTUs, donde M y RT son más similares entre sí. Lo que podría indicar condiciones particulares en N, que afectan a OTUs específicos.

Es primordial señalar, que no se tienen por completo aguas de riego semejantes entre los diferentes estudios en el mundo por las diferencias en el manejo del recurso hídrico. Se ha encontrado que las comunidades bacterianas de ríos y presas son semejantes en su estado natural (Tamames *et al.*, 2010), lo que realza la necesidad de monitorear las descargas

urbanas y evitar la contaminación de los afluentes naturales para prevenir su deterioro y preservar cuanto se pueda la diversidad autóctona. Estudios recientes han demostrado la alteración de la estructura bacteriana en receptores de efluentes de una PTAR, con una composición de por lo menos 50% de los componentes provenientes de la planta (Mansfeldt *et al.*, 2020). Por ello y dado la reciente apertura de la PTAR de Atotonilco, se sugiere el monitoreo del río Tula y de la presa Endhó en una escala de tiempo y espacio.

Dominio Archaea: RNAr 16S

Para la comunidad del dominio Archaea la calidad del pulso hidráulico aún no ha diferenciado la riqueza ponderada (tiempo antes del riego). Sin embargo, la temporada de riego con un pulso hidráulico con aportes residuales si modificó la riqueza ponderada de Archaea de un tiempo a otro; no obstante, los niveles de riqueza son semejantes a los obtenidos en el suelo control. Por consiguiente, no se puede asociar con certeza el aumento de riqueza ponderada a la calidad del pulso hidráulico. Tanto los suelos como las aguas tienen una óptima capacidad de carga, de acuerdo con los rangos de riqueza ponderada, dando a la comunidad una mayor capacidad de adaptabilidad.

En suelos agrícolas, Pereira e Silva y colaboradores (2012) correlacionan de manera positiva el aumento en la diversidad de arqueas con el contenido de MO y NO_3^- , coincidiendo con los valores más altos de riqueza ponderada encontrados en este trabajo para S-C y S-N. Si bien para el dominio Archaea, el estado del arte ha aumentado considerablemente en los últimos 30 años, demostrándose su distribución en prácticamente todos los ambientes (Bomberg *et al.*, 2008; Auguet *et al.*, 2010). En suelos, la mayoría de los estudios se dirigen a suelos forestales y una minoría a suelos agrícolas. Casi todos ellos, se han centrado en comunidades metanógenas de cultivos inundados o de suelos negros, Chernozems (Liu *et al.*, 2019). En un estudio amplio de suelos (179 muestras de varios biomas no secos), solo se ha identificado la relación C:N como determinante negativo de la abundancia relativa (Bates *et al.*, 2011) contrario a los datos obtenidos; mientras que en estudios locales, se ha sugerido a la salinidad, pH (Tripathi *et al.*, 2015), clima y elevación como determinantes; siendo dominante el linaje 1.1b de *Crenarchaeota* como grupo indicador para suelos (Auguet *et al.*, 2010).

Con respecto a las relaciones de similitud, la calidad del pulso hidráulico determinó la estructura específica en cada suelo (tiempo después del riego). De manera similar, en el tiempo antes, la historia de riego parece haber fijado una estructura de acuerdo con la calidad del pulso hidráulico; sin embargo, para S-RT y S-N, no ha sido suficiente ya que ambos suelos se agrupan, posiblemente porque las OTUs del tiempo después que diferenciaban a los suelos sucumbieron. Por otro lado, la presencia de ciertas OTUs (5, 6 y 7) en las aguas de riego y los suelos después del riego, pueden denotar la entrada de estos filotipos al suelo por medio del riego. Sin embargo, al estar presentes también en el suelo conservado, es más probable sean filotipos que estuvieran desde el tiempo antes del riego (no detectadas) y que tras la perturbación del pulso hidráulico (lluvia o riego) resistieran y aumentaran su abundancia. Teniendo esta información precedente, el siguiente paso es corroborar la identidad microbiana de cada OTU, por medio de la secuenciación de las bandas recuperadas.

En las aguas de riego a pesar de las diferencias fisicoquímicas halladas, estas no se diferencian estadísticamente a nivel de riqueza ponderada, contrario a lo obtenido en el dendograma de similitud del perfilado de la estructura bacteriana, donde cada calidad de agua presenta OTUs particulares que los separan. No hay reportes previos de la ecología de arqueas en aguas de riego, exceptuando la dinámica en PTAR (Kuroda *et al.*, 2015), pero al ser un sistema cerrado y controlado es difícil equiparar ambos ambientes.

Estructura y dinámica funcional

Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN): *nifH*

Se ha reportado por separado en diversos estudios, que la estructura diazotrófica en suelos está influenciada principalmente por tres factores: eventos de estrés (aplicación de pesticidas y fertilizantes, aumento de salinidad), función del ecosistema o uso del suelo (forestal o agrícola) y prácticas de manejo (incorporación de rastrojos, tipo de cultivo, manejo de fertilizante, rotación de cultivos, presencia de cultivo) (Wakelin *et al.*, 2010; Orr *et al.*, 2011; Sharma y Singh, 2017). Factores más específicos relacionados con genotipos *nifH* son el contenido de carbono orgánico particulado (Wakelin *et al.*, 2010), pH (Feng *et al.*,

2018), contenido de arcillas (Pereira e Silva *et al.*, 2011) y nitrógeno (Gonzalez Perez *et al.*, 2014).

Para una mejor comprensión y discusión de resultados, se debe considerar en los suelos estudiados, que los factores modificadores se presentan de manera variable por el tipo de uso de suelo agrícola. Tanto las prácticas de manejo como los eventos de estrés se relacionan estrechamente, entre los principales está la incorporación de rastrojos (S-N), presencia de cultivos (S-M, S-RT), el riego con agua sin un tratamiento controlado para uso agrícola (S-M, S-RT, S-N) asociado directamente a la entrada a largo plazo de N orgánico en S-RT y S-N, además de la aplicación directa de fertilizante químico (urea) y orgánico (estiércol) (S-M, S-RT) e indirecta con la presencia intermitente de ganado (S-N).

El pulso hidráulico con diferentes calidades de agua no ha generado diferencias entre suelos a nivel de riqueza ponderada (antes del riego), ni en una temporada de riego. S-N sin importar el tiempo, presentó el valor más alto de riqueza ponderada de OTUs *nifH* y no así el suelo con riego de agua de manantial. Es decir, fue opuesto a la hipótesis planteada.

En suelos agrícolas, las prácticas de manejo como la adición de nitrógeno (fertilizantes inorgánicos y orgánicos, estiércol, aguas de riego) afectan sustancialmente el ciclo de N (Sainju, 2017). Se ha reportado la fertilización química a largo plazo modifica la estructura diazotrófica con la disminución de la diversidad (Feng *et al.*, 2018), hecho contrario a la alta riqueza ponderada obtenida para S-M y S-RT. Sin embargo, lo obtenido tiene coherencia al tener presente que el agua de riego RT tiene aportes importantes de descargas orgánicas y ambos suelos están adicionados con estiércol. Concordando con lo obtenido en diversos estudios a largo plazo del uso combinado de fertilizantes químicos y orgánicos (Liao *et al.*, 2018) donde la diversidad de fijadores de N aumenta. Por otro lado, en suelos con solo suplementos orgánicos, como residuos de cultivos y estiércol, se mantiene y mejora la diversidad diazotrófica (Teng *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2012), lo que es consistente para S-N que solo recibe aportes orgánicos.

Si bien se ha reportado en altas concentraciones de amonio y nitrato, hay bajas abundancias del gen *nifH* (Lindsay *et al.*, 2010; Pereira E Silva *et al.*, 2013; Sharma y Singh, 2017), esto no

denota una disminución en la riqueza de diazótrofos como lo demuestran Fan y colaboradores en 2019. Ellos, tras tres y media décadas de fertilización (inorgánica y orgánica) en suelos agrícolas comprobaron una disminución del 50% en la tasa de fijación de N, con una asociada disminución en la abundancia relativa total, pero no así de la riqueza de diazótrofos. Identificaron grupos “ganadores” asociados a grupos facultativos o copiotrofos como *Bradyrhizobium* y *Burkholderia* que aprovechan el N entrante para su crecimiento en vez de fijar N, y grupos “perdedores”, oligotróficos, que disminuyen su abundancia identificando como tales a *Geobacter* y *Anaeromyxobacter*. En los suelos con riego de aguas con aportes residuales estudiados, podría haber diazótrofos ganadores que aprovechen el N entrante, evitando fijarlo, evidenciando estos suelos como ambientes muy habitables con una gran capacidad de carga, por los valores de riqueza ponderada obtenidos de acuerdo con los rangos establecidos por Marzorati y colaboradores (2008). Mientras que en el suelo con riego de agua de manantial los diazótrofos “perdedores” (en un entorno de fertilización) serían la comunidad competitiva realizando activamente la fijación de N; en este suelo el ambiente forzaría la alta riqueza ponderada observada. No se tienen los datos requeridos para aseverar estos supuestos; para ello se propone en primera instancia la medición de la tasa de fijación de N, además de la secuenciación del mayor número de bandas recuperadas.

En relación con el perfilado de la estructura de BFN, la calidad del pulso hidráulico ha diferenciado la estructura de S-M, pero no claramente la de suelos con aportes residuales que presentan un alto porcentaje de similitud. Por otro lado, el pulso hidráulico (lluvia o riego) dependiente de la calidad tras la temporada de riego separó la estructura entre suelos, pero no fue suficiente para inducir un cambio en la estructura de un tiempo a otro dentro de un mismo suelo.

En un medio acuático, la gran mayoría de estudios relacionados con diazótrofos se han centrado en ambientes salinos. En una presa de agua dulce, se ha identificado a la estratificación del agua, la mezcla y el N como factores que determinan la variación espacio-tiempo de la estructura y actividad de la comunidad diazotrófica (Wang *et al.*, 2015). En este mismo estudio se usó DGGE y se identificó positivamente al nitrógeno total, el amonio y la

profundidad con un mayor número de OTUs *nifH*, detectando un máximo de 16. Valor dentro del rango, 15 a 22, obtenido para las aguas de riego. Siendo cercano a A-M, agua de riego sin aportes residuales. Sin embargo, estos factores no coinciden con A-RT y A-N, en cuyo caso, el número de bandas sería mayor en A-N por una mayor concentración de nitrógeno total y amonio. En otro estudio, en una laguna hipertrófica la riqueza de la comunidad *nifH* se asoció más fuertemente a la profundidad y no así a la concentración de nutrientes (Highton *et al.*, 2016). Si bien, la estructura de las aguas de riego en el análisis de conglomerados se logra separar, los valores de similitud son bajos en cada grupo. Indicando cada agua de riego no presenta uniformidad de OTUs de BFN.

Bacterias oxidantes de amonio (BOA): amoA

La comunidad microbiana nitrificante, oxidante aerobia de amonio, por mucho tiempo se consideró exclusiva del dominio Bacteria (BOA), pero la presencia del gen *amoA* en ciertas arqueas (AOA), abrió un nuevo debate del papel que tienen en la nitrificación. Hay un consenso del predominio de AOA sobre BOA en diferentes tipos de suelos, incluidos suelos agrícolas (Leininger *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2020). Se ha reportado que en sistemas terrestres, la dinámica de nitrificantes, BOA y AOA, se afecta por la conjunción de diferentes factores como humedad, disponibilidad de amoníaco, relación C:N, pH, así como la competencia por N entre las raíces de las plantas, microorganismos heterótrofos y los mismos nitrificantes, actuando de manera variable, positiva y negativamente, sobre la riqueza, abundancia y funcionalidad activa (Adair y Schwartz, 2008; Xiao *et al.*, 2020). La estructura de comunidades nitrificantes en suelos agrícolas resulta de las condiciones del suelo, la comunidad vegetal y el manejo agrícola (Norton y Ouyang, 2019).

En suelos con alto contenido de amonio, las BOA pese a ser superadas en abundancia por AOA dominan funcionalmente la comunidad nitrificante, siendo susceptibles a modificaciones, en su mayoría a aumentar la abundancia y riqueza cuando se adicionan fertilizantes nitrogenados inorgánicos (Jia y Conrad, 2009; Giguere *et al.*, 2015), condiciones deseadas y creadas en suelos agrícolas. En los suelos aquí estudiados, esto difirió ya que en el suelo control se presentó la menor riqueza ponderada de OTUs para BOA, a pesar de tener la mayor concentración de amonio, que favorecería una mayor diversidad. Sin embargo, la

alta relación de C:N estaría limitando a la comunidad de BOA. En los suelos agrícolas, para el tiempo antes del riego, dadas las características fisicoquímicas de fertilidad, se intuyó que habría una riqueza ponderada baja de BOA. Por ello, se sospecha, que la estructura de BOA encontrada para este tiempo específico puede no reflejar por completo la estructura activa nitrificante. Previamente se ha reportado, tras la influencia de 20 años de irrigación con aguas residuales aumentan las BOA (Levy-Booth *et al.*, 2014), coincidiendo con la alta riqueza ponderada encontrada. En suelos con adición de nitrógeno, se ha documentado la secuenciación de bandas *amoA* de DGGE, correspondiendo al grupo 1, 9 y 3 de *Nitrospira* (Avrahami *et al.*, 2003). Por otro lado, para el tiempo después del riego con agua con aportes residuales, no hubo un incremento significativo de riqueza ponderada, a pesar del alto contenido de nitrógeno inorgánico en el agua de riego, que debería aumentar la diversidad de BOA. Sin embargo, ambos suelos para este tiempo de estudio presentaron vegetación en crecimiento, que pudo causar un efecto de competencia por el amonio. Al no contar con las concentraciones de las formas químicas de nitrógeno en suelos para este tiempo, no se descarta la presencia e importancia de las AOA.

Con relación a las huellas genéticas obtenidas para BOA, el uso de suelo, forestal o agrícola, permitió que se separara, más claramente, la estructura en los suelos ya sea antes o después del riego. No obstante, la calidad del pulso hidráulico en específico de aportes residuales, S-RT y S-N, fue determinante para una estructura compartida (tiempo después del riego) que se mantuvo levemente hasta el tiempo antes del riego.

Dentro de las aguas de riego, no se encontró una separación clara de riqueza ponderada para BOA entre las aguas con aportes residuales, siendo mayor a los datos de A-M. Los estudios de la comunidad nitrificante en cuerpos de aguas dulce son limitados, siendo nulos los dirigidos específicamente a agua de riego agrícola. Zhou y colaboradores (2015) estudiaron la abundancia y función nitrificante de aguas continentales incluyendo aguas subterráneas, lagos, ríos y presas, encontrando ubicuidad tanto de BOA como AOA; lo notorio es la diversidad y abundancia mayor generalizada de las segundas sobre las primeras. Sin embargo, la tasa de oxidación de amonio se adjudicó a BOA. Recién en 2020, Ginawi y colaboradores corroboraron la abundancia de AOA en un río con un gradiente de calidad en

donde además de hacer notorio y demostrar que las actividades antropogénicas y el estrés ambiental pueden modificar la estructura y función de las comunidades nitrificantes, encontraron que en ambientes no perturbados dominan las AOA, mientras que en aguas asociadas a actividades humanas (receptores de efluentes residuales) lo son las BOA. Se ha reportado que la concentración de amonio, OD y pH son factores que influyen en la relación de AOA y BOA (Abell *et al.*, 2011; Trias *et al.*, 2012). Por lo antes citado y dado que A-RT y A-N son aguas contaminadas estarían dominadas por BOA. Se ha documentado que a altas concentraciones de amonio la presencia significativa de *Nitrosomonas*, indican actividad antropogénica (Merbt *et al.*, 2015). Para A-M, la riqueza ponderada de nitrificantes podría ser más alta, por una posible abundancia predominante de AOA no detectada dadas sus características fisicoquímicas del agua; la PCR cuantitativa puede aclarar la relación BOA vs. AOA.

A destacar es que el A-RT y A-N, además de no ser diferentes a nivel de riqueza ponderada para BOA, comparten un alto porcentaje de similitud entre los patrones de sus perfiles, indicando una estructura compartida en aguas con aportes residuales.

CONCLUSIONES

Tanto en términos de materia orgánica y de suministro de nitrógeno, el suelo con riego de agua residual fue el más fértil de los suelos agrícolas estudiados. Sin embargo, no se puede asegurar que esta condición sea producto del riego con agua residual por las condiciones de manejo del suelo.

En cuanto a la calidad hídrica de las tres aguas de riego, considerando las normas con un enfoque de uso agrícola, ninguna calificó como adecuada para riego agrícola. Tanto el agua de riego de río Tula y el agua de riego residual, de acuerdo a la demanda química de oxígeno son aguas contaminadas no siendo diferentes entre ellas.

Para los suelos estudiados, en el tiempo antes del riego, la calidad del pulso hidráulico sin importar la historia de riego ha diferenciado la estructura microbiana total de Archaea y la estructura funcional de las BFN. Mientras que la calidad del pulso hidráulico en el tiempo después del riego, fue determinante para modificar la estructura de Bacteria, Archaea y BOA. La estructura del suelo con riego de río Tula y el de riego con agua residual fue similar en Archaea y BOA, en los tiempos antes y después del riego, respectivamente.

La calidad del pulso hidráulico, en términos de riqueza ponderada no ha generado un cambio en los suelos estudiados, tiempo antes del riego, para Bacteria, Archaea, BFN y BOA. Sin embargo, tras la temporada de riego la calidad del pulso hidráulico generó un cambio en la riqueza ponderada de Bacteria, Archaea y BOA para el suelo con riego de manantial, los suelos con aportes residuales y en el suelo control, respectivamente. Por lo tanto, la calidad del pulso hidráulico no presenta un efecto homogéneo en todas las comunidades microbianas, por lo cual probablemente otros factores del manejo del suelo influyen sobre la diversidad microbiana del suelo.

En las aguas de riego su calidad fue determinante para la estructura de Archaea y BFN. Sin embargo, no es suficiente para diferenciar la estructura de BOA para las aguas con aportes residuales, agua de río Tula y agua residual; mismo efecto para la riqueza ponderada de Bacteria y BOA.

CONSIDERACIONES FINALES

Este trabajo aporta información de las comunidades microbianas de suelos regados con distintas calidades de aguas. Sin embargo, no se controlaron variables del manejo agrícola como la historia de irrigación y la fertilización, por lo tanto, se necesitan más estudios extensos en temporalidad en condiciones controladas, por ejemplo, de microcosmos, para el monitoreo adecuado de las implicaciones del uso de diferentes aguas de riego.

La secuenciación pendiente de las bandas dará mayor información detallada de las comunidades microbianas y dado que la presencia de genes funcionales, no siempre se correlaciona con la actividad funcional presente en cierto sitio y momento, se recomienda la adición de enfoques transcryptómicos o bien proteómicos, poco abordados en el contexto de suelos con riego.

REFERENCIAS

- Abell, G. C. J., Banks, J., Ross, D. J., Keane, J. P., Robert, S. S., Revill, A. T., y Volkman, J. K. (2011). Effects of estuarine sediment hypoxia on nitrogen fluxes and ammonia oxidizer gene transcription. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(1), 111–122.
- Adair, K. L., y Schwartz, E. (2008). Evidence that ammonia-oxidizing archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of northern Arizona, USA. *Microbial Ecology*, 56(3), 420–426.
- Adhikari, K., y Hartemink, A. E. (2016). Linking soils to ecosystem services — A global review. *Geoderma*, 262, 101–111.
- Ågren, G. I., Wetterstedt, J. Å. M., y Billberger, M. F. K. (2012). Nutrient limitation on terrestrial plant growth - modeling the interaction between nitrogen and phosphorus. *New Phytologist*, 194(4), 953–960.
- Akinoyemi, J. O., y Souley, S. O. (2014). Monitoring the quality of some sources of irrigation water in different parts of Ogun State, Nigeria. *IERI Procedia*, 9, 123–128.
- Apajalahti, J. H., Kettunen, A., Bedford, M. R., y Holben, W. E. (2001). Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5656–5667.
- ASRVM A.C, Asociación de Silvicultores de la Región del Valle del Mezquital A. C. (2010). *Estudio Regional Forestal Valle del Mezquital, Hgo, UMAFOR 1304*. México: ASRVM AC.
- Auguet, J., Barberan, A., y Casamayor, E. (2010). Global ecological patterns in uncultured Archaea. *The ISME Journal*, 4(2), 182–190.
- Aвраhаmi, S., Liesack, W., y Conrad, R. (2003). Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology*, 5(8), 691–705.
- Bailey, A. W. (1976). Nitrogen fixation in honey mesquite seedlings. *Journal of Range Management*, 29(6), 479–481.
- Barth, R. C., y Klemmedson, J. O. (1982). Amount and distribution of dry matter, nitrogen and organic carbon in soil-plant systems of mesquite and palo verde. *Journal of Range Management*, 35, 412–418.
- Bastida, F., Torres, I. F., Romero-Trigueros, C., Baldrian, P., Větrovský, T., Bayona, J. M., ... Nicolás, E. (2017). Combined effects of reduced irrigation and water quality on the soil microbial community of a citrus orchard under semi-arid conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 104, 226–237.
- Bates, S. T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J. G., Walters, W. A., Knight, R., y Fierer, N. (2011). Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *The ISME Journal*, 5(5), 908–917.
- Bautista-Cruz, A., Etchevers-Barra, J., del Castillo, R. F., y Gutiérrez, C. (2004). La calidad del suelo y sus indicadores. *Ecosistemas*, 13(2), 90–97.
- Becerra-Castro, C., Lopes, A. R., Vaz-Moreira, I., Silva, E. F., Manaia, C. M., y Nunes, O. C. (2015). Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. *Environment International*, 75, 117–135.
- Bevivino, A., Paganin, P., Bacci, G., Florio, A., Pellicer, M. S., Papaleo, M. C., ... Dalmastri, C. (2014). Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a mediterranean region. *PLoS ONE*, 9(8), e105515.
- Blum, W. E. H., Warkentin, B. P., y Frossard, E. (2006). Soil, human society and the environment. En E. Frossard, W. E. H. Blum, y B. P. Warkentin (Eds.) *Function of soils for human societies and the environment, special publication 266* (pp. 1-8). London: The Geological Society of London.
- Bodnar, R. J., Azbej, T., Becker, S. P., Cannatelli, C., Fall, A., y Severs, M. J. (2013). Whole Earth geohydrologic cycle, from the clouds to the core: the distribution of water in the dynamic Earth system. En M. E. Bickford (Ed.), *The web of geological sciences: advances, impacts, and interactions* (pp. 431-461). USA: The Geological Society of American, Inc.
- Bomberg, M., Montonen, L., Münster, U., y Jurgens, G. (2008). Diversity and function of archaea in freshwater habitats. *Current Trends in Microbiology*, 4, 61–89.
- Braatz, S., y Kandiah, A. 1996. Utilización de aguas residuales urbanas para el riego de árboles y bosques. *Unasylva*, 47(185), 45–51.
- Brady, N.C. (1990). *The nature and properties of soils*. (10a Ed.). New York, USA: McMillan.
- Bravo-Inclán, L. A., Saldaña-Fabela, M. P., y Sánchez-Chávez, J. J. (2008). Long-term eutrophication diagnosis of a high altitude body of water, Zimapán Reservoir, Mexico. *Water Science y Technology*, 57(11), 1843–1849

- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., y Noller, H. F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 148(2), 107–127.
- Broszat, M., Nacke, H., Blasi, R., Siebe, C., Huebner, J., Rolf, D., y Grohmann, E. (2014). Wastewater irrigation increases the abundance of potentially harmful gammaproteobacteria in soils in Mezquital Valley, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5282-5291.
- Brumme, R., Wang, C. P., Priess, J., Raubuch, M., y Steinmetz, G. (2009). Fate, transport, and retention of applied ¹⁵N labelled nitrogen in forest soils. En R. Brumme y P. K. Kanna (Eds.), *Functioning and management of european beech ecosystems* (pp. 253-263). Berlin: Springer.
- Bukowska, A., Bielska, A., Karnkowska, A., Chróst, R. J., y Jasser, I. (2014). Molecular (PCR-DGGE) versus morphological approach: analysis of taxonomic composition of potentially toxic cyanobacteria in freshwater lakes. *Aquatic Biosystems*, 10, 1-10.
- Bundt, M., Widmer, F., Pesaro, M., Zeyer, J., y Blaser, P. (2001). Preferential flow paths: biological 'hot spots' in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(6), 729–738.
- Burns, E. (2009). *Repensar la cuenca: la gestión de ciclos del agua en el Valle de México*. México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Cabirol, N., Villemur, R., Perrier, J., Jacob, F., Fouillet, B., y Chambon, P. (1998). Isolation of a methanogenic bacterium, *Methanosarcina* sp. strain FR, for its ability to degrade high concentrations of perchloroethylene. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 1142–1147.
- Cabirol, N., Rojas-Oropeza, M., y Fernández, F. J. (2011). Biología molecular: herramienta para estudios de ecología microbiana aplicada a estudios ambientales. En F. Fierro-Fierro y M. Vergara-Onofre (Eds.), *Impacto de la biología molecular y las nuevas tecnologías en el conocimiento de la función celular y sus aplicaciones* (pp. 77–98). México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Canfora, L., Bacci, G., Pinzari, F., Lo Papa, G., Dazzi, C., y Benedetti, A. (2014). Salinity and bacterial diversity: to what extent does the concentration of salt affect the bacterial community in a saline soil? *PLoS ONE*, 9(9), e106662.
- Carbonetto, B., Rascovan, N., Álvarez, R., Mentaberry, A., y Vázquez, M. P. (2014). Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine Pampas. *PLoS ONE*, 9(6), e99949.
- Castilla-Hernández, P., del Rocío Torres-Alvarado, M., Herrera-San Luis, J. A., y Cruz-López, N. (2014). Water quality of a reservoir and its major tributary located in east-central Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(6), 6119–6135.
- CGPEAS, Coordinación General de Proyectos Especiales de Abastecimiento y Saneamiento. (2018). Oficio B00.12. CPTTI.-084/2018 en respuesta a la solicitud de información No. 1610100231618.
- Chapela Lara, M. (2011). *Variación temporal en el contenido de metales pesados en suelos regados con aguas residuales*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cheung, P. K., Yuen, K. L., Li, P. F., Lau, W. H., Chiu, C. M., Yuen, S. W., y Baker, D. M. (2015). To swim or not to swim? A disagreement between microbial indicators on beach water quality assessment in Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 101(1), 53–60.
- Chevremont, A. C., Boudenne, J. L., Coulomb, B., y Farnet, A. M. (2013). Impact of watering with UV-LED-treated wastewater on microbial and physico-chemical parameters of soil. *Water Research*, 47(6), 1971–1982.
- Collins, W. W., y Qualset, C. O. (1999). *Biodiversity in agroecosystems*. Florida, USA: CRC Press.
- CONAGUA, Comisión Nacional del Agua. (2016). *Ley Federal de Derechos, Disposiciones Aplicables en Materia de Aguas Nacionales 2020*. Recuperado el 25 de agosto de 2018 de <https://www.gob.mx/conagua/documentos/ley-federal-de-derechos-2020?state=published>
- CONAGUA. (2017). Sistema Nacional de Información del agua, Calidad del agua. Recuperado el 25 de agosto de 2018 de <http://sina.conagua.gob.mx/sina/tema.php?tema=calidadAgua&ver=reporte&o=7&n=nacional>
- CONAGUA. (2018). Oficio B00.912.001.MT.-371 en respuesta a la solicitud de información No. 161010026318.
- Contreras, J. D., Meza, R., Siebe, C., Rodríguez-Dozal, S., López-Vidal, Y. A., Castillo-Rojas, G., ... Eisenberg, J. N. S. (2017). Health risks from exposure to untreated wastewater used for irrigation in the Mezquital Valley, Mexico: A 25-year update. *Water Research*, 123, 834–850.
- Coskun, D., Britto, D. T., Shi, W., y Kronzucker, H. J. (2017). How plant root exudates shape the nitrogen cycle. *Trends in Plant Science*, 22(8), 661–673.

- Cruz Campa, S. (1965). *Rehabilitación integral del Distrito de Riego 03, Tula, Hgo.* Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo.
- Cruz-Martínez, K., Rosling, A., Zhang, Y., Song, M., Andersen, G. L., y Banfield, J. F. (2012). Effect of rainfall-induced soil geochemistry dynamics on grassland soil microbial communities. *Applied Environmental Microbiology*, 78(21), 7587-7595.
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., ... Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509.
- Dalkmann, P., Broszat, M., Siebe, C., Willaschek, E., Sakinc, T., Huebner, J., ... Siemens, J. (2012). Accumulation of pharmaceuticals, Enterococcus, and resistance genes in soils irrigated with wastewater for zero to 100 years in central Mexico. *PLoS ONE*, 7(9), e45397.
- De La Mora-Orozco, C., Flores-Lopez, H., Rubio-Arias, H., Chavez-Duran, A., y Ochoa-Rivero, J. (2017). Developing a water quality index (WQI) for an irrigation dam. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(5), 439.
- De Souza Andrade, D., Colozzi-Filho, A., Balota, E. L., y Hungria, M. (2003). Long-term effects of agricultural practices on microbial community. En L. García-Torres, J. Benites, A. Martínez-Vilela, y A. Holgado-Cabrera (Eds.), *Conservation agriculture* (pp. 301-306). Dordrecht: Springer.
- del Mar Alguacil, M., Torrecillas, E., Torres, P., García-Orenes, F., y Roldán, A. (2012). Long-term effects of irrigation with waste water on soil AM Fungi diversity and microbial activities: the implications for agro-ecosystem resilience. *PLoS ONE*, 7(10), e47680.
- Delgado, A., y Gómez, J. A. (2016). The soil physical, chemical and biological properties. En F. Villalobos y E. Fereres (Eds.), *Principles of agronomy for sustainable agriculture* (pp. 15–26). Cham: Springer.
- Delgado-Baquerizo, M., Reith, F., Dennis, P. G., Hamonts, K., Powell, J. R., Young, A., ... Bissett, A. (2018). Ecological drivers of soil microbial diversity and soil biological networks in the Southern Hemisphere. *Ecology*, 99(3), 583–596.
- Diario Oficial de la Federación. (1981). *Ley Federal de Derechos*. Recuperado el 27 de mayo de 2018 de: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/index.htm>
- Ding, G. C., Radl, V., Schloter-Hai, B., Jechalke, S., Heuer, H., Smalla, K., y Schloter, M. (2014). Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine. *PLoS ONE*, 9(3), e92958.
- Doran, J. W., y Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15(1), 3–11.
- Draper, A. D., Doores, S., Gourama, H., y Laborde, L. F. (2016). Microbial survey of Pennsylvania surface water used for irrigating produce crops. *Journal of Food Protection*, 79(6), 902–912.
- Elías – Lara, M. (2018). Plan sostenible y participativo de manejo de agua potable en cabañas ecológicas, caso de estudio: comunidad hñähñü “El Alberto”, Ixmiquilpan, Hidalgo, México. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Elifantz, H., Kautsky, L., Mor-Yosef, M., Tarchitzky, J., Bar-Tal, A., Chen, Y., y Minz, D. (2011). Microbial activity and organic matter dynamics during 4 years of irrigation with treated wastewater. *Microbial Ecology*, 62(4), 973–981.
- Eregno, F. E., Tryland, I., Tjomsland, T., Kempa, M., y Heistad, A. (2018). Hydrodynamic modelling of recreational water quality using *Escherichia coli* as an indicator of microbial contamination. *Journal of Hydrology*, 561, 179–186.
- Fan, K., Delgado-Baquerizo, M., Guo, X., Wang, D., Wu, Y., Zhu, M., ... Chu, H. (2019). Suppressed N fixation and diazotrophs after four decades of fertilization. *Microbiome*, 7, 143.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (1996). *Nociones ambientales básicas para profesores rurales y extensionistas*, Estudio FAO Montes 131. Roma, Italia: FAO
- FAO. (2015a). AQUASTAT. Extracciones de agua. Recuperado el 6 de septiembre de 2018 de: <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/didyouknow/printesp2.stm>
- FAO. (2015b). *Las funciones del suelo*. Recuperado el 12 de mayo de 2018 de: <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/es/c/294325/>
- FAO. (2016). AQUASTAT Base de datos. Extracción de agua por sectores. Recuperado el 7 de septiembre de 2018 de: <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/data/query/results.html>

- FAO., y GTIS. (Grupo Técnico Intergubernamental del Suelo). (2016). *Estado Mundial del Recurso Suelo - Resumen Técnico*. Roma, Italia: FAO.
- Farhadkhani, M., Nikaeen, M., Yadegarfar, G., Hatamzadeh, M., Pourmohammadbagher, H., Sahbaei, Z., y Rahmani, H. R. (2018). Effects of irrigation with secondary treated wastewater on physicochemical and microbial properties of soil and produce safety in a semi-arid area. *Water Research*, *144*, 356–364.
- Faure, D., y Joly, D. (2016). Structure and functioning of microbial ecosystems: metagenomics and integration of omics. En D. Faure y D. Joly (Eds.), *Insight on environmental genomics* (pp. 103–113). Elsevier.
- Feng, M., Adams, J. M., Fan, K., Shi, Y., Sun, R., Wang, D., ... Chu, H. (2018). Long-term fertilization influences community assembly processes of soil diazotrophs. *Soil Biology and Biochemistry*, *126*, 151–158.
- Fernandes, E. C. M., Motavalli, P. P., Castilla, C., y Mukurumbira, L. (1997). Management control of soil organic matter dynamics in tropical land-use systems. *Geoderma*, *79*(1–4), 49–67.
- Fields, S. (2004). Global nitrogen: cycling out of control. *Environmental Health Perspectives*, *112*(10), A556-A563.
- Fierer N., y Lennon, J. T. (2011). The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *American Journal of Botany*, *98*(3), 439-448.
- Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R., ... y Jackson, R. B. (2007). Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(21), 7059-7066.
- Fonseca-Salazar, M. A., Díaz-Ávalos, C., Castañón-Martínez, M. T., Tapia-Palacios, M. A., y Mazari-Hiriart, M. (2016). Microbial indicators, opportunistic bacteria, and pathogenic protozoa for monitoring urban wastewater reused for irrigation in the proximity of a megacity. *EcoHealth*, *13*(4), 672–686.
- Frenk, S., Hadar, Y., y Minz, D. (2014). Resilience of soil bacterial community to irrigation with water of different qualities under Mediterranean climate. *Environmental Microbiology*, *16*(2), 559–569.
- Frenk, S., Dag, A., Yermiyahu, U., Zipori, I., Hadar, Y., y Minz, D. (2015). Seasonal effect and anthropogenic impact on the composition of the active bacterial community in Mediterranean orchard soil. *FEMS Microbiology Ecology*, *91*(9), fiv096.
- Frenk, S., Hadar, Y., y Minz, D. (2018). Quality of irrigation water affects soil functionality and bacterial community stability in response to heat disturbance. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(4), e02087-17.
- Friedel, J. K., Langer, T., Siebe, C., y Stahr, K. (2000). Effects of long-term waste water irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and its activities in central Mexico. *Biology and Fertility of Soils*, *31*(5), 414–421.
- García-Hernández, J., y Tovar-García, E. D. (2012). Corredor de balnearios en el Valle del Mezquital, Hidalgo: empresarios, turismo y desarrollo. *Revista Internacional La Nueva Gestión Organizacional*, *7*(13), 11–28.
- García-Orenes, F., Caravaca, F., Morugán-Coronado, A., y Roldán, A. (2015). Prolonged irrigation with municipal wastewater promotes a persistent and active soil microbial community in a semiarid agroecosystem. *Agricultural Water Management*, *149*, 115–122.
- García-Sánchez, R., Camargo-Ricalde, S. L., García-Moya, E., Luna-Cavazos, M., Romero-Manzanares, A., y Montaña, N. M. (2012). *Prosopis laevigata* and *Mimosa biuncifera* (Leguminosae), jointly influence plant diversity and soil fertility of a Mexican semiarid ecosystem. *Revista de Biología Tropical*, *60*, 87–103.
- Gelsomino, A., Badalucco, L., Ambrosoli, R., Crecchio, C., Puglisi, E., y Meli, S. M. (2006). Changes in chemical and biological soil properties as induced by anthropogenic disturbance: a case study of an agricultural soil under recurrent flooding by wastewaters. *Soil Biology and Biochemistry*, *38*(8), 2069–2080.
- Ghimire, R., Norton, J. B., Stahl, P. D., y Norton, U. (2014). Soil microbial substrate properties and microbial community responses under irrigated organic and reduced-tillage crop and forage production systems. *PLoS ONE*, *9*(8), e103901.
- Gibson, R., Becerril-Bravo, E., Silva-Castro, V., y Jiménez, B. (2007). Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine, disrupting compounds in wastewaters and springwaters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, *1169*, 31–39.
- Giguere, A. T., Taylor, A. E., Myrold, D. D., y Bottomley, P. J. (2015). Nitrification responses of soil ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria to ammonium concentrations. *Soil Science Society of America Journal*, *79*(5), 1366–1374.
- Ginawi, A., Wang, L., Wang, H., Yu, B., y Yunjun, Y. (2020). Effects of environmental variables on abundance of ammonia-oxidizing communities in sediments of Luotian River, China. *PeerJ*, *8*, e8256.

- Girvan, M. S., Bullimore, J., Pretty, J. N., Osborn, A. M., y Ball, A. S. (2003). Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1800–1809.
- Gjessing, E. T. (1994). The role of humic substances in the acidification response of soil and water—results of the Humic Lake Acidification Experiment (HUMEX). *Environment International*, 20(3), 363–368.
- Gómez-Silván, C., Molina-Muñoz, M., Poyatos, J. M., Ramos, A., Hontoria, E., Rodelas, B., y González-López, J. (2010). Structure of archaeal communities in membrane-bioreactor and submerged-biofilter wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, 101(7), 2096–2105.
- Gonzalez Perez, P., Ye, J., Wang, S., Wang, X. L., y Huang, D. F. (2014). Analysis of the occurrence and activity of diazotrophic communities in organic and conventional horticultural soils. *Applied Soil Ecology*, 79, 37–48.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., y McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351.
- Gray, N. D., y Head, I. M. (2008). Microbial Ecology. En S. E. Jorgensen y B. D. Fath (Eds.), *Encyclopedia of Ecology* (pp. 2357–2368). Elsevier Science.
- Green, S. J., Leigh, M. B., y Neufeld, J. D. (2015). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. En T. McGenity, K. Timmis, y B. Nogales (Eds.), *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols* (pp. 77–99). Berlin: Springer.
- Guarneros - Manoatl, H. (2018). *Modelo socioecológico acoplado para la revalorización del mezquite dentro de un sistema agroforestal en el Valle del Mezquital*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Guédron, S., Duwig, C., Prado, B. L., Point, D., Flores, M. G., y Siebe, C. (2014). (Methyl)Mercury, arsenic, and lead contamination of the world's largest wastewater irrigation system: the Mezquital Valley (Hidalgo State—Mexico). *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(8), 2045.
- Guo, W., Andersen, M. N., Qi, X., Li, P., Li, Z., Fan, X., y Zhou, Y. (2017). Effects of reclaimed water irrigation and nitrogen fertilization on the chemical properties and microbial community of soil. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(3), 679–690.
- Guo, W., Qi, X., Xiao, Y., Li, P., Andersen, M. N., Zhang, Y., y Zhao, Z. (2018). Effects of reclaimed water irrigation on microbial diversity and composition of soil with reducing nitrogen fertilization. *Water*, 10(4), 365.
- Harshberger, J. W. (1911). The soil, a living thing. *Science*, 33(854), 741–744.
- Hastings, R. (1999). Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis to microbial ecology. En C. Edwards (Ed.), *Environmental monitoring of bacteria, methods in biotechnology* (pp. 175–186). New Jersey, NJ: Humana Press.
- Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J., y Saunders, J. R. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of General Microbiology*, 139(6), 1147–1153.
- Hernández-Martínez, J. L., Prado, B., Cayetano-Salazar, M., Bischoff, W. A., y Siebe, C. (2018). Ammonium-nitrate dynamics in the critical zone during single irrigation events with untreated sewage effluents. *Journal of Soils and Sediments*, 18(2), 467–480.
- Hidri, Y., Bouziri, L., Maron, P.-A., Anane, M., Jedidi, N., Hassan, A., y Ranjard, L. (2010). Soil DNA evidence for altered microbial diversity after long-term application of municipal wastewater. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(2), 423–431.
- Highton, M. P., Roosa, S., Crawshaw, J., Schallenberg, M., y Morales, S. E. (2016). Physical factors correlate to microbial community structure and nitrogen cycling gene abundance in a nitrate fed eutrophic lagoon. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1691.
- Huang, G., Takahashi, W. S., Liu, H., Saito, T., y Kimura, N. (2016). Characterization of soil bacterial diversity in relation to irrigation water: a case study in china. *Journal of Water Resource and Protection*, 08(12), 1090–1102.
- Ibekwe, A. M., Gonzalez-Rubio, A., y Suarez, D. L. (2017). Impact of treated wastewater for irrigation on soil microbial communities. *Science of The Total Environment*, 622, 1603–1610.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2005). Conjunto de datos edafológicos. Escala 1: 1 000 000 serie I. Recuperado el 18 de noviembre de 2018 de <http://inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825267636>
- INEGI. (2016). *Anuario estadístico y geográfico de Hidalgo 2016*. México: INEGI.

- Ionescu, D., Siebert, C., Polerecky, L., Munwes, Y. Y., Lott, C., Häusler, S., ... de Beer, D. (2012). Microbial and chemical characterization of underwater fresh water springs in the dead sea. *PLoS ONE*, 7(6), e38319.
- Jacobson, M. R., Brigle, K. E., Bennett, L. T., Setteerquist, R. A., Wilson, M. S., Cash, V. L., ... Dean, D. R. (1989). Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 171(2), 1017–1027.
- Jahren, P., y Sui, T. (2017). *How water influences our lives*. Singapore: Springer.
- Jain, S. K., y Singh, V. P. (2003). Water Quality Modeling. En S. K. Jain y C. P. Singh (Eds.), *Developments in Water Science* (Vol. 51, pp. 743–786). Elsevier.
- Jansson, J. K., y Hofmockel, K. S. (2020). Soil microbiomes and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 18(1), 35–46.
- Jechalke, S., Broszat, M., Lang, F., Siebe, C., Smalla, K., y Grohmann, E. (2015). Effects of 100 years wastewater irrigation on resistance genes, class 1 integrons and IncP-1 plasmids in Mexican soil. *Frontiers in Microbiology*, 6, 163.
- Jia, Z., y Conrad, R. (2009). *Bacteria* rather than *Archaea* dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 11(7), 1658–1671.
- Jiménez, B., Cruickshank, C., Capella, S., Chávez, A., Palma, A., Pérez, R., y García, V. (1999). *Estudio de la factibilidad de empleo del agua del acuífero del Valle del Mezquital para suministro del Valle de México*. México: elaborado para la Comisión Nacional del Agua por el Instituto de Ingeniería, UNAM, Proyecto 8384, (diciembre), 1500 p.
- Jiménez, B., y Chávez, A. (2004). Quality assessment of an aquifer recharged with wastewater for its potential use as drinking source: “El Mezquital Valley” case. *Water Science and Technology*, 50(2), 269–276.
- Jiménez, C. B., y Landa, V. H. (1998). Physico-chemical and bacteriological characterization of wastewater from Mexico city. *Water Science and Technology*, 37, 1–8.
- Johnson, H. B., y Mayeux, H. S. (1990). *Prosopis glandulosa* and the nitrogen balance of rangelands: extent and occurrence of nodulation. *Oecologia*, 84(2), 176–185.
- Jones, G., Bogaard, A., Charles, M., y Hodgson, J. G. (2000). Distinguishing the effects of agricultural practices relating to fertility and disturbance: a functional ecological approach in archaeobotany. *Journal of Archaeological Science*, 27(11), 1073–1084.
- Joshi, P., Pande, V., y Joshi, P. (2016). Microbial diversity of aquatic ecosystem and its industrial potential. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 3, 177–179.
- Kemp, P. F., y Aller, J. Y. (2004). Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(2), 161–177.
- Kemp, W. M., y Boynton, W. R. (1980). Influence of biological and physical processes on dissolved oxygen dynamics in an estuarine system: Implications for measurement of community metabolism. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 11(4), 407–431.
- Kivlin, S. N., y Hawkes, C. V. (2016). Temporal and spatial variation of soil bacteria richness, composition, and function in a Neotropical rainforest. *PLoS ONE*, 11(7), e0159131.
- Kleikemper, J., Pombo, S. A., Schroth, M. H., Sigler, W. V., Pesaro, M., y Zeyer, J. (2005). Activity and diversity of methanogens in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 149–158.
- Knittel, K., Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R., y Amann, R. (2005). Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 467–479.
- Krapp, A. (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 115–122.
- Kuffner, M., Piñar, G., Hace, K., Handschur, M., y Haslberger, A. G. (2004). DGGE-fingerprinting of arable soils shows differences in microbial community structure of conventional and organic farming systems. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 2(3-4), 260-268.
- Kuramae, E. E., Yergeau, E., Wong, L. C., Pijl, A. S., Veen, J. A., y Kowalchuk, G. A. (2012). Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 12–24.
- Kuroda, K., Hatamoto, M., Nakahara, N., Abe, K., Takahashi, M., Araki, N., y Yamaguchi, T. (2015). Community composition of known and uncultured archaeal lineages in anaerobic or anoxic wastewater treatment sludge. *Microbial Ecology*, 69(3), 586–596.

- Lara-Figueroa, H. N., y García-Salazar, E. M. (2019). Prevalencia de enfermedades asociadas al uso de agua contaminada en el Valle del Mezquital. *Entreciencias*, 7(21), 91-106.
- Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A., y Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2407–2415.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., y Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), 5111-5120.
- Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Aanderud, Z., Lennon, J., y Fierer, N. (2013). Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *The ISME Journal*, 7(8), 1641–1650
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., ... Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442(7104), 806–809.
- Lesser-Carrillo, L. E., Lesser-Illades, J. M., Arellano-Islas, S., y González-Posadas, D. (2011). Balance hídrico y calidad del agua subterránea en el acuífero del Valle del Mezquital, México central. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 28(3), 323-336.
- Levy-Booth, D. J., Prescott, C. E., y Grayston, S. J. (2014). Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 75, 11–25.
- Li, B., Cao, Y., Guan, X., Li, Y., Hao, Z., Hu, W., y Chen, L. (2019). Microbial assessments of soil with a 40-year history of reclaimed wastewater irrigation. *Science of the Total Environment*, 651, 696–705.
- Li, H., Zhang, Y., Li, D., Xu, H., Chen, G., y Zhang, C. (2009). Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for fingerprinting of microbial communities in paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(5), 954–968.
- Liao, H., Li, Y., y Yao, H. (2018). Fertilization with inorganic and organic nutrients changes diazotroph community composition and N-fixation rates. *Journal of Soils and Sediments*, 18(3), 1076–1086.
- Lindsay, E. A., Colloff, M. J., Gibb, N. L., y Wakelin, S. A. (2010). The abundance of microbial functional genes in grassy woodlands is influenced more by soil nutrient enrichment than by recent weed invasion or livestock exclusion. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), 5547–5555.
- Lipson, D., Schmidt, S. K., y Monson, R. K. (1999). Links between microbial population dynamics and nitrogen availability in an alpine ecosystem. *Ecology*, 80(5), 1623-1631.
- Liu, J., Yu, Z., Yao, Q., Sui, Y., Shi, Y., Chu, H., ... Wang, G. (2019). Biogeographic distribution patterns of the Archaeal communities across the black soil zone of northeast China. *Frontiers in Microbiology*, 10, 23.
- Liu, X., Zhang, J., Gu, T., Zhang, W., Shen, Q., Yin, S., y Qiu, H. (2014). Microbial community diversities and taxa abundances in soils along a seven-year gradient of potato monoculture using high throughput pyrosequencing approach. *PLoS ONE*, 9, e86610.
- Liu, Z., Rong, Q., Zhou, W., y Liang, G. (2017). Effects of inorganic and organic amendment on soil chemical properties, enzyme activities, microbial community and soil quality in yellow clayey soil. *PLoS ONE*, 12(3), e0172767.
- Lopes, A. R., Becerra-Castro, C., Vaz-Moreira, I., Silva, M. E. F., Nunes, O. C., y Manaia, C. M. (2015). Irrigation with treated wastewater: potential impacts on microbial function and diversity in agricultural soil. En D. Fatta-Kassinos, D. Dionysiou, y Kümmerer K. (EDs.), *Wastewater reuse and current challenges. The handbook of environmental chemistry* (Vol. 44, pp. 105-128). Cham: Springer.
- Lozano-Rivas, W. A. (2013). *Calidad fisicoquímica del agua : métodos simplificados para su muestreo y análisis*. Bogotá: Universidad Piloto de Colombia.
- Lüneberg, K., Schneider, D., Siebe, C., y Daniel, R. (2018). Drylands soil bacterial community is affected by land use change and different irrigation practices in the Mezquital Valley, Mexico. *Scientific Reports*, 8, 1413.
- Mansfeldt, C., Deiner, K., Mächler, E., Fenner, K., Eggen, R. I. L., Stamm, C., ... Altermatt, F. (2020). Microbial community shifts in streams receiving treated wastewater effluent. *Science of the Total Environment*, 709, 135727.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., y Verstraete, W. (2008). How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*, 10(6), 1571–1581.
- Merbt, S. N., Auguet, J. C., Blesa, A., Martí, E., y Casamayor, E. O. (2015). Wastewater treatment plant effluents change abundance and composition of ammonia-oxidizing microorganisms in mediterranean urban stream biofilms. *Microbial Ecology*, 69(1), 66–74.

- Montaño-Arias, N., García-Sánchez, R., Ochoa-de la Rosa, G., y Monroy-Ata, A. (2006). Relación entre la vegetación arbustiva, el mezquite y el suelo de un ecosistema semiárido en México. *Terra Latinoamericana*, 24(2), 193–205.
- Montelongo, C. R., Gordillo, M. A. J., María, O. E., Villagómez, I. J. R., Acevedo, S. O. A., y Prieto, G. F. (2008). Modelación de la calidad del agua río Tula del estado de Hidalgo, México. *DYNA*, 75(154), 5–18.
- Montilla Jiménez, F., y Salinas Torres, D. (2015). *Fundamentos de química acuáticas*. España: Universidad de Alicante
- Morell, I., y Hernández, F. (2000). *El agua en Castellón, un reto para el siglo XXI*. Castelló de la Plana: Universitat Jaume I.
- Morris, S. J. y Blackwood, C. B. (2015). The ecology of the soil biota and their function. En E. A. Paul (Ed.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry* (4a. Ed, pp. 273-309). Boston: Academic Press.
- Müller, J., Heinze, J., Joshi, J., Boch, S., Klaus, V. H., Fischer, M., y Prati, D. (2014). Influence of experimental soil disturbances on the diversity of plants in agricultural grasslands. *Journal of Plant Ecology*, 7(6), 509–517.
- Muñoz-Rojas, M. (2018). Soil quality indicators: critical tools in ecosystem restoration. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 5, 47–52.
- Murphy, B. W. (2014). Soil organic matter and soil function—review of the literature and underlying data. Department of the Environment, Canberra, Australia.
- Muyzer, G., De Waal, E., y Utterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., y Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology*, 164(3), 165–172.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., y Renella, G. (2003). *Microbial diversity and soil functions*. *European journal of soil science*, 54(4), 655–670.
- Navarro, I., Chavez, A., Barrios, J. A., Maya, C., Becerril, E., Lucario, S., y Jimenez, B. (2015). Wastewater reuse for irrigation—practices, safe reuse and perspectives. En M. S. Javaid (Eds.) *Irrigation and Drainage-Sustainable Strategies and Systems*. Croatia: InTech.
- Ndour, N. Y. B., Baudoin, E., Guissé, A., Seck, M., Khouma, M., y Brauman, A. (2008). Impact of irrigation water quality on soil nitrifying and total bacterial communities. *Biology and Fertility of Soils*, 44(5), 797–803.
- Nemergut, D., Shade, A., y Violle, C. (2014). When, where and how does microbial community composition matter? *Frontiers in Microbiology*, 5, 497.
- Ng, C., Le, T. H., Goh, S. G., Liang, L., Kim, Y., Rose, J. B., y Yew-Hoong, K. G. (2015). A comparison of microbial water quality and diversity for ballast and tropical harbor waters. *PLoS ONE*, 10(11), e143123.
- NOM-001-SEMARNAT-1996. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. *Diario Oficial de la Federación*, 6 de enero de 1997, México.
- NOM-021-SEMARNAT-2000. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. *Diario Oficial de la Federación*, 17 de octubre del 2000, México.
- Norris, T. B., Wraith, J. M., Castenholz, R. W., y McDermott, T. R. (2002). Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Applied Environmental Microbiology*, 68(12), 6300–6309.
- Norton, J. M., Alzerreca, J. J., Suwa, Y., y Klotz, M. G. (2002). Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Archives of Microbiology*, 177(2), 139–149.
- Norton, J. M., y Ouyang, Y. (2019). Controls and adaptive management of nitrification in agricultural soils. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1931.
- OCAVM, Organismo de Cuenca Aguas del Valle de México. (2018). Oficio B00.801.002.2-425-18 en respuesta a la solicitud de información No. 1610100318118.
- Orr, C. H., James, A., Leifert, C., Cooper, J. M., y Cummings, S. P. (2011). Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 911–919.

- Ortega-Larrocea, M. P., Siebe, C., Bécard, G., Méndez, I., y Webster, R. (2001). Impact of a century of wastewater irrigation on the abundance of arbuscular mycorrhizal spores in the soil of the Mezquital Valley of Mexico. *Applied Soil Ecology*, 16(2), 149–157.
- Ortega–Morgado, V. A. (2017). *Evaluación del riesgo ambiental en distintos cuerpos de agua mediante bioensayos en embriones de pez cebra, caso de estudio: comunidad Hñähñu “El Alberto”, Ixmiquilpan-Hidalgo*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Oved, T., Shaviv, A., Goldrath, T., Mandelbaum, R. T., y Minz, D. (2001). Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3426–3433.
- Ozcan, M. B. A. U., Erpul, G., y Canga, M. R. (2006). Spatial variability of organic matter and some soil properties of mineral topsoil in cankirı indagi blackpine (*Pinus nigra*) plantation region. *Journal of Applied Sciences*, 6(2), 445–452.
- Pajares, S., y Bohannon, B. J. M. (2016). Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1045.
- Paz Ferreira, J., Pereira De Almeida, V., Cristina Alves, M., Aparecida De Abreu, C., Vieira, S. R., y Vidal Vázquez, E. (2016). Spatial variability of soil organic matter and cation exchange capacity in an oxisol under different land uses. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(sup1), 75–89.
- Peña–López, A. K. (2016). *Evaluación de la emisión de gases de efecto invernadero como indicadores de calidad de distintos suelos en función de su uso en las lagunas de Chaschoc (Emiliano Zapata, Tabasco)*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pereira e Silva, M. C., Semenov, A. V., Van Elsas, J. D., y Salles, J. F. (2011). Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 77, 57–68.
- Pereira e Silva, M. C., Dias, A. C. F., van Elsas, J. D., y Salles, J. F. (2012). Spatial and temporal variation of Archaeal, Bacterial and Fungal communities in agricultural soils. *PLoS ONE*, 7(12), e51554.
- Pereira E Silva, M. C., Schloter-Hai, B., Schloter, M., van Elsas, J. D., y Salles, J. F. (2013). Temporal dynamics of abundance and composition of nitrogen-fixing communities across agricultural soils. *PLoS ONE*, 8(9), e74500.
- Pérez, R., Jiménez, R., Jiménez, B. E., y Chávez, A. (2009). ¿El agua del valle del Mezquital, fuente de abastecimiento para el Valle de México? Documento de trabajo. [Internet] Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/saneab/mexicona>.
- Poly, F., Monrozier, L. J., y Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152, 95–103.
- Portillo, M. C., Leff, J. W., Lauber, C. L., y Fierer, N. (2013). Cell size distributions of soil bacterial and archaeal taxa. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7610–7617.
- Prado, B., Siebe, C., Bischoff, W. A., Hernández Martínez, L., y Mora, L. (2015). El suelo: guardián de la calidad del agua subterránea. *Biodiversitas*, 122, 6–9.
- Prakash, O., Shouche, Y., Jangid, K., y Kostka, J. E. (2013). Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 51–62.
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P., y Wagner, M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5368–5382.
- Qian, Y. L., y Mecham, B. (2005). Long-term effects of recycled wastewater irrigation on soil chemical properties on golf course fairways. *Agronomy Journal*, 97, 717–721.
- Quail, M., Smith, M. E., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., ... Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13, 341.
- Rames, E., Roiko, A., Stratton, H., y Macdonald, J. (2016). Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Research*, 96, 308–326.
- Raschid-Sally, L., y Jayakody, P. (2008). *Drivers and characteristics of wastewater agriculture in developing countries-results from a global assessment*. Research Report 127, Colombo: International Water Management Institute.
- Reséndiz-Cruz, I., Pérez-Montes, L. E., y Navarro-Sigüenza, A. G. (2017). La comunidad de aves del sureste del Valle del Mezquital, México: estructura y composición. *Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología*, 18, 157-175.

- Rodarte García, R., Galindo Escamilla, E., Díaz Pérez, F., y Fernández Fernández, G. L. (2012). *Gestión del Agua y Reconstrucción de la Naturaleza En el Valle del Mezquital*. Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Rodicio, M. R., y Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245.
- Rojas-Oropeza, M., Fernández, F. J., Dendooven, L., y Cabirol, N. (2012). Effect of methyl parathion on nitrous oxide production: A laboratory study. *Journal of Environmental Management*, 95, S25-S30.
- Rosas Pérez, I., Craviato, A., y Ezcurra, E. (2004). *Microbiología ambiental*. México: Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Rösel, S., Allgaier, M., y Grossart, H.-P. (2012). Long-term characterization of free-living and particle-associated bacterial communities in lake Tiefwaren reveals distinct seasonal patterns. *Microbial Ecology*, 64(3), 571–583.
- Rothauwe, J. H., Witzel, K. P., y Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4704–4712.
- Rubio-Franchini, I., López-Hernández, M., Ramos-Espinosa, M. G., y Rico-Martínez, R. (2016). Bioaccumulation of metals arsenic, cadmium, and lead in zooplankton and fishes from the Tula river watershed, Mexico. *Water Air & Soil Pollution*, 227, 5.
- Rusch, D. B., Halpern, A. L., Sutton, G., Heidelberg, K. B., Williamson, S., Yooseph, S., ... Venter, J. C. (2007). The sorcerer II global ocean sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical pacific. *PLoS Biology*, 5(3), e77.
- Rusiñol, M., Martínez-Puchol, S., Timoneda, N., Fernández-Cassi, X., Pérez-Cataluña, A., Fernández-Bravo, A., ... Girones, R. (2020). Metagenomic analysis of viruses, bacteria and protozoa in irrigation water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 224, 113440.
- Sainju, U. M. (2017). Determination of nitrogen balance in agroecosystems. *MethodsX*, 4, 199–208.
- Santa Olalla Mañas, F. M., López Fuster, P., y Calera Belmonte, A. (2005). *Agua y agronomía*. España: Mundi-Prensa.
- Schmidt, S. K., Costello, E. K., Nemergut, D. R., Cleveland, C. C., Reed, S. C., Weintraub, M. N., Meyer, A. F., y Martin, A. M. (2007). Biogeochemical consequences of rapid microbial turnover and seasonal succession in soil. *Ecology*, 88(6), 1379–1385.
- Scott, D. B., Van Dyke, M. I., Anderson, W. B., y Huck, P. M. (2015). Influence of water quality on nitrifier regrowth in two full-scale drinking water distribution systems. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(12), 965–976.
- SEDESOL. (2010). Catálogo de localidades. Sistema de Apoyo para la Planeación del PDZP. Unidad de Microrregiones-Dirección General Adjunta de Planeación Microrregional-Secretaría de Desarrollo Social.
- SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2016). ACUERDO por el que se da a conocer el resultado de los estudios técnicos de las aguas nacionales subterráneas del acuífero Valle del Mezquital, clave 1310, en el Estado de Hidalgo, Región Hidrológico-Administrativa Aguas del Valle de México. *Diario Oficial de la Federación*, Segunda sección 15 de septiembre de 2016, México.
- SEMARNAT. (2018). ACUERDO por el que se dan a conocer los resultados del estudio técnico de las aguas nacionales superficiales en las cuencas hidrológicas Arroyo Zarco, Río Ñadó, Río Galindo, Río San Juan 1, Río Tecozautla, Río San Juan 2, Río Grande de Tulancingo, Río Metztlán 1, Río Metzquitlán, Río Metztlán 2, Río Amajaque, Río Claro, Río Amajac, Río Calabozo, Río Los Hules, Río Tempoal 1, Río San Pedro, Río Tempoal 2, Río Verde 1, Río Verde 2, Río Verde 3, Arroyo El Puerquito o San Bartolo, Arroyo Altamira, Río Santa María 1, Río Santa María 2, Río Santa María 3, Río Tamasopo 1, Río Tamasopo 2, Río Gallinas, Río El Salto, Río Valles, Río Tampaón 1, Río Choy, Río Coy 1, Río Coy 2, Río Tampaón 2, Río Victoria, Río Tolimán, Río Extoraz, Embalse Zimapán, Río Moctezuma 1, Río Moctezuma 2, Río Tancuilín, Río Huichihuayán, Río Moctezuma 3, Río Moctezuma 4, Río Jaumave-Chihue, Río Guayalejo 1, Río Guayalejo 2, Río Sabinas, Río Comandante 1, Río Comandante 2, Río Mante, Río Guayalejo 3, Arroyo El Cojo, Río Tantoán, Río Guayalejo 4, Río Tamesí, Río Moctezuma 5, Río Chicayán 1, Río Chicayán 2, Río Pánuco 1, Arroyo Tamacuil o La Llave y Río Pánuco 2, mismas que forman parte de la subregión hidrológica Río Pánuco de la Región Hidrológica número 26 Pánuco. *Diario Oficial de la Federación*, 7 de febrero de 2018, México.
- Sharma, S., y Singh, D. K. (2017). Temporal variations in diazotrophic communities and *nifH* transcripts level across the agricultural and fallow land at Jaipur, Rajasthan, India. *Indian Journal of Microbiology*, 57, 92–99.

- Shiklomanov, I. A. (1993). World fresh water resources. En P. H. Gleick (Ed.), *Water in Crisis: A Guide to the World's Fresh Water Resources* (pp. 13–24). New York: Oxford University Press.
- Siebe, C. (1998). Nutrient inputs to soils and their uptake by alfalfa through long-term irrigation with untreated sewage effluent in Mexico. *Soil Use and Management*, *14*, 119–122.
- Siebe, C., Chapela-Lara, M., Cayetano-Salazar, M., y Prado, B. (2016). Effects of more than 100 years of irrigation with Mexico City's wastewater in the Mezquital Valley (Mexico). En H. Hettiarachchi y R. Ardakanian (Eds.), *Safe use of wastewater in agriculture: good practice examples* (pp. 121–137). Germany: UNU-FLORES.
- Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C., y Kaupenjohann, M. (2008). Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City–Mezquital Valley. *Water Research*, *42*(8–9), 2124–2134.
- Singh, B. K., Munro, S., Reid, E., Ord, B., Potts, J. M., y Millard, P. (2006). Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *European Journal of Soil Science*, *57*, 72–82.
- Siqueira, J. F., Sakamoto, M., y Rosado, A. S. (2017). Microbial community profiling using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). En G. Seymour, M. Cullinan, y N. Heng (Eds.), *Oral biology. Methods in molecular Biology* (Vol. 1537, pp. 139–152). New York, NY: Humana Press
- Spring, S., Schulze, R., Overmann, J., y Schleifer, K. H. (2000). Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(5), 573–590.
- Stadler, P., Loken, L. C., Crawford, J. T., Schramm, P. J., Sorsa, K., Kuhn, C., ... Zessner, M. (2019). Spatial patterns of enzymatic activity in large water bodies: ship-borne measurements of beta-D-glucuronidase activity as a rapid indicator of microbial water quality. *Science of The Total Environment*, *651*, 1742–1752.
- Stockdale, E. A., Shepherd, M. A., Fortune, S., y Cuttle, S. P. (2006). Soil fertility in organic farming systems - fundamentally different? *Soil Use and Management*, *18*, 301–308.
- Suslow, T. V. (2004) Oxidation-reduction potential (ORP) for water disinfection monitoring, control, and documentation. *ANR Pub*, *8149*, 1–5.
- Tamames, J., Abellan, J. J., Pignatelli, M., Camacho, A., y Moya, A. (2010). Environmental distribution of prokaryotic taxa. *BMC Microbiology*, *10*, 85.
- Tanaka, H., Katsuta, A., Toyota, K., Sawada, K., Toyota, K., y Sawada, K. (2014). Soil Fertility and Soil Microorganisms. En S. Tojo y T. Hirasawa (Eds.), *Research approaches to sustainable biomass systems* (pp. 107–142). New York: Academic Press.
- Tang, H., Yu, M., Wang, Y., Han, X., Wang, X., Jin, W., Chi, F., y Wei, D. (2012). Effects of long-term fertilization on *nifH* gene diversity in agricultural black soil. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(11), 2659–2666.
- Teng, Q., Sun, B., Fu, X., Li, S., Cui, Z., y Cao, H. (2009). Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, south China. *Journal of Microbiology*, *47*(2), 135–141.
- Thompson, C. L. (2014). Analysis of community dynamics in environmental samples using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. En I. Paulsen y A. Holmes (Eds.), *Environmental Microbiology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (Vol. 1096, pp. 45–55). New Jersey: Humana Press.
- Throbäck, I. N., Enwall, K., Jarvis, Å., y Hallin, S. (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, *49*(3), 401–417.
- Topalcengiz, Z., Strawn, L. K., y Danyluk, M. D. (2017). Microbial quality of agricultural water in Central Florida. *PLoS ONE*, *12*(4), e0174889.
- Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., y Nardi, S. (2010). Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. *Plant Signaling & Behavior*, *5*(6), 635–643.
- Trias, R., Ruiz-Rueda, O., García-Lledó, A., Vilar-Sanz, A., López-Flores, R., Quintana, X. D., ... Bañeras, L. (2012). Emergent macrophytes act selectively on ammonia-oxidizing bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(17), 6352–6356.
- Tripathi, B. M., Kim, M., Tatenno, R., Kim, W., Wang, J., Lai-Hoe, A., ... Adams, J. M. (2015). Soil pH and biome are both key determinants of soil archaeal community structure. *Soil Biology and Biochemistry*, *88*, 1–8.
- Truchado, P., Lopez-Galvez, F., Gil, M. I., Pedrero-Salcedo, F., Alarcón, J. J., y Allende, A. (2016). Suitability of different *Escherichia coli* enumeration techniques to assess the microbial quality of different irrigation water sources. *Food Microbiology*, *58*, 29–35.

- Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R. J., Enríquez-Aragón, J. A., Estrada-Alvarado, I., Hernández-Rodríguez, C., ... Marsch, R. (2008). Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles*, *12*(2), 247–254.
- Vanschoenwinkel, J., y Van Passel, S. (2018). Climate response of rainfed versus irrigated farms: the bias of farm heterogeneity in irrigation. *Climatic Change*, *147*, 225–234.
- Vendan, R. T., Lee, S. H., Yu, Y. J., y Rhee, Y. H. (2012). Analysis of bacterial community in the ginseng soil using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Indian Journal of Microbiology*, *52*(2), 286–288.
- Venkatesan, A. K., y Halden, R. U. (2015). Wastewater Treatment plants as chemical observatories to forecast ecological and human health risks of manmade chemicals. *Scientific Reports*, *4*, 3731.
- Voroney, R. P. y Heck, R. J. (2015). The soil habitat. En A. P. Eldor (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (4a. Ed, pp. 15-39). Boston: Academic Press.
- Wafula, D., White, J. R., Canion, A., Jagoe, C., Pathak, A., y Chauhan, A. (2015). Impacts of long-term irrigation of domestic treated wastewater on soil biogeochemistry and bacterial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(20), 7143–7158.
- Wakelin, S. A., Gupta, V. V. S. R., y Forrester, S. T. (2010). Regional and local factors affecting diversity, abundance and activity of free-living, N₂-fixing bacteria in Australian agricultural soils. *Pedobiologia*, *53*(6), 391–399.
- Wang, L., Yu, Z., Yang, J., y Zhou, J. (2015). Diazotrophic bacterial community variability in a subtropical deep reservoir is correlated with seasonal changes in nitrogen. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(24), 19695–19705.
- Wang, P., Chen, B., Yuan, R., Li, C., y Li, Y. (2016). Characteristics of aquatic bacterial community and the influencing factors in an urban river. *Science of The Total Environment*, *569–570*, 382–389.
- Xiao, R., Qiu, Y., Tao, J., Zhang, X., Chen, H., Reberg-Horton, S. C., ... Hu, S. (2020). Biological controls over the abundances of terrestrial ammonia oxidizers. *Global Ecology and Biogeography*, *29*(2), 384–399.
- Ye, R. W., y Thomas, S. M. (2001). Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. *Current Opinion in Microbiology*, *4*(3), 307–312.
- Yin, H. B., y Patel, J. (2018). Comparison of methods to determine the microbial quality of alternative irrigation waters. *Agricultural Water Management*, *201*, 38–45.
- Yin, H. B., Nou, X., Gu, G., y Patel, J. (2018). Microbiological quality of spinach irrigated with reclaimed wastewater and roof-harvest water. *Journal of Applied Microbiology*, *125*, 133–141.
- Yoshino, K., Nishigaki, K., y Husimi, Y. (1991). Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. *Nucleic Acids Research*, *19*(11), 3153–3153.
- Yu, Z., García-González, R., Schanbacher, F. L., y Morrison, M. (2008). Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by *Archaea*-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(3), 889–893.
- Yu, Z., y Morrison, M. (2004). Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(8), 4800–4806.
- Zerkle, A. L., y Mikhail, S. (2017). The geobiological nitrogen cycle: from microbes to the mantle. *Geobiology*, *15*(3), 343–352.
- Zhang, Y., Dong, J., Yang, Z., Zhang, S., y Wang, Y. (2008). Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria in mangrove sediments assessed by PCR–denaturing gradient gel electrophoresis. *Archives of Microbiology*, *190*, 19–28.
- Zhou, L., Wang, S., Zou, Y., Xia, C., y Zhu, G. (2015). Species, abundance and function of ammonia-oxidizing archaea in Inland waters across China. *Scientific Reports*, *5*(1), 1–13.

ANEXOS

Anexo 1

Coordenadas de los sitios de muestreo

Coordenadas de los sitios de muestreo para los suelos y aguas de riego.

	Coordenadas	
S-C	20 25.534 N	99 14.354 W
S-M	20 25.262 N	99 13.127 W
S-RT	20 24.779 N	99 13.262 W
S-N	20 24.657 N	99 12.522 W
A-M	20°24'43.1" N	99°12'51.1" W
A-RT	20°24'32.2" N	99°12'34.4" W
A-N	20°08'47.7" N	20°08'47.7" N

Anexo 2

Protocolo modificado de extracción de DNA Ruch *et al.*, 2007.

1. Cortar asépticamente el filtro en trozos pequeños.
Limpiar con alcohol el área de la campana, así como cajas Petri de vidrio, pinzas metálicas, tijeras y navajas de cúter. Esterilizar este material en campana de flujo laminar con UV. El proceso se realiza en campana.
2. Colocar los trozos en tubos Falcon de 15 ml.
Nota: Precalentar el termobañó a 37°C para el paso 5.
3. Agregar 5 ml de buffer TE pH 8 asegurando que todos los trozos sean cubiertos.
4. Agregar una pizca de lisozima (concentración final de 2.5 mg/ml⁻¹)
5. Incubar los tubos en termobañó a 37°C durante 1h.
6. Agregar una pizca de proteinasa K (concentración final de 200 µg/ml⁻¹).
7. Realizar un choque térmico colocando el tubo en nitrógeno líquido seguido de la inmediata descongelación a 55 °C.
8. Repetir el paso 7 tres veces en total.
9. Añadir 500 µl de SDS 10% (concentración final de 1%) y una pizca de proteinasa K (concentración final 200 µg/ml⁻¹).
10. Incubar en termobañó a 55° C durante 2 h con agitación suave.
11. Realizar tres extracciones de fenol (Realizar en campana de extracción).
Agregar un volumen igual de fenol (pH 7.9).
Mezclar las fases con suaves movimientos de inversión.
Centrifugar durante 5 min a 3000 rpm.
Recuperar el sobrenadante, fase acuosa, (evitando arrastrar la fase orgánica, fenol) en un tubo limpio.
12. Realizar una extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (PCI) (25:24:1) (Realizar en campana de extracción).
Agregar un volumen igual de PCI
Mezclar las fases con suaves movimientos de inversión.
Centrifugar durante 5 min a 3000 rpm.
Recuperar el sobrenadante, fase acuosa, (evitando arrastrar la fase orgánica, fenol) en un tubo limpio.
13. Precipitar el sobrenadante con dos volúmenes de etanol frío al 100% y 0.25 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 7.2.
Mezclar invirtiendo suavemente.
Congelar a -20°C durante toda la noche.

- Centrifugar a 8000 rpm durante 15 min a 4°C.
Decantar el sobrenadante
14. Lavar el sedimento de ADN con etanol al 70%.
Agregar un volumen igual de etanol al 70%.
Lavar suavemente la pastilla de ADN.
Centrifugar a 8000 rpm durante 15 min a 4°C.
Desechar el etanol por decantación.
Dejar secar la pastilla a temperatura ambiente.
 15. Resuspender el DNA en 50 µl de agua estéril libre de nucleasas.
 16. Almacenar a -20 °C.

Anexo 3

Índice de rango ponderado de riqueza (R_r)

El índice de rango ponderado de riqueza (R_r) es un índice desarrollado con el propósito de unificar una medida de biodiversidad en las técnicas de huella genética por gradiente desnaturizante. El índice se denota de la siguiente forma:

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

N^2 =Cuadrado del número total de bandas

T_g =fracción del gradiente de temperatura que comprende la primera (T_i) y última banda del patrón (T_f). El resultado de $(T_f - T_i)$ se divide entre 100 que se considera la temperatura teórica máxima de desnaturización además de permitir mantener un orden de magnitud análogo al índice R_r descrito de manera inicial para DGGE en el trabajo de Marzorati y colaboradores (2008) (Gómez-Silván *et al.*, 2010).

$$T_g = (T_f - T_i) \div 100$$

Para calcular T_g se puede usar una plantilla para dividir el gel TGGE en porciones discretas con el propósito de encontrar la temperatura inicial (T_i) y final (T_f) requeridas para describir la diversidad total de una muestra. Para coadyuvar a esta tarea se empleó el software AutoCAD 2018 para la obtención de las distancias físicas entre bandas.

Anexo 4

Valores de referencia de la NOM-021-SEMARNAT-2000

NOM-021-SEMARNAT-2000					
Materia orgánica (%)		Nitrógeno total (%)		pH	
Muy bajo	<0.5	Muy bajo	<0.05	Fuertemente ácido	<5.0
Bajo	0.6-1.5	Bajo	0.05-0.10	Moderadamente ácido	5.1-6.5
Medio	1.6-3.5	Medio	0.10-0.15	Neutro	6.6-7.3
Alto	3.6-6.0	Alto	0.15-0.25	Moderadamente alcalino	7.4-8.5
Muy alto	>6.0	Muy alto	>0.25	Fuertemente alcalino	>8.5

Anexo 5

Tablas del análisis estadístico para características fisicoquímicas de los suelos de El Alberto.

<i>Análisis entre suelos</i>			
	ANOVA	Tukey-Kramer	
	Valor de p	Pares con diferencias significativas	
Contenido de humedad (W)	0.117		
Densidad real	0.293		
Densidad aparente	3×10^{-6}	S-C S-M S-RT S-N	S-N, S-M S-N, S-RT, S-C S-M S-C, S-M
pH	0.000	S-C S-M S-RT S-N	S-N, S-M, S-RT S-C, S-N S-C, S-N S-C, S-M, S-RT
MO	4.66×10^{-4}	S-C S-M S-RT S-N	S-M, S-RT, S-N S-RT, S-N, S-C S-M, S-N, S-C S-C, S-M, S-RT
Carbono orgánico (Corg)	4.66×10^{-4}	S-C S-M S-RT S-N	S-M, S-RT, S-N S-RT, S-N, S-C S-M, S-N, S-C S-C, S-M, S-RT
CIC	5.1×10^{-5}	S-C S-M S-RT S-N	S-M, S-RT, S-N S-C, S-N S-C, S-N S-M, S-RT, S-C
Nitrógeno total (Nt)	7.36×10^{-4}	S-C S-M S-RT S-N	S-M, S-RT S-RT, S-N, S-C S-N, S-C, S-M S-M, S-RT
Amonio	4.9×10^{-5}	S-C S-M S-RT S-N	S-M, S-RT, S-N S-C S-C S-C
Nitrito	5.037×10^{-3}	S-C S-M S-RT S-N	S-RT, S-N S-RT, S-N S-C, S-M S-C, S-M
Nitrato	0.000	S-C S-M S-RT S-N	S-RT, S-N S-RT, S-N S-C, S-M, S-N S-C, S-M, S-RT
Nivel de significancia de 0.05.			

Anexo 6

Tablas del análisis estadístico para características fisicoquímicas de las aguas de riego.

Análisis entre aguas de riego			
	ANOVA	Tukey-Kramer	
	Valor de p	Pares con diferencias significativas	
Temperatura	0.000	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-N, A-M A-RT, A-M
pH	0.007	A-M A-RT A-N	A-N A-N A-M, A-RT
Potencial de oxido reducción (ORP)	0.000	A-M A-RT A-N	A-N A-N A-M, A-RT
Conductividad eléctrica (EC)	0.000	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-N, A-M A-RT, A-M
Resistividad (RES)	0.000	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-N, A-M A-RT, A-M
Solidos disueltos totales	0.000	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-N, A-M A-RT, A-M
Salinidad	0.000	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-N, A-M A-RT, A-M
Oxígeno disuelto	0.000	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-N, A-M A-RT, A-M
Turbidad	0.000	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-N, A-M A-RT, A-M
Nitrógeno total	0.045	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-N, A-M A-RT, A-M
Nitrógeno amoniacal	0.000	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-N, A-M A-RT, A-M
Nitrito	0.000	A-M A-RT A-N	A-RT A-M, A-N A-RT
Nitrato	0.001	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-N, A-M A-RT, A-M
Demanda química de oxígeno (DQO)	0.001	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-M A-M
Nivel de significancia de 0.05			

Anexo 8

Tablas del análisis estadístico de riqueza ponderada por rango (Rr) para los genes de estudio.

Análisis de riqueza ponderada por rango (Rr)			
	ANOVA/prueba de t de Student pareada (Antes ≠ Después)	Tukey-Kramer	
	Valor de p	Pares con diferencias significativas	
RNAr 16S Bacteria			
Aguas de riego	0.0002	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-M A-M
Suelos antes del riego	0.2243		
Suelos después del riego	0.0035	S-MD	S-CD, S-RTD, S-ND
AC ≠ DC	0.8274		
AM ≠ DM	0.0031		
ART ≠ DRT	0.2754		
AN ≠ DN	0.2673		
RNAr 16S Arquea			
Aguas de riego	0.0810		
Suelos antes del riego	0.2863		
Suelos después del riego	0.0764		
AC ≠ DC	0.2717		
AM ≠ DM	0.2134		
ART ≠ DRT	0.0030		
AN ≠ DN	0.0499		
nifH			
Aguas de riego	0.0000	A-M A-RT A-N	A-RT A-M, A-N A-RT
Suelos antes del riego	0.8310		
Suelos después del riego	0.1982		
AC ≠ DC	0.3159		
AM ≠ DM	0.8070		
ART ≠ DRT	0.9307		
AN ≠ DN	0.6291		
amoA			
Aguas de riego	0.0017	A-M A-RT A-N	A-RT, A-N A-M A-M
Suelos antes del riego	0.0954		
Suelos después del riego	0.7776		
AC ≠ DC	0.0350		
AM ≠ DM	0.7623		
ART ≠ DRT	0.4883		
AN ≠ DN	0.5628		
Nivel de significancia de 0.05			