

Evaluación de compost con presencia de metales pesados en el crecimiento de *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices**

Evaluation of compost with presence of heavy metals on the growth of *Azospirillum brasilense* and *Glomus intraradices*

Augusto Rojas Aparicio¹, Jenny Marbella Vázquez Jacinto¹, Nelly Romero Gomezcaña², Miguel Ángel Rodríguez Barrera¹, Jeiry Toribio Jimenez¹ y Yanet Romero Ramírez[§]

¹Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo, Guerrero, México. Av. Lázaro Cárdenas s/n. Ciudad Universitaria. Apdo Postal. 39070. (marley_jamrock@hotmail.com; jen_1512@hotmail.com; rmiguel@gmail.com; jeiryjimenez2014@gmail.com; yromero@uagro.mx). ²Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Guerrero. Carretera México-Acapulco No. 274, Col. Burócratas, CP. 39090. Chilpancingo, Guerrero. (nelly.romero@sdrguerrero.gob.mx). [§]Autora para correspondencia: yromero@uagro.mx.

Resumen

Compost es materia orgánica que resulta de la acción microbiana controlada en residuos orgánicos. Hoy en día, la agricultura es responsable del uso integrado de biofertilizantes y compost, que representan una alternativa importante para reducir el uso de fertilizantes químicos. En este estudio se evaluó el compost con presencia de metales pesados sobre el crecimiento de *A. brasilense* y *G. intraradices*. El análisis microbiológico del compost solo mostro resultados significativos para el crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. La conclusión es que el uso de compost con presencia de metales pesados no causa ningún efecto adverso sobre el crecimiento de *A. brasilense* y *G. intraradices*, ya que los dos microorganismos pudieron ser aislados e identificados en la rizosfera de la planta. Por otra parte, los metales no excedieron los límites máximos permitidos por las normas internacionales como la NTC-5167 y la norma 503 de EPA.

Palabras clave: *A. brasilense*, *G. intraradices*, composta, metales pesados.

Abstract

Compost is an organic material obtained as a result of the controlled microbial action on organic waste. Nowadays, farming is responsible of the integrated use of biofertilizers and compost, which represent an important alternative to reduce the use of chemical fertilizers. In this study the compost with presence of heavy metals on the growth of *A. brasilense* and *G. intraradices* was evaluated. Microbiological analysis of compost only revealed significant results for the growth of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The conclusion is that the use of compost with presence of heavy metals does not cause any adverse effects on the growth of *A. brasilense* and *G. intraradices*, since the two microorganisms were able to be isolated and identify in the rhizosphere of plants. Furthermore, observed metals did not exceed the maximum permissible limits by the international standards as NTC-5167 and standard 503 of EPA.

Key words: *A. brasilense*, *G. intraradices*, compost, heavy metals.

Introducción

El compost es la materia orgánica obtenida a partir de la acción controlada de microbios en los residuos orgánicos biodegradables como hojas, frutas y piel de vegetales, residuos orgánicos de casa, estiércol, residuos urbanos sólidos, aguas residuales y residuos agroindustriales. Los factores que afectan el proceso de compostaje son: la naturaleza de los residuos orgánicos y las condiciones de desarrollo de la población microbiana. Cuando las condiciones ambientales no son óptimas, la población microbiana disminuye y por tanto su acción afecta el proceso. En general, el principal residuos biodegradables incluido en el proceso de compostaje son de origen agrícola, animal, residuos líquidos y agroindustriales, residuos sólidos urbanos, residuos del tratamiento de aguas residuales y residuos de madera también están incluidas (Muñoz, 2005).

Sin embargo, cuando los residuos agroindustriales son incluidos en el proceso de compostaje, las posibilidades de encontrar metales pesados aumentan considerablemente, como lo son el cadmio (Cd), plomo (Pb), arsénico (As), mercurio (Hg) y selenio (Se), elementos que perjudican la salud humana. En general, una composta de alta calidad y adecuada para ser utilizada en agricultura, presenta los siguientes límites máximos: Cd 10 mg kg⁻¹, Cu 450 mg kg⁻¹, Ni 120 mg kg⁻¹, Pb 300 mg kg⁻¹, Zn 1 100 mg kg⁻¹, Hg 7 mg kg⁻¹ y Cr 400 mg kg⁻¹ (EPA, 2006). Los factores más importantes en el proceso de compostaje son el contenido de agua, humedad (50 a 60%) y pH (6.5 a 8) (Muñoz, 2005; Pérez *et al.*, 2010); la relación carbono-nitrógeno (C/N) es un factor que debe ser controlado para asegurar una fermentación correcta, los valores óptimos varían de 25 a 30% de estos elementos. Por otra parte, los microorganismos desempeñan un papel importante durante el proceso de compostaje, en donde la acción de facultativos y aerobios obligados, mesófilos y termófilos es predominante (Pérez *et al.*, 2010). Estos microorganismos son responsables de la degradación de la materia orgánica.

Los bio fertilizantes son responsables de estimular el crecimiento y productividad de los cultivos (Rueda-Puente *et al.*, 2009). Las bacterias comúnmente utilizadas en la agricultura son aquellas que corresponden al género *Rhizobium* y *Azospirillum* (Caballero-Mellado *et al.*, 2007). Algunos autores han reportado que cuando hay un hongo co-inoculante como la micorriza arbuscular, el estímulo en el crecimiento vegetativo aumenta significativamente, afectando de manera positiva la absorción de minerales y

Introduction

The compost is the organic material obtained by the controlled action of microbes on biodegradable organic residues as leaves, fruit and vegetable skins, home organic waste, manure, solid urban waste, sewage waste and agro-industrial wastes. The factors affecting the composting process are: the nature of the organic waste and the conditions of development of the microbial population. Since when environmental conditions are not optimal, the microbial population decreases and thus its action affecting the process. In general the main biodegradable waste included in the composting process are of agricultural origin, animal and vegetable nature, liquid and agro-industrial waste, municipal solid waste, waste from wastewater treatment and wood waste are also included (Muñoz, 2005).

However, when agro-industrial wastes are included in the composting process, the chances to find heavy metals increase considerably, being cadmium (Cd), lead (Pb), arsenic (As), mercury (Hg) and selenium (Se), the most concerning elements for human health. In general, a high quality compost and suitable to use it in agriculture presents the next maximum limits: Cd 10 mg kg⁻¹, Cu 450 mg kg⁻¹, Ni 120 mg kg⁻¹, Pb 300 mg kg⁻¹, Zn 1 100 mg kg⁻¹, Hg 7 mg kg⁻¹ and Cr 400 mg kg⁻¹ (EPA, 2006). The most important factors in the composting process are water content, humidity (50 to 60%) and pH (6.5 to 8) (Muñoz, 2005; Pérez *et al.*, 2010); the ratio carbon-nitrogen (C/N) is a factor that must be controlled to ensure a correct fermentation, the optimal values vary from 25 to 30% of these elements. On the other hand, the microorganisms play an important role during the composting process, where the action of facultative and obligate aerobes, mesophiles and thermophiles is predominant (Pérez *et al.*, 2010). These microorganism are responsible for the degradation of organic matter.

Bio-fertilizers are responsible for stimulating growth and crop productivity (Rueda-Puente *et al.*, 2009). The most commonly used bacteria in agriculture are those corresponding to the genus *Rhizobium* and *Azospirillum* (Caballero-Mellado *et al.*, 2007). Some authors have reported that when there is a fungal co-inoculant as the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), the stimulus on the vegetal growth increases significantly, affecting in a positive way the mineral absorption and the availability of N, P and K on the soil (Mendoza and Cruz-Hernández, 2010). AMF associations are formed only by fungi

la disponibilidad de N, P y K en el suelo (Mendoza y Cruz-Hernández, 2010). Asociaciones de micorriza arbuscular están formadas únicamente por hongos pertenecientes al Filo *Glomeromycota*, de estos el más utilizados en agricultura es *Glomus intraradices*. Guerrero ha sido considerado como uno de los principales productores de maíz en México durante muchos años, con el séptimo lugar a nivel nacional, no sólo para consumo familiar, pero para comercializarlo.

Los fertilizantes químicos se utilizan en la agricultura para ayudar a que los cultivos alcancen un crecimiento y producción óptima, restablecimiento de los nutrientes extraídos del suelo; sin embargo, el abuso y mal uso de estos productos han causado deterioro del suelo (erosión, salinización y acidificación), y daño al medio ambiente. A fin de reducir el impacto causado por los fertilizantes, el Gobierno del estado de Guerrero, a través de la Secretaría de Desarrollo Rural (SEDER), ha promovido el uso de biofertilizantes (*A. brasilense* y *G. intraradices*), así como la producción de compost por parte de los agricultores. El objetivo de esta estrategia es que se utilice en todo el Estado. Para alcanzar este objetivo, SEDER ha sugerido la introducción de composta de otros sitios; sin embargo, es necesario evaluar la calidad de las mismas antes de su distribución, ya que se ha detectado la presencia de metales pesados, incluso cuando estos están en niveles permisibles. En este proyecto se evaluó el efecto de los metales pesados presentes en la composta que se distribuye a los agricultores en el estado de Guerrero en el crecimiento de *A. brasilense* y *G. intraradices*.

Materiales y métodos

Preparación del sustrato y material biológico

La composta fue proporcionado por el Gobierno del Distrito Federal México (GDF) y los biofertilizantes (*A. brasilense* y *G. intraradices*) por la casa comercial Biosustenta. La composta se hace en Texcoco a partir de la recolección de basura del DF y el producto de la poda de los jardines, no contiene estiércol de animales y se reporta un pH neutro (7.31), contenido de materia orgánica 27.36% y humedad muy baja (4.08%). El suelo utilizado presento un pH ligeramente alcalino (7.65), un contenido de materia orgánica de 2.88% y el porcentaje de humedad muy baja (1.84%). La composta y el suelo se trataron en autoclave a 121 °C durante 1 h. Para esterilizar las semillas de *Zea mays* se determinó como lo describe Wenny y Dumroese 1987.

belonging to the Phylum *Glomeromycota*, from these the most used in agriculture is *Glomus intraradices*. Guerrero has being considered one of the main maize producers in Mexico during many years, being the seventh position nationally, not only for family consumption but to commercialize it.

Chemical fertilizers are used in agriculture to help the crops reach an optimal growth and production, reinstating the nutrients removed from the soil; however, the abuse and wrong use of these have caused the soil deterioration (erosion, acidification and salinization), and damage to the environment. In order to reduce the impact caused by fertilizers, the Government of the State of Guerrero, through the Secretaría de Desarrollo Rural (SEDER), has promoted the use of bio-fertilizers (*A. brasilense* y *G. intraradices*), as well as the compost production by the farmers. The aim of this strategy is to be used all along the State. In order to reach this goal, the SEDER has suggested the introduction of compost from other sites, however it is necessary to evaluate the quality of it before its distribution since it has been detected the presence of heavy metals, even when they are in the permissive levels. In this project we evaluated the effect of heavy metals present in the compost that it is distributed to farmers in the state de Guerrero on the growth of *A. brasilense* and *G. intraradices*.

Materials and methods

Substrate preparation and biological material

Compost was provided by the Government of Mexico DF (GDF) and the bio-fertilizers (*A. brasilense* and *G. intraradices*) by the trading house Biosustenta. The compost is made in Texcoco with trash collection from DF and product of the pruning of gardens, no contain carries animal manure and reported a neutral pH (7.31), an organic matter content of 27.36% and humidity very low (4.08%). The soil used presented a slightly alkaline pH (7.65), an organic matter content of 2.88% and very low humidity percentage (1.84%). The compost and soil were autoclaved at 121 °C for 1 h. To sterilize the seeds from *Zea mays* was determined as described Wenny and Dumroese 1987. After this treatment, they were impregnated with a non-toxic adherent based on carboxymethyl cellulose. To finish, we mixed *G. intraradices* (333 g) and *A. brasilense* (117 g) and apply this mixture on the seeds.

Después de este tratamiento, estas se impregnaron con un adherente no tóxico a base de carboximetil celulosa. Para finalizar se mezcló *G. intraradices* (333 g) y *A. brasilense* (117 g) y subsecuentemente esta mezcla se aplicó sobre las semillas.

Tratamientos

Los tratamientos usados en este estudio son CN (suelo y las semillas), T1 (tierra, composta y semilla), T2 (tierra, composta estéril y semilla), T3 (tierra, compuestas, semilla y bio-fertilizante), T4 (tierra, composta estéril, semilla y bio-fertilizante), T5 (tierra, composta, semilla estéril y bio-fertilizante) y T6 (tierra estéril, composta estéril, semilla estéril y bio-fertilizante).

Determinación de las propiedades físico-químicas de la composta

El contenido de materia orgánica de C, P y N se determinó como se describe González-Chávez *et al.* (2009). El pH se determinó en agua y CaCl₂ en una relación 1:2.5 de extracto de solución de un potenciómetro 420^a se utilizó para las mediciones (Orion Research, Beverly, MA).

Determinación de patógenos humanos y metales pesados en la composta

Para caracterizar la microbiología de la composta, se realizaron una serie de diluciones las cuales fueron inoculadas en medios específicos para las bacterias consideradas potencialmente patógenas para el ser humano (Mac Conkey, sal y manitol y Salmonella-Shigella). Para determinar los metales pesados en la composta, el procedimiento se realizó en el Laboratorio de Geoquímica, perteneciente a la Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, ubicada en Taxco el Viejo, Guerrero. Los metales se analizaron por ICP-AES (Talavera *et al.*, 2006).

Aislamiento de *A. brasilense* y observación de *G. intraradices* a partir de raíces de maíz con composta

Se realizaron algunas pruebas como fermentación de la glucosa y el método Gram para identificar el microorganismo en raíces (Baca *et al.*, 2010). Para observar las raíces micorrizadas por *G. intraradices*, se utilizó la técnica de Phillips y Haymann (1970). Además, se realizó un conteo de esporas en la rizosfera como lo descrito por Gerdemann y Nicholson (1963).

Treatments

The treatments used in this study are CN (soil and seed) T1 (soil, compost and seed), T2 (Soil, compost sterile and seed), T3 (soil, composte, seed and Biofertilizer), T4 (soil, compost sterile, seed and biofertilizer), T5 (soil, compost, seed sterile and biofertilizer) and T6 (soil sterile, compost sterile, seed sterile and biofertilizer).

Determining the compost physicochemical properties

The organic matter content of C, P and N was determined as described González-Chávez *et al.* (2009). The pH was determined in water and CaCl₂ in a ratio 1:2.5 of extract-solution a potentiometer 420^a was used for the measurements (Orion Research, Beverly, MA).

Determining human pathogens in the compost and heavy metals in the compost

To characterize the microbiology of the compost, we did serial dilutions which were inoculated in specific media for bacteria considered potentially pathogenic for the human (Mac Conkey, Salt and mannitol and Salmonella-Shigella). To determine the heavy metals in the compost, the procedure was done in the Laboratory of Geochemistry, belonging to the Academic Unit of Earth Sciences, located in Taxco el Viejo, Guerrero. Metals were analyzed by ICP-AES (Talavera *et al.*, 2006).

Isolation of *A. brasilense* and observation of *G. intraradices* from maize roots with compost

We did some tests as the glucose fermentation and Gram's method to identify the microorganism of the roots (Baca *et al.*, 2010). To observe mycorrhizal roots by *G. intraradices*, we used the technique by Phillips and Haymann (1970). Additionally, we counted spores in the rhizosphere as described by Gerdemann and Nicholson (1963).

Results and discussion

Physicochemical analysis of the compost

One of the goals of this work was to determine the physicochemical properties of the compost. The analysis reported that the compost has a neutral pH (7.31), an average

Resultados y discusión

Análisis fisicoquímico de la composta

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar las propiedades físico-químicas de la composta. El análisis arrojó que la composta tiene un pH neutro (7.31), un contenido medio de materia orgánica (27.36%) y baja humedad (4.08%). La cantidad de N, K, Ca, Mg, Fe, P y Mn es promedio (Álvarez-Solís *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2010). La conductividad eléctrica registró un valor alto y una textura arenosa (NTC-51672004). En cuanto a la composta, los tres elementos principales considerados para el crecimiento del microorganismo (N, P y K), están presentes por debajo de los niveles reportados por Álvarez-Solís *et al.* (2010), N= 0.095%, P= 0.65% y K= 0.83%. Estos resultados muestran que en compostas donde se incluyen basura recolectada del DF y residuos vegetales, hay una disminución en el contenido de estos nutrientes (Castillo *et al.*, 2000). El contenido de materia orgánica (CMO), considerado como una importante fuente de nutrientes (Pérez *et al.*, 2010), fue de 27.36%, la cual es una buena cantidad para materia orgánica. CMO en la composta tiene un efecto positivo sobre la fertilidad del suelo, además de mejorar sus características físicas, biológicas y químicas. Sin embargo, el porcentaje de materia orgánica en la composta utilizada mostró un valor más bajo comparado con la reportada por Zapata *et al.* (2005), en un rango de 46 a 56%, quien utilizó la composta hecha a base de lodos locales y residuos de corteza de pino.

Determinación de patógenos humanos en la composta

El análisis microbiológico de la composta mostró la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se confirmó este resultado con la prueba de coagulasa para *S. aureus* y un conjunto bioquímico para *P. aeruginosa*. Los resultados obtenidos en el análisis microbiológico de la composta (Cuadro 1) mostraron la existencia de *S. aureus*, aunque el crecimiento no fue significativo como para afectar la salud de aquellos que manipulan la composta (NMX-F-310-1978). Varios autores han reportado el crecimiento de esta bacteria en muestras de humus de lombriz, lo que sugiere que sus componentes contienen materia fecal de origen animal (Ogefere *et al.*, 2010); sin embargo, la composta utilizada en este estudio no tiene contenido estiércol animal.

content of organic matter (27.36%) and low humidity (4.08%). The amount of N, K, Ca, Mg, Fe, P, and Mn is average (Álvarez-Solís *et al.*, 2010, Pérez *et al.*, 2010). The electrical conductivity registered a high value and a sandy texture (NTC-51672004). Regarding the compost, the three main elements considered for the growth of the microorganism (N, P y K), are present below the levels reported by Álvarez-Solís *et al.* (2010), N= 0.095%, P= 0.65% and K= 0.83%. These results show that in those composts where trash collection from DF and vegetable waste are included, there is a decrease in the content of those nutrients (Castillo *et al.*, 2000). The organic matter content (OMC), considered an important source of nutrients (Pérez *et al.*, 2010), was 27.36%, which is a good amount for compost. The OMC in the compost has a positive effect on the soil fertility, besides improving its physical, chemical and biological characteristics. However, the percent of OM in the used compost showed a lower value compared to that reported by Zapata *et al.* (2005), in a range from 46 to 56%, who used compost based on local muds and pine bark residues.

Determining human pathogens in the compost

The microbiological analysis of the compost reported the presence of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. We confirmed this result with the coagulase test for *S. aureus* and a biochemical set for *P. aeruginosa*. The results obtained in the microbiological analysis of the compost (Table 1) showed the existence of *S. aureus*, although the growth was not significant to affect the health of those manipulating the compost (NMX-F-310-1978). Several authors have reported the growth of this bacterium in samples of vermicompost, suggesting that its components have a fecal animal origin (Ogefere *et al.*, 2010) nonetheless, the compost used in this study does not have these origins, no carries animal manure.

The growth of *P. Aeruginosa* was observed due to the capacity of this bacterium to grow at high temperatures which makes it resistant to the auto-sterilization process undergone by the compost. The auto-sterilization consists in a temperature rise because of the metabolic activity of the microorganisms present in the compost (Muñoz, 2005). Pérez *et al.* (2010) showed that the manure compost has higher densities of the genus *Pseudomonas* (420×10^3 CFU g^{-1}), which has a high adaptation capacity.

Se observó el crecimiento de *P. Aeruginosa* debido a la capacidad de esta bacteria para crecer a temperaturas elevadas, lo que las hace resistente al proceso de auto-esterilización a la que fue expuesta la composta. La auto-esterilización consiste en un incremento de temperatura de la actividad metabólica de los microorganismos presentes en la composta (Muñoz, 2005). Pérez *et al.* (2010) demostraron que la composta de estiércol contiene una mayor densidad del género *Pseudomonas* (420×10^3 UFC g^{-1}), las cuales tienen una alta capacidad de adaptación.

Determining heavy metals in the compost

The analysis of heavy metals in the compost is shown in Table 2. We compared three international norms, considering the amounts of heavy metals found in the compost falling inside the maximum permissive limits. Despite the presence of heavy metals in the analyzed compost, the concentrations of As, Cd, Cr, Cu, Ni and Pb are below the maximum permissive levels in the NTC-5167 2004, Norm 503 of EPA and the EPA in 2006. These concentrations suggest that the compost was

Cuadro 1. Análisis microbiológicos para encontrar bacterias patógenas humanas en muestras de composta.

Table 1. Microbiological analysis to find human pathogenic bacteria in compost samples.

Medio de cultivo	Núm. de colonias	UFC g^{-1} composta (UFC g^{-1})	Resultado	GRAM colorante
Sal y manitol	5	500	<i>S. aureus</i>	ns Cocci +
Mac Conkey	16	116 000	<i>P. aeruginosa</i>	ns Bacillus -
	0	0	<i>E. coli</i>	-
SS	0	0	<i>Salmonella</i> sp.	-
	0	0	<i>Shigella</i> sp.	-

ns= no significativo; CFU= unidades formadoras de colonias; SS= medio de cultivo de *Salmonella* and *Shigella*.

Determinación de metales pesados en la composta

El análisis de metales pesados en composta se muestra en la Cuadro 2. Se compararon tres normas internacionales, teniendo en cuenta las cantidades de metales pesados que se encuentran en la composta estas están dentro de los límites máximos permisibles. A pesar de la presencia de metales pesados en la composta analizada, las concentraciones de As, Cd, Cr, Cu, Ni y Pb están por debajo de los niveles máximos permisibles en la NTC-5167 2004, Norma 503 de la EPA y EPA en 2006. Estas concentraciones sugieren que el compost se hizo utilizando una gran variedad de residuos, los cuales normalmente no están sujetos a una selección apropiada y separación de residuos. Aún más, algunos autores reportan el uso de aguas residuales para mantener la humedad durante el proceso de compostaje, siendo esta una de las formas de incorporar los metales pesados en la composta. Del mismo modo, los metales pesados como Pb, As, Cd, Cu, Zn, Ni y Hg, se podrían haber añadido de manera continua a los suelos a través de las actividades agrícolas y/o industriales, y la incineración (Khan, 2006).

made using a big variety of waste, which normally is not subject to an appropriate selection and residue separation. Even more, some authors report the use of waste water to maintain the humidity during the compost process, being one of the ways to incorporate heavy metals to the compost. Likewise, heavy metals as Pb, As, Cd, Cu, Zn, Ni and Hg, could have been added in a continuous manner to the soils through agricultural and/or industrial activities, and incineration (Khan, 2006).

Isolation of *A. brasilense* in the roots and observation of *G. intraradices* in the maize rhizosphere

We used the method reported by Baca *et al.* (2010) to obtain pure cultures *A. brasilense*, here we observed that the concentration of heavy metals from compost used in this work did not affect the native or external microbiology that could exist in the compost and the soil since the analysis showed positive results to microbial growth and to the isolation of *A. brasilense*. The observation of how the fungus colonized the roots was performed at the end of the experiment. We used two techniques, the first one was to isolate the fungus from the roots, being able to observe

Cuadro 2. Concentraciones de metales pesados en la composta.
Table 2. Heavy metal concentrations in the compost.

Metales pesados	Composta (mg kg ⁻¹)	Niveles máximos permisibles		
		Norma 503 EPA*(mg kg ⁻¹)	NTC-5167, 2004**(mg kg ⁻¹)	EPA 2006***(mg kg ⁻¹)
As	0.4375	54	41	--
Cd	0.5	18	39	10
Cr	23.4375	1 200	1 200	400
Cu	91.1875	1 200	450	450
Ni	24.6875	180	420	120
Pb	62.375	300	300	300

*= valores en la norma 503 de la agencia de protección ambiental (EPA); **= valores en el NTC-5167, 2004, que establece los requisitos que deben cumplir los productos orgánicos utilizados como fertilizantes y abonos; ***= Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos.

Aislamiento de *A. brasilense* en las raíces y la observación de *G. intraradices* en la rizosfera del maíz

Se utilizó el método descrito por Baca *et al.* (2010) para obtener cultivos puros de *A. brasilense*, aquí se observó que la concentración de metales pesados proveniente de la composta utilizada en este trabajo no afectó a la microbiología nativa o externa que pudiera existir en la composta y en el suelo ya que el análisis mostró resultados positivos a crecimiento microbiano y para el aislamiento de *A. brasilense*. La observación de cómo el hongo coloniza las raíces se realizó al final del experimento. Se utilizaron dos técnicas, la primera fue para aislar el hongo de las raíces, pudiéndose observar una gran cantidad de vesículas, esporas e hifas (Figura 1a), principalmente pertenecientes al género *Glomus*. La segunda técnica fue la descrita por Gerdemann y Nicholson (1963), donde se contabilizó y analizó la rizosfera (Figura 1b). En este caso, fue posible identificar más de una muestra del género *Glomus* y particularmente *G. intraradices* en los tratamientos en los que se añadió bio-fertilizante (principalmente T3 y T6).

Conclusiones

Se demostró que los metales pesados presentes en esta composta introducida por SEDER en el estado de Guerrero, no afecta totalmente el crecimiento de *A. brasilense* y *G. intraradices*. Este hecho fue corroborado cuando encontramos el hongo y la bacteria en las raíces de todas las muestras analizadas, incluso en aquellos donde el bio-fertilizante no fue añadido. No se encontraron valores significativos para el crecimiento de bacterias patógenas humanas (*S. aureus* y *P. aeruginosa*), mostrando que

a high amount of vesicles, spores and hyphae (Figure 1a), mainly belonging to the genus *Glomus*. The second technique was the one described by Gerdemann and Nicholson, (1963), where we counted and analyzed the rhizosphere (Figure 1b). In this case, we were able to identify more than one sample of the genus *Glomus* and particularly *G. intraradices* in the treatments where we added bio-fertilizers (T3 and T6 mainly).

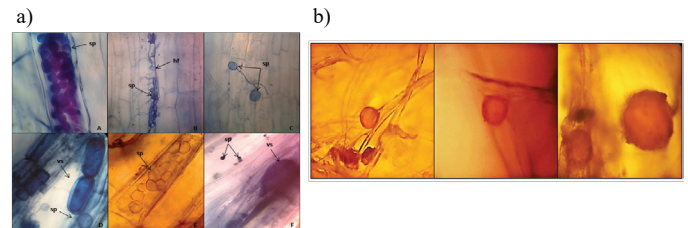


Figura 1. Morfología (a) y esporas de *G. intraradices* (b) observada en las raíces y la rizosfera de maíz mediante la técnica de Phillips y Haymann, 1970. Tratamiento 6. Imagen A) esporas (sp.); B) hifas (hf) y esporas (sp.); C) esporas (sp.); D) vesículas (vs) y esporas (sp.); E) esporas (sp.) y F) esporas (sp.) y vesícula (vs). Taxonomía normal mostrada por las esporas que pertenecen a *G. intraradices*.

Figure 1. Morphology (a) and spores of *G. intraradices* (b) observed in the maize roots and the rhizosphere by the technique of Phillips and Haymann, 1970. Treatment 6. Image A) spores (sp); B) hyphae (hf) and spores (sp); C) spores (sp); D) vesicles (vs) and spores (sp); E) spores (sp) and F) spores (sp) and vesicle (vs). Usual taxonomy shown by the spores belonging to *G. intraradices*.

Conclusions

It was shown that the heavy metals present in this compost introduced by the SEDER in the Guerrero state, did not affect totally the growth of *A. brasilense* and *G. intraradices*. This

no son un riesgo para los que manipulan la composta. Finalmente, encontramos que la bacteria es tolerante a altas concentraciones de arsenico, así como plomo y cobre, pero en concentraciones más bajas. Este no fue el caso de cadmio, donde la bacteria no creció.

Literatura citada

- Álvarez, S. J. D.; Gómez, V. D. A.; León, M. N. S. and Gutiérrez, M. F. A. 2010. Manejo integrado de fertilizantes y abonos orgánicos en el cultivo de maíz. *Agrociencia*. 44(5):578-584.
- Baca, K.; Sánchez, M.; Carreño, C. and Mendoza, G. 2010. Polihidroxialcanoatos de cepas de *Azospirillum spp.* aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" y *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. *Sci. Agrop.* 1:213-224.
- Caballero, M. J.; Onofre, L. J.; Estrada, de los S. P. and Martínez, A. L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(16):5308-5319.
- Castillo, A. E.; Quarín, S. H. and Iglesias M. C. 2000. Caracterización química y física de composta de lombrices elaborados a partir de residuos orgánicos puros y combinados. *Agríc. Téc.* 60:74-79.
- Environmental Regulations and Technology (EPA-503). Land application of biosolids. United States Environmental Protection Agency. Washington, DC. July 2003. 186 p.
- Environmental Protection Agency (EPA). 2006. Life cycle assessment: principles and practice. Scientific Applications International corporation. United States Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio. May. 44 p.
- Gerdemann, J. and Nicholson, T. 1963. Spore of mycorrhizae endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br. Mycol. Soc.* 46:235-244.
- González, Ch. M. C.; Carrillo, G. R. and Gutiérrez, C. M. C. 2009. Natural attenuation in a slag heap contaminated with cadmium: the role of plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Hazard. Mater.* 161:1288-1298.
- Khan, A. G. 2006. Mycorrhizoremediation-an enhanced form of phytoremediation. *J Zhejiang Univ. Sci B.* 7:503-514.
- Mendoza, H. A. and Cruz, H. M. A. 2010. Empleo de *Azospirillum* como biofertilizante. *In: introducción al uso y manejo de los biofertilizantes en la agricultura.* Aguado, G. A. INIFAP-SAGARPA. México. 171-185 pp.
- fact was corroborated when we found the fungus and the bacterium in the roots of all the samples analyzed, even in those where the bio-fertilizer was not added. No significant values were found for the growth of human pathogenic bacteria (*S. aureus* y *P. aeruginosa*), showing that they are not a risk to manipulate the compost. Finally, we found that the bacterium is tolerant to high concentrations of As, as well as lead and copper but in lower concentrations. This was not the case of cadmium, where the bacterium did not grow.

End of the English version



- Muñoz, J. 2005. Compostaje en pescador, cauca: tecnología apropiada para el manejo de residuos orgánicos y su contribución a la solución de problemas medioambientales. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 24 p.
- Ogefere, H. O.; Ogbimi, A. O. and Omoregie, R. 2010. Microbiology of composting pig waste: Comparison of vermicomposting and open heap techniques. *Malaysian J. Microbiol.* 6(1):25-29.
- Pérez, R. C.; Pérez, A. C. and Vertel, M. 2010. Nutritional, physical-chemical and microbiological characterization of three organic fertilizers to be used in agricultural ecosystems of pastures located in the subregion Sabanas, department of Sucre, Colombia. *Rev. Tumbaga.* 5:27-37.
- Phillips, J. M. and Hayman D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Journal Transactions of the British Mycol. Soc.* 55:158-161.
- Rueda, P. E. O.; Murillo, A. B.; García, H. J. L.; Barrón, H. J. M.; Preciado, R. P. y Tarazón, H. M. A. 2009. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal como biofertilizantes en ambientes árido-salinos *In: agricultura orgánica.* Castillo, I. O.; Salazar, E.; Fortis, M.; Trejo, H. I.; Vázquez, C.; López, J. D.; Figueroa, R.; Zúñiga, R.; Preciado, P. y Chavarria, J. A. Comisión Nacional de la Ciencia del Suelo y CONACYT. Gómez Palacio, México. 259-272.
- Talavera, O.; Armienta, M. A.; Abundis, J. G. and Mundo, N. F. 2006. Geochemistry of leachates from the El Fraile sulfide tailings piles in Taxco Guerrero, southern Mexico. *Environ. Geochemis. Health.* 28(3):243-255.
- Wenny, D. L. and Dumroese, R. K. 1987. Germination of conifer seeds surface sterilized with bleach. *Tree planters' notes.* 38(3):18-21.
- Zapata, N.; Guerrero, F. y Polo, A. 2005. Evaluación de corteza de pino y residuos urbanos como componentes de sustratos de cultivo. *Agríc. Téc.* 65(4):378-387.