



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Laboratorio de Ecología de Suelos

Análisis de comunidades microbianas en suelos agrícolas

Tesis que presenta:

M. en C. Elizabeth Selene Gómez Acata

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director:

Dr. Luc Dendooven

Co-director

Dra. Yendi E. Navarro Noya

MEXICO, D.F.

Marzo, 2015

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecología de Suelos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Luc Dendooven y la co-dirección de la Dra. Yendi E. Navarro Noya.

La sustentante agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca No. 216180 otorgada para realizar sus estudios de Doctorado, en el período de Agosto del 2011 a Marzo del 2015.

Agradecimientos

La vida es por etapas, cada una nos deja aprendizajes importantes y en cada una existen personas que siempre están a tu lado y aquellas que vienen a sumarse a tu vida. Ahora que culmino mis estudios de Doctorado quiero agradecer: a mi amada familia por su apoyo y cariño constante e incondicional; mamá, papá, Pamela y Rigel saben que los quiero y admiro, sus sabios consejos me han acompañado a lo largo de este camino. A mi jefe Luc por otorgarme la confianza para profundizar en lo que más me apasiona que es la investigación. A mi coasesora Yendí, por ofrecerme su amistad, por los inolvidables momentos compartidos y por todo lo que he aprendido personal y profesionalmente. A Marco Luna y Blanquita por siempre tener la disposición para apoyarme en el trabajo diario, y por todas las enseñanzas y platicas tan agradables. A los sinodales Dra. Soledad Vásquez, Dr. Cesar Hugo Hernández, Dr. Rodolfo Marsch, Dr. Roberto Ruiz, y Dr. José Esparza por sus correcciones y observaciones de la tesis. A mis amigos por amenizar mis días en el laboratorio con charlas, risas y bromas, por ser mis colegas en experimentos y cómplices en las fiestas.

Dedico este trabajo a mi sobrina Abril, esperando que algún día sea fuente de inspiración para ella y decida incursionar en el apasionante estudio de los microorganismos, como lo ha hecho su tía, que la quiere con todo el corazón.

*“Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha
llevado a alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside
únicamente en mi tenacidad”.*

Louis Pasteur (1822-1895), Químico francés

Índice

	Páginas
Índice de tablas	IX
Índice de figuras	X
Resumen	XII
Abstract	XIV
 CAPITULO I. Efecto del cambio de uso del suelo sobre las comunidades bacterianas en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca.	
1.1 Antecedentes	17
1.1.1 Los bosques en el mundo	
1.1.2 Bosques y cambio en el uso del suelo	
1.1.3 Ecosistemas forestales en México	18
1.1.4 Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca	20
1.1.5 Microorganismos del suelo frente a las perturbaciones	22
1.1.6 Resistencia y resiliencia de la comunidad microbiana	23
1.2 Justificación	28
1.3 Hipótesis	
1.4 Objetivo general	29
1.5 Objetivos particulares	
1.6 Diagrama general de trabajo	
1.7 Materiales y métodos	30
1.7.1 Sitio de estudio y tratamientos a evaluar	
1.7.2 Muestreo	
1.7.3 Caracterización fisicoquímica del suelo	
1.7.4 Caracterización biológica del suelo	31
1.7.5 Incubación aerobia, extracción de DNA y amplificación del gen 16S rRNA	
1.7.6 Construcción de la librería para pirosecuenciación	32
1.7.7 Pirosecuenciación	

1.7.8	Análisis de secuencias	
1.7.9	Especies indicadoras	33
1.7.10	Resistencia	
1.8	Resultados	34
1.8.1	Características fisicoquímicas del suelo	
1.8.2	Librería pirosecuenciada	35
1.8.3	Análisis de las secuencias	
1.8.4	Estructura de la comunidad bacteriana	39
1.8.5	Diversidad Alpha	43
1.8.6	Diversidad Beta	44
1.8.5	Impacto de las características fisicoquímicas del suelo sobre las comunidades bacterianas	45
1.8.8	Especies indicadoras	
1.8.9	Resistencia	47
1.9	Discusión	49
1.9.1	Efecto del cambio de uso de suelo sobre las características fisicoquímicas	
1.9.2	Taxa más abundantes	50
1.9.3	Estructura de la comunidad microbiana por uso de suelo	51
1.9.4	Especies indicadoras por uso de suelo	53
1.9.3	Resistencia de las comunidades bacterianas al cambio de uso de suelo	54
1.10	Conclusiones	56

CAPITULO II. Fijación biológica de nitrógeno en suelos sometidos a diferentes prácticas agrícolas de distinto origen geográfico

2.1	Antecedentes	58
2.1.1	Agricultura convencional	
2.1.2	Agricultura de conservación	59
2.1.3	Centro Internacional de mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT)	60
2.1.4	Importancia del nitrógeno en el suelo	61
2.1.5	Fijación biológica de nitrógeno	62
2.2	Justificación	66

2.3	Hipótesis	
2.4	Objetivo general	67
2.5	Objetivos particulares	
2.6	Diagrama general de trabajo	
2.7	Materiales y métodos	68
2.7.1	Sitio de estudio y tratamientos	
2.7.2	Muestreo	
2.7.3	Incubación aerobia y fijación biológica de nitrógeno	
2.7.4	Medición de actividad de la nitrogenasa mediante ensayo de reducción de acetileno	71
2.7.4	Extracción de DNA	
2.7.5	Detección del gen <i>nifH</i>	72
2.7.6	Análisis estadístico	
2.8	Resultados	73
2.8.1	Actividad nitrogenasa en los suelos estudiados	
2.8.2	Extracción de DNA y detección del gen <i>nifH</i>	75
2.9	Discusión	77
2.10	Conclusiones	78

CAPITULO III. Detección de los transcritos del gen *nifH* en una dinámica de fijación biológica de nitrógeno en suelos sometidos a diferentes prácticas agrícolas.

3.1	Antecedentes	80
3.1.1	Estación experimental Norman E. Borlaug (CENEB)	
3.1.2	Fijación de nitrógeno en suelo	81
3.2	Justificación	82
3.3	Hipótesis	
3.4	Objetivo general	83
3.5	Objetivos particulares	
3.6	Diagrama general de trabajo	
3.7	Materiales y métodos	84
3.7.1	Descripción del sitio de estudio y tratamientos evaluados	

3.7.2	Muestreo	
3.7.2	Dinámica de fijación biológica nitrógeno	
3.7.3	Medición de amonio (NH ₄ ⁺) en suelo	85
3.7.4	Medición de actividad de la nitrogenasa mediante ensayo de reducción de acetileno	
3.7.5	Extracción de RNA total	
3.7.6	Síntesis de cDNA y detección del gen <i>nifH</i>	86
3.8	Resultados	87
3.8.1	Fijación biológica nitrógeno	
3.8.2	Medición de amonio en suelo	
3.8.3	Extracción de RNA total, síntesis de cDNA y detección de los transcritos del gen <i>nifH</i>	
3.9	Discusión	91
3.10	Conclusiones	92
IV.	Perspectivas	93
V.	Referencias	94
VI.	Anexo	101

Índice de tablas

	Páginas
Tabla 1.1 Superficie destinada a nuevo uso de suelo en la República mexicana en los últimos dos sexenios	21
Tabla 1.2. Superficie de usos de suelo y vegetación, 2007	
Tabla 1.3 Estudios enfocados al efecto del cambio de uso de suelo sobre las comunidades microbianas.	26
Tabla 1.4 Efecto del cambio de uso de suelo sobre la composición de la comunidad microbiana	27
Tabla 1.5 Características fisicoquímicas de los suelos del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca	34
Tabla 1.6 Número total de secuencias obtenidas después de realizar el filtro primario y OTUs agrupadas por tratamiento y localidad.	37
Tabla 1.7. Parámetros de diversidad alpha en los diferentes usos de suelo evaluados.	43
Tabla 2.1 Muestras de suelo colectadas en las diferentes estaciones experimentales y su fecha de muestreo	69
Tabla 2.2 Tratamientos a evaluar en los diferentes lotes experimentales	70
Tabla 2.3 Actividad nitrogenasa detectada en los suelos sometidos a diferentes prácticas agrícolas de distinto origen geográfico.	74
Tabla 2.4 Detección del gen <i>nifH</i> a partir de DNA total de diferentes suelos	76
Tabla 3.1 Actividad de la nitrogenasa registrada en la dinámica de fijación biológica de nitrógeno en suelos sometidos a diferente manejo de residuo.	88
Tabla 3.2 Prueba de Dunnet a la actividad de la nitrogenasa en el tratamiento con sacarosa.	
Tabla 6.1 Afiliación taxonómica de los géneros más abundantes en todos los tratamientos	101
Tabla 6.2 Coeficiente phi de indicadores de especies por uso de suelo	102
Tabla 6.3 Coeficiente phi de indicadores de especies compartidas entre uso de suelo	
Tabla 6.4 Información relevante de las especies indicadoras detectadas por uso de suelo	103
Tabla 6.5 Análisis de varianza y prueba poshoc a los valores de actividad de la nitrogenasa en suelos sometidos a diferentes prácticas agrícolas	105

Índice de figuras

	Páginas	
Figura 1.1	Representación del cambio anual en la superficie de bosque por región	18
Figura 1.2	Respuesta de la composición microbiana ante un disturbio.	24
Figura 1.3	Librería para pirosecuenciación.	35
Figura 1.4	Grupos taxonómicos más abundantes por uso de suelo.	38
Figura 1.5	Abundancia relativa a nivel de phylum en los diferentes usos de suelo evaluados.	40
Figura 1.6	Abundancia relativa a nivel de phylum < 1.5% en los diferentes usos de suelo evaluados.	
Figura 1.7	Representación de la abundancia relativa a nivel de Clase >1%.	41
Figura 1.8	Abundancia relativa mayor a 1% de los tratamientos evaluados del Area de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca	42
Figura 1.9	Curvas de rarefacción	43
Figura 1.10	Análisis de componentes principales (PCA) con los datos de abundancia relativa de los diferentes phyla y clases de Proteobacteria de los diferentes tratamientos	44
Figura 1.11	Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la distancia Weighted y Unweighted Unifrac de las diferentes localidades	46
Figura 1.12	Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la distancia Weighted y Unweighted Unifrac en base en la localidad estudiada	
Figura 1.13	Análisis de correlación canónica (CCA) de los porcentajes de los diferentes phyla y clases de Proteobacteria de los diferentes tratamientos con las características fisicoquímicas de los suelos sometidos a diferente uso	47
Figura 1.14	Resistencia de grupos taxonómicos expresado como cambio relativo	48
Figura 2.1	Microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre y simbióticos.	63
Figura 2.2	Actividad de la nitrogenasa detectada en los suelos sometidos a diferentes prácticas agrícolas de México, Australia, Mozambique, Zambia y Zimbabue.	75
Figura 3.1	Actividad de la enzima nitrogenasa en suelos sometidos a diferente manejo de rastrojo y fertilización nitrogenada bioestimulados con sacarosa y manitol en una dinámica de 56 días.	89

Figura 3.2	Concentración de NH_4^+ de los suelos sometidos a diferente manejo de rastrojo y fertilización nitrogenada de la estación experimental CENEB, Sonora..	
Figura 3.3	Concentración de NH_4^+ de los suelos sometidos a diferente manejo de rastrojo y fertilización nitrogenada de la estación experimental CENEB, Sonora bioestimulados con sacarosa.	90
Figura 3.4	Concentración de NH_4^+ de los suelos sometidos a diferente manejo de rastrojo y fertilización nitrogenada de la estación experimental CENEB, Sonora bioestimulados con rastrojo de maíz	
Figura 3.5	Gel de agarosa al 1% en el que se observan bandas de RNA total extraído de las muestras de la estación experimental CENEB (Sonora)	91
Figura 6.1	Resistencia de las especies indicadoras expresada como cambio relativo	101
Figura 6.2	Esquema de muestreo del lote C-10 de la estación experimental CENEB (Sonora)	104

Resumen

Las comunidades bacterianas del suelo tienen un papel muy importante en la productividad y reciclaje de nutrientes de los ecosistemas, debido a su participación en los ciclos biogeoquímicos. Los agroecosistemas son importantes para el humano porque de ellos obtienen alimentos y fibras, sin embargo, generan modificaciones intensas de los componentes bióticos y abióticos del ecosistema. Por ello, la presente tesis investigó el efecto del cambio del uso de suelo sobre la estructura y composición de las comunidades bacterianas. El efecto de las prácticas agrícolas sobre una de las actividades bacterianas más importantes para la productividad primaria de los ecosistemas, la fijación de nitrógeno. Cada uno de estos objetivos se aborda en tres diferentes capítulos que describo a continuación.

En el capítulo I se abordó el estudio del efecto de la deforestación y el cultivo con maíz (*Zea mays* L.) sobre las características fisicoquímicas y la estructura de la comunidad bacteriana del suelo, en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca en México. Se tomaron muestras de suelo en tres localidades: Capulín, Dilatada y Rosa Morada, en tres parcelas (forestal, deforestada cultivada con maíz o destinada al pastoreo). Se caracterizaron fisicoquímicamente, se extrajo el DNA metagenómico y se determinó la estructura de la comunidad microbiana a través de pirosecuenciación en la plataforma 454 Roche del gen que codifica para el rRNA 16S (gen 16S rRNA). Se determinó la diversidad alpha y beta, la resistencia de las comunidades microbianas y las especies indicadoras de cada uso de suelo. La deforestación y el cultivo con maíz cambiaron la estructura de la comunidad microbiana. La abundancia relativa de los phyla Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes disminuyó mientras que Acidobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes y Firmicutes se incrementó, por lo que fueron resistentes al cambio en el uso del suelo.

En el capítulo II se evaluó el efecto de prácticas de agricultura convencional y de conservación sobre la comunidad microbiana fijadora de nitrógeno. Se colectaron suelos de diferente origen geográfico (Zambia, Mozambique, Zimbabue, Australia y México), se midió la actividad nitrogenasa por la técnica de reducción de acetileno, se extrajo el DNA metagenómico y se amplificó el gen *nifH*. Se detectó actividad nitrogenasa y el gen *nifH* en todas las muestras de suelo, con excepción de las provenientes de Zambia, Mozambique y Zimbabue.

En el capítulo III, se determinó el efecto de las prácticas de agricultura convencional y de conservación sobre la comunidad activa fijadora de nitrógeno en una incubación aerobia. Se seleccionó el suelo con mayor actividad nitrogenasa determinada en el capítulo II y se incubó con sacarosa y manitol o rastrojo de maíz como fuente de carbono. Se midió la actividad nitrogenasa y el contenido de amonio en suelo durante 56 días. Se extrajo el RNA total del suelo en el día donde se observó la mayor actividad nitrogenasa, se sintetizó el cDNA y se amplificó el gen *nifH*. Únicamente se observó actividad nitrogenasa en los suelos adicionados de sacarosa y manitol en los primeros siete días de incubación, siendo mayor en el día tres en la mayoría de los casos. Se detectó el gen *nifH* en los cDNAs sintetizados de todas las muestras.

Abstract

Bacterial communities in soil have an important role in productivity and nutrient cycling in ecosystems, due to their involvement in biogeochemical cycles. Agroecosystems are important for human because they can get food and fiber, however, generate intense modifications of biotic and abiotic components of the ecosystem. Therefore, this thesis investigated the effect of land use change on the structure and composition of the bacterial communities in soil. The effect of agricultural practices on one of the most important primary productivity bacterial activity, nitrogen fixation. Each of these objectives was addressed in three different chapters that describe below.

Chapter I studies the effect of deforestation and cultivation with maize (*Zea mays* L.) on the physicochemical characteristics and structure of the bacterial community in soil from *Area de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca* located in Mexico. Soil was sampled from three locations Capulín, Dilatada and Rosa Morada in three plots (forest, cultivated with maize or grazed by animals). Soil was physicochemically characterized, metagenomic DNA was extracted and the bacterial community structure was determined using Roche 454 pyrosequencing of 16S rRNA gene. The alpha and beta diversity, the resistance of microbial communities to disturbance and species indicator for each land-use were determined. Deforestation and cultivation with maize changed the microbial community structure, the abundance of Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes decreased while Acidobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes and Firmicutes increased, so the last ones were resistant to land use change.

Chapter II, the effect of conventional and conservation practices on nitrogen fixing activity was evaluated. Soils samples from different geographical origins (Africa, Oceania and Mexico) were collected, nitrogenase activity by acetylene reduction assay was measured, metagenomic DNA was extracted and *nifH* gene was amplified. Nitrogenase activity was detected in all soil samples, except in those from Africa, as well as the *nifH* gene.

Chapter III, the effect of conventional and conservation practices on nitrogen-fixing functional community in an aerobic incubation was determined. Soils with higher nitrogenase activity measured in chapter II were selected. Soils were incubated for 56 days with sucrose and mannitol or corn straw. Nitrogenase activity and the ammonium content in soil was measured for 56 days. Total RNA was extracted from soil on the day where the highest nitrogenase activity was found. The cDNA was synthesized and the *nifH*

gene amplified. Nitrogenase activity was detected only when mannitol and sucrose were added and during the first seven days of incubation. On day three the highest activity was detected in most cases. The *nifH* gene was detected in the synthesized cDNAs from all samples.

CAPITULO I.

Efecto del cambio de uso del suelo sobre las comunidades bacterianas en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Los bosques en el mundo

La última *Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010* de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) reportó que la superficie forestal mundial es de aproximadamente 4,000 millones ha, lo que equivale al 31% de la superficie terrestre. El mayor porcentaje de la cubierta forestal está en Sudamérica, seguida de Europa (incluyendo la Federación Rusa), Norteamérica y Centroamérica. Los cinco países con mayor riqueza forestal son la Federación Rusa, Brasil, Canadá, Estados Unidos de América y China, representando más de la mitad del total del área de bosque (FAO, 2010).

1.1.2 Bosques y cambio en el uso del suelo

Los bosques almacenan una gran cantidad de bióxido de carbono (CO₂) en su biomasa (cerca de 289 gigatoneladas en todo el mundo), por lo que tienen un papel importante en la mitigación del cambio climático. Captan una gran cantidad de agua hacia los acuíferos, conservan la diversidad biológica y dan protección al suelo (Hartmann et al., 2012). En el periodo 2005-2010 la existencia de carbono en biomasa forestal se redujo en 0.5 gigatoneladas por año (FAO, 2010).

La reducción de la zona boscosa puede darse por deforestación ya sea por acción antropogénica, que implica la tala del bosque por la acción humana para su conversión a otros usos como la agricultura e infraestructura o por desastres naturales (FAO, 2010). El cambio de uso de suelo es una de las principales amenazas de la biodiversidad mundial y uno de los más devastadores cambios es la conversión de los bosques a sistemas de cultivo (Navarrete et al., 2012). En la última década alrededor de 13 millones ha de bosques fueron convertidas en zonas destinadas a otros usos o se perdieron por causas naturales. Para el periodo de 2000-2010 la variación neta en la superficie boscosa (equivalente a la suma de las pérdidas menos la suma de los incrementos de superficie forestal) se estimó en -5.2 millones ha por año (una superficie de la dimensión de Costa Rica). Sudamérica reportó las mayores pérdidas netas de bosque (4 millones ha anuales), seguida de África (3.4 millones ha anuales) y Oceanía (700,000 ha anuales). En Norteamérica y Centroamérica la superficie de bosque permaneció estable mientras que en Europa siguió aumentando a un ritmo más lento (700,000 ha anuales) que en la

década de los 90s. Asia tuvo una ganancia neta de 2.2 millones ha anuales (Fig. 1.1) (FAO, 2010).

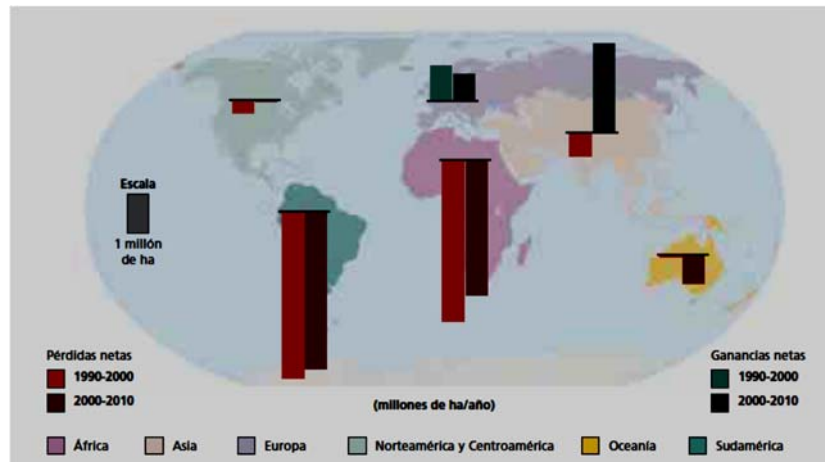


Figura 1.1 Representación del cambio anual en la superficie de bosque por región (FAO, 2010)

Cerca de 1,200 millones ha de bosques se usan para la obtención de productos forestales maderables y no maderables (30% de los bosques del mundo). La superficie designada para fines productivos ha disminuido en más de 50 millones ha desde los 90s a medida que los bosques se han designado para otros fines. El 8% de los bosques del mundo tiene como función principal la protección del suelo y de los recursos hídricos (FAO, 2010). A nivel mundial a pesar de que aumenta la superficie de bosque y se intensifican los esfuerzos para su conservación existe un declive a medida que se explotan o convierten a otros usos como la agricultura, que representa el 11% de la superficie terrestre (FAO, 2010).

Por otra parte, la superficie de bosque cuya función principal es la conservación de la diversidad biológica, ha aumentado en más de 95 millones ha desde 1990 (12% de la superficie total de bosque del mundo), la mayor parte en áreas protegidas. En casi todos los países alrededor del 10% de los bosques son parques nacionales, reservas de caza, áreas naturales silvestres y otras áreas naturales protegidas establecidas por ley (FAO, 2010).

1.1.3 Ecosistemas forestales en México

En México 140 millones ha (73% de la superficie del país) son vegetación terrestre natural, de la superficie con cobertura forestal; 41% corresponde a matorrales xerófilos,

24% a bosques templados y 23% a selvas. México ocupa el décimo segundo lugar en cuanto a existencia de superficie boscosa, después de Rusia, Brasil, Canadá, Estados Unidos de América, China, Australia, Congo, Indonesia, Perú, India y Sudan (CONAFOR, 2009).

En la zonificación forestal del territorio nacional establecida por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), las Áreas Naturales Protegidas son zonas donde la nación ejerce su soberanía y jurisdicción. En el que los ambientes originales no se han alterado significativamente por la actividad humana o que se requieren preservar y restaurar. Son creadas mediante un decreto presidencial y las actividades que pueden realizarse se establecen de acuerdo a la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente. La Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) administra en el país 176 áreas naturales que representan 25,394,779 ha y se dividen en nueve regiones. En la región Centro y Eje Neovolcánico se localiza el Área de protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (<http://www.conanp.gob.mx/regionales/>). Las Áreas de Protección de Flora y Fauna son zonas de cuyos hábitats preservados depende la existencia, transformación y desarrollo de especies de flora y fauna silvestre. Se conserva la diversidad de plantas y animales, los sistemas naturales se mantienen saludables y se satisfacen las necesidades esenciales de la sociedad, sin afectar la biodiversidad existente. (<http://nevadodetoluca.conanp.gob.mx>).

De acuerdo a datos de la SEMARNAT la superficie total de bosques del territorio mexicano disminuyó de 91.379 millones ha en 1990 a 84.983 millones ha para el año 2010. La SEMARNAT reportó que en el periodo de 1990-2000 la tasa de cambio anual (variación promedio anual de ganancia o pérdida) fue de -354,000 ha (-0.52%) y para el período 2005-2010, fue de -155,000 ha (-0.24%). Además, reportó que se autorizaron 8,322.85 ha (de septiembre de 2011 a junio de 2012) para cambio del uso del suelo en terrenos forestales, dando un incremento de un 6% con respecto al mismo período un año anterior, durante el año 2013 se autorizaron 12,054.2 ha (Tabla 1.1). La superficie de uso agrícola estimada para el 2007 fue de 32,158,281 ha (Tabla 1.2). Se comprometieron por compensación ambiental por el cambio de uso de suelo 29,260.9 ha para reforestación y restauración (SEMARNAT, 2012) (http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/).

1.1.4 Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca

El Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFF-NT) es una de las áreas Naturales Protegidas con más antigüedad en México. Se decretó Parque Nacional el 25 de enero de 1936, posteriormente el presidente Lázaro Cárdenas lo modificó el 19 de febrero de 1937 para establecer por decreto una reserva forestal nacional dentro del parque. Finalmente, el 1 de octubre de 2013 por decreto presidencial se modificó nuevamente para establecerla como Área de Protección de Flora y Fauna.

El APFF-NT se localiza en los municipios de Almoloya de Juárez, Amanalco, Calimaya, Coatepec Harinas, Temascaltepec, Tenango del Valle, Toluca, Villa Guerrero, Villa Victoria y Zinacantepec en el Estado de México. Se conforma por un polígono con una superficie total de 53,590 ha dentro del cual se ubica la Zona núcleo cráter (1,941 ha) integrada por las subzonas de protección y uso restringido. La función principal de esta zona es la preservación de los ecosistemas y especies, las actividades humanas se restringen a la investigación (colectas científicas), educación ambiental, turismo de bajo impacto (sustentable), monitoreo ambiental, restauración de ecosistemas y reintroducción de especies.

La zona de amortiguamiento (51,649 ha) está integrada por las subzonas de preservación, aprovechamiento sustentable de los recursos naturales y de los ecosistemas, de uso público, de asentamientos humanos y de recuperación. En ésta zona es posible rehabilitar áreas degradadas, se permiten actividades educativas turísticas y recreativas, investigación científica, monitoreo ambiental, turismo sustentable, manejo forestal (labores y prácticas silvícolas, aprovechamiento extractivo y no extractivo de la vida silvestre), actividades agrícolas y pecuarias, restauración de ecosistemas y reintroducción de especies (<http://nevadodetoluca.conanp.gob.mx/actividades>).

Tabla 1.1 Superficie destinada a nuevo uso de suelo en la República mexicana en los últimos dos sexenios.

Entidad federativa	Período (años)	Superficie autorizada (ha)	Ecosistema afectado (ha)			Nuevo uso de suelo (ha)			
			^a Bosque	^b Selva	^c Vegetación forestal de zonas áridas	Agrícola	Pecuario	Infraestructura básica	Otros
Nacional	2000-2006	48,857.7	7,315	14,239	27,304	4,611	651	33,398	10,196
	2007-2012	76,380.0	8,633	18,806	48,941	2,317	2	51,218	22,844
	2013	12,054.2	1,589	2,689	7,775	437	49	9,736	1,832
Total	14	137,291.9	17,537	35,734	84,020	7,365	702	94,352	34,872

^a**Bosque:** incluye vegetación forestal de zonas de clima templado principalmente, donde predominen especies leñosas perennes desarrolladas espontáneamente con una cobertura de copa mayor al 10% de la superficie que ocupa, formando masas mayores a 1,500 m² e incluye todos los tipos de bosque señalados en la clasificación del INEGI.

^b**Selva:** se considera la vegetación forestal de clima tropical donde predominen especies leñosas perennes desarrolladas espontáneamente, con una cobertura de copa mayor al 10% de la superficie que ocupa, y formado por masas mayores a 1,500 m², se incluyen todos los tipos de selva, manglar y palmar de la clasificación del INEGI, excluyendo los acahuales.

^c**Vegetación forestal de zonas áridas:** aquella que se desarrolla espontáneamente en regiones de clima árido o semiárido formando masas mayores a 1,500 m² se incluyen todos los tipos de matorral, selva baja espinosa y chaparral de la clasificación del INEGI, además de todo tipo de vegetación arbórea o arbustiva presente en zonas con precipitación media inferior a 500 mm anuales.

Nuevo uso de infraestructura básica: incluye desarrollos urbanos, petroquímica, gasoductos, construcciones urbanas, gasolineras, líneas de transmisión y distribución eléctrica, carreteras, plantas de tratamiento, presas, etc.

Otros usos: incluye caminos de acceso, banco de materiales, granjas acuícolas, etc. (Consulta temática SEMARNAT, Diciembre, 2014, http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/approot/dgeia_mce/html/mce_index.html)

Tabla 1.2. Superficie de usos de suelo y vegetación, 2007

	Agrícola (ha)	Bosque cultivado (ha)	Asentamientos humanos y áreas de infraestructura (ha)	Vegetación natural e inducida (ha)
Nacional	32,158,281.8	37,232.1	1,595,283.5	145,739,933

(Consulta temática, SEMARNAT, Diciembre 2014, http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/)

1.1.5 Microorganismos del suelo frente a las perturbaciones

El suelo es un componente esencial de los ecosistemas forestales, es una matriz biológica dinámica que alberga un complejo microbioma que tiene un papel integral en los procesos del ecosistema. El metabolismo microbiano modula la resistencia y resiliencia de los microorganismos frente a las perturbaciones (Hartmann et al., 2014). Los microorganismos del suelo son abundantes y diversos, se estima que existen hasta 10^9 células y 10^4 especies por gramo. Son protagonistas de muchas funciones (ciclos biogeoquímicos, ciclaje de nutrientes, descomposición de la materia orgánica, fertilidad) y son esenciales para la integridad de los ecosistemas forestales (Griffiths y Philippot, 2012). Los factores bióticos (cobertura vegetal) y abióticos (temperatura, pH, minerales, agua, nutrientes) pueden influir en la comunidad microbiana del suelo y en su actividad. El suelo (recurso no renovable) está bajo la presión ambiental relacionada con la intensificación de las actividades humanas (perturbaciones). Una "perturbación" puede darse por causas bióticas o abióticas y resulta en una respuesta fisiológica de un individuo o del sistema ante un "estrés". (Lin et al., 2010; Botton et al., 2006).

El suelo es un entorno heterogéneo para la microbiota que lo habita, sus componentes (arena, limo, arcilla y materia orgánica) proporcionan una infinidad de microhábitats para los organismos residentes en él, por lo que están expuestos a condiciones abióticas y nutricionales que pueden variar. En un sistema "estable", cada microhábitat está ocupado por los organismos con capacidad de colonizarlo. Sin embargo, el tipo de planta y uso del suelo pueden tener repercusiones en la composición microbiana (Garbeva et al., 2004). Frente a perturbaciones pequeñas, la funcionalidad microbiana no se altera completamente debido a la redundancia de los genes entre microorganismos involucrados en los ciclos biogeoquímicos, en contraste con perturbaciones a gran escala, que pueden conducir a cambios importantes en las poblaciones microbianas (Berthrong et al., 2009).

Una especie confinada a uno o a pocos hábitats potencialmente representa un mejor indicador ecológico de los cambios ambientales que uno localizado en diferentes hábitats. Las especies de este tipo se llaman " especies indicadoras " y se utilizan para monitorear los cambios ambientales y evaluar los impactos de perturbaciones en los ecosistemas. Las especies indicadoras pueden reflejar el estado biótico o abiótico del medio ambiente; evidenciar los efectos de los cambios ambientales e indicar la diversidad de otras especies, taxa, o comunidades dentro de un área (De Cáceres y Legendre, 2009)

1.1.6 Resistencia y resiliencia de la comunidad microbiana

La resistencia (grado al cual la composición microbiana permanece sin cambio frente a un disturbio) es la capacidad de un sistema para soportar una perturbación. La resiliencia (velocidad de retorno) se refiere a la capacidad del sistema para recuperarse después de una perturbación temporal y regresar a su estado pre-disturbio o llegar a un nuevo estado estable, por lo que es una medida de la capacidad de los sistemas de absorber los cambios y aún persistir volviendo a un estado de equilibrio (Griffiths y Philippot, 2012; Botton et al., 2006).

La composición microbiana (la riqueza, abundancia relativa y estructura filogenética de un taxón) es resistente si es similar a través de una variedad de condiciones ambientales, es decir, es difícil de perturbar de su estado original. Es resiliente, cuando la composición cambia y se recupera rápidamente, ya sea por crecimiento o por la adaptación fisiológica o genética y puede cambiar en respuesta a nuevas condiciones ambientales. Pero puede contener taxa con redundancia funcional (habilidad de un taxón microbiano para llevar a cabo un proceso a la misma tasa que otro bajo las mismas condiciones ambientales), por lo que los procesos de los ecosistemas no se alteran (Allison y Martiny, 2008).

Algunos grupos microbianos muestran un alto grado de flexibilidad metabólica y tolerancia fisiológica a la variación de las condiciones ambientales por lo que son resistentes al cambio. Además, la adaptación evolutiva a través de la transferencia horizontal de genes permite a los microorganismos sensibles adaptarse a las nuevas condiciones ambientales y volver a la composición original. Por ejemplo, en una perturbación aplicada a un ecosistema, la composición microbiana puede ser resistente a la perturbación y no cambiar, ser resiliente y recuperar su composición inicial o una comunidad cuya composición es sensible y no resiliente podría producir procesos similares al de la comunidad original si los miembros son funcionalmente redundantes (Fig. 1.2). Las características de los microorganismos sugieren que la resiliencia pueden ser común, es decir, muchos microorganismos tienen tasas de crecimiento rápido, por lo tanto, si su abundancia es suprimida por una perturbación, tienen el potencial para recuperarse rápidamente. Por otra parte, tienen flexibilidad fisiológica (ejemplo, las bacterias púrpuras del azufre, pueden ser fotótrofas en condiciones anóxicas y heterótrofas en condiciones aerobias). Si la adaptación fisiológica no es posible, entonces la evolución (a través de mutaciones o intercambio horizontal de genes) podría permitir que taxa microbianos

puedan adaptarse a las nuevas condiciones ambientales y recuperarse del disturbio. Además, en una perturbación, algunos taxa pueden beneficiarse de las nuevas condiciones y aumentar su abundancia. Para que algunos taxa puedan recuperar su abundancia, los que respondieron positivamente a la perturbación tendría que disminuir su abundancia para devolver a la comunidad a su composición original (Allison y Martiny, 2008).

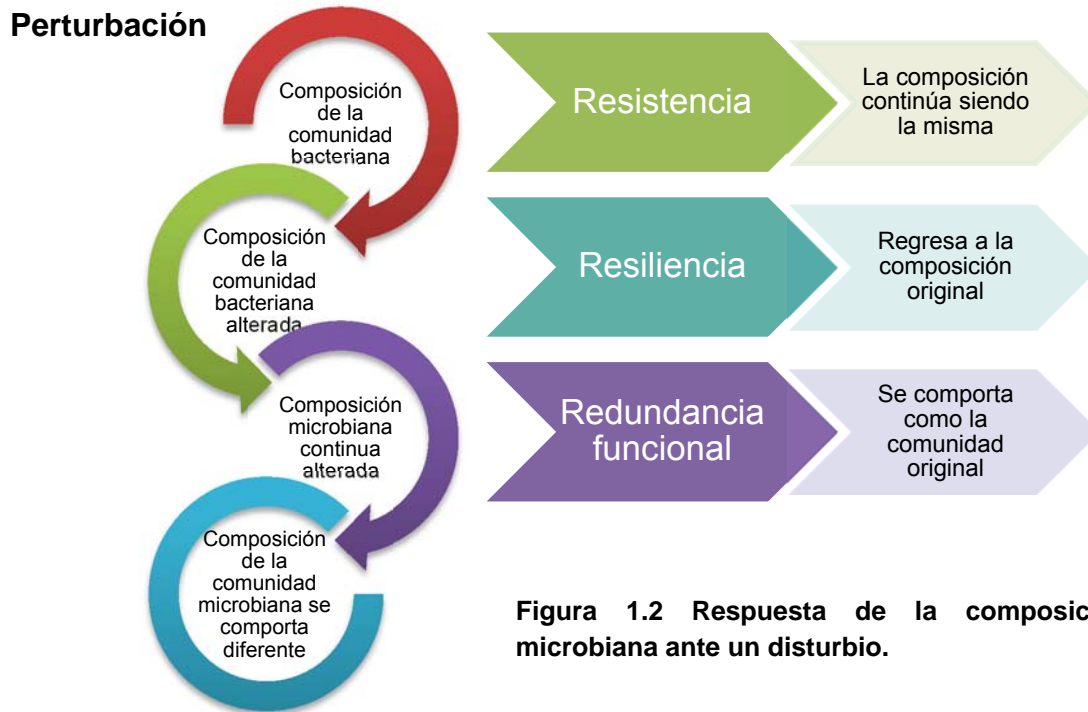


Figura 1.2 Respuesta de la composición microbiana ante un disturbio.

La resistencia y resiliencia se puede medir después de una perturbación mediante la comparación entre las muestras tomadas antes y después de la perturbación. El cálculo de la resiliencia y resistencia se presenta generalmente como una proporción o porcentaje de la variable medida en el tratamiento perturbado respecto al control (sin perturbaciones) al mismo tiempo, las ecuaciones en general toman la forma de cambio relativo respecto al control (Griffiths y Philippot, 2012).

La eliminación de la cobertura vegetal y los cultivos agrícolas causan cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, asociados a la reducción de la materia orgánica, deterioro de la estructura del suelo y disminución de la biomasa y actividad microbiana. No es claro cómo el deterioro en las propiedades del suelo y el cambio en las comunidades microbianas afectan la estabilidad funcional de los suelos. Se

plantea la hipótesis de que la estabilidad funcional del suelo se genera por la redundancia funcional de los microorganismos y que el efecto de la perturbación depende del nivel de especificidad de la función afectada. Por ejemplo, funciones tales como la descomposición de la materia orgánica no son afectadas, mientras que funciones especializadas como la nitrificación, desnitrificación, oxidación de metano, mineralización de xenobióticos se afectan a medida que disminuye la biodiversidad (Chaer et al., 2009).

La deforestación y el cambio en el uso del suelo a cultivo agrícola causan cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Tabla 1.3). Estudios con técnicas convencionales de biología molecular como ARDRA, RISA, PFLA, DGGE o pirosecuenciación del gen 16S rRNA han demostrado que la deforestación y el cultivo alteran la estructura de la comunidad bacteriana con respecto al suelo nativo (Shange et al., 2012; Nacke et al., 2011; Nüsslein y Tiedje, 1999; Borneman y Triplett, 1997; Bossio et al., 1995) (Tabla 1.4).

Tabla 1.3 Estudios enfocados al efecto del cambio de uso de suelo sobre las comunidades microbianas.

Uso de suelo	Características fisicoquímicas	Marcador molecular	Correlación	Referencia
<i>Agrícola químico, agrícola orgánico Pastizal</i>	C _{orgánico} mayor en suelo agrícola orgánico	Gen 16S rRNA pirosecuenciación	Acidobacteria correlación positiva con pH ácido	Chaudhry et al., 2012
<i>Agrícola, Forestal</i>	Diferencia significativa en las propiedades fisicoquímicas entre cultivo y forestal	Gen 16S rRNA pirosecuenciación	Acidobacteria correlación positiva con materia orgánica, Al y pH Agrícola (Acidobacteria Gp4-7, Gp10, Gp13), forestal (Acidobacteria Gp1, Gp2) Acidez y saturación de Al (Acidobacteria Gp1 y Gp10 correlación positiva; Gp3 correlación negativa), con P, B, Zn (Acidobacteria Gp13)	Navarrete et al., 2012
<i>Pastizal, Forestal</i>	Forestal pH ácido, bajo contenido de C _{total} y alta contenido de Al	Gen 16S rRNA pirosecuenciación	Forestal (comunidades microbianas con pH ácido e incremento de Al, Pastizal (correlacionado con incrementos de C, N, Mg ²⁺))	Rodrigues et al., 2012
<i>Pastizal, Agrícola Forestal</i>	Agrícola y pastizal (pH alcalino), C _{orgánico} disminuyo en agrícola y aumento en pastizal, N _{total} se incrementó en el de pastizal	Gen 16S rRNA pirosecuenciación	Acidobacteria correlacionado positivamente con pH	Shange et al., 2012
<i>Pastizal, Forestal</i>		Gen 16S rRNA pirosecuenciación	Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria Gp1, Gp3, Gp6, Gp13, Gp17, Gp18 correlacionado con pH	Nacke et al., 2011
<i>Agrícola, Pastizal Forestal</i>		Gen 16S rRNA T-RFLP y clonación	Comunidad microbiana se correlaciona con la acidez	da C Jesús et al., 2009
<i>Agrícola, Pastoreo, Forestal</i>	C _{total} , N _{total} , P _{extraíble} con diferencia significativa, pH, humedad, y densidad aparente sin diferencia significativa	Gen 16S y 18S rRNA, clonación	Comunidad bacteriana correlacionada con el pH y textura	Lauber et al., 2008

Tabla 1.4 Efecto del cambio de uso de suelo sobre la composición de la comunidad microbiana

Uso de suelo	Taxa más abundantes	Taxa más importantes por uso de suelo	Referencia
<i>Agrícola, químico, orgánico, Pastizal</i>	Proteobacteria 29.8%, Acidobacteria 22.6%, Actinobacteria 11.1% y Bacteroidetes 4.7%	Proteobacteria, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes mas abundantes en suelo agrícola orgánico, Actinobacteria en suelo agrícola químico, Acidobacteria en el pastizal	Chaudhry et al., 2012
<i>Agrícola, Forestal</i>	Acidobacteria 28% en suelo forestal, 18% en agrícola	Presencia de Acidobacteria Gp11 solo en agrícola	Navarrete et al., 2012
<i>Pastizal, Forestal</i>	Proteobacteria 56% Acidobacteria 15-20% Firmicutes 3-12%	Acidobacteria más afectado por el cambio, seguido de Nitrospirae y Gemmatimonadetes; Firmicutes, Actinobacteria y Chloroflexi se incrementaron en pastizal.	Rodrigues et al., 2012
<i>Pastizal, Agrícola, Forestal</i>	Proteobacteria 39.9-45.5% Actinobacteria Acidobacteria 4.4.-20.6%	Acidobacteria se afectó por cambio a suelo agrícola Gemmatimonadetes aumentaron en el agrícola, Chloroflexi disminuyó en pastizal y agrícola, diferencia significativa en Verrucomicrobia, BRC1, Nitrospirae, Cyanobacteria. Alphaproteobacteria y Acidobacteria mayor abundancia relativa en el forestal Betaproteobacteria y Deltaproteobacteria mayor abundancia relativa en el agrícola. Actinobacteria, Betaproteobacteria y Deltaproteobacteria mayor en pastizal que forestal. Actinomycetes mas abundante en agrícola. Solirubrobacterales mayor abundancia en agrícola	Shange et al., 2012
<i>Pastizal, Forestal</i>	Acidobacteria Actinobacteria, Proteobacteria	En orden de abundancia, suelo forestal Alphaproteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, pastizal Actinobacteria, Acidobacteria y Alphaproteobacteria	Nacke et al., 2011
<i>Agrícola, Pastizal, Forestal</i>	Acidobacteria 38.8% Proteobacteria 36.2% Bacteroidetes 8.3%, Actinobacteria 6.1%	Bacteroidetes en pastizal y agrícola, Firmicutes en forestal, Actinobacteria en forestal, Alphaproteobacteria en agrícola Análisis de indicadores de especies (<i>Arthrobacter</i> y <i>Bradyrhizobium</i> suelos agrícolas; Sphingobacteriales y Acidobacteria pastizal,	de C Jesús et al., 2009
<i>Agrícola, Pastoreo, Forestal</i>	Acidobacteria 28% Actinobacteria 16% Proteobacteria 15% Ascomycota 27% Basidiomycota 70%	Abundancia relativa de Acidobacteria mayor en forestal	Lauber et al., 2008

1.2 Justificación

En México la deforestación a causa del cambio de uso de suelo ha aumentado en los últimos años. La transformación de zonas forestales a sitios de pastoreo o de cultivo tiene repercusiones sobre las características fisicoquímicas y biológicas del suelo.

El efecto del cambio de uso de suelo sobre la composición de las comunidades microbianas se ha reportado en trabajos previos con técnicas convencionales de biología molecular. Sin embargo, nuestra comprensión de cómo las comunidades microbianas responden ante esta perturbación es limitado. Por lo que es de interés para este trabajo definir los grupos taxonómicos que tienen la habilidad de resistir el cambio manteniéndose estables, los que se recuperan y regresan a su estado pre-disturbio, y los que se pueden considerar indicadores de cada ecosistema. Además de proporcionar conocimiento de los efectos del cambio de uso de suelo sobre la diversidad y composición de la comunidad microbiana.

1.3 Hipótesis

Dado que la deforestación y las prácticas agrícolas causan un cambio en la estructura de la comunidad bacteriana entonces los taxa con la mayor abundancia relativa en los suelos forestales serán los más resistentes al cambio.

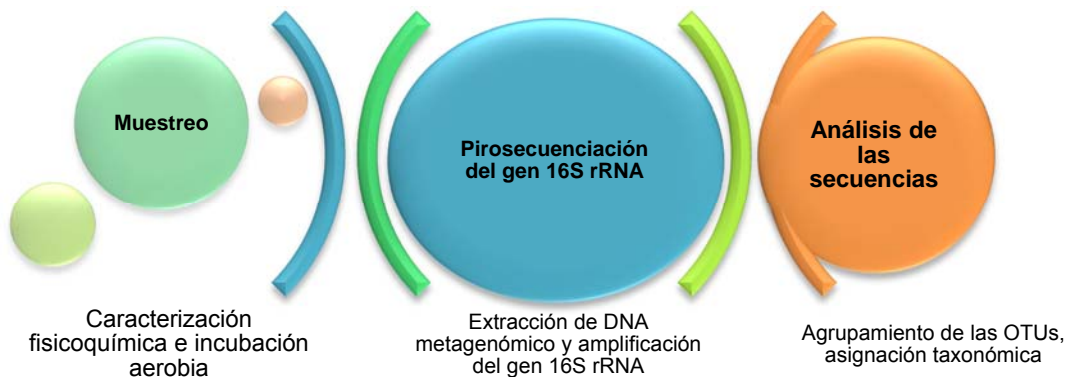
1.4 Objetivo general

Evaluar el efecto del cambio del uso del suelo (deforestación y agricultura) sobre la composición de las comunidades bacterianas en un suelo forestal.

1.5 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la deforestación y prácticas agrícolas sobre la estructura de las comunidades bacterianas.
- Correlacionar el cambio de uso de suelo con las características fisicoquímicas y comunidades bacterianas.
- Determinar los taxa resistentes al cambio de uso del suelo.

1.6 Diagrama general de trabajo



1.7 Materiales y métodos

1.7.1 Sitio de estudio y tratamientos a evaluar

El *Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca* es el área natural protegida con mayor antigüedad en México (78 años desde que se decretó), ubicada al suroeste de la ciudad de Toluca en el Estado de México, su altitud es de 3700 msnm, de clima húmedo y frío con una temperatura anual media de 7.5°C. La precipitación es en los meses de junio a agosto (1000-1200 mm) (<http://nevadodetoluca.conanp.gob.mx>).

Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

- a) Forestal: zona de bosque de coníferas
- b) Agrícola: zona donde se ha cultivado maíz por 20 años
- c) Perturbado: zona deforestada destinada al pastoreo

1.7.2 Muestreo

Se tomaron muestras de suelo en 20 puntos al azar en cinco parcelas de 400 m² de tres tratamientos diferentes: forestal, perturbado y agrícola (15 parcelas en total) ubicados en tres localidades: Rosa Morada (latitud norte 19°16'-19°17' longitud oeste 99°51'-99°52') Dilatada (latitud norte 19°16'-19°18' longitud oeste 99° 52'-99° 54') y El Capulín (latitud norte 19°17'-19°18' longitud oeste 99°55'-99° 56') de 100 ha. El suelo se tomó cuando el maíz se encontraba en el estado vegetativo V1-V3, un mes antes de que las muestras se colectaran se aplicó N como nitrato de amonio (176 kg ha⁻¹) o urea (130 kg ha⁻¹).

El suelo se tomó con una barrena (Eijkelkamp, Holanda) de siete cm de diámetro a diez centímetros de profundidad, de cada localidad (n=3), de cada tratamiento (n=3) y de cada parcela (n=5) por lo que se colectaron 45 muestras. El suelo se llevó al laboratorio y se tamizó con una malla de cinco mm de tamaño de apertura de trama. Una parte se utilizó para la caracterización fisicoquímica de suelos y otra se almacenó a -20°C para los análisis de biología molecular.

1.7.3 Caracterización fisicoquímica del suelo

Las características fisicoquímicas se determinaron en el Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales de la UAEM por el Ing. Isaías Valencia Becerril incluyendo: capacidad de retención de agua (CRA) (método gravimétrico), conductividad eléctrica (CE) (método de pasta saturada), el nitrógeno total (método de Kjeldhal), tamaño de la

partícula de suelo, carbono total, capacidad de intercambio catiónico (método de acetato de bario) y cationes intercambiables Ca, K, Mg y Na (extracción con oxalato de amonio y determinados por absorción atómica) (Wright y Stuczynski, 1996).

1.7.4 Caracterización biológica del suelo

La determinación del C de la biomasa microbiana, la mineralización del carbono en una incubación aerobia y el coeficiente metabólico (qCO_2) [relación entre la respiración (emisión de CO_2 después de 1 día) y la biomasa microbiana] se realizó en el Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales de la UAEM por el Ing. Isaías Valencia Becerril.

1.7.5 Incubación aerobia, extracción de DNA y amplificación del gen 16S rRNA

Se tomaron 10 g de suelo de cada parcela en estudio (en total 45), se pre-incubaron al 40% de la CRA durante siete días. Posteriormente se realizó la extracción de DNA a partir de 0.25 g de suelo utilizando el kit Power soil DNA isolation kit MoBio (Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, como sigue: la muestra de suelo se colocó en el *PowerBeadTube* (contiene arena y un buffer que ayuda a dispersar las partículas del suelo, disuelve ácidos húmicos y protege a los ácidos nucleicos de la degradación). Se agregó dodecil sulfato de sodio (SDS), la lisis se realizó en un agitador Vortex® a máxima velocidad durante diez minutos. Posteriormente se adicionó una la solución C2 que elimina compuestos orgánicos y no orgánicos así como restos celulares y proteínas. Finalmente el DNA se disolvió en una solución concentrada de sales que lo unió a la sílica contenida en la columna *Spin Filter*. Se realizó un lavado con una solución que contiene etanol para eliminar residuos de sales, ácidos húmicos y otros contaminantes. El DNA se eluyó de la columna *Spin Filter* con agua ultrapura (dos eluciones de 50 μ L). La calidad del DNA se verificó en un gel de agarosa al 0.8% y se visualizó con ayuda de SyBr Gold (Invitrogen, Carlsbad, USA) en un transiluminador Blstar16 (Biometra Analytik, Jena Alemania).

A partir de muestras de DNA íntegro y purificado, se amplificó la región V1-V6 del gen 16S rRNA utilizando los iniciadores 8-F (5'-AGA GTT TGA TCI TGG CTC A-3') y 949-R (5'-CCG TCW ATT KCT TTG AGT T-3') (Navarro-Noya et al., 2013). Con etiquetas de 10 pb y adaptadores lib-L para pirosecuenciación por medio de la plataforma 454 Roche, con un tamaño aproximado del amplicón de 1000 pb. Las muestras se amplificaron por triplicado en un volumen final de 25 μ L, se visualizaron en un gel de agarosa al 1% con ayuda de SyBr Gold en un transiluminador Blstar16.

1.7.6 Construcción de la librería para pirosecuenciación

Los amplicones (el producto de tres reacciones de PCR) se purificaron con el fin de concentrar la muestra y eliminar residuos de iniciadores, dNTPs, etc. utilizando el kit UltraClean PCR Clean-Up (Mo Bio laboratorios, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a instrucciones del fabricante. La elución se realizó con agua en un volumen final de 30 μ L. Los amplicones purificados se cuantificaron utilizando PicoGreen dsDNA (Invitrogen, Carlsbad, USA) de acuerdo a instrucciones del fabricante. Para ello se realizó una dilución 1:50 de los productos purificados de cada muestra en Tris-EDTA pH 8 (TE) 1 \times , y se mezclaron en volúmenes iguales con PicoGreen 1 \times disuelto en TE 1 \times . La mezcla se dejó reposar por cinco min en oscuridad, y se hizo la medición en un NanoDrop™ 3300 Fluorespectrometer (Thermo Scientific Nanodrop). Las lecturas se hicieron con 2 μ L de la mezcla por triplicado. La concentración de cada muestra se determinó utilizando una curva estándar usando DNA de concentración conocida en las mismas condiciones en que se manejaron las muestras. Utilizando los valores de la cuantificación se mezclaron las muestras para obtener cantidades iguales. La mezcla se purificó como se mencionó anteriormente, se visualizó en un gel de agarosa al 1% con SyBr Gold y se cuantificó con PicoGreen para determinar la concentración final.

1.7.7 Pirosecuenciación

La mezcla se envió al servicio de secuenciación en Macrogen Inc. (DNA Sequencing Service, Seoul, Korea) por medio del pirosecuenciador Roche GS-FLX Plus 454 (Roche, Mannheim, Alemania).

1.7.8 Análisis de secuencias

Los datos de la pirosecuenciación se analizaron con el software QIIME 1.8.0 (Caporaso et al., 2010). En el filtro primario se eliminaron las secuencias menores a 450 pb, así como las lecturas con menos de 25 de calidad, con homopolímeros mayores a seis nucleótidos y con ambigüedades en las etiquetas o iniciadores. Las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) se agruparon al 97% de similitud. La asignación taxonómica se realizó con un umbral de confianza del 80% basándose en la comparación con las secuencias del Ribosomal Database Project usando el clasificador Naïve Bayesian rRNA (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) (Wang et al., 2007). Se seleccionaron al azar 305 secuencias por muestra para los análisis de diversidad. Las secuencias se

depositaron en el GenBank con el número de acceso SRP043580. Se calcularon las distancias filogenéticas de las comunidades bacterianas usando Fast UniFrac (Hamady et al., 2010) en QIIME (Caporaso et al., 2010).

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto del uso del suelo basado en la diferencia significativa usando el Modelo general lineal (PROC GLM. SAS Institute, 1989). El efecto sobre las poblaciones microbianas (abundancia relativa de los diferentes phyla y de las cuatro clases de Proteobacteria) se visualizó con un análisis de componentes principales (PCA) usando PROC FACTOR. La correlación con las características físicoquímicas del suelo se determinó con PROC CORR, se usó un análisis de correlación canónica (CCA) (PROC CANCORR, SAS Institute, 1989).

1.7.9 Especies indicadoras

Se realizó un análisis de especies indicadores con los datos de abundancia relativa, utilizando el paquete *indicspecies* de R (<http://www.r-project.org/>), con la función `multipatt` se determinó el coeficiente Phi (ϕ) (Chytry et al., 2002). Se consideraron especies indicadoras aquellas con un valor $\phi > 0.4$ y $p < 0.05$.

1.7.10 Resistencia

Los valores de abundancia relativa de las cinco réplicas de las tres localidades (Capulín, Dilatada y Rosa Morada) con excepción de los valores extremos. Se promediaron y se usaron para calcular el porcentaje de cambio relativo del suelo agrícola y perturbado tomando como comparación el suelo forestal (Chaer et al., 2009).

$$\text{Cambio relativo (\%)} = [(T/C) - 1] * 100$$

Donde T es la abundancia relativa de un grupo bacteriano del suelo perturbado o agrícola y C es la abundancia relativa del grupo bacteriano en el suelo forestal tomado como control.

1.8 Resultados

1.8.1 Características fisicoquímicas del suelo

El pH fue menor en el suelo agrícola comparado con el suelo forestal y perturbado ($p < 0.001$). El N total fue menor en el suelo agrícola comparado con el suelo forestal y el C orgánico (SOC) fue menor en el suelo perturbado ($p < 0.05$) comparado con el suelo agrícola y el forestal. La CEC no tuvo diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 1.5). El C y N de biomasa microbiana y la emisión de CO_2 fueron significativamente más bajos en el suelo agrícola que en el forestal ($p < 0.01$). En el suelo agrícola la emisión de CO_2 fue de $7.4 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y en el suelo forestal de $15.5 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ mientras que el C de la biomasa fue de 267 mg C kg^{-1} y 763 mg C kg^{-1} respectivamente. El coeficiente metabólico $q\text{CO}_2$ o el intervalo entre la respiración (CO_2 emitido después de un día) y la biomasa microbiana fue casi el doble en el suelo agrícola ($q\text{CO}_2 = 0.183$) comparado con el suelo forestal ($q\text{CO}_2 = 0.094$).

Tabla 1.5 Características fisicoquímicas de los suelos del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (Gómez-Acata et al., 2014).

Característica fisicoquímica/Tratamiento	Forestal	Perturbado	Agrícola	^d MSD	Valor de p
CE^a (dS m ⁻¹)	0.055 A ^{bc}	0.053 A	0.052 A	0.006	0.472
pH	6.1 A	6.2 A	5.3 B	0.4	<0.001
C orgánico	29.3 A	18.7 B	20.4 AB	9.9	0.029
N total	0.79 A	0.69 AB	0.57 B	0.21	0.016
Arcilla (g kg ⁻¹ ss)	75 AB	60 B	90 A	20	0.008
Limo	215 A	220 A	230 A	50	0.832
Arena	710 A	720 A	690 A	50	0.202
Textura	Franco arenoso				
CEC^e (Cmol g ⁻¹)	32.7 A	28.0 A	25.0 A	8.8	0.111
K	8.3 A	8.6 A	14.6 A	8.4	0.135
Ca	6.7 A	3.5 A	4.1 A	4.6	0.227
Mg (g kg ⁻¹ ss)	58.6 A	7.5 A	8.8 A	54.7	0.051
Na	5.8 A	6.5 A	10.0 A	6.6	0.307
Emisión CO₂ d⁻¹	15.5 A	10.5 B	7.4 C	2.4	<0.001
^fBio-C (g kg ⁻¹)	763 A	387 B	267 B	271	<0.001
^gBio-N	85.8 A	29.9 B	15.0 B	27.3	<0.001

^aCE: conductividad electrolítica, ^blos valores son la media de las cinco réplicas de cada tratamiento, ^clos valores en la misma fila con diferente letra son significativamente diferentes $p < 0.05$, ^dMSD: Mínima diferencia significativa ($p < 0.05$). ^eCEC: capacidad de intercambio catiónico, ^fBio-C: C microbiano, ^gBio-N: N microbiano.

1.8.2 Librería pirosecuenciada

La cuantificación realizada a la librería del gen 16S rRNA por el servicio de MacroGen Inc. (DNA Sequencing Service, Seoul, Korea), mostró que la concentración de la librería fue de 3,407,594,895 moléculas μL^{-1} , siendo óptima para iniciar la secuenciación, el tamaño de amplicón fue de aproximadamente 1000 pb (Fig. 1.3a). El total de lecturas obtenidas después de la secuenciación fue de 137,357, encontrando más del 50% en un tamaño mayor a 700 pb (Fig. 1.3b).

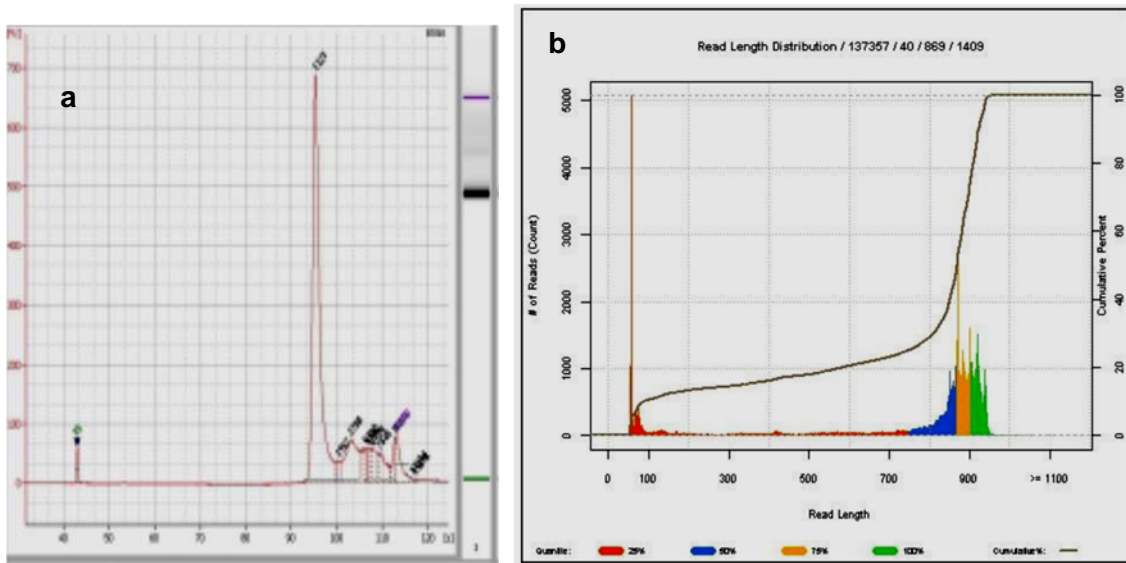


Figura 1.3 Librería para pirosecuenciación. a) Electroferograma de la librería del gen 16S rRNA enviado por MacroGen Inc. realizado en un equipo Agilent bioanalyzer & Caliper Labchip GX DNA High Sensitivity. b) Distribución de las lecturas provenientes de la pirosecuenciación.

1.8.3 Análisis de las secuencias

1.8.3.1 Resultados del filtro primario

Se obtuvieron un total de 95,611 secuencias de buena calidad. Para los análisis se eliminaron las secuencias que no cubrieron los criterios de calidad seleccionados: secuencias fuera del intervalo seleccionado (menores a 450 pb y mayores a 1000 pb), 144 secuencias por debajo de 25 de calidad, 4,512 secuencias con homopolímeros mayores a 6 nucleótidos, 4,586 secuencias con algún error en el iniciador, 1,194 secuencias con errores en la etiqueta. Secuencias obtenidas por muestra se reporta en la Tabla 1.6.

1.8.3.2 Agrupamiento de las OTUs

El número total de OTUs observadas fue de 21,444. El mínimo número de OTUs por muestra fue de 209 y el máximo de 4,844. En la parcela CM4 no se observaron OTUs debido a que no se obtuvieron secuencias de esta muestra después del filtro primario, los resultados por muestra se resumen en la Tabla 1.6.

1.8.3.3 Asignación taxonómica

Se reportaron un total de 18 phyla, 53 clases, 82 órdenes, 163 familias y 320 géneros. El phylum más abundante fue Proteobacteria (35.2% ± 6.7%) seguido del Acidobacteria (21.3% ± 5.9) y Actinobacteria (10.1% ± 4.1). Las clases más abundantes fueron Alphaproteobacteria (14.9% ± 6%), Betaproteobacteria (10.7% ± 4%) y Actinobacteria (10.1% ± 4%). Los órdenes más abundantes fueron Rhizobiales (11% ± 5%), Gemmatimonadales (7% ± 3%), Acidobacteria Gp4 y Gp1 (7% ± 4%) y Actinomycetales (6% ± 3%). Las familias más abundantes fueron Gemmatimonadaceae (7% ± 3%), Acidobacterias de los grupos Gp1 y Gp4 (7% ± 4%) y Bradyrhizobiaceae (5% ± 3%). Los géneros más abundantes fueron *Gemmatimonas* (7.3% ± 3.2%) *Bradyrhizobium* (3.3% ± 2.1%) y *Steroidobacter* (1.4% ± 1.1%).

1.8.3.4 Distribución de los taxa por tratamiento

Los grupos taxonómicos más abundantes en el tratamiento forestal fueron: phylum Proteobacteria (40.1%), clase Alphaproteobacteria (19%), orden Rhizobiales (15%), familia Bradyrhizobiaceae (6%), género *Bradyrhizobium* y *Gemmatimonas* (5%). Para el tratamiento agrícola: phylum Proteobacteria (32.6%), clase Alphaproteobacteria (11%), orden Gp1 (12%), familia Gemmatimonadaceae (9%), género *Gemmatimonas* (9%). En el perturbado: phylum Proteobacteria (32.6%), clase Alphaproteobacteria (14%), orden Rhizobiales (9%), familia Gemmatimonadaceae (8%) y género *Gemmatimonas* (8%) (Fig. 1.4; Tabla 6.1 Anexo).

Tabla 1.6 Número total de secuencias obtenidas por tratamiento y localidad después de realizar el filtro primario y OTUs agrupadas.

<i>Localidad/ Tratamiento</i>	Capulín			Dilatada Secuencias			Rosa Morada		
	Muestra	Número de secuencias	Número de OTUs	Muestra	Número de secuencias	Número de OTUs	Muestra	Número de secuencias	Número de OTUs
<i>Agrícola</i>	^a CM1	663	749	DM16	523	567	RM31	2203	2372
	CM2	1411	1388	DM17	2453	2498	RM32	474	424
	CM3	1901	2066	DM18	1731	1816	RM33	491	561
	CM4	0	0	DM19	1743	1908	RM34	2433	2502
	CM5	208	280	DM20	1886	1956	RM35	214	231
<i>Perturbado</i>	CMx6	290	350	DMx21	2007	2406	RMx36	449	473
	CMx7	1123	975	DMx22	1465	1570	RMx37	2444	2953
	CMx8	1689	1793	DMx23	1790	1921	RMx38	1129	1333
	CMx9	1873	1692	DMx24	529	505	RMx39	4289	4844
	CMx10	1799	2066	DMx25	287	282	RMx40	2650	2814
<i>Forestal</i>	CF11	721	913	DF26	2076	1886	RF41	3107	3438
	CF12	204	209	DF27	1565	1720	RF42	1526	1632
	CF13	1277	1489	DF28	1703	1337	RF43	2391	2091
	CF14	1491	1717	DF29	1516	1383	RF44	2139	2003
	CF15	801	922	DF30	524	459	RF45	1785	2043

^aCM:Capulín suelo agrícola; CMx:Capulín suelo perturbado; CF:Capulín suelo forestal; DM:Dilatada suelo agrícola; DMx:Dilatada suelo perturbado; DF:Dilatada suelo forestal; RM:Rosa Morada suelo agrícola; RMx:Rosa Morada suelo perturbado; RF:Rosa Morada suelo forestal.

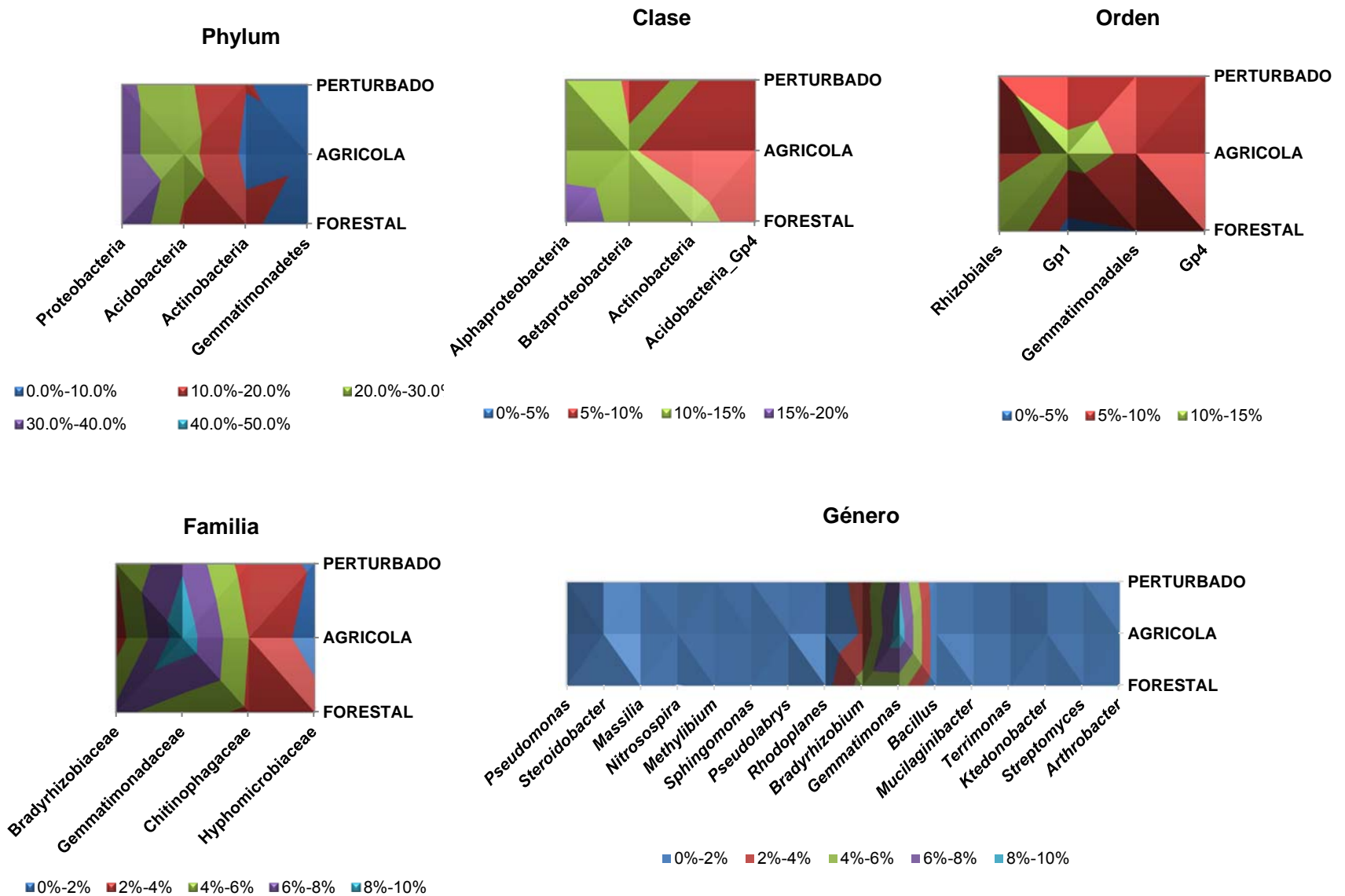


Figura 1.4 Grupos taxonómicos más abundantes por uso de suelo (forestal, agrícola, perturbado).

1.8.4 Estructura de la comunidad bacteriana

La abundancia relativa de los phyla Acidobacteria y Gemmatimonadetes fue significativamente más alta en el suelo agrícola comparada con el suelo forestal ($p < 0.05$). Mientras que la abundancia de los phyla Proteobacteria y Actinobacteria fue más alta en el suelo forestal que el suelo agrícola ($p < 0.001$). La abundancia del phylum Gemmatimonadetes fue significativamente más alta en el tratamiento agrícola comparado con el forestal y perturbado ($p < 0.001$). La abundancia relativa del phylum Verrucomicrobia fue significativamente más alta en el tratamiento perturbado que en el tratamiento agrícola ($p < 0.05$) (Fig. 1.5). Los phyla con una abundancia relativa menor al 1.5% fueron Cyanobacteria, Nitrospira, WS3, OP10, OP11, TM7, BRC1 y OD1. La abundancia relativa de los phyla Cyanobacteria, Nitrospira, OP10, OP11 y BRC1 se incrementó en el tratamiento agrícola y perturbado comparado con el forestal (Fig. 1.6).

Dentro del phylum Proteobacteria, la abundancia relativa de la clase Alphaproteobacteria (principalmente el orden Rhizobiales) fue significativamente mayor en el suelo forestal comparada con el suelo agrícola, mientras que las clases Deltaproteobacteria (en su mayoría del orden Myxococcales) y Acidobacteria Gp1 mostraron una tendencia opuesta ($p < 0.01$) (Fig. 1.7 y 1.8a). Se detectaron 15 grupos de Acidobacteria, con mayor abundancia relativa Gp1, Gp2, Gp3, Gp4, Gp6 y Gp7. Los grupos de Acidobacteria más abundantes por tratamiento fueron Gp4 en forestal y perturbado y Gp1 en suelo agrícola (Fig. 1.8b).

Las familias con mayor abundancia relativa en los suelos forestales fueron Bradyrhizobiaceae e Hyphomicrobiaceae pertenecientes al orden Rhizobiales. Gemmatimonadaceae con mayor abundancia relativa en el tratamiento agrícola comparado con el forestal y el perturbado (Fig. 1.8c).

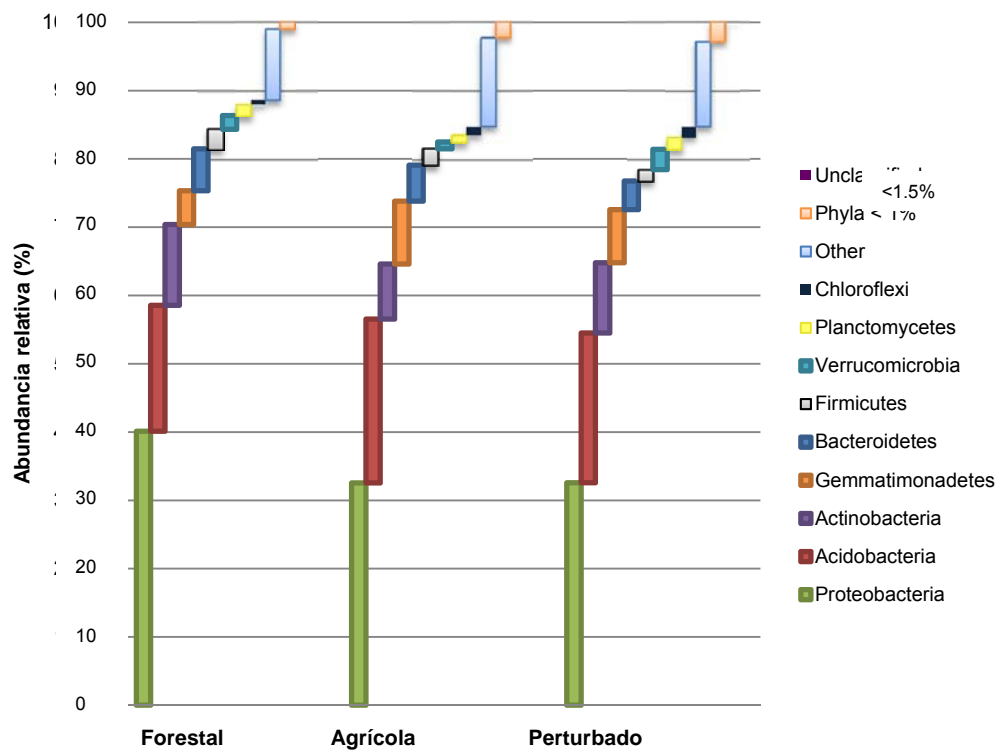


Figura 1.5 Abundancia relativa a nivel de phylum en los diferentes usos de suelo evaluados.

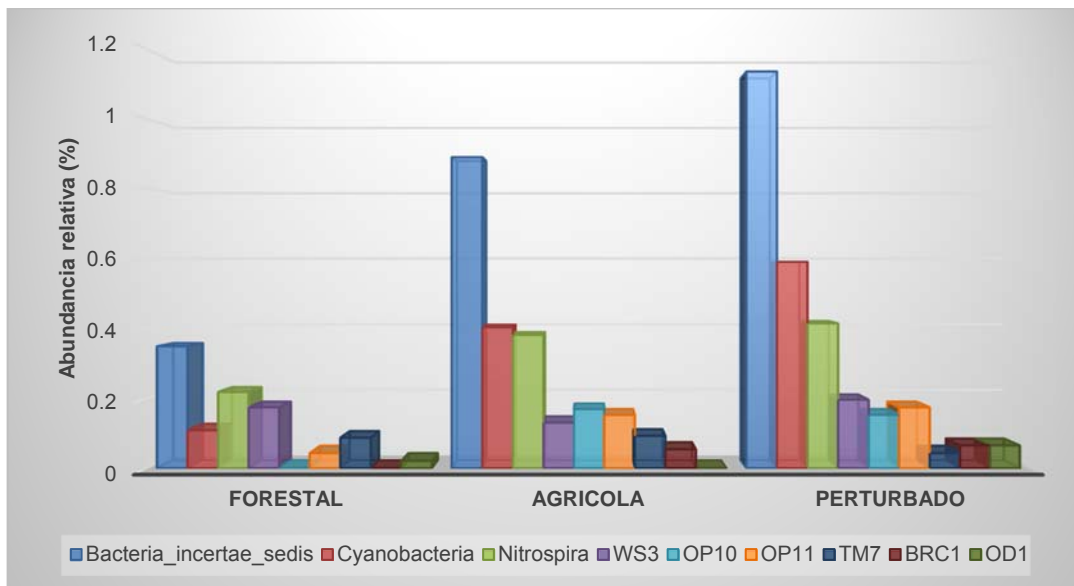


Figura 1.6 Abundancia relativa a nivel de phylum < 1.5% en los diferentes usos de suelo evaluados.

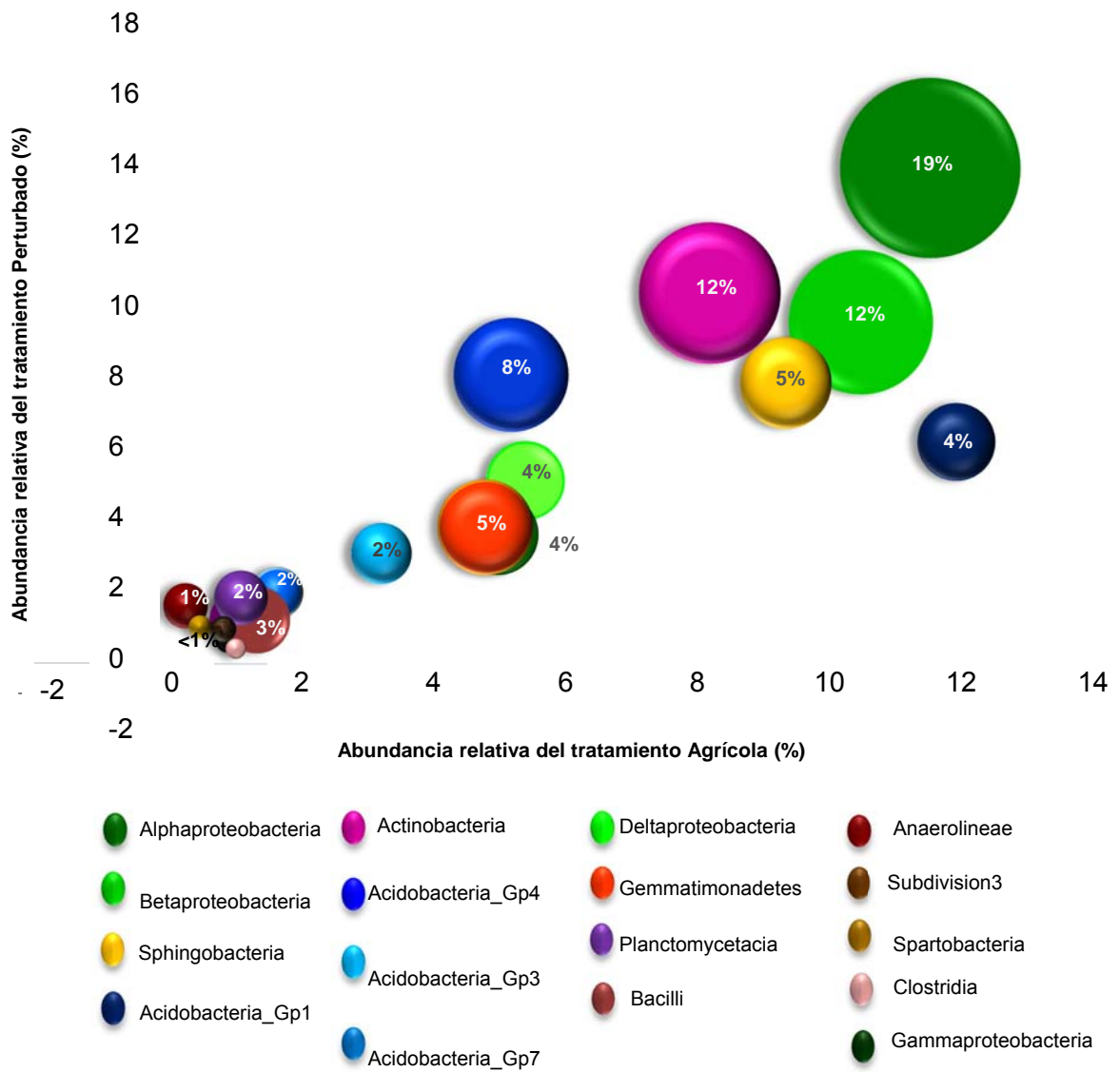


Figura 1.7 Representación de la abundancia relativa a nivel de Clase >1%. Las esferas representan la abundancia relativa del tratamiento forestal, en el eje de las abscisas se observa la abundancia relativa del tratamiento agrícola mientras que en el eje de las ordenadas la abundancia relativa del tratamiento perturbado.

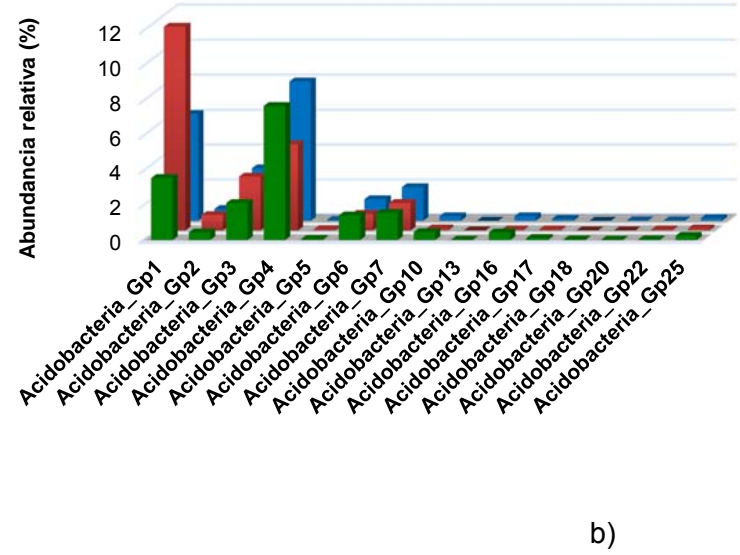
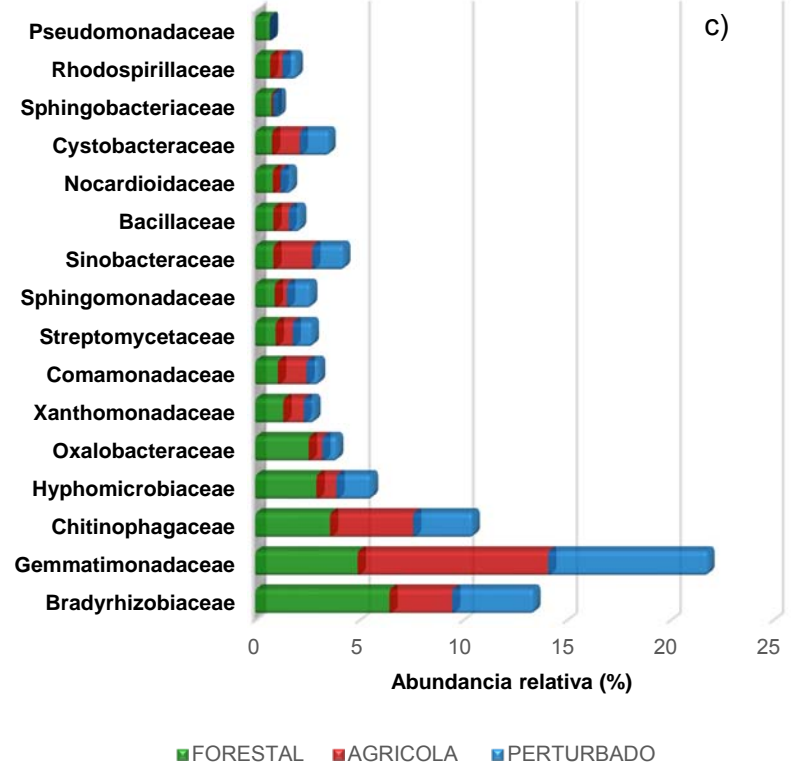
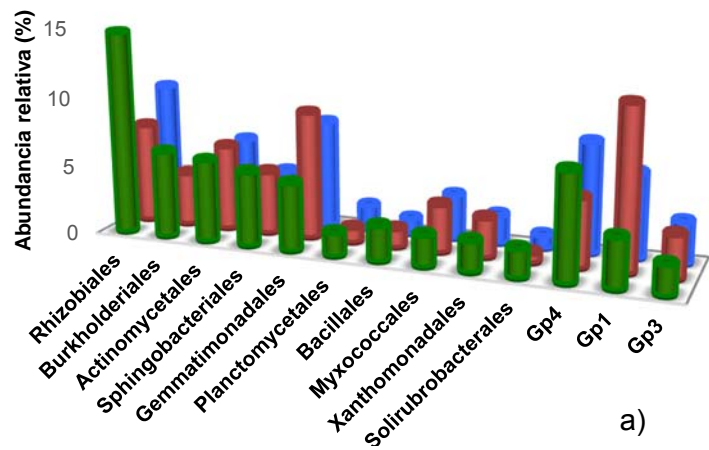


Figura 1.8 Abundancia relativa de los taxa mayor a 1% de los usos de suelo evaluados. a) Orden b) Grupos de Acidobacteria c) Familia.

1.8.5 Diversidad Alpha

El análisis de diversidad, muestra que existe la misma riqueza de especies en los tres tratamientos, aunque, el tratamiento agrícola fue el que tuvo menor diversidad (Tabla 1.7) (Fig. 1.9)

Tabla 1.7. Parámetros de diversidad alpha en los diferentes usos de suelo evaluados.

<i>Tratamiento</i>	ACE	Chao1	Shannon	Simpson	Diversidad filogenética	Especies observadas
<i>Forestal</i>	1461 ± 461	1296 ± 415	8.5 ± 0.62	0.99 ± 0.004	41 ± 11	677 ± 241
<i>Agrícola</i>	1238 ± 488	1121 ± 457	8.2 ± 0.63	0.99 ± 0.002	37 ± 13	579 ± 289
<i>Perturbado</i>	1667 ± 755	1469 ± 674	8.6 ± 0.70	0.99 ± 0.002	43 ± 17	743 ± 400

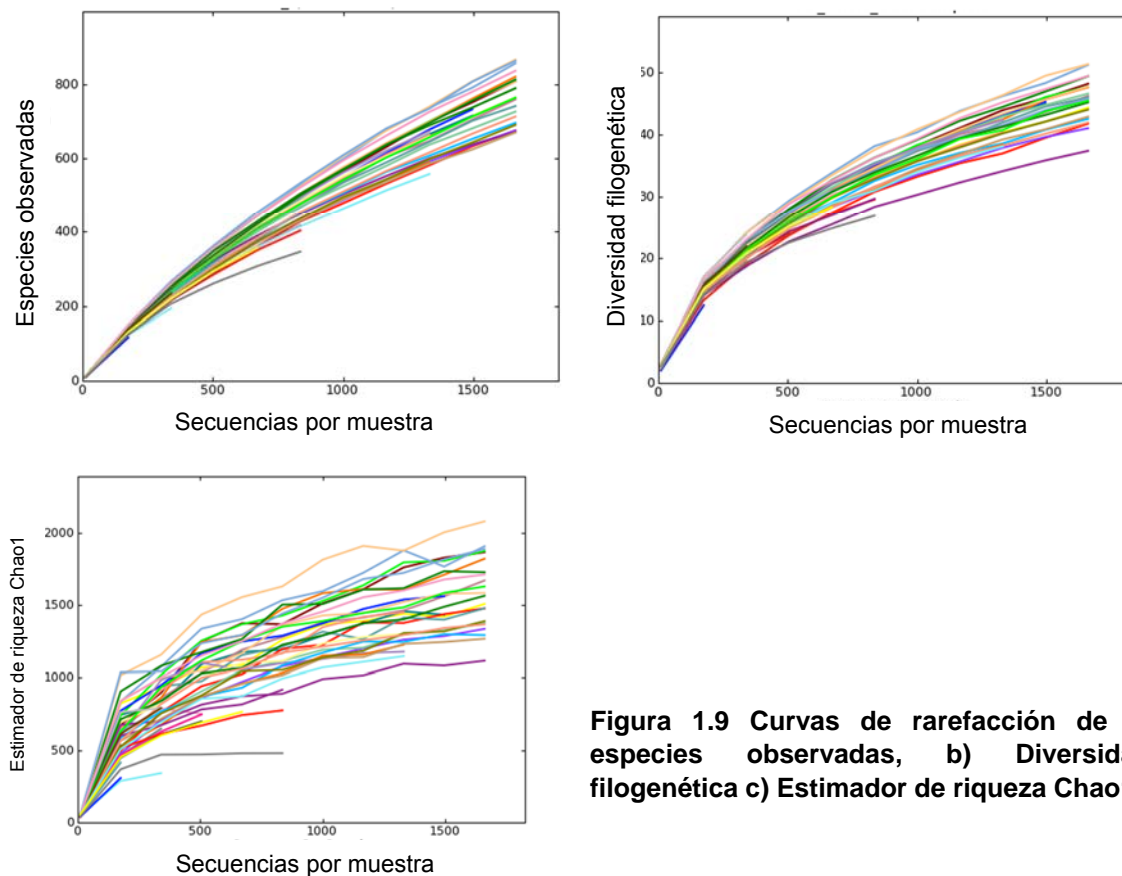


Figura 1.9 Curvas de rarefacción de a) especies observadas, b) Diversidad filogenética c) Estimador de riqueza Chao1

1.8.6 Diversidad Beta

El análisis de PCA mostró que cultivar con maíz cambia la estructura de la comunidad bacteriana comparado con el suelo forestal. Además, se observó que el suelo agrícola se caracterizó por un PC1 y PC2 positivo (cargado por los phyla Acidobacteria, Chloroflexi y la clase Deltaproteobacteria con la abundancia relativa más elevada). El suelo forestal se caracterizó por un PC1 negativo (la abundancia relativa más elevada del phylum Bacteroidetes, y de las clases Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria) y un PC2 positivo (abundancia relativa del phylum Firmicutes más elevada) o negativo (abundancia relativa más elevada del phylum Actinobacteria). Las muestras del suelo perturbado se localizaron entre el suelo agrícola y el forestal, con un PC1 negativo o positivo (Fig. 1.10).

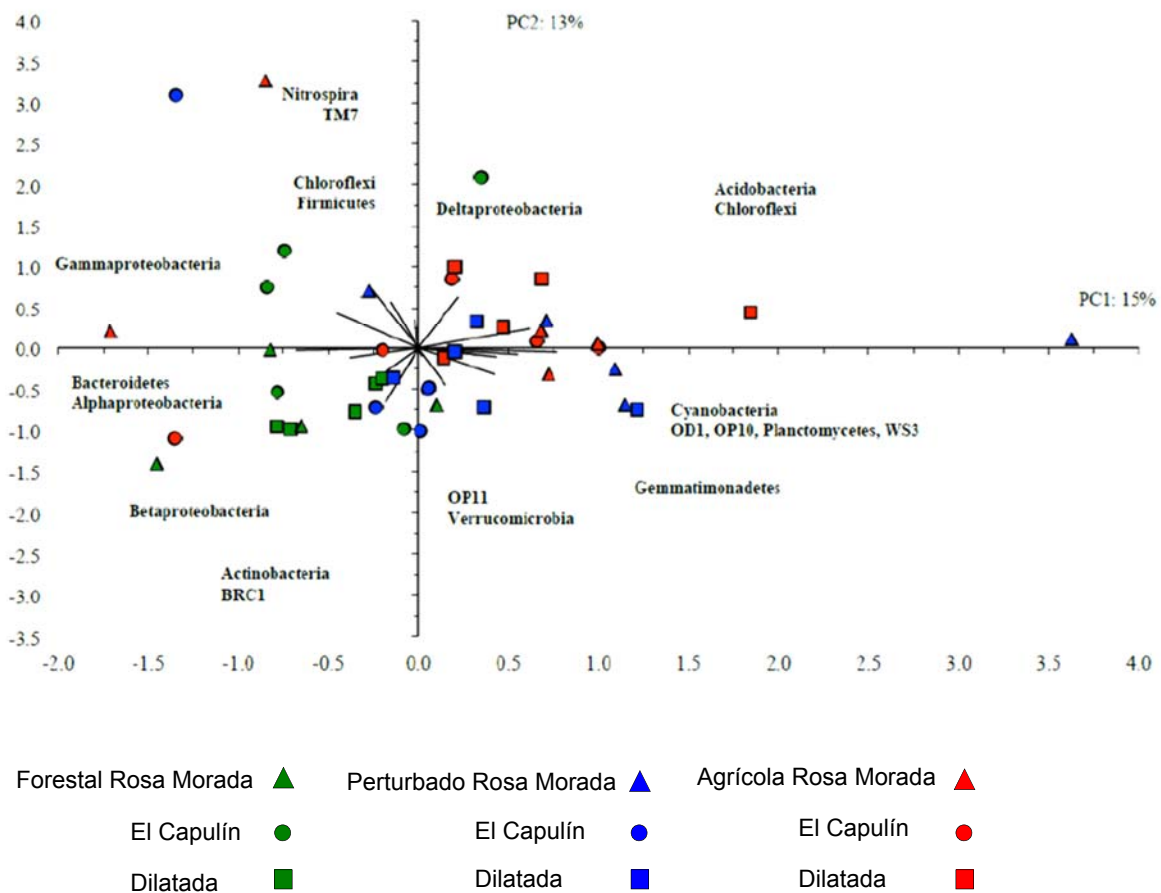


Figura 1.10 Análisis de componentes principales (PCA) con los datos de abundancia relativa de los diferentes phyla y clases de Proteobacteria de los diferentes tratamientos.

El PCoA basado en la distancia del Weighted UniFrac y Unweighted Unifrac reveló que deforestar el suelo y cultivarlo con maíz cambió la composición filogenética de la comunidad bacteriana comparado con los suelos forestales (Fig. 1.11). El suelo perturbado y agrícola se agruparon juntos y se separaron del suelo forestal. Las muestras no se separaron en el PCoA basado en las diferentes localidades, lo que indica que el efecto se debió al cambio del uso del suelo (Fig. 1.12).

1.8.7 Impacto de las características fisicoquímicas del suelo sobre las comunidades bacterianas

El análisis CCA de los diferentes tratamientos indicó que la clase Gammaproteobacteria y los phyla Gemmatimonadetes y Nitrospira (con una elevada abundancia relativa en el suelo cultivado con maíz) se favorecieron en suelos con una alta CEC y elevado contenido de arcilla. Acidobacteria, Bacteroidetes, Betaproteobacteria, BRC1 y OP11 por un alto contenido de P y K. La clase Alphaproteobacteria y los phyla Actinobacteria, Planctomycetes, OD1 y Verrucomicrobia (con abundancia relativa alta en el suelo forestal y perturbado) se favorecieron en suelos con pH alcalino, alto contenido de C orgánico, N total y Mg en el suelo forestal (Fig. 1.13).

1.8.8 Especies indicadoras

Se encontraron como especies indicadoras miembros del orden Rhizobiales y Solirubrobacterales, de la familia Hyphomicrobiaceae, Micromonosporaceae e Ilumatobacter y los géneros *Rhodoplanes*, *Mucilaginibacter*, *Humicoccus*, *Bradyrhizobium*, *Solirubrobacter*, *Agromonas* y *Nocardia*. En los suelos forestales, mientras que Acidobacteria Gp1 y Gammaproteobacteria así como *Nitrosospora* en los agrícolas; *Chelatococcus* y miembros de la Subdivision3 en los suelos perturbados (Tabla 6.2 Anexo).

El suelo forestal y agrícola compartieron como especies indicadoras miembros de la familia Comamonadaceae. El forestal y perturbado, *Pedomicrobium*, miembros de Acidobacteria Gp16, Acidimicrobiales, Spartobacteria y Actinobacteria. El suelo agrícola y perturbado compartieron a *Gemmatimonas* como especie indicadora (Tabla 6.3 Anexo).

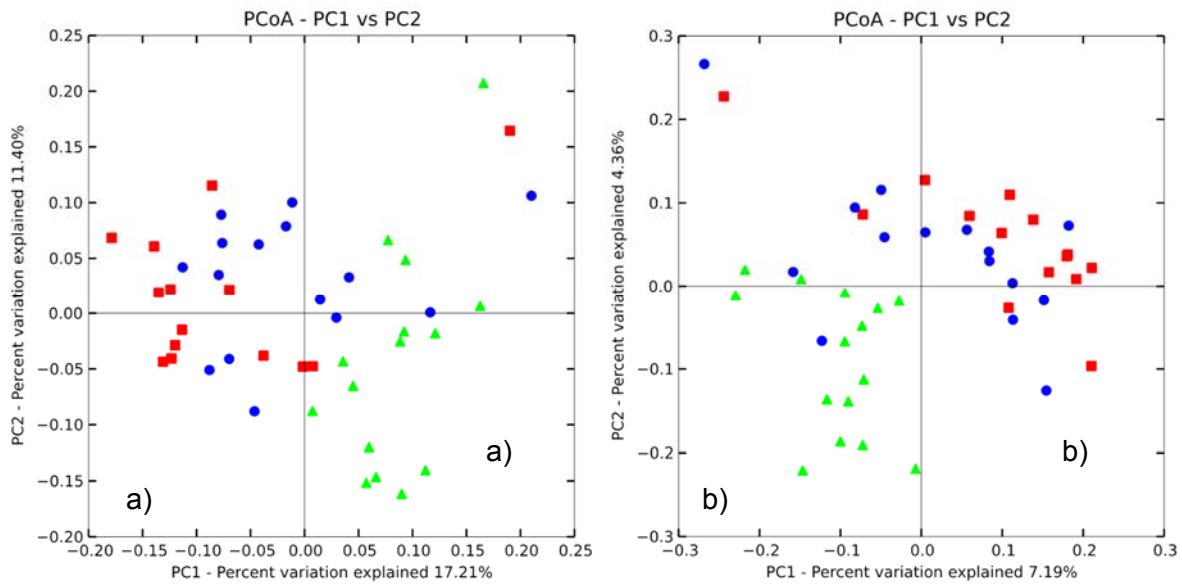


Figura 1.11 Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la distancia a) Weighted (abundancia) y b) Unweighted Unifrac (presencia/ausencia) de comunidades bacterianas sometidas a diferente uso del suelo de las diferentes localidades (Forestal ▲, Agrícola ■, Perturbado ●)

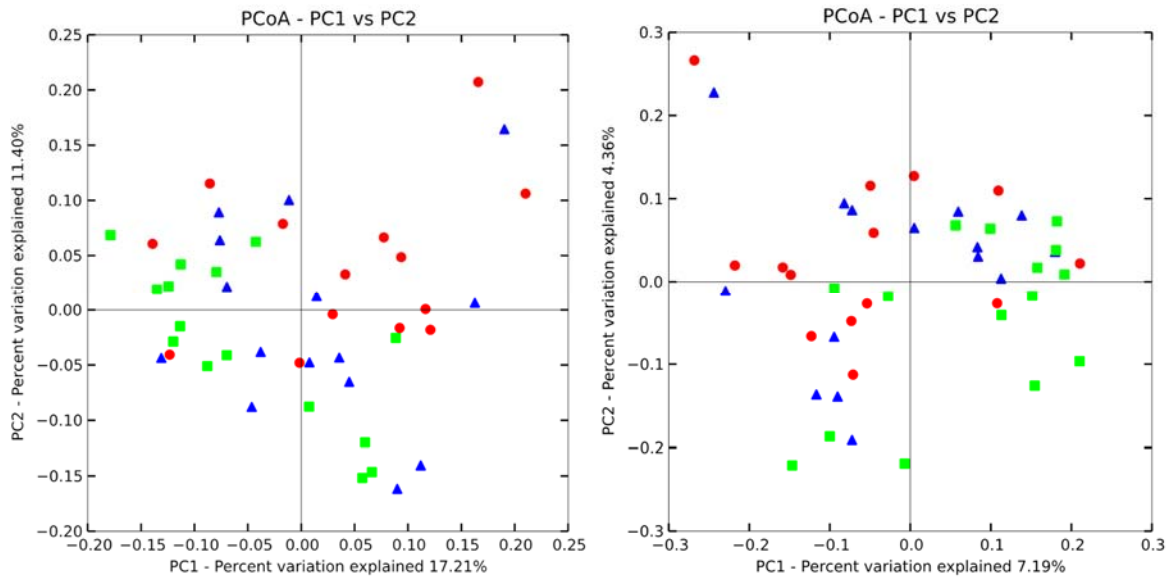


Figura 1.12 Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la distancia a) Weighted y b) Unweighted Unifrac en base en la localidad estudiada de los diferentes usos de suelo evaluados (Rosa Morada ▲, Dilatada ■, Capulín ●).

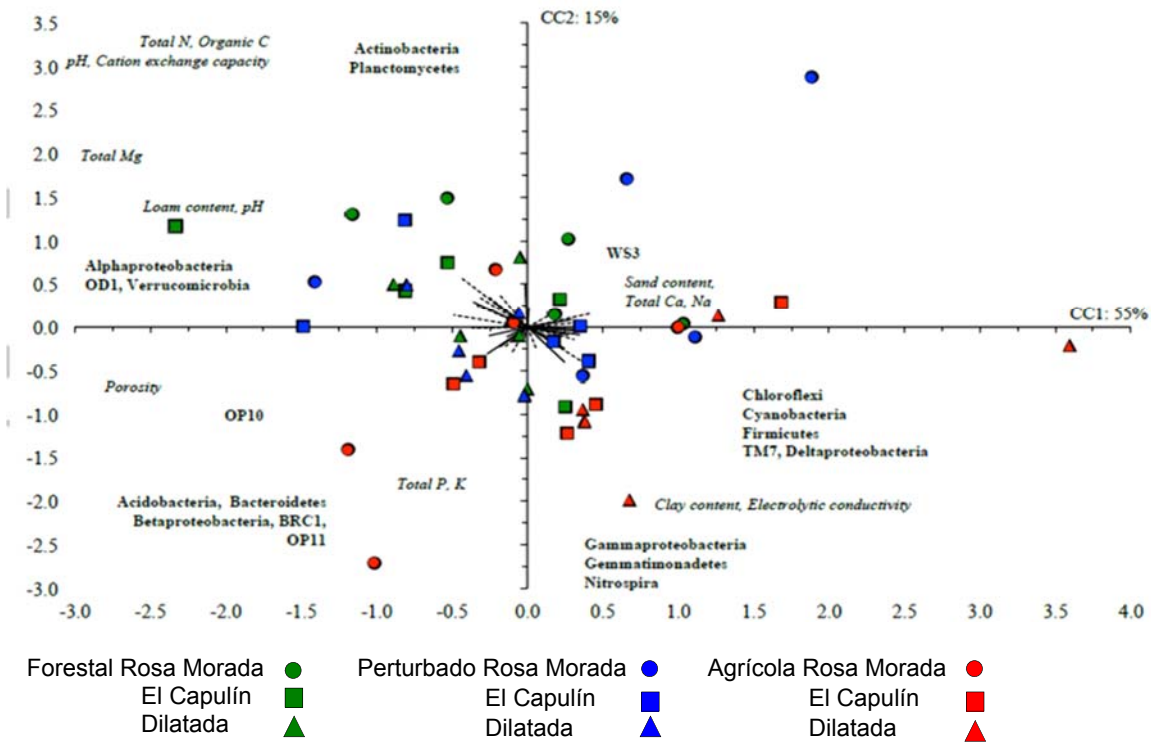
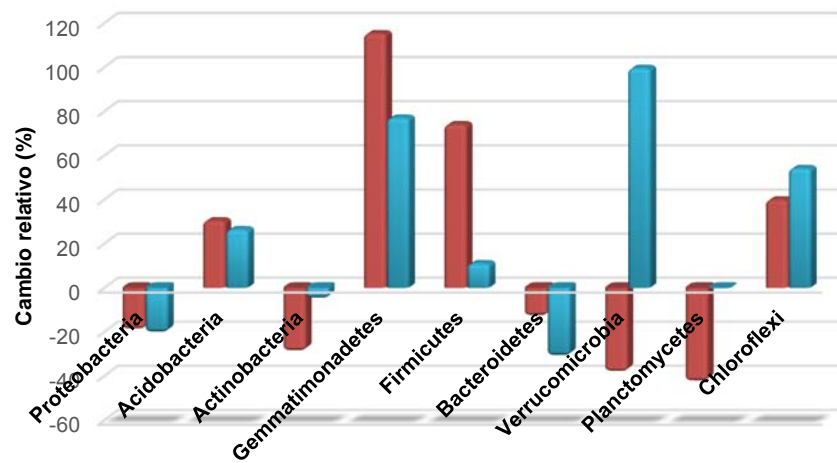


Figura 1.13 Análisis de correlación canónica (CCA) de los porcentajes de los diferentes phyla y clases de Proteobacteria de los diferentes tratamientos con las características fisicoquímicas de los suelos sometidos a diferente uso.

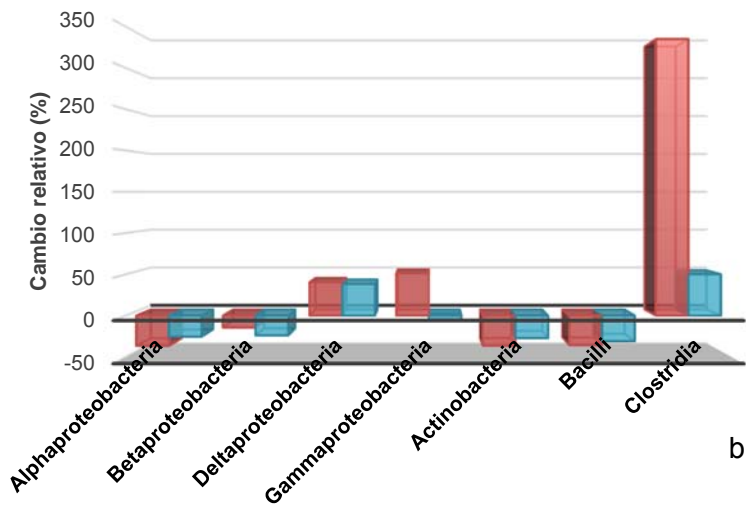
1.8.9 Resistencia

La abundancia relativa de los phyla Proteobacteria (principalmente clase Alphaproteobacteria y Betaproteobacteria), Actinobacteria y Bacteroidetes disminuyó en el suelo perturbado (21%, 5%, y 31%) y en el suelo agrícola (19%, 29% y 13%) comparados con el forestal. Los phyla Acidobacteria (Gp1, Gp2, Gp3, Gp7), Gemmatimonadetes, Firmicutes (clase Clostridia) y Chloroflexi fueron resistentes a la perturbación y su abundancia relativa se incrementó en el suelo perturbado y agrícola comparado con el suelo forestal. El phylum Verrucomicrobia aumentó en el suelo perturbado (Fig. 1.14).

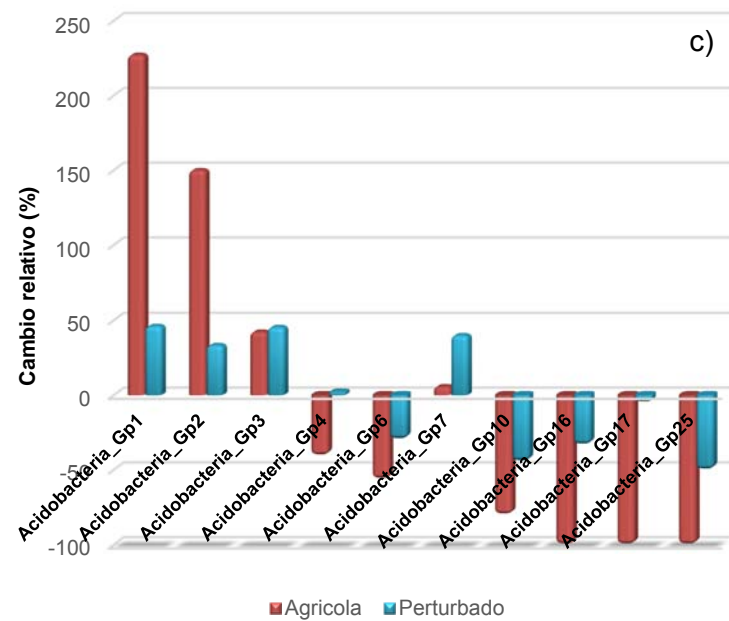
Las especies indicadoras del suelo forestal no fueron resistentes al cambio de uso de suelo (agrícola y perturbado). Las especies indicadoras de los tratamientos agrícola y perturbado si resistieron el cambio de uso de suelo (aumentó su abundancia relativa con respecto al suelo forestal). *Gemmatimonas* fue resistente al cambio de uso de suelo tanto agrícola como perturbado (Fig. 6.1 Anexo).



a)



b)



c)

Figura 1.14 Resistencia de grupos taxonómicos expresado como cambio relativo. a) Phylum, b) Clase y c) grupos de Acidobacteria.

1.9 Discusión

1.9.1 Efecto del cambio de uso de suelo sobre las características fisicoquímicas

Se sabe que la deforestación causa cambios en las características fisicoquímicas del suelo. La eliminación de la vegetación natural provoca que el contenido de materia orgánica disminuya en el suelo como se ha reportado con anterioridad (Camara-Ferreira et al., 2014; Kocyigit y Demirci, 2012; Kaschuk et al., 2011; Nogueira et al., 2006). La materia orgánica del suelo juega un papel importante en el funcionamiento de los ecosistemas y del crecimiento de las plantas (Campos et al., 2012; Powlson et al., 2011). En el presente trabajo, el C orgánico del suelo disminuyó 1.4 veces en el suelo agrícola comparado con el suelo forestal, esto puede deberse a la poca entrada de materia orgánica al suelo y a que no se repone la que es mineralizada. Una disminución similar se encontró en el suelo perturbado, por lo que una disminución en la materia orgánica del suelo (SOC) puede presentarse por la tala de árboles o por prácticas agrícolas, como se ha encontrado en estudios previos en los que el SOC disminuye cuando un suelo forestal es deforestado ya que la deforestación disminuye la entrada de carbono al suelo (Nourbakhsh, 2006). El C y N de la biomasa microbiana y la emisión de CO₂ disminuye frecuentemente en suelos cultivados comparado con suelos forestales (Camara-Ferreira et al., 2014), como lo reportado por Kocyigit y Demirci (2012) en una pradera y en un suelo agrícola comparado con suelo forestal del norte de Turquía. La biomasa microbiana disminuyó en tanto menos C de sustrato estuvo disponible y la emisión de CO₂ disminuyó en tanto menos materia orgánica es mineralizada como se ha reportado previamente (Balota et al., 2013).

El coeficiente metabólico qCO₂ fue el doble en el suelo cultivado con maíz comparado con el suelo forestal y de 56% en el suelo perturbado. Los disturbios con frecuencia causan un incremento en qCO₂ (Wardle y Ghani, 1995). Kaschuk et al. (2011) reportaron que el qCO₂ se incrementó en un 147% debido al reemplazamiento con el cultivo anual.

La deforestación afecta otras características del suelo, como el pH y la CEC. Moebius-Clune et al. (2011) encontraron una disminución del pH como en este estudio en una cultivo en el oeste de Kenia con 20 años de cultivo posterior a un suelo forestal. La caída en el pH puede relacionarse con un incremento en ácidos orgánicos solubles,

reacciones formadoras de ácidos (oxidación de fertilizantes basados en NH_4 (urea) o hidrólisis de fertilizantes de fosfato monocálcico, la mineralización de C o la capacidad de intercambio catiónico (Guo et al., 2010; Thomas y Hargrove, 1984). La CEC del suelo agrícola fue 14% más bajo que en el suelo forestal. Los sitios de intercambio catiónico se pierden cuando la materia orgánica disminuye (Moebius-Clune et al., 2011). La aplicación de fertilizantes y otras prácticas agrícolas incrementaron el contenido de la conductividad eléctrica en el suelo agrícola más de tres veces (0.16 dS m^{-1} a 0.52 dS m^{-1}).

1.9.2 Taxa más abundantes

Proteobacteria, Acidobacteria y Actinobacteria fueron los phyla más abundantes en los suelos (todos los tratamientos) como se ha reportado con anterioridad en otros estudios (Baldrian et al., 2012; Russo et al., 2012; Lin et al., 2010; Will et al., 2010). El phylum más abundante fue Proteobacteria, el cual ya se ha reportado como predominante en suelos agrícolas, humedales, en el permafrost de bosque y suelos de turba (Ansola et al., 2014; Dan et al., 2014; Steven et al., 2014; Sun et al., 2014; Roesch et al., 2007). El segundo phylum más abundante fue Acidobacteria reportado en suelos forestales con pH ácido (Baldrian et al., 2012, Faoro et al., 2010; Jones et al., 2009) en una gran variedad de ambientes como suelos, sedimentos, aguas termales, turberas, lagos ácidos de minas, cuevas y asociados al plancton (Naether et al., 2012). El tercero más abundante, Actinobacteria reportado en suelos agrícolas (Chaundry et al., 2012). Las clases más abundantes fueron Alphaproteobacteria y Betaproteobacteria como se ha encontrado en suelos forestales de Taiwan (Lin et al., 2010), suelos agrícolas (Roesch et al., 2007) y en suelos de pradera (Chaundry et al., 2012). Los ordenes más abundantes como Rhizobiales se ha encontrado en suelos forestales (Montaña et al., 2012), Gemmatimonadales que ha sido reportado como significativamente abundante en suelos agrícolas (Chaundry et al., 2012) y Acidobacteria Gp4 y Gp1 siendo de los subgrupos de este phylum mas abundantes en suelos (Naether et al., 2012). Finalmente, los géneros más abundantes *Gemmatimonas* reportado en suelos agrícolas de la Antártida (Shivaji et al., 2004), seguido de *Bradyrhizobium* bacteria simbiótica fijadora de nitrógeno asociada a leguminosas y que se ha encontrado abundante en estudios de metagenoma de suelos de pradera (Delmont et al., 2012) y *Steroidobacter* reportado en la rizósfera de pepino (Tian y Gao, et al., 2014).

1.9.3 Estructura de la comunidad bacteriana por uso de suelo

Se ha sugerido que la estructura de la comunidad bacteriana es específica del uso de suelo y que la materia orgánica afecta la actividad y la estructura de la comunidad microbiana (Wallenius et al., 2011). La deforestación y el cultivo del suelo cambian las características fisicoquímicas y alteran la estructura de la comunidad bacteriana como se ha reportado en estudios previos (Shange et al., 2012; Nacke et al., 2011). En este trabajo el elevado contenido de materia orgánica y pH en el suelo forestal favorecieron a los phyla Actinobacteria, Bacteroidetes y Proteobacteria. Mientras que el bajo contenido de materia orgánica y el pH ácido en el suelo agrícola favoreció los phyla Acidobacteria, Chloroflexi y Gemmatimonadetes. En el suelo perturbado se detectó un cambio en la comunidad bacteriana situándolo entre las poblaciones del suelo agrícola y del forestal. Los grupos bacterianos que se favorecieron en el suelo forestal se conocen por preferir en su mayoría ambientes ricos en materia orgánica.

La abundancia relativa del phylum Proteobacteria, ej. *Bradyrhizobium* (orden Rhizobiales, clase Alphaproteobacteria), disminuyó en el suelo agrícola comparado con el suelo forestal, resultados similares se encontraron en suelos forestales de Los Tuxtlas (México) cuando se deforestaron y se cambió el uso del suelo (agrícola y de pastoreo) (Ormeño-Orrillo et al., 2012). La abundancia relativa del orden Solirubrobacterales fue tres veces mayor en el suelo forestal que en el suelo agrícola, resultados opuestos se encontraron en los suelos de Alabama, EE.UU, en el que la abundancia relativa de este orden fue significativamente mayor en suelos cultivados con respecto a suelos forestales (Shange et al. 2012), miembros de este orden se han aislado de campos de ginseng y suelos agrícolas (An et al., 2011).

La disminución en la materia orgánica y pH, como se encontró en el suelo agrícola, se sabe que favorece al phylum Acidobacteria (Fierer et al., 2007). Estudios previos han reportado que cambios en la abundancia del phylum Acidobacteria debido a variaciones de pH dependen de las respuestas de los subgrupos de Acidobacteria (Yin et al, 2010). En este trabajo, filotipos pertenecientes a Gp1 se favorecieron con la disminución en el pH ya que su abundancia relativa fue 3 veces más alta en el suelo agrícola que en el suelo forestal (11.7 ± 1.7 vs $3.6\% \pm 6.1$) consistente con lo reportado por Liu et al. (2014): la abundancia relativa de Gp1 y Gp3 se incrementa con la disminución de pH mientras que la abundancia de Gp4, Gp5, Gp6 y Gp7 disminuye. En

estudios previos, Acidobacteria Gp1, Gp2, Gp3, Gp4 y Gp6 se reportaron como muy abundantes en el suelo, como en este trabajo. Además, se correlacionan negativamente con el pH los subgrupos Gp1, Gp2, Gp3, Gp12, Gp13 y Gp15 mientras que los subgrupos Gp4, Gp6, Gp7, Gp10, Gp11, Gp16, Gp17, Gp18, Gp22 y Gp25 se correlacionan positivamente (Jones et al., 2009). Adicionalmente Gp1, Gp3, Gp4 y Gp6 fueron los mas abundantes en los suelos agrícolas consistente con lo reportado por Kielak et al. (2009).

El phylum Gemmatimonadetes es un grupo clave en la descomposición de lignocelulosa que es abundante en suelos forestales (D'haeseleer et al., 2013) en este estudio. Sin embargo, la abundancia relativa fue más alta en el suelo agrícola ($9.2\% \pm 3.2\%$) que en el forestal ($4.9\% \pm 2.4\%$) por lo que un factor diferente de la materia orgánica debió favorecerlo. Por ejemplo, DeBruyn et al. (2011) sugirieron que miembros del phylum Gemmatimonadetes se adaptan mejor a los suelos secos debido a que su abundancia relativa está correlacionada inversamente con la humedad del suelo. Quizá la pérdida de materia orgánica en el suelo agrícola y perturbado disminuye la retención de agua en el suelo y por tanto hay una pérdida de humedad que favoreció a este grupo taxonómico.

En general, la distribución taxonómica por uso de suelo encontrada es similar a la reportada por Shange et al. (2012) en suelos de Alabama, USA (forestal, agrícola y de pastoreo). Algunas similitudes son: los grupos bacterianos más abundantes Proteobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria (con diferencia significativa entre los suelos agrícolas y forestales), el phylum Gemmatimonadetes mas abundante en el suelo cultivado; las clases, Alphaproteobacteria, Acidobacteria y Actinobacteria fueron las más abundantes en todos los tratamientos. Por tratamiento, la abundancia relativa de la clase Alphaproteobacteria fue significativamente mayor en el suelo forestal comparado con el agrícola. Mientras se detectó un incremento en la clase Acidobacteria y una disminución en Betaproteobacteria en el suelo forestal con respecto al de pastoreo. Contrario a lo reportado en este estudio, el phylum Chloroflexi se vio favorecido en el suelo forestal, la clase Acidobacteria con mayor abundancia relativa en el suelo forestal y el orden Solirubrobacterales con mayor abundancia relativa en el suelo agrícola.

De manera similar Nacke et al. (2011) reportaron a los phyla Proteobacteria, Acidobacteria y Actinobacteria como más abundantes en muestras de suelo forestales y de pastoreo. Encontraron abundancia relativa significativamente más altas en suelos de pastoreo comparados con suelos forestales de los phyla Actinobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia, Cyanobacteria y Gemmatimonadetes. También reportaron que Acidobacteria Gp16, Gp6, Gp4, Gp3 y Gp7 fueron los más abundantes en suelos de pastoreo y Acidobacteria Gp3, Gp16, Gp6, Gp1 y Gp4 en los suelos forestales. A diferencia de este trabajo, reportaron los phyla Gemmatimonadetes, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Chloroflexi y Planctomycetes con una abundancia relativa menor al 1%.

1.9.4 Especies indicadoras por uso de suelo

Las especies indicadoras encontradas en el suelo forestal se han reportado capaces de degradar pectina, xilano y laminarina con frecuencia en suelos ricos en materia orgánica, en suelos con pH ácido, en humedales y compostas, entre otros, (Chen et al., 2014; Park et al., 2014; Srinivas et al., 2014, Khan et al., 2013; Chakravarthy et al., 2012; Takaichi et al., 2012) (Tabla 6.4 Anexo), por que se le puede explicar su presencia en este tipo de suelos.

En el suelo agrícola se encontraron especies indicadoras capaces de realizar funciones como oxidación del amonio, desnitrificación o tener un metabolismo oligotrófico (Urakawa et al., 2014; Naether et al., 2012). Probablemente su metabolismo les permite ocupar nichos con bajo contenido de carbono. En el suelo perturbado el género *Chelatococcus* se encontró como especie indicadora, el cual ha sido aislado de aguas termales y de suelo (Yang et al., 2013) (Tabla 6.4 Anexo).

Las especies indicadoras capaces de habitar dos ambientes diferentes (forestal-perturbado; forestal-agrícola o agrícola perturbado) han sido reportadas como fotosintéticas, heterótrofas, quimiolitotróficas, capaces de oxidar o reducir fierro, aisladas de suelos, ambientes acuáticos, biopelículas, etc. (Itoh et al., 2011; Jones et al., 2009; Cox y Sly, 1997) (Tabla 6.4 Anexo). Probablemente esta flexibilidad metabólica es lo que les permite habitar en ecosistemas con características tan diferentes, ej. suelo forestal-deforestado.

1.9.3 Resistencia de las comunidades bacterianas al cambio de uso de suelo

Los phyla Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes fueron menos resistentes a la deforestación y al cultivo con maíz. La pérdida en la materia orgánica y las prácticas agrícolas como la labranza reducen su abundancia relativa, como se ha reportado previamente (Navarro-Noya et al., 2013). Estos resultados son consistentes con lo reportado por Chen et al. (2012) donde encontraron que la abundancia relativa del phylum Proteobacteria es menor en un suelo cultivado comparado con uno forestal.

Los phyla Acidobacteria, Gemmatimonadetes, Chloroflexi y Firmicutes se favorecieron por la deforestación y el cultivo con maíz. Navarro-Noya et al. (2013) encontraron que la abundancia relativa de los phyla Gemmatimonadetes y Chloroflexi fue baja cuando los residuos del cultivo postcosecha fueron retenidos a diferencia de cuando fueron removidos. Por otra parte, Chen et al. (2012) reportaron un incremento en la abundancia relativa del phylum Acidobacteria en suelos agrícolas comparados con forestales. Además, De Bruyn et al. (2011) sugieren una adaptación de Gemmatimonadetes a suelos más secos y a una baja humedad, encontrando que su abundancia se correlaciona inversamente con la humedad. Probablemente, este tipo de microorganismos se ven favorecidos en ambientes pobres en materia orgánica, ya que tanto la labranza como el contenido de materia orgánica se sabe tiene un efecto fuerte sobre la población microbiana del suelo (Griffiths y Philippot, 2012).

Las especies indicadoras del suelo forestal no resistieron el cambio de uso de suelo, probablemente debido a la pérdida de materia orgánica. En cambio, aquellos que si resistieron son microorganismos oligotróficos, por lo que son capaces de sobrevivir en un ambiente pobre en nutrientes y materia orgánica.

En este trabajo encontramos que los taxa con mayor abundancia relativa en los suelos nativos no necesariamente son capaces de resistir el cambio de uso de suelo. Aquellas especies que prefieren ambientes ricos en materia orgánica son negativamente afectadas pero aquellas que prefieren ambientes pobres son beneficiadas. Por otra parte, están las especies que son capaces de sobrevivir en ambas condiciones, ¿es la flexibilidad metabólica de los microorganismos lo que les permite sobrevivir? ¿cuál es la causa de que ciertos grupos microbianos se vean afectados mientras que otros son ven estimulados? ¿realmente son las propiedades del suelo las que causan un cambio en la estructura de las comunidades microbianas? o ¿son las interacciones las que se

modifican y por ende algunos grupos microbianos aumentan o disminuyen? ¿O simplemente, ¿se trata de que cuando disminuye la abundancia de un grupo taxonómico por condiciones adversas permite que otro pueda reproducirse? ¿Son las interacciones entre los microorganismos las que determinan que la abundancia de algún grupo aumente mientras que la de otro disminuya? es decir, ¿será acaso que si un taxón se ve afectado por el cambio de las condiciones ambientales, disminuya su efecto negativo o positivo sobre otra población?. Muchas interacciones suceden en el suelo, tanto positivas como negativas, fenómenos de competencia, producción de compuestos antimicrobianos, sin olvidar que también existen las interacciones con otros microorganismos del suelo no bacterianos.

En general, se encontró que 1) el cambio de uso de suelo, principalmente aquellas que están relacionadas con las prácticas agrícolas, tiene un efecto sobre las propiedades fisicoquímicas y, en consecuencia sobre la estructura de las comunidades microbianas del suelo; 2) que el contenido de materia orgánica y el pH son las propiedades del suelo que más influyen sobre la abundancia de los microorganismos; y 3) que los taxa reportados como más abundantes fueron Proteobacteria, Acidobacteria y Actinobacteria.

1.10 Conclusiones

- Cultivar con maíz y la deforestación tienen un efecto sobre las características fisicoquímicas del suelo y sobre la estructura de la comunidad bacteriana.
- Los phyla Actinobacteria, Bacteroidetes y Proteobacteria fueron menos resistentes a la deforestación
- Los phyla Acidobacteria (principalmente Gp1), Chloroflexi y Gemmatimonadetes fueron los más resistentes a la deforestación y cultivo del suelo.
- Los grupos taxonómicos con mayor abundancia relativa en el suelo forestal no resistieron la deforestación y el cultivo con maíz.
- Las especies indicadoras del suelo forestal no resistieron el cambio de uso de suelo, probablemente por la pérdida de materia orgánica.

CAPITULO II.

Fijación biológica de nitrógeno en suelos sometidos a diferentes prácticas agrícolas de distinto origen geográfico

2.1 Antecedentes

La FAO estima que 830 millones de personas en el mundo padecen hambre y de éstas el 80% dependen de la agricultura para sobrevivir. Además, estima que para el 2050 la población mundial se incrementará en un 50%, lo que conllevará a un aumento en el consumo de productos animales y vegetales y en consecuencia un incremento de la producción agrícola (Clay, 2004).

Las prácticas de agricultura tradicionales, como la agricultura convencional, involucran una serie de operaciones de labranza que rompen el suelo en fragmentos pequeños, incrementa la erosión y el riesgo de degradación de la estructura, resultando en una pérdida marcada de la humedad. Por ello, existe la necesidad de desarrollar tecnologías y esquemas de manejo que puedan incrementar la producción, preservar la naturaleza, reducir los costos y disminuir la pobreza. Una de estas tecnologías es la agricultura de conservación (Govaerts et al., 2009). En contraste con la agricultura convencional, la agricultura de conservación reduce la erosión del suelo, aumenta su fertilidad, permite la acumulación de materia orgánica, reduce la compactación, mejora las relaciones hídricas, incrementa la biodiversidad y productividad (Aulakh et al., 2012).

2.1.1 Agricultura convencional

La operación más importante en la agricultura convencional es la labranza del suelo (arado). Este procedimiento se le asocia con un incremento en la fertilidad debido a la mineralización de los nutrientes a consecuencia del arado. Sin embargo, este proceso solo ocurre durante un número limitado de años. Una vez que el efecto fertilizante de la materia orgánica es reemplazado por el uso de fertilizantes minerales, se debe recurrir a una labranza más intensiva lo que resulta a largo plazo en una reducción de la materia orgánica, destrucción de la estructura del suelo, reducción de la humedad y disponibilidad de nutrientes, abuso de la utilización de fertilizantes y pesticidas y se reduce la tasa de infiltración de agua. Además, la labranza del suelo y la quema de residuos son considerados necesarios por motivos fitosanitarios para el control de plagas, enfermedades y malezas (FAO, 2002). La quema de residuos causa una pérdida de la materia orgánica y nutrientes, y contaminación atmosférica debido a las emisiones de gases de efecto invernadero como son monóxido de carbono (CO), CO₂, óxido nitroso (N₂O) y metano (CH₄) (Aulakh et al., 2012). El número, la cantidad de

microorganismos y su distribución en el perfil del suelo son modificados por las prácticas de labranza. La diversidad microbiana presente o la composición puede ser cambiada por la labranza cero comparada con la labranza convencional (Nicolardot et al., 2007).

2.1.2 Agricultura de conservación

La agricultura de conservación tiene como objetivo conservar, mejorar y hacer un uso más eficiente de los recursos naturales a través del manejo integrado del suelo, agua, recursos agrícolas y biológicos disponibles, con el fin de lograr una agricultura sostenible y rentable. Bajo formas específicas y continuadas de cultivo, la regeneración del suelo es más rápida que su degradación, la intensificación de la producción agrícola es económica, ecológica y socialmente sostenible. Esto lo logra mediante la aplicación de tres principios básicos: *perturbación mínima del suelo cobertura permanente con materia orgánica y rotación de cultivo* (<http://www.fao.org>). Estos principios se han desarrollado para reducir los efectos negativos sobre el medio ambiente, producto de las técnicas tradicionales de agricultura (Monneveux et al., 2006).

2.1.2.1 Principios básicos de la agricultura de conservación

Perturbación mínima del suelo (labranza cero o siembra directa): evitar la preparación mecánica de la cama de siembra o alteración del suelo desde la cosecha del cultivo anterior. Incluye los sistemas de camas permanentes con únicamente la reformación superficial de los surcos entre las camas tanto como sea necesario antes de la siembra del siguiente cultivo (Govaerts et al., 2009). El término de siembra directa en el contexto de la agricultura de conservación, es usado como sinónimo de agricultura de no-labranza o labranza cero, ésta implica sembrar directamente a través de la capa de cobertura con una sembradora directa (<http://www.fao.org>).

Cobertura permanente del suelo (mantillo): se cortan y dejan los residuos del cultivo (al menos el 30%) en la superficie del suelo después de la cosecha, lo que produce un mantillo de cobertura vegetal que protege al suelo del impacto físico de la lluvia y el viento. En consecuencia se reduce la erosión, se retiene la humedad, hay una mejor infiltración y temperatura en sus capas superficiales (Uri, 1999). Esta zona se convierte en el hábitat de organismos que descomponen el mantillo, lo incorporan y mezclan,

incrementando la formación de humus y de nutrientes liberados al suelo. La cobertura contribuye a la estabilización física de la estructura del suelo, mejora las condiciones para el desarrollo de las raíces y el crecimiento de las plántulas, garantiza la reducción de la temperatura y conserva la humedad (<http://www.fao.org>).

Rotación de cultivos: cultivos diferentes con patrones de enraizamiento distintos combinado con labranza cero, promueve la formación de una extensa red de canales para las raíces y macroporos en el suelo. Esto ayuda a que el agua se infiltre a zonas más profundas. La rotación disminuye el riesgo de pestes y enfermedades por organismos patógenos (Hobbs et al., 2008).

2.1.2.2 Beneficios de la agricultura de conservación.

Desde el punto de vista *económico* mejora la eficiencia de la producción por medio del ahorro de tiempo (reducción en el requerimiento de mano de obra y los costos). *Agronómico* mejora la productividad del suelo por el incremento de la materia orgánica, conservación del agua en el suelo, mejoramiento de la estructura, eficiencia en el uso de fertilizantes. *Medio ambientales y sociales* para la protección del suelo y lograr una agricultura sostenible, reducción de la erosión del suelo, disminución de la contaminación del aire y agua e incremento de la biodiversidad (Reicosky y Saxton, 2007; <http://www.fao.org>).

2.1.2.3 Desventajas de la agricultura de conservación

Son principalmente a corto plazo, costos elevados del equipo especializado de siembra, adquisición de habilidades más sofisticadas de manejo y aprendizaje que requiere el agricultor; dependencia parcial en el uso de herbicidas durante las etapas iniciales (sobre todo en la transición de agricultura convencional a de conservación). Sin embargo, su uso tiende a reducirse con el tiempo debido a que la cobertura del suelo previene las malezas (<http://www.fao.org>).

2.1.3 Centro Internacional de mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT)

Debido a que la agricultura de conservación ha ganado gran impulso, existen organizaciones a nivel mundial encargadas de realizar investigación sobre los cultivos de cobertura, las herramientas, equipos y herramientas utilizadas en este tipo de

agricultura, tal es el caso del Centro Internacional de Mejoramiento de Trigo y Maíz (CIMMYT).

El CIMMYT es un organismo internacional, sin fines de lucro, dedicado a la investigación científica y capacitación relacionada con el cultivo de maíz y trigo. Trabaja con cerca de 100 países en desarrollo a través de oficinas en Asia, África y América Latina. Participa con 20 países africanos con el objetivo de obtener maíces tolerantes a la sequía y ayudar en el mejoramiento de instalaciones para el almacenamiento de los granos y de esta forma disminuir las pérdidas postcosecha. Por otra parte colabora con Australia para el mejoramiento del trigo destinado a agricultores africanos y de otros países a través del Centro Australiano para la Investigación Agrícola Internacional (ACIAR) y la Corporación Australiana de Investigación y Desarrollo de Cereales (GRDC). En México cuenta con cinco campos experimentales: “El Batán”, “Agua fría”, “Tlaltizapán”, “Toluca” y “Campo experimental Norman E. Borlaug (CENEB)”. Además con el Centro de Recursos Genéticos (en el que se conserva la más diversa colección de maíz y trigo del mundo) y el Laboratorio de informática aplicada a cultivos

La misión del CIMMYT es acrecentar de forma sustentable la productividad de los sistemas de cultivo de maíz y trigo con el fin de garantizar la seguridad alimentaria global y reducir la pobreza. Para ello realiza tres tareas fundamentales: mejoramiento genético de maíz y trigo; investigación y creación de prácticas agronómicas eficientes; capacitación y desarrollo de recursos humanos, a través de diversos programas como son: programa global del maíz, programa global del trigo y programa de agricultura de conservación (<http://www.cimmyt.org/es/>).

2.1.4 Importancia del nitrógeno en el suelo

El nitrógeno (N) es un macronutriente limitante en la producción agrícola mundial aplicado en grandes cantidades como fertilizante (Reed et al., 2011). La eficiencia en el uso de este nutriente por las plantas depende de las características fisicoquímicas del suelo (pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, tipo de partículas minerales); factores climáticos (temperatura, precipitaciones, evaporación); prácticas agronómicas (labranza, manejo de residuos, rotación de cultivo, aplicaciones de fertilizantes y manejo de plagas) y tipo de cultivo.

El N en el suelo está sujeto a la volatilización, inmovilización, desnitrificación y lixiviación. El amonio (NH_4^+) y el amoniaco producto de fuentes nitrogenadas como la urea, se pierden por volatilización cuando dejan la superficie del suelo. La inmovilización de nitrógeno se da en relaciones C:N altas, lo que incrementa la incorporación de N en la biomasa microbiana. La labranza influye en las pérdidas por inmovilización, por la influencia que tiene sobre el contacto entre el suelo y los residuos y la velocidad de descomposición de estos (Malhi et al., 2001).

El N en el suelo sufre una serie de transformaciones químicas que requieren de una comunidad bacteriana diversa que posea los genes funcionales responsables de las transformaciones de este elemento, por ejemplo: *nifH* (fijación de N_2), *amoA* (oxidación del amonio), *nirS* y *nirK* (reducción del nitrato) y *nosZ* (reducción del óxido nitroso) (Wallenstein y Vitgalys, 2005). Este macronutriente se ha evaluado en las diversas etapas del ciclo, como son la nitrificación (Okano et al., 2004), fijación de nitrógeno (Bürgmann et al., 2003) y desnitrificación (Henderson et al., 2010; Dandie et al., 2007) por ser clave en la productividad de un agroecosistema.

2.1.5 Fijación biológica de nitrógeno

La fijación de nitrógeno es un proceso en el que el N_2 es reducido a NH_4^+ , la forma de nitrógeno usado por los organismos para la síntesis de biomoléculas como las proteínas y ácidos nucleicos. El proceso industrial Haber-Bosch realiza esta transformación, con un catalizador metálico (Fe), presiones elevadas (5.06×10^7 Pa) y altas temperaturas (600-800 K). Sin embargo, la fijación biológica del nitrógeno se realiza a temperatura ambiente y presión atmosférica (Reed et al., 2011; Cheng, 2008). En la naturaleza este proceso es llevado a cabo exclusivamente por microorganismos del dominio Archaea y Bacteria llamados diazótrofos por medio de un complejo enzimático denominado nitrogenasa (Reed et al., 2011; Cheng, 2008). Los microorganismos diazótrofos pueden ser autótrofos, heterótrofos, quimiolitótrofos, foroheterótrofos y metanogénicos. Se pueden encontrar asociados a plantas, tal es el caso la simbiosis rizobia-leguminosas, *Frankia*-plantas actinorrícicas, *Anabaena-Azolla* o de vida libre como *Azotobacter*, *Clostridium*, *Azospirillum*, ya sea en un ecosistema natural o en un agroecosistema (Fig 2.1) (Reed et al., 2011; Herridge et al., 2008).

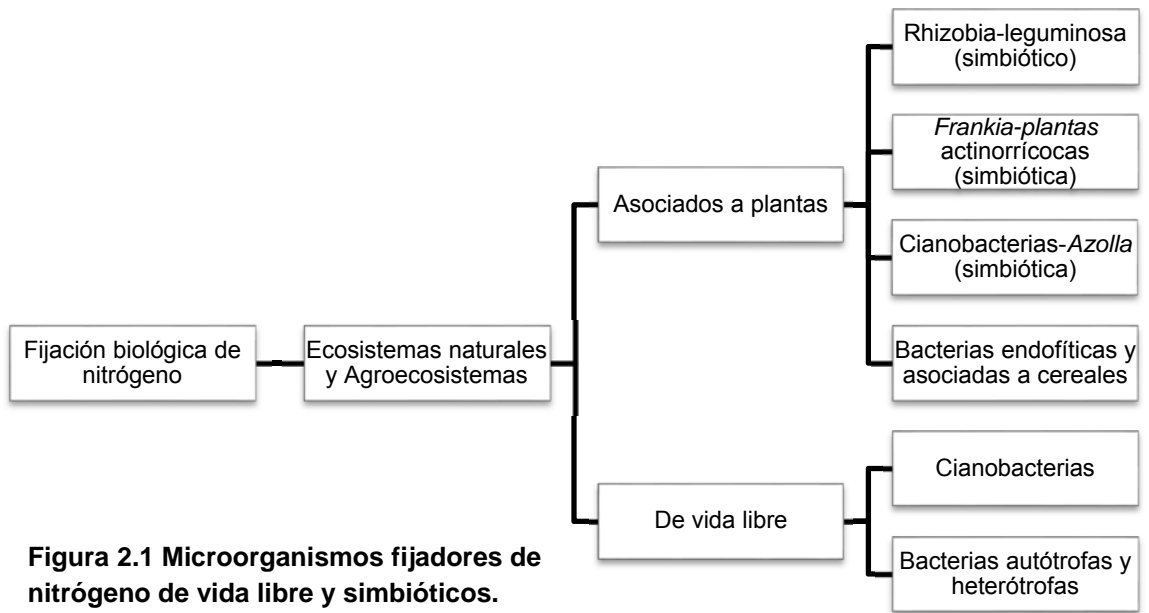
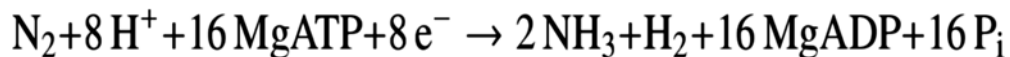


Figura 2.1 Microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre y simbióticos.

El complejo enzimático nitrogenasa se caracteriza por ser sensible a oxígeno, requiere un catalizador metálico (hierro, vanadio o molibdeno) y requiere cantidades elevadas de energía en forma de ATP. El complejo enzimático nitrogenasa se compone de dos subunidades llamadas dinitrogenasa reductasa (Fe-proteína o componente II) y la dinitrogenasa (Molibdo-Hierro proteína o componente I). La primera está codificada en los genes *nifH* y la segunda en los genes *nifD* y *nifK*. Sin embargo, existen nitrogenasas alternativas, en las que el molibdeno es remplazado por vanadio (codificada en los genes *vnfHDK*) o por hierro (genes *anfHDK*). La más abundante y ampliamente estudiada es la nitrogenasa dependiente de molibdeno. La reacción catalizada por esta enzima es la siguiente (Seefeldt et al., 2009):



El gen *nifH* es el biomarcador molecular más ampliamente utilizado para estudiar las comunidades microbianas que participan en esta etapa del ciclo del nitrógeno en ambientes tanto acuáticos como terrestres, debido a que los resultados obtenidos son semejantes con los que se obtienen con el gen 16S rRNA (Jetten, 2008). La filogenia de los genes de las dinitrogenasas se agrupan en 4 clusters: cluster I nitrogenasas codificadas por el gen *nifH* que contienen molibdeno y algunos *vnfH*; cluster II nitrogenasa alternativa con hierro codificadas en el gen *anfH* y nitrogenasa de algunos

grupos de Archaea; Cluster III secuencias del gen *nifH* de un grupo diverso de microorganismos distantemente relacionados muchos de los cuales son anaerobios estrictos (clostridia, sulfato reductores); Cluster IV grupo divergente de secuencias tipo *nif* de Archaea (Zehr et al., 2003).

El estudio de la fijación de nitrógeno afectada por practicas agrícolas ha sido poco estudiada. Wakelin et al. (2010) en un estudio al este de Australia. Compararon el efecto de la rotación de cultivo con gramíneas y leguminosas en la zona agrícola de Border Check, el monocultivo de arroz en la zona de Contour, la rotación con cereales y canola en la zona de Pivot y una zona con vegetación nativa. Además del manejo de residuos (incorporado, quemado o retenido) sobre la presencia, la expresión de los genes *nifH* y la actividad de fijación de nitrógeno. Reportaron que en la rotación gramínea-leguminosa y residuo retenido, a diferencia del DNA el número de copias del transcrito del gen *nifH* no se correlaciona con el etileno producido en la prueba de reducción de acetileno. La incorporación del rastrojo incrementó la fijación de nitrógeno en comparación con el rastrojo quemado o retenido. Por otra parte, en la zona Contour, el número de copias del gen *nifH* fue mayor que en la zona de Border check. Concluyen que para esta zona, no existe relación entre las prácticas de manejo de residuos con la expresión del gen *nifH* ni con el potencial de fijación de nitrógeno. En Pivot concluyen que tanto la fijación de nitrógeno como los niveles de expresión del gen *nifH* fueron mayores en los suelos con agricultura que los de vegetación nativa.

Finalmente, Hayden et al. (2010) estudiaron un suelo agrícola y otro con vegetación nativa en tres zonas geomorfológicas de Australia examinando la abundancia de los genes *nifH* por qPCR. Sus resultados indican que la abundancia de los genes *nifH* no está relacionada con el uso del suelo, al observar un número similar de copias tanto en los suelos sometidos a agricultura como los de vegetación nativa. Por otra parte el gen *nifH* solo fue detectado en el 50% de los 60 sitios estudiados. Concluyen que no hay una relación significativa entre la abundancia de los genes *nifH* con el uso del suelo y las zonas geomorfológicas estudiadas.

Orr et al. (2011) analizaron dos suelos del noroeste de Inglaterra cultivados con papa y con rotación de cultivo (cebada-leguminosas) sometidos a agricultura orgánica y agricultura convencional, respectivamente. Comparan la diversidad, abundancia de los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre y expresión de genes *nifH*,

tomando muestras en marzo, junio y septiembre. Encontraron que el número de transcritos del gen *nifH* es mayor en agricultura convencional en las tres fechas muestreadas, y en agricultura convencional en junio y en agricultura orgánica en septiembre. La evaluación de marzo y septiembre reveló que los suelos con agricultura convencional tuvieron mayor diversidad que los suelos con agricultura orgánica. Por último, concluyen que la rotación de cultivo tiene un efecto sobre la comunidad fijadora de nitrógeno, ya que ésta es más abundante y diversa después del cultivo de cebada.

2.2 Justificación

Los sistemas de producción agrícola implementan diferentes procedimientos para incrementar la productividad, como son los métodos de labranza y el manejo de residuos. Al respecto, estudios previos han demostrado que las prácticas agrícolas tienen un efecto sobre las comunidades microbianas afectando su estructura y sobre las características físicas, químicas y biológicas del suelo; así como, en la dinámica del nitrógeno (macroelemento esencial constituyente de las biomoléculas). El nitrógeno es reincorporado al suelo a través del proceso llamado fijación biológica, realizado por microorganismos diazótrofos. Sin embargo, no se tienen reportes claros del efecto de éstas prácticas sobre la estructura de este gremio microbiano.

Por todo lo anterior, es importante evaluar el efecto del manejo de residuos, sistema de labranza y rotación de cultivo sobre la actividad de fijación de nitrógeno. Con el fin de determinar si las prácticas agrícolas convencionales tienen un efecto negativo sobre la actividad de fijación de nitrógeno, independientemente del origen geográfico.

2.3 Hipótesis

Dado que las prácticas agrícolas convencionales cambian la estructura de la comunidad bacteriana entonces la actividad nitrogenasa de los fijadores de nitrógeno en el suelo, disminuirá con respecto a las prácticas de agricultura de conservación.

2.4 Objetivo general

Evaluar el efecto de las prácticas agrícolas sobre la comunidad involucrada en la fijación biológica del nitrógeno, en suelos agrícolas sometidos a diferentes manejos de rastrojo y sistemas de labranza, de diferente origen geográfico.

2.5 Objetivos particulares

- Evaluar la actividad nitrogenasa de la comunidad microbiana fijadora de nitrógeno en suelos de diferente origen geográfico.
- Detectar el gen *nifH* en los suelos de diferente origen geográfico sometidos a diferentes prácticas agrícolas.

2.6 Diagrama general de trabajo



2.7 Materiales y métodos

2.7.1 Sitio de estudio y tratamientos

Las muestras se tomaron en lotes experimentales del CIMMyT en África (Zimbabue, Zambia y Mozambique), América (México) y Oceanía (Australia). Las muestras de África provienen de la estación experimental Henderson (HRS) en Zimbabue, del Centro de Entrenamiento Agrícola Monze (MFTC) en Zambia. En México, provienen de la estación experimental El Batán en el Estado de México y de la estación Normand E. Borlaug (CENEB) en Sonora (Tabla 2.1). Cada estación experimental está dividida en lotes y cada uno en parcelas (ejemplo Fig. 6.2 Anexo), en las cuáles se combinan diferentes prácticas de agricultura de conservación y convencional. Cada tratamiento evaluado (parcelas) está por triplicado (con excepción de la estación experimental en el Edo. De México “El Batán” en donde las parcelas están por duplicado). Se evaluaron diferentes prácticas agrícolas: labranza (cero, mínima y convencional), manejo de residuos (incorporación, quema o retención), fertilización (con y sin nitrógeno) y tipo de cultivo (rotación y monocultivo) (Tabla 2.2).

2.7.2 Muestreo

La toma de muestras se realizó utilizando barrenas limpias y sin aceite, tomando de la parte superficial del suelo (0 a 15 cm) varios puntos en cada parcela. Las muestras se secaron al aire y se almacenaron a temperatura ambiente.

2.7.3 Incubación aerobia y fijación biológica de nitrógeno

En frascos ampulla de 120 mL se pesaron 15 g de suelo seco de cada parcela por duplicado (en total 152), se ajustaron al 40% de la capacidad de retención de agua y se pre-incubaron por siete días a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, a la mitad de los frascos (76) se adicionaron 10 g kg⁻¹ ss de sacarosa y manitol, el resto se consideraron como control. Los frascos ampulla se colocaron en jarras de incubación, las cuales contenían agua para evitar la pérdida de humedad y frascos con NaOH 1M para capturar las emisiones de CO₂ y evitar condiciones de anaerobiosis. Se incubaron durante tres días a temperatura ambiente.

Tabla 2.1 Muestras de suelo colectadas en las diferentes estaciones experimentales y su fecha de muestreo.

<i>Continente País</i>	<i>Fecha</i>	<i>Sitio</i>	<i>No.</i>	<i>Muestra</i>	<i>Continente País</i>	<i>Fecha muestreo</i>	<i>Sitio</i>	<i>No.</i>	<i>Muestra</i>	
<i>África-Zimbabue</i>	Noviembre 2012	HRS	1	CPMZ_1*	<i>Oceanía-Australia</i>			1	MAT_1	
			4	CPMZ_2*				2	MAT_2	
			7	CPMZ_3*				3	MAT_3	
			2	DSMZ_1				1	MIT_1	
			5	DSMZ_2				2	MIT_2	
			8	DSMZ_3				3	MIT_3	
			3	DSMSZ_1				1	MW_1	
			6	DSMSZ_2				2	MW_2	
			9	DSMSZ_3				3	MW_3	
		10	CPMA_1	C-10	111	CTB_SI_1				
		11	CPMA_2		211	CTB_SI_2				
		12	CPMA_3		311	CTB_SI_3				
<i>África-Zambia</i>	Noviembre 2012	MFTC	1	CPM_1	<i>América-México-Sonora (CENEB)</i>			121	PB_SB_1	
			5	CPM_2				221	PB_SB_2	
			9	CPM_3				231	PB_SB_3	
			2	DSM_1				151	PB_SR_1	
			6	DSM_2				251	PB_SR_2	
			10	DSM_3				351	PB_SR_3	
			3	DSMC_1				115	CTB_SIN_1	
			7	DSMC_2				215	CTB_SIN_2	
			11	DSMC_3				315	CTB_SIN_3	
			4	DSMCS_1				125	PB_SBN_1	
			8	DSMCS_2				225	PB_SBN_2	
			12	DSMCS_3				325	PB_SBN_3	
<i>África-Mozambique</i>	Noviembre 2012	SRS	1	CPMM_1	<i>América-México Estado de México (El Batán)</i>	Enero 2014	BVD5	18	ZTWMK_1	
			5	CPMM_2				59	ZTWMK_2	
			9	CPMM_3				29	CTMMR_1	
			2	DSMM_1				51	CTMMR_2	
			6	DSMM_2				BVH9	14	PBWMK_1
			10	DSMM_3					21	PBWMK_2
			3	DSMS_1			5		CBWMR_1	
			7	DSMS_2			17	CBWMR_2		
			11	DSMS_3						
		4	DSMSB_1							
		8	DSMSB_2							
		12	DSMSB_3							

*Las muestras se tomaron entre las filas después de realizada la siembra

Tabla 2.2 Tratamientos a evaluar en los diferentes lotes experimentales

Continente País	Muestra	Labranza	Manejo de residuos	Rotación	Fertilización nitrogenada
África- Zimbabue	CPMZ	Convencional	Removido	Monocultivo maíz	SD
	DSMZ	Siembra directa	Retención		SD
	DSMSZ		Retención	Maíz-Crotalaria	SD
	CPMA	Convencional	Removido		SD
África-Zambia	CPM	Convencional	Removido	Monocultivo maíz	SD
	DSM	Siembra directa	Retención		SD
	DSMC		Retención	Maíz-Algodón	SD
	DSMCS	Removido	Maíz-Algodón- Crotalaria	SD	
África- Mozambique	CPMM	Convencional	Removido	Monocultivo maíz	SD
	DSMM	Siembra directa	Retención		SD
	DSMS		Retención	Maíz-Girasol	SD
	DSMSB	Removido	Maíz-girasol- Frijol	SD	
Oceanía- Australia	MAT	Máxima	SD	Monocultivo de algodón	SD
	MIT	Mínima	SD		SD
	MW	Mínima	SD	Trigo-Algodón	SD
América-México- Sonora (CENEBS)	CTB_SI	Convencional	Incorporado	Maíz-trigo	Sin fertilizante
	PB_SB	Cero	Quemado		
	PB_SR		Retenido		
	CTB_SIN	Convencional	Incorporado		300 kg N ha ⁻¹
	PB_SBN	Cero	Quemado		
	PB_SRN		Retenido		
América- México Estado de México (El Batán)	ZTWMK	Cero	Retenido	Maíz-Trigo	150 kg N ha ⁻¹
	CTMMR	Convencional	Removido	Monocultivo maíz	
	PBWMK	Cero	Retenido	Maíz-Trigo	
	CBWMR	Convencional	Retenido	Maíz-Trigo	

SD: sin información

2.7.4 Medición de actividad de la nitrogenasa mediante ensayo de reducción de acetileno

Después de tres días de incubación, los viales se sellaron herméticamente con un tapón de hule y un casquillo de metal. Posteriormente, se reemplazó el 5% de volumen de aire por acetileno con una jeringa para gases Hamilton®. Después de 24 h de incubación a 28°C y 37°C se tomó una alícuota de 1 mL de aire para medir el etileno formado en un cromatógrafo de gases Agilent 4890-D GC-17 (USA) con detector de ionización de flama (FID). Una columna PORAPAK-N 50/80 se utilizó para medir el etileno formado, la temperatura del detector, del inyector y del horno fue 250, 40 y 55°C respectivamente. La cantidad de etileno se calculó por la comparación de las áreas de los picos con respecto a una curva estándar de etileno a una concentración conocida. La cepa *Klebsiella variicola* ATCC BAA-830T se utilizó como control positivo. La actividad nitrogenasa se determinó utilizando la ley general de los gases ideales $PV = nRT$, en donde:

n = moles

P =presión absoluta (del Distrito Federal)

R =constante universal (0.082 L atm K⁻¹ mol⁻¹)

T =temperatura absoluta (temperatura ambiente)

V =volumen[(etileno L mL⁻¹)(Headspace mL)]

Se despeja n de la fórmula y se obtienen los moles de etileno formados en 24 h de incubación: finalmente se divide entre el peso del suelo seco para obtener la actividad de nitrogenasa en nmol de etileno g⁻¹_{ss} h⁻¹.

2.7.4 Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó a partir de 1 g de suelo después de medir la actividad de nitrogenasa. La extracción se realizó por duplicado por tres métodos diferentes (físicoquímico, químico y enzimático), obteniendo por cada parcela una mezcla de seis extracciones de DNA. Se eliminaron los ácidos húmicos realizando lavados con pirofosfato de sodio 0.15 M, hasta obtener un sobrenadante claro (indicativo de ausencia de ácidos húmicos). Se realizaron lavados con regulador de fosfatos 0.15 M pH 8 para eliminar el exceso de pirofosfato. Una vez eliminados los ácidos húmicos, se realizó la extracción de DNA como sigue:

-
- Método fisicoquímico (Valenzuela-Encinas et al., 2009) se realizó una lisis mecánica (arena y vortex 10 min), lisis química (SDS 12%) y lisis física (con choque térmico -70°C y 70°C).
 - Método químico (Winston y Hoffman, 1987) se realizó una lisis mecánica (arena y vortex 10 min) y lisis química (SDS 1% y Tritón X-100 2%).
 - Método enzimático (Sambrook y Russell, 2001) se incubó con lisozima (10 mg mL⁻¹) durante 1 h, se realizó una lisis mecánica (arena y vortex 10 min) y lisis química (SDS 10%)

Posteriormente, en todos los casos se realizó una eliminación de proteínas con acetato de potasio 5 M pH 5 y EDTA 0.5 M pH 8 y cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. La precipitación de DNA se realizó con PEG 13% NaCl 1.6 M toda la noche a -20°C.

2.7.5 Detección del gen *nifH*

A partir de la mezcla de DNAs, se amplificó el gen *nifH* utilizado como marcador molecular de la fijación de nitrógeno. Se utilizaron los fusion-primers *nifH_19F* 5'-TAY GGI AAR GGI GGI ATH GG -3' y *nifH_398R* 5'- AAI CCI CCR CAI ACI ACR TCI CC- 3' diseñados en el grupo de trabajo (Dra. Y. Navarro Noya comunicación personal) con un multi-identificador (MID) de 10 pb para 454 Roche. La mezcla de reacción contenía de 1-3 µL de DNA dependiendo de la muestra y 10 pmol del iniciador. Las condiciones de la PCR fueron 30 ciclos, la temperatura de alineamiento fue de 53 °C. La integridad del amplificado se verificó en un gel de agarosa al 1% y se visualizó con SyBr Gold.

Para algunas muestras fue necesario realizar PCR anidada durante 10 ciclos. El producto de ésta amplificación se tomó como molde para una nueva amplificación (20 ciclos). En otras muestras se realizó un touchdown (20 ciclos 60°C-53°C) y el producto de esta PCR se tomó como molde para la siguiente.

2.7.6 Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Shapiro y Levene para verificar la normalidad de los datos en R (<http://www.r-project.org/>). Los datos sin distribución normal se transformaron según fue el caso (ej. raíz cuadrada). Se realizó una prueba de ANOVA, los resultados con diferencia significativa se les hizo una prueba poshoc de Tukey.

2.8 Resultados

2.8.1 Actividad de la nitrogenasa en los suelos estudiados

Se detectó actividad nitrogenasa en los suelos adicionados con sacarosa y manitol en los suelos de México y Australia incubados a 37°C, observándose la mayor actividad en los suelos de la estación experimental de Sonora (CENEB) (Fig. 2.2). No se detectó actividad nitrogenasa en los suelos denominados control (sin adición de fuente de carbono) provenientes de Zambia, Mozambique, Zimbabue, México y Australia incubados a temperatura ambiente (22°C) o 37°C. En las muestras de África adicionadas con sacarosa y manitol incubadas a 37°C tampoco se detectó actividad nitrogenasa. Sin embargo, cuando se incubaron a temperatura ambiente, se detectó actividad en algunas muestras de Mozambique y Zambia (Tabla 2.3). Las muestras que no presentaron actividad a las 24 h se incubaron 48 h más, sin embargo, no se detectó actividad.

No hay diferencia significativa en la actividad nitrogenasa detectada en los suelos del CENEB en ninguno de los tratamientos. Mientras que, se observó diferencia significativa en actividad de fijación de nitrógeno en las muestras de Australia con rotación de cultivo ($p < 0.01$). Entre las muestras del CENEB y El Batán, se observó diferencia significativa en la actividad nitrogenasa en los tratamientos adicionados con nitrógeno ($p < 0.01$). Por otra parte, con las muestras de Australia, se encontró diferencia significativa entre los sitios de estudio ($p < 0.01$), la rotación de cultivo (maíz-trigo vs trigo-algodón) ($p < 0.01$) y la labranza (labranza mínima vs labranza cero y labranza mínima vs labranza convencional) ($p < 0.01$). Respecto a las muestras de El Batán, se encontró diferencia significativa en la actividad nitrogenasa con las muestras de Australia, por sitio de estudio ($p < 0.01$), labranza (máxima vs cero ($p < 0.05$), máxima vs convencional ($p < 0.01$) y rotación (monocultivo de algodón vs maíz-trigo) ($p < 0.05$) (Tabla 6.5 Anexo)

Tabla 2.3 Actividad nitrogenosa detectada en los suelos sometidos a diferentes prácticas agrícolas de distinto origen geográfico.

<i>Continente</i>	<i>Muestra</i>	<i>28°C</i>	<i>37°C</i>	<i>Continente</i>	<i>Muestra</i>	<i>28°C</i>	<i>37°C</i>
<i>País</i>				<i>País</i>			
<i>África-Zimbabue</i>	CPMZ_1	*D	ND	<i>América-México-Sonora (CENEBS)</i>	CTB_SI_1	ND	D
	CPMZ_2	*ND	ND		CTB_SI_2	ND	D
	CPMZ_3	ND	ND		CTB_SI_3	ND	D
	DSMZ_1	ND	ND		PB_SB_1	ND	D
	DSMZ_2	ND	ND		PB_SB_2	ND	D
	DSMZ_3	ND	ND		PB_SB_3	ND	D
	DSMS_1	ND	ND		PB_SR_1	ND	D
	DSMS_2	ND	ND		PB_SR_2	ND	D
	DSMS_3	ND	ND		PB_SR_3	ND	D
	CPMA_1	ND	ND		CTB_SIN_1	ND	D
	CPMA_2	ND	ND		CTB_SIN_2	ND	D
CPMA_3	ND	ND	CTB_SIN_3	ND	D		
<i>África-Zambia</i>	CPM_1	ND	ND	<i>América-México Estado de México (EI Batán)</i>	PB_SBN_1	ND	D
	CPM_2	ND	ND		PB_SBN_2	ND	D
	CPM_3	ND	ND		PB_SBN_3	ND	D
	DSM_1	ND	ND		PB_SRN_1	ND	D
	DSM_2	ND	ND		PB_SRN_2	ND	D
	DSM_3	ND	ND		PB_SRN_3	ND	D
	DSMC_1	D	ND		ZTWMK_1	*NDE	D
	DSMC_2	D	ND		ZTWMK_2	NDE	D
	DSMC_3	D	ND		CTMMR_1	NDE	D
	DSMCS_1	ND	ND		CTMMR_2	NDE	D
	DSMCS_2	D	ND		PBWMK_1	NDE	D
DSMCS_3	D	ND	PBWMK_2	NDE	D		
<i>África-Mozambique</i>	CPMM_1	D	ND	<i>Oceania-Australia</i>	CBWMR_1	NDE	D
	CPMM_2	ND	ND		CBWMR_2	NDE	D
	CPMM_3	ND	ND		MAT_1	NDE	D
	DSMM_1	ND	ND		MAT_2	NDE	D
	DSMM_2	ND	ND		MAT_3	NDE	D
	DSMM_3	D	ND		MIT_1	NDE	D
	DSMS_1	ND	ND		MIT_2	NDE	D
	DSMS_2	D	ND		MIT_3	NDE	D
	DSMS_3	ND	ND		MW_1	NDE	D
	DSMSB_1	ND	ND		MW_2	NDE	D
	DSMSB_2	ND	ND		MW_3	NDE	D
DSMSB_3	ND	ND					

*D: detectado; ND: no detectado; NDE: no determinado

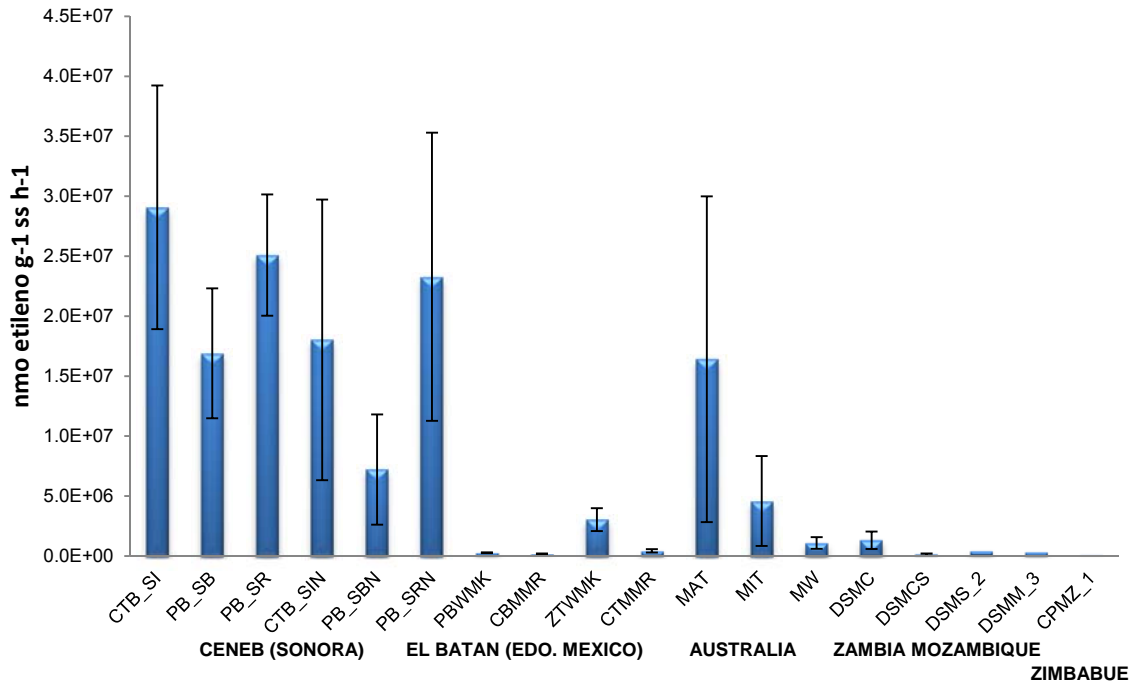


Figura 2.2 Actividad de la nitrogenasa detectada en los suelos sometidos a diferentes prácticas agrícolas de México, Australia, Mozambique (solo las parcelas que se detectó actividad), Zambia y Zimbabue (única parcela que se detectó actividad).

2.8.2 Extracción de DNA y detección del gen *nifH*

Se realizó la extracción de DNA de todas las muestras tanto las que se detectó actividad nitrogenasa como en las que fue ausente, dando un total de 456 extracciones, en todos los casos se obtuvo DNA íntegro de alto peso molecular. Se detectó el gen *nifH* en todas las parcelas estudiadas en los suelos de Australia y México (Estado de México y Sonora) (Tabla 2.4).

Tabla 2.4 Detección del gen *nifH* a partir de DNA total de diferentes suelos

Continente País	Sitio	No.	Muestra	Detección del gen <i>nifH</i>	Continente País	Sitio	No.	Muestra	Detección del gen <i>nifH</i>	
África-Zimbabue	HRS	1	CPMZ_1	-	Oceanía-Australia		1	MAT_1	*-	
		4	CPMZ_2	-			2	MAT_2	*+	
		7	CPMZ_3	-			3	MAT_3	-	
		2	DSMZ_1	-			1	MIT_1	+	
		5	DSMZ_2	-			2	MIT_2	+	
		8	DSMZ_3	-			3	MIT_3	+	
		3	DSMS_1	-			1	MW_1	-	
		6	DSMS_2	-			2	MW_2	+	
		9	DSMS_3	-			3	MW_3	+	
		10	CPMA_1	-			C-10	111	CTB_SI_1	+
		11	CPMA_2	-				211	CTB_SI_2	+
		12	CPMA_3	-				311	CTB_SI_3	+
África-Zambia	MFTC	1	CPM_1	-	América-México-Sonora (CENEb)		121	PB_SB_1	+	
		5	CPM_2	-			221	PB_SB_2	+	
		9	CPM_3	-			231	PB_SB_3	+	
		2	DSM_1	-			151	PB_SR_1	+	
		6	DSM_2	-			251	PB_SR_2	+	
		10	DSM_3	-			351	PB_SR_3	+	
		3	DSMC_1	-			115	CTB_SIN_1	+	
		7	DSMC_2	-			215	CTB_SIN_2	+	
		11	DSMC_3	-			315	CTB_SIN_3	+	
		4	DSMCS_1	-			125	PB_SBN_1	+	
		8	DSMCS_2	-			225	PB_SBN_2	+	
		12	DSMCS_3	-			325	PB_SBN_3	+	
África-Mozambique	SRS	1	CPMM_1	-	América-México México (El Batán)	BVD5	18	ZTWMK_1	+	
		5	CPMM_2	-			59	ZTWMK_2	+	
		9	CPMM_3	-			29	CTMMR_1	+	
		2	DSMM_1	-			51	CTMMR_2	+	
		6	DSMM_2	-			BVH9	14	PBWMK_1	+
		10	DSMM_3	-				21	PBWMK_2	+
		3	DSMS_1	-		5		CBWMR_1	+	
		7	DSMS_2	-		17		CBWMR_2	-	
		11	DSMS_3	-						
		4	DSMSB_1	-						
		8	DSMSB_2	-						
		12	DSMSB_3	-						

*(-): ausencia de amplicón (+) presencia de amplicón

2.9 Discusión

La fijación biológica de nitrógeno medida mediante la reducción de acetileno se estimuló con la adición de una fuente de carbono. La fijación de nitrógeno es una actividad muy costosa en términos energético por lo que una fuente de carbono de fácil asimilación ayuda a que los microorganismos tengan la energía suficiente para llevar a cabo la fijación de nitrógeno.

La actividad de nitrogenasa fue mayor en los suelos del CENEB (Sonora), sin embargo no se encontró diferencia significativa en la actividad enzimática entre las prácticas de agricultura de conservación y tradicional. Por otra parte, no se encontró diferencia significativa en la actividad nitrogenasa debido a la aplicación de fertilizante nitrogenado, a pesar de que el nitrógeno tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de dicha enzima. Los valores de actividad nitrogenasa en los suelos del CENEB ($4.85 \times 10^{-4} \text{ mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ en el día tres) fueron mayores a los reportados en suelos forestales incubados con 2% de sacarosa por Bellenger et al. (2014) ($2 \times 10^{-10} \text{ mol de etileno min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ en el día seis). La actividad nitrogenasa en los suelos de Australia y El Batán fue menor comparada con la de Sonora. En las muestras de África, únicamente se detectó en algunas parcelas con el cambio de temperatura. Se encontró un efecto de la rotación de cultivo (con algodón) sobre la actividad nitrogenasa similar a lo reportado por Orr et al. (2011). La labranza también tiene un efecto sobre la actividad enzimática, contrario a lo reportado por Hsu y Buckley (2009), quienes encontraron que en los suelos con labranza cero la actividad enzimática es menor.

El gen *nifH* se detectó en las muestras de México y Australia, por lo que las prácticas agrícolas no tiene un efecto sobre la presencia del gen de la comunidad fijadora de nitrógeno. En las muestras de África no se detectó el gen *nifH*, probablemente, el número de genes está por debajo del límite de detección de la metodología empleada.

2.10 Conclusiones

- La actividad nitrogenasa fue mayor en los suelos del CENEB (Sonora).
- La rotación de cultivo y la labranza tiene un efecto significativo sobre la actividad nitrogenasa de la comunidad fijadora de nitrógeno.
- Se detectó el gen *nifH* en las parcelas de México y Australia.
- En los suelos de África no se detectó actividad nitrogenasa (con excepción de algunas parcelas), ni presencia del gen *nifH* por los métodos utilizados.

CAPITULO III.

Detección de los transcritos del gen *nifH* en una dinámica de fijación biológica de nitrógeno en suelos sometidos a diferentes prácticas agrícolas.

3.1 Antecedentes

3.1.1 Estación experimental Norman E. Borlaug (CENEB)

Se localiza cerca de Ciudad Obregón, Sonora, México (27.33 Norte, 109.09 Oeste) en el Valle del Yaqui, posee un clima árido con temperaturas anuales promedio de 24.7°C y precipitaciones anuales promedio de 384 mm. Las lluvias predominan en verano y sólo el 23% de las precipitaciones ocurren durante la temporada de cultivo de trigo (noviembre a mayo). El suelo está clasificado como un Vertisol hiposódico de acuerdo a la World Reference Base System (Verhulst et al., 2011).

La estación está dividida en lotes los cuales se sub-dividen en parcelas con base en los tratamientos a estudiar. Entre estos el lote C-10 (Fig. 6.2 Anexo) se utiliza desde 1992 para evaluar y comparar diferentes estrategias agrícolas utilizadas en agricultura de conservación (labranza cero con residuos retenidos) con prácticas de agricultura convencional (labranza convencional con incorporación, remoción o quema de residuos). Se realiza rotación anual de trigo y maíz: el primero como un cultivo sembrado sobre camas elevadas en dos hileras separadas 22 cm a finales de noviembre y principios de diciembre, cosechado en mayo y el segundo, como cultivo de verano sembrado en una hilera en el centro de la cama en junio y cosechado en octubre. El riego se aplica en los surcos entre las camas.

El cultivo en camas elevadas se ha utilizado desde tiempos inmemoriales por agricultores en muchas partes del mundo. Su origen y uso ha sido asociado con problemas en el manejo del agua. Su aplicación ha sido usada en Asia central, China, Zimbabue y en la zona árida del oeste de Estados Unidos. En el Valle del Yaqui, se ha implementado desde hace 25 años. En muchos casos la aplicación tradicional del cultivo de camas elevadas involucra considerables operaciones de labranza para su elaboración antes de la siembra del siguiente cultivo y la quema de los residuos o la utilización del rastrojo para forraje. Sin embargo uno de los pasos para incrementar la sustentabilidad es reducir la labranza, reutilizar las camas con reformación superficial tanto como sea necesario (camas permanentes) y darle un mejor manejo y distribución a los residuos del cultivo antes de la siembra (Govaerts et al., 2007).

Los tratamientos que se llevan a cabo en las parcelas son:

1) *Camas levantadas con labranza convencional-rastrojo incorporado (CTB-SI)*: al término de cada cultivo se realiza el arado al suelo después del cual se vuelven a formar las camas; los residuos de trigo y maíz son incorporados por operaciones de labranza.

2) *Camas permanentes-rastrojo quemado (PB-SB)*: labranza cero con rehúso continuo de las camas permanentes, donde los surcos son reformados sin disturbio de la superficie de las camas; los residuos tanto del trigo como del maíz se queman.

3) *Camas permanentes-rastrojo removido (PB-SR)*: labranza cero con rehúso continuo de las camas permanentes, los residuos tanto del maíz como del trigo son removidos.

4) *Camas permanentes-residuos parcialmente removidos (PB-SPR)*: labranza cero con rehúso continuo de las camas permanentes, los residuos de maíz son retirados y los de trigo se dejan en la superficie.

5) *Camas permanentes-rastrojo retenido (PB-SR)*: los residuos de maíz y trigo son triturados y se mantienen en la superficie de las camas las cuáles son reformadas conforme es necesario.

Por otra parte, aunado a estos tratamientos también se maneja fertilización nitrogenada con urea a diferentes concentraciones que van desde 50 a 300 kg de N/ha aplicado en los surcos de forma basal o en la formación del primer nudo además, se incluye un tratamiento sin fertilización nitrogenada.

3.1.2 Fijación de nitrógeno en suelo

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso de gran importancia a través del cual el N₂ atmosférico se convierte amonio, la forma que pueden ser utilizada por plantas y animales. En el capítulo anterior, puede consultarse con más detalle la importancia de la fijación de nitrógeno en los ecosistemas terrestres. El gen *nifH*, que codifica una subunidad de la enzima nitrogenasa, es un marcador útil que utilizado para estudiar la distribución y diversidad de los diazótrofos. Se sugiere que factores ambientales como la humedad del suelo, oxígeno, pH, cantidad de carbono, disponibilidad de nitrógeno y de oligoelementos, tales como Mo, Fe y V tienen efectos directos sobre las tasas de fijación de nitrógeno (Hsu y Buckley, 2009).

3.2 Justificación

En un agroecosistema, como el que se encuentra en la estación experimental Norman E. Borlaug del CIMMYT en México, los residuos del cultivo de maíz y trigo son incorporados, retenidos o quemados; del cual ya se ha estudiado la dinámica de nitrógeno bajo esta estrategia agrícola. Por otra parte, en el capítulo 2, determinamos que los suelos provenientes de esta estación experimental, presentaron la mayor actividad nitrogenasa comparados con los suelos provenientes de las otras estaciones experimentales (El Batán, Zimbabue, Zambia, Mozambique y Australia). Por lo que, nos planteamos determinar efecto de las prácticas agrícolas sobre la comunidad activa, si son resistentes o ante estas perturbaciones. Además determinar si una fuente de carbono de difícil asimilación como es el rastrojo de maíz, puede estimular a la actividad de fijación de nitrógeno.

3.3 Hipótesis

Dado que la quema de residuos disminuye la actividad microbiológica en el suelo entonces la actividad nitrogenasa disminuirá en comparación con los tratamientos donde el residuo fue incorporado o retenido

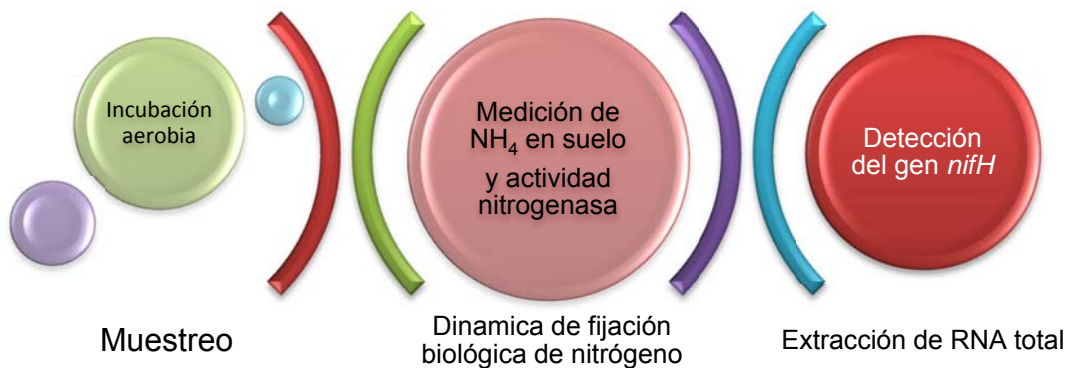
3.4 Objetivo general

Evaluar el efecto de las prácticas de agricultura de conservación y convencional sobre la comunidad microbiana activa fijadora de nitrógeno, en un suelo agrícola cultivado con trigo y maíz sometido a diferentes manejos de rastrojo y sistemas de labranza.

3.5 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de las prácticas agrícolas sobre la actividad de la nitrogenasa de la comunidad microbiana activa diazótropa en una dinámica de fijación biológica de nitrógeno.
- Evaluar el efecto de la adición de rastrojo de maíz al suelo sobre la actividad de fijación de nitrógeno.
- Detectar la expresión del gen *nifH* como marcador molecular de la población activa fijadora de nitrógeno.

3.6 Diagrama general de trabajo



3.7 Materiales y métodos

3.7.1 Descripción del sitio de estudio y tratamientos evaluados

El lote C-10 está dividido en 105 parcelas con base en los tratamientos establecidos, por triplicado, en un diseño de bloques aleatorios. Cada parcela cuenta con ocho camas de 0.75 m de ancho y 13 m de largo lo que da una superficie de 78 m² por parcela (Fig 6.2 Anexo). La siembra del trigo se realizó en camas permanentes el 14 de diciembre y en camas convencionales el 15 de diciembre. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

- 1) Camas levantadas con labranza convencional y rastrojo incorporado (CTB-SI)
- 2) Camas permanentes con rastrojo quemado (PB-SB)
- 3) Camas permanentes con rastrojo retenido (PB-SR)
- 4) Camas levantadas con labranza convencional y rastrojo incorporado fertilizados con 300 kg N ha⁻¹ en forma de urea (CTB-SI+N)
- 5) Camas permanentes con rastrojo quemado fertilizados con 300 kg N ha⁻¹ en forma de urea (PB-SB+N)
- 6) Camas permanentes con rastrojo retenido fertilizados con 300 kg N ha⁻¹ en forma de urea (PB-SR+N)

3.7.2 Muestreo

La toma de muestras será realizado cuando el trigo había pasado por la etapa de antesis y se encontraba en estado de llenado de grano. Se utilizaron barrenas limpias y sin aceite, tomando de la parte superficial del suelo (0 a 15 cm) seis puntos en las camas 2, 3, 6 y 7 de cada parcela. Las muestras se secaron al aire y se almacenarán a temperatura ambiente.

3.7.2 Dinámica de fijación biológica nitrógeno

En frascos ampolla de 120 mL se pesaron 25 g de suelo seco de cada parcela (en total 18), para cada día de muestreo (0, 1, 3, 5, 7, 14, 28 y 56 días) y para cada sub-tratamiento (sacarosa + manitol; rastrojo de maíz; control), dando un total de 432 unidades experimentales. El suelo se ajustó al 40% de la CRA y se pre-incubó por siete días a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la dinámica de fijación biológica de nitrógeno se realizó como sigue: a un tercio de las unidades experimentales se les

adicionó 1 g C kg⁻¹ ss de rastrojo de maíz, otro tercio 10 g kg⁻¹ ss de sacarosa y manitol, el restante fue tratado como control. Los frascos ampula se colocaron en jarras de incubación, las cuales contenían agua para evitar la pérdida de humedad y frascos con NaOH 1M para capturar las emisiones de CO₂ y evitar condiciones de anaerobiosis. Los frascos se destaparon cada siete días para permitir el recambio de aire y se incubaron a temperatura ambiente durante 56 días, efectuando mediciones de actividad de la nitrogenasa y del contenido de NH₄⁺ en suelo a los días 0, 1, 3, 5, 7, 14, 28 y 56.

3.7.3 Medición de NH₄⁺ en suelo

En cada día de muestreo se extrajeron 10 g de suelo de cada frasco ampula y se colocaron en envases de plástico de 250 mL a los que se les adicionó 50 mL de K₂SO₄ 0.5 M, se agitaron durante 30 min a 4000 rpm. Posteriormente los extractos se filtraron con papel Whatman #42 y se almacenaron a -20°C hasta su uso. El amonio se determinó en un analizador automático SKALAR. El NH₄⁺ se determinó interpolando los datos en una curva tipo de estándares de concentración conocida.

3.7.4 Medición de actividad de la nitrogenasa mediante ensayo de reducción de acetileno

Una vez extraído el suelo para la determinación de amonio, los viales se sellaron herméticamente con un tapón de hule y un casquillo de metal. Posteriormente, se reemplazó el 5% de volumen de aire por acetileno con una jeringa para gases Hamilton®. Después de 24 h de incubación a 37°C se tomó una alícuota de 1 mL de aire para medir el etileno formado en un cromatógrafo de gases Agilent 4890-D GC-17 (USA). La actividad nitrogenasa se calculó como se describió previamente (Capítulo II).

3.7.5 Extracción de RNA total

Con base en los resultados de la medición de actividad de la nitrogenasa se seleccionaron las muestras para la extracción del RNA total. A partir de 1 g de muestra de suelo fresco y utilizando el Kit comercial RNA PowerSoil® MOBIO (Carlsbad, CA USA). Se realizó la extracción de acuerdo a especificaciones del fabricante. La muestra de suelo se colocó en los *Bead tubes* que contiene las *magnetic beads*, se adicionó la solución *Bead* que dispersa las partículas del suelo. La lisis celular se realizó adicionando la solución SR1 que contiene SDS, se agregó una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 pH 8 (importante que no esté oxidado) y se agitó en vortex por 10 min. Posteriormente prosiguieron una serie de pasos de eliminación de proteínas. Los ácidos

nucleicos se precipitaron con isopropanol frío por 30 min a -20°C , la pastilla se purificó (para la eliminación de ácidos húmicos) con ayuda de las *RNA Capture Columns*, en las que los ácidos húmicos quedaron adheridos y el RNA se eluyó selectivamente con ayuda de la solución *SR6*. El RNA total extraído se resuspendió en 25 μL de agua libre de nucleasas y se almacenó a -70°C . Para la elución del DNA de las *Capture Columns* se utilizó una solución de NaCl 1.5 M pH 5.5 y se precipitó con isopropanol a -20°C por 10 min, después de secar la pastilla, se resuspendió en 60 μL de agua y almacenó a -20°C .

La integridad del RNA y del DNA se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (w/v). El RNA se cuantificó utilizando Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) de acuerdo a instrucciones del fabricante. Para ello se realizó una dilución 1:200 (varía en función de la cantidad visualizada en el gel de agarosa) de las muestras de RNA en TE 1x libre de nucleasas, y se mezclaron en volúmenes iguales con RiboGreen 1x disuelto en TE 1x libre de nucleasas. La mezcla se incubó 5 min a 4°C en oscuridad. La medición se realizó en un NanoDrop™ 3300 Fluorespectrómetro (Thermo Scientific Nanodrop). Las lecturas se hicieron con 2 μL de la mezcla por triplicado. La concentración de cada muestra se determinó utilizando una curva estándar realizada con RNA de concentración conocida en las mismas condiciones en que se manejaron las muestras.

3.7.6 Síntesis de cDNA y detección del gen *nifH*

Para la síntesis de cDNA se tomaron 21 μL de RNA total, se trataron con 0.2 U de DNAsa (Invitrogen, Carlsbad, USA), la mezcla de reacción contenía Buffer 1x, MgCl_2 2mM y se llevó a un volumen de 30 μL con agua DEPC. Se incubó 15 min a temperatura ambiente. La enzima se inactivó con 1 μL de EDTA 25 mM a 65°C por 10 min.

Se sintetizó el cDNA con el RNA total libre de DNA y con la Retrotranscriptasa SuperScript III RT (Invitrogen, CA). La mezcla de reacción contenía 150 ng de random primers y 2 mM dNTPs en un volumen final de 30 μL con H_2O DEPC. Ésta mezcla se incubó a 65°C durante 5 min y se enfrió rápidamente a 4°C durante 1 min para evitar la formación de estructuras secundarias en el RNA. Posteriormente, se adicionaron 200 U de la retrotranscriptasa, regulador First-Strand 1x y 5 mM de DTT, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para favorecer el alineamiento de los random primers. La síntesis del cDNA se realizó a 50°C por 45 min y se detuvo la reacción a 70°C por 15 min.

Para verificar la síntesis del cDNA se realizó una PCR utilizando como marcador molecular el gen que codifica para la ATP sintasa (*atpD*) y la región V1-V3 del gen 16S rRNA. Se incluyó una muestra del RNA libre de DNA como testigo. Finalmente, el cDNA se conservó a -20°C. El cDNA sintetizado se utilizó como molde para la amplificación del gen *nifH* utilizado como marcador molecular de la fijación de nitrógeno. La amplificación se realizó como se describió previamente (Capítulo II) utilizando 2-4 µL de cDNA.

3.8 Resultados

3.8.1 Fijación biológica nitrógeno

Se detectó actividad de nitrogenasa mediante la prueba de reducción de acetileno en los primeros siete días de las parcelas adicionadas con sacarosa y manitol (Tabla 3.1) (Fig. 3.1), siendo mayor en el día tres de la dinámica en la mayoría de los casos (Tabla 3.2) ($p < 0.001$). No se detectó actividad nitrogenasa hasta el día 56 monitoreado en los suelos adicionados con rastrojo de maíz ni en los control

3.8.2 Medición de amonio en suelo

El contenido de amonio en suelo en las muestras denominadas control fue menor con respecto a los suelos adicionados con sacarosa y manitol o rastrojo de maíz y se mantuvo estable a lo largo de la dinámica (Fig. 3.2), En el suelo adicionado con sacarosa, el amonio se incrementó en los primeros siete días, siendo mayor en el día cinco (Fig. 3.3). Respecto al sub-tratamiento con rastrojo de maíz, se observó un incremento en el primer día de la dinámica, y disminuyó con el paso del tiempo (Fig. 3.4).

3.8.3 Extracción de RNA total, síntesis de cDNA y detección de los transcritos del gen *nifH*

Se extrajo el RNA total (Fig. 3.5) en las 18 muestras de suelo donde se observó la mayor actividad de fijación biológica de nitrógeno (día tres de la dinámica). Se sintetizaron todos los cDNAs y se detectó el gen *nifH* en todas las parcelas estudiadas.

Tabla 3.1 Actividad de la nitrogenasa registrada en la dinámica de fijación biológica de nitrógeno en suelos sometidos a diferente manejo de residuo.

<i>Sub-tratamiento</i>	Tratamiento	Días muestreados							
		0	1	3	5	7	14	28	56
Control	CTB-SI	-	-	-	-	-	-	-	-
	PB-SB	-	-	-	-	-	-	-	-
	PB-SI	-	-	-	-	-	-	-	-
	CTB-SI N	-	-	-	-	-	-	-	-
	PB-SB N	-	-	-	-	-	-	-	-
	PB-SI N	-	-	-	-	-	-	-	-
Rastrojo de maíz	CTB-SI	-	-	-	-	-	-	-	-
	PB-SB	-	-	-	-	-	-	-	-
	PB-SI	-	-	-	-	-	-	-	-
	CTB-SI N	-	-	-	-	-	-	-	-
	PB-SB N	-	-	-	-	-	-	-	-
	PB-SI N	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	CTB-SI	+	+	+	+	+	-	-	-
	PB-SB	+	+	+	+	+	-	-	-
	PB-SI	+	+	+	+	+	-	-	-
	CTB-SI N	+	+	+	+	+	-	-	-
	PB-SB N	+	+	+	+	+	-	-	-
	PB-SI N	+	+	+	+	+	-	-	-

(-) Ausencia de actividad de nitrogenasa determinada por la técnica de reducción de acetileno. (+) Presencia de actividad de nitrogenasa

Tabla 3.2. Prueba de Dunnet a la actividad de la nitrogenasa en el tratamiento con sacarosa.

<i>Tratamiento</i>	Tiempo (días)		
	1	3	5
<i>CTB-SI N</i>	0.354	0.084	0.106
<i>PB-SB N</i>	0.203	0.000*	0.000*
<i>PB-SR N</i>	0.000*	0.000*	0.019
<i>CTB-SI</i>	0.019	0.148	0.601
<i>PB-SB</i>	0.024	0.004	0.449
<i>PB-SR</i>	0.117	0.000*	0.260

*Datos con diferencia significativa con la prueba de Dunnet, tomado como control de comparación el día cero, $p < 0.001$

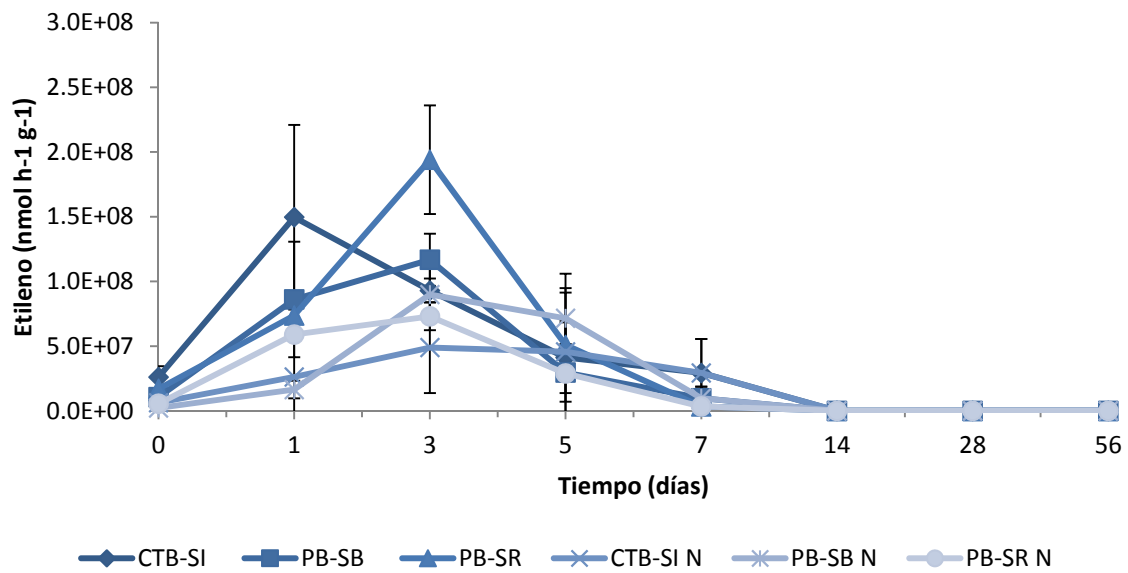


Figura 3.1 Actividad de la enzima nitrogenasa en suelos sometidos a diferente manejo de rastrojo y fertilización nitrogenada bioestimulados con sacarosa y manitol en una dinámica de 56 días.

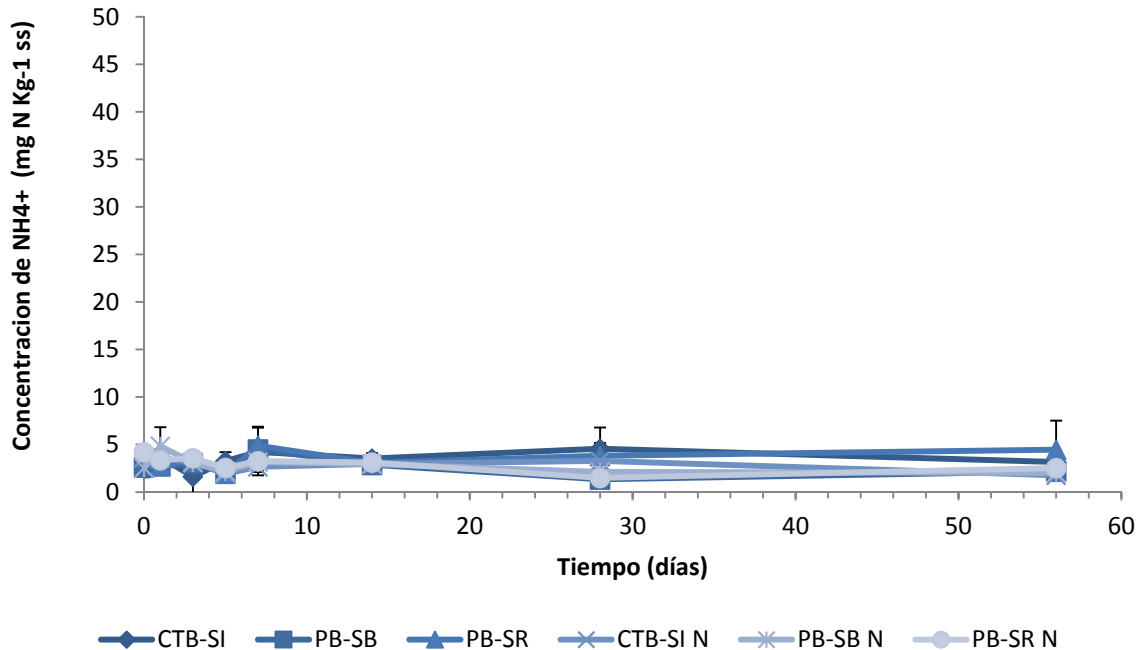


Figura 3.2 Concentración de NH₄⁺ de los suelos sometidos a diferente manejo de rastrojo y fertilización nitrogenada de la estación experimental CENEB, Sonora.

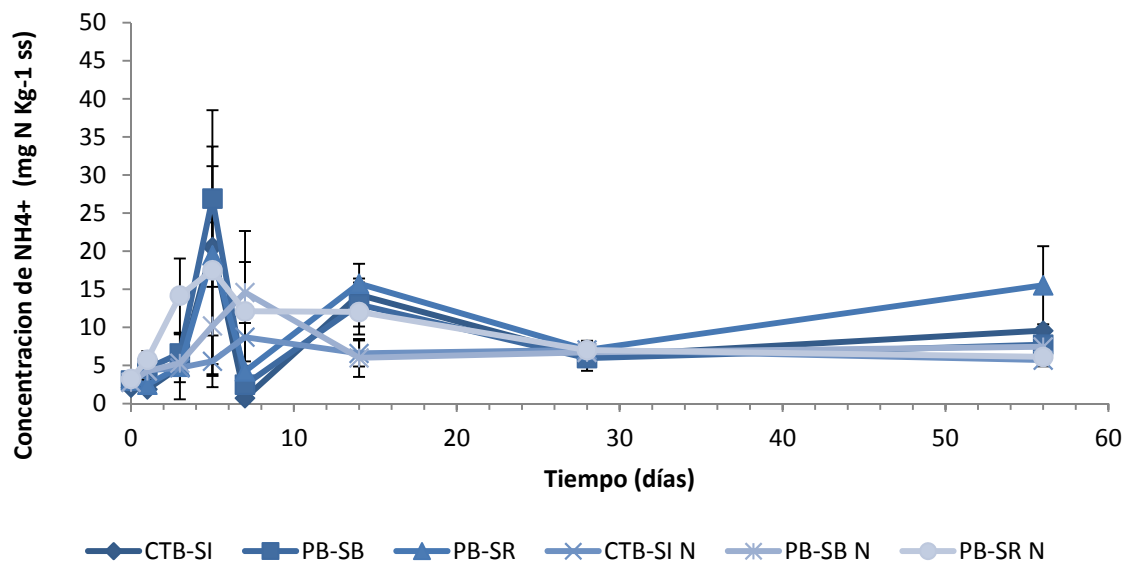


Figura 3.3 Concentración de NH_4^+ de los suelos sometidos a diferente manejo de rastrojo y fertilización nitrogenada de la estación experimental CENEB, Sonora bioestimulados con sacarosa.

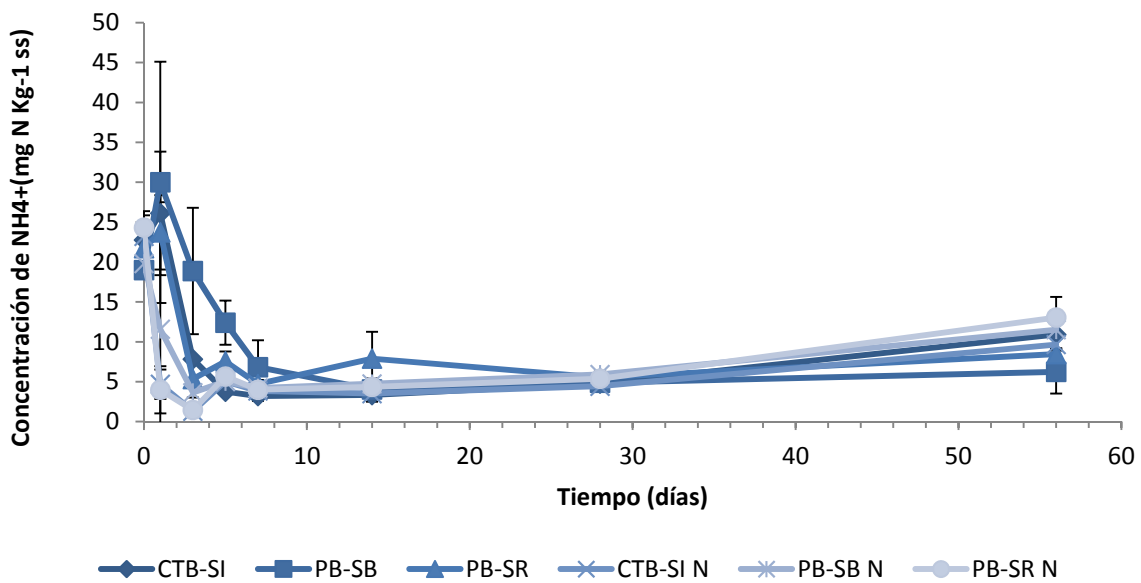


Figura 3.4 Concentración de NH_4^+ de los suelos sometidos a diferente manejo de rastrojo y fertilización nitrogenada de la estación experimental CENEB, Sonora bioestimulados con rastrojo de maíz

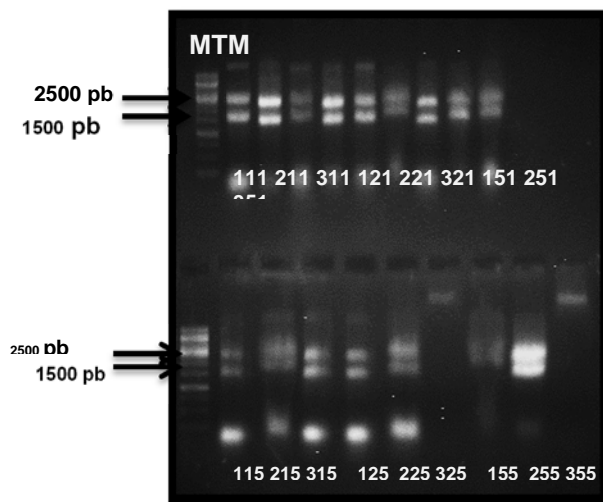


Figura 3.5 Gel de agarosa al 1% en el que se observan bandas de RNA total extraído de las muestras de la estación experimental CENEBS (Sonora)

3.9 Discusión

Se detectó actividad nitrogenasa en el suelo adicionado de sacarosa durante los primeros siete días. En los suelos incubados sin fuente de carbono no se detectó actividad nitrogenasa, durante los 56 días monitoreados. Probablemente los microorganismos fijadores de nitrógeno se estimularon con la fuente de carbono obteniendo la energía necesaria para realizar la fijación de nitrógeno. En los suelos adicionados con rastrojo de maíz no se detectó actividad nitrogenasa probablemente debido al nitrógeno presente en el rastrojo de maíz o por la difícil mineralización del carbono (fracción fibrosa).

Durante la dinámica en los tratamientos con sacarosa y manitol, aumentó el contenido de nitrógeno en el suelo. Probablemente debido a la fijación biológica del nitrógeno o a la mineralización del nitrógeno presente en la materia orgánica por los microorganismos estimulados con la adición de la fuente de carbono. Los adicionados con rastrojo de maíz, se detectó una gran cantidad de nitrógeno en el suelo en el día uno de la dinámica probablemente, debido al contenido en el rastrojo de maíz. Se detectó la expresión del gen *nifH* en los suelos adicionados con sacarosa que es congruente con la detección de la actividad nitrogenasa.

3.10 Conclusiones

- La adición de sacarosa y manitol estimuló a la comunidad fijadora de nitrógeno durante los primeros 7 días de la dinámica.
- El rastrojo de maíz no estimuló a la comunidad fijadora de nitrógeno durante los 56 días monitoreados.
- La máxima actividad nitrogenasa, en la mayoría de los casos, se detectó al día 3 de la dinámica en las parcelas adicionadas con sacarosa y manitol.
- No hubo diferencia significativa en la actividad nitrogenasa entre las parcelas con diferentes prácticas agrícolas.
- El contenido de amonio en el suelo se incrementó en los primeros 7 días de la dinámica en las muestras adicionadas con sacarosa y manitol.
- Se detectó la expresión del gen *nifH* en todas las parcelas sometidas a diferentes prácticas agrícolas.

4. Perspectivas

- Capítulo I
 - Realizar ensayos de resiliencia de poblaciones microbianas en los suelos estudiados.
 - Evaluar el efecto del cambio de uso del suelo sobre enzimas encargadas de la mineralización de la materia orgánica.
 - Aislar las especies indicadoras, ya que de algunas de ellas no se tiene mucha información.

- Capítulo II y III
 - Secuenciar el gen *nifH* y determinar si existe algún efecto de las prácticas agrícolas sobre la abundancia y composición de la comunidad fijadora de nitrógeno.
 - Aislar microorganismos fijadores de nitrógeno en aquellas parcelas en las que se registró la mayor actividad nitrogenasa con el fin de utilizarlos como potenciales biofertilizantes.
 - Evaluar el efecto de las prácticas agrícolas sobre los microorganismos fijadores de nitrógeno con nitrogenasas alternativas.
 - En función de que la rotación de cultivo parece afectar la actividad nitrogenasa, realizar un estudio del efecto de plantas de diferente familia botánica sobre la comunidad fijadora de nitrógeno en diferentes suelos.

5. Referencias

- Ansola G, Arroyo P, Sáenz de Miera LE. 2014. Characterization of the soil bacterial community structure and composition of natural and constructed wetlands. *Sci Total Environ.* 473-474:63-71.
- Aulakh MS, Manchanda JS, Garg A, Kumar S, Dercon G, Nguyen M. 2012. Crop production and nutrient use efficiency of conservation agricultura for soybean-wheat rotatiom in the Indo-Gangetic Plains of Northwestern India. *Soil Till Res.* 120:50-60
- Auling G, Busse HJ, Egli T, El-Banna T, Stackebrandt E. 1993. Description of the gram-negative, obligately aerobic, nitriloacetate (NTA)-utilizing bacteria as *Chelatobacter heintzii*, gen. nov., sp. nov., and *Chelatococcus asaccharovorans*, gen. nov., sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 16:104-112.
- Baldrian P, Kolarik M, Stursova M, Kopecky J, Valaskova V, Vetrovsky T, Zifcakova L, Snajdr J, Rídl J, Vlcek C, Voriskova J. 2012. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *ISME Journal.* 6:248-258.
- Bellenger JP, Xu Y, Zhang X, Morel FMM, Kraepiel AML. 2014. Possible contribution of alternative nitrogenases to nitrogen fixation by asymbiotic N₂-fixing bacteria in soils. *Soil Biol Biochem.* 69:413-420
- Borneman J, Triplett EW. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environm Microbiol.* 63:2647-2653.
- Bossio DA, Girvan MS, Verchot L, Bullimore J, Borelli T, Albrecht A, Scow KM, Ball AS, Pretty JN, Osborn AM. 2005. Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya. *Microb Ecol.* 49:50-62.
- Botha WJ, Jaftha JB, Bloem JF, Habig JH, Law IJ. 2004. Effect of soil bradyrhizobia on the success of soybean inoculant strain CB 180. *Microbiol Res.* 159:219–231
- Botton S, van Heusden M, Parsons JR, Smidt H, van Straalen N. 2006. Resilience of Microbial Systems Towards Disturbances. *Crit Rev Microbiol.* 32:101-112
- Bürgmann H, Widmer F, Sigler WV, Zeyer J. 2003. mRNA Extraction and reverse transcription PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. *Appl EnvironMicrobiol.* 4:1928-1935
- Câmara-Ferreira AC, Carvalho-Leite LF, Ferreira de Araújo AS, Eisenhauer N. 2014. Land-use type effects on soil organic carbon and microbial properties in a semi-arid region of northeast Brazil. *Land Degrad & Dev.* Article first published online.
- Campos AC, Etchevers JB, Oleschko KL, Hidalgo CM. 2012. Soil microbial biomass and nitrogen mineralization rates along an altitudinal gradient on the Cofre de Perote volcano (Mexico): the importance of landscape position and land use. *Land Degrad & Dev.* Article first published online.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA,
- Chaundry V, Rehman A, Mishra A, Chauhan PS, Nautiyal CS. 2012. Changes in Bacterial Community Structure of Agricultural Land Due to Long-Term Organic and Chemical Amendments. *Microb Ecol.* 64:450-460.
- Chen XB, Su YR, He XY, Wei YW, Wei WX, Wu JS. 2012. Soil bacterial community composition and diversity respond to cultivation in Karst ecosystems. *World J Microb & Biot.* 28:205-213.

-
- Chen XY, Zhao R, Tian Y, Kong BH, Li XD, Chen ZL, Li YH. 2014. *Mucilaginibacter polytrichastri* sp. nov., isolated from a moss (*Polytrichastrum formosum*), and emended description of the genus *Mucilaginibacter*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64:1395-400.
- Cheng Q. 2008. Perspectives in biological nitrogen fixation research. *J Integr Plant Biol.* 50:786-798
- Clay J. 2004. *World Agriculture and the Environment*. USA. Island Press. pp 16
- CONAFOR, 2009. *Inventario Nacional Forestal y de suelos México 2004-2009*.
- Cox TL, Sly LI. 1997. Phylogenetic Relationships and Uncertain Taxonomy of *Pedomicrobium* Species. *Int J Syst Bacter.* 47:377-380
- Cui Q, Wang L, Huang Y, Liu Z, Goodfellow M. 2005. *Nocardia jiangxiensis* sp. nov. and *Nocardia miyunensis* sp. nov., isolated from acidic soils. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:1921-1925.
- D'haeseleer P, Gladden JM, Allgaier M, Chain PSG, Tringe SG, Malfatti SA, Aldrich JT, Nicora CD, Robinson EW, Paša-Tolić L, Hugenholtz P, Simmons BA, Singer SW. 2013. Proteogenomic analysis of a thermophilic bacterial consortium adapted to deconstruct switchgrass. *PLOS One* 8:e68465.
- Dan D, Zhang DP, Liu WC, Lu C, Zhang TT. 2014. Diversity analysis of bacterial community from permafrost soil of Mo-he in China. *Indian J Microbiol* 54:111-113.
- Dandie C.E., Miller M.N., Burton D.L., Zebarth B.J., Trevors J.T. y Goyer C. 2007. Nitric oxide reductase-targeted real-time PCR quantification of denitrifier populations in soil. *Appl Environ Microbiol.* 13:4250-4258
- De Cáceres M, Legendre P. 2009. Associations between species and groups of sites: índices and statistical inference. *Ecology.* 90:3566-3574
- DeBruyn JM, Nixon LT, Fawaz MN, Johnson AM, Radosevich M. 2011. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. *Appl Environ Microbiol* 77:6295-6300.
- DeBruyn JM, Radosevich M, Wommack KE, Polson SW, Hauser LJ, Fawaz MN, Korlach J, Tsaie YC. 2014. Genome Sequence and Methylome of Soil Bacterium *Gemmatirosa kalamazonensis* KBS708T, a Member of the Rarely Cultivated Gemmatimonadetes Phylum Genome Announc. 2:e00226-14.
- Delmont TO, Prestat E, Keegan KP, Faubladier M, Robe P, Clark IM, Pelletier E, Hirsch PR, Meyer F, Gilbert JA, Paslier DL, Somonet P, Vogel TM. 2012. Park Grass Experiment. *ISME J.* 6:1677-1687
- Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schlibfer KH, Stackebrandt E. 2006. *The prokaryotes*. Springer. Pp16
- Everest GJ, Cook AE, le Roes-Hill M, Meyers PR. 2011. *Nocardia rhamnosiphila* sp. nov., isolated from soil. *Syst Appl Microbiol.* 34:508-12.
- FAO, 2002. *Agricultura de conservación. Estudios de casos en América latina y África*. Boletín de suelos de la FAO. No. 78.
- FAO, 2010. *Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010*. Informe principal.
- Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88:1354–1364.
- Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD. 2004. Microbial diversity in soil: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol.* 42:243-270
- Gebbers R, Beese M. 1988. *Pedomicrobium americanum* sp. nov. and *Pedomicrobium australicum* sp. nov. from Aquatic Habitats, *Pedomicrobium* sp. and *Pedomicrobium ferrugineum*. *Int J of Syst Bacteriol.* 38:303-315
- Govaerts B, Sayre KD, Goudeseune B, De Corte P, Lichter K, Dendooven L, Deckers J. 2009. Conservation agriculture as a sustainable option for the central Mexican highlands. *Soil Till Res.* 103:222-230

-
- Govaerts B, Sayre KD, Lichter K, Dendooven L, Deckers J. 2007. Influence of permanent raised bed planting and residue management on physical and chemical soil quality in rain fed maize/wheat systems. *Plant Soil*. 291:39-54
- Govaerts B, Verhulst N, Castellanos-Navarrete A, Sayre KD, Dixon J, Dendooven L. 2009. Conservation agriculture and soil carbon sequestration: between myth and farmer reality. *Crit Rev Plant Sci*. 28:97-122
- Griffiths BS, Philippot L. 2012. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microb Ecol*. 37:112-129
- Guo JH, Liu XJ, Zhang Y, Shen JL, Han WX, Zhang WF, Christie P, Goulding KWT, Vitousek PM, Zhang FS. 2010. Significant acidification in major Chinese croplands. *Science* 327:1008-1010.
- Gupta RS, Chander P, George S. 2013. Phylogenetic framework and molecular signatures for the class Chloroflexi and its different clades; proposal for division of the class Chloroflexi class. nov. into the suborder Chloroflexineae subord. nov., consisting of the emended family Oscillochloridaceae and the family Chloroflexaceae fam. nov., and the suborder Roseiflexineae subord. nov., containing the family Roseiflexaceae fam. nov. *A Van Leeuw*.103:99-119
- Hayden HL, Drake J, Imhof M, Oxley APA, Norng S, Mele PM. 2010. The abundance of nitrogen cycle genes *amoA* and *nifH* depends on land-uses and soil types in South-Eastern Australia. *Soil Biol Biochem*. 42:1774-1783
- Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*. 311:1-18
- Hobbs PR, Sayre K, Gupta R. 2008. The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. *Phil Trans R Soc*. 363:543-555
- Hofman CS, Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. 57:267-272.
- Hsu SF, Buckley DH. 2009. Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. *ISME J*. 3:124-136
- Itoh T, Yamanoi K, Kudo T, Ohkuma M, Takashina T. 2011. *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field. *Int J Syst Evol Microbiol*. 61:281-1285
- Jetten MSM. 2008. The microbial nitrogen cycle. *Environ Microbiol*. 10:2903-2909
- Khan H, Chung EJ, Kang DY, Jeon CO, Chung YR. 2012. *Mucilaginibacter jinjuensis* sp. nov., with xylan-degrading activity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63:1267-1272.
- Kielak A, Pijl AS, van Veen JA, Kowalchuk GA. 2009. Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *ISME J*. 3:378-382
- Kim MK, Na JR, Lee TH, Im WT, Soung NK, Yang DC. 2007. *Solirubrobacter soli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol*. 57:1453-1455.
- Kocycigit R, Demirci S. 2012. Long-term changes of aggregate-associated and labile soil organic carbon and nitrogen after conversion from forest to grassland and cropland in northern Turkey. *Land Degrad & Dev*. 23:475-482.
- Lagostina L, Goldammer T, Røy H, Evans TW, Lever MA, Jørgensen BB, Petersen DG, Schramm A, Schreiber L.. Ammonia-oxidizing bacteria of the Nitrosospira Cluster 1 dominate over ammonia-oxidizing archaea in oligotrophic surface sediments near the South Atlantic Gyre. *EMIR*. Publicado online

-
- Lakshmi KV, Sasikala Ch, Ramana ChV. 2009. *Rhodoplanes pokkaliisoli* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from a waterlogged brackish paddy soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59:2153-2517.
- Lin YT, Huang YH, Tang SL, Whitman WB, Coleman DC, Chiu CY. 2010. Bacterial Community Diversity in Undisturbed Perhumid Montane Forest Soils in Taiwan. *Microb Ecol.* 59:369-378
- Liu J, Sui Y, Yu Z, Shi Y, Chu H, Jin J, Liu X, Wang G. 2014. High throughput sequencing analysis of biogeographical distribution of bacterial communities in the black soils of northeast China. *Soil Biol Biochem.* 70:113-122.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Lee JS, Senthilkumar M, Lee KC, Sundaram S. 2010. *Mucilaginibacter gossypii* sp. nov. and *Mucilaginibacter gossypicola* sp. nov., plant-growth-promoting bacteria isolated from cotton rhizosphere soils. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60:2451-7.
- Malhi SS, Grant CA, Johnston AM, Gill KS. 2001. Nitrogen fertilization management for no-till cereal production in the Canadian Great Plains: a review. *Soil Till Res.* 60:101-122
- Moebius-Clune BN, van Es HM, Idowu OJ, Schindelbeck RR, Kimetu JM, Ngoze S, Lehmann J, Kinyangi JM. 2011. Long-term soil quality degradation along a cultivation chronosequence in western Kenya. *Agr Ecosyst Environ.* 141:86-99.
- Monneveux P, Quillérou E, Sanchez C, Cesati-Lopez J. 2006. Effect of zero tillage and residues conservation on continuous maize cropping in a subtropical environment (Mexico). *Plant Soil.* 279:95-105
- Nacke H, Thürmer A, Wollherr A, Will C, Hodac L, Herold N, Schöning I, Schrupf M, Daniel R. 2011. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS ONE* 6:e17000.
- Naether A, Foessel BU, Naegele V, Wüst PK, Weinert J, Bonkowski M, Alt F, Oelmann Y, Polle A, Lohaus G, Gockel S, Hemp A, Kalko EKV, Linsenmair KE, Pfeiffer S, Renner S, Schöning I, Weisser WW, Wells K, Fischer M, Overmann J, Friedricha MW. 2012. Environmental Factors Affect Acidobacterial Communities below the Subgroup Level in Grassland and Forest Soils. *Appl Environ Microbiol.* 78:7398-7406
- Naether A., Foessel B.U., Naegele V., Wust P.K., Weinert J., Bonkowski M., Alt F., Oelmann Y., Polle A., Lohaus G., Gockel S., Hemp A., Kalko E.K.V., Linsenmair K.E., Pfeiffer S., Renner S., Schöning I., Weisser W.W., Wells K., Fischer M., Overmann J., y Friedrich M.W. 2012. Environmental Factors Affect Acidobacterial Communities below the the subgroup level in grassland and forest soils. *Appl Environ Microbiol.* 78:7398-7406
- Navarro-Noya YE, Gómez-Acata S, Montoya-Ciriaco N, Rojas-Valdez A, Suárez-Arriaga MC, Valenzuela-Encinas C, Jiménez-Bueno N, Verhulst N, Govaerts B, Dendooven L. 2013. Relative impacts of tillage, residue management and crop rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. *Soil Biol Biochem.* 65:86-95.
- Nicolardot B, Bouziri L, Bastian F, Ranjard L. 2007. A microcosm experiment to evaluate the influence of location and quality of plant residues on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. *Soil Biol Biochem.* 39:1631-1644
- Nourbakhsh F. 2006. Decoupling of soil biological properties by deforestation. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 121:435-438
- Nüsslein K, Tiedje JM. 1999. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl Environ Microbiol.* 65:3622-3626.

-
- Ohta H, Hattori T. 1983. *Agromonas oligotrophica* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing oligotrophic bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 49:429-46.
- Okano Y, Hristova KR, Leutenegger CM, Jackson LE, Denison RF, Gebreyesus B, Lebauer D, Scow KM. 2004. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol*. 2:1008-1016
- Okubo T, Fukushima S, Itakura M, Oshima K, Longtonglang A, Teaumroong N, Mitsui H, Hattori M, Hattori R, Hattori T, Minamisawa K. 2013. Genome analysis suggests that the soil oligotrophic bacterium *Agromonas oligotrophica* (*Bradyrhizobium oligotrophicum*) is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol* 79:2542-2551
- Okubo T, Tsukui T, Maita H, Okamoto S, Oshima K, Fujisawa T, Saito A, Futamata H, Hattori R, Shimomura Y, Haruta S, Morimoto S, Wang Y, Sakai Y, Hattori M, Aizawa S, Nagashima KVP, Masuda S, Hattori T, et al. 2012. Complete Genome Sequence of *Bradyrhizobium* sp. S23321: Insights into Symbiosis Evolution in Soil Oligotrophs. *Microbes Environ*. 27:306–315.
- Oren A, Xu XW. 2014. The family Hyphomicrobiaceae. En: Rosenberg E. Et al (eds). *The prokariotes*. Springer Berlin Heidelberg. Pp 247-281
- Ormeño-Orrillo E, Rogel-Hernández MA, Lloret L, López-López A, Martínez J, Barois I, Martínez-Romero E. 2012. Change in land use alters the diversity and composition of *Bradyrhizobium* communities and led to the introduction of *Rhizobium etli* into the tropical rain forest of Los Tuxtlas (Mexico). *Microb Ecol* 63:822-834.
- Orr CH, James A, Leifert C, Cooper JM, Cummings SP. 2011. Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Appl Environ Microbiol*. 3:911-919
- Panday D, Das SK. 2010. *Chelatococcus sambhunathii* sp. nov., a moderately thermophilic alphaproteobacterium isolated from hot spring sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*. 60:861–865
- Pankratov TA, Tindall BJ, Liesack W, Dedysh SN. 2007. *Mucilaginibacter paludis* gen. nov., sp. nov. and *Mucilaginibacter gracilis* sp. nov., pectin-, xylan- and laminarin-degrading members of the family Sphingobacteriaceae from acidic Sphagnum peat bog. *Int J Syst Evol Microbiol*.. 57:2349-2354.
- Park CS, Han K, Ahn TY. 2014. *Mucilaginibacter koreensis* sp. nov., isolated from leaf mould. *Int J Syst Evol Microbiol*. 64:2274-2279.
- Powlson DS, Brookes PC, Whitmore AP, Goulding KWT, Hopkins DW. 2011. Soil Organic Matters. *Eur J Soil Sci*. 62:1-4.
- Ramírez-Bahena MH, Chahboune R, Peix A, Velázquez E. 2013. Reclassification of *Agromonas oligotrophica* into the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium oligotrophicum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63:1013-6.
- Reed SC, Cleveland CC, Townsend AR. 2011. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. *Annu Rev Ecol Syst*. 42:489-512
- Reicosky DC, Saxton KE. 2007. The benefits of no-tillage. En: Baker et al. (Ed). *No-tillage seeding in conservation agriculture*. FAO and CAB International. London, UK. pp. 11-22
- Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG, Triplett EW. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J*. 1:283-290

-
- Rodrigues JLM, Pellizari VH, Mueller R, Baek K, da C Jesus E, Paula FS, Mirza B, Hamaoui GS, Tsai SM, Feigl B, Tiedje JM, Bohannan BJM, Nüsslein K. 2012. Conversion of the Amazon rainforest to agricultura results in biotic homogeinization of soil bacterial communities. PNAS. 110:988-993
- Russo SE, Legge R, Weber KA, Brodie EL, Goldfarb KC, Benson AK, Tan S. 2012. Bacterial community structure of contrasting soils underlying Bornean rain forests: Inferences from microarray and next-generation sequencing methods. Soil Biol Biochem. 55:48-59
- Sambrook J, Rusell DW. 2001 Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, eds).
- SAS Institute. 1989. Statistic Guide for Personal Computers, Version 6.04, Ed., SAS Institute, Cary.
- Schramm A, de Beer D, Wagner M, and Amann R. 1998. Identification and Activities In Situ of Nitrosospira and Nitrospira spp. as Dominant. Populations in a Nitrifying Fluidized Bed Reactor. Appl Environ Microbiol.64: 3480–3485.
- Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR. 2009. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. Annu Rev Biochem. 78:701-722
- SEMARNAT, 2012. Sexto informe de labores. México.
- Shange RS, Ankumah O, Ibekwe AM, Zabawa R, Dowd SE. 2012. Distinct soil bacterial communities revealed under a diversely managed agroecosystem. PLoS ONE 7: e40338.
- Shaw LJ, Nicol GW, Smith Z, Fear J, Prosser JI, Baggs EM.. 2006. Nitrosospira spp. can produce nitrous oxide via a nitrifier denitrification pathway. Environ Microbiol. 8:214-22.
- Shiva S, Reddy GS, Aduri RP, Kutty R, Ravensschlag K. 2004. Bacterial diversity of a soil simple from Schirmacher Oasis, Antarctica. Cell Mol Biol. 50:525-536.
- Singleton DR, Furlong MA, Peacock AD, White DC, Coleman DC, Whitman WB.2003. Solirubrobacter pauli gen. nov., sp. nov., a mesophilic bacterium within the Rubrobacteridae related to common soil clones. Int J Syst Evol Microbiol. 53:485-90.
- Srinivas A, Sasikala C. 2014. *Rhodoplanes oryzae* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from the rhizosphere soil of paddy. Int J Syst Evol Microbiol. 64:2198-203.
- Steven B, Gallegos-Graves L, Yeager C, Belnap J, Kuske CR. 2014. Common and distinguishing features of the bacterial and fungal communities in biological soil crusts and shrub root zone soils. Soil Biol Biochem. 69:302-312.
- Tain Y, Gao L. 2014. Bacterial diversity in the rhizosphere of cucumbers grown in soils covering a wide range of cucumber cropping histories and environmental conditions. Microb Ecol. 68:794-806
- Takaichi S, Sasikala Ch, Ramana ChV, Okamura K, Hiraishi A. 2012. Carotenoids in Rhodoplanes Species: Variation of Compositions and Substrate Specificity of Predicted Carotenogenesis Enzymes. Curr Microbiol. 65:150-155
- Tamura T, Hatano K, Suzuki K. 2006.A new genus of the family Micromonosporaceae, *Polymorphospora* gen. nov., with description of *Polymorphospora rubra* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 56:1959-1964.
- Thomas GW. 1996. Soil pH and soil acidity. En: Sparks D.K. (Ed). Methods of soil analysis: chemical methods. Part 3. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin. pp 475-490
- Trujillo ME, Hong K, Genilloud O. 2014. The family Micromonosporaceae. En: Rosenberg E. et al. (eds).The prokariotes. Springer Berlin Heidelberg. Pp 499-569

- Urakawa H, Garcia JC, Nielsen JL, Le VQ, Kozłowski JA, Stein LY, Lim CK, Pommerening-Röser A, Martens-Habbenha W, Stahl DA, Klotz MG. 2014. *Nitrosospira lacus* sp. nov., a psychrotolerant ammonia-oxidizing bacterium from sandy lake sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 65:242-250
- Uri N.D. 1999. Conservation tillage in United States agriculture. New York. pp 1-3
- Valenzuela-Encinas C, Neria-González I, Alcántara-Hernández RJ, Enríquez-Aragón JA, Estrada-Alvarado I, Hernández-Rodríguez C, Dendooven L, Marsch R. 2009. Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles.* 12:247-254.
- Wakelin SA, Gupta VVSR, Forrester ST. 2010. Regional and local factors affecting diversity, abundance and activity of free-living, N₂-fixing bacteria in Australian agricultural soils. *Pedobiologia.* 53:391-399.
- Wallenius K, Rita H, Mikkonen A, Lappi K, Lindström K, Hartikainen H, Raateland A, Niemi RM. 2011. Effects of land use on the level, variation and spatial structure of soil enzyme activities and bacterial communities. *Soil Biol Biochem.* 43:1464-1473.
- Wallenstein MD, Vitgalys RJ. 2005. Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soil. *Pedobiologia.* 49:665-672
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environm Microbiol.* 73:5261–5267.
- Wang X, Jia F, Liu C, Zhao J, Wang L, Shen Y, Wang J, Zhang J, Li C, Xiang W. 2013. *Xiangella phaseoli* gen. nov., sp. nov., a member of the family Micromonosporaceae. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63:2138-2145
- Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 7:335–336.
- Will C, Thurmer A, Wollherr A, Nacke H, Herold N, Schrupf M, Gutknecht J, Wubet T, Buscot F, Daniel R. 2010. Horizon-Specific Bacterial Community Composition of German rassland Soils, as Revealed by Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA Genes. *Appl Environm Microbiol.* 76:6754-6759
- Wright RJ, Stuczynski T. 1996. Atomic absorption and flame emission spectrometry. In *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods Part 3*, Sparks DL (ed). Soil Science Society of America Inc, American Society of Agronomy, Inc Madison, Wisconsin, USA. 65-90.
- Yang Y, Huang S, Zhang Y, Xu F. 2014. Nitrogen Removal by *Chelatococcus daeguensis* TAD1 and Its Denitrification Gene Identification. *Appl Biochem Biotech.* 172:829-839
- Yoon JH, Kang SJ, Im WT, Lee ST, Oh TK.. 2008. *Chelatococcus daeguensis* sp. nov., isolated from wastewater of a textile dye works, and emended description of the genus *Chelatococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58:2224-2228.
- Yoon JH, Kang SJ, Jung SY, Oh TK. 2007. *Humicoccus flavidus* gen. nov., sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57:56-59.
- Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol.* 5:539-554
- Zhang H, Sekiguchi Y, Hanada S., Hugenholtz P, Kim H, Kamagata Y, Nakamura K. 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53:1155-1163
- Zhang L, Zhu L, Si M, Li C, Zhao L, Wei Y, Shen X. 2014. *Solirubrobacter taibaiensis* sp. nov., isolated from a stem of *Phytolacca acinosa* Roxb. *A Van Leeuw.* 106:279-285

6. ANEXO

Tabla 6.1 Afiliación taxonómica de los géneros más abundantes en todos los tratamientos

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
<i>Proteobacteria</i>	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>
<i>Proteobacteria</i>	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Sinobacteraceae	<i>Steroidobacter</i>
<i>Proteobacteria</i>	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Massilia</i>
<i>Proteobacteria</i>	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrospira</i>
<i>Proteobacteria</i>	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_incertae_sedis	<i>Methylibium</i>
<i>Proteobacteria</i>	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>
<i>Proteobacteria</i>	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	<i>Pseudolabrys</i>
<i>Proteobacteria</i>	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	<i>Rhodoplanes</i>
<i>Proteobacteria</i>	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>
<i>Gemmatimonadetes</i>	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	<i>Gemmatimonas</i>
<i>Firmicutes</i>	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>
<i>Bacteroidetes</i>	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Mucilaginibacter</i>
<i>Bacteroidetes</i>	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	<i>Terrimonas</i>
<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	<i>Ktedonobacter</i>
<i>Actinobacteria</i>	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>
<i>Actinobacteria</i>	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>

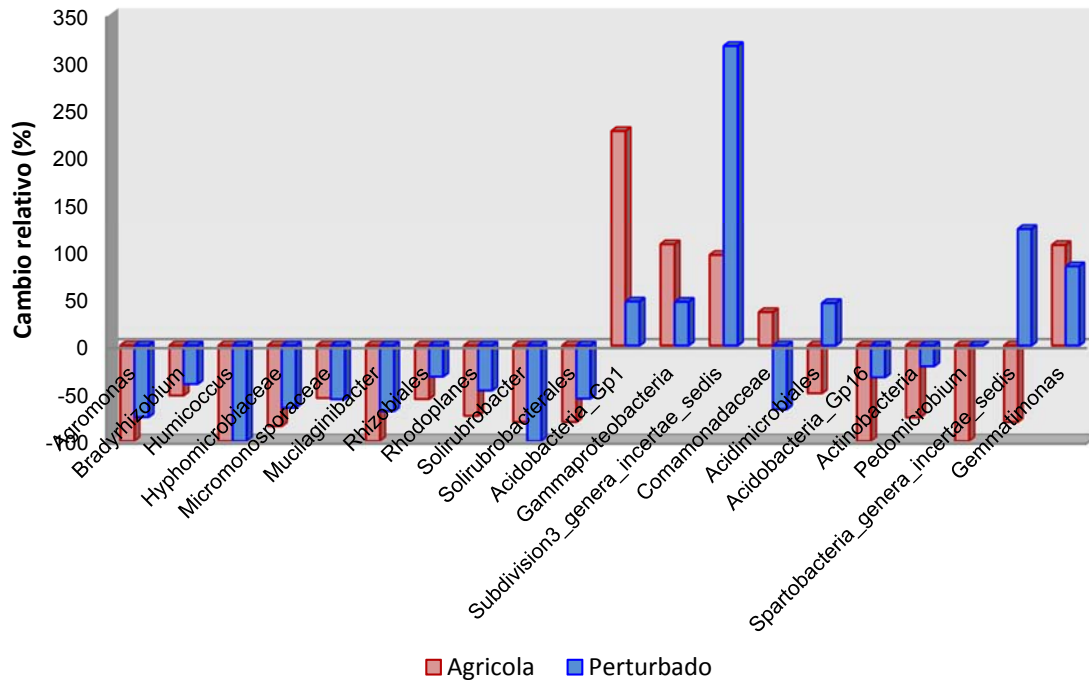


Figura 6.1. Resistencia de las especies indicadoras expresada como cambio relativo.

Tabla 6.2 Coeficiente phi de indicadores de especies por uso de suelo

Tratamiento	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	phi	P
Agrícola	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Gp1	Other	Other	0.587	0.001
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrosospira</i>	0.426	0.008
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Other	Other	Other	0.412	0.013
Perturbado	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	<i>Chelatococcus</i>	0.457	0.010
	Verrucomicrobia	Subdivision3	Subdivision3_genera_incertae_sedis	Other	Other	0.442	0.007
Forestal	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	<i>Rhodoplanes</i>	0.598	0.001
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Other	Other	0.531	0.001
	Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Mucilaginibacter</i>	0.524	0.002
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Other	0.511	0.002
	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nakamurellaceae	<i>Humicoccus</i>	0.508	0.005
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>	0.504	0.001
	Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	<i>Solirubrobacter</i>	0.490	0.002
	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micromonosporaceae	Other	0.472	0.005
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Agromonas</i>	0.457	0.002
	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i>	0.443	0.003
	Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	Other	Other	0.442	0.007
	Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales_incertae_sedis	Ilumatobacter	Other	0.410	0.014

Tabla 6.3 Coeficiente phi de indicadores de especies compartidas entre uso de suelo

Tratamiento	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	phi	P
Agrícola-perturbado	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	<i>Gemmatimonaa</i>	0.520	0.002
Agrícola-forestal	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Other	0.416	0.016
Perturbado-forestal	Actinobacteria	Actinobacteria.	Other	Other	Other	0.578	0.001
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	<i>Pedomicrobium</i>	0.438	0.012
	Verrucomicrobia	Spartobacteria	Spartobacteria_genera_incertae_sedis	Other	Other	0.407	0.018
	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp16	Gp16	Other	Other	0.402	0.024
	Actinobacteria..	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Other	Other	0.401	0.027

Tabla 6.4 Información relevante de las especies indicadoras detectadas por uso de suelo

Tratamiento	Taxon	Datos relevantes	Referencia
<i>Forestal</i>	<i>Rhodoplanes</i>	Bacteria purpura no del azufre, fototrófica; aislada de arrozales, estanque de peces de agua dulce y efluentes industriales; productor de carotenoides	Srinivas et al., 2014; Chakravarthy et al., 2012; Takaichi et a., 2012; Lakshmi et al., 2009
	<i>Mucilaginibacter</i>	Aislados de turberas, residuos de arroz, humedales de agua dulce, suelos, rizósfera de algodón, moho de hoja y musgo; capaces de degradar pectina, xilano y laminarina,	Chen et al., 2014; Park et al., 2014; Khan et al., 2013; Madhaiyan et al., 2010; Pankratov et al.,2007
	<i>Humicoccus</i>	Aislado de suelos de Korea	Yoon et al., 2007
	<i>Bradyrhizobium</i>	Fijación de nitrógeno; oligotrofos, nitrificación, oxidación de azufre	Okubo et al., 2012; Botha et al., 2004
	<i>Solirubrobacter</i>	Aislado de suelos con ginseg, madriguera de lombrices, de tallo de <i>Phylotacca</i>	Zhang et al., 2014; Kim et al., 2007; Singleton et al., 2003
	<i>Agromonas</i>	Reclasificada a <i>Bradyrhizobium</i> ; bacteria oligotrófica, fijadora de nitrógeno, aislada de arrozales	Okubo et al., 2013; Ramírez-Bahena et al., 2013; Otha y Hattori et al.,1983
	<i>Nocardia</i>	Aislado de suelos ricos en materia orgánica, compostas, suelos forestales	Everest et al., 2011; Cui et al., 2005
	Hyphomicrobiaceae	Distribuidos en suelos, lagos; crecen con bajas concentraciones de carbono, quimioheterótrofos, anaerobios, desnitrificadores	Oren y Xu, 2014
	Micromonosporaceae	Aislados de sedimentos, rizósfera, tejidos de plantas, cuerpos de agua; algunas especies degradan quitina, celulosa, lignina, pectina	Trujillo et al., 2014; Wang et al., 2013; Tamura et al., 2006
<i>Agrícola</i>	Acidobacteria Gp1	Abundante en suelos agrícolas, forestales/; su abundancia se correlaciona negativamente con el pH; oligótrofos	Naether et al., 2012; Jones et al., 2009; Kielak et al., 2009
	<i>Nitrosospira</i>	Aislada de sedimentos ; bacteria oxidadora del amonio Productora de oxido nitroso vía desnitrificación	Urakawa et al., 2014; Shaw et al., 2006; Schramm et al., 1998
<i>Perturbado</i>	<i>Chelatococcus</i>	Aislado de aguas residuales de la industria textil, de aguas termales, de suelo; desnitrificación aerobia	Yang et al., 2013; Panday y Das,2010; Yoon et al., 2008; Auling et al., 1993
<i>Forestal-agrícola</i>	Comamonadaceae	Bacterisa heterotróficos, fotosintéticas,, quimiolitotróficos	Dworkin et al., 2006
<i>Forestal-perturbado</i>	<i>Pedomicrobium</i>	Asilado de suelos de podzol, ambientes acuáticos, de biofilm de Mn	Cox y Sly, 1997; Gebers y Beese ,1988
	Acidobacteria Gp16	Reportado en suelos agrícolas, forestales, de pastoreo	Nacke et al.,2011; Jones et al., 2009
	Acidimicrobiales	Reportado en ambientes ácidos; capaces de oxidar y reducir fierro	Itoh et al., 2011
<i>Agrícola-perturbado</i>	<i>Gemmatimonas</i>	Aislado de un reactor operado para eliminación biológica de fosforo de aguas residuales y de suelo	DeBruyn et al.,2014; Zhang et al., 2003

Tabla 6.5 Análisis de varianza y prueba poshoc a los valores de actividad de la nitrogenasa en suelos sometidos a diferentes prácticas agrícolas

Sitio de estudio	Tratamiento	Valor de P	Prueba poshoc Tukey	Valor de P
CENEB	Manejo de residuos	0.120		
	Labranza	0.363		
	Fertilización con nitrógeno	0.174		
Australia	Labranza	0.074		
	Rotación de cultivo	0.021	Monocultivo algodón vs trigo algodón	0.021
CENEB-EI Batán	Fertilización con nitrógeno	1.06 E-6	0-150 kg N ha ⁻¹	0.000001
			0-300 kg N ha ⁻¹	0.1553
			150-300 kg N ha ⁻¹	0.00007
	Labranza	0.681		
	Rotación de cultivo	0.059		
El Batán-Australia	labranza	0.0028	Máxima-cero	0.031
			Máxima-convencional	0.001
			Mínima-convencional	0.055
	Rotación	0.0103	Monocultivo algodón vs maíz-trigo	0.011
			Monocultivo algodón-monocultivo maíz	0.058
	Sitio	0.007		
CENEB-Australia	Rotación	0.002	Maíz-trigo vs trigo-algodón	0.003
	Labranza	0.002	Mínima-cero	0.005
			Mínima-convencional	0.003
	Sitio	0.002		