



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL IPN

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

LA DESNITRIFICACIÓN EN UN SUELO FORESTAL.
“PINAL DEL ZAMORANO”, QUERÉTARO.

TESIS QUE PRESENTA EL
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA
CONRADO MANUEL GUZMÁN FLORES

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS.**

DEDICATORIA:

**Ya sea que comáis, que bebáis o que hagáis cualquier otra cosa,
hacedlo todo para la gloria de Dios. *1 Corintios 10:31***

**A Dios, sin él no habría nada que estudiar, nada de lo cuál
maravillarnos y nada de lo cuál estar agradecidos.**

**A mis papás porque son los mejores papás del mundo, siempre
han proveído de buenos consejos para mí y mis hermanos,
siempre han estado ahí. Es una bendición compartir esta vida
con ellos.**

**A mis hermanos porque esta tesis celebra y comparte nuestro
deseo y gratitud de hacer lo que nos gusta.**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan José Peña Cabriaes por la oportunidad de realizar mi investigación de tesis en su laboratorio. Por toda su paciencia a la hora de enseñarme y su entusiasmo por profundizar en el conocimiento. Por su afán de siempre mejorar y por su rigor a la hora de evaluar. Por sus buenos consejos en lo profesional y lo personal.

Al Dr. Víctor Jaramillo Luque por todo su entusiasmo en este proyecto, por sus invaluable consejos y puntos de vista que le dieron a esta investigación una dirección y un propósito. Por su apoyo en la captura del marco teórico, los métodos, los análisis, los resultados y la discusión.

Al Dr. John Paul Délano Frier y a la Dra. Gabriela Olmedo Álvarez por su labor como miembros del comité tutorial. Por sus acertados comentarios y sus valiosas críticas. Por sus preguntas que enriquecieron grandemente la investigación.

Al maestro José Antonio Vera Núñez por siempre creer en la realización de esta investigación, por acompañarme a la primera evaluación del sitio de estudio, por recordarme el objetivo y los alcances del proyecto. Por siempre brindar ayuda en todos los métodos y por la medición de las muestras de emisión.

A Luis Hernández, Francisco Saldaña y Fernando Barajas por ser un excelente equipo de muestreo en campo. Soportar la lluvia, la montaña, el frío, el peso del equipo de medición y otros imprevistos. Espero que se la hayan pasado tan bien como yo.

A Luis Hernández por ser el mejor auxiliar de laboratorio, por tener el material y reactivos siempre en orden y a la mano, por su profesionalismo en todas las compras y cuestiones administrativas. Sobre todo por su compañerismo y por mantener un ambiente de laboratorio alegre.

A mis compañeros de laboratorio Coyolxauhqui Barrera y Sergio Hernández a los cuales admiró muchísimo. A Sergio por siempre brindar ayuda, a ambos por sus buenos consejos, su sabiduría y sobretodo por su admirable calidad humana.

A todos mis compañeros de laboratorio: Abraham García, Magdalena Cervantes, Anibal Silva, Carlos Chávez, Luis León, Mónica Uribe y David Camarena. Todos ellos son excelentes personas y queridos compañeros.

Al único e incomparable Conrad's Club: Ahiko, Melany, Javi, Erasmo, Rigel, Vivi, Estela, Frank y Quetzeli. Mis mejores amigos en la maestría. Las buenas amistades suceden por buenas razones.

A todo el cuerpo del CINVESTAV: investigadores, administrativos, intendencia, auxiliares y estudiantes. Somos el mejor centro de investigación del país.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por todo el soporte financiero que hace posible que yo y mis compañeros estudiantes podamos realizar nuestros estudios de posgrado.

A Dios porque él es el que hizo la tierra con su poder, el que estableció el mundo con su sabiduría, y con su inteligencia extendió los cielos. ¡Cuán numerosas son tus obras, oh Señor! Con sabiduría las has hecho todas, llena está la tierra de tus posesiones.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS	1
AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE GENERAL	4
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE CUADROS	8
GLOSARIO	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
I. ANTECEDENTES	14
1. El Ciclo del Nitrógeno	14
1.1 Fijación	15
1.2 Asimilación	16
1.3 Mineralización	16
1.4 Nitrificación	16
1.5 Desnitrificación	17
2. La Desnitrificación	17
2.1 Factores Ambientales	18
2.1.1 Factores Próximos	18
2.1.2 Factores Distales	19
2.2 Factores Biológicos	20
3. La Emisión de NO:N ₂ O:N ₂	22
3.1 El depósito atmosférico y la desnitrificación	24
4. La Desnitrificación en Ecosistemas Naturales	25
5. Los Ecosistemas Forestales de México	26
II. JUSTIFICACIÓN	28
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS	29
1. Pregunta de Investigación	29
2. Hipótesis	29

IV. OBJETIVOS	30
1. Objetivo General	30
2. Objetivos Particulares	30
V. MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Sitio de Estudio	31
2. Muestreo	34
3. Métodos	36
3.1 Reducción de acetileno	36
3.2 Medición de la emisión <i>in vitro</i>	36
3.3 Cuantificación por cromatografía de gases	37
3.4 Propiedades fisicoquímicas del suelo	38
3.5 Conteo de bacterias totales y desnitrificantes	39
3.6 Medición de la actividad desnitrificante	40
3.7 Respiración del suelo	41
3.8 Análisis estadísticos	42
VI. RESULTADOS	43
1. Emisión de Óxido Nitroso (N ₂ O) y Nitrógeno Molecular (N ₂)	43
1.1 Emisión de N ₂ O	43
1.2 Emisión de N ₂	44
2. Factores Ambientales	45
2.1 Propiedades físicas del suelo	45
2.2 Dinámica de oxígeno en el suelo	46
2.2.1 Contenido de humedad	46
2.2.2 Densidad Aparente	47
2.3 Fertilidad del suelo	48
2.3.1 Nitrógeno	48
i) Nitrógeno total	48
ii) Amonio (NH ₄ ⁺)	49
iii) Nitrato (NO ₃ ⁻)	50
2.3.2 Carbono	51
i) Materia orgánica del suelo (MOS)	51

ii) Carbono orgánico del suelo (COS)	52
2.4 Relación carbono:nitrógeno (C:N)	53
2.5 Temperatura y pH	53
2.5.1 Temperatura	53
2.5.2 pH	54
3. Factores Biológicos	55
3.1 Bacterias totales	55
3.2 Bacterias desnitrificantes	55
3.3 Actividad desnitrificante	56
3.4 Respiración del suelo	57
4. Análisis de correlación y componentes principales	58
4.1 Análisis de Correlación de Pearson	58
4.2 Análisis de Componentes Principales	60
IX. DISCUSIÓN GENERAL	62
X. BIBLIOGRAFÍA	65
XI. ANEXOS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema general de los procesos biológicos del ciclo del nitrógeno.	15
Figura 2.	Factores ambientales y biológicos que favorecen el proceso de desnitrificación en suelos.	18
Figura 3.	Secuencia de reducción de NO_3^- a N_2 por el proceso de desnitrificación.	20
Figura 4.	Enzimas responsables de cada uno de los pasos de la desnitrificación.	21
Figura 5.	Mapa de localización del Pinal del Zamorano entre los Estados de Querétaro y Guanajuato.	33
Figura 6.	Ubicación de los doce sitios de muestreo en la montaña del Pinal del Zamorano.	36
Figura 7.	Emisión de N_2O por tipo de cobertura vegetal.	43
Figura 8.	Emisión de N_2 por tipo de cobertura vegetal.	44
Figura 9.	Contenido de humedad del suelo por tipo de cobertura vegetal.	47
Figura 10.	Densidad aparente del suelo por tipo de cobertura vegetal.	48
Figura 11.	Contenido de nitrógeno total del suelo por tipo de cobertura vegetal.	49
Figura 12.	Contenido de amonio (NH_4^+) en el suelo por tipo de cobertura vegetal.	50
Figura 13.	Contenido de nitratos (NO_3^-) en el suelo por tipo de cobertura vegetal.	51
Figura 14.	Materia orgánica del suelo por tipo de cobertura vegetal.	52
Figura 15.	Temperatura del suelo por tipo de cobertura vegetal.	54
Figura 16.	Población de bacterias cultivables totales por tipo de cobertura vegetal.	55
Figura 17.	Población de bacterias desnitrificantes cultivables por tipo de cobertura vegetal.	56
Figura 18.	Actividad desnitrificante por tipo de cobertura vegetal.	58
Figura 19.	Respiración del suelo por tipo de cobertura vegetal.	65
Figura 20.	Análisis de componentes principales.	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I.	TIPOS DE COBERTURA VEGETAL ESTABLECIDOS PARA EL ESTUDIO DE LA DESNITRIFICACIÓN DEL PINAL DEL ZAMORANO Y SUS RESPECTIVAS ALTITUDES	34
Cuadro II.	MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES DEL SUELO.	38
Cuadro III.	COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS DESNITRIFICANTES.	39
Cuadro IV.	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS DOCE SITIOS DE MUESTREO.	45
Cuadro V.	TEXTURA Y TIPO DE SUELO EN LOS DOCE SITIOS DE MUESTREO.	46
Cuadro VI.	CONTENIDO DE CARBONO ORGÁNICO DEL SUELO POR TIPO DE COBERTURA VEGETAL EN LOS TRES SITIOS DE MUESTREO.	52
Cuadro VII.	RELACIÓN CARBONO NITRÓGENO (C:N) POR TIPO DE COBERTURA VEGETAL EN LOS TRES SITIOS DE MUESTREO.	53
Cuadro VIII.	CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LAS VARIABLES.	59
Cuadro IX.	CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES Y LOS FACTORES DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.	61

GLOSARIO

C:N	Relación carbono nitrógeno
C ₂ H ₂	Acetileno
CO ₂	Dióxido de carbono
COS	Carbono Orgánico del Suelo
KNO ₃	Nitrato de potasio
MOS	Materia Orgánica del Suelo
msnm	metros sobre el nivel del mar
N _T	Nitrógeno total
N ₂	Nitrógeno molecular
N ₂ O	Óxido nitroso
Nar	Enzima nitrato reductasa
NH ₄ ⁺	Amonio
Nir	Enzima nitrito reductasa
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
Nor	Enzima óxido nítrico reductasa
Nos	Enzima óxido nitroso reductasa
<i>NosZ</i>	Gen que codifica la Nos
O ₂	Oxígeno molecular
TCD	Detector de termoconducción
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

La desnitrificación es el último proceso del ciclo del nitrógeno donde el nitrato (NO_3^-) presente en el suelo es reducido por un grupo filogenéticamente diverso de microorganismos a las formas gaseosas de óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y nitrógeno molecular (N_2). El NO es un gas altamente reactivo y el N_2O es un gas de efecto invernadero. La estimación de estas emisiones en ecosistemas naturales permite conocer y cuantificar sus pérdidas a la atmósfera. Existen pocos estudios de este fenómeno en los bosques templados de montaña en las regiones subtropicales del mundo. Los datos presentados en esta investigación representan la primera cuantificación de un bosque templado de montaña en México. El sitio de estudio es la montaña del Pinal del Zamorano ubicada entre los Estados de Querétaro y Guanajuato. Se determinaron cuatro tipos de cobertura vegetal en un gradiente altitudinal de 2600 a 3200msnm, con herbáceas anuales en la base de la montaña, seguido de matorrales de transición, bosque de encino y bosque de oyamel. Se tomaron muestras de suelo en tres sitios de estudio por tipo de cobertura vegetal al final de la temporada de lluvias en los meses de septiembre, octubre y noviembre del 2014. Las mediciones de N_2O se hicieron *in vitro* en 30g de suelo saturado a las 24 horas y se cuantificaron por cromatografía de gases. Se determinaron las propiedades físicoquímicas y nutricionales del suelo, se cuantificaron las poblaciones bacterianas desnitrificantes cultivables y se midió la actividad bacteriana desnitrificante. El suelo de herbáceas presentó la mayor emisión de N_2O ($0.76 \text{ ng N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), seguida del suelo de arbustos de transición ($0.61 \text{ ng N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), el suelo del bosque de oyamel ($0.51 \text{ ng N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). y el suelo del bosque de encino ($0.12 \text{ ng N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Estos datos correlacionaron positivamente con la densidad aparente del suelo, el contenido de arcillas y el pH, mientras que hubo una correlación negativa con el contenido de arena. El suelo de herbáceas y arbustos presentó la mayor actividad bacteriana desnitrificante seguida del suelo del bosque de oyamel, mientras que el suelo del bosque de encino presentó la actividad más baja, estos resultados siguen la misma tendencia que los valores de emisión. El suelo del bosque de oyamel presentó las concentraciones más altas de nitrógeno y NH_4^+ , condiciones que favorecen la desnitrificación, quizá por esto presentó tasas de emisión de N_2O semejantes a herbáceas y arbustos.

ABSTRACT

Denitrification is the final process in the global nitrogen cycle. Nitrate (NO_3^-) present in soil is reduced by a wide array of phylogenetically diverse microorganisms to the gaseous forms of nitric oxide (NO), nitrous oxide (N_2O), and molecular nitrogen (N_2). NO is a highly reactive gas, and N_2O has a greenhouse effect. The quantification of these emissions in natural ecosystems helps our understanding of nitrogen losses to the atmosphere. There are few studies that measure denitrification in mountain temperate forests in the tropics and subtropics. This investigation represents the first estimate of N_2O emissions in a mountain temperate forest in Mexico. Our study site was the Pinal del Zamorano Mountain located between the States of Queretaro and Guanajuato. Four types of vegetation cover were established along an elevation gradient from 2600 to 3200masl: annual grasses at the base of the mountain, transition shrubs, oak forest, and fir forest (*Abies religiosa*). Soil samples were collected in three study sites from each type of vegetation cover at the end of the 2014 rainy season between September and November. N_2O measurements were taken *in vitro* from 30g of saturated soil after 24 hours, and quantified by gas chromatography. Physicochemical and nutritional soil properties were measured, cultured denitrifying bacteria were counted, and bacteria denitrifying activity was quantified. Soil in grasses presented the highest N_2O emission ($0.76 \text{ ng N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), followed by transition shrubs ($0.61 \text{ ng N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), fir forest ($0.51 \text{ ng N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), and oak forest soil ($0.12 \text{ ng N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). These data positively correlated with soil bulk density, clay content, and pH. Sand content had a negative correlation. Grasses and Shrubs soils had the highest denitrifying activity, followed by fir forest. Oak forest soil had the lowest denitrifying activity, and these results match those of N_2O emissions. Fir forest soil had the highest nitrogen and NH_4^+ content, both factors favor denitrification. Maybe this is why fir forest soil had similar emissions to those in grasses and shrubs soils.

INTRODUCCIÓN

La emisión de los principales gases de efecto invernadero (CO_2 , N_2O , CH_4) a la atmósfera por fuentes antropogénicas se ha elevado sustancialmente en el último siglo a causa de la revolución industrial y el uso de combustibles fósiles (Ehhalt & Prather, 2001). En 1988, ante la posibilidad de un cambio climático debido al incremento en la concentración de estos gases en la atmósfera, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y la Organización Meteorológica Mundial (WMO) crearon el Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC) con el objetivo de formar un organismo de cooperación entre las naciones cuyo objetivo es revisar y estudiar la información científica, técnica y socio económica relevante al entendimiento de este fenómeno (IPCC, 2013).

Desde los inicios de la era industrial hasta el presente, la concentración de N_2O ha aumentado en un 20% (MacFarling Meure et al., 2006), principalmente por la intensificación agrícola a través de dos procesos: el uso de fertilizantes nitrogenados sintético-industriales y el cambio de uso del suelo de ecosistemas naturales a agrícolas (Reay et al., 2012). Sin embargo, la emisión de N_2O se debe también a fuentes naturales en los ecosistemas acuáticos y los suelos de los ecosistemas terrestres (Kroeze, Mosier, & Bouwman, 1999).

La emisión de N_2O es parte del ciclo del nitrógeno y ocurre de forma natural a través de varios procesos microbiológicos que ocurren en el suelo y en los cuerpos acuáticos. La desnitrificación es el último paso del ciclo donde el N presente en el suelo regresa a la atmósfera en forma de óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y nitrógeno molecular (N_2). Este proceso es responsable de la pérdida de fertilizantes en los suelos agrícolas, pero también ocurre en ecosistemas naturales (Stehfest & Bouwman, 2006).

Ante la necesidad de cuantificar la emisión de N_2O como gas de efecto invernadero a partir de fuentes antropogénicas y naturales, varios grupos de investigación han estudiado el proceso de desnitrificación en numerosos ecosistemas con diferentes variables ambientales. En México existen pocos datos de emisión de N_2O no solo en sitios agrícolas sino también

en ecosistemas naturales (Dai et al., 2014; Davidson et al., 1993; Pérez et al., 2004). Junto con Argentina, Brasil y Venezuela, México contribuye con 80% de las emisiones de gases de efecto invernadero en Latinoamérica, y aunque solo contribuye con el 3% de la emisión de N₂O (Bustamante et al., 2014), la falta de un espectro de cuantificación que incluya otros ecosistemas podría estar subestimando dicha contribución.

Esta investigación es el primer acercamiento a la cuantificación de la emisión de N₂O por desnitrificación en un bosque templado de montaña en México. Al contar con más datos de campo sobre estas emisiones se espera robustecer el conocimiento de la contribución real que los ecosistemas naturales en México tienen sobre la emisión de N₂O a la atmósfera.

I. ANTECEDENTES

1. El Ciclo del Nitrógeno

En la naturaleza, los ciclos biogeoquímicos son los fenómenos a través de los cuáles distintas sustancias, moléculas y elementos son transformados debido a procesos biológicos, geológicos y químicos que ocurren predominantemente en la corteza terrestre, la hidrósfera y la atmósfera. La constante transformación de la materia en el planeta Tierra se debe al metabolismo de los organismos vivos y sus redes tróficas, así como al efecto de variables fisicoquímicas a diferentes escalas.

Los ciclos biogeoquímicos se basan en los elementos que conforman la vida en la Tierra: el ciclo del carbono (C), del nitrógeno (N), y del fósforo (P), entre otros, tanto en forma inorgánica como orgánica. Las formas inorgánicas minerales de la materia son aquellas que no han sido incorporadas al metabolismo de los organismos vivos como: el CO₂, sales en el suelo y iones metálicos. En cambio, las formas orgánicas de la materia son aquellas que sí lo han hecho *i.e.* azúcares, aminoácidos y vitaminas.

En particular, el ciclo del N ha sido ampliamente estudiado por dos razones: 1) es el elemento más abundante en la atmósfera (78%), y 2) es considerado un elemento limitante en la producción primaria global de nuevos compuestos orgánicos por organismos fotosintéticos (Vitousek & Howarth, 1991). La forma más abundante del N es el N molecular (N₂), que es químicamente estable debido a su triple enlace. El N es fundamental para la formación de aminoácidos, ácidos nucleicos y ATP.

Existen diferentes formas químicas presentes en el suelo y la hidrósfera de las que los organismos vivos primarios, (*i.e.* plantas y bacterias fotosintéticas) obtienen el N; otros microorganismos han desarrollado mecanismos para obtener el N₂ de la atmósfera. La ruptura del triple enlace del N₂ (N≡N) genera nuevas formas químicas. Este fenómeno se conoce como fijación, el cual ocurre a través de diferentes mecanismos: 1) fijación

biológica, 2) descargas eléctricas en la atmósfera y 3) fijación industrial, aunque la primera es la más abundante y representa el 60% de la fijación global (Postgate, 1982).

Debido a esta constante transformación del N, se han establecido cinco procesos que caracterizan mecanismos únicos de transformación desde una óptica biológica. A su vez estos procesos generan una dinámica de entradas y salidas que establecen el ciclo biogeoquímico del N (Fig. 1). Estos procesos son:



Fig. 1. Esquema general de los procesos biológicos del ciclo del nitrógeno (de acuerdo a Delwiche, 1981).

1.1 Fijación

Como se mencionó antes, la fijación del N_2 se basa en los mecanismos que rompen su triple enlace. Esto ocurre por descargas eléctricas, procesos humanos industriales y por microorganismos procariontes filogenéticamente y fisiológicamente diversos que poseen un complejo enzimático llamado nitrogenasa formado por dos enzimas: dinitrogenasa y

nitrogenasa reductasa que les permite fijar el N_2 . Aunque algunas bacterias fijadoras viven en forma libre, la mayoría de los estudios se ha enfocado en aquellas relaciones simbióticas entre organismos eucariotas y procariotas fijadores de N_2 , como las que ocurren en leguminosas (Bottomley & Myrold, 2007).

1.2 Asimilación

Después que el N es fijado, las bacterias lo asimilan a través de modificaciones metabólicas y lo integran a los compuestos orgánicos que requieren N *i.e.* aminoácidos y ácidos nucleicos. Ya que no todos los organismos vivos fijan N_2 , la asimilación es el proceso por el cual un organismo (planta, animal, hongo o bacteria) consume formas minerales u orgánicas para integrarlas a su metabolismo. A nivel microbiano, la asimilación puede ocurrir por la degradación de la materia orgánica cuando la fuente de alimento posee las cantidades necesarias de N para que el microorganismo pueda llevar a cabo sus funciones biológicas, y a través de la asimilación de formas minerales presentes de forma natural en el medio, *i.e.* nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) (Robertson & Groffman, 2007).

1.3 Mineralización

La mineralización y la asimilación deben ser vistas como un ciclo más pequeño dentro del ciclo global del N (Fig 1). Si la fuente de alimento contiene la cantidad suficiente de N, el resto será mineralizado y excretado. La asimilación y la mineralización la llevan a cabo organismos eucariotas (hongos) y procariotas (bacterias). Aunque la forma del producto final del N puede ser muy diversa, tradicionalmente se ha visto al NH_4^+ como el producto de este paso del ciclo del N (Robertson & Groffman, 2007).

1.4 Nitrificación

A diferencia de la mineralización, la nitrificación es un proceso muy semejante a la fijación en la cual el complejo enzimático está muy conservado, además de que sólo un grupo reducido de microorganismos lo realizan. En suelos no agrícolas, la nitrificación es un

proceso dominado en su mayoría por organismos autótrofos aerobios obligados que llevan a cabo una oxidación del NH_4^+ como donador de electrones a formas menos reducidas, principalmente NO_2^- y NO_3^- . Estas bacterias forman dos grupos distintos ya que cada uno lleva a cabo un paso del proceso: NH_4^+ -oxidantes y NO_2^- -oxidantes. También, existen organismos heterótrofos que nitrifican al amoníaco (NH_3^+), aunque en menor proporción y no dirigen esta oxidación al crecimiento celular. En suelos forestales, los hongos y las bacterias heterótrofas aerobias obligadas son los principales organismos nitrificantes (Robertson & Groffman, 2007).

1.5 Desnitrificación

La desnitrificación es el último paso del ciclo del N donde numerosos microorganismos anaerobios facultativos y hongos llevan a cabo una reducción del NO_3^- utilizándolo como aceptor de electrones en lugar del oxígeno (O_2). La reducción del NO_3^- puede ser parcial o total liberando diferentes formas atmosféricas del N: óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) o nitrógeno molecular (N_2). La desnitrificación ocurre en condiciones de anaerobiosis donde la concentración de O_2 es limitada, obligando a este grupo filogenéticamente y fisiológicamente diverso a utilizar el NO_3^- en lugar del O_2 como aceptor de electrones. La desnitrificación ocurre en sistemas acuáticos, terrestres y en el sedimento de cuerpos de agua como ríos y lagos (Chapin, Matson, & Mooney, 2002).

2. La Desnitrificación

En el ciclo del N, la desnitrificación es el paso menos entendido y cuantificado en su contribución al balance de masa del ciclo del N por varias razones que afectan la magnitud de los productos: 1) por eventos sensibles a cambios súbitos en la concentración de O_2 en el suelo (Lloyd, 1993), 2) el requerimiento específico de nutrientes limitantes, en particular el NO_3^- (Tiedje, 1988), y 3) la diversidad de microorganismos que pueden llevar a cabo este fenómeno dificulta el entendimiento del papel de estas poblaciones (Firestone, 1982). Es un proceso que depende de numerosas enzimas cuya presencia o ausencia favorecerá la

emisión de una forma u otra de N (Philippot, Andert, Jones, Bru, & Hallin, 2011). Y ya que uno de los productos de este proceso es el N_2 , el antecedente atmosférico de este gas dificulta su medición (Groffman, 2012).

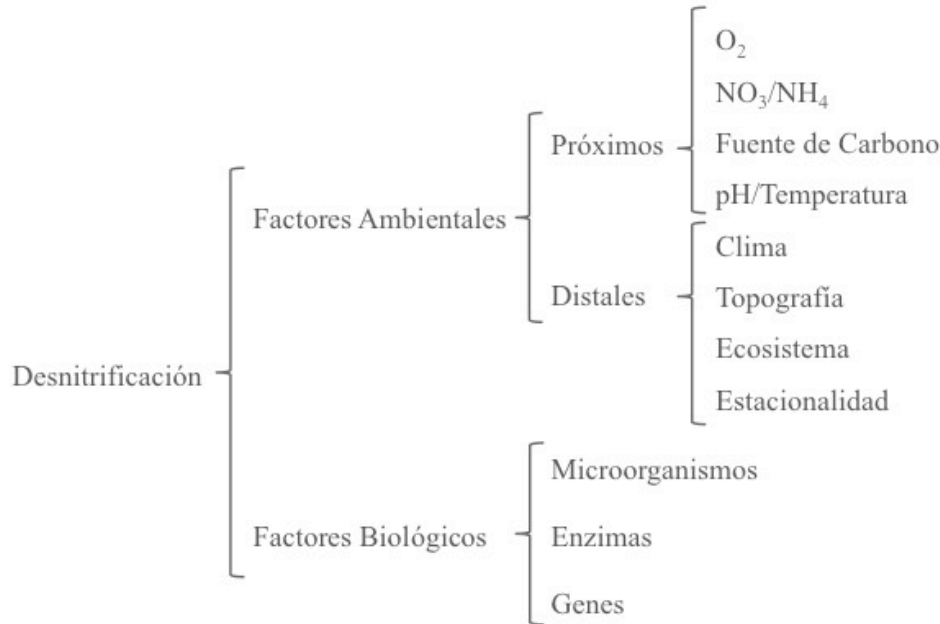


Fig. 2. Factores ambientales y biológicos que favorecen el proceso de desnitrificación en suelos.

La desnitrificación, como cualquier otro proceso de los ciclos biogeoquímicos, está sujeto a ciertos factores ambientales cuya variabilidad favorecerá o inhibirá el evento. Estos factores se han categorizado en próximos y distales, dependiendo del grado de afectación inmediato sobre la población microbiana (Fig. 2). Los factores biológicos están más relacionados a los diferentes genes que codifican a las enzimas que llevan a cabo la desnitrificación, así como a los consorcios microbianos presentes en el suelo (Saggar et al., 2013).

2.1 Factores Ambientales

2.1.1 Factores próximos

Los microorganismos desnitrificantes son anaerobios facultativos, esto implica que el principal factor ambiental que determina el proceso de desnitrificación es la concentración

de O_2 en el suelo. La concentración de O_2 está sujeta a la humedad del suelo, su compactación y su capacidad de drenaje, éstas últimas sujetas a su vez a las propiedades físicas del suelo (De Klein & Van Logtestijn, 1996). En un evento de precipitación o anegación, la concentración de O_2 disminuye creando un ecosistema anaeróbico que desencadena la utilización de NO_3^- por los microorganismos desnitrificantes (Vermes & Myrold, 1992).

Debido a que los microorganismos desnitrificantes sustituyen al O_2 , por el NO_3^- como aceptor de electrones durante la respiración celular, entonces la presencia de esta forma mineral de N es fundamental para que se lleve a cabo la desnitrificación (Tiedje, 1988). También, con la misma magnitud debe existir una fuente de C que favorezca el desarrollo de los microorganismos (Burford & Bremner, 1975).

Otros factores próximos que favorecen la desnitrificación, y prácticamente todos los procesos metabólicos, son el pH y la temperatura (Fig. 2). La temperatura es uno de los principales factores ambientales que favorecen la desnitrificación siendo la tasa de emisión máxima a $60^\circ C$ (Knowles, 1982), aunque se sabe que a baja temperatura en suelos templados la desnitrificación sigue ocurriendo (Dobbie & Smith, 2001). Por otro lado, el pH tiene un menor efecto, pues aunque la desnitrificación es óptima a pH neutro, sigue ocurriendo en suelos ácidos (Bryan, 1981).

2.1.2 Factores distales

El clima y el ecosistema determinan fuertemente los procesos que ocurren en el suelo en todos los procesos de los ciclos biogeoquímicos. En el caso de la desnitrificación cuando se conjuntan los factores próximos en el suelo, se crean momentos y espacios de alta actividad desnitrificante, lo cual tiene como consecuencia una alta emisión de $NO:N_2O:N_2$ (Groffman, 2012). Esta complejidad está a su vez regulada por eventos climáticos como las precipitaciones (Vermes & Myrold, 1992), el congelamiento del suelo, el descongelamiento del suelo (Papen & Butterbach-Bahl, 2000), y las sequías (Davidson et al., 1993).

Cada uno de estos eventos climáticos en conjunto con las propiedades físicas del suelo hará que cada ecosistema se comporte de forma distinta (Werner, Butterbach-Bahl, Haas, Hickler, & Kiese, 2007). La composición en la textura de suelo y los contenidos de arena, limo y arcilla favorecerán la emisión de N_2O , un suelo de textura fina tiene mayores emisiones que un de textura gruesa (Groffman & Tiedje, 1989). Incluso, la altitud y la latitud determinarán la magnitud de la desnitrificación (Fang et al., 2015). Dentro de un mismo bosque, la tasa de desnitrificación no será igual a diferentes altitudes (Wolf, Veldkamp, Homeier, & Martinson, 2011).

2.2 Factores biológicos

Cuando existen las condiciones ambientales necesarias, los microorganismos del suelo desencadenan la desnitrificación con el fin de obtener energía. Alrededor de 60 géneros de bacterias y arqueas, así como varios hongos saprófitos han sido identificados como organismos desnitrificantes (Saggar et al., 2013). La mayoría de estos son bacterias heterótrofas anaerobias facultativas, aunque también hay bacterias quimiolitótrofas que se alimentan de la reducción del NO_3^- (Fernández, Sierra-Alvarez, Field, Amils, & Sanz, 2008). En hongos no se conoce exactamente el mecanismo de desnitrificación, aunque se sabe que muchos hongos tienen la capacidad de reducir NO_3^- , y NO_2^- a NO y N_2O de forma desasimilatoria en condiciones anaerobias similar a las bacterias heterótrofas (Shoun, Fushinobu, Jiang, Kim, & Wakagi, 2012).

El proceso de desnitrificación sigue una ruta metabólica donde la baja concentración de O_2 origina una cascada de señalización que comienza en la pared celular y termina en la producción de enzimas capaces de reducir las diferentes formas de N. El proceso es como sigue (Fig. 3):

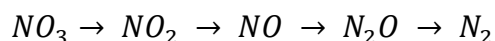


Fig. 3. Secuencia de reducción de NO_3^- a N_2 por el proceso de desnitrificación.

No todos los organismos desnitrificantes poseen todas las enzimas necesarias para llevar a cabo el proceso completo. Dependiendo de los genes que posea un organismo, éste podrá reducir el N hasta ciertas formas moleculares. Un tercio de las bacterias desnitrificantes secuenciadas y todos los hongos carecen de la enzima que lleva a cabo la última reducción de N_2O a N_2 . Por este motivo, el producto final es una proporción $NO:N_2O:N_2$ cuya magnitud dependerá principalmente de las enzimas presentes y de los consorcios microbianos presentes en el suelo. Así, la diversidad de microorganismos puede favorecer una desnitrificación completa o incompleta (Philippot et al., 2011).

Para cada paso de la desnitrificación existe una enzima independiente que lleva a cabo la reducción. Estas son, en forma secuencial, la nitrato reductasa (Nar), la nitrito reductasa (Nir), la óxido nítrico reductasa (Nor), y la óxido nítrico reductasa (Nos) (Fig. 4). Todas son inducidas cuando el organismo detecta baja concentración de O_2 y todas son reguladas a su vez por la presencia de O_2 tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Cuando la concentración de O_2 aumenta se inicia otra cadena de señalización que detiene el proceso de transcripción y traducción, ya que la célula obtiene una eficiencia energética más alta de la reducción del O_2 que de la reducción del NO_3 (Bakken, Bergaust, Liu, & Frostegard, 2012).

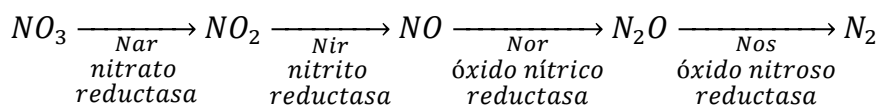


Fig. 4. Enzimas responsables de cada uno de los pasos de la desnitrificación.

En las bacterias todas estas enzimas se encuentran en la membrana o en el espacio periplásmico, lo cual facilita la detección de estas formas de N molecular que pueden ser reducidas, así como su rápida expulsión en caso de que la concentración de O_2 en el medio vuelva a ser favorable (Bothe, Ferguson, & Newton, 2007). En particular, el NO es tóxico para la mayoría de las bacterias y hongos ya que tiene un transporte pasivo en la membrana hacia el interior de la célula por lo que durante la generación de este reactivo por Nir, es muy probable que subsecuentemente Nor lleve a cabo una rápida reducción a N_2O (Shiro, 2012).

A diferencia de las enzimas cuyos mecanismos de acción son similares, los genes que codifican Nar, Nir y Nor son muy diversos debido a la diversidad filogenética de los organismos desnitrificantes. Todos estos genes se encuentran regularmente agrupados en regiones definidas del cromosoma, así como genes que codifican a diferentes proteínas asociadas a la producción de estas enzimas, lo cual sugiere que la desnitrificación es un proceso sumamente regulado y sensible a las diferentes condiciones del medio (van Spanning, Richardson, & Ferguson, 2007). Al contrario, el gene *NosZ* que codifica a la enzima Nos está altamente conservado, además de ser el único gen conocido cuyo producto es capaz de catalizar el último paso de la desnitrificación al reducir N_2O a N_2 , cerrando así el ciclo del N (Zumft & Körner, 2007).

Tanto los factores ambientales como los biológicos del proceso de la desnitrificación han sido ampliamente estudiados. Los primeros a diferentes escalas del ecosistema, y los segundos bajo diferentes condiciones tanto *in situ*, como *in vitro*. Por un lado, se considera a la desnitrificación neta como aquella cuyos productos ($NO:N_2O:N_2$) son emitidos, y a la desnitrificación potencial como la relacionada a la presencia de genes y enzimas en el suelo. Este es precisamente uno de los problemas al estudiar la desnitrificación ya que no ha sido posible relacionar en un sitio determinado la emisión total de la emisión estimada, así como los microorganismos que están llevando a cabo el proceso. Principalmente porque la desnitrificación es parte de un proceso metabólico que se activa bajo condiciones especiales, el cual es realizado por una gran diversidad de microorganismos.

3. La Emisión de $NO:N_2O:N_2$

En ecosistemas naturales, la proporción de los gases producto de la desnitrificación depende no sólo de los factores antes mencionados, sino también está relacionada a la competencia por la obtención de energía a partir de las diferentes fuentes de N y C (Zaehle, 2013).

En los sistemas agrícolas intensivos donde se emplean fertilizantes químicos ocurre un enriquecimiento acelerado de nutrientes, así como el súbito consumo de O_2 en el suelo agrícola durante la irrigación. Esto ha generado que los sistemas agrícolas sean la primera fuente de emisión de $N_2O:NO$ a la atmósfera (Reay et al., 2012).

Las principales fuentes antropogénicas de N_2O y NO , además de la agricultura son la industria, la quema de biomasa, y otras formas indirectas de emisión como la combustión interna de los motores. La quema de biomasa está estrechamente ligada a la agricultura por la quema de residuos agrícolas y la quema de ecosistemas naturales para dar lugar a nuevos sitios agrícolas, lo que se conoce como cambio de uso de suelo. Ligado a otros procesos antropogénicos como la fijación industrial de nitrógeno y la explosión urbana-demográfica-industrial se estima que la emisión de estos gases continuará creciendo, aunque no es posible cuantificar exactamente la emisión a una escala global (Reay et al., 2012).

El N_2O es un gas de efecto invernadero con una capacidad de calentamiento global 300 veces mayor que el CO_2 , es decir, retiene más calor de los rayos del sol en la atmósfera, y tiene una vida en la atmósfera de 100 años. Además, juega un papel en la destrucción del ozono (O_3) estratosférico (Ehhalt & Prather, 2001). Por su parte, el NO es un gas altamente reactivo rápidamente convertido a NO_2^- , el cual precipita en forma de lluvia ácida (Davidson & Kinglerlee, 1997). Existe gran interés por conocer la emisión de estos gases a escala mundial bajo diferentes condiciones de emisión, y bajo diferentes ecosistemas. La mayor preocupación está en conocer la magnitud de la perturbación que los procesos antropogénicos han tenido en la modificación de la composición de estos gases en la atmósfera.

Alrededor del mundo se han estimado las emisiones en diferentes cultivos agrícolas y bajo diferentes condiciones de riego, y diferentes tratamientos post-cosecha, etc. Sin embargo, por la evaporación del amoníaco en sistemas agrícolas, la precipitación de lluvia ácida y la lixiviación del NO_3^- también se ha estudiado la desnitrificación y sus emisiones en otros ecosistemas naturales. Asimismo, se ha estudiado el efecto que las zonas agrícolas y

urbanas han tenido sobre los ecosistemas naturales terrestres y acuáticos donde puede haber una mayor concentración de NO_3^- (Smith, & Conen, 2004).

En las regiones del mundo donde predomina la agricultura intensiva, como en Norteamérica, Europa y Asia (particularmente en China), se ha estudiado la desnitrificación en los bosques templados y en las praderas adyacentes a sitios agrícolas. Debido a la alta variabilidad en los factores ambientales se presentan momentos y espacios de alta actividad (Groffman, 2012). Esto además de profundizar el conocimiento que se tiene acerca de la desnitrificación, ha puesto en evidencia que aunque los ecosistemas agrícolas siguen siendo los mayores productores de estas emisiones, existen ecosistemas naturales que también tienen una gran contribución a estas emisiones y por lo tanto deben ser estudiados (Werner et al., 2007).

3.1 El depósito atmosférico y la desnitrificación

El depósito atmosférico de N en ecosistemas forestales naturales ocurre principalmente a través de dos fuentes: 1) los óxidos de N emitidos en los motores de combustión interna, y la oxidación atmosférica que da lugar a otras formas reactivas como el ácido nítrico (HNO_3) y 2) formas reducidas de N reactivo como el NH_3^+ , emitidas principalmente por la agricultura y la ganadería. Ya que estas formas reactivas de N también son asimiladas por las poblaciones vegetales en ecosistemas naturales, se ha estudiado el efecto que esta fertilización indirecta tiene sobre la desnitrificación y otros procesos microbianos que favorecen la emisión de N_2O y NO (Law, 2013).

El alto depósito atmosférico de N en los Apalaches Centrales de Estados Unidos (EUA) ha permitido el estudio de la desnitrificación en suelos forestales contaminados. Existe una mayor emisión de N_2O en sitios fertilizados con NO_3^- , la que coincide con una mayor actividad enzimática desnitrificante en comparación con sitios no fertilizados (Wallenstein, Peterjohn, & Schlesinger, 2006). Los bosques de abeto y haya del sur de Alemania también reciben un alto depósito atmosférico de N. Al estudiar el efecto que este fenómeno tiene sobre la desnitrificación, se encontraron resultados semejantes a los descritos en los

Apalaches de EUA al observar una relación lineal entre el depósito atmosférico y la emisión de N_2O por desnitrificación (Papen & Butterbach-Bahl, 1999).

Si bien la desnitrificación de estas fuentes externas de fertilización en ecosistemas forestales puede representar un proceso de remediación natural, también se ha observado que un alto depósito atmosférico puede saturar un ecosistema por encima de sus requerimientos nutricionales de N. En bosques de China y Japón con tasas de depósito atmosférico entre moderadas y altas se ha observado que a medida que incrementa el depósito, también aumenta la acidificación del suelo, se incrementa la concentración de NO_3 en el suelo, y por lo tanto la lixiviación a sistemas acuáticos (Fang et al., 2015).

4. La Desnitrificación en Ecosistemas Naturales

Además de estudiar la emisión de N_2O y NO en ecosistemas naturales y agrícolas donde el depósito atmosférico de N es alta, también es importante caracterizar la emisión en otros ecosistemas. La relación que existe entre la desnitrificación y los factores próximos y distales también está asociada a las particularidades de cada ecosistema.

En los bosques templados donde el depósito atmosférico no es un factor que determine la emisión de estos gases existen otras condiciones que modifican la actividad desnitrificante. En general, los bosques templados de coníferas tienen tasas de emisión de N_2O bajas. Incluso estos bosques sirven como sumideros del N_2O durante el invierno cuando la concentración de N en el suelo es limitante (Erickson & Perakis, 2014). Otros bosques templados caducifolios muestran tasas de emisión de N_2O mayores que en bosques de coníferas (Inclán et al., 2012).

Se sabe que los bosques tropicales lluviosos son la segunda mayor fuente de emisión de N_2O y NO después de los suelos agrícolas (Breuer, Papen, & Butterbach-Bahl, 2000). Las principales causas son las propiedades físicas del suelo y la estacionalidad. Pero debido a las diferentes altitudes en las montañas de las regiones tropicales donde los ecosistemas

forestales son diferentes, la emisión está sujeta a otros factores como la temperatura y la humedad.

En los bosques subtropicales donde la altitud determina el tipo de cobertura vegetal dominante, ésta también determina la tasa de emisión (Wolf et al., 2011). En un estudio realizado en China donde se compararon bosques de coníferas con bosques caducifolios, se encontró que la desnitrificación es el proceso que determina la emisión de N_2O en el bosque de coníferas, mientras que la nitrificación favorece la emisión de N_2O en bosques caducifolios (Cheng, Wang, Wang, Zhang, & Cai, 2014).

5. Los Ecosistemas Forestales de México

Los ecosistemas forestales del mundo constituyen los reservorios de diversidad más grandes con cerca del 70% de las especies vegetales y animales. Los bosques son los ecosistemas terrestres más productivos almacenando el 45% del carbono terrestre y contribuyendo con el 50% de la producción neta primaria de compuestos orgánicos a través de la fijación de CO_2 (Bonan, 2008). Debido a la alta actividad biológica, los bosques tienen las tasas de transformación de la materia más elevadas y esto favorece a los ciclos biogeoquímicos y el enriquecimiento de los suelos. La abundante cobertura vegetal mitiga el calentamiento de la superficie terrestre por los rayos del sol, amortigua los cambios de temperatura y genera una barrera contra el viento. Juegan además un papel muy importante en los ciclos hidrológicos por la evapotranspiración de su cobertura vegetal, que recarga la atmósfera en las regiones terrestres alimentando los ciclos de precipitación, escurrimiento y almacenamiento de los mantos acuíferos. Por su extenso sistema radicular, los bosques retienen el suelo y frenan la erosión (Bonan, 2008).

En México, aproximadamente el 30% del territorio está compuesto de ecosistemas forestales. Estos ecosistemas están clasificados en bosques templados y bosques tropicales. Los bosques templados se caracterizan por desarrollarse a partir de una altitud de 2000 m y por tener una baja temperatura entre 12 a 23°C a lo largo del año. También presentan una estacionalidad muy marcada de época de secas y lluvias, aunque por su composición

vegetal de especies perennifolias de pino y encino permanecen verdes durante todo el año. Estos representan el 16% del territorio nacional. Los bosques templados en las regiones tropicales de México se desarrollan a mayor altitud debido a una menor temperatura comparada con las regiones bajas y costeras de otros ecosistemas (Challenger & Soberón, 2008). Esto hace que la mayoría de los bosques templados de México se encuentren en regiones montañosas, las cuales representan cerca de la mitad del territorio nacional (Flores-Martínez, 2002).

Hasta la fecha no se han hecho evaluaciones de campo de la emisión de N_2O y NO en el suelo de los bosques templados de México. Se tiene información de estas emisiones en los bosques tropicales secos de la costa del Pacífico en el Estado de Jalisco, bosques tropicales secos de la Península de Yucatán, y matorrales semiáridos del Estado de Guanajuato en el centro del país.

La primera medición en campo de N_2O y NO se realizó en la región de Chamela en el Estado de Jalisco, en bosques tropicales secos de los lomeríos de la costa del Pacífico a principio de la década de los noventa. Aquí se observó que durante la temporada seca la nitrificación favorecía la emisión de NO , mientras que en la temporada de lluvias la desnitrificación favoreció la emisión de N_2O (Davidson et al., 1993). Por medio de un modelo que estimaba la dinámica de carbono en los bosques tropicales secos de la península de Yucatán y que además integraba la desnitrificación en suelo, se determinó que los factores ambientales que tienen un efecto más directo en la emisión de N_2O son la temporada de lluvias y un mayor contenido de materia orgánica del suelo (MOS) (Dai et al., 2014). Por último en los matorrales semiáridos del centro del país en el Estado de Guanajuato se evaluó la cobertura vegetal de dos especies en laboratorio: Mezquite (*Acacia schaffneri*) y Huizache (*Prosopis laevigata*), y se observó que la emisión de N_2O era mayor en mezquite la cual se atribuye a una mayor tasa de mineralización de N en el suelo (Pérez et al., 2004).

II. JUSTIFICACIÓN

Los gases N_2O y NO son gases de efecto invernadero producidos por la desnitrificación en ecosistemas naturales y agrícolas. Aunque estos gases forman parte del ciclo biogeoquímico del N, la contribución de los sistemas agrícolas ha generado una nueva relación $NO:N_2O:N_2$ en la atmósfera. Se han estudiado las condiciones ambientales y biológicas que favorecen este fenómeno y se ha estimado su emisión. De este modo se ha profundizado en el proceso de la desnitrificación y en el efecto que estos gases tienen sobre la atmósfera terrestre.

En México, los ecosistemas naturales y agrícolas donde se ha estudiado la desnitrificación son escasos, a pesar de que nuestra posición en los trópicos genera gradientes de cobertura vegetal asociados a la altitud, bosques templados y húmedos a mayor altitud y bosques tropicales húmedos y secos a menor altitud y latitud. Un sitio de estudio donde se pueda ilustrar el efecto de la altitud sobre la cobertura vegetal predominante y por consiguiente en la emisión de estos gases asociada a cada ecosistema, podría ejemplificar el fenómeno que ocurre en los bosques de nuestro país.

Conocer las variables ambientales y biológicas que desencadenan la desnitrificación permitirá profundizar en el conocimiento que se tiene de los microorganismos desnitrificantes. A escalas regionales, estas variables permitirán establecer criterios para el manejo de los ecosistemas naturales protegiendo aquellos que tengan una emisión baja y mejorando el manejo de otros que tienen una emisión alta. Esto, además identificará aquellos ecosistemas naturales que han sido afectados por el depósito atmosférico y otras perturbaciones. Estas evaluaciones mejorarán el ordenamiento territorial y frenarán los cambios de uso de suelo que favorecen la emisión de N_2O .

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

1. Pregunta de Investigación

En un bosque templado de montaña donde puedan observarse diferencias en la composición vegetal dependiendo de la altitud, la pregunta es ¿cuáles podrían ser las variables ambientales y biológicas asociadas a cada tipo de cobertura vegetal que controlan la emisión de N_2O por desnitrificación?

Las variables ambientales son aquellas que afectan la actividad metabólica desnitrificante de estos microorganismos, mientras que las variables biológicas están asociadas al tipo de cobertura vegetal y a la diversidad bacteriana en el suelo.

El tipo de cobertura vegetal está determinado por las especies arbóreas y arbustivas predominantes en cada altitud, generando así un gradiente con diferentes características ambientales y biológicas que permitan identificar las emisiones de N_2O por desnitrificación.

2. Hipótesis

Las emisiones de N_2O por desnitrificación en un bosque templado de montaña en México son mayores en las zonas bajas de la montaña dominadas por plantas anuales, donde la cobertura forestal es menor o nula. Esto se debe a que los factores asociados a la desnitrificación como son una mayor temperatura, condiciones limitantes de oxígeno debidas a las propiedades físicas del suelo y la alta concentración de NO_3 favorecen la actividad de los microorganismos desnitrificantes en las comunidades vegetales de plantas anuales.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Estudiar la emisión de N_2O por desnitrificación en el suelo de un bosque templado de montaña en México a lo largo de un gradiente altitudinal con diferentes tipos de cobertura vegetal.

2. Objetivos Particulares

1. Medir la emisión de N_2O en diferentes tipos de cobertura vegetal.
2. Determinar los factores ambientales asociados a la emisión de N_2O por desnitrificación.
3. Cuantificar las poblaciones bacterianas desnitrificantes.
4. Establecer una relación entre los factores ambientales y las poblaciones bacterianas desnitrificantes y su efecto sobre la emisión de N_2O en cada tipo de cobertura vegetal.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sitio de estudio

El Pinal del Zamorano es un conjunto de conos estratovolcánicos del plioceno temprano ubicado en la parte centro-norte de los Estados de Querétaro y Guanajuato (Fig. 3). Geográficamente, el Pinal del Zamorano pertenece al Eje Neovolcánico Transversal y representa el límite con la Mesa del Centro y la Sierra Madre Oriental (Carrasco-Núñez, Milán, & Verma, 1989). Es el sitio con altitud mayor de ambos Estados a 3360 m y debido a esta altura, el Pinal del Zamorano posee un clima húmedo templado que contrasta con el resto de las regiones semiáridas que lo rodean (Gómez-Sánchez, 1997).

El ecosistema del Pinal del Zamorano está compuesto de bosques subtropicales templados, siendo las principales especies forestales: oyamel (*Abies religiosa*), encino (*Quercus* spp.) y pino piñonero (*Pinus cembroides*). En las zonas de arroyos y escurrimientos bajos domina el bosque de galería compuesto por pequeñas poblaciones de álamos (*Populus* spp.) y ahuejotes (*Salix bonplandiana*). En las zonas bajas predominan los ecosistemas semiáridos como matorrales rosetófilos y vegetación crasicaule (Gómez-Sánchez, 1997).

Por su clima templado y su geografía accidentada, el Pinal del Zamorano es una importante subcuenca de recarga pluvial. Sus escurrimientos alimentan a la región a través de su incorporación a los mantos acuíferos, al río Chichimequillas que pertenece a la cuenca Lerma-Santiago del Pacífico y al río Extoraz que pertenece a la cuenca del Pánuco en el Golfo (Arango-Guevara, 2006).

De acuerdo con la carta edafológica del Instituto Nacional de Geografía y Estadística, el suelo del Pinal del Zamorano se clasifica en cuatro tipos: Úmbrico, Phaeozem, Leptosol y Luvisol. De acuerdo con el Centro Internacional de Información y Referencia del Suelo (ISRIC) los suelos úmbricos son suelos oscuros ácidos, ricos en materia orgánica que se originan a partir de la lenta descomposición de la materia vegetal. Estos suelos se ubican en

regiones montañosas subtropicales húmedas. Los suelos phaezoem son suelos arcillosos, porosos, fértiles, ricos en materia orgánica, el contraste en las estaciones de lluvias y secas es importante en su formación. Tienen además, una gran capacidad de retención de humedad y su uso es predominantemente agrícola. Los suelos leptosol son suelos poco profundos donde la roca parental está a unos cuantos centímetros de la superficie, pueden estar presentes en regiones montañosas. Los suelos luvisol tienen movimiento de arcillas a horizontes no superficiales, donde el horizonte A no contiene arcillas, pero el horizonte B es arcilloso, tienen buena retención de humedad y son porosos, además de ser aptos para uso agrícola.

Debido a la naturaleza volcánica del Pinal del Zamorano y del Eje Neovolcánico Transversal, el material parental está formado por rocas ígneas extrusivas, andesíticas, basálticas y riolíticas.

En 1999, el Pinal del Zamorano fue catalogado como Región Prioritaria Terrestre de México por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). El objetivo de dicha propuesta es detectar unidades ecológicas que contengan una riqueza única comparada a otras regiones del territorio, que presenten cierto grado de endemismo, y que posean una integridad biológica con una oportunidad real de conservación (Arriaga-Cabrera, 2009). El Pinal del Zamorano pertenece a este programa dada su importancia hidrológica y su significancia regional al ser el único bosque de oyamel en estado medio de conservación para los Estados de Guanajuato y Querétaro.

Con un área estimada de 497km², el Zamorano tiene un nivel de conservación medio bajo, es decir, aprovechable únicamente a nivel regional. Debido a su cercanía a la Sierra Gorda de Querétaro y Guanajuato se considera un corredor biológico. Existen importantes endemismos botánicos de los géneros *Baccharis*, *Cirsium* y *Rubus* con una población muy reducida, además de algunos microendemismos en las zonas altas de la montaña. Ciertas especies endémicas identificadas en el pasado no se han encontrado en registros más recientes intuyendo su extinción local (Gómez-Sánchez, 1997).

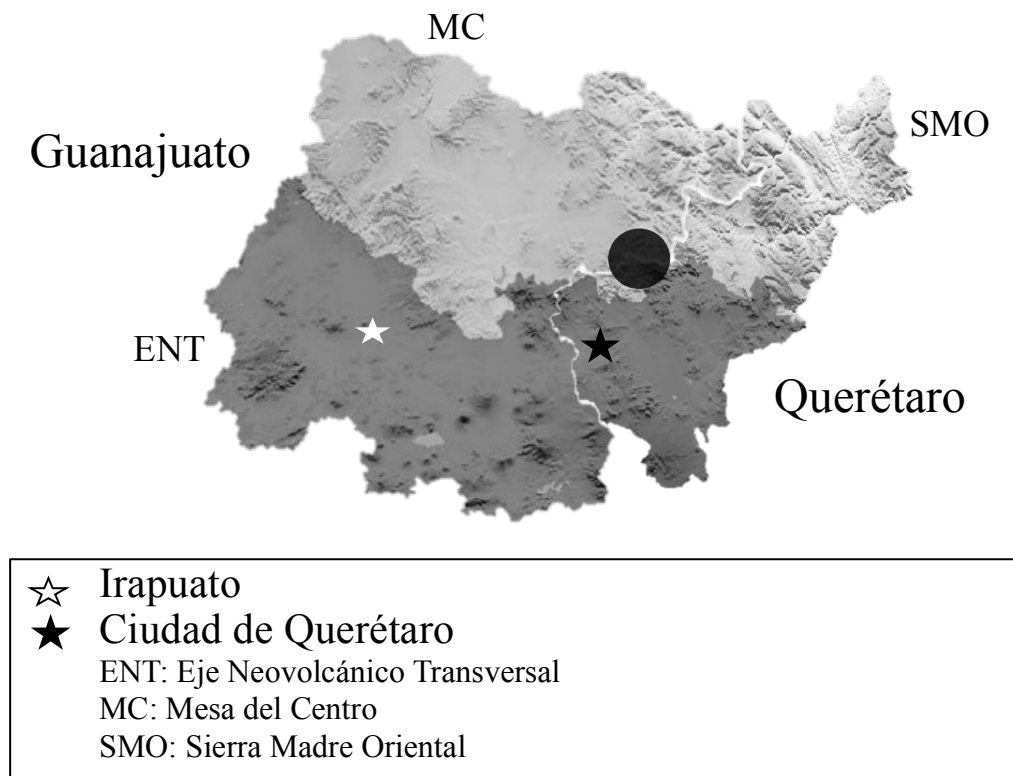


Fig. 5. Mapa de localización del Pinal del Zamorano entre los Estados de Querétaro y Guanajuato.

En el Pinal del Zamorano, la amenaza mayor se da por el cambio de uso de suelo y la deforestación por parte de las comunidades rurales para uso agrícola y ganadero, principalmente en los niveles bajos de la montaña dominados por vegetación crasicaule y rosetófila. La fragmentación en los bosques de encino y oyamel se debe a la ganadería bovina extensiva y la deforestación selectiva de oyamel (Estrada-Muñoz, 2002). Además, la montaña es susceptible a incendios forestales. En 1990 se registró el incendio forestal más destructivo al consumir 500 ha en la ladera noroeste (Cita?).

Las consecuencias principales de estas amenazas son: la erosión del suelo y la pérdida de infiltración y recarga pluvial por la deforestación, la compactación del suelo y exposición de la roca parental por el sobrepastoreo, y la pérdida de biodiversidad y desplazamiento de la fauna silvestre por la deforestación selectiva y el cambio de uso de suelo (Estrada-Muñoz, 2002).

Debido a que el Pinal del Zamorano delimita la frontera entre los Estados de Querétaro y Guanajuato, su conservación demanda un acuerdo entre ambas entidades. En el 2000, el Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato decretó su fracción de 138 km² como Área Natural Protegida en la categoría de Reserva de Conservación. En el 2002, se decretó el Programa de Manejo, el cual tiene como objetivo principal establecer estrategias para la conservación y preservación de la diversidad biológica y el ecosistema a través del fomento a la investigación científica, la educación ambiental, la regulación sobre el aprovechamiento sustentable y el apoyo a las comunidades que habitan la región (Estrada-Muñoz, 2002). Actualmente, el Estado de Querétaro no ha establecido un programa de conservación para dicha montaña.

2. Muestreo

Durante los meses de julio y agosto del 2014 se hicieron visitas de campo a la montaña del Pinal del Zamorano y se establecieron cuatro sitios de estudio basados en el tipo de cobertura vegetal predominante y la altitud (Cuadro I).

Cuadro I. TIPOS DE COBERTURA VEGETAL ESTABLECIDOS PARA EL ESTUDIO DE LA DESNITRIFICACIÓN DEL PINAL DEL ZAMORANO Y SUS RESPECTIVAS ALTITUDES.

Cobertura Vegetal Predominante	Altitud (msnm)
Bosque de Oyamel (<i>Abies religiosa</i>)	3,200
Bosque de Encino (<i>Quercus</i> spp.)	3,000
Matorral de Transición	2,700
Herbáceas Anuales	2,650

Se establecieron tres sitios en cada uno de los tipos de cobertura vegetal para sumar un total de 12 sitios (Fig. 4). Además de la cobertura vegetal predominante y la altitud, estos se determinaron a partir de otras características:

1. Topografía de la montaña: todos los sitios están ubicados en laderas norte, o en crestas donde la cobertura vegetal es similar en los tres sitios de muestreo. Esto para evitar otras variables como exposición a la luz solar, la cual determina otras poblaciones vegetales, principalmente de herbáceas y arbustos.
2. Topografía de los sitios: en su mayoría, los sitios están ubicados en laderas de poca pendiente (30% de pendiente: 16° de inclinación). Esto favorece la retención del suelo y permite un muestreo en suelo menos rocoso.
3. Cobertura vegetal del sotobosque: se refiere a las poblaciones vegetales no predominantes, principalmente en el bosque de oyamel y encino. También en arbustos se establecieron sitios con vegetación semejante.

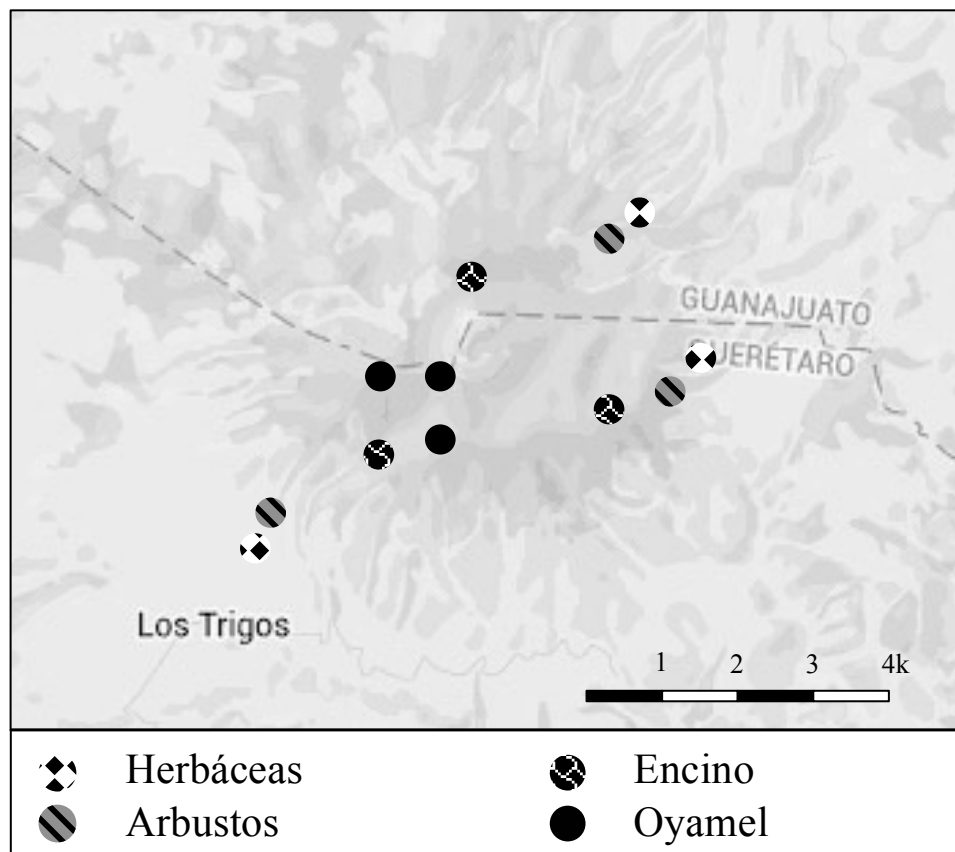


Fig. 6. Ubicación de los sitios de muestreo en la montaña del Pinal del Zamorano.

Hacia el final de la temporada de lluvias, se realizaron tres muestreos en septiembre, octubre y noviembre del 2014. En cada muestreo se evaluaron tres sitios pertenecientes a los cuatro tipos de cobertura vegetal y cada muestreo se realizó mensualmente. Se

establecieron cuadrantes de 10x10 m en cada uno de los sitios de estudio y se instalaron cuatro cámaras de PVC (15 cm de alto y 20.5 cm de diámetro interno) de un volumen de 4.95 kg para la captura de gases, esquinados a 1 m de distancia del perímetro; esta distancia variaba dependiendo de la topografía del sitio. Las cámaras se clavaron a diferentes profundidades dependiendo de la topografía del sitio. Pasadas 24 h de estabilización del sitio, las cámaras se sellaron con su respectiva tapadera de PVC, la cual contenía un septo en el centro para la captura de gases. Se tomaron muestras de gases a la 1 y 24 h en viales al vacío de 6 mL.

También se tomaron muestras compuestas de suelo de cuatro sitios aleatorios dentro del cuadrante para análisis microbiano y químico en laboratorio. Por último, se tomaron cinco núcleos de suelo intacto de 4 cm de profundidad por 10.5 cm de diámetro para un volumen total de 0.34 kg para estimar la emisión de gases en laboratorio. Tanto las muestras de suelo como los núcleos de suelo intacto se tomaron a partir del horizonte A removiendo la capa superficial de oxidación (horizonte O).

3. Métodos

3.1 Reducción de acetileno

Los núcleos de suelo intactos se dejaron airear por 15 minutos y se destaparon. Después se sellaron con Parafilm, se extrajo el 10% del volumen y se inyectó el 10% del volumen de acetileno, C_2H_2 (3 ± 1 mL). El núcleo se incubó y se tomaron muestras a 1 y 24 h en viales al vacío de 6 mL.

3.2 Medición de la emisión de N_2O *in vitro*

Paralelo a la medición de la emisión en campo y por núcleos de suelo intacto se utilizó otro método para favorecer la emisión en muestras de suelo bajo condiciones de laboratorio. Para los doce sitios se pesaron 30 g de suelo en frascos de vidrio de 250 mL y se saturó el suelo con agua destilada estéril. La saturación se realizó con base en la porosidad, el

contenido de humedad y la densidad aparente, de manera que a cada frasco se le agregaron aproximadamente 10 mL, los cuales se cerraron con tapadera de rosca de plástico y se sellaron con Parafilm. Las tapas tenían un septo para la captura de gases. Cada muestra se hizo por triplicado. Se incubaron a temperatura ambiente y se tomaron muestras a 1, 12, 24 y 48 h en viales al vacío de 6 mL.

Bajo las mismas condiciones, una muestra de suelo de 30 g se incubó con la técnica de reducción de C_2H_2 (10% del volumen en C_2H_2 , es decir, aproximadamente 25 mL). Cada muestra se hizo por triplicado. Se dejaron incubar a temperatura ambiente y se tomaron muestras a 1, 12, 24 y 48 h en viales evacuados.

Como punto de comparación se tomaron 30 g de suelo agrícola con las siguientes características. Al grupo A se le adicionó una dosis de fertilización nitrogenada con nitrato de potasio (KNO_3) de 300 μg de N/g de suelo. El grupo B no recibió fertilización. Ambos grupos se realizaron por triplicado, se dejaron incubar y se tomaron muestras a 1, 12, 24 y 48 h. Otros dos grupos conformados por 30 g de suelo agrícola bajo las mismas condiciones del grupo A y B se incubaron con la técnica de reducción de C_2H_2 (10% del volumen en C_2H_2). Los ensayos se hicieron por triplicado, se dejaron incubar a temperatura ambiente y se tomaron muestras a 1, 12, 24 y 48 h.

3.3 Cuantificación por cromatografía de gases

Con microjeringa, se tomaron 250 μL de cada vial con muestra de gas y se inyectaron a un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie III, a través de un detector TCD en una columna HP Plot Q no polar con un diámetro de 0.530 mm. Los gases acarreadores fueron una mezcla de He y N_2 a un flujo constante de 1 mL/minuto. Las condiciones de separación fueron: Temperatura del horno a 90°C, Temperatura del inyector a 200°C, y Temperatura del Detector a 250°C.

Cada muestra se dejó correr 10 min, y se hicieron limpiezas del sistema después de 10 muestras por 20 min. Los gases de referencia utilizados fueron: óxido nitroso, acetileno y etileno.

3.4 Propiedades fisicoquímicas del suelo

Para determinar el tipo de suelo, textura, contenido de materia orgánica, nitrógeno total del suelo, concentración de amonio y concentración de nitrato, se envió 1 kg de muestra compuesta, seca, tamizada a 14 mm por sitio al INIFAP-Celaya. Los métodos utilizados se describen en el cuadro II.

Cuadro II. MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES DE LOS SUELOS ANALIZADOS.

Análisis	Método
Textura de Suelo y Tipo de Suelo	Hidrómetro de Bouyoucos
Materia Orgánica del Suelo	Calcinación en Mufla
Nitrógeno Total	Kjeldahl
Amonio (NH ₄)	Formaldehido
Nitratos (NO ₃)	Ácido salicílico

Durante el muestreo se tomó la temperatura del suelo a 10 cm de profundidad con cuatro mediciones por sitio con un medidor combinado de temperatura y conductímetro Mca. Hanna Instruments®.

La humedad del suelo se estimó tomando 100 g de muestra que se dejó secar a peso constante. Para calcular la densidad aparente se pesaron los núcleos de suelo intacto y se dividieron entre el volumen de los núcleos.

3.5 Conteo de bacterias totales y desnitrificantes

Para cuantificar las bacterias con potencial desnitrificante se sembraron diluciones decimales del suelo en un medio selectivo para bacterias desnitrificantes. También, a estas diluciones se les midió la actividad desnitrificante. Por último, se hizo un conteo de bacterias totales en medio nutritivo no selectivo para tener una referencia de comparación a las poblaciones desnitrificantes.

De las muestras de suelo se determinó el número de bacterias totales cultivables por el método de cuenta viable en placa con el medio agar nutritivo. Se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) en placa de las diluciones decimales 3, 4, 5 y 6. Para determinar las UFC/g suelo se tomó la dilución 4 como referencia.

El medio selectivo utilizado para estimar la población desnitrificante es el descrito por Heylen *et al.* (2006) y modificado, el cual está compuesto por un medio mineral para microorganismos heterotróficos descrito por Atlas (1993) (Cuadro III).

Cuadro III. COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS DESNITRIFICANTES.

Reactivo	Cantidad (g/L)
Medio Mineral Atlas	
Agar noble	20.0
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	1.20
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	0.624
Sulfato de amonio [(NH ₄) ₂ SO ₄]	0.50
Cloruro de sodio (NaCl)	0.10
Solución de cloruro de calcio (CaCl ₂ •6 H ₂ O) 5 g/L	0.05 (10 mL)
Solución de sulfato de magnesio (MgSO ₄ •7 H ₂ O) 20 g/L	0.20 (10 mL)
Solución Mineral (g/L):	1 mL
EDTA disódico	15.0
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ •7 H ₂ O)	7.0

Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	1.8
Sulfato de hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	1.6
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	5.2
Molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	0.47
Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.47
Medio para desnitrificantes descrito por Heylen <i>et al.</i>	
Vitaminas (mg/L):	1 mL
Sulfato monosódico 10 mM a pH 7/100 mL:	
4-aminobenzoato	4
D-(+)-biotina	2
Ácido nicotínico	10
D-(+)-pantotenato	5
Piridoxina	15
Ácido fólico	4
Ácido lipóico	1
Solución de tiamina:	2 mL
Sulfato monosódico 25 mM a pH 3.4/100 mL	100 mg tiamina
Solución de cobalamina:	2 mL
Cobalamina (mg/L)	50 mg
Fuente N: KNO_3	3 mM
Fuente C: Succinato de sodio	20 veces fuente de N
pH neutro	

Las cajas de Petri preparadas con el medio antes descrito, e inoculadas con las diluciones respectivas fueron incubadas en cámaras anaeróbicas durante 4 días a 37°C. El crecimiento bacteriano (UFC/g suelo) se estimó en las diluciones decimales 3, 4, y 5.

3.6 Medición de la actividad desnitrificante

Para comprobar la actividad desnitrificante de forma cualitativa se hicieron incubaciones por sitio de estudio y por triplicado para un total de 9 unidades experimentales por tipo de

cobertura vegetal. En 10mL de medio líquido selectivo desnitrificante se midió la actividad a partir de la dilución decimal 2 hasta la dilución 6. A cada tubo se le agregaron ~2mL de aceite mineral para evitar el flujo de gases y favorecer la anaerobiosis. Los tubos se incubaron durante 5 días a 37°C. Una vez observado el crecimiento se utilizó el método descrito por Focht & Joseph (1973) a partir del reactivo que lleva su nombre. Este reactivo está compuesto por: 1g α -naftilamina, 2g ácido sulfanílico y 50g de Sulfato de Bario.

El fundamento de la técnica se basa en la reducción del nitrato como fuente de nitrógeno a otras formas más reducidas que siguen la dinámica de la desnitrificación mostrada en la figura 3. En este método la, α -naftilamina es un indicador que en presencia de nitrito (NO_2) cambia de color a rojo. Entonces si el nitrato del medio fue reducido únicamente hasta nitrito, se produce el cambio de color esperado a rojo. Si el medio permanece incoloro existen dos posibilidades: el nitrato permaneció intacto y no hubo actividad reductora, o el nitrato fue reducido a las formas gaseosas de nitrógeno (NO , N_2O , N_2).

Para establecer cuál de las dos condiciones se está llevando a cabo, el método de Focht & Joseph incluye añadir otra microespátula de zinc granulado. El zinc reduce el nitrato a nitrito y entonces el α -naftilamina indica cuál de las dos posibilidades antes mencionadas. De esta manera si el medio permaneció incoloro entonces el nitrato fue reducido a formas gaseosas, mientras que si el medio cambió de color a rojo, el nitrato permaneció intacto y no hubo actividad desnitrificante.

Se descartaron cerca de 8mL del medio para hacer el experimento en 2mL. A cada tubo se le agregó una microespátula del reactivo de Focht & Joseph, si no hubo cambio de color se agregó una microespátula de zinc granulado.

3.7 Respiración del suelo

Para determinar la actividad biológica total del suelo como respiración, se incubaron las muestras de núcleo intacto para cuantificar el consumo de oxígeno. Se pesaron 250g en

frascos de 1L y se dejaron incubar por 12 horas en un módulo de respiración Comput-OX línea AV4R, marca N-Con Systems®.

3.8 Análisis Estadísticos

Se hicieron análisis de varianza a las mediciones de emisión de N₂O y a cada uno de los factores ambientales y biológicos, se compararon las medias por tipo (oyamel, encino, arbustos y herbáceas), por tiempos de muestreo (Septiembre, Octubre, Noviembre) y al sistema completo. Los datos de emisión de N₂ fueron transformados logarítmicamente. Para pruebas paramétricas se utilizó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) y para pruebas no paramétricos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$). Para determinar el efecto de los factores ambientales y biológicos sobre la emisión se hicieron pruebas de correlación de Pearson y de componentes principales ($\alpha=0.05$) para los doce sitios de estudio. Todos los análisis estadísticos se hicieron en el programa XLSTAT Base® de Addinsoft (2015).

VI. RESULTADOS

1. Emisión de Óxido Nitroso (N_2O) y Nitrógeno Molecular (N_2) *in situ*

1.1 Emisión de N_2O *in situ*

Se cuantificó la emisión mayor de N_2O en el suelo de herbáceas ($0.76 \text{ ng } N_2O\text{-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) seguida del suelo de arbustos ($0.61 \text{ ng } N_2O\text{-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y el suelo del bosque de oyamel ($0.51 \text{ ng } N_2O\text{-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), mientras que en el suelo del bosque de encino se estimó la menor emisión de N_2O ($0.12 \text{ ng } N_2O\text{-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Los cuatro tipos de cobertura vegetal presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la emisión de N_2O (Fig. 7). No hubo diferencia significativa en la emisión de N_2O entre los suelos del bosque de encino y oyamel, tampoco entre los suelos del bosque de oyamel y arbustos, y entre los suelos de arbustos y herbáceas.

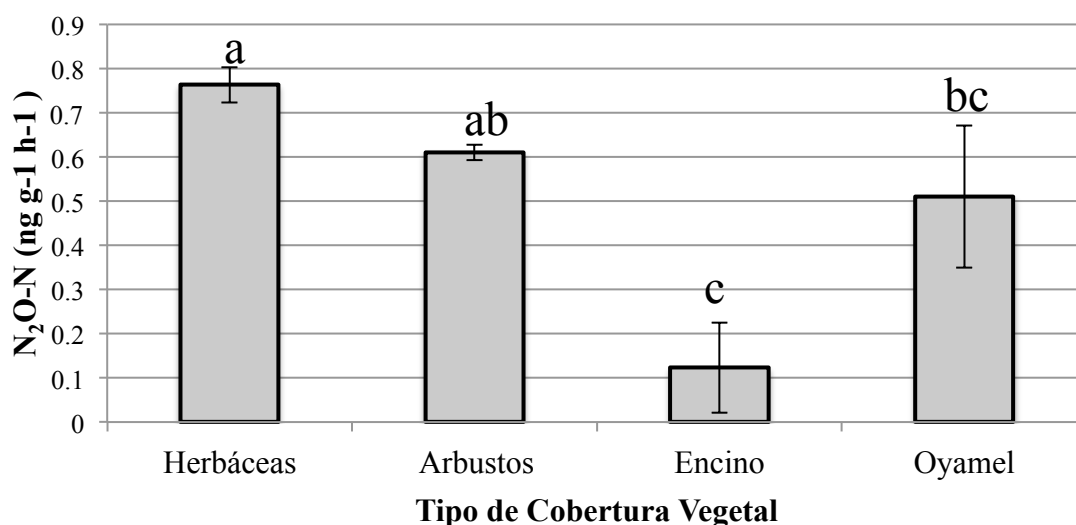


Fig. 7. Emisión de N_2O por tipo de cobertura vegetal. Kruskal-Wallis ($n=3$, $\alpha=0.05$), letras iguales no hay diferencias significativas. Las barras muestran la desviación estándar.

1.2 Emisión de N₂

Al contrario de la emisión de N₂O donde el suelo del bosque de encino tuvo los valores más bajos, para la medición de N₂ el suelo del bosque de encino presentó las tasas más altas de emisión de N₂ (0.91 ng N₂-N g⁻¹ h⁻¹) seguido del suelo de arbustos (0.62 ng N₂-N g⁻¹ h⁻¹), y el suelo de herbáceas (0.26 ng N₂-N g⁻¹ h⁻¹). El suelo del bosque de oyamel presentó la emisión de N₂ más baja (0.25 ng N₂-N g⁻¹ h⁻¹). Los cuatro tipos de cobertura vegetal presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la emisión de N₂ (Fig. 8). No hubo diferencia significativa en la emisión de N₂ entre los suelos de arbustos y del bosque de encino, y entre los suelos de herbáceas y del bosque de oyamel

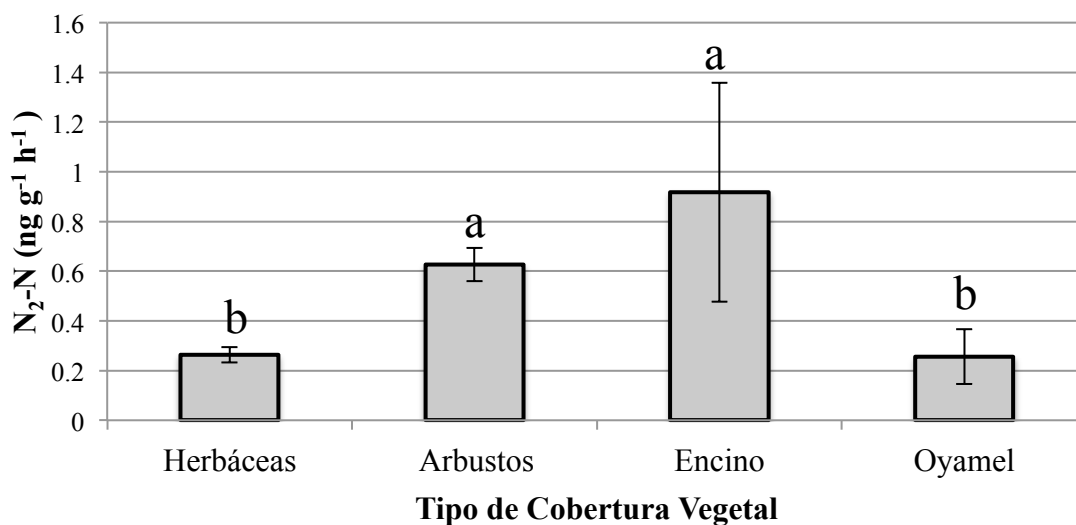


Fig. 8. Emisión de N₂ por tipo de cobertura vegetal. Tukey (n=3, $\alpha=0.05$), letras iguales no hay diferencias significativas. Las barras muestran la desviación estándar.

Tanto en la emisión de N₂O como en la emisión de N₂, el sitio de muestreo 3 del suelo del bosque de encino presentó magnitudes en un orden de diferencia inferior y superior respectivamente, con respecto a los otros dos sitios de muestreo. Al considerar ambos datos como valores atípicos y eliminarlos del análisis estadístico se observó que para la emisión de N₂O no hubo diferencia en el análisis de varianza. Sin embargo para la emisión de N₂ sí hubo diferencia en el análisis de varianza, haciendo que el suelo del bosque de encino presentara diferencia significativa con respecto a los otros tres tipos de cobertura vegetal.

2. Factores Ambientales

El cuadro IV muestra un resumen de los factores ambientales analizados en cada uno de los sitios de estudio.

Cuadro IV. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS DOCE SITIOS DE MUESTREO.

Sitio	Altitud msnm	Humedad %	Densidad g cm ⁻³	NTS g/kg	NH ₄ mg/kg	NO ₃ mg/kg	MOS g/kg	Temperatura °C	pH
O1	3249	53.0	0.57	14.3	31.1	4.98	490	10.0	5.9
O2	3224	65.2	0.74	15.0	39.7	0.15	470	11.8	5.7
O3	3244	65.5	0.70	19.7	66.4	0.79	443	8.5	5.6
E1	3008	45.3	0.72	7.2	31.1	5.77	189	11.0	5.2
E2	3003	44.4	0.88	4.7	33.9	0.33	146	12.3	5.5
E3	3005	42.0	0.96	8.0	30.3	0.17	246	10.1	5.2
A1	2719	30.4	1.09	4.8	16.6	1.20	116	14.4	6.2
A2	2808	33.8	1.35	4.7	24.6	0.23	131	14.9	5.9
A3	2626	32.0	0.97	4.8	7.94	0.15	118	11.5	5.8
H1	2674	22.3	1.41	3.9	14.4	5.32	60	22.5	5.7
H2	2756	25.8	1.66	2.0	12.3	0.41	49	17.5	5.7
H3	2608	24.7	1.39	1.5	8.67	0.28	53	14.6	6.4

O: oyamel, E: encino, A: arbustos, H: herbáceas.

2.1 Propiedades físicas del suelo

El cuadro V muestra la textura del suelo y el contenido de arena, arcilla y limo. Se puede observar como los suelos del bosque de oyamel y del bosque de encino mostraron ser más ricos en arena, mientras que los suelos de arbustos y herbáceas en arcillas. Los contenidos de arena y limo en los suelos del bosque de oyamel (arena = 79%, limo = 14%) y del bosque de encino (arena = 75.3%, limo = 20%) fueron significativamente diferentes de los suelos de herbáceas (arena = 42%, limo = 41%) y arbustos (arena = 54%, limo = 36%) ($p <$

0.05). De acuerdo con la clasificación de suelos del ISRIC, los suelos del bosque de oyamel y del bosque de encino son suelos Leptosol y Úmbrico, y los suelos de herbáceas y arbustos son Phaeozem y Luvisol.

Cuadro V. TEXTURA Y TIPO DE SUELO EN LOS DOCE SITIOS DE MUESTREO.

Sitio	Arena	Arcilla	Limo	Tipo de Suelo
Oyamel 1	78%	6%	16%	franco arenoso
Oyamel 2	80%	7%	13%	franco arenoso
Oyamel 3	80%	8%	12%	franco arenoso
Encino 1	76%	4%	20%	franco arenoso
Encino 2	79%	4%	17%	franco arenoso
Encino 3	72%	4%	24%	franco arenoso
Arbustos 1	59%	9%	32%	franco arenoso
Arbustos 2	53%	11%	36%	franco
Arbustos 3	49%	11%	40%	franco
Herbáceas 1	51%	11%	38%	franco
Herbáceas 2	29%	25%	46%	franco
Herbáceas 3	45%	15%	40%	franco

2.2 Dinámica de Oxígeno en el Suelo

2.2.1 Contenido de Humedad

En general, se observó que el contenido de humedad aumentó a medida que la altitud se elevaba. De acuerdo a esta tendencia el suelo de herbáceas presentó el contenido de humedad más bajo (24.24%) seguido del suelo de arbustos (31.72%) y el suelo del bosque de encino (43.9%). El suelo del bosque de oyamel presentó el contenido de humedad más alto (61.23%) Los cuatro tipos de cobertura vegetal presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el contenido de humedad (Fig. 9).

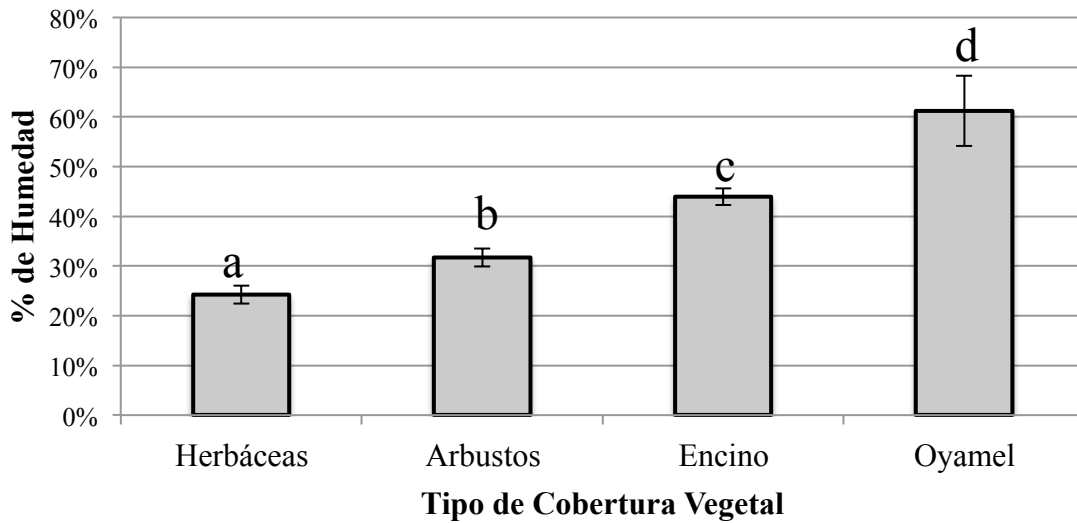


Fig. 9. Contenido de humedad del suelo por tipo de cobertura vegetal. Tukey ($n=3$, $\alpha=0.05$), letras iguales no hay diferencias significativas. Las barras muestran la desviación estándar.

2.2.2 Densidad aparente

A diferencia del contenido de humedad, la densidad aparente fue inversa a la altitud. El suelo de herbáceas presentó la densidad aparente más alta (1.49 g cm^{-3}) seguido del suelo de arbustos (1.14 g cm^{-3}), y del suelo del bosque de encino (0.86 g cm^{-3}). El suelo del bosque de oyamel presentó la densidad aparente más baja (0.67 g cm^{-3}). Los cuatro tipos de cobertura vegetal presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la densidad aparente del suelo (Fig. 10). No se observó diferencia significativa entre la densidad aparente de los suelos de herbáceas y arbustos, tampoco en la densidad aparente de los suelos de arbustos y de los bosques de encino y oyamel.

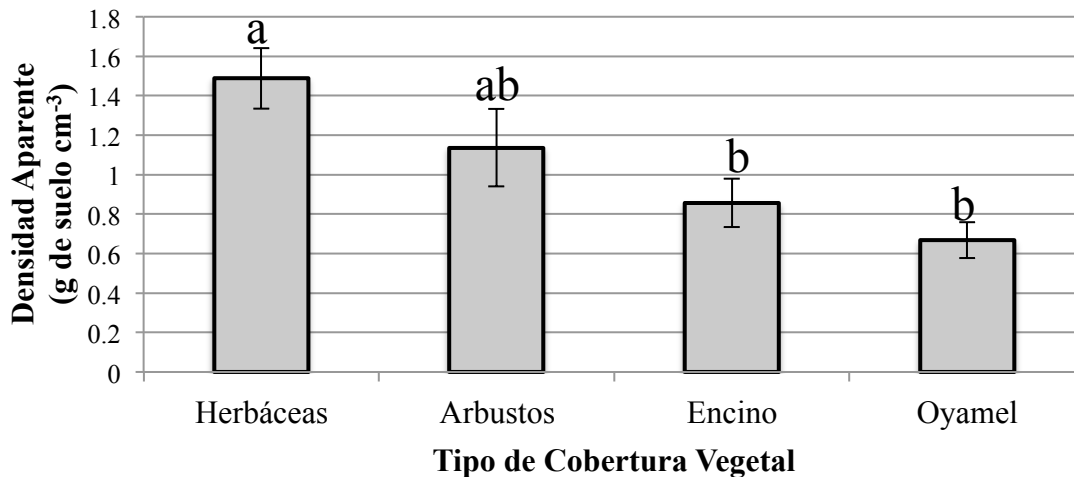


Fig. 10. Densidad aparente del suelo por tipo de cobertura vegetal. Tukey ($n=3$, $\alpha=0.05$), letras iguales no hay diferencias significativas. Las barras muestran la desviación estándar.

La prueba de correlación de Pearson ($p < 0.05$) entre contenido de humedad, densidad aparente del suelo, textura del suelo y altitud indicó que a medida que aumenta la altitud también aumenta el contenido de humedad ($R^2 = 0.949$) y el contenido de arena ($R^2 = 0.846$). Por el contrario, la densidad aparente disminuyó a medida que aumentaba la altitud ($R^2 = -0.791$).

2.3 Fertilidad del suelo

Los siguientes factores relacionados con la fertilidad del suelo se obtuvieron de muestras compuestas de cada uno de los sitios de muestreo. Por lo tanto, sólo se presenta el promedio de las tres repeticiones por tipo de cobertura vegetal.

2.3.1 Nitrógeno

i) Nitrógeno total

La tendencia que sigue la concentración de nitrógeno total en suelo mostró ser proporcional a la altitud, el suelo de herbáceas presentó el contenido de nitrógeno total más bajo (2.5 g

N/kg de suelo) seguido del suelo de arbustos (4.8 g N/kg de suelo) y el suelo del bosque de encino (6.6 g N/kg de suelo). El contenido de nitrógeno total en el suelo del bosque de oyamel es más que la suma del contenido de nitrógeno total en el suelo de los otros tres tipos de cobertura vegetal (16.3 g N/kg de suelo). Los cuatro tipos de cobertura vegetal presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la concentración de nitrógeno total del suelo (Fig. 11). No hay diferencia significativa ($p < 0.05$) en la concentración de nitrógeno total del suelo en los suelos de herbáceas, arbustos y del bosque de encino.

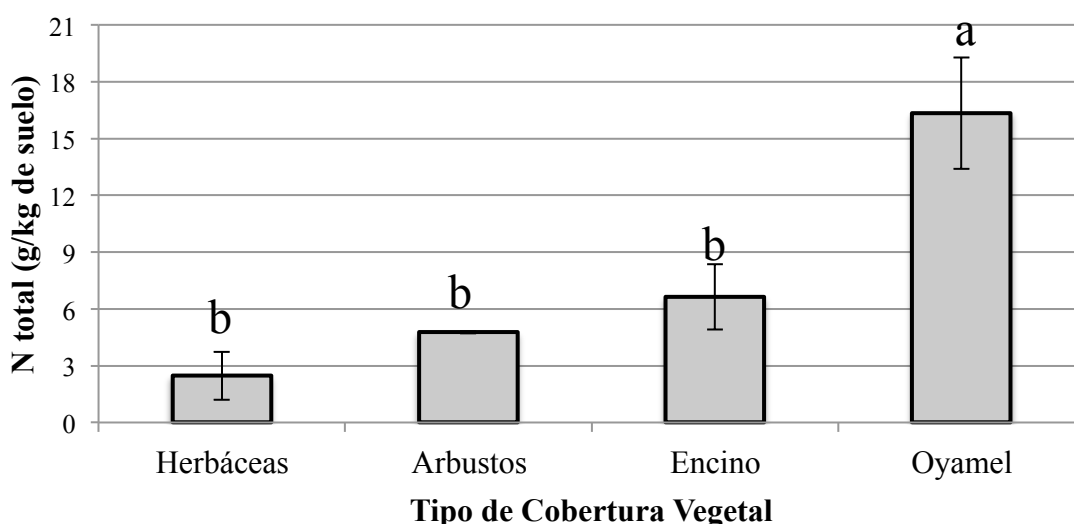


Fig. 11. Nitrógeno total del suelo por tipo de cobertura vegetal. Kruskal-Wallis ($n=3$, $\alpha=0.05$), letras iguales no hay diferencias significativas. Las barras muestran la desviación estándar.

ii) Amonio (NH_4^+)

La concentración de NH_4^+ en los cuatro tipos de cobertura vegetal siguió la misma tendencia que el contenido de nitrógeno total, ya que también fue proporcional a la altitud. El suelo de herbáceas mostró tener la concentración menor de NH_4^+ (11.79 mg NH_4^+ /kg de suelo), seguido del suelo de arbustos (16.38 mg NH_4^+ /kg de suelo) y el suelo del bosque de encino (31.77 mg NH_4^+ /kg de suelo). El suelo del bosque de oyamel tiene la concentración mayor de NH_4^+ (45.73 mg NH_4^+ /kg de suelo). Los cuatro tipos de cobertura vegetal

presentaron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en la concentración de NH_4^+ en el suelo (Fig. 12). No hubo diferencia significativa entre la concentración de NH_4^+ entre los suelos del bosque de oyamel y del bosque de encino, tampoco hubo diferencia significativa entre los suelos de herbáceas, arbustos y del bosque de encino.

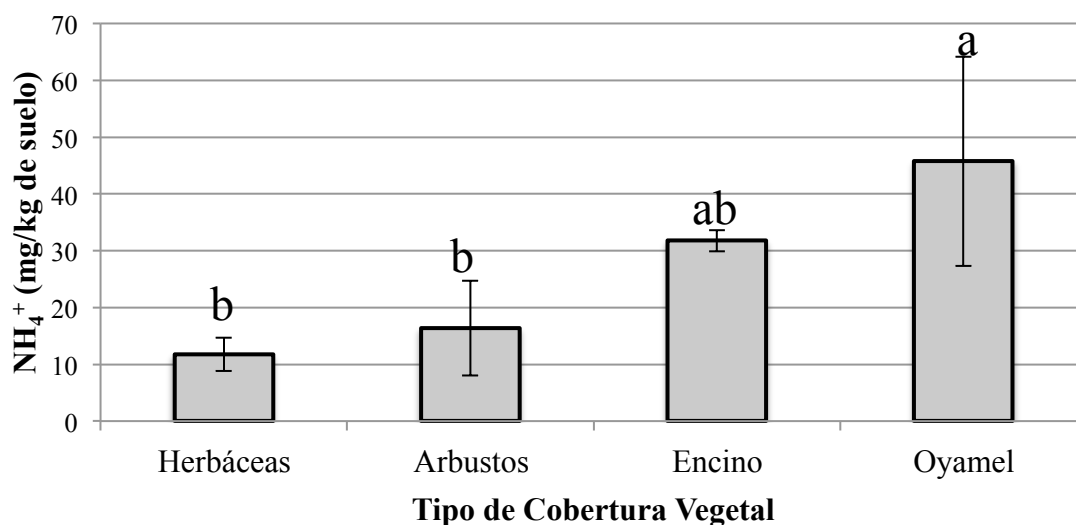


Fig. 12. Contenido de amonio (NH_4^+) del suelo por tipo de cobertura vegetal. Kruskal-Wallis ($n=3$, $\alpha=0.05$), letras iguales no hay diferencias significativas. Las barras muestran la desviación estándar.

iii) Nitrato (NO_3^-)

El muestreo de septiembre en los cuatro tipos de cobertura vegetal presentó concentraciones de NO_3^- un orden de magnitud superior a los muestreos de octubre y noviembre. En este muestreo, el suelo del bosque de encino presentó la concentración mayor de NO_3^- en el suelo (5.77 mg NO_3^- /kg de suelo), mientras que el suelo de arbustos presentó la concentración menor de NO_3^- en el suelo (1.2 mg NO_3^- /kg de suelo). En el muestreo de octubre, el suelo de herbáceas presentó la concentración mayor de NO_3^- en el suelo (0.41 mg NO_3^- /kg de suelo), mientras que el suelo del bosque de oyamel presentó la concentración menor de NO_3^- en el suelo (0.15 mg NO_3^- /kg de suelo). En el muestreo de noviembre, el suelo del bosque de oyamel presentó la concentración mayor de NO_3^- en el suelo (0.79 mg NO_3^- /kg de suelo), mientras que el suelo de arbustos presentó la

concentración menor de NO_3^- en el suelo ($0.15 \text{ mg NO}_3^-/\text{kg}$ de suelo). El análisis de correlación de Pearson ($p < 0.05$) determinó que la concentración de NO_3^- no correlacionó con ninguna otra variable de estudio.

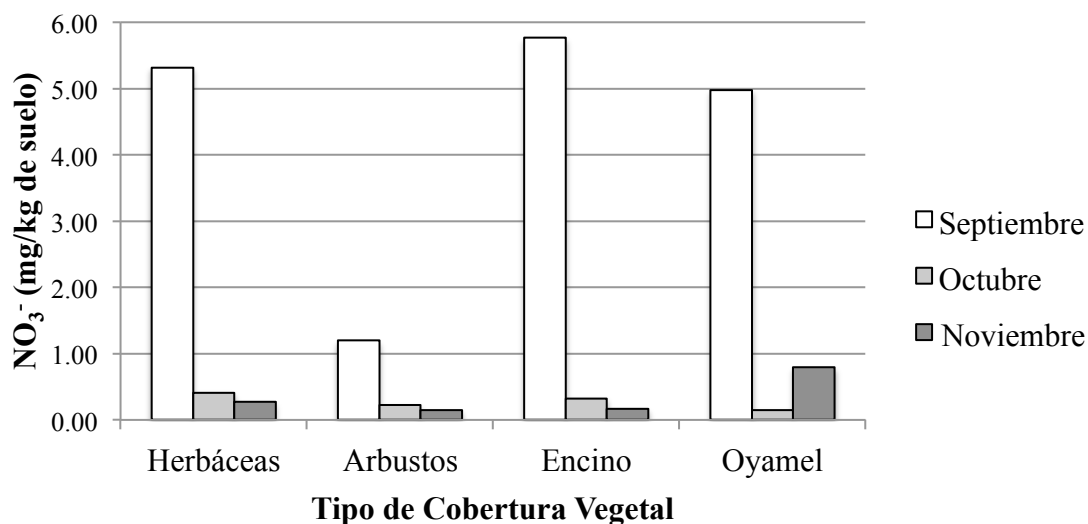


Fig. 13. Contenido de nitrato (NO_3^-) en el suelo por tipo de cobertura vegetal.

2.3.2 Carbono

i) Materia orgánica del suelo (MOS)

Igual que la concentración de nitrógeno total del suelo y la concentración de NH_4^+ en el suelo, el contenido de materia orgánica del suelo fue proporcional a la altitud. El suelo de herbáceas mostró el contenido de materia orgánica del suelo más bajo (54 g MO/kg de suelo) seguido del suelo de arbustos (122 g MO/kg de suelo) y el suelo del bosque de encino (194 g MO/kg de suelo). El suelo del bosque de oyamel tiene el contenido de materia orgánica del suelo más alto (468 g MO/kg de suelo). Los cuatro tipos de cobertura vegetal presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el contenido de materia orgánica del suelo (Fig. 14). No hubo diferencia significativa entre los suelos de arbustos y del bosque de encino, y tampoco hubo diferencia significativa entre los suelos de arbustos y herbáceas.

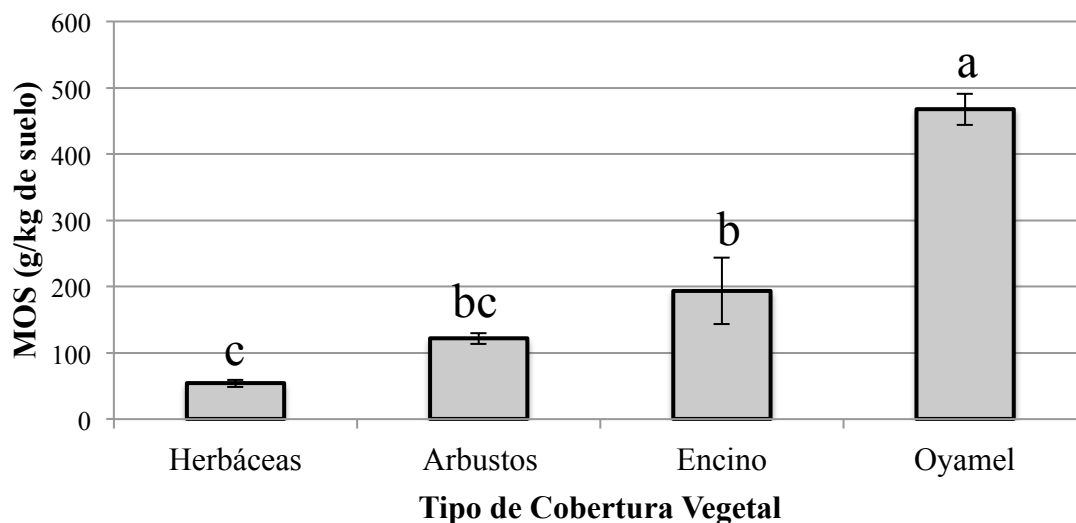


Fig. 14. Materia orgánica del suelo por tipo de cobertura vegetal. Kruskal-Wallis (n=3, $\alpha=0.05$), letras iguales no hay diferencias significativas. Las barras muestran la desviación estándar.

ii) Carbono orgánico del suelo (COS)

El carbono orgánico del suelo se obtiene del 58% de la fracción del contenido de materia orgánica del suelo:

$$COS = MOS * 0.58$$

El cuadro VI muestra el contenido de carbono orgánico del suelo de cada uno de los sitios de muestro en los cuatro tipos de cobertura vegetal.

Cuadro VI. CONTENIDO DE CARBONO ORGÁNICO DEL SUELO POR TIPO DE COBERTURA VEGETAL EN LOS TRES SITIOS DE MUESTREO.

Sitio de Muestreo	Herbáceas [†]	Arbustos [†]	Encino [†]	Oyamel [†]
1	35	67	110	284
2	28	76	85	273
3	31	68	143	257

[†] g de Carbono orgánico/kg de suelo.

2.4 Relación carbono:nitrógeno (C:N)

A partir del contenido de carbono orgánico en el suelo y el contenido total de nitrógeno en el suelo fue posible calcular la relación carbono nitrógeno. El cuadro VII presenta la relación C:N del suelo de los doce sitios de muestreo.

Cuadro VII. RELACIÓN CARBONO NITRÓGENO (C:N) POR TIPO DE COBERTURA VEGETAL EN LOS TRES SITIOS DE MUESTREO.

Sitio de Muestreo	Herbáceas	Arbustos	Encino	Oyamel
1	9	14	15	20
2	14	16	18	18
3	20	14	18	13
Promedio	14	15	17	17

El análisis de correlación de Pearson entre los factores de fertilidad del suelo y la altitud indicó que a medida que aumenta la altitud también aumenta el nitrógeno total del suelo ($R^2 = 0.885$), el contenido de amonio ($R^2 = 0.869$) y el contenido de materia orgánica del suelo ($R^2 = 0.923$).

2.5 Temperatura y pH

2.5.1 Temperatura

Igual que la densidad aparente del suelo, la temperatura del suelo fue inversamente proporcional a la altitud. El suelo de herbáceas presentó la temperatura más alta del suelo (18.2°C), seguido del suelo de arbustos (13.6°C) y el suelo del bosque de encino (11.1°C). El suelo del bosque de oyamel presentó la temperatura más baja (10.1°C). Los cuatro tipos de cobertura vegetal presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la temperatura del suelo (Fig. 15). No hubo diferencia significativa en la temperatura del suelo

entre el suelo de herbáceas y arbustos, y ni entre el suelo de arbustos y el suelo de los bosques de encino y oyamel.

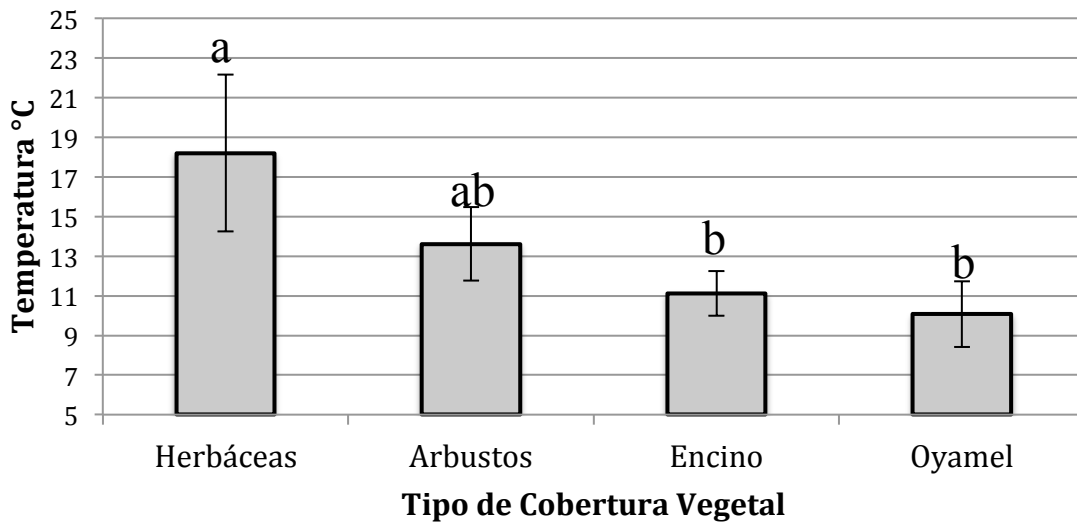


Fig. 15. Temperatura del suelo por tipo de cobertura vegetal. Tukey ($n=3$, $\alpha=0.05$), letras iguales no hay diferencias significativas. Las barras muestran la desviación estándar.

2.5.2 pH

El pH del suelo para cada uno de los cuatro tipos de cobertura vegetal fue: 5.9 para el suelo de herbáceas, 6 para el suelo de arbustos, 5.3 para el suelo del bosque de encino y 5.7 para el suelo del bosque de oyamel, valores estadísticamente iguales entre los cuatro tipos de cobertura vegetal. Estos resultados muestran que el pH fue bastante homogéneo a lo largo del gradiente de cobertura vegetal.

La prueba de correlación de Pearson indicó que a medida que aumenta la altitud disminuye la temperatura del suelo ($R^2 = -0.668$). La correlación entre pH y altitud es positiva, pero no es significativa ($R^2 = 0.319$).

3. Factores Biológicos

3.1 Bacterias Totales

El suelo de arbustos presentó la población de bacterias cultivables totales más grande (3.9×10^5 UFC g^{-1} de suelo), seguido del suelo de herbáceas (3.2×10^5 UFC g^{-1} de suelo) y el suelo del bosque de encino (1.1×10^5 UFC g^{-1} de suelo). El suelo del bosque de oyamel presentó la población de bacterias totales más pequeña (8.0×10^4 UFC g^{-1} de suelo). Las poblaciones de bacterias totales cultivables se encontraron en el mismo rango (1×10^5 UFC g^{-1} de suelo) en los cuatro tipos de cobertura vegetal, por lo que no presentaron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) (Fig. 16).

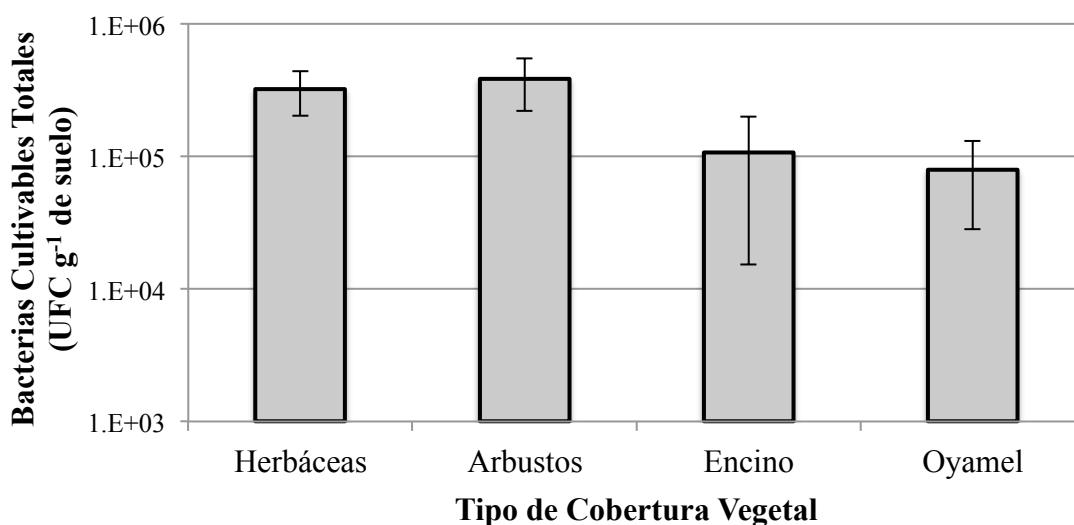


Fig. 16. Población de bacterias cultivables totales por tipo de cobertura vegetal. Tukey ($n=3$, $\alpha=0.05$). Las barras muestran la desviación estándar.

3.2 Bacterias Desnitrificantes

El suelo de herbáceas presentó la población de bacterias desnitrificantes cultivables más grande (2.9×10^5 UFC g^{-1} de suelo), seguido del suelo de arbustos (2.5×10^5 UFC g^{-1} de suelo) y el suelo del bosque de oyamel (1.2×10^5 UFC g^{-1} de suelo). El suelo del bosque de encino presentó la población de bacterias desnitrificantes más pequeña (6.2×10^4 UFC g^{-1}

de suelo). Las poblaciones de bacterias desnitrificantes cultivables se encontraron en el mismo rango (1×10^5 UFC g^{-1} de suelo) en los cuatro tipos de cobertura vegetal, por lo que no presentaron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) (Fig. 17).

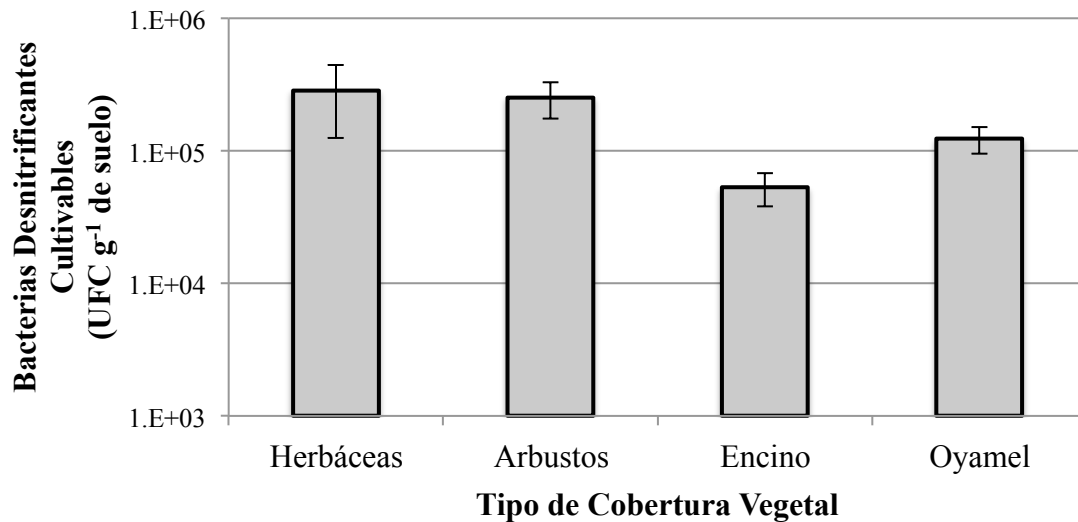


Fig. 17. Población de bacterias desnitrificantes cultivables por tipo de cobertura vegetal. Tukey ($n=3$, $\alpha=0.05$). Las barras muestran la desviación estándar.

3.3 Actividad Desnitrificante

El 89% de los tubos de cultivo de bacterias del suelo de herbáceas presentaron actividad desnitrificante total y el 11% no presentó actividad desnitrificante. El 89% de los tubos de cultivo de bacterias del suelo de arbustos presentó actividad desnitrificante total, y el 11% presentó desnitrificación parcial. En contraste el 56% de los tubos de cultivo de bacterias del suelo del bosque de oyamel presentó actividad desnitrificante total, y el 44% presentó actividad desnitrificante parcial. El 45% de los tubos de cultivo de bacterias del suelo del bosque de encino presentó actividad desnitrificante total, el 33% presentó actividad parcial, y el 22% no presentó actividad desnitrificante.

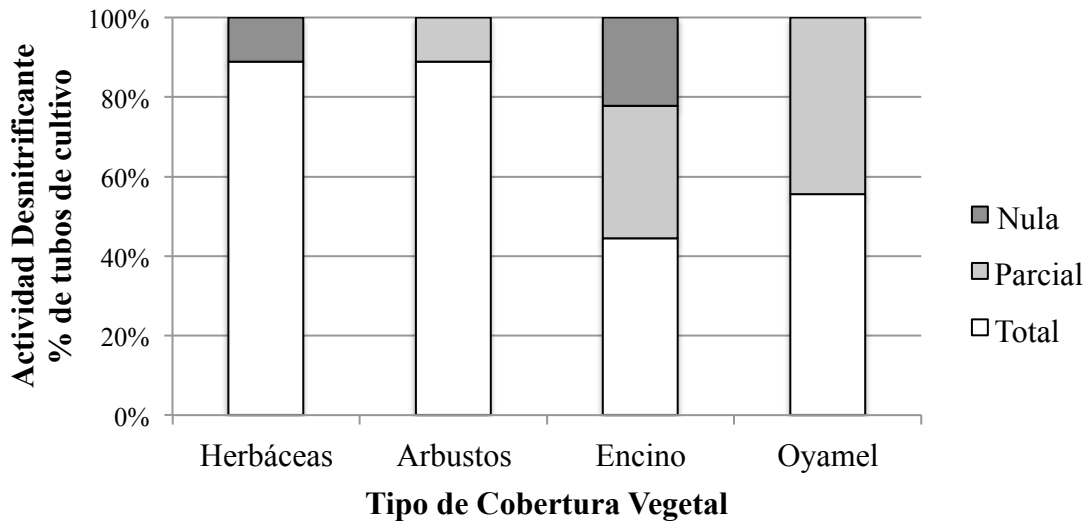


Fig. 18. Actividad desnitricante por tipo de cobertura vegetal. Porcentaje de tubos de cultivo que presentaron reducción del NO_3^- en el medio selectivo líquido. De acuerdo con el método de Focht & Josphe existen tres posibilidades de reducción de NO_3^- : total, parcial o nula (representada en escala de grises).

3.4 Respiración del suelo

El suelo del bosque de oyamel presentó la tasa de respiración más alta ($148.2 \text{ mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), seguido del suelo de herbáceas ($101.8 \text{ mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y el suelo del bosque de encino ($97.4 \text{ mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). El suelo de arbustos presentó la tasa de respiración más baja ($92.3 \text{ mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Los cuatro tipos de cobertura vegetal no presentaron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en la tasa de respiración del suelo (Fig. 19).

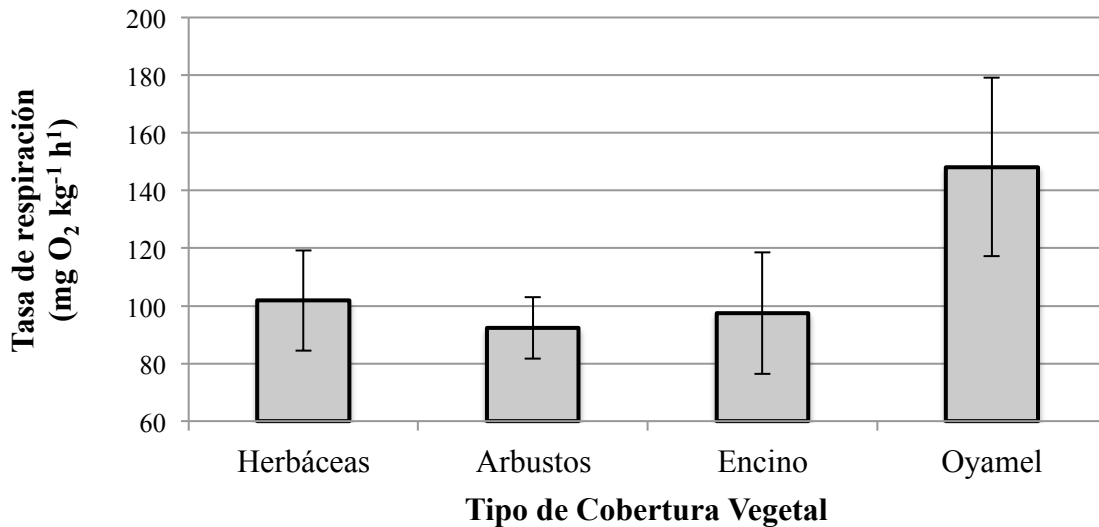


Fig. 19. Respiración del suelo por tipo de cobertura vegetal. Tukey (n=3, $\alpha=0.05$). Las barras muestran la desviación estándar.

El análisis de correlación de Pearson entre altitud y población total y desnitrificante indicó que a medida que aumenta la altitud disminuyen tanto la población total de bacterias cultivables totales ($R^2 = 0.788$), y como la población de bacterias desnitrificantes ($R^2 = -0.687$).

4. Análisis de Correlación y Componentes Principales

4.1 Análisis de correlación de Pearson

La correlación entre la emisión total de N₂O y los factores ambientales y biológicos indica que los factores que están asociados a una mayor emisión de este gas son los siguientes: una mayor población de bacterias desnitrificantes es mayor ($R^2 = 0.702$), y de bacterias cultivables totales ($R^2 = 0.596$), una mayor densidad del suelo ($R^2 = 0.631$), rico en arcilla ($R^2 = 0.714$), y pobre en arena ($R^2 = -0.682$) y con altos valores de pH ($R^2 = 0.711$). La emisión de N₂ correlaciona con la emisión de N₂O negativamente ($R^2 = -0.749$).

Cuadro VIII. CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LAS VARIABLES.

Variables	Altitud	N ₂	N ₂ O	P. Total	P. Desni- nitrificante	Densidad Aparente	NTS	NH ₄	MOS	Temperatura	pH	Arena	Arcilla
Altitud	1												
Emisión de N ₂	-0.02	1											
Emisión de N ₂ O	-0.50	-0.74	1										
Población Total	-0.78	-0.18	0.59	1									
P. Desni- nitrificante	0.68	-0.40	0.70	0.67	1								
Densidad Aparente	-0.79	-0.24	0.63	0.61	0.50	1							
NTS	0.88	-0.27	-0.18	-0.56	-0.37	-0.77	1						
NH ₄	0.86	0.00	-0.37	-0.65	-0.51	-0.66	0.87	1					
MOS	0.92	-0.26	-0.25	-0.59	-0.46	-0.80	0.95	0.77	1				
Temperatura	-0.66	-0.21	0.55	0.51	0.66	0.81	-0.64	-0.61	-0.67	1			
pH	0.31	0.43	-0.71	-0.37	-0.56	-0.31	0.09	0.27	0.09	-0.34	1		
Arena	0.84	0.26	-0.68	-0.67	-0.51	-0.91	0.74	0.78	0.77	-0.68	0.39	1	
Arcilla	-0.53	-0.43	0.71	0.35	0.28	0.79	-0.44	-0.49	-0.48	0.55	-0.44	-0.88	1

Números en negritas tienen correlación significativa ($\alpha = 0.05$)

Al analizar la correlación entre la población de bacterias desnitrificantes cultivables y los factores ambientales, se observó que los factores que se asociaron a una mayor población de estas bacterias fueron temperaturas mayores ($R^2 = 0.665$) y bajos contenidos de humedad en el suelo ($R^2 = -0.616$).

4.2 Análisis de Componentes principales

En la figura 20 se observa que el primer componente principal explica el 57.57% de la variación entre tipos de cobertura vegetal y separa al suelo de los bosques de oyamel y encino del suelo de herbáceas y arbustos. El segundo componente principal explica el 17.48% de la variación y separa al suelo del bosque de encino de los otros tres tipos de cobertura vegetal. Asimismo los suelos de herbáceas y arbustos se agruparon en un mismo cuadrante.

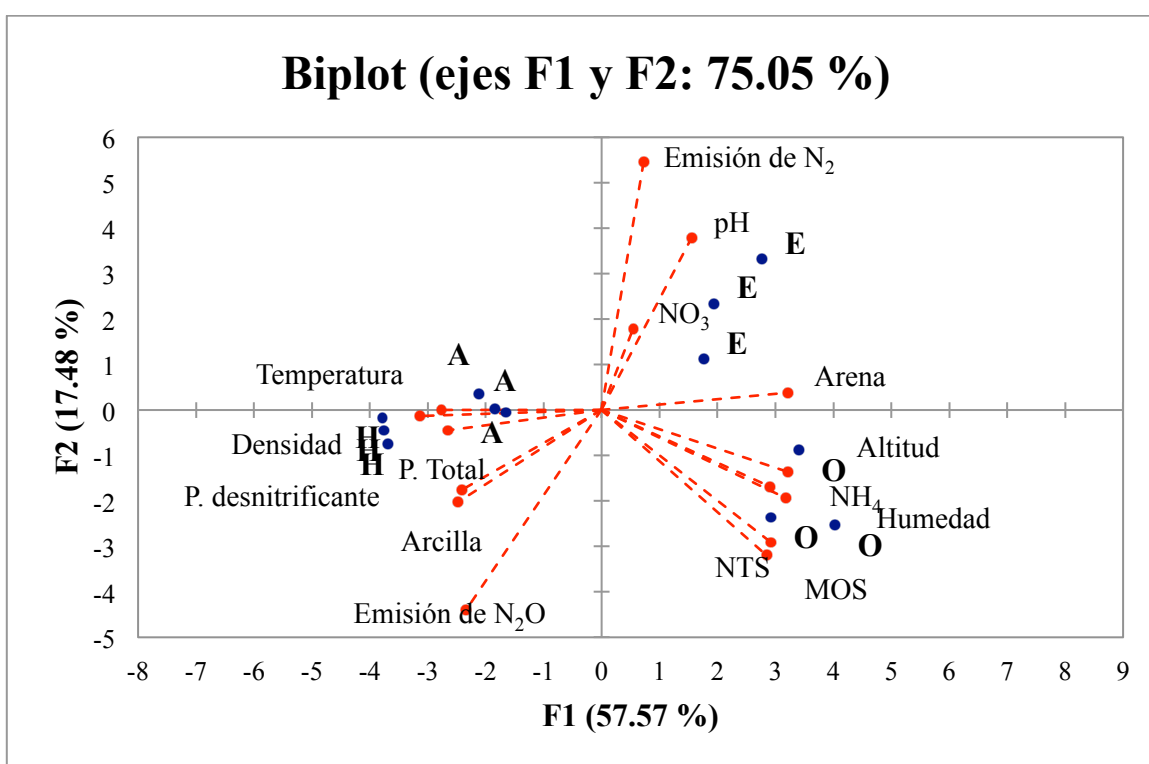


Fig. 20. Análisis de Componentes Principales. H: herbáceas, A: arbustos, E: encino, O: oyamel. NTS: Nitrógeno total del suelo, MOS: Materia orgánica del suelo.

El primer componente principal está correlacionado con la altitud, la textura del suelo (arena y arcilla), la temperatura, el contenido de humedad, la densidad aparente, el nitrógeno total del suelo, el contenido de materia orgánica del suelo (MOS), la concentración de NH₄⁺ y las poblaciones bacterianas cultivables totales y desnitrificantes. El segundo componente principal está correlacionado con la emisión de N₂, la emisión de

N₂O y el pH. Por último el tercer componente principal está correlacionado con la concentración de NO₃⁻. Estos datos se muestran con mayor detalle en el cuadro IX.

Cuadro IX. CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES Y LOS FACTORES DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

	F1	F2	F3	F4
Altitud	0.942¹	-0.220	-0.007	-0.202
Emisión de N ₂	0.212	0.877¹	-0.056	0.149
Emisión de N ₂ O	-0.681	-0.707¹	0.034	0.006
PBCT ²	-0.775¹	-0.072	0.030	0.469
PBCT-D ³	-0.704¹	-0.283	0.523	0.289
Humedad	0.932¹	-0.313	-0.074	0.006
Densidad	-0.918¹	-0.021	-0.183	-0.241
NTS ⁴	0.831¹	-0.515	0.114	-0.006
NH ₄ ⁺	0.850¹	-0.273	-0.063	-0.056
NO ₃ ⁻	0.159	0.287	0.828¹	-0.389
MOS ⁵	0.854¹	-0.468	0.092	-0.019
Temperatura	-0.808¹	-0.001	0.339	-0.283
pH	0.454	0.609¹	-0.128	-0.222
Arena	0.941¹	0.062	0.186	0.185
Arcilla	-0.723¹	-0.327	-0.331	-0.457

¹Números en negritas tienen correlación significativa ($\alpha = 0.05$)

²PBCT Población de bacterias cultivables totales

³PBCT-D Población de bacterias cultivables con actividad desnitrificante

⁴NTS Nitrógeno total del suelo

⁵MOS Materia orgánica del suelo

En resumen, el suelo del bosque de oyamel, localizado a mayor altitud, está caracterizado por tener el contenido de humedad más alto y las concentraciones más altas de MOS, NTS y NH₄⁺. Los suelos de arbustos y herbáceas, en la zona baja de la montaña, se caracterizan por tener la temperatura más alta, la densidad aparente más alta, el contenido de arcilla más alto y las poblaciones bacterianas cultivables desnitrificantes y totales más altas. Aunque las emisiones de N₂O y N₂ no están correlacionadas con el primer componente principal, el suelo de herbáceas mostró una mayor emisión de N₂O, mientras que la mayor emisión de N₂ se registró en el suelo del bosque de encino. Este último tipo de cobertura vegetal comparte el mismo contenido de arena con el suelo del bosque de oyamel, y tiene el pH más bajo con un valor de 5.28.

IX. DISCUSIÓN

En el bosque templado del Pinal del Zamorano el suelo de la zona baja de la montaña dominada por especies herbáceas anuales presentó la mayor emisión de N_2O *in vitro*, seguida del suelo de arbustos. Mediciones semejantes *in situ* en diferentes bosques de montaña en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, han mostrado que las zonas bajas de la montaña presentan una mayor emisión comparada con las zonas altas (Koehler, Corre, Veldkamp, Wullaert, & Wright, 2009; Purbopuspito, Veldkamp, Brumme, & Murdiyarto, 2006; Wolf, Veldkamp, Homeier, & Martinson, 2011). Respecto a la emisión de N_2O en los dos tipos de cobertura forestal dominados por encino y oyamel, se esperaría que la emisión fuera menor en el bosque de coníferas como sucede en otros bosques de las regiones templadas del mundo (Fang et al., 2015; Inclán et al., 2012; Vermes & Myrold, 1992). Sin embargo las mediciones *in vitro* no lo mostraron en el Pinal del Zamorano, sino que el bosque de encino presentó la emisión más baja.

Ya que la emisión de N_2O en esta investigación se midió *in vitro*, con las mismas condiciones de saturación y a la misma temperatura, los factores que pueden estar determinando esta tendencia son aquellos relacionados a las propiedades nutricionales y microbianas del suelo de cada tipo de cobertura vegetal. Al considerar estos factores nutricionales del suelo, como son el contenido de materia orgánica, el contenido de nitrógeno total y nitrógeno amoniacal, se observan contenidos mayores en los suelos forestales de encino y oyamel. Así, no es raro que el suelo del bosque de oyamel haya presentado una emisión semejante al suelo de herbáceas y arbustos, ya que estos factores favorecen la desnitrificación bajo condiciones limitantes de oxígeno, o de saturación, en el experimento *in vitro* (Lloyd, 1993; Tiedje, 1988).

En el caso específico del suelo de herbáceas y arbustos se midieron bajos contenidos de carbono orgánico, nitrógeno total y NH_4^+ , lo que generalmente indica una tasa alta de inmovilización. En este caso las pérdidas de nitrógeno pueden ocurrir principalmente durante eventos de anegación como se observa en el experimento *in vitro* (Grageda-Cabrera et al., 2004). Lo contrario sucede en el suelo del bosque de encino, donde contenidos altos

de carbono orgánico, nitrógeno total y NH_4^+ pueden indicar una tasa alta de mineralización, y una emisión baja de N_2O , incluso en condiciones de saturación. Esto sugiere una tasa alta de inmovilización, es decir un ciclo de nitrógeno más dinámico y cerrado (i.e., con menos pérdidas) (Purbopuspito et al., 2006).

Bajas temperaturas y altos contenidos de humedad disminuyen las tasas de mineralización y de inmovilización en el suelo de la zona alta de las montañas (Wolf et al., 2011). Sin embargo, grandes entradas de materia vegetal en el suelo del bosque de oyamel, indicado por los altos contenidos de materia orgánica, no descartan una tasa de mineralización mayor a la tasa de inmovilización (Wolf et al., 2011). Para contextualizar estos procesos en el Pinal del Zamorano, es necesario hacer las mediciones *in situ*, ya que el aumento en la temperatura y la perturbación al obtener la muestra, así como la saturación del suelo durante el experimento *in vitro*, pueden ocasionar pérdidas de nitrógeno por desnitrificación que no necesariamente ocurren *in situ*.

En el análisis de correlación de Pearson se observó que la emisión de N_2O estaba asociada a las poblaciones bacterianas. Aunque no hubo diferencias significativas en las poblaciones bacterianas desnitrificantes cultivables en el suelo de los cuatro tipos de cobertura vegetal, el experimento de la actividad desnitrificante mostró que los suelos de herbáceas y arbustos presentaron una mayor actividad, comparados con el suelo de los bosques de encino y oyamel. Las mediciones de N_2O *in vitro* también indican una mayor emisión en los suelos de herbáceas y arbustos, lo cual refuerza que la actividad desnitrificante en estos suelos es mayor comparada con los suelos forestales, a pesar de que, el suelo del bosque de encino presentó condiciones altas de materia orgánica, nitrógeno total y nitrógeno amoniacal. No hay que descartar el hecho de que el suelo del bosque de encino presentó altos contenidos de arena y una densidad aparente baja, factores ambientales que no favorecen la desnitrificación (Groffman & Tiedje, 1989), y que en el análisis Pearson, tuvieron una correlación negativa con la emisión de N_2O .

El suelo de herbáceas y arbustos presentó las temperaturas más altas, y el bosque de oyamel las más bajas. Esto podría reducir la actividad microbiana en el suelo del bosque de oyamel,

y por lo tanto disminuir la emisión de N_2O en mediciones *in situ*, modificando la tendencia que se observa en las mediciones *in vitro* de esta investigación. Para descartar el efecto del contenido de humedad *in situ*, las mediciones tendrían que hacerse inmediatamente después de un evento de precipitación donde el suelo mostrara las mismas condiciones de saturación. Al extender los períodos de muestreo para incluir la temporada seca de diciembre a mayo y los meses más calientes durante el verano se tendría un mejor panorama de las pérdidas de nitrógeno por desnitrificación en el Pinal del Zamorano.

Los resultados más sobresalientes de esta investigación sugieren que es la actividad de las poblaciones microbianas desnitrificantes el factor que más determina la emisión de N_2O en los diferentes tipos de cobertura vegetal. El experimento *in vitro* eliminó el efecto que la altitud y sus factores asociados, como el contenido de humedad, la temperatura y la textura del suelo, tienen sobre la emisión de N_2O dejando que la desnitrificación ocurra únicamente por el uso que los microorganismos hacen de los nutrientes presentes en el suelo bajo condiciones limitantes de oxígeno.

Otros factores que podrían incluirse en experimentos *in vitro* son los diferentes horizontes del suelo en los diferentes tipos de cobertura vegetal, principalmente en los suelos forestales de encino y oyamel, ya que los contenidos de materia orgánica y de nitrógeno disminuyen con la profundidad. En esta investigación se muestreó únicamente el suelo del horizonte A. Por otro lado en mediciones *in situ*, debe incluirse el grado de compactación del suelo, ya que este también limita las concentraciones de oxígeno y puede tener un efecto sobre la desnitrificación (De Klein & Van Logtestijn, 1996).

En conclusión, los resultados de esta investigación demuestran que bajo condiciones *in vitro*, factores menos estudiados, como las poblaciones de microorganismos presentes en cada uno de los tipos de cobertura vegetal, podrían afectar significativamente la emisión de N_2O en los suelos forestales de montaña. Estos datos presentan la primera estimación que se hace de la emisión de N_2O en el suelo de un bosque templado de montaña, bajo diferentes coberturas vegetales, en las regiones subtropicales de México.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Arango-Guevara, A. F. (2006). *Caracterización Geológico Ambiental de la cuenca del Río Chichimequillas, Estado de Querétaro*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arriaga-Cabrera, L. (2009). Regiones prioritarias y planeación para la conservación de la biodiversidad. En J. Sarukhán (Ed.), *Capital Natural de México* (pp. 433–457). Ciudad de México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Atlas, R. M. (1993). *Handbook of microbiological media*. (L. C. Parks, Ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Bakken, L. R., Bergaust, L., Liu, B., & Frostegard, A. (2012). Regulation of denitrification at the cellular level: a clue to the understanding of N₂O emissions from soils. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1593), 1226–1234.
- Bonan, G. B. (2008). Forests and climate change: forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *Science*, 320(5882), 1444–1449.
- Bothe, H., Ferguson, S. J., & Newton, W. E. (2007). *Biology of the Nitrogen Cycle*. Oxford: Elsevier.
- Bottomley, P. J., & Myrold, D. D. (2007). biological N inputs. En A. P. Eldor (Ed.), *Soil microbiology, ecology, and biochemistry* (3rd ed., pp. 365–387). Burlington: Academic Press.
- Breuer, L., Papen, H., & Butterbach-Bahl, K. (2000). N₂O emission from tropical forest soils of Australia. *Journal of Geophysical Research*, 105(D21), 26353.
- Bryan, B. A. (1981). Physiology and biochemistry of denitrifiers. En C. C. Delwiche (Ed.), *Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide* (pp. 67–84). N.Y.: John Wiley & Sons.
- Burford, J. R., & Bremner, J. M. (1975). Relationships between the denitrification capacities of soils and total, water-soluble and readily decomposable soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 7(6), 389–394.
- Bustamante, M. M., Martinelli, L. A., Ometto, J. P., do Carmo, J. B., Jaramillo, V., Gavito, M. E., ... Marquina, S. (2014). Innovations for a sustainable future: rising to the challenge of nitrogen greenhouse gas management in Latin America. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 9-10(March), 73–81.

- Carrasco-Núñez, G., Milán, M., & Verma, S. P. (1989). Geología del Volcán Zamorano, Estado de Querétaro. *Revista Instituto de Geología UNAM*, 8(2), 194–201.
- Challenger, A., & Soberón, J. (2008). Los ecosistemas terrestres. En J. Sarukhán (Ed.), *Capital Natural de México* (pp. 88–107). Ciudad de México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Chapin, F. S., Matson, P. A., & Mooney, H. A. (2002). *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology. System* (Vol. 21).
- Cheng, Y., Wang, J., Wang, S. Q., Zhang, J. B., & Cai, Z. C. (2014). Effects of soil moisture on gross N transformations and N₂O emission in acid subtropical forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, 50(7), 1099–1108.
- Dai, Z., Birdsey, R. A., Johnson, K. D., Dupuy, J. M., Hernandez-Stefanoni, J. L., & Richardson, K. (2014). Modeling carbon stocks in a secondary tropical dry forest in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(4), 1925.
- Davidson, A. E., Matson, P. A., Vitousek, P. M., Riley, R., Dunkin, K., & Maass, J. M. (1993). Processes Regulating Soil Emissions of NO and N₂O in a Seasonally Dry Tropical Forest. *Ecology*, 74(1), 130-139.
- Davidson, A. E., & Kingerlee, W. (1997). A global inventory of nitric oxide emissions from soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 48, 37–50.
- De Klein, C. A., & Van Logtestijn, R. S. (1996). Denitrification in grassland soils in The Netherlands in relation to irrigation, N-application rate, soil water content and soil temperature. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(2), 231–237.
- Dobbie, K., & Smith, K. (2001). The effects of temperature, water-filled pore space and land use on N₂O emissions from an imperfectly drained gleysol. *European Journal of Soil Science*, (January 1998), 197–206.
- Ehhalt, D., & Prather, M. (2001). Atmospheric Chemistry and Greenhouse Gases. En J. T. Houghton, Y. Ding, D. J. Griggs, M. Noguer, P. J. van der Linden, X. Dai, ... C. A. Johnson (Eds.), *Climatic Change 2001: The Scientific Basis* (pp. 241–287). NY: Cambridge University Press.
- Erickson, H. E., & Perakis, S. S. (2014). Soil fluxes of methane, nitrous oxide, and nitric oxide from aggrading forests in coastal Oregon. *Soil Biology and Biochemistry*, 76, 268–277.
- Estrada-Muñoz, R. (2002). *Programa de manejo del área natural protegida Pinal del Zamorano*. Guanajuato.

- Fang, Y., Koba, K., Makabe, A., Takahashi, C., Zhu, W., Hayashi, T., ... Yoh, M. (2015). Microbial denitrification dominates nitrate losses from forest ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(5), 1470–1474.
- Fernández, N., Sierra-Alvarez, R., Field, J. A., Amils, R., & Sanz, J. L. (2008). Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *Chemosphere*, *70*(3), 462–474.
- Firestone, M. K. (1982). Biological denitrification. En F. J. Stevenson (Ed.), *Nitrogen in agricultural soils* (pp. 289–326). Madison: American Society of Agronomy.
- Flores-Martínez, A. (Ed.). (2002). Suelos. En *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México* (pp. 85–128). Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Focht, D. D., & Joseph, H. (1973). An improved method for the enumeration of denitrifying bacteria. *Soil Science Society of America Journal*, *37*(5), 698.
- Gómez-Sánchez. (1997). Flora Vascular del cerro El Zamorano. *Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales*, 40.
- Grageda-Cabrera, O. A., Medina-Cázares, T., Aguilar-Acuña, J. L., Hernández-Martínez, M., Solís-Moya, E., Aguado-Santacruz, G. A., & Peña-Cabriales, J. J. (2004). Pérdidas de nitrógeno por emisión de N₂ y N₂O en diferentes sistemas de manejo y con tres fuentes nitrogenadas. *Agrociencia*, *38*, 625–633.
- Groffman, P. M. (2012). Terrestrial denitrification: challenges and opportunities. *Ecological Processes*, *1*(1), 11.
- Groffman, P. M., & Tiedje, J. M. (1989). Denitrification in north temperate forest soils: Spatial and temporal patterns at the landscape and seasonal scales. *Soil Biology and Biochemistry*, *21*(5), 613–620.
- Heylen, K., Vanparrys, B., Wittebolle, L., Verstraete, W., Boon, N., & De Vos, P. (2006). Cultivation of denitrifying bacteria: Optimization of isolation conditions and diversity study. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(4), 2637–2643.
- Inclán, R., Uribe, C., Sánchez, L., Sánchez, D. M., Clavero, Á., Fernández, A. M., ... Jandl, R. (2012). N₂O and CH₄ fluxes in undisturbed and burned holm oak, scots pine and pyrenean oak forests in central Spain. *Biogeochemistry*, *107*(1-3), 19–41.
- IPCC. (2013). *Principles governing IPCC work*. 37th session.
- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiological Reviews*, *46*(1), 43–70.
- Koehler, B., Corre, M. D., Veldkamp, E., Wullaert, H., & Wright, S. J. (2009). Immediate

- and long-term nitrogen oxide emissions from tropical forest soils exposed to elevated nitrogen input. *Global Change Biology*, 15, 2049–2066.
- Kroeze, C., Mosier, A., & Bouwman, L. (1999). Closing the global N₂O budget : A retrospective analysis 1500 - 1994. *Global Biogeochemical Cycles*, 13(1), 1–8.
- Law, B. (2013). Nitrogen deposition and forest carbon. *Bio*, 496, 307–308.
- Lloyd, D. (1993). Aerobic denitrification in soils and sediments: From fallacies to facts. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(10), 352–356.
- MacFarling Meure, C., Etheridge, D., Trudinger, C., Steele, P., Langenfelds, R., van Ommen, T., ... Elkins, J. (2006). Law Dome CO₂, CH₄ and N₂O ice core records extended to 2000 years BP. *Geophysical Research Letters*, 33(14), L14810.
- Papen, H., & Butterbach-Bahl, K. (1999). A 3-year continuous record of nitrogen trace gas fluxes from untreated and limed soil of a N-saturated spruce and beech forest ecosystem in Germany 2. NO and NO₂ fluxes. *J. Geophys. Res.*, 104, 18505–18520.
- Pérez, M. V. A., Castañeda, J. G., Frías-Hernández, J. T., Franco-Hernández, O., Van Cleemput, O., Dendooven, L., & Olalde, V. (2004). Trace gas emissions from soil of the central highlands of Mexico as affected by natural vegetation: a laboratory study. *Biology and Fertility of Soils*, 40(4), 252–259.
- Philippot, L., Andert, J., Jones, C. M., Bru, D., & Hallin, S. (2011). Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N₂O emissions from soil. *Global Change Biology*, 17, 1497–1504.
- Postgate, J. R. (1982). *The fundamentals of Nitrogen Fixation*. Trowbridge: Cambridge University Press.
- Purbopuspito, J., Veldkamp, E., Brumme, R., & Murdiyarso, D. (2006). Trace gas fluxes and nitrogen cycling along an elevation sequence of tropical montane forests in Central Sulawesi, Indonesia. *Global Biogeochemical Cycles*, 20(3).
- Reay, D. S., Davidson, A. E., Smith, K. A., Smith, P., Melillo, J. M., Dentener, F., & Crutzen, P. J. (2012). Global agriculture and nitrous oxide emissions. *Nature Climate Change*, 2(6), 410–416.
- Robertson, G. P., & Groffman, P. M. (2007). Nitrogen transformations. En A. P. Eldor (Ed.), *Soil microbiology, ecology, and biochemistry* (3rd ed., pp. 341–364). Burlington: Academic Press.
- Saggar, S., Jha, N., Deslippe, J., Bolan, N. S., Luo, J., Giltrap, D. L., ... Tillman, R. W. (2013). Denitrification and N₂O:N₂ production in temperate grasslands: Processes,

- measurements, modelling and mitigating negative impacts. *Science of The Total Environment*, 465, 173–195.
- Shiro, Y. (2012). Structure and function of bacterial nitric oxide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(10), 1907–1913.
- Shoun, H., Fushinobu, S., Jiang, L., Kim, S. W., & Wakagi, T. (2012). Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1593), 1186–1194.
- Smith, K. A., Smith, K. A., & Conen, F. (2004). Impacts of land management on fluxes of trace greenhouse gases. *Soil Use and Management*, 20(2), 255–263.
- Stehfest, E., & Bouwman, L. (2006). N₂O and NO emission from agricultural fields and soils under natural vegetation: summarizing available measurement data and modeling of global annual emissions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 74(3), 207–228.
- Tiedje, J. M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. En A. J. B. Zehnder (Ed.), *Environmental microbiology of anaerobes* (pp. 179–244). N.Y.: John Wiley & Sons.
- van Spanning, J. M., Richardson, D. J., & Ferguson, S. J. (2007). Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. En H. Bothe, S. J. Ferguson, & W. E. Newton (Eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle* (pp. 3–20). Oxford: Elsevier.
- Vermes, J. F., & Myrold, D. D. (1992). Denitrification in forest soils in Oregon. *Canadian Journal of Forest Research*, 22(1987), 504–512.
- Vitousek, P. M., & Howarth, R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry*, 13(2), 87–115.
- Wallenstein, M. D., Peterjohn, W. T., & Schlesinger, W. H. (2006). N fertilization effects on denitrification and N cycling in an aggrading forest. *Ecological Applications*, 16(6), 2168–2176.
- Werner, C., Butterbach-Bahl, K., Haas, E., Hickler, T., & Kiese, R. (2007). A global inventory of N₂O emissions from tropical rainforest soils using a detailed biogeochemical model. *Global Biogeochemical Cycles*, 21(3).
- Wolf, K., Veldkamp, E., Homeier, J., & Martinson, G. O. (2011). Nitrogen availability links forest productivity, soil nitrous oxide and nitric oxide fluxes of a tropical montane forest in southern Ecuador. *Global Biogeochemical Cycles*, 25(4).
- Zaehle, S. (2013). Terrestrial nitrogen - carbon cycle interactions at the global scale.

Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 368(ii), 9.

Zumft, W. G., & Körner, H. (2007). Nitrous oxide reductases. En H. Bothe, S. J. Ferguson, & W. E. Newton (Eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle* (pp. 67–81). Oxford: Elsevier.

XI. ANEXOS

ANEXO 1

EMISIÓN DE GASES *IN SITU* Y EN NÚCLEOS DE SUELO INTACTO.

		Oyamel	N ₂ O	Encino	N ₂ O	Arbustos	N ₂ O	Herbáceas	N ₂ O	
Sitio 1 Septiembre	Núcleo de Suelo Intacto. Inhibición por C ₂ H ₂	1 hora	1.1	-	1.1	-	1.1	-	1.1	-
			1.2	-	1.2	-	1.2	-	1.2	-
			1.3	-	1.3	-	1.3	-	1.3	-
			1.4	-	1.4	-		-	1.4	-
			1.5	-	1.5	-	1.5	-	1.5	-
		24 horas		-	1.1	-	1.1	-	1.1	-
			1.2	-	1.2	-	1.2	-	1.2	-
			1.3	-	1.3	-	1.3	-	1.3	-
			1.4	-	1.4	-	1.4	-	1.4	-
			1.5	-	1.5	-	1.5	X	1.5	-
	Medición <i>in situ</i>	1 hora		-		-		-		-
			1.2	-		-		-		-
				-		-		-		-
				-		-		-		-
		24 horas		-		-	1.1	-		-
				-	1.2	-	1.2	-	1.2	-
			-		-		-	1.3	-	
			-		-		-	1.4	-	
Sitio 2 Octubre	Núcleo de Suelo Intacto. Inhibición por C ₂ H ₂	1 hora	2.1	-	2.1	-	2.1	-	2.1	-
			2.2	-	2.2	-	2.2	-	2.2	X
			2.3	-	2.3	-	2.3	-	2.3	-
			2.4	-	2.4	-	2.4	-		-
			2.5	-	2.5	-	2.5	-	2.5	-
		24 horas	2.1	-	2.1	-	2.1	-	2.1	-
			2.2	-	2.2	-	2.2	-	2.2	-
			2.3	-	2.3	-	2.3	-	2.3	-
			2.4	-	2.4	-	2.4	-	2.4	-
			2.5	-	2.5	-	2.5	-	2.5	-
	Medición <i>in situ</i>	1 hora		-		-		-	2.1	-
				-		-		-	2.2	-
				-		-		-	2.3	-

Sitio 3 Noviembre	Núcleo de Suelo Intacto. Inhibición por C ₂ H ₂	24		-		-		-	2.4	-	
				-		-		-		-	
				-		-		-	2.1	-	
				-		-		-	2.2	-	
				-		-		-	2.3	-	
				-		-		-	2.4	X	
		1 hora		-	3.1	-	3.1	-	3.1	-	
				-	3.2	-	3.2	-	3.2	-	
				-	3.2	-	3.3	-	3.3	-	
				-	3.4	-	3.4	-	3.4	-	
				-	3.5	-		-		-	
			24 horas		-	3.1	-	3.1	-	3.1	-
					-	3.2	-	3.2	-	3.2	-
					-	3.2	-	3.3	-	3.3	-
	-	3.4		-	3.4	-	3.4	-			
	-	3.5	-		-		-				