



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Los ácidos grasos como indicadores de la actividad de la
microbiota en suelos derivados de una selva húmeda
tropical, Los Tuxtlas, Veracruz, México**

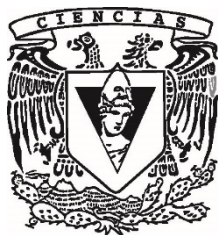
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARTHA AMÉRICA BALEÓN SEPÚLVEDA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez
Ciudad Universitaria, CDMX, 2017**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

Baleón

Sepúlveda

Martha América

55 3563 5877

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311150898

2. Datos del tutor

Dr.

Francisco Javier

Álvarez

Sánchez

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Amada Laura

Reyes

Ortigoza

4. Datos del sinodal 2

Dra.

María Guadalupe

Barajas

Guzmán

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Claudia Alejandra

Ponce de León

Hill

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Dulce Yaahid

Flores

Rentería

7. Datos del trabajo escrito

Los ácidos grasos como indicadores de la actividad de la microbiota en suelos derivados de una selva húmeda tropical, Los Tuxtlas, Veracruz, México

77 p

2017

Agradecimientos académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias.

Al proyecto PAPIIT **Almacenes de carbono en el suelo de una selva húmeda: la contribución de los hongos micorrizógenos arbusculares** (IN-116814) por el apoyo financiero para realizar este trabajo

Al laboratorio de Ecología del Suelo, en especial al coordinador, el Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez, y a los miembros de este grupo de trabajo: Dra. Irene Sánchez Gallén, Dra. Guadalupe Barajas y al M. en C. Juan Carlos Peña Becerril.

A la Unidad de Análisis Ambiental de la Facultad de Ciencias por todas las facilidades presentadas durante el desarrollo de este trabajo, a su responsable la Dra. Claudia Alejandra Ponce de León Hill, y al M. en C. Manuel Hernández Quiroz.

A la Dra. Dulce Y. Flores Rentería y al Biólogo. Diego Morales Rojas por su apoyo en el conocimiento y desarrollo de las técnicas de laboratorio.

A los sinodales del jurado integrado por la Dra. Amada Laura Reyes Ortigoza, la Dra. María Guadalupe Barajas Guzmán, el Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez, la Dra. Claudia Alejandra Ponce de León Hill y la Dra. Dulce Yaahid Flores Rentería por sus comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A todos los integrantes de la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, del Instituto de Biología.

Agradecimientos personales

A mi mamá, por enseñarme lo que es la verdadera fortaleza de corazón, por todo el esfuerzo, trabajo y amor, pero sobre todo porque ni un solo segundo ha dejado de creer en mí.

A mis tías, Lety, Silvia y Bety, por ser unas segundas mamás para mí, acompañarme en cada momento y ser las mejores animadoras que existen.

A mi hermanito Jorge David, aunque eres pequeñito tienes el corazón más grande que existe, gracias por motivarme a seguir adelante.

A mis tías Meche, Lupita y Chela, por siempre estar al pendiente de mí, porque a pesar de estar lejos, siempre están presentes.

A Sergio, por todo el amor y apoyo, por entenderme, por ayudarme, por ser mi cómplice y mi mejor equipo.

A mis amigos Daniela y Abraham, por escucharme, animarme, hacerme reír, por estar siempre, en los buenos y malos momentos, bebés, gracias por su amistad incondicional.

A mis primos Emmanuel y Gabriela, porque crecimos como hermanos. A Nora, gracias por darme la mano siempre que lo necesito.

A mis sobrinos, Gaby, Emiliano, Fernando, Francisco y Emmir por contagiarme su energía.

A Javier, gracias por escucharme, darme consejos, las muchas revisiones y en especial por la paciencia que me has tenido.

A Irene, gracias por todos los consejos, por los regaños, por las experiencias, pero, sobre todo, gracias por presentarme a la selva como sólo tú sabes hacerlo.

A mis compañeros de LES: Irma, Fernanda, Carlos, Isaac, Laura, Irvin, Manuel, Yesenia y Viviana por toda su ayuda, por los buenos ratos en el laboratorio y por su amistad.

A Leslie, Miriam, Ilse y Leo, gracias por su eterna amistad.

A todo el crew que ha estado presente desde primer semestre, Juan, Diana, Ariel, Frida y Yenny, la carrera no habría sido lo mismo sin ustedes.

ÍNDICE

Resumen	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Selvas húmedas.....	9
1.2. Cambio de uso del suelo en las selvas húmedas	9
1.3. Hongos micorrizógenos arbusculares	13
1.4. Estructuras de los HMA	14
1.5. Factores que afectan la formación de estructuras de los HMA.....	16
1.6. Ácidos grasos.....	19
1.7. Comunidades bacterianas del suelo	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. General	24
2.2. Particulares	24
3. HIPÓTESIS	24
4. MÉTODOS	25
4.1. Sitio de Estudio	25
4.1.1. Clima	25
4.1.2. Usos del suelo	26
4.1.3. Propiedades físico-químicas del suelo	30
4.2. Muestreo	30
4.3. Laboratorio.....	31
4.3.1. Lavado y esterilizado de material	31
4.3.2. Preparación de las muestras	32
4.3.3. Liofilización	32
4.3.4. Extracción de ácidos grasos.....	32
4.3.5. Separación, identificación y cuantificación de ácidos grasos	33
5. ANÁLISIS DE DATOS	35
6. RESULTADOS	36
6.1. Contribución de la microbiota.....	36
6.2. Cuantificación de ácidos grasos.....	37

6.3. Correlaciones	40
6.4. Análisis de Componentes Principales (ACP)	42
7. DISCUSIÓN.....	50
8. CONCLUSIONES.....	54
9. PERSPECTIVAS.....	54
10. LITERATURA CITADA	55
ANEXO 1	66
Listado de compuestos químicos encontrados en los cultivos en la temporada de sequía	66
ANEXO 2	68
Técnica de liofilización	68
ANEXO 3	69
Extracción de ácidos grasos (Sasser, 1990).....	69
Preparación de reactivos	72
ANEXO 4	73
Método de cromatografía	73
Espectros de masas de los ácidos grasos	74
Ejemplos de cromatogramas	75
Concentración de ácidos grasos.....	77

Resumen

El cambio de uso de suelo es uno de los principales motores del cambio global en la actualidad, afecta a casi todos los ecosistemas terrestres, en particular en las selvas húmedas ha provocado una tasa de desaparición anual de hasta 2.5×10^{-6} ha en el planeta (Lambin *et al.*, 2003). El remplazo de especies y la remoción de la cobertura vegetal tienen impactos fuertes sobre la microbiota y las condiciones físico-químicas del suelo.

Este trabajo tuvo como objetivo estimar la actividad funcional de la microbiota en cuatro usos del suelo derivados de la selva húmeda de Los Tuxtlas, Veracruz, durante la temporada de sequía, utilizando como indicador de abundancia la cantidad de ácidos grasos.

Se seleccionaron cuatro usos de suelo, cinco sitios por uso, y tres réplicas por sitio, mediante la técnica de extracción de ácidos grasos totales de la célula (Sasser, 1990), y la cuantificación mediante el método de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (Zelles, 1997; Gavito y Olsson 2003; Olsson *et al.*, 2003), se identificaron los ácidos grasos correspondientes a los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) y bacterias Gram⁺ y Gram⁻ con base en el tiempo de retención con relación a un estándar interno y el espectro de masas.

Para determinar si existían diferencias significativas entre los usos de suelo, se realizó un Análisis de Varianza de una vía y para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba Post-Hoc de Tukey ($\alpha=0.05$). Para los datos que no fueron normales se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para identificar las diferencias entre grupos.

Además, se realizaron una serie de correlaciones entre la concentración de ácidos grasos y los nutrientes disponibles en el suelo, así como pH, con una significancia de 0.05.

Finalmente se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para determinar la tendencia de comportamiento de todas las propiedades físico-químicas del suelo y los ácidos grasos. El criterio de selección de las variables para explicar los componentes fue

que tuvieran un valor de correlación mayor a 0.70. Todas las pruebas fueron realizadas con el paquete Statistica 8.0.

Los resultados definieron diferencias significativas entre los usos de suelo y el contenido de ácidos grasos (CAG) correspondientes a los hongos micorrizógenos arbusculares. En todos los usos del suelo, el grupo de los HMA presenta el mayor aporte de ácidos grasos mientras que el grupo de las bacterias Gram⁻ presenta los valores más bajos. Los suelos de selva y potrero presentaron significativamente mayor abundancia de ácidos grasos en comparación con los suelos provenientes de cultivos, este comportamiento se repite para los CAG en bacterias Gram⁺. Por otro lado, la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de medianas, mostraron diferencias significativas entre los usos de suelo para el grupo de las bacterias Gram⁻. La selva presentó significativamente mayor abundancia de ácidos grasos en comparación con los suelos provenientes de potreros y cultivos.

En los resultados de los análisis multivariados (ACP) y correlaciones se observó que las variables que contribuyen más a explicar el ordenamiento espacial de la comunidad microbiana fueron aquellas relacionadas con la disponibilidad de nutrientes (Carbono total (Ct) y materia orgánica del suelo (MOS)). Mientras que el pH presentó una correlación positiva si se considera el total del CAG de todos los grupos de microbiota, y este efecto puede ser explicado por el comportamiento de los HMA cuya correlación también fue positiva.

El cambio de uso de suelo en la selva de Los Tuxtlas afectó de manera negativa la abundancia de las comunidades microbianas asociadas a los grupos funcionales de HMA y bacterias del suelo (Gram⁺ y Gram⁻) expresadas en términos de los ácidos grasos, sin embargo, aun así se encontraron dichos grupos en todos los usos de suelo, demostrando un alta capacidad de persistencia a pesar de la adición de nutrientes o el uso de plaguicidas en los sistemas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Selvas húmedas*

Las selvas húmedas, también conocidas como bosques tropicales o selvas altas perennifolias (Rzedowski, 1994) se localizan entre el trópico de cáncer y el trópico de capricornio y son consideradas uno de los biomas terrestres más diversos (Dirzo, 2001).

En México, las selvas tropicales húmedas cubren 91 565.6 km² lo que representa el 4.6% del territorio nacional, se ubican principalmente en la zona sur y vertiente del Golfo de México en los estados de Puebla, Oaxaca, Veracruz, Tabasco, Campeche y Chiapas (INEGI, 2002).

En estos ecosistemas la temperatura y humedad son constantes. Las especies vegetales más importantes estructuralmente pertenecen a las familias Orchidaceae, Polypodiaceae s.l., Asteraceae, Fabaceae y Caesalpiniaceae, que también son las más diversas. Además, las formas de crecimiento vegetal se han dividido en siete categorías: arbóreas, herbáceas, epífitas, lianas, trepadoras, arbustos y parásitos (Ibarra-Manríquez y Sinaca, 1995).

1.2. *Cambio de uso del suelo en las selvas húmedas*

Las selvas húmedas se encuentran bajo amenaza constante debido a la explotación de sus recursos y al cambio global. El cambio global se refiere a todas las actividades naturales o humanas que tienen efecto directo sobre los mismos, y que generan cambios en los procesos que determinan el funcionamiento del sistema Tierra. Dentro de las causas directas o motores de cambio global se incluyen al cambio de uso del suelo, la sobreexplotación de los recursos, a las especies invasoras, la contaminación ambiental y al cambio climático, que tienen como principal consecuencia la pérdida de biodiversidad (Millenium Ecosystem Assesment, 2005; O'Brian y Leichenko, 2005). Se calcula que la tasa de desaparición anual para las selvas húmedas es de 2.5×10^{-6} ha en el planeta (Lambin *et al.*, 2003).

El cambio de uso de suelo es el motor de cambio global que más ha afectado la permanencia de las selvas húmedas, y se refiere a la remoción total o parcial de la vegetación para destinar estos espacios a otras actividades (SEMARNAT, 2001); se calcula que el 69% de los suelos en el planeta han sido impactados por las actividades humanas, por lo que se encuentran moderada o altamente degradados (FAO, 2011).

En México, se ha reducido la cobertura de selvas húmedas a un ritmo del 0.76% anual (Mas *et al.*, 2009). La deforestación extensiva es la principal amenaza debido a que deja fragmentos de vegetación e influye de manera directa en la diversidad y abundancia de especies en el sitio y sus alrededores (Guevara *et al.*, 2004).

En particular, el cambio en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz, México, está relacionado, principalmente, con la eliminación de la cobertura para la apertura de campos de cultivo y potreros, el desarrollo de infraestructura urbana y de comunicaciones entre las que se incluye la construcción de carreteras, caminos y viviendas. También hay fenómenos naturales que han contribuido con un cambio radical en el paisaje, como incendios, inundaciones, deslizamientos de tierra y huracanes (Geist y Lambin, 2001, 2002), lo cual en conjunto ha resultado en una pérdida del 90% de la cobertura vegetal original (Guevara *et al.*, 2004).

En general el cambio de uso de suelo tiene efectos importantes en la composición de especies de un ecosistema, disminuye la biodiversidad (Varela *et al.*, 2009), reduce la cobertura vegetal (p. ej. cuando se convierten a pastizales ganaderos, conocidos como potreros) y/o provoca el reemplazo de especies (p. ej. cuando se convierten en campos de cultivo). Además, la deforestación tiene un efecto casi siempre negativo en las condiciones de microhábitat (Cram *et al.*, 2015).

El cambio de vegetación aunado a los factores mencionados tiene un impacto en las condiciones fisicoquímicas del suelo. Las condiciones de temperatura y humedad son distintas en los usos de suelo modificados, ya que al remover la cobertura vegetal se produce un incremento en la exposición a la luz solar y al viento, provocando una mayor evaporación del agua, es decir, se reduce la humedad del suelo, y aumenta la temperatura y la erosión, además, las tasas de descomposición de la materia orgánica son más lentas (de Souza Braz *et al.*, 2013; Cram *et al.*, 2015).

En este sentido, la materia orgánica también es afectada por el cambio de uso de suelo, no solo en la cantidad, sino en la calidad de la misma ya que se reduce la cantidad de material lábil más rica en ácidos húmicos, lo que provoca que la diversidad de microorganismos también disminuya (de Souza Braz *et al.*, 2013; Cram *et al.*, 2015). La cantidad y calidad de dicha materia orgánica juega un papel fundamental en el ciclo de nutrientes del suelo, en particular con la dinámica del ciclo del carbono (C), que, con la transformación de la selva a otro uso del suelo, reduce su capacidad de almacenamiento de C como materia orgánica y lo libera como CO₂ (Lal, 2004; Sotomayor-Ramírez *et al.*, 2009).

Otros efectos importantes son aquellos relacionados con la estructura del suelo: mientras que la densidad aparente aumenta, la porosidad disminuye, lo que en conjunto provoca que la tasa de infiltración sea menor (Zimmermann *et al.*, 2010).

El abandono de las prácticas agrícolas y/o pecuarias tiene como consecuencia la formación de selvas secundarias (localmente conocidos como "acahuales"), los cuales son fragmentos de recuperación, que se encuentran en un estado de sucesión ecológica, y cuyas características tienden a ser parecidas a las del sistema original (Fig. 1).

Existen estudios en los que se evalúa el efecto del cambio de uso del suelo en las comunidades edáficas, la clasificación de éstas se encuentra determinada según diversos grupos funcionales los cuales consisten en un grupo de organismos que tienen la misma función o un impacto similar en el suelo (Gitay y Noble, 1997). Por ejemplo, la comunidad de lombrices se ve disminuida en los potreros, mientras que la diversidad de los grupos de hormigas y termitas es mayor en los sistemas en regeneración natural que en los sistemas en manejo, existe una tendencia a entender que a mayor intensificación del uso de suelo los niveles de pérdida de biodiversidad también aumentan (Barois *et al.*, 2011).

Uno de los grupos funcionales de mayor importancia ecológica para la selva que pueden verse afectados por el cambio de uso de suelo es la comunidad microbiana del suelo, dentro de la cual se encuentran los hongos micorrizógenos arbusculares y las bacterias (Varela *et al.*, 2009; Barois *et al.*, 2011; Cuenca, 2015).



Figura 1. Cambio de uso del suelo en la Selva de Los Tuxtlas, Veracruz.

1.3. Hongos micorrizógenos arbusculares

El término micorriza se refiere a la relación entre hongos y raíces; la palabra micorriza proviene del griego *micos* que significa hongo y *rhiza* que significa raíz (Cuenca, 2015).

Existen diferentes tipos de micorrizas, tradicionalmente se clasifican en ectomicorrizas (las que no penetran la pared celular) y endomicorrizas (aquellas que se desarrollan dentro de la célula); sin embargo, existen otros tipos de micorrizas las cuales se encuentran en un estado intermedio dentro de la clasificación anterior, por lo que generalmente las clasificaciones se realizan con base en el tipo de hongo con el que se establece la asociación, de esta manera los principales tipos de micorrizas son: ectomicorrizas, endomicorrizas, micorrizas arbutoides, monotropoides, ericoides, orquidioides y arbusculares (Cuenca, 2015).

Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) forman parte de la microbiota del suelo y desempeñan un papel fundamental en casi todos los ecosistemas terrestres, forman una relación mutualista funcional conocida como micorriza arbuscular (MA) con las plantas (Smith y Read, 2008) aumentando así la productividad, estabilidad y mantenimiento de los ecosistemas, ya que reducen la pérdida de nutrientes mediante su almacenamiento en la biomasa viva (Simard *et al.*, 2012).

Las micorrizas arbusculares se forman entre el 95% de las familias de plantas y los hongos del Phylum Glomeromycota (Varela *et al.*, 2009), la planta provee al hongo de nutrientes, principalmente carbono en diversas formas y el hongo provee de nutrientes fundamentales para el desarrollo de las plantas, como P y N, además de protección contra patógenos de la raíz, mejora en las relaciones hídricas, y aumenta la supervivencia y eficiencia en el crecimiento (Smith y Read, 2008; Cuenca, 2015).

1.4. Estructuras de los HMA

El nombre de “micorriza arbuscular” (MA) deriva de las estructuras características de esta asociación: los arbuscúlos, los cuales junto con otras estructuras como las vesículas se consideran caracteres diagnósticos para la determinación taxonómica. Las estructuras dentro de esta asociación pueden dividirse en dos grandes grupos (Fig. 2): las estructuras extrarradicales y las intrarradicales. Dentro de las primeras se encuentran a las hifas y a las esporas, y en las estructuras dentro de la raíz, a los arbuscúlos y las vesículas (Smith y Read, 2008).

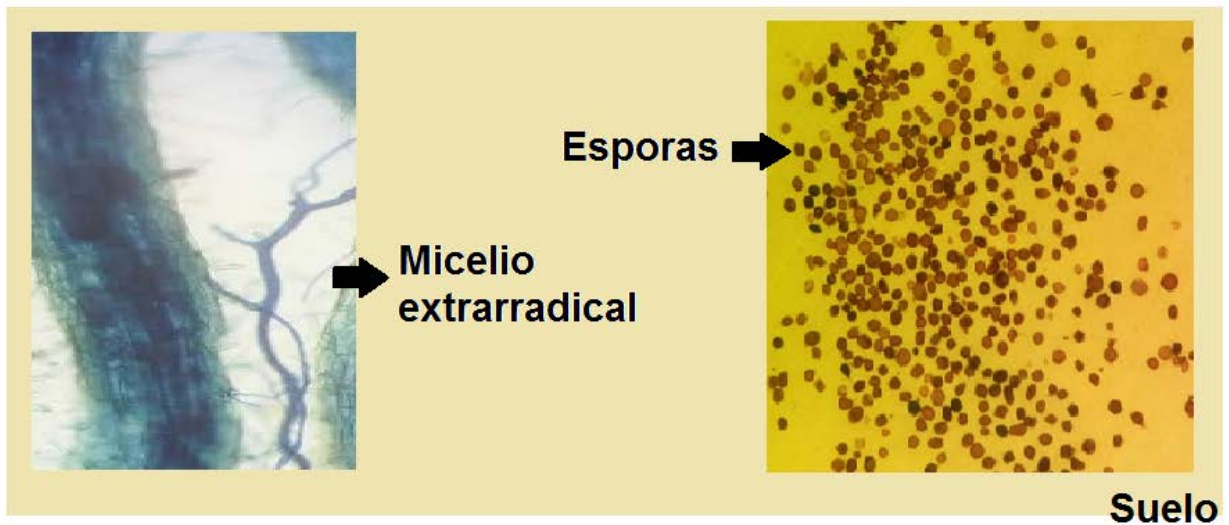
Cada una de las estructuras que se desarrollan en la asociación micorrizógena tienen diferente origen y función. Durante la formación de la MA existe contacto entre las hifas y la raíz de la planta lo que provoca la formación de un apresorio, tras esto el hongo penetra en la raíz formando una estructura espiralada o enrollada, una vez dentro de la raíz se producen los arbuscúlos y el resto de las estructuras (Tabla 1) (Cuenca, 2015).

Tabla 1. Estructuras de los HMA.

	Estructura	Descripción	Función
Estructuras extrarradicales	Esporas	Estructuras que miden entre 50 y 300 micras, que contienen abundantes compuestos de carbono y pared de quitina.	Estructuras de resistencia que se dispersan a través del viento.
	Micelio	Red de hifas que se distribuye a lo largo del suelo.	Exploración, para la absorción de nutrientes.
Estructuras intrarradicales	Ovillos	Enrollamientos de las hifas.	Estructuras importantes para el intercambio de nutrientes.
	Arbuscúlos	Son ramificaciones de las hifas dentro de las células vegetales permiten un contacto entre la planta y el hongo.	Son considerados estructuras de transferencia temporales.
	Vesículas	Son hifas hinchadas.	Consideradas estructuras de almacenamiento de lípidos.

¹Smith y Smith, 1990; ²Smith y Read, 2008

Estructuras extrarradicales



Estructuras intrarradicales

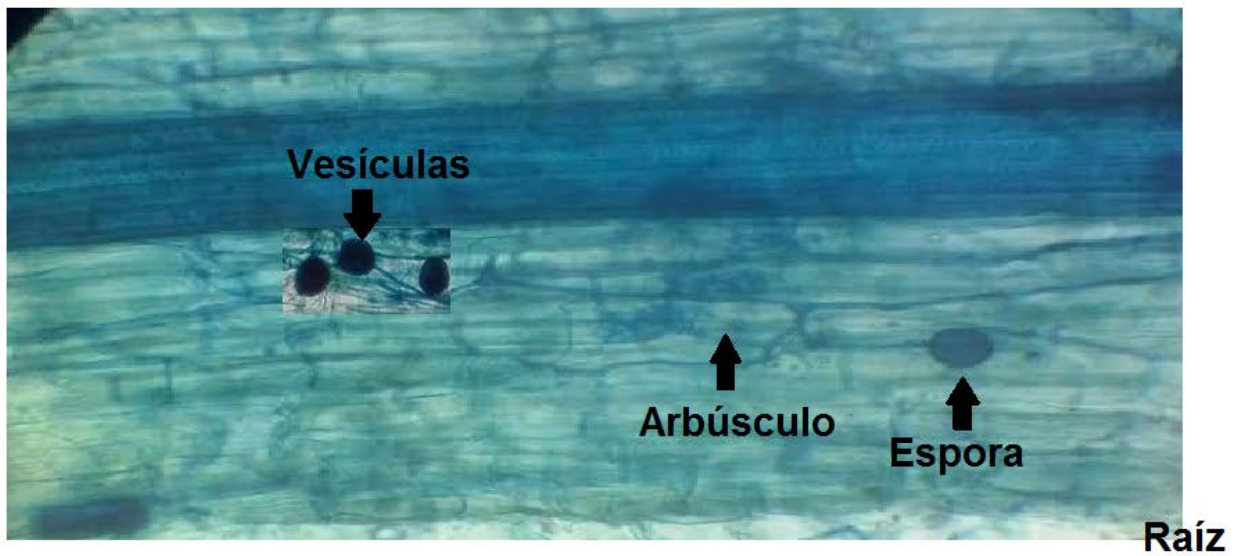


Figura 2. Estructuras de la asociación micorrizógena arbuscular. Fotografías de Cervantes, 2017.

1.5. Factores que afectan la formación de estructuras de los HMA

La formación de las diferentes estructuras está influenciada por las condiciones ambientales, la temporalidad y las plantas hospederas (Tabla 2) (Bever *et al.*, 2001). Por ejemplo, en el caso de las esporas, el cambio de uso de suelo determina la abundancia de estas estructuras a nivel local y los disturbios influyen en su diversidad regional (Varela *et al.*, 2009). Además, Stürmer y Siqueira (2010) encontraron diferencias significativas en la riqueza de especies con base en la identificación por esporas para diferentes usos de suelo en Brasil, presentándose la mayor riqueza en los usos de suelo más perturbados.

El estrés hídrico es uno de los factores que promueve el desarrollo de micelio extrarradical, como una estructura de búsqueda de agua en el suelo, sumado a la temperatura óptima para su desarrollo ubicada en un intervalo entre 18 y 40° C (Entry *et al.*, 2002).

Así mismo, determinadas características del suelo también afectan la diversidad y estructura de la comunidad de HMA. Por ejemplo, la textura del suelo afecta la estructura, la porosidad y la capacidad de almacenamiento hídrico del suelo, así como el intercambio catiónico, se sabe que esto puede influenciar directamente en la comunidad de HMA, ya que existen géneros que presentan preferencias con base en la textura del suelo (Johnson *et al.*, 1992). Otra característica que afecta la abundancia de los HMA es la densidad aparente del suelo, la cual refleja el espacio poroso en el mismo y que puede verse disminuida con el sobrepastoreo, debido al peso del ganado, el cual compacta el suelo afectando negativamente la persistencia de los HMA pues las hifas no son capaces de atravesar los bloques que se forman de materia orgánica y suelo (Sylvia, 1992).

En general, cualquier fenómeno que altere la disponibilidad de los recursos limitantes para las especies vegetales (fósforo y nitrógeno) tiene el potencial para afectar la dinámica de la asociación a múltiples escalas, por ejemplo, los bancos de genes de la población pueden cambiar a medida que los individuos con la más alta adecuación en el nuevo medio se vuelven relativamente más abundantes cada generación (Johnson *et al.*, 2006). En el 2010, Johnson propuso un modelo para explicar la relación entre los

recursos limitantes fósforo (P) y nitrógeno (N) en la asociación, conocido como el “Trade balance model” (Fig. 3) en el cual establece que la función de la micorriza arbuscular está determinada por la interacción de N y P, así como por la demanda y abastecimiento de carbono (C).

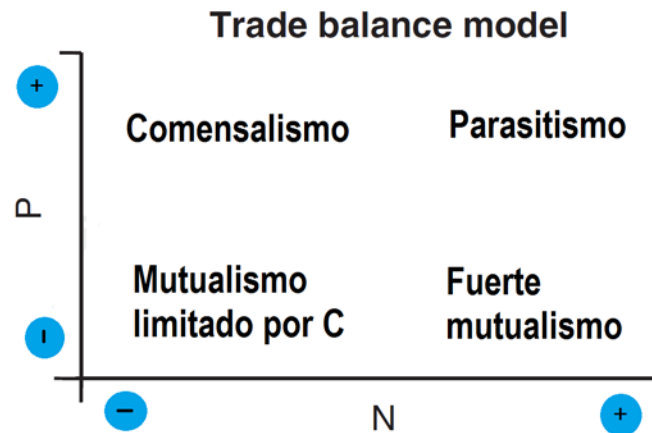


Figura 3. Trade Balance Model. En el mutualismo limitado por C, el N y P son limitados aun cuando el intercambio de C por P es favorable, la limitación de N restringe la adquisición de C por fotosíntesis. En el fuerte mutualismo, el P es limitado, por lo que el intercambio de C-P es desfavorable y el abastecimiento de C no es limitado por la deficiencia de N. En el caso del comensalismo, el P no es limitado de tal manera que las plantas no tienen nada que ganar del intercambio C-P, pero la demanda de C por el hongo se mantiene porque el crecimiento fungal es limitado en N. En el último caso, el parasitismo, ni el N ni el P son limitados, las plantas no obtienen ningún beneficio del intercambio C-P y la demanda de C del hongo no es limitada por la deficiencia de N. Modificado de Johnson, 2010.

Adicionalmente, la disponibilidad de nutrientes puede modificar la cantidad de esporas y la diversidad de especies de los HMA, debido a que las formas asimilables de estos pueden variar según las condiciones de pH del suelo (Abbott y Robson, 1985). La forma asimilable del P es el ortofosfato (H_2PO_4), mientras que para el N son el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NO_4^+). Estas formas asimilables se encuentran en concentraciones menores a las totales para cada nutriente. Y se estima que la producción de micelio extrarradical es menor en ecosistemas con mayor disponibilidad de nutrientes (Cruz-Paredes, 2013).

Tabla 2. Agentes de disturbio para la comunidad de HMA. Modificado de van der Heyde, 2017.

Agente de disturbio	Mecanismo	Respuesta de los HMA	Referencias
Disturbios mecánicos del suelo	Alteración de la red de hifas	Reducción de la supervivencia de las hifas y abundancia de esporas	Jasper et al. 1989, Wright et al. 1999, Hart y Reader 2002, Jansa et al. 2006
Cambios en las plantas hospederas	Diferencias en la preferencia de huéspedes, y en las estrategias de vida de las plantas	Cambios en la composición, diferencias en el % de colonización, producción de esporas, y en las estructuras de almacenamiento según las especies vegetales	Vandenkoornhuyse et al. 2002, Hokka et al. 2004, Uibopuu et al. 2009, Davison et al. 2011, Torecillas et al. 2012, Opik et al. 2010
Enriquecimiento de nutrientes	Mediado por la planta, efectos directos en las esporas e hifas	Reducción del % de colonización y abundancia de esporas a mayor disponibilidad de nutrientes, no hay cambio en la abundancia a mediana disponibilidad de P, diversos cambios en composición	Tresender 2004, Jansa et al. 2006
pH	Tolerancia	Cambios en la composición de la comunidad, en suelos ácidos la colonización de raíces es menor	Porter et al. 1987, Clark 1997

1.6. Ácidos grasos

Cada una de las estructuras de los HMA tiene una función determinada, en el caso de las vesículas y de las esporas (Fig. 4), son capaces de almacenar lípidos como lo son los ácidos grasos (Olsson, 1999).

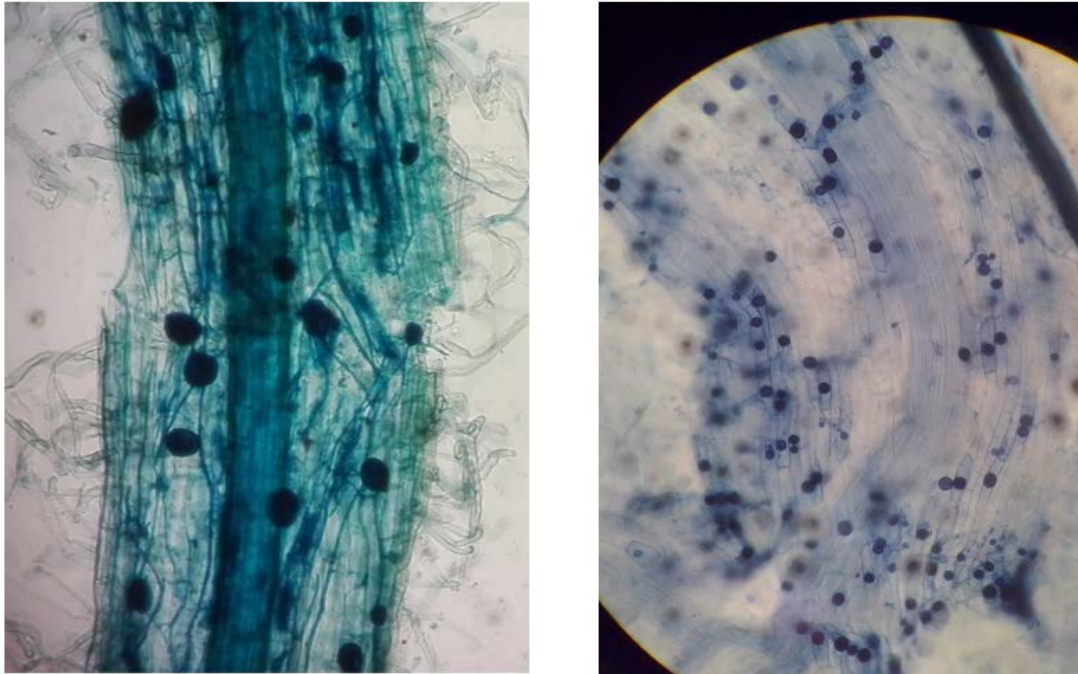


Figura 4. A la izquierda vesículas (40x) y a la derecha esporas de HMA (20x). Fotografías de Cervantes, 2017.

Los ácidos grasos son importantes constituyentes de las células eucariotas y se dividen en dos grandes grupos; los ácidos grasos neutros (NLFA's) y los ácidos grasos fosfolipídicos (PLFA's) que pueden ser utilizados para estimar la cantidad de micelio fúngico de MA así como la localización de carbono en las diferentes estructuras (Olsson, 1999).

Los ácidos grasos fosfolipídicos, son constituyentes de la membrana celular y han sido utilizados para describir la estructura de las comunidades microbianas en el suelo y como un indicador de la biomasa. Además, son considerados una herramienta para evaluar el

efecto de los cambios en las condiciones del suelo causados por contaminación y prácticas de manejo. Por otro lado, los ácidos grasos neutros, son indicadores del almacenamiento de energía y del estado nutricional (Olsson, 1999).

Una de las técnicas más utilizadas para la cuantificación de las comunidades microbianas en el suelo es la determinación de ácidos grasos. En particular el ácido 16:1 ω 5 (11-ácido hexadecenoico metil éster) se puede utilizar como un bioindicador debido a su alta especificidad para los HMA (Olsson, 1999), es considerado el ácido graso dominante en el almacén de lípidos para estos hongos (Gavito y Olsson, 2003), encontrándose en una proporción de hasta el 43% (Olsson *et al.*, 1995).

Las técnicas de cuantificación tradicionales de HMA, se basan en el conteo de estructuras mediante herramientas microscópicas, dentro de ellas destaca la cuantificación de micelio y el conteo e identificación de esporas, sin embargo, estas técnicas suponen una serie de problemas debido a que la diferenciación visual es subjetiva, además incluye la cuantificación de estructuras vivas y muertas. Para sobrellevar estas desventajas, se han desarrollado aquellas técnicas que incluyen biomarcadores específicos para el grupo, como la cuantificación de quitina, a pesar de que la quitina es un importante constituyente de la pared celular de los hongos, también se encuentra presente en el grupo de los insectos y los artrópodos; otro constituyente de la membrana, el ergosterol ha sido utilizado también para estimar la biomasa, sin embargo se encuentra en una concentración mucho menor en los HMA que en otros grupos de hongos (Olsson, 1999).

1.7. Comunidades bacterianas del suelo

En el suelo conviven un gran número de organismos, dentro de estos se encuentran representados una gran variedad de grupos, entre los que destacan las bacterias por su gran importancia funcional. Se cree que en el suelo se pueden encontrar incluso hasta 2×10^9 g⁻¹ de células bacterianas. El desarrollo de estos organismos se encuentra frecuentemente limitado por las fuentes de energía disponibles y se considera que en este grupo probablemente se encuentra el mayor número de especies en el planeta, concentrados en 35 Phyla (Coleman *et al.*, 2004).

Uno de los grandes problemas para el estudio de estos microorganismos radica en su clasificación. Tradicionalmente se ocupa la clasificación morfológica de los grupos, sin embargo, la clasificación fisiológica resulta más adecuada para entender los roles ecológicos de estos microorganismos en el suelo (Killham y Prosser, 2007). En este sentido la clasificación con base en el tipo de pared celular: Gram⁺ y Gram⁻ (Fig. 5) ha sido la más utilizada por diversos autores, ya que permite estimar la estructura de la comunidad bacteriana utilizando criterios tanto morfológicos como fisiológicos.

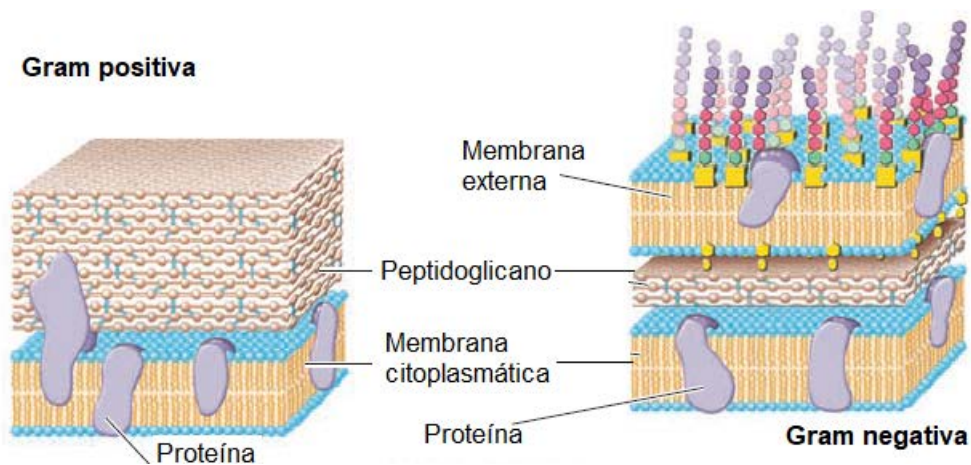


Figura 5. Diagrama esquemático de la pared celular de las bacterias Gram⁺ y Gram⁻. Modificado de Madigan, 2015.

Los microorganismos del suelo se encuentran encargados de un gran número de procesos en los ecosistemas, entre los que destacan los ciclos biogeoquímicos y de reciclaje de nutrientes. La disponibilidad de fósforo (P), por ejemplo, depende de la

mineralización biogeoquímica regulada por microorganismos capaces de generar exoenzimas para transformar compuestos inorgánicos en orgánicos (Alexander, 1981).

La entrada de C a los suelos se realiza por la incorporación de materia orgánica, este proceso lo realizan las plantas y algunos microorganismos, mediante la fijación del C atmosférico, una vez en el suelo el C orgánico puede ser utilizado por los organismos heterótrofos o utilizado para producir energía mediante la respiración (Schlesinger, 1997).

En este sentido, otro de los elementos que tiene un fuerte impacto en las comunidades microbianas del suelo es el N, el cual es integrado a los ecosistemas mediante la fijación biológica, y una vez ahí, puede ser degradado, absorbido, mineralizado o desnitrificado por los microorganismos del suelo (Chapin *et al.*, 2011).

En la selva tropical de Los Tuxtlas, no existe un inventario completo sobre la gran diversidad de bacterias en el suelo, sin embargo, se supone que predominan en este sitio las bacterias Gram⁻ fijadoras de nitrógeno, ya que se encuentran asociadas a especies vegetales de la Familia Fabaceae, la cual es la tercera familia mayor representada para este sistema (Crews, 1999). En los bosques tropicales similares a Los Tuxtlas, como los ubicados en Panamá y Costa Rica, el género *Bradyrhizobium* es el simbionte predominante (Parker, 2004, 2008); por esta razón se propone que las bacterias de este género podrían ser las dominantes.

Adicionalmente uno de los factores que modula la dinámica de las comunidades microbianas, es el pH del suelo. A valores de pH ácidos (0-6) domina la comunidad de hongos, mientras que a valores de pH básicos (8-14), dominan las comunidades bacterianas (Rousk *et al.*, 2009). En particular, la profundidad del suelo puede cambiar la dinámica de las bacterias, por ejemplo, las bacterias Gram⁺ tienden a aumentar exponencialmente con el aumento en la profundidad, mientras que la mayor abundancia de bacterias Gram⁻ se encuentra en la superficie (Coleman *et al.*, 2004).

Las comunidades bacterianas son capaces de responder de manera predecible a la variación que provoca el manejo y cambio de uso de suelo, por lo que pueden ser consideradas como una herramienta útil para determinar el estado del suelo (Hermans

et al., 2017), mediante su estudio es posible entender las dinámicas emergentes de los ecosistemas modificados.

La cuantificación de ácidos grasos es una técnica que permite la estimación de más de un grupo de biota en un solo análisis. Como ya se mencionó, se ha empleado en numerosas ocasiones para la identificación de HMAs, además se han utilizado más de 300 ácidos grasos para cuantificar la presencia de diferentes grupos funcionales de bacterias en el suelo (Sasser, 1990). En este sentido, se han caracterizado ácidos grasos correspondientes a cada grupo, siendo los ácidos $i17:00$ para las bacterias Gram⁺ y $18:1\omega7$ para las bacterias Gram⁻ los más representativos (Baath, 2003).

Se ha determinado que factores asociados principalmente con la adición de nutrientes tienden a disminuir su diversidad, así como su efectividad con relación a la defensa contra patógenos y fijación de nitrógeno en las plantas (Salles *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 2007).

En cuanto a los estudios enfocados en el efecto de cambio de uso de suelo, un ejemplo lo representan las especies del género *Bradyrhizobium* cuya diversidad tiende a disminuir cuando la selva es convertida a campos de cultivo o pastizales, mientras que se considera que la vegetación secundaria tiene una diversidad equivalente al sistema original. Además, se ha observado que la composición de la comunidad bacteriana cambia considerablemente en los campos de cultivo (Ormeño *et al.*, 2011).

La presencia de distintas comunidades microbianas un reflejo de la salud del ecosistema, su estudio permite entender su importancia en el ciclo de nutrientes (Olsson, 1999) por lo cual es primordial su cuantificación en sistemas de regeneración natural, así como en sistemas manejados, para identificar los efectos de este cambio de uso de suelo y potencialmente para el manejo adecuado de la interacción microbiota-suelo a fin de lograr sistemas sustentables.

2. OBJETIVOS

2.1. *General*

Determinar la concentración de ácidos grasos de la microbiota en usos del suelo derivados de la selva húmeda de los Tuxtlas, Veracruz, durante la temporada de sequía.

2.2. *Particulares*

- Comparar los ácidos grasos de HMA, bacterias Gram⁺ y Gram⁻ en diferentes usos de suelo: selva, acahual, potrero y cultivo.
- Analizar el efecto de las propiedades físicas y químicas del suelo en la estructura de la comunidad microbiana de HMA, bacterias Gram⁺ y Gram⁻ en diferentes usos de suelo.

3. HIPÓTESIS

H1 En los usos del suelo en donde la cantidad de nutrientes sea menor, la actividad de la comunidad microbiana se verá afectada negativamente, por lo tanto:

- Considerando el sistema original (selva) y el sistema en regeneración natural (acahual), el acahual presentará menor concentración de ácidos grasos que la selva.
- En los sistemas en manejo (potrero y cultivo), el potrero tendrá mayor concentración de ácidos grasos que el cultivo.

H2 El pH tendrá un efecto directo en la abundancia de la comunidad microbiana; a pH básicos dominará la comunidad de bacterias y a pH ácidos la comunidad de hongos.

H3 En los usos del suelo en donde se realiza adición de nutrientes y de plaguicidas, la microbiota del suelo se verá afectada negativamente, por lo tanto, el cultivo presentará la concentración más baja de ácidos grasos en comparación con otros usos del suelo.

4. MÉTODOS

4.1. Sitio de Estudio

Este trabajo se realizó en la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas. El sitio se localiza en el suroeste del estado de Veracruz (Fig. 6). Sus coordenadas geográficas son: 18°10' y 18°45' N y 94°42' y 95°27' O. Se encuentra ubicada en los municipios de Ángel R. Cabada, Catemaco, Mecayapan, Pajapan, San Andrés Tuxtla, Santiago Tuxtla, Soteapan y Tatahuicapan de Juárez (IBUNAM, 2016).

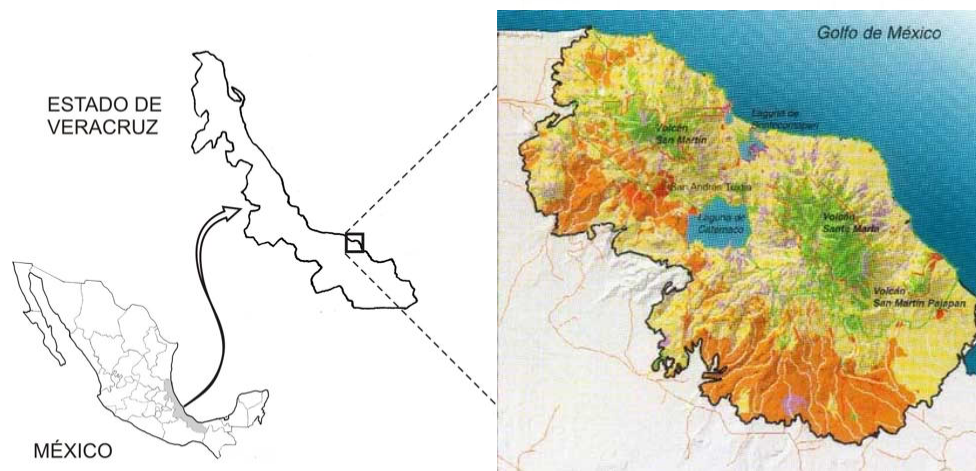


Figura 6. Ubicación geográfica de la Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas, Veracruz. Modificada de: <http://www.ibiologia.unam.mx/tuxtlas/tuxtlas.htm>

4.1.1. Clima

El clima de la región es cálido-húmedo (Aw), el promedio de temperatura máxima es de 27.3°C y temperatura mínima de 21.5°C, con una precipitación media anual mayor a 4500 mm. Aun cuando hay un régimen de precipitación durante todo el año (Fig. 7) se presenta una estacionalidad, de los meses de junio a febrero es considerada la temporada de lluvias y de marzo a mayo la de sequía. El mes más seco es abril (IBUNAM, 2016).

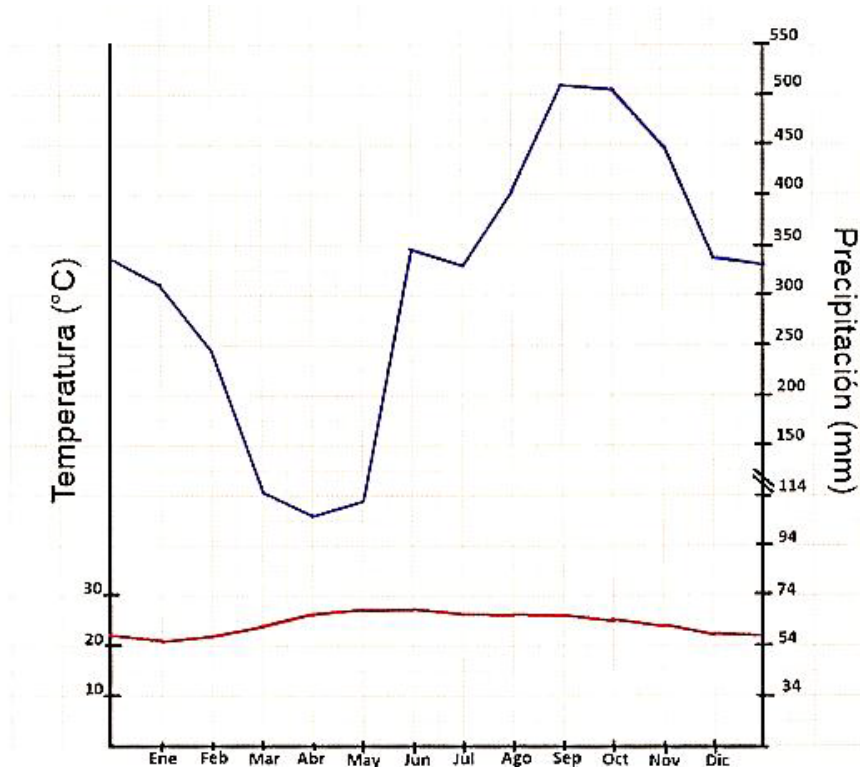


Figura 7. Diagrama ombrotérmico. Datos obtenidos de la Estación Climatológica de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, 1996-2015. La línea roja representa la temperatura y la línea azul la precipitación.

4.1.2. Usos del suelo

En la región de Los Tuxtlas abundan los suelos de origen volcánico, de material parental como basalto, andesitas y cenizas volcánicas. Se pueden encontrar acrisoles (34.2%), andosoles (21%), feozems (18%) y vertisoles (13%) (Campos, 2004).

La zona de Los Tuxtlas es un mosaico de vegetación que se caracteriza por la presencia de zonas de selva mezcladas con cultivos, pastizales y acahuals o áreas en proceso de regeneración (Estrada y Coates-Estrada, 1983).

Selva (Fig. 8)

Para este trabajo se seleccionaron sitios de selva ubicados dentro de la Estación de Biología Tropical del Instituto de Biología, UNAM; estos son representativos de la vegetación original que cubría toda la sierra (Estrada y Coates-Estrada, 1983) por lo que son consideradas las zonas más conservadas. La textura del suelo es arcillosa (Acevedo, 2017). Se identifican tres estratos: árboles emergentes, subdosel y sotobosque. Se han reportado 940 especies pertenecientes a 137 familias, de las cuales las más características son: *Astrocaryum mexicanum*, *Chamaedorea spp*, *Trophis mexicana*, *Cymbopetalum bailloni*, *Nectandra ambigens*, *Poulsenia armata* y *Brosimum alicastrum* (Ibarra-Manríquez y Sinaca, 1995).

Selvas secundarias (Acahuales) (Fig. 8)

Para este uso del suelo, se obtuvieron acahuales de diferentes edades en función del tiempo que se han dejado sin manejo desde que fueron talados, 5, 18, 24, 27 y más de 50 años. La textura del suelo es franca arcillosa (Acevedo, 2017). Las especies vegetales características son: *Alchornea latofiloa*, *Heliocarpus appendiculatus*, *Hampea nutricia*, *Piper hispidum*, *Parathesis lenticellata*, *Erithrina folkersii*, *Cestrum luteovirescens*, *Lonchocarpus guatemalensis*, *Acacia cornigera* y *Sapium nitidum* (Pennigton y Sarukhán, 1968; Carabias, 1980).

Potrero (Fig. 8)

Los potreros son sembradíos de pastizales que sostienen cabezas de ganado vacuno. La textura del suelo es arcillosa (Acevedo, 2017). Predomina el “pasto insurgente” (*Brachiaria brizantha*), una especie no nativa capaz de resistir a condiciones adversas de crecimiento, sin embargo, también resulta común observar especies arbóreas tanto nativas como introducidas, como lo son: *Nectandra ambigens*, *Brosimum alicastrum*, *Ampelocera hottley*, *Bursera simaruba*, *Spondias radlkoferi* y *Zanthoxylum kellermanii* (Guevara *et al.*, 1994; Laborde, 1996), que en muchas ocasiones fungen como cercas vivas (Williams-Linera, 1998). Este uso del suelo resulta el predominante sobre los otros

en la zona, se estima que los pastizales cubren el 55% del territorio de la Reserva de la Biosfera, Los Tuxtlas (CONANP, 2006).

Cultivo (Fig. 8)

Los sitios seleccionados fueron monocultivos de maíz, chile y sandía, en donde la preparación del terreno previa a la siembra se realiza de manera manual. La textura del suelo es arcillosa (Acevedo, 2017). Se encontró que a estos se les adiciona principalmente herbicidas como Velfosato®, fertilizantes como Multiagro®, Ktionic®, Folicab®, Humusdita®, reguladores del crecimiento vegetal como Biozyme® TF y Ultra Vigofort®, y fungicidas como Fitosick®, Legasus® y Previcur Energy® (Anexo 1).

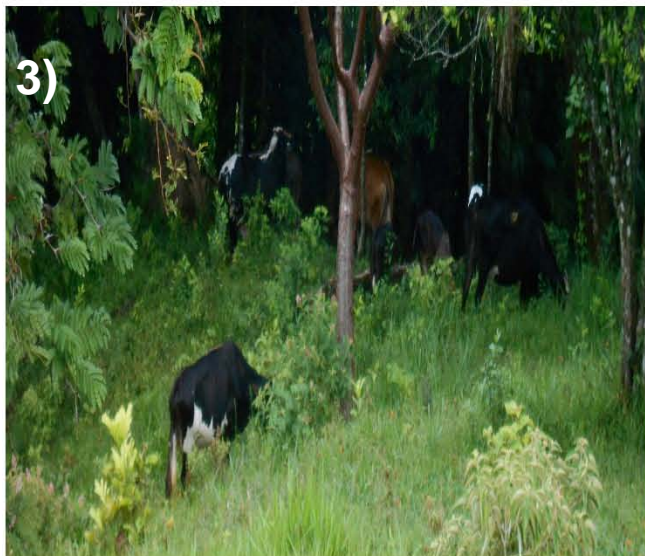


Figura 8. Usos de suelo: 1) Selva, 2) Vegetación secundaria (Acahual), 3) Potrero y 4) Cultivo

4.1.3. Propiedades físico-químicas del suelo

Tabla 3. Valores promedio de los análisis químicos para la temporada de sequía en el año de muestreo (2015), se incluye la desviación estándar (Acevedo, 2017).

	SELVA	ACAHUAL	POTRERO	CULTIVO
pH (H ₂ O)	5.69 ± 0.29	5.76 ± 0.15	5.77 ± 0.18	5.32 ± 0.18
Ct (%)	4.30 ± 0.59	5.04 ± 0.55	3.82 ± 0.63	3.48 ± 0.31
MOS (%)	7.34 ± 1.27	8.80 ± 1.96	7.20 ± 1.62	5.04 ± 0.92
Nt (%)	0.39 ± 0.05	0.44 ± 0.13	0.35 ± 0.06	0.32 ± 0.01
P (mg kg ⁻¹)	1.41 ± 0.65	2.48 ± 2.15	1.51 ± 0.34	1.30 ± 0.18
Nitrato (mg kg ⁻¹)	21.06 ± 2.62	28.45 ± 7.21	11.63 ± 4.58	23.74 ± 7.17
Amonio (mg kg ⁻¹)	29.16 ± 2.46	32.15 ± 6.37	32.54 ± 5.75	27.71 ± 1.51
Contenido hídrico (g H ₂ O/g ⁻¹)	0.43 ± 0.17	0.37 ± 0.09	0.42 ± 0.13	0.33 ± 0.12
DA (g suelo/cm ³)	0.90 ± 0.11	0.85 ± 0.13	0.90 ± 0.10	1.07 ± 0.05

Ct= Carbono total; MOS= Materia orgánica del suelo; Nt= Nitrógeno total; P= Fósforo; DA= Densidad aparente.

4.2. Muestreo

Se realizó un muestreo en cuatro usos de suelo (Fig. 9): selva, acahual, potrero y cultivo en el mes de abril de 2015 (época de sequía). Se seleccionaron cinco sitios para cada uso de suelo cada uno con un área total de 0.1 h y se tomaron muestras de 500 g de los primeros 20 cm de suelo de tres réplicas de manera aleatoria para cada sitio de los cuales 100 g fueron transportados en una hielera.

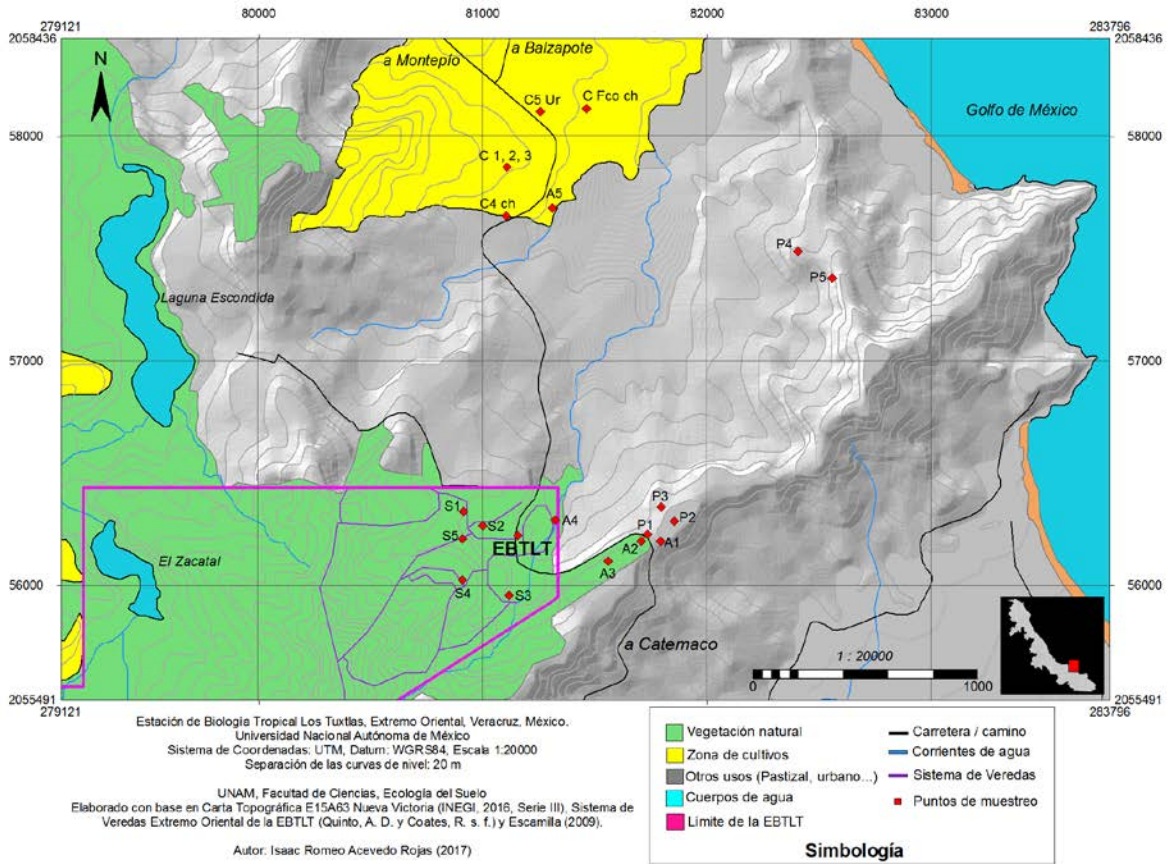


Figura 9. Mapa de los sitios para cada uso de suelo seleccionados. S=Selva, A=Acahual, P=Potrero y C=Cultivo. Elaborado por: Acevedo Rojas, 2017. Con base en carta topográfica E15A63 Nueva Victoria, (INEGI 2016, Serie III), Sistema de Veredas Externo Oriental de la EBTLT (Quinto, A.D. y Coates, R. s.f.) y Escamilla (2009).

4.3. Laboratorio

4.3.1. Lavado y esterilizado de material

En la Unidad de Análisis Ambiental (UNAAMB) de la Facultad de Ciencias, todo el material utilizado en la determinación de ácidos grasos se lavó con detergente neutro concentrado (libre de fosfatos) HYCLIN PLUS. Posteriormente se colocó en un baño de ácido clorhídrico (HCl) al 10% durante una noche, transcurrido este tiempo se enjuagó

con agua desionizada y se dejó reposar durante una hora para finalmente ser esterilizado a 120°C durante 15 min y colocarse en un horno a 150°C durante 2 horas.

4.3.2. Preparación de las muestras

En el Taller de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias, UNAM se almacenaron las muestras congeladas a -4°C. Para el proceso de liofilización se pesaron 15 g de suelo y se mantuvieron en papel aluminio a -4°C.

4.3.3. Liofilización

Se realizó un protocolo de liofilización para muestras de suelo (Anexo 2), en el cual las muestras pesadas y congeladas de suelo se colocaron en frascos de vidrio color ámbar de 40 ml y boca ancha para su liofilización. A cada frasco se le colocó una contratapa de aluminio con pequeñas perforaciones para permitir la evaporación del agua y evitar la salida de suelo. Para este proceso, las muestras deben ser colocadas a una temperatura de -20°C durante 30 min; el proceso se llevó a cabo en una liofilizadora LabConco modelo FreeZone 4.5. Una vez liofilizadas, estas muestras fueron pulverizadas con la ayuda de un mortero.

4.3.4. Extracción de ácidos grasos

La extracción de los ácidos grasos totales de la célula (WCFA) se realizó mediante una técnica modificada de Sasser (1990) que consta de cuatro etapas: saponificación, metilación, extracción y lavado de bases (Anexos 3).

4.3.5. Separación, identificación y cuantificación de ácidos grasos

Este proceso se realiza con el uso de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas. Los ácidos grasos se identifican por su masa molecular y el tiempo de retención (tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta que el análito es graficado) con relación al estándar interno (19:0 ácido nonadecanoico metil éster) (Anexo 3) (Zelles, 1997; Gavito y Olsson 2003; Olsson *et al.* 2003).

La nomenclatura utilizada fue con base en el sistema “A:B ω C” en donde “A” indica el número total de átomos de carbono, “B” el número de insaturaciones, y “ ω ” precede a “C”, el número de átomos de carbono entre las insaturaciones más cercanas y la porción alifática terminal de la molécula. Los sufijos “i” y “a” se refieren a los derivados de metilo iso y ante-iso.

En el caso de los HMA se identificó el espectro de masas y tiempo de retención para el ácido 16:1 ω 5 (11-ácido hexadecenoico metil éster), adicionalmente se buscaron los espectros de masas para el grupo de las bacterias Gram⁺ (i17:00 14-ácido hexadecenoico metil éster), Gram⁻ (18:1 ω 7 11-ácido octadecenoico metil éster) y hongos (18:2 ω 6,9 6,9,12-ácido octadecatrienoico metil éster) (Anexo 4, Fig. 22) (Baath, 2003). Los tiempos de retención se reportan en la Tabla 4.

Tabla 4. Tiempos de retención de los ácidos grasos.

Grupo	Tiempo de retención (min)	Ácido graso
HMA	13.36	16:1 ω 5
Gram ⁺	17.05	i17:00
Gram ⁻	14.58	18:1 ω 7
Estándar	19.15	19:0

Para la obtención de los cromatogramas se utilizó el método en SIM del cromatógrafo de gases con el cual se monitorean las masas características de cada uno de los compuestos que se desean identificar (Anexo 4). Las masas monitoreadas se reportan en la Tabla 5.

Tabla 5. Masas monitoreadas para cada ácido graso.

Grupo	Ácido graso	PM	Ion 2	Ion 3
HMA	16:1 ω 5	268	236	194
Gram ⁺	i17:00	284	255	241
Gram ⁻	18:1 ω 7	296	264	222
Estándar	19:0	312	281	269

Con base en el cromatograma obtenido (p.ej. Fig. 23 y 24, Anexo 4) se realizó el cálculo de la concentración absoluta de ácidos grasos por gramo de suelo (nmoles g⁻¹) (Tabla 10, Anexo 4) con base en el siguiente factor de conversión:

$$\left(\frac{\% \text{ área ácido graso}}{\% \text{ área pico std}} \right) \left(\frac{\text{concentración std añadido} (25 \mu\text{g})}{\frac{PM \text{ std}}{g \text{ muestra}}} \right) = \text{nmoles g}^{-1}$$

En donde,

% área del ácido graso, con base la integración del área del pico en el cromatograma

% pico std, se refiere a la integración del área del pico del estándar

PM std, se refiere al peso molecular del estándar interno

5. ANÁLISIS DE DATOS

Para analizar si los datos tenían una distribución normal, se aplicó la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk. Al no ser normales, los datos para HMA y bacterias Gram⁺ fueron transformados mediante la función de logaritmo natural. En el caso de las bacterias Gram⁻, dado que con la transformación no se normalizaron, se procedió a utilizar estadísticos para datos no paramétricos.

Para determinar si existían diferencias significativas entre los usos de suelo, en los datos para HMA y bacterias Gram⁺ se realizó un Análisis de Varianza de una vía. Posteriormente, para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba Post-Hoc de Tukey ($\alpha=0.05$). En el caso de Bacterias Gram⁻ se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para identificar las diferencias entre grupos.

Se realizaron correlaciones de Spearman para la cantidad de ácidos grasos y la cantidad de nutrientes, así como para la variable de pH. Las pruebas se realizaron con una significancia de $p<0.05$.

Finalmente, se realizó un Análisis de Componentes Principales para determinar la tendencia de comportamiento de todas las propiedades físico-químicas del suelo pH, Ct (%), MOS (%), Nt (%), P (mg kg⁻¹), Nitrato (mg kg⁻¹), Amonio (mg kg⁻¹), y los ácidos grasos. El criterio de selección de las variables para explicar los componentes fue que tuvieran un valor de correlación mayor a 0.70 y fueron graficados como vectores. Todas las pruebas fueron realizadas con el paquete Statistica 8.0.

6. RESULTADOS

6.1. Contribución de la microbiota

Fueron identificados los espectros de masas de los ácidos grasos correspondientes a la comunidad de HMA, bacterias Gram⁺, bacterias Gram⁻, en todas las muestras procesadas. En la tabla 10 (ver anexos) se reporta la concentración de ácidos grasos (nmoles g⁻¹) para cada réplica por cada uso de suelo.

En la figura 10, se observó que, en todos los usos del suelo, el grupo de los HMA presentó el mayor aporte de ácidos grasos mientras que el grupo de las bacterias Gram⁻ presenta los valores más bajos.

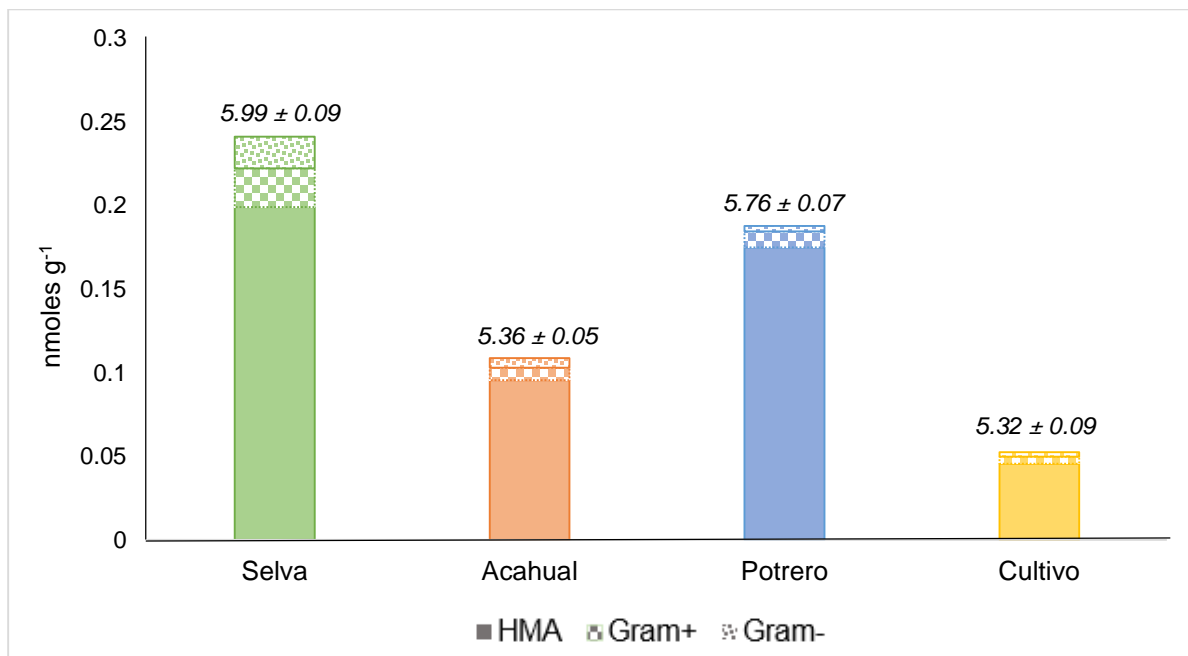


Figura 10. Contribución promedio de la microbiota por uso de suelo. Sobre las barras se incluye el valor promedio de pH \pm EE.

6.2. Cuantificación de ácidos grasos

El análisis de ANOVA para la concentración de ácidos grasos para los hongos micorrizógenos arbusculares mostró diferencias significativas entre los usos de suelo ($F_{(3,56)}= 5.72$, $p<0.001$). Los suelos de selva y potrero presentaron significativamente mayor abundancia de ácidos grasos (16:1 ω 5) en comparación con los suelos provenientes de cultivos (Fig. 11).

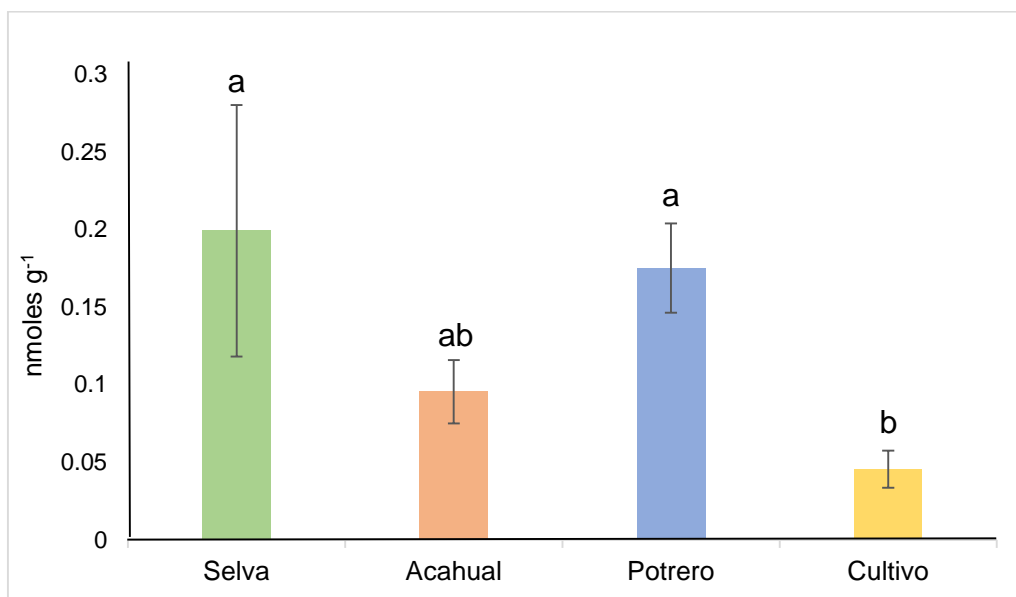


Figura 11. Concentración de ácidos grasos de HMA para todos los usos de suelo ($\bar{x}\pm EE$). Las letras distintas indican diferencias significativas con base en la prueba de Tukey ($p<0.05$).

El análisis de ANOVA del contenido de ácidos grasos de bacterias Gram⁺ mostró diferencias significativas entre los usos de suelo ($F_{(3,56)} = 7.30$, $p < 0.003$). Los suelos de selva y potrero presentaron significativamente mayor abundancia de ácidos grasos (i17:00) en comparación con los suelos provenientes de cultivos. (Fig. 12).

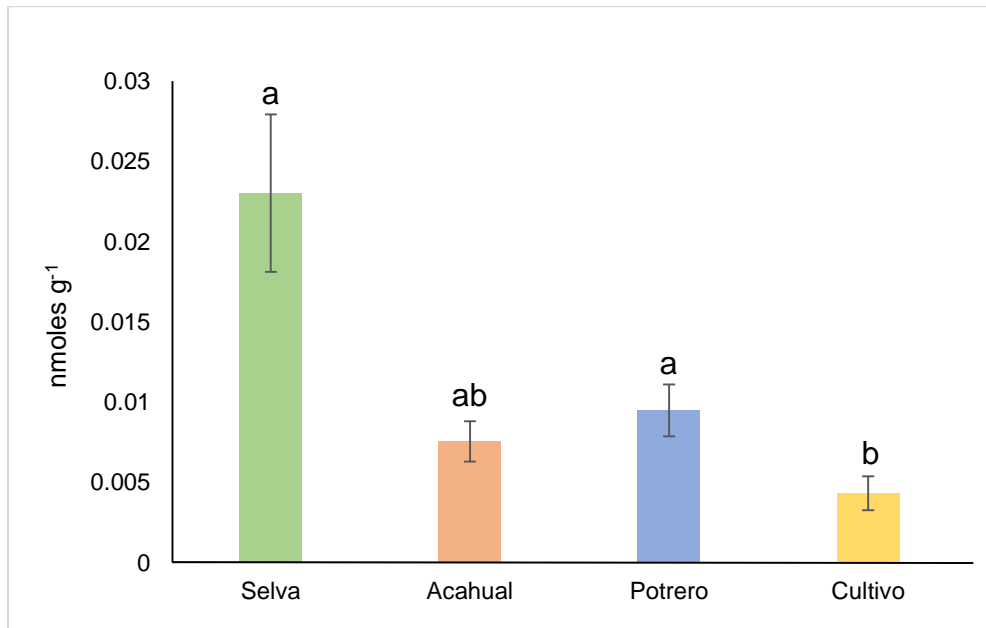


Figura 12. Concentración de ácidos grasos de bacterias Gram⁺ para todos los usos del suelo ($\bar{x} \pm EE$). Las letras distintas indican diferencias significativas con base en la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Las pruebas de Kruskal-Wallis y de medianas, mostraron diferencias significativas en la concentración de ácidos grasos para el grupo de las bacterias Gram⁻ entre los usos de suelo ($\chi^2=13.60$, $df=3$, $p=0.003$). Los suelos de selva y presentaron significativamente mayor abundancia de ácidos grasos (18:1 ω 7) en comparación con los suelos provenientes de potreros y cultivos (Fig. 13).

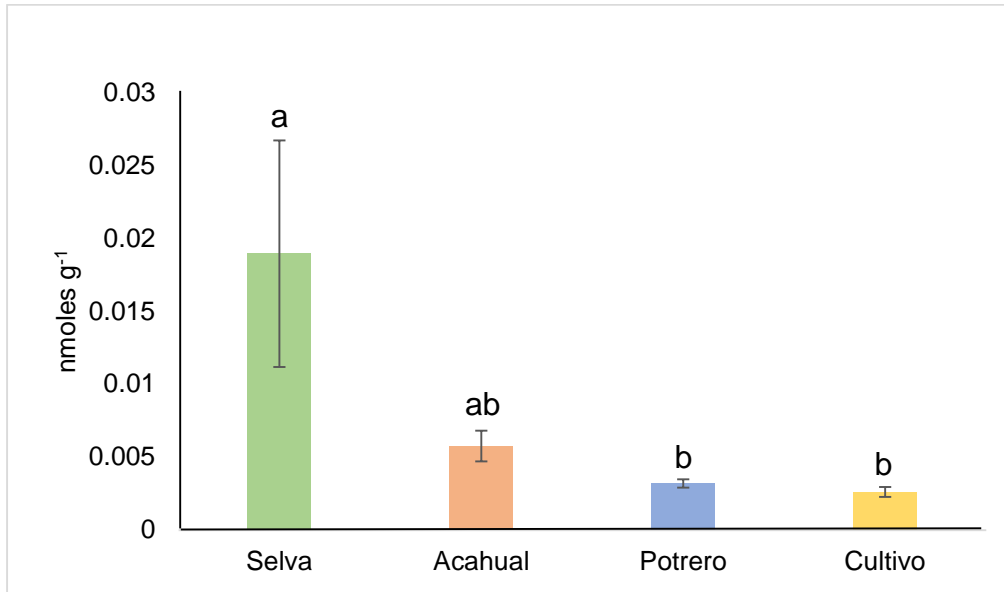


Figura 13. Concentración de ácidos grasos de Bacterias Gram⁻ para todos los usos de suelo ($\bar{x} \pm EE$). Las letras distintas indican diferencias significativas con base en la prueba de Kruskal-Wallis.

6.3. Correlaciones

Los análisis de correlación mostraron que la concentración de ácidos grasos se correlacionó positivamente con el C ($r=0.26$; $p<0.05$; Fig. 14) y con la MO ($r=0.28$; $p<0.05$; Fig. 15).

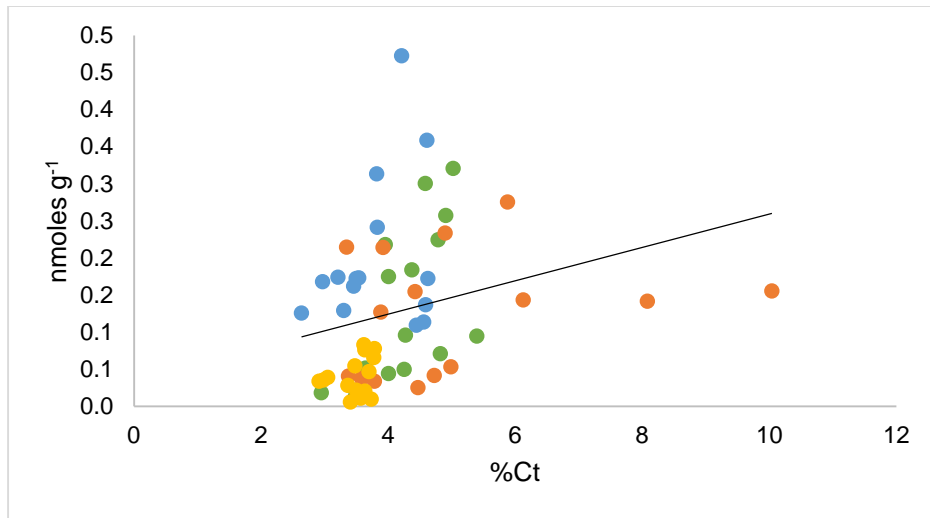


Figura 14. Correlación entre la concentración de ácidos grasos y el porcentaje de carbono total. Los puntos en la gráfica representan las réplicas para cada uso de suelo. Selva=verde, Acahual=Naranja, Potrero=Azul, y Cultivo=Amarillo.

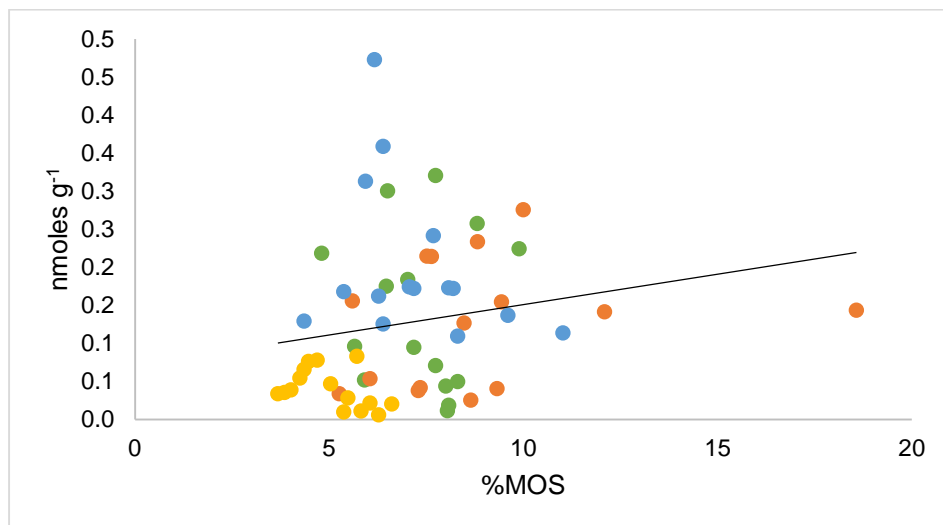


Figura 15. Correlación entre la concentración de ácidos grasos y el porcentaje de materia orgánica del suelo. Los puntos en la gráfica representan las réplicas para cada uso de suelo. Selva=verde, Acahual=Naranja, Potrero=Azul, y Cultivo=Amarillo.

En el caso del pH los análisis de correlación mostraron que la concentración de ácidos grasos se correlacionó positivamente con esta variable sólo cuando se consideran los ácidos grasos de toda la microbiota ($r=0.3051$; $p<0.05$; Fig. 16), y que esta correlación positiva puede atribuirse al grupo de HMA ($r=0.3316$; $p<0.05$; Fig. 17).

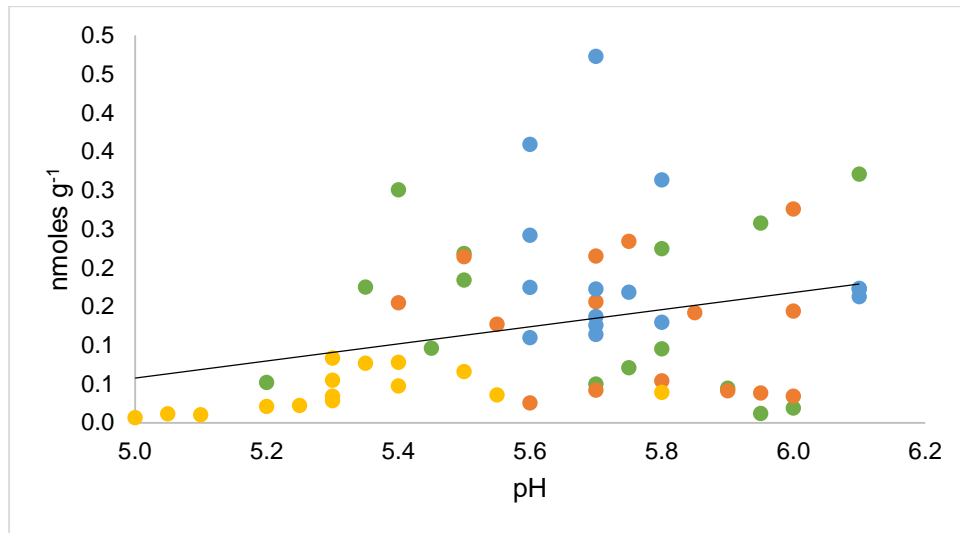


Figura 16. Correlación entre la concentración de ácidos grasos totales y los valores de pH. Los puntos en la gráfica representan las réplicas para cada uso de suelo. Selva=verde, Acahual=Naranja, Potrero=Azul, y Cultivo=Amarillo.

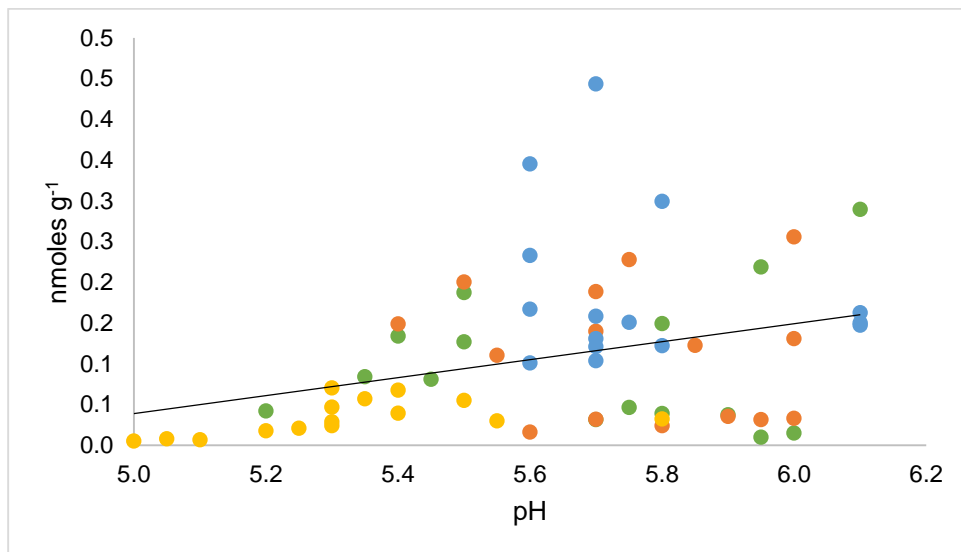


Figura 17. Correlación entre la concentración de ácidos grasos de HMA y los valores de pH. Los puntos en la gráfica representan las réplicas para cada uso de suelo. Selva=verde, Acahual=Naranja, Potrero=Azul, y Cultivo=Amarillo.

6.4. Análisis de Componentes Principales (ACP)

Para todos los grupos de microbiota, en el análisis multivariado de propiedades del suelo y concentración de ácidos grasos, los primeros dos componentes explicaron el 55.03% de la variación. El primer eje representó el 32.25% de la variación, las variables que presentaron los valores positivos más altos en la correlación fueron C, Nt y contenido de arena (reflejo de la textura del suelo, y los contenidos de arcilla para los valores negativos; el carbono y el nitrógeno total tuvieron los valores más altos en los vectores propios (Tabla 6). El segundo componente representó el 19.77% de la variación, y las variables con los valores de correlación más altos negativos fueron las del contenido de ácidos grasos de la microbiota (Fig. 18).

Tabla 6. Valores propios y porcentaje acumulativo de variación para los dos primeros ejes para las propiedades físicas del suelo y los ácidos grasos de la microbiota.

	Eje 1	Eje 2
Valores propios	4.23	2.37
Porcentaje de variación acumulativo	35.35	55.03
Vectores propios		
C	0.8437	0.4550
Nt	0.8630	0.4259
Arenas	0.8012	-0.2027
Arcillas	-0.7877	0.2189
HMA	0.4438	-0.6640
Gram ⁺	0.5884	-0.5634
Gram ⁻	0.4736	-0.6022

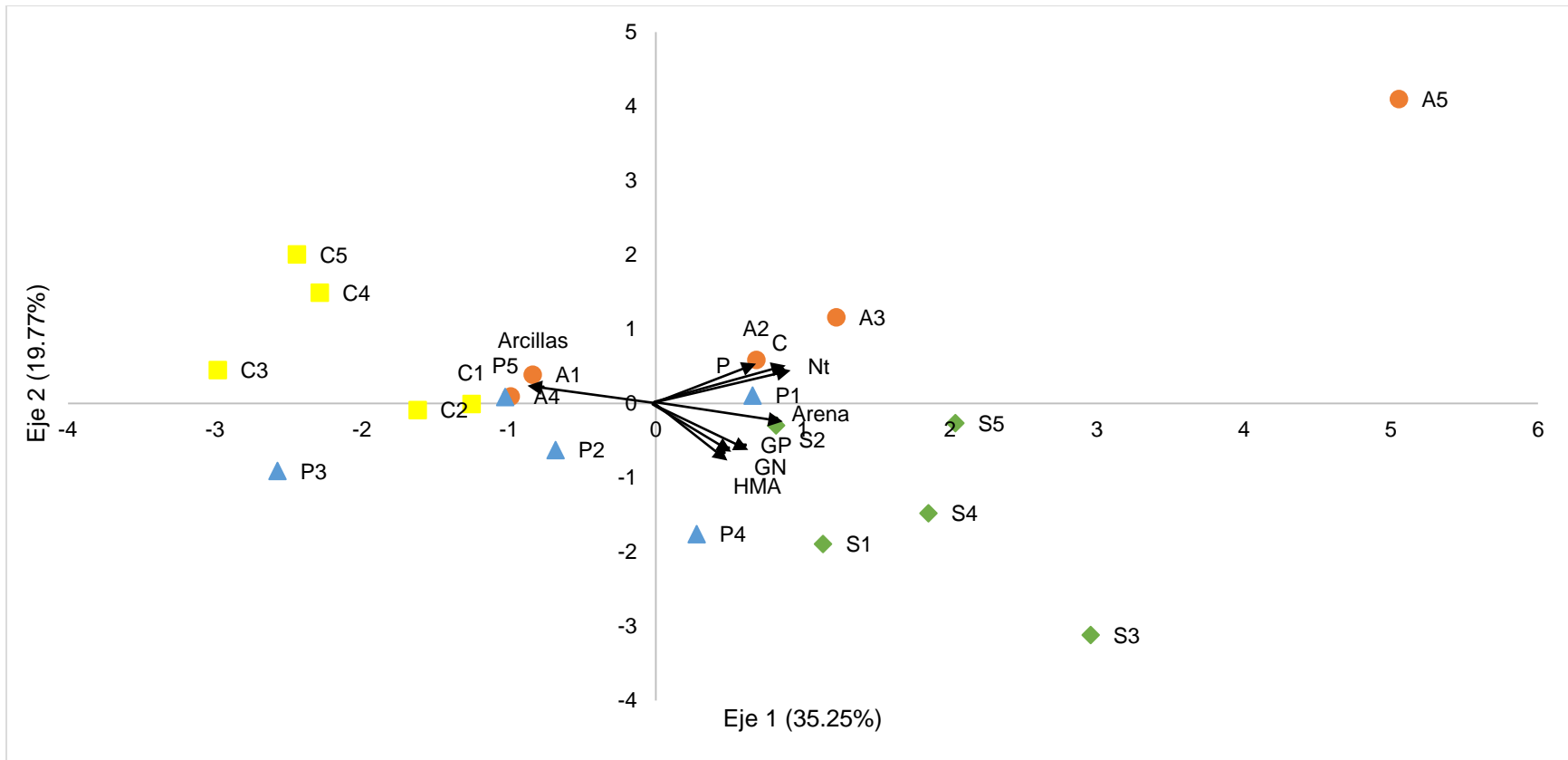


Figura 18. Análisis de Componentes Principales para los grupos de microbiota. Los números corresponden a las réplicas y los colores al uso de suelo. S=Selva, A=Acahual, P=Potrero y C=Cultivo.

Para el grupo de HMA en el análisis multivariado de propiedades del suelo y concentración de ácidos grasos los primeros dos componentes explicaron el 58.23% de la variación. El primer eje representó el 38.71% de la variación, las variables que presentaron los valores positivos más altos en la correlación fueron C, Nt, P y contenido de arena (reflejo de la textura del suelo), y los contenidos de arcilla para los valores negativos; el carbono y el nitrógeno total tuvieron los valores más altos en los vectores propios (Tabla 7). El segundo componente representó el 19.52% de la variación, y la variable con el valor de correlación más alto fue NO₃ (Fig. 19).

Tabla 7. Valores propios y porcentaje acumulativo de variación para los dos primeros ejes para las propiedades físicas del suelo y los ácidos grasos de los HMA.

	Eje 1	Eje 2
Valores propios	3.87	1.95
Porcentaje de variación acumulativo	38.71	58.23
Vectores propios		
C	0.9149	0.2865
Nt	0.9292	0.2441
P	0.7164	0.4541
NO ₃	0.4258	0.7790
Arenas	0.7637	-0.4975
Arcillas	-0.7390	0.4629

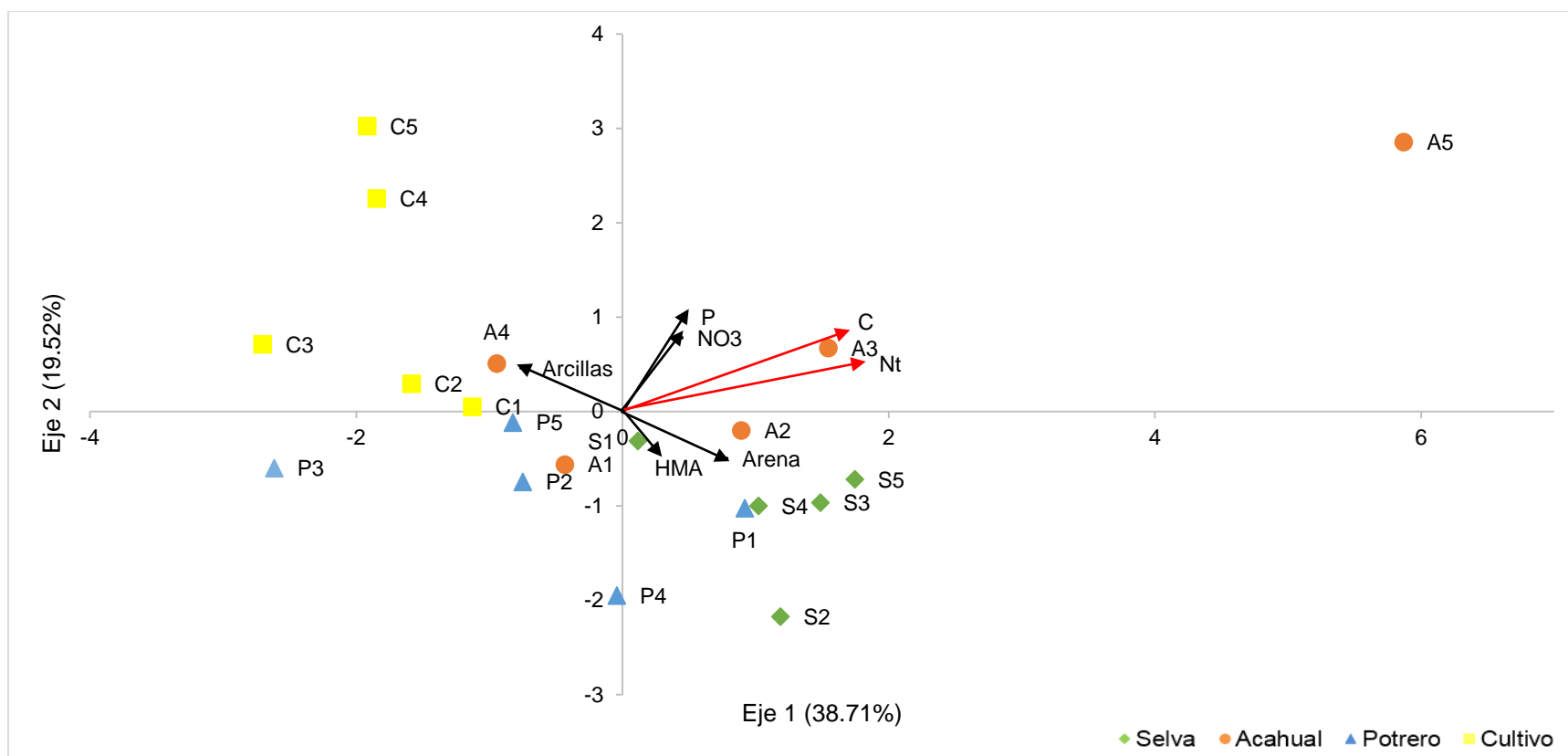


Figura 19. Análisis de Componentes Principales para el grupo de los HMA. Los números corresponden a las réplicas y los colores al uso de suelo. S=Selva, A=Acahual, P=Potrero y C=Cultivo. Las flechas rojas representan a las variables con una contribución ≥ 0.90 .

En las bacterias Gram⁺ el análisis multivariado de las propiedades del suelo y concentración de ácidos grasos se explicó por los primeros dos componentes (59.68%). El primer eje representó el 39.84% de la variación; las variables que presentaron los valores positivos más altos en la correlación fueron C, Nt y arenas, y los contenidos de arcillas para los valores negativos; el carbono y el nitrógeno total tuvieron los valores más altos en los vectores propios (Tabla 8). El segundo componente representó el 19.83% de la variación, en este caso la variable con el valor de correlación más alto fue NO₃ (Fig. 20).

Tabla 8. Valores propios y porcentaje acumulativo de variación para los dos ejes para las propiedades físicas del suelo y los ácidos grasos de las bacterias Gram⁺.

	Eje 1	Eje 2
Valores propios	3.98	1.98
Porcentaje de variación acumulativo	39.84	59.68
Vectores propios		
C	0.9073	0.3170
Nt	0.9212	0.2791
NO ₃	0.3992	0.7782
Arenas	0.7767	-0.4595
Arcillas	-0.7564	0.4399

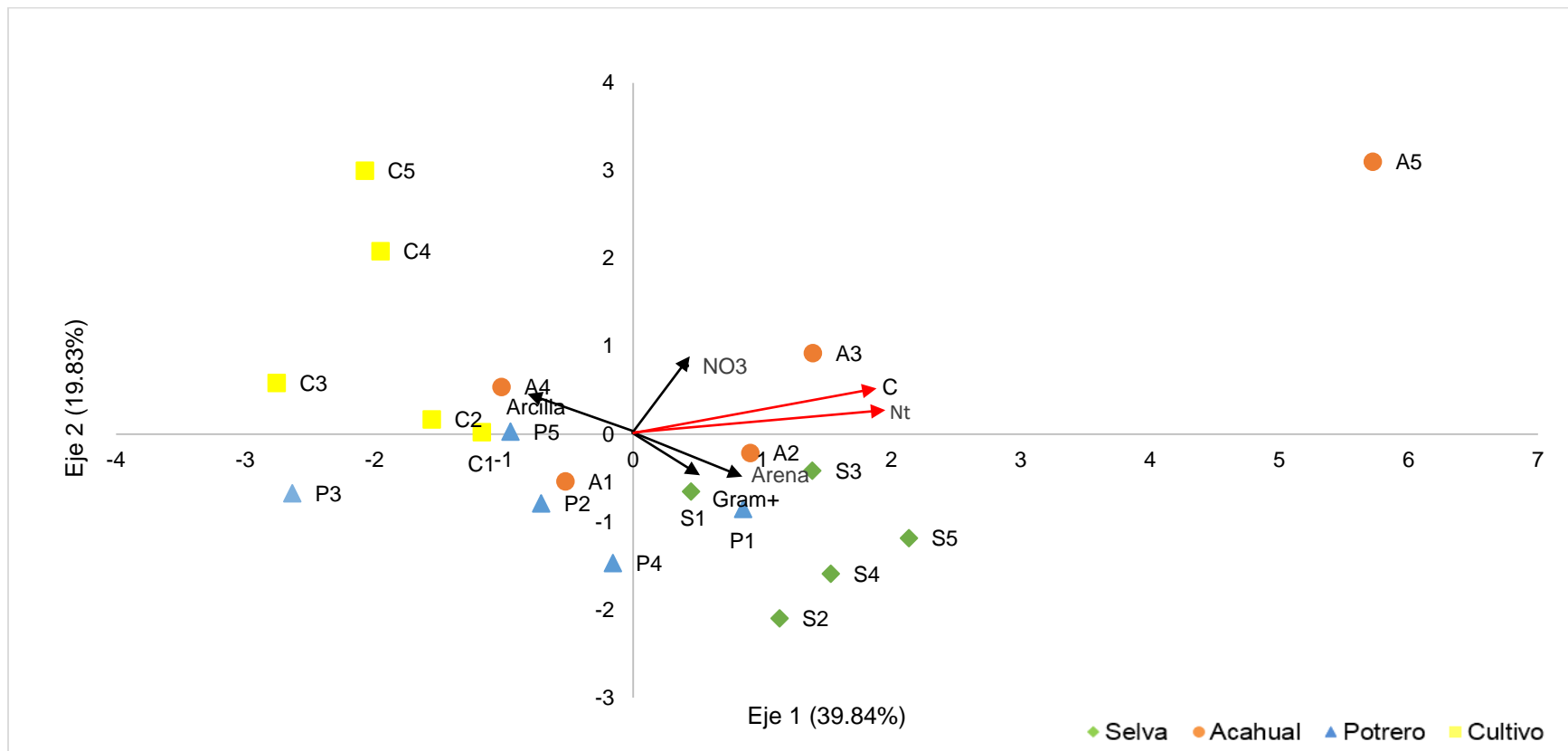


Figura 20. Análisis de Componentes Principales para el grupo de las bacterias Gram⁺. Los números corresponden a las réplicas y los colores al uso de suelo. S=Selva, A=Acahual, P=Potrero y C=Cultivo. Las flechas rojas representan a las variables con una contribución ≥ 0.90 .

En las bacterias Gram⁻ el análisis multivariado de propiedades del suelo y contenido de ácidos grasos se explicó por los primeros dos componentes (57.67%). El primer eje representó el 38.86% de la variación; las variables que presentaron los valores positivos más altos en la correlación fueron C, Nt, P y arenas, y los contenidos de arcillas para los valores negativos; el carbono y el nitrógeno total tuvieron los valores más altos en los vectores propios (Tabla 9). El segundo componente representó el 18.80% de la variación; en este caso la variable con el valor de correlación más alto fue NO₃ (Fig. 21).

Tabla 9. Valores propios y porcentaje acumulativo de variación para los dos primeros ejes para las propiedades físicas del suelo y los ácidos grasos de las bacterias Gram⁻.

	Eje 1	Eje 2
Valores propios	3.88	1.88
Porcentaje de variación acumulativo	38.86	57.67
Vectores propios		
C	0.9100	0.2910
Nt	0.9272	0.2417
P	0.7138	0.4735
NO ₃	0.4513	0.7312
Arenas	0.7667	-0.5336
Arcillas	-0.7464	0.5046

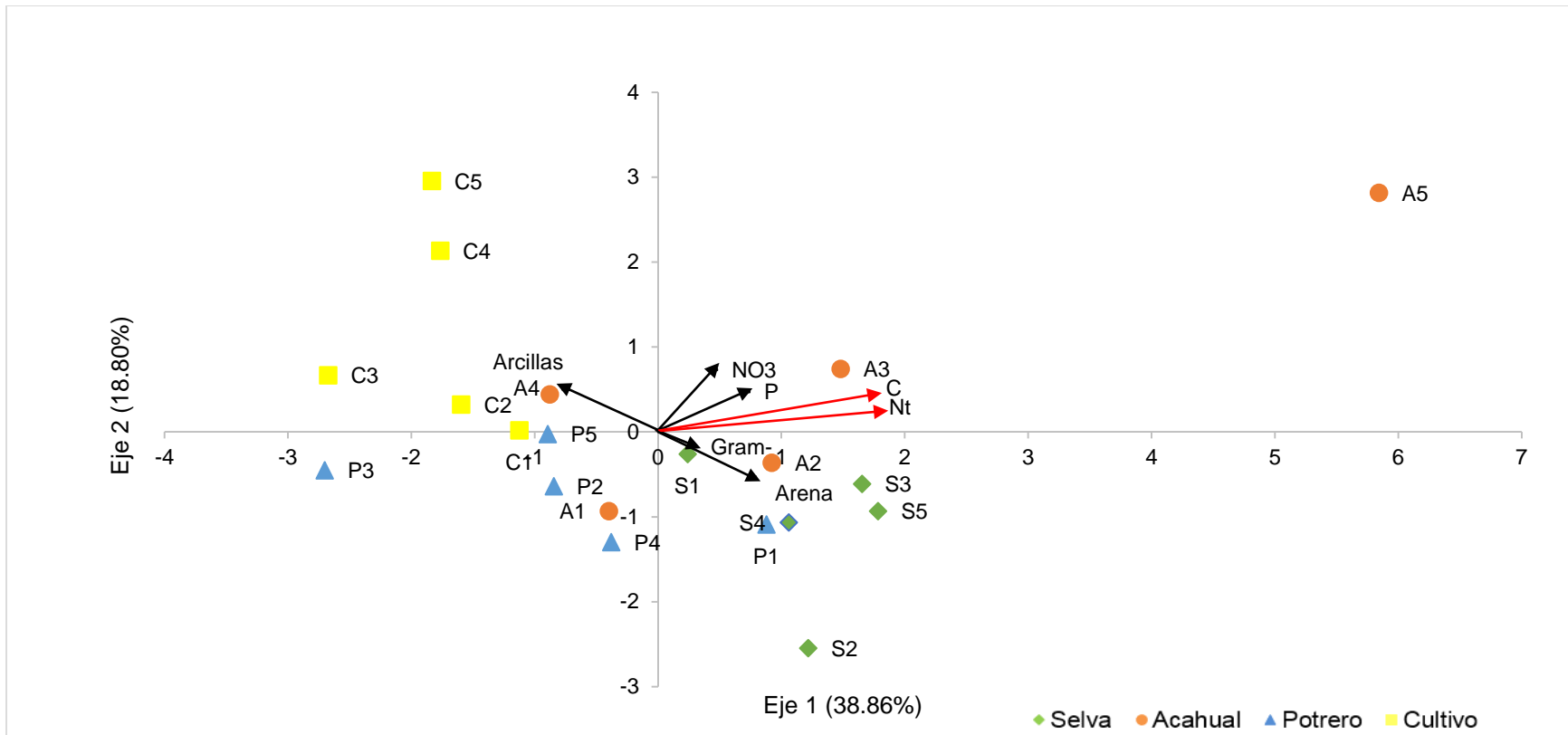


Figura 21. Análisis de Componentes Principales para el grupo de las bacterias Gram⁻. Los números corresponden a las réplicas y los colores al uso de suelo. S=Selva, A=Acahual, P=Potrero y C=Cultivo. Las flechas rojas representan a las variables con una contribución ≥ 0.90

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo los usos del suelo explorados corresponden a dos sistemas: original (selva)/en regeneración natural (acahual) y en manejo (potreros y cultivos). De manera general, si comparamos las diferencias dentro de cada sistema se observa que los acahuales y los cultivos presentaron una menor abundancia de ácidos grasos en comparación con la selva y los potreros, respectivamente.

Los potreros presentaron una mayor abundancia de ácidos grasos en todos los grupos de microbiota (HMA, Gram⁺ y Gram⁻) en comparación con los suelos de cultivo. También ocurrió la misma tendencia de mayor abundancia en el caso de la selva en comparación con los acahuales.

En el potrero, la especie vegetal que predomina es el pasto insurgente (*Brachiaria brizantha*), el cual, por su historia de vida, se encuentra bajo alta exposición a luz solar lo que deriva en alta producción, almacenamiento de C, y aumento en la colonización (Cervantes, 2017), así como en el crecimiento de micelio extrarradical, lo que podría explicar también en la alta producción y acumulación de ácidos grasos. Esto además coincide con lo reportado por otros autores, en el área de estudio, en donde la formación de estructuras como micelio y esporas de HMA aumenta en este uso de suelo, para la mayor absorción de recursos como es el caso del micelio extrarradical, en donde se han encontrado valores de hasta 20.05 m g⁻¹ (Casariego, en preparación) el doble a lo reportado para la selva 9.85 m g⁻¹ (Becerril, 2016) y como estructuras de resistencia como es el caso del aumento en la esporulación (Guadarrama y Álvarez, 1999).

Aunado a la anterior, los resultados de los análisis multivariados (ACP) contribuyen a confirmar esta hipótesis, pues se observó que las variables que contribuyen más a explicar el ordenamiento espacial de la comunidad microbiana fueron aquellas relacionadas con la disponibilidad de nutrientes; esto es consistente con lo propuesto por Johnson (2010), que señala que la estequiometría de los sitios es un factor que determina el comportamiento de la comunidad de HMA.

Sin embargo, es importante determinar las especies de HMA que se encuentran asociadas a este pasto, pues se sabe que el uso intensivo del suelo provoca una pérdida en la diversidad (Simons *et al.*, 2017), y que algunas especies predominan sobre otras en zonas perturbadas (Johnson *et al.*, 1999); es decir, aunque en términos de abundancia los valores son más altos, los valores de riqueza y diversidad pueden ser menores en comparación con la selva, comprometiendo la funcionalidad y vulnerabilidad de la comunidad de HMA. En el caso de las selvas secundarias, estas no presentan diferencias significativas con respecto a los otros usos del suelo, sin embargo, en los procesos de regeneración natural después de las prácticas agrícolas o el abandono, pueden existir cambios en la estructura de la comunidad de HMA debido a las diferencias presentadas entre géneros (Guadarrama *et al.*, 2014). Para determinar lo anterior es necesario realizar la identificación de las especies presentes en estos sitios, por métodos tradicionales (identificación por esporas) o moleculares (secuenciación masiva), cada uno con sus limitaciones.

En 1995, Olsson propuso un método para estimar la biomasa de los HMA a partir de la cuantificación de los ácidos grasos. Este autor propone que asumiendo que el 58% de los HMA está constituido por lípidos, y que de esos el 24% son fosfolípidos, y que de estos el 43% de los ácidos grasos corresponde al 16:1 ω 5, entonces se puede estimar la biomasa fúngica (50% P.S.) en rangos entre 1.5 a 1.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ en el suelo, sin embargo, este método no resulta adecuado debido a que no considera el almacenamiento diferencial de ácidos grasos en las distintas estructuras, ya que se sabe que las vesículas pueden tener una composición lipídica diferente a la del micelio extrarradical (Jabaji-Hare, 1988).

La variación de pH en los suelos muestreados tuvo un efecto significativo positivo sólo cuando se consideraron el total de ácidos grasos de todos los grupos de microbiota; sin embargo, no fue suficiente para que éste tuviera un efecto significativo en la comunidad bacteriana que se viera reflejado en la cantidad de ácidos grasos medidos, contrario a lo planteado en la segunda hipótesis, ya que este comportamiento se encuentra explicado por la comunidad de HMA.

Este estudio se realizó de manera paralela en la temporada de lluvias (septiembre, 2015), reportándose una menor cantidad de ácidos grasos ($p < 0.00001$) (Flores, en preparación). Esto es acorde a otros estudios en los que se ha reportado un aumento en la formación de estructuras de los HMA debido al estrés hídrico en la temporada de sequía (Guadarrama y Álvarez, 1999; Becerril, 2017).

En el caso del ácido graso 18:2 ω 6,9 generalmente asociado al grupo de los hongos saprófitos, éste se degrada con facilidad después de siete semanas de almacenamiento (Petersen y Klug, 1994), por lo que no fue posible encontrarlo en estas muestras, sin embargo, su estudio resulta importante para entender la estructura total de las comunidades microbianas en el suelo.

Los microorganismos del suelo son responsables de un gran número de procesos esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas, incluyendo los ciclos de nutrientes. En el caso de las bacterias Gram⁻, se sabe que algunas de las especies de este grupo corresponden a las fijadoras de N, y, además, que son altamente sensibles a los efectos ocasionados por procesos como el cambio de uso de suelo, ya que puede cambiar la nodulación o la persistencia de estas en el suelo (Lima *et al.*, 2008). Esto coincide con los resultados, ya que, debido a la alta concentración de ácidos grasos en la selva en comparación con los otros usos del suelo, podemos determinar que el cambio de uso de suelo tiene un impacto directo sobre la persistencia tanto de las bacterias Gram positivas como negativas. Además, se sabe que algunas especies de HMA reducen la biomasa de bacterias fijadoras de nitrógeno debido a la competencia por los exudados de la raíz (Hamel *et al.*, 1991; Paul y Clark, 1996). Sumado a esto, se sabe que la adición de agroquímicos como los funguicidas reportados para esta temporada, disminuyen la supervivencia y la colonización de bacterias tipo Rhizobial (Ramos y Ribeiro, 1993; Fox *et al.*, 2007; Ormeño *et al.*, 2008).

En la temporada de sequía en la que se realizó el muestreo del presente estudio se encontraron rastros de la adición de plaguicidas en los cultivos (Acevedo, 2017), pues se encontró evidencia (presencia de contenedores vacíos) de la posible aplicación de Velfosato®, un herbicida que contiene glifosato como ingrediente activo (41%). El glifosato es un plaguicida del grupo de los organofosforados, que resulta altamente

persistente en el suelo, su vida media varia de un par de días a dos o tres meses, sin embargo, algunos reportes mencionan que su persistencia puede durar de 100 a 200 años, mientras que su actividad fitotóxica puede perdurar hasta 19 semanas después de su aplicación, (Heinomen-Tanski, 1989; Feng y Thompson, 1990; Weber, 1994). Así, la presencia de diferentes partículas derivadas de éste, son capaces de alterar los flujos de energía, la dinámica de nutrientes y la estructura de las comunidades microbianas (Wardle *et al.*, 1990) como lo esperábamos en la hipótesis tres. La adsorción en el suelo de este herbicida se ve favorecida por valores de pH ácidos en el suelo, dado que la interacción entre las arcillas del suelo y el glifosato aumenta, debido a que ambos adquieren cargas más positivas (McConell y Hossner, 1985). En este sentido, los suelos evaluados presentan valores de pH ácidos (5.32 a 5.99), con lo que se favorece la persistencia y oclusión de este herbicida, lo cual genera un impacto directo sobre las comunidades microbianas. En algunos estudios, se ha determinado que dosis altas de glifosato en el suelo son capaces de estimular la respiración microbiana (Haney *et al.*, 2000; Aráujo *et al.*, 2003), con esto sugieren que este compuesto es utilizado por los microorganismos como fuente de carbono; bajo este supuesto se ha propuesto que la aplicación constante de este compuesto es capaz de seleccionar a las poblaciones microbianas capaces de degradarlo (Andréa *et al.*, 2003), sin embargo, la degradación no es específica para algún grupo (Singh *et al.*, 2006). En un análisis de ácidos grasos de la comunidad microbiana de Cuatro Ciénegas expuestas a glifosato, se encontró que la mayor proporción corresponde a las bacterias Gram⁺ en los sitios estudiados, por lo que se propone que estas podrían ser capaces de degradar el glifosato, pero a su vez, ser más susceptibles a verse afectadas por este mismo (Chávez, 2017). Esto coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, en donde las bacterias Gram⁺ son más abundantes, en comparación con las Gram⁻.

8. CONCLUSIONES

El cambio de uso de suelo en la selva de Los Tuxtlas afectó de manera negativa la abundancia de las comunidades microbianas asociadas a los grupos funcionales de HMA y bacterias del suelo (Gram⁺ y Gram⁻) expresadas en términos de los ácidos grasos, sin embargo aun así se encontraron dichos grupos en todos los usos de suelo, demostrando un alta capacidad de persistencia a pesar de la adición de nutrientes o el uso de plaguicidas en los sistemas, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (Ahern *et al.*, 2007; French *et al.*, 2017; Saia *et al.*, 2015) y fortalece la idea de utilizar estas comunidades como indicadoras de daño en sistemas modificados.

En el análisis del efecto del cambio de uso de suelo de la selva de Los Tuxtlas, la disponibilidad de nutrientes fue un factor que afectó los ácidos grasos de la microbiota del suelo, reduciéndolos en los suelos con cultivos, aunque el pH no fue una variable concluyente para explicar el cambio de las comunidades microbianas. Finalmente, la adición de compuestos químicos, como los herbicidas, es capaz de reducir la cantidad de ácidos grasos producidos por la microbiota del suelo, en particular por la actividad de las bacterias.

9. PERSPECTIVAS

El análisis del efecto del cambio de uso de suelo en la microbiota mediante la cuantificación de ácidos grasos supone una serie de ventajas sobre otras técnicas tradicionales de cuantificación, sin embargo, es necesario considerar que es una técnica muy precisa que requiere de condiciones y equipo de laboratorio en condiciones óptimas de trabajo, esto debido a que las muestras son fácilmente alteradas si no se tiene el cuidado y limpieza necesaria. A pesar del gran esfuerzo que supone esta técnica, la considero una de las más precisas en identificación de grupos, por lo que sugiero que sea utilizada de manera más frecuente en estudios posteriores y que las observaciones y modificaciones realizadas en este trabajo sirvan como un referente para hacerla más eficiente.

10. LITERATURA CITADA

- Abbott, L.K. y Robson, A.D. 1985. The effect of soil pH on the formation of vesicular arbuscular mycorrhizas by two species of *Glomus*. *Australian Journal of Soil Research* 23: 253-261.
- Acevedo, I. 2017. Cambio de uso de suelo en la selva húmeda de Los Tuxtlas y su efecto en el microclima y propiedades físico-químicas del suelo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ahern, K.S., Ahern, C.R. y Udy, J.W. 2007. Nutrient additions generate prolific growth of *Lyngbya majuscula* (cyanobacteria) in field and bioassay experiments. *Harmful Algae* 6 (1): 134-151.
- Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* 211 (4478): 132-138.
- Andréa, M.D., Peres, T.B., Luchini, L.C., Bazarin, S., Papini, S., Matallo, M.B. y Savoy, V.I. 2003. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 38 (11): 1329-1335.
- Araújo, A.D., Monteiro, R.T. y Abarkeli, R.B. 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52 (5): 799-804.
- Baath, E. 2003. The use of neutral lipid fatty acids to indicate the physiological conditions of soil fungi. *Microbial ecology* 45: 373-383.
- Becerril, A. 2017. Análisis de la producción de micelio extrarradical de hongos micorrizógenos arbusculares durante la sucesión en una selva de Los Tuxtlas, Veracruz, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bever, J.D., Schultz, P.A., Pringle, A. y Morton, J. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi: more diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *BioScience* 51: 923-931.

- Campos, C.A. 2004. El Suelo. En: Guevara, S. Laborde-Dovalí, J. y Sánchez-Ríos, G. (Eds.) Los Tuxtlas. El paisaje de la Sierra. Instituto de Ecología A.C. y Unión Europea. Xalapa, Ver. pp 181-192.
- Carabias, M.J. 1980. Análisis de la vegetación de la selva alta perennifolia y comunidades derivadas de ésta en una zona cálido-húmeda de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de México.
- Cervantes, I. 2017. Estimación del potencial de inóculo de hongos micorrizógenos arbusculares en cuatro diferentes usos del suelo en Los Tuxtlas, Veracruz, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chapin, F.S., Matson, P. y Mooney, H.A. 2011. Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology. Springer. 398 pp.
- Chávez, P. 2017. Efecto del uso del glifosato en la dinámica de nutrientes y actividad microbiana de suelos agrícolas en el valle de Cautro Ciénegas, Coahuila. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Clark, R.B. 1997. Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant Soil* 192 (1): 15-22.
- Coleman, D., Crossley, D. y Hendrix, P. 2004. Fundamentos en Ecología del Suelo 2ª edición. Elsevier Academic Press. Georgia, EUA. 404 pp.
- Cram, S., Sommer, I., Fernández, P., Galicia, L., Ríos, C y Barois, I. 2015. Soil natural capital modification through landuse and cover change in a tropical forest landscape: implications for management. *Journal of Tropical Forest Science* 27(2): 189-201.
- Crews, T. 1999. The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: evolutionary vs ecological considerations. *Biogeochemistry* 46: 233-246.

- Cruz-Paredes, C. 2013. Cuantificación de la colonización intraradical y extraradical de hongos micorrizógenos arbusculares en un mosaico heterogéneo en el trópico seco de Veracruz. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cuenca, G. 2015. Las micorrizas arbusculares: aspectos teóricos y aplicados. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (VIC). Caracas, Venezuela. 432 pp.
- Davison, J., Öpik, M., Daniell, T.J., Moora, M. y Zobel, M. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in plant roots are not random assemblages. *FEMS Microbiology ecology* 78 (1): 103-115.
- Dirzo, R. 2001. Tropical forest. En: Chapin III S., Sala, E y Huber, E. (Eds). Global Biodiversity in a changing environment. Scenarios for the 21st century. Ecological Studies 152. Springer. Estados Unidos. pp 251-276.
- Estrada, A. y Coates. 1983. Rain forest in Mexico: research and conservation at Los Tuxtlas. *Oryx*. 17: 201-204.
- Entry, J.A., Rygielwicz, P.T., Watrud, L.S y Donnelly, P.K. 2002. Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas. *Advance in Environmental Research* 7(1): 123-128.
- FAO. 2011. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. The state of the world's land and water resources for food and agriculture, managing systems at risk. Roma y Earthscan, Londres.
- Feng, J.C. y Thompson, D.G. 1990. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 2: persistence in foliage and soils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 38: 1118-1125.
- Fox, J.E., Gullledge, J., Engelhaupt, E., Burow, M.E. y McLachlan, J.A. 2007. Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (24): 10282-10287.

- French, K.E., Tkacz, A. y Turnbull, A. 2017. Conversion of grassland to arable decreases microbial diversity and alters community composition. *Applied Soil Ecology* 110: 43-52.
- Frostegard, A., Tunlid, A. y Baath E. 1993. Phospholipid fatty acids composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Apple Environment Microbiology*. 59:3605–3617.
- Gavito M. E y Olsson P. A. 2003. Allocation of plant carbon to foraging and storage in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 45: 181-187.
- Geist, H.J y Lambin, E. 2001. What drives tropical deforestation? A meta-analysis of proximate and underlying causes of deforestation base on sub national case study evidence. LUCG report, series: 4. CIACO. Printshop, Bélgica.
- Geist, H.J y Lambin, E. 2002. Proximate causes and undelaying driving forces of tropical deforestation. *BioScience* 52(2):142-149.
- Guadarrama, P. y Álvarez, F. J. 1999. Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores in different environments in a tropical rain forest, Veracruz, Mexico. *Mycorrhiza* 8: 267-270.
- Guadarrama, P., Castillo, S., Ramos-Zapata, J.A., Hernández-Cuevas, L.V y Camargo-Ricalde, S.L. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungi communities in changing environments: The effects of seasonality and anthropogenic disturbance in a seasonal dry forest. *Pedobiología* 57: 87-95.
- Guevara, S., Meave, J., Moreno-Casasola, P., Laborde, J. y Castillo, S. 1994. Vegetación y flora de potreros en la sierra de Los Tuxtlas, México. *Acta Botánica Mexicana* 28: 1-27.
- Guevara, S., Laborde, J y Sánchez, G. 2004. Los Tuxtlas. El paisaje de la sierra. Instituto de Ecología, A.C. y Unión Europea. Xalapa, Ver., 288 pp.
- Hamel, C., Nesser, C., Barrantes-Cartin, U., Furlan, V. y Smith, D.L. 1991. Endomycorrhizal fungal species mediate 15N transfer from soybean to maize in non-fumigated soils. *Plant Soil* 138: 41-47.

- Haney, L.S., Senseman, F. y Honsy, Z. 2000. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science* 48: 89-93.
- Hart, M.M. y Reader, R.J. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153 (2): 335-344.
- Heinonen-Tanski, H. 1989. The effect of the temperature and liming on the degradation of glyphosate in two arctic forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 313-317.
- Hermans, S.M., Buckley, H.L., Case, B.S., Curran-Cournane, F., Taylor, M y Lear, G. 2017. Bacteria as Emerging Indicators of Soil Condition. *Applied and Environmental Microbiology* 83: 1-13.
- Hokka, V., Mikola, J., Vestberg, M., Setälä, H. 2004. Interactive effects of defoliation and AM fungus on plants and soil organisms in experimental legume-grass communities. *Oikos* 106 (1): 73-84.
- Ibarra, G. y Sinaca, S. 1995. Lista florística comentada de la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical* 43 (1-3): 75-115.
- IBIUNAM. Instituto de Biología. Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas. 2016. Disponible en: <http://www.ibiologia.unam.mx/tuxtlas/tuxtlas.htm>
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2016. Selvas húmedas. Conjunto de Datos Vectoriales de Uso del Suelo y Vegetación escala 1:250 000, serie V. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/>.
- Jabaji-Hare. 1988. Lipid and fatty acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: contribution to taxonomy. *Mycologia* 80: 622-629.
- Jansa, J., Wiemken, A. y Frossard, E. 2006. The effects of agricultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi. *Geological Society, London, Special Publications* 266 (1): 89-115.
- Jasper, D.A., Robson, A.D. y Abbot, L.K. 1989. Soil disturbance hyphae of reduces the infectivity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 112 (1): 93-99.

- Johnson, N.C., Zak, D.R., Tilman, D y Pfleger, F.L. 1991. International association for ecology dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizal during old field sucession. *Oevologia* 86 (3): 349-358.
- Johnson, N.C., Tilman, D. y Wedin, D. 1992. Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. *Ecology* 73: 2043-2042.
- Johnson, N.C., Hoeksema, J.D., Bever, J.D., Chaudhary, V.B., Gehring, C.A., Klironomos, J.N., Koide, R., Miller R.M., Moore, J y Moutoglis, P. 2006. From Lilliput to Brobdingnag: Extending models of mycorrhizal function across scales. *BioScience* 56: 889-900.
- Johnson, N.C. 2010. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist* 185: 631-647.
- Killham, K. y Prosser, J.I. 2007. The Prokaryotes. En: Paul, E.A. (Ed) Soil Microbiology, ecology and Biochemistry. Elsevier. pp 119-144.
- Laborde, F.C. 1996. Patrones de vuelo de aves frugívoras en relación a los árboles en pie en pastizales tropicales. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science* 3004: 1623–1627.
- Lambin, E., Helmut, J., Geist, J. y Lepers, E. 2003. Dynamics of Land-Use and Land-Cover Change in Tropical Regions. *Annual Review of Environment and Resources* 28: 205-241.
- Lima, A.S., Nóbrega, R.S., Barberi, A., da Silva, K., Ferreira, D.F y Moreira, F.M. 2008. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant Soil* 319: 127-145.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Stahl, D. 2015. Brock biology of microorganisms. 14ª Edición. Pearson. 1041 pp.

- Martínez, M. 2008. Grupos funcionales. En: Capital Natural de México, vol I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO. México. pp 365-412.
- Mas, J., Velázquez, A. y Couturier, S. 2009. La evaluación de los cambios de cobertura/uso de suelo en la República Mexicana. *Investigación Ambiental* 1 (1): 23-39.
- McConnell, J.S. y Hossner, L.R. 1985. pH-dependent adsorption isotherms of glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33 (6): 1075-1078.
- NIST. Instituto Nacional de Estándares y Tecnología. 2016. Espectros de masas. Datos de la Base de Datos de Referencia Estándar del NIST 69: Libro del Web de Química del NIST. Disponible en: <http://www.webbook.nist.gov/chemistry/>.
- O'Brian, K y Leichenko, R. 2005. IICA. 2005. Cambio ambiental global, globalización y seguridad alimentaria.
- Olsson, P.A., Baath, E., Jakobsen, I y Soderström, B. 1995. The use of phospholipid and neutral lipid fatty acids to estimate biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Micological Research* 99 (5): 623-629.
- Olsson, P.A. 1999. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *Microbiology Ecology* 29: 303-310.
- Olsson, A., Lenart, L., Bago, B., Wallander, H y Van Airle, I. 2003. Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 59 (1): 7-10.
- Opik, M., Vanatoa, A., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J.M., Reier, U. y Zobel, M. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* 188 (1): 223-241.
- Ormeño, E., Rosenblueth, M., Luyten, E., Vanderleyden, J. y Martínez, E. 2008. Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Environmental Microbiology* 10: 1271-1284.

- Ormeño, E., Rogel, M.A., Lloret, L., López, A., Martínez, J., Barois, I. y Martínez, E. 2011. Change in land use alters the diversity and composition of *Bradyrhizobium* communities and led to the introduction of *Rhizobium etli* into the tropical rain forest of Los Tuxtlas (Mexico). *Microbiology Ecology* 63: 822-834.
- Parker, M.A., 2004. rRNA and *dnaK* relationships of *Bradyrhizobium* sp. Nodule bacteria from four papilionoid legume trees in Costa Rica. *Systematic Applied Microbiology* 27: 334-342.
- Parker, M.A., 2008. Symbiotic relationships of legumes and nodule bacteria on Barro Colorado Island, Panama: a review. *Microbiology Ecology* 55: 662-672.
- Paul, E.A. y Clark, F.E. 1996. Soil microbiology and biochemistry. Academic, Nueva York.
- Pennington, T.D y Sarukhan, J. 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. México, D.F.
- Petersen, S y Klug, M. 1994. Effects of Sieving, Storage, and Incubation Temperature on the Phospholipid Fatty Acid Profile of a Soil Microbial Community. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (7): 2421-2430.
- Porter, W.M., Robson, A.D. y Abbott, L.K. 1987. Field survey of the distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil pH. *Journal of Applied Ecology* 24 (2): 659.
- Ramos, M.I. y Ribeiro, W.Q. 1993. Effect of fungicides on survival of *Rhizobium* on seeds and the nodulation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 152: 145-150.
- Rousk, J., Brookes, P., Bååth, E. 2009. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (6): 1589-1596.
- Rzedowsky, J. 1994. La vegetación de México. Limusa, Noriega (Eds). México D.F. p 159.

- Saia, S., Rappa, V., Ruisi, P., Abenavoli, M.R., Sunseri, F., Giambalvo, D., Frenda, A.S. y Martinelli, F. 2015. Soil inoculation with symbiotic microorganisms promotes plant growth and nutrient transporter genes expression in durum wheat. *Frontiers in Plant Science* 6: 1-10.
- Salles, J.F., van Elsas, J.D., van Veen, J.A. 2006. Effect of agricultural management regime on *Burkholderia* community structure in soil. *Microbial Ecology* 52 (2): 267-279.
- Sasser, M. 1990. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. MIDI. Technical Note 101.
- Schlesinger, W.H. 1997. Biogeochemistry (Vol. 8). Gulf Professional Publishing.
- SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2001. Cambio de uso de suelo. Disponible en: <http://tramites.semarnat.gob.mx/index.php/forestal-y-suelos/suelos>
- Simard, S.W., Beiler K.J., Bingham, M.A., Deslippe, L.J y Teste, F. 2012. Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews* 26: 39-60.
- Simons, N.K., Lewinsohn, T., Blüthgen, N., Buscot, F., Boch, S., Daniel, R., Gossner, M.M., Jung, K., Kaiser, K., Müller, J., Prati, D., Renner, S.C., Socher, S.A., Sonnemann, I., Weiner, C.N., Werner, M., Wubet, T., Wurst, S y Weisser, W.W. 2017. Contrasting effects of grassland management modes on species-abundance distributions of multiple groups. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 237: 143-153.
- Smith, S.E y Read, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3a Edición. Academic Press.
- Sotomayor-Ramírez D., Espinoza, Y y Acosta-Martínez, V. 2009. Landuse effects on microbial biomass C, β -glucosidase and β -glucosaminidase activities, and availability, storage, and age of organic C in soil. *Biology and Fertility of Soils* 45: 487-497.

- de Souza-Braz, A., Fernandez, A. y Alleoni, L. 2013. Soil attributes after the conversion from forest to pasture in Amazon. *Land degradation and Development* 24: 33-38.
- StatSoft, Inc. 2007. Statistica (data analysis software system), version 8. www.statsoft.com
- Stürmer, S.L y Siqueira, J.O. 2011. Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. *Mycorrhiza* 21: 255-267.
- Sylvia, D. (1992). Quantification of External Hyphae of Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi. En: Techniques for mycorrhizal research methods in Microbiology. Norris, J. R. (Ed.) Academic Press. Harcourt Brace y Company Publishers. London. pp. 9-17.
- Torrecillas, E., Alguacil, N.M. y Roldan, A. 2012. Host preferences of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing annual herbaceous plant species in semiarid Mediterranean prairies. *Applied Environmental Microbiology* 78 (17): 6180-6186.
- Tresender, K.K. 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorous, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytologist* 164: 347-355.
- Uibopuu, A., Moora, M., Saks, Ü., Daniell, T., Zobel, M. y Öpik, M. 2009. Differential effect of arbuscular mycorrhizal fungal communities from ecosystems along management gradient on the growth of forest understorey plant species. *Soil Biology Biochemistry* 41 (10): 2141-2146.
- Vanderkoornhuyse, P., Husband, R., Daniell, T.J., Watson, I.J., Duck, J.M., Fitter, A.H. y Young, J.P. 2002. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology* 11 (8): 1555-1564.
- van der Heijden, M., Bardgett, R.D y van Stralen, N.M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11: 296-310.
- van der Heyde, M., Ohsowski, B., Abbott, L.K y Hart, M. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungus responses to disturbance are context-dependent. *Mycorrhiza* 25: 1-10.

- Varela, L., Trejo, D. Álvarez-Sánchez, F.J., Barois, I., Amora-Lazcano, E., Guadarrama, P., Lara, L., Olivera, D., Sánchez-Gallen, I., Sangabriel, W. y Zulueta, R. 2009. Land use and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Mexican tropical ecosystems: preliminary results. En: Barois, I., Huising, E.J., Okoth, P., Trejo, D y de los Santos, M. (Eds.). *Below-Ground Biodiversity in Sierra Santa Marta, Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico*. Instituto de Ecología, A.C. pp. 99-112.
- Wardle, D.A. y Parkinson, D. 1990. Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. *Plant and Soil* 122 (1): 29-37.
- Weber, J.B. 1994. Properties and behavior of pesticides in soil. En: Honeycutt, R.C. y Schabacker, D.J. (Eds.) *Mechanism of pesticide movement into ground water*. Londres, Lewis. pp 29-39.
- Wright, S.F., Starr, J.L. y Paltineanu, I.C. 1999. Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. *Soil Science Society of America Journal* 63 (6): 1825.
- Zelles, L. 1997. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* 35: 275-294.
- Zimmermann, B., Papritz, A y Elsenbeer, H. 2010. Asymmetric response to disturbance and recovery: Changes of soil permeability under forest–pasture–forest transitions. *Geoderma* 159: 209–215.

ANEXO 1

Listado de compuestos químicos encontrados en los cultivos en la temporada de sequía

Velfosato®	Glifosato 41%	Agua y surfactante 59%
Humus líquido de lombriz con nutrimentos (Multiagro®)	Materia orgánica 45% Nitrógeno total 8.68% Ácidos húmicos y fúlvicos 17.80% Potasio asimilable (K ₂ O) 3.27% Fósforo asimilable (P ₂ O ₅) 2.5% Calcio 6600ppm Fitoreguladores naturales 600ppm	Magnesio 4500ppm Azufre 3100ppm Fierro 1500ppm Zinc 1500ppm Manganeso 1500ppm Cobre 80ppm Boro 100ppm Molibdeno 50ppm Cobalto 2ppm
Calcio y Boro en solución (Folicab®)	Calcio 14% Nitrógeno 14% Boro 5000ppm	Agentes quelantes 5% Extractos naturales 0.5% Diluyentes y acondicionadores 66%
Promotor de asimilación de nutrientes (Ktionic®)	Complejo orgánico fúlvico 25%	Diluyentes y acondicionadores 75%
Mejorador de suelos (Humusdita®)	Ácidos húmicos (derivados de leonardita) 12%	Diluyentes y coadyuvantes 88%

Regulador de crecimiento vegetal (Biozyme® TF)	Extractos de origen vegetal y fitohormonas biológicamente activas 78.87%	Microelementos 1.86% Diluyentes y acondicionadores 19.27%
Regulador de crecimiento tipo 1 (Ultra Vigofort®)	Citocininas 2081.9ppm	Otras fitohormonas 61.5ppm Vitaminas 947.95ppb
Nutriente foliar líquido (Fulvik® Plus)	Nitrógeno 3% Fósforo (P ₂ O ₅) 7%	Potasio (K ₂ O) 0.5% Inertes Hasta 100%
Fungicida agrícola (Fitosick®)	Triadimefón 25%	Diluyente, humectante, dispersante, adherente, antiespumante y acondicionador de fluidez 75%
Fungicida con AgCelence (Legasus®)	Pyraclostrobin 5% Metiram 55%	Portador, dispersante, humectante y antiespumante 40%
Fungicida (Previcur Energy®)	Propamocarb 47.2%	Fosetil 27.6% Agua 25.2%

ANEXO 2

Técnica de liofilización

Procedimiento

1. Antes de utilizar la liofilizadora esta se debe drenar, con el objetivo de eliminar los residuos de agua de usos anteriores.
2. Se enciende la liofilizadora y se presiona el botón del modo Manual.
3. Antes de colocar las muestras a liofilizar el aparato debe alcanzar una temperatura de -47°C , con el objetivo de que la congelación del material sea inmediata
4. Las muestras a liofilizar (suelo en este caso), que se han mantenido en congelación (-20°C), se introducen en la liofilizadora en frascos individuales, con contratapas de aluminio para evitar la expulsión del material.
5. Cerrar la liofilizadora y asegurarse que la tapa y la cápsula queden perfectamente selladas.
6. Encender el botón de vacío.
7. Esperar 48 h. Durante este periodo se realizará el proceso de deshidratación en frío de las muestras.

ANEXO 3

Extracción de ácidos grasos (Sasser, 1990)

Procedimiento

1. Saponificación

Durante esta etapa, se produce la lisis de las células. Los ácidos grasos son separados de los lípidos celulares y convertidos en sus correspondientes sales de sodio.

- Pesar 1.0 g del suelo liofilizado y transferirlo a un tubo de ensaye de 15 ml. Nota: todo el material utilizado debe de estar completamente limpios (lavados con detergente libre de fosfatos y posteriormente sumergidos en ácido clorhídrico al 10%) y esterilizado (horno a 400 °C durante 3 horas o en la autoclave a 160 °C durante 20 min). Revisar los tubos para descartar aquellos que tengan muescas o fracturas.
- Agregar 2.0 +/- 0.1 ml del Reactivo 1 (base metabólica compuesta por 45 g NaOH, 150 ml de metanol y 150ml de agua destilada desionizada) a cada tubo.
- Cerrar cada tubo con un forro de teflón dentro del tapón de rosca.
- Agitar en el vórtex cada tubo por 5-10 segundos a máxima velocidad.
- Colocar los tubos en baño maría 100 °C. Nota: precalentar los baños una hora antes.
- Después de 5 minutos sacar los tubos del baño maría y enfriarlos ligeramente (en agua con hielos). Checar posibles fugas, y en caso de existir cambiar el tapón o ponerle otra tapa.
- Agitar cada tubo en vórtex y volver a ponerlos en baño maría por 25 minutos más.
- Después de un total de 30 minutos de saponificación en el baño maría, sacar los tubos y colocarlos en agua fría.

2. Metilación

En el proceso de metilación las sales sódicas de los ácidos grasos se convierten en ésteres metílicos para incrementar la volatilidad de los ácidos grasos para el análisis por cromatografía de gases.

- Después de enfriar los tubos, destaparlos y agregar 4 ml +/- 0.1ml del Reactivo 2 (reactivo de metilación 325 ml de 6N HCL en 275 ml de metanol).
- Cerrar cada tubo y agitar en el vórtex de 5 a 10 segundos.
- Calentar en baño maría los tubos a 80°C por 10 minutos. Nota: cuidar que sean exactamente 10 minutos.
- Sacar del baño maría y enfriar en agua fría rápidamente.

3. Extracción

En la extracción los ésteres metílicos se transfieren de la fase acuosa acídica a la fase orgánica con la técnica de extracción líquida-líquida.

- Destapar cada tubo y agregar 2.5 ml del Reactivo 3 (1:1 v/v hexano: éter metil terbutílico).
- Agregar a cada tubo 1 µl de 19:0 como estándar interno (concentración final 0.25 µg/µl).
- Cerrar los tubos y agitar en el vórtex evitando que se sedimenten.
- Rotar los tubos durante 10 minutos.
- Centrifugar los tubos por 5 minutos a 2000 RPM. Nota: en caso de obtener poco sobrenadante re-centrifugar a 3000 RPM.
- Destapar cada tubo. Usando una pipeta Pasteur para cada muestra, remover el sobrenadante a un tubo nuevo. Nota: cuidar de no tocar el precipitado con la punta de la pipeta.

4. Lavado básico

En esta etapa se eliminan los ácidos grasos libres y los agentes residuales.

- Agregar a cada tubo 6 ml del Reactivo 4 (Solución básica de NaOH -10.8g- diluido en agua destilada desionizada -900ml-).
- Cerrar cada tubo y rotarlos por 5 minutos.
- Centrifugar los tubos por 3 minutos a 2000 RPM. Nota: en caso de re-suspensión de las fases re-centrifugar a 3000 RPM.
- Usando una pipeta Pasteur para cada muestra, remover el sobrenadante y colocarlo en frascos GC viales. Nota: mantener los tubos completamente verticales durante esta fase y evitar tocar el precipitado con la punta de la pipeta.
- Evaporar el hexano durante toda la noche en la campana. Nota: también se pueden evaporar bajo nitrógeno.
- Agregar a frascos nuevos GC viales 200 µl de hexano.
- La muestra ahora está lista para el cromatógrafo de gases.

Preparación de reactivos

Reactivo 1

NaOH monohidratado 45 g
Metanol (Grado HPLC) 150 ml
H₂O (Esterilizada) 150 ml

Reactivo 2

6.00 N HCL 325 ml
Metanol (Grado HPLC) 375 ml
Adicionar el ácido para mezclar con el metanol

Reactivo 3

Hexano (Grado HPLC) 200 ml
Metil-terbutil éter (Grado HPLC) 200 ml
Adicionar Metil-terbutil éter para mezclar con el hexano

Reactivo 4

NaOH 10.8 g
H₂O (Esterilizada) 900 ml

Estándar 19:0 (concentrado 0.25 µg/ µl)

Disolver 0.0250 g de ácido nonadecanoico metil éster (FA 19:0) en 10 ml de hexano= Estándar B.

Concentración Estándar B: 0.25 µg/ µl* 1000 µl) /10000 µl de hexano.

NOTA: Las cantidades indicadas por cada reactivo son para preparar a 1L. Asimismo al momento de ser utilizados se requiere de frascos de vidrio con capacidad aproximada de 500 ml, verificando que las tapas de estos tengan teflón. Estos se utilizarán al momento para verter solo las cantidades requeridas en la técnica de tal forma que no se lleguen a contaminar los recipientes en donde se prepararon anteriormente.

ANEXO 4

Método de cromatografía

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 5973 acoplado a un detector de masas. La columna capilar fue HP-ultra 2 (25m m x 0.2 mm x 0.33 μ m), utilizando como gas acarreador helio (He) con flujo constante. La temperatura del inyector fue de 250°C y la del detector de masas de 300°C. Se inyecta 1 μ L de muestra. El programa de la temperatura fue el siguiente: la temperatura inicial es de 140°C que aumenta a 260°C a una tasa de 5°C por minuto, y un segundo incremento a 310°C con una tasa de 40°C por minuto. Se utilizó el ácido graso 19:0 (Ácido nonadecanoico metil éster) como estándar interno.

Espectros de masas de los ácidos grasos

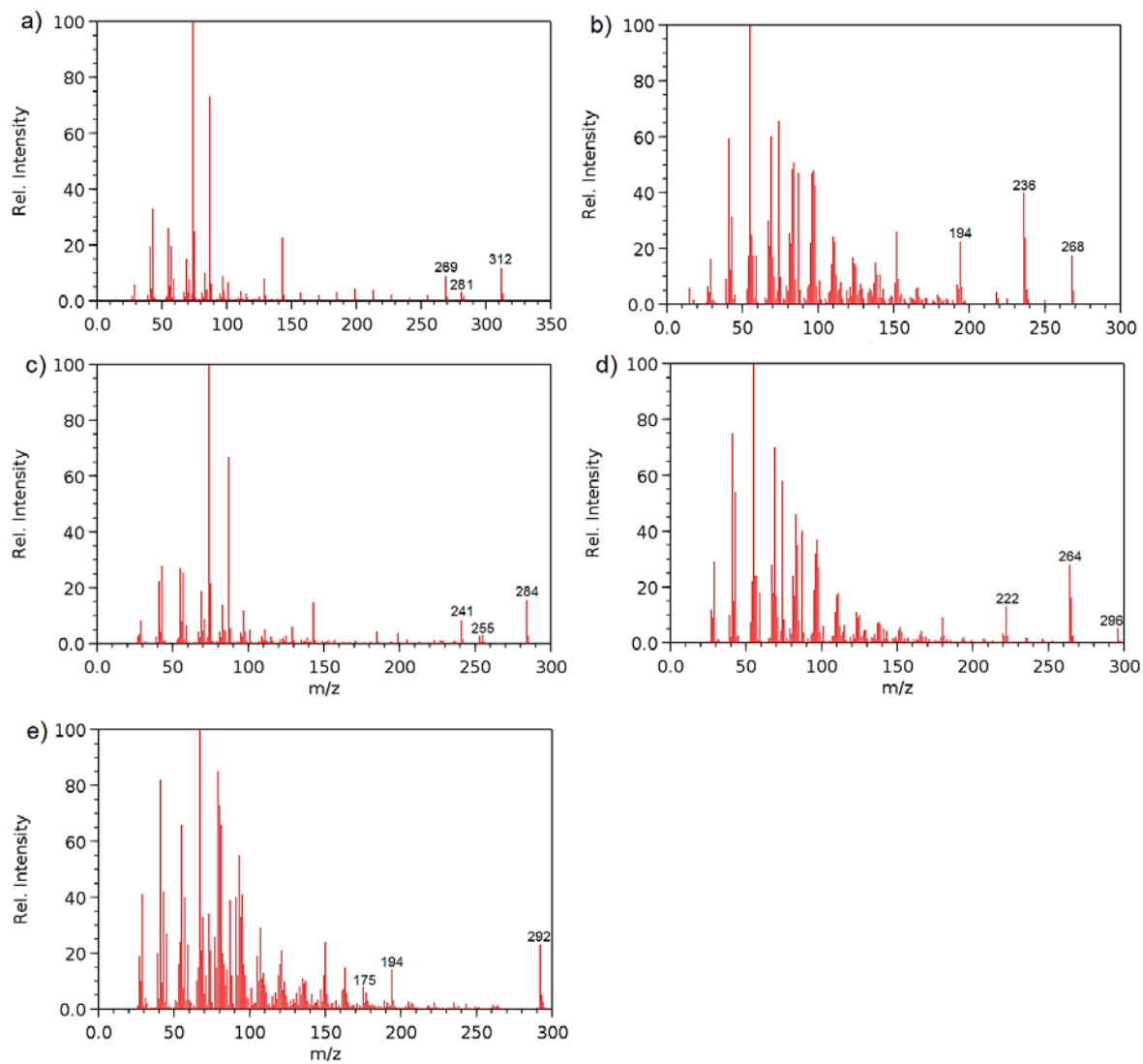


Figura 22. a) Ácido nonadecanoico metil éster (19:0), b) 11-ácido hexadecenoico metil éster (16:1 ω 5), c) 14-ácido hexadecenoico metil éster (i17:0), d) 11-ácido octadecenoico metil éster (18:1 ω 7), e) 6,9,12-ácido octadecatrienoico metil éster (18:2 ω 6,9).

Ejemplos de cromatogramas

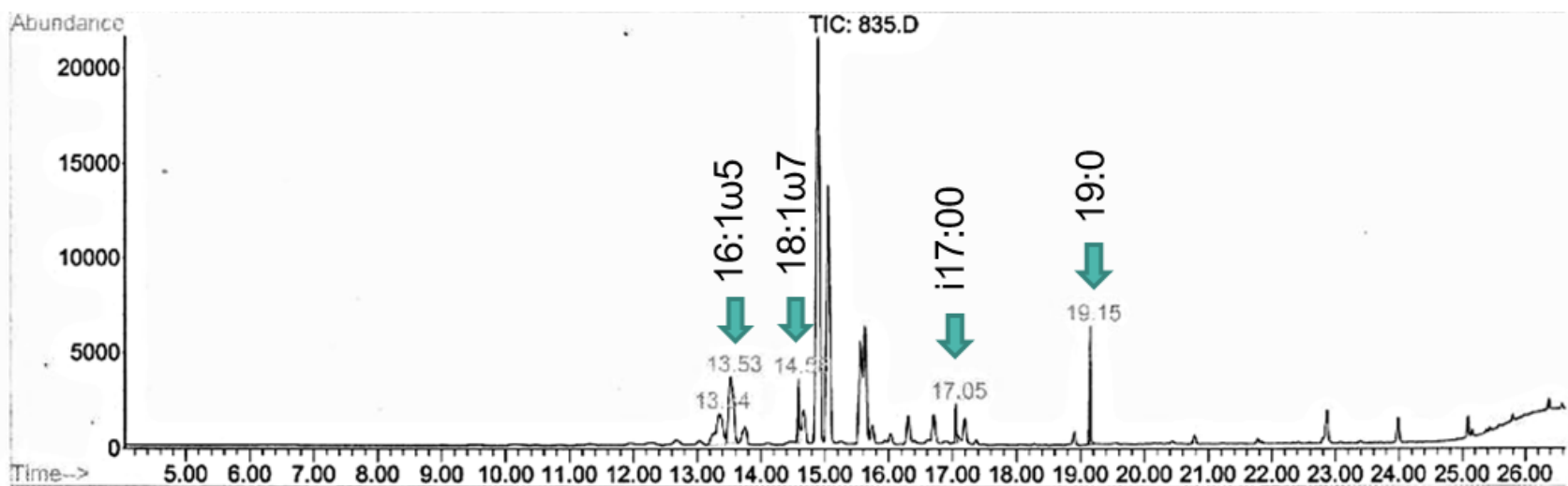


Figura 23. Cromatograma de la muestra de Acahual 1. El eje X representa el tiempo y el eje Y la abundancia relativa de cada compuesto para esta muestra. Con las flechas se señalan los ácidos grasos correspondientes para cada grupo de microbiota: 16:1 ω 5 (HMA), 18:1 ω 7 (Gram⁻), i17:00 (Gram⁺) y 19:0 para el estándar interno.

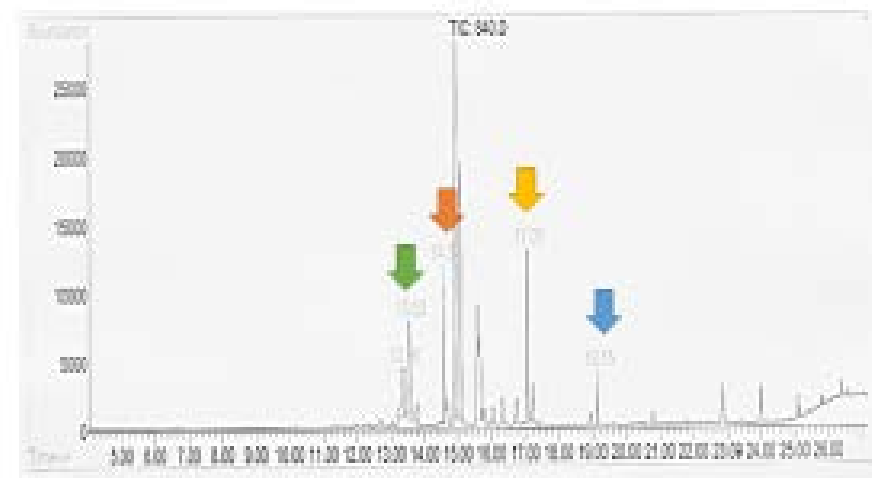
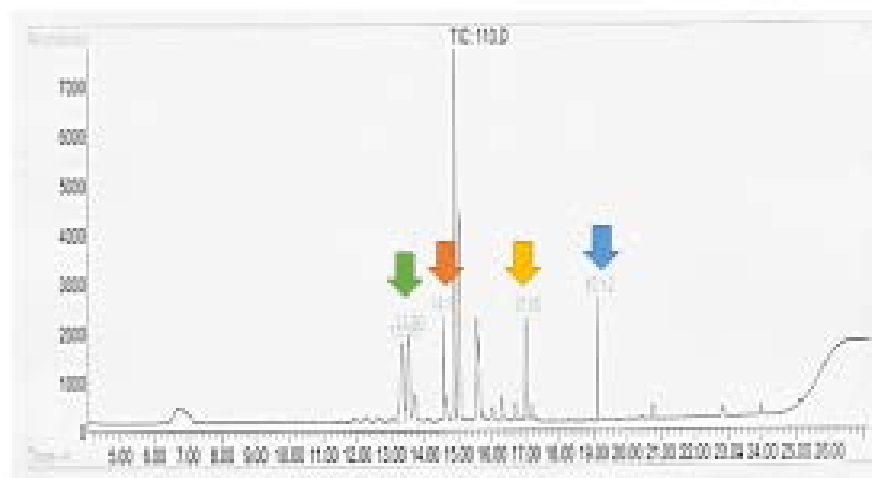
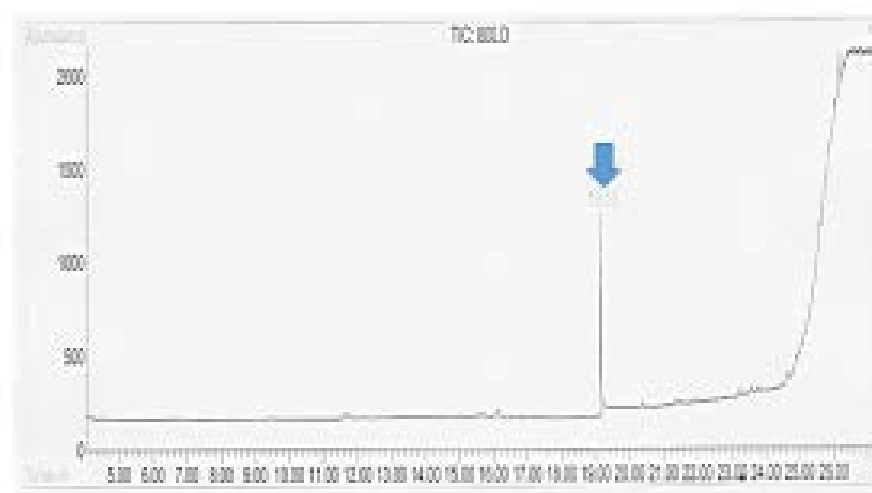
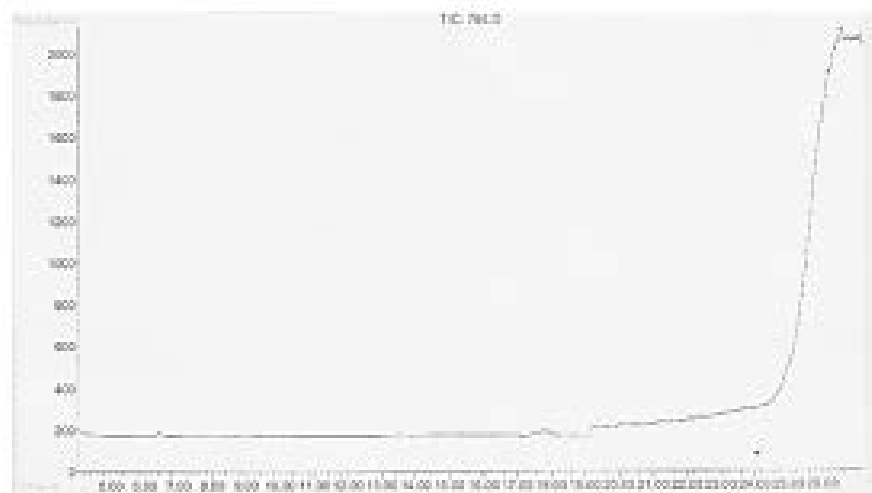


Figura 24. Ejemplos de cromatogramas. a) Blanco de hexano, b) Estándar interno 19:0, c) Muestra de cultivo 18, y d) Muestra de potrero 7. Las flechas señalan los ácidos grasos de la microbiota: Verde=HMA, Naranja=Gram⁻, Amarillo=Gram⁺ y Azul=Estándar interno.

Concentración de ácidos grasos

Tabla 10. Concentración de ácidos grasos (nmoles g⁻¹) para cada réplica por uso de suelo (UDS). S: selva, A: acahual, P: pastizal, C: cultivo.

UDS	HMA	Gram ⁺	Gram ⁻	UDS	HMA	Gram ⁺	Gram ⁻
S11	0.042	0.0049	0.0050	P11	0.158	0.0097	0.0045
S12	0.127	0.0468	0.0105	P12	0.104	0.0073	0.0029
S13	0.084	0.0358	0.0555	P13	0.131	0.0031	0.0031
S21	0.015	0.0021	0.0019	P21	0.150	0.0093	0.0031
S22	0.038	0.0038	0.0031	P22	0.163	0.0077	0.0028
S23	0.010	0.0012	0.0010	P23	0.147	0.0205	0.0046
S31	0.134	0.0511	0.1156	P31	0.121	0.0039	0.0008
S32	0.187	0.0124	0.0188	P32	0.122	0.0046	0.0026
S33	0.081	0.0076	0.0077	P33	0.151	0.0134	0.0041
S41	0.290	0.0153	0.0159	P41	0.345	0.0102	0.0035
S42	0.149	0.0521	0.0233	P42	0.300	0.0116	0.0023
S43	0.219	0.0346	0.0042	P43	0.444	0.0252	0.0042
S51	0.039	0.0445	0.0117	P51	0.167	0.0046	0.0028
S52	0.032	0.0155	0.0030	P52	0.101	0.0043	0.0047
S53	0.046	0.0178	0.0069	P53	0.233	0.0071	0.0019
A12	0.033	0.0011	0.0003	C11	0.070	0.0095	0.0035
A12	0.035	0.0017	0.0040	C12	0.055	0.0067	0.0045
A13	0.032	0.0023	0.0042	C13	0.040	0.0032	0.0045
A21	0.024	0.0169	0.0129	C21	0.047	0.0058	0.0021
A22	0.016	0.0068	0.0028	C22	0.068	0.0074	0.0032
A23	0.032	0.0062	0.0038	C23	0.057	0.0154	0.0043
A31	0.200	0.0083	0.0057	C31	0.032	0.0041	0.0029
A32	0.256	0.0128	0.0071	C32	0.029	0.0023	0.0028
A33	0.228	0.0033	0.0028	C33	0.030	0.0033	0.0024
A41	0.189	0.0108	0.0154	C41	0.024	0.0017	0.0029
A42	0.149	0.0026	0.0033	C42	0.018	0.0014	0.0017
A43	0.110	0.0070	0.0099	C43	0.021	0.0004	0.0006
A51	0.131	0.0089	0.0040	C51	0.007	0.0010	0.0022
A52	0.140	0.0118	0.0041	C52	0.005	0.0005	0.0005
A53	0.123	0.0132	0.0060	C53	0.008	0.0024	0.0009