



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN ECOLOGÍA

Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad
Morelia

Relación entre la diversidad bacteriana
cultivable y los ciclos biogeoquímicos del suelo
en el Bosque Mesófilo de Montaña de Santiago
Comaltepec, Oaxaca.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN ECOLOGÍA

P R E S E N T A

GLORIA NOHELY ÁLVAREZ LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. YUNUEN TAPIA TORRES
CODIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA VÉLEZ AGUILAR

MORELIA, MICHOACÁN, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN ECOLOGÍA

Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad
Morelia

Relación entre la diversidad bacteriana
cultivable y los ciclos biogeoquímicos del suelo
en el Bosque Mesófilo de Montaña de Santiago
Comaltepec, Oaxaca.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN ECOLOGÍA

P R E S E N T A

GLORIA NOHELY ÁLVAREZ LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. YUNUEN TAPIA TORRES
CODIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA VÉLEZ AGUILAR

MORELIA, MICHOACÁN, 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA
SECRETARÍA GENERAL
SERVICIOS ESCOLARES

MTRA. IVONNE RAMÍREZ WENCE
DIRECTORA
DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la **sesión ordinaria 11** del **H. Consejo Técnico** de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad Morelia celebrada el día **02 de diciembre del 2020**, acordó poner a su consideración el siguiente jurado para la presentación del Trabajo Profesional del alumno (a) **Gloria Nohely Álvarez López** adscrita a la Licenciatura en Ecología con número de cuenta **312317995**, quien presenta la tesis titulada: "Relación entre la diversidad bacteriana cultivable y los ciclos biogeoquímicos del suelo en el Bosque Mesófilo de Montaña de Santiago - Comaltepec, Oaxaca", bajo la dirección como **tutora** a la Dra. Yunuen Tapia Torres y como **co-tutora** a la Dra. Patricia Vélez Aguilar.

El jurado queda integrado de la siguiente manera:

Presidente:	Dra. Laura Espinosa Asuar
Vocal:	Dr. Jorge Valdívila Anistro
Secretario:	Dra. Yunuen Tapia Torres
Suplente 1:	Dr. Luis Eduardo Servín Garcidueñas
Suplente 2:	Dr. Jaime Gasca Pineda

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Morelia, Michoacán a 17 de mayo del 2021.

DRA. YESENIA ARREDONDO LEÓN
SECRETARIA GENERAL

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos Institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia

A la Licenciatura en Ecología impartida en la ENES Morelia, UNAM

A la Dra. Yunuen Tapia Torres y la Dra. Patricia Vélez Aguilar por guiarme a lo largo de este proyecto con paciencia y dedicación.

A mis sinodales: Dra. Laura Espinosa Asuar, Dr. Jorge Valdivia Anistro, Dra. Yunuen Tapia Torres, Dr. Luis Eduardo Servín Garcidueñas y Dr. Jaime Gasca Pineda. por los aportes que contribuyeron a la mejora de esta tesis.

A los proyectos “PAPIIT-UNAM-DGAPA (IA206219) Uso sostenible de los fertilizantes fosfatados como mecanismo para el mantenimiento a largo plazo de la fertilidad de suelos; y (IA201319) Patrones de diversidad de los hongos microscópicos que habitan en ecosistemas amenazados de México: bosques de niebla”, por el financiamiento otorgado para esta tesis.

A los siguientes laboratorios por el préstamo de equipo y material:

- Laboratorio de Ecología Molecular de Micromicetes en Ecosistemas Amenazados, IB, UNAM.
- Laboratorio de Microbiómica, ENES Morelia, UNAM.
- Laboratorio de Biogeoquímica de suelos, IIES, UNAM.
- Laboratorio de Sistemática Molecular Botánica, IB, UNAM.
- Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y Salud, IB, UNAM.

Agradecimientos Personales

A mis compañeros de licenciatura: Ori, Ale, Elihú, Bruno, Rodrigo, Daniel y Sergio por su empatía, cariño, comprensión, respeto, amabilidad, tolerancia y diversión, en ese mismo orden. Los recordaré por siempre.

A los compañeros que conocí en los distintos laboratorios y que contribuyeron a esta tesis:

- Emily, Caro, Andrés, Vianey, Ale y Jess, gracias por resolver mis dudas siempre y procurar que mis técnicas de trabajo mejorarán día con día.
- Alberto Morón, Pamela Chávez y Cinthya Leocadio, les agradezco especialmente a ustedes por la gran ayuda que me ofrecieron durante gran parte del proceso para esta tesis.

Dedicatoria a mi hija Canaán Pamela Otáñez Álvarez:

Iniciamos juntas esta gran historia, la cual lleva por título “Licenciatura en Ecología”. Éramos dos frente a quienes me entrevistaban en aquel momento, yo en una silla y tú en mi vientre, escribimos esa primera frase dentro de la hoja en blanco: ¡Hola, mi nombre es Nohely Álvarez!

Agradezco infinitamente tu apoyo y comprensión. No importaba el momento, siempre tuviste en ti el acto perfecto para mi consuelo e inspiración.

GRACIAS

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
1. Resumen.....	iv
2. Abstract.....	v
3. Introducción.....	1
3.1. Participación de las comunidades bacterianas edáficas en el ciclaje de nutrientes.....	1
3.2. Ciclaje de nutrientes en el suelo del Bosque Mesófilo de Montaña.....	2
4. Antecedentes.....	3
4.1. Estequiometría de nutrientes.....	3
4.2. Estrategias bacterianas para la obtención de nutrientes.....	5
4.2.1. Obtención potencial de energía en forma de C en el Bosque Mesófilo de Montaña.....	6
4.2.2. Obtención potencial de P en el Bosque Mesófilo de Montaña.....	7
4.2.3. Obtención potencial de N en el Bosque Mesófilo de Montaña.....	9
4.3. Características biogeoquímicas del suelo y su relación con la diversidad bacteriana edáfica.....	9
5. Pregunta de investigación.....	11
6. Hipótesis.....	11
7. Objetivo general.....	11
8. Objetivos específicos.....	11
9. Materiales y métodos.....	12
9.1. Sitio de estudio.....	12
9.2. Diseño de muestreo.....	13
9.3. Análisis microbiológicos.....	14
9.3.1. Aislamiento de la diversidad bacteriana.....	14
9.3.2. Conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC).....	16
9.3.4. Aislamiento y purificación de los morfotipos bacterianos seleccionados.....	16
9.3.5. Preservación ex situ de las cepas bacterianas aisladas.....	17
9.3.6. Extracción de ADN genómico de las cepas bacterianas aisladas del suelo.....	17
9.3.7. Técnica de PRC en gradiente de temperatura y de magnesio (Mg).....	18
9.3.8. Identificación taxonómica de especies bacterianas potenciales.....	21
9.4. Análisis biogeoquímicos del suelo.....	21

9.4.1. <i>Determinación del pH del suelo</i>	21
9.4.2. <i>Análisis de la actividad enzimática del suelo</i>	22
9.4.3. <i>Cuantificación de nutrientes</i>	24
9.4.3.1. <i>Cuantificación de C, N y P totales</i>	24
9.4.3.2. <i>Cuantificación de C, N y P disueltos</i>	25
9.4.3.3. <i>Cuantificación de C, N y P en biomasa microbiana</i>	25
10. <i>Análisis de resultados</i>	27
11. <i>Resultados</i>	28
11.1. <i>Diversidad cultivable obtenida y especies bacterianas cultivables más ampliamente distribuidas</i>	28
11.1.2. <i>Diversidad bacteriana α y β entre los sitios de muestreo</i>	29
11.2. <i>Características biogeoquímicas y actividad enzimática del suelo</i>	30
11.2.1. <i>Actividad enzimática bacteriana del suelo de BMM</i>	30
11.2.2. <i>Nutrientes en el suelo y en biomasa microbiana</i>	31
11.3. <i>Estequiometría de nutrientes</i>	32
11.4. <i>Relación entre las variables biogeoquímicas del suelo, actividad enzimática y diversidad bacteriana obtenida</i>	33
11.4.1. <i>Relación entre actividad enzimática del suelo y la distribución de las bacterias cultivables obtenidas</i>	33
11.4.2. <i>Relación entre las características biogeoquímicas del suelo y la distribución de las bacterias cultivables obtenidas</i>	35
12. <i>Discusión</i>	36
12.1 <i>Diversidad α y β cultivable</i>	36
12.2. <i>Dinámica hipotética de nutrientes</i>	38
12.3. <i>Relación entre los nutrientes del suelo y la diversidad bacteriana cultivable obtenida</i>	41
13. <i>Conclusiones</i>	42
14. <i>Perspectivas</i>	42
15. <i>Referencias</i>	43
ANEXO I.....	44
ANEXO II.....	44
ANEXO III.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estequiometría de nutrientes en sistemas de BMM y ecosistemas forestales de todo el mundo..	5
Tabla 2. Compuestos utilizados para la preparación de medio de cultivo LB.....	15
Tabla 3. Condiciones de PCR para diferentes concentraciones de Mg.....	19
Tabla 4. Combinaciones realizadas para la técnica de PCR en gradiente.....	20
Tabla 5. Enzimas cuantificadas.....	22
Tabla 6. Unidades Formadoras de Colonias por medio de cultivo y sitio de muestreo.....	28
Tabla 7. Asignaciones taxonómicas.....	28
Tabla 8. Media y desviación estándar (\pm sd) de la actividad enzimática del suelo para cada sitio de muestreo.....	30
Tabla 9. Media y desviación estándar (\pm sd) de la concentración de nutrientes para cada sitio de muestreo.....	31
Tabla 10. Media y desviación estándar (\pm sd) de los cocientes estequiométricos de nutrientes en el suelo y la biomasa microbiana para cada sitio de muestreo.....	32
Tabla 11. Matriz de correlación (Spearman) entre las variables biogeoquímicas del suelo y la actividad enzimática. En negritas se resaltan las correlaciones significativas.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitio de estudio y tipos de suelo (modificado de H. Ayuntamiento de Santiago Comaltepec; Ixtlán, Oaxaca, 2011).....	13
Figura 2. Diseño de muestro para la colecta de suelo. Los puntos en negro indican los sitios donde se tomaron muestras abarcando los primeros 5.0 cm de suelo con tubos de 50 mL. Los puntos grises indican a los sitios donde fueron tomadas las muestras con nucleador.....	14
Figura 3. Aislamiento y purificación de los morfotipos seleccionados. a) Aislados mediante la técnica de estriado por duplicado y b) colonia bacteriana a los tres días de crecimiento.....	16
Figura 4. Cepario bacteriano en glicerol al 70%.....	17
Figura 5. Programa del termociclador para el gradiente de temperatura. En la temperatura de alineación se muestran las tres temperaturas puestas a prueba.....	20
Figura 6. Dendograma resultante de la diversidad β . Los puntos en verde corresponden al sitio de muestreo 1, los puntos en azul señalan al sitio dos y los puntos en naranja al sitio de muestreo 3.....	30
Figura 7. Análisis de correspondencia canónica entre la actividad enzimática del suelo y la diversidad de bacterias cultivables.....	34
Figura 8. Análisis de Correlación Canónica entre las variables biogeoquímicas del suelo y la diversidad de bacterias cultivables.....	35
Figura 9. Dinámica hipotética de nutrientes en el Bosque Mesófilo de Montaña.....	39
ANEXO III. Tablas y figuras.....	39

1. Resumen

Las bacterias son microorganismos importantes en los ciclos biogeoquímicos del suelo, manteniendo su fertilidad, y desempeñando un rol ecológico irremplazable en el funcionamiento de los ecosistemas. Por ejemplo, especies fotosintéticas como las cianobacterias participan en el ciclo del C; *Pseudomonas* lo hace en la nitrificación y desnitrificación del N, y los *Bacillus* poseen la capacidad de solubilizar y mineralizar el P. En conjunto, estos procesos aumentan la probabilidad de que los nutrientes del suelo sean absorbidos por las plantas y otros organismos. Debido a lo anterior, las bacterias podrían ser consideradas como microorganismos clave en el Bosque Mesófilo de Montaña. Este ecosistema es considerado como el sistema más amenazado de México, ya que enfrenta diversos disturbios de origen antrópico, tales como la fragmentación y el cambio de uso de suelo, que tiende a alterar el almacenamiento y disponibilidad de nutrientes, resultando en una pérdida irreversible de diversidad funcional bacteriana y sus procesos ecosistémicos asociados. El objetivo de este proyecto fue: aislar e identificar la diversidad bacteriana cultivable del Bosque Mesófilo de Montaña en Santiago Comaltepec, Oaxaca, inferir su participación en los ciclos biogeoquímicos del suelo y crear un cepario con los recursos genéticos obtenidos para su preservación *ex situ*. Teniendo como hipótesis que la actividad enzimática se acentúa en aquellas enzimas útiles para la obtención del nutriente limitante en el sistema, junto con la presencia de los grupos bacterianos con la capacidad de sintetizarlas. Se llevó a cabo el aislamiento e identificación de la diversidad bacteriana cultivable, se analizaron los cocientes estequiométricos C: N: P, C: N, C: P y N: P, y se cuantificó la actividad de cinco enzimas (β -glucosidasa, cellobiohidrolasa, glucosaminidasa, fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa). También se evaluaron características biogeoquímicas del suelo como nutrientes disueltos, incorporados en biomasa microbiana y totales, así como el pH. De acuerdo con los resultados obtenidos, los cocientes en biomasa son menores a los disueltos y los totales. La relación de C: P en nutrientes disueltos, microbianos y totales fue mayor, en comparación con la relación C: N de los tres almacenes de nutrientes medidos, los géneros bacterianos con mayor registro fueron *Bacillus* y *Pseudomonas*, y la actividad enzimática más alta fue de la fosfomonoesterasa. Estos resultados confirman la hipótesis propuesta en el presente trabajo, ya que, el mayor registro los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* cuentan con la capacidad de sintetizar a la enzima fosfomonoesterasa, mayormente cuantificada, y ello podría estar asociado a la obtención del P, sugerido como nutriente limitante, de acuerdo con las relaciones estequiométricas obtenidas en este sistema.

2. Abstract

Bacteria are important microorganisms in the biogeochemical cycles of the soil, maintaining its fertility, and playing an irreplaceable ecological role in the functioning of ecosystems. For example, photosynthetic species such as cyanobacteria participate in the C cycle; *Pseudomonas* does it in nitrification and denitrification of N, and *Bacillus* can solubilize and mineralize P. Together, these processes increase the probability that soil nutrients are absorbed by plants and other organisms. Due to the above, bacteria could be considered as key microorganisms in the Mountain Mesophilic Forest. This ecosystem is considered the most threatened system in Mexico, as it faces various disturbances of anthropic origin, such as fragmentation and changes in land use, which tend to alter the storage and availability of nutrients, resulting in an irreversible loss of Bacterial functional diversity and its associated ecosystem processes. The objective of this project was: to isolate and identify the cultivable bacterial diversity of the Mountain Mesophilic Forest in Santiago Comaltepec, Oaxaca, infer its participation in the soil biogeochemical cycles and create a stock with the genetic resources obtained for its ex-situ preservation. With the hypothesis that the enzymatic activity is accentuated in those enzymes useful for obtaining the limiting nutrient in the system, together with the presence of bacterial groups with the ability to synthesize them. The isolation and identification of the cultivable bacterial diversity was carried out, the stoichiometric ratios C: N: P, C: N, C: P and N: P were analyzed, and the activity of five enzymes (β -glucosidase, cellobiohydrolase, glucosaminidase, phosphomonoesterase and phosphodiesterase). Soil biogeochemical characteristics such as dissolved nutrients, incorporated in microbial and total biomass, as well as pH, were also evaluated. According to the results obtained, the biomass ratios are lower than the dissolved ones and the total ones. The C: P ratio in dissolved, microbial, and total nutrients was higher, compared to the C: N ratio of the three nutrient stores measured, the bacterial genera with the highest record were *Bacillus* and *Pseudomonas*, and the highest enzymatic activity was of phosphomonoesterase. These results confirm the hypothesis proposed in the present work, since the greater record of *Bacillus* and *Pseudomonas*, which are bacterial genera with the ability to synthesize the enzyme phosphomonoesterase, mostly quantified, could be associated with obtaining P, suggested as limiting nutrient, according to the stoichiometric relationships obtained in this system.

3. Introducción

3.1. Participación de las comunidades bacterianas edáficas en el ciclaje de nutrientes

Aunque diferentes formas de vida participan en los procesos de descomposición de la materia orgánica que llega al suelo (Madsen, 2011), las comunidades bacterianas destacan por llevar a cabo funciones clave, mediante el uso eficiente de una gran diversidad de capacidades bioquímicas. Estas funciones clave influyen en procesos indispensables para el buen funcionamiento de los ecosistemas (Falkowski *et al.*, 2008), como son la dinámica de nutrientes y los ciclos biogeoquímicos (Schimel & Bennett, 2004; Bardgett *et al.*, 2008; Wall *et al.*, 2012).

Dentro de la gran diversidad de mecanismos que llevan a cabo las bacterias edáficas, se encuentra la capacidad de fijar nitrógeno (N) atmosférico (N_2) y la liberación de amonio (NH_4^+), que es N inorgánico disponible para sí mismas y otros organismos como las plantas (Vitousek *et al.*, 2002). Además, pueden llegar a sintetizar ácidos orgánicos que permiten liberar iones fosfato (PO_4^{3-}) a partir de una fuente de fósforo inorgánica (Pi) estable, obteniendo así fósforo (P) mediante el mecanismo de solubilización (Coyne, 1999).

Las bacterias, son capaces también de hidrolizar y mineralizar residuos orgánicos, mediante la biosíntesis de enzimas que son secretadas al medio llamadas exoenzimas. Estas exoenzimas participan en la liberación de iones PO_4^{3-} y NH_4^+ a la solución del suelo, de donde además de las bacterias, otros organismos pueden tomar dichos nutrientes mediante el mecanismo de inmovilización en biomasa (Soares, 2006; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013).

Pseudomonas aeruginosa y *Burkholderia* sp. son bacterias edáficas que tienen la capacidad de biosintetizar exoenzimas para obtener nutrientes de los lípidos contenidos en las paredes celulares de las plantas y los microorganismos. Por otro lado, bacterias como *Escherichia coli*, *Serratia marscens*, *Bacillus* y *Pseudomonas* aprovechan el almidón degradándolo con enzimas amilasas para obtener la glucosa. La degradación de hemicelulosa y pectina se logran llevarla a cabo bacterias pectinolíticas como *Erwinia* sp., *Pseudomonas*, *Arthrobacter* y *Bacillus*. La celulosa presente en la pared celular de plantas puede ser degradada mediante celulasas producidas por bacterias como *Actinobacterias*, *Cellovibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acetobacter*, *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Ruminococcus* y *Fibrobacter*. Incluso existen bacterias edáficas como *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Clostridium* con la capacidad de degradar quitina (Horwath, 2017).

Algunas de las exoenzimas reportadas para la obtención de P son las fitasas, que han sido detectadas en bacterias como *Bacillus* y *Enterobacter* sp, y las fosfatasa producidas por *Bacillus subtilis*,

Nostoc sp., *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti* y *Corynebacterium glutamicum* (Idriss *et al.*, 2002).

En la mayoría de los suelos la biomasa microbiana, de la cual forman parte las bacterias edáficas, abarca aproximadamente el 5.0 y 1.0% del C y N total contenido en ellos, respectivamente (Smith *et al.*, 1990). Pues se calcula que un gramo de suelo puede contener más de $\sim 10^9$ bacterias metabólicamente activas en los primeros diez cm de profundidad en ecosistemas terrestres sin perturbación (Horwath, 2017). Esta diversidad bacteriana se encuentra interactuando dentro de una compleja matriz de minerales y materia orgánica (Paul & Clark, 1996).

A pesar de que menos del 1.0% de la diversidad bacteriana puede ser aislada en medios de cultivo (Ellis *et al.*, 2003), los repositorios biológicos son útiles e importantes para la conservación y exploración de recursos genéticos microbianos que pueden ser utilizados en estudios posteriores (Murray *et al.*, 2009). Por ejemplo, mediante estudios dependientes de cultivo se ha logrado llevar a cabo el aislamiento de las cepas anteriormente mencionadas, así como su preservación en colecciones de cultivos (Idriss *et al.*, 2002; Horwath, 2017).

3.2. Ciclaje de nutrientes en el suelo del Bosque Mesófilo de Montaña

Los suelos representan al mayor almacén de nutrientes orgánicos en los ecosistemas terrestres, debido a que pueden llegar a contener tres veces más C, N y P que la vegetación (Paul & Clark, 1989; Schlesinger, 1990). Su contenido de nutrientes se incrementa principalmente en el P, ya que este nutriente no se encuentra de forma libre en la atmósfera terrestre, y su principal almacén son los minerales primarios de la corteza terrestre, donde solo existe el 0.13% de P disponible para las distintas formas de vida (Post *et al.*, 1982; Jobbágy & Jackson, 2000; Schlesinger, 2000).

El suelo del Bosque Mesófilo de Montaña (BMM) de Santiago Comaltepec, Oaxaca (CONABIO-CONANP, 2007), proporciona una oportunidad única para el estudio de la diversidad y actividad de las bacterias edáficas porque alberga a una gran diversidad microbiana (Leff *et al.*, 2012). Esta gran diversidad se explica por algunas características abióticas particulares, como una precipitación anual entre los 1,000 y 2,000 mm, la temperatura media anual de 18 °C (Rzedowski, 1986; Nair *et al.*, 2008), el alto contenido de materia orgánica y el pH ácido del suelo, el cual es considerado como el principal moderador de la diversidad microbiana (Cavelier, 1992; Shen *et al.*, 2013).

Actualmente, el BMM mexicano se encuentra altamente amenazado por el cambio de uso de suelo para la ganadería y la agricultura, tanto comercial como de subsistencia (Garavito *et al.*, 2012). Se estima

que menos del 1.0% del territorio nacional está ocupado por vegetación primaria de BMM (8,809 km²; serie III de INEGI, 2007) y, aproximadamente, un 50% de la superficie original ha sido reemplazada por otros tipos de cobertura (Challenger, 1998).

El cambio de uso de suelo y la alteración del ecosistema tienden a modificar las propiedades fisicoquímicas del mismo, afectando al ciclo, la disponibilidad y el almacenamiento de nutrientes (Cavelier & Mejía, 1990; Cavelier, 1992); esto repercute directamente sobre la diversidad funcional bacteriana y los procesos ecosistémicos asociados a ella (Alele *et al.*, 2014).

Por lo tanto, la comprensión integral de cómo se relacionan algunas características biogeoquímicas del suelo con la distribución y función de los microorganismos, podría contribuir a nuestro entendimiento sobre dinámica de nutrientes en este sistema de BMM, y con ello facilitar el diseño de estrategias de conservación eficaces en las que los recursos genéticos almacenados puedan ser utilizados.

4. Antecedentes

4.1. Estequiometría de nutrientes

En 1958, Alfred Redfield observó que, en promedio, la biomasa planctónica contiene C, N y P en una relación atómica de 106: 16: 1, similar a la relación de C, N y P en el agua marina. El poder predictivo de la relación Redfield incitó a buscar patrones similares en ecosistemas terrestres, promoviendo así el surgimiento de una nueva disciplina dedicada a la estequiometría ecológica, la cual busca comprender el equilibrio de múltiples elementos químicos en las interacciones ecológicas (Elser *et al.*, 2000; Sterner & Elser 2002).

En los ecosistemas terrestres las proporciones de estos elementos parecen ser más variables que las del océano, pero con una relación constante entre la concentración de nutrientes en el organismo y el medio ambiente, para el mismo ecosistema en diferentes sitios. Un patrón que sugiere que existe una relación estequiométrica en comunidades vegetales y ecosistemas forestales de todo el mundo (Tabla 1; Reich & Oleksyn, 2004; McGroddy *et al.*, 2004), aún, así nuestra comprensión actual de las relaciones estequiométricas y su importancia en los ecosistemas terrestres sigue siendo relativamente limitada (Cleveland & Liptzin, 2007).

Cleveland y Liptzin, 2007, encontraron que la relación estequiométrica C: N: P de biomasa microbiana en los ecosistemas terrestres es de 60: 7: 1, mientras que para el suelo es de 186: 13: 1. Los

resultados sugieren que la comunidad microbiana del suelo es altamente homeostática, es decir que la relación de la biomasa microbiana no está determinada por las relaciones estequiométricas del suelo. Esto último puede deberse a que algunos de los microorganismos tienen la capacidad de realizar ajustes metabólicos para cubrir sus demandas específicas energéticas y nutricionales (Sterner & Elser, 2002).

El concepto de homeostasis estequiométrica fue definido por Sterner y Elser, 2002, y representado por un modelo que describe las posibles relaciones estequiométricas elementales entre los organismos y el medio ambiente. En este modelo los organismos se caracterizaron de dos formas: organismos homeostáticos, donde los cambios en la estequiometría elemental de los recursos no tienen influencia en la estequiometría elemental del organismo, más su crecimiento e inversión en la obtención de nutrientes se ve influenciado por el nutriente más escaso. Alternativamente, un organismo puede no ser homeostático, al mostrar una estequiometría elemental idéntica a sus recursos, por lo que los cambios en la estequiometría de los recursos conducen a cambios en la estequiometría del organismo.

La relación C: N promedio que ha sido reportada sobre los nutrientes totales contenidos en el suelo de ecosistemas forestales es de 14.5, mientras que la relación N: P es de 14.6 y la relación C: P oscila alrededor de 211.7 (Tabla 1; Cleveland & Liptzin, 2007). La disparidad respecto a la relación C: P se asocia a que la materia orgánica acumulada incrementa las concentraciones de C y N, mientras que la erosión de los minerales primarios disminuye la principal fuente de P en ecosistemas terrestres (Walker & Syers, 1976; Chadwick *et al.*, 1999). Referente a ello, Tiessen y sus colaboradores, 1984, observaron que la fracción microbiana de P orgánico (Po) es la fuente de P lábil más importante en los suelos ácidos, como los que se encuentran en el BMM.

Para la biomasa microbiana del suelo, de la cual forman parte las bacterias edáficas, la relación C: N varía entre 8:1 y 12:1 (Tabla 1; Paul, 2007), donde el C va de 31 a 1670 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, con un promedio de 544 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Wright & Coleman, 2000) y el N oscila entre tres y 280 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, con un promedio de 81 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Vance *et al.*, 1987; Henrot & Robertson, 1994; Zak *et al.*, 1994; Wardle, 1998). En tanto, la estequiometría N: P es de 6.9, siendo más restringida que la de las plantas (27.8), por lo que se sugiere que esta relación puede ser un índice más certero sobre la limitación de nutrientes en un ecosistema (Cleveland & Liptzin, 2007).

Tabla 1. Estequiometría de nutrientes en sistemas de BMM y ecosistemas forestales de todo el mundo

Altitud m.s.n.m.	Estequiometría de nutrientes						Cita
	Totales			Microbianos			
	C:N	C:P	N:P	C:N	C:P	N:P	
910	10	138	15	12	58	5	Devi & Yadava, 2006
910	10	256	26	13	49	4	Devi & Yadava, 2006
1900	12	259	22	10	65	6	Maithani <i>et al.</i> , 1996
Consenso de ecosistemas forestales	15	212	15	8	74	9	Cleveland & Liptzin, 2007

4.2. Estrategias bacterianas para la obtención de nutrientes

Las comunidades bacterianas, generalmente, conformadas por linajes filogenéticamente distantes, cuentan con una gran diversidad de estrategias metabólicas para optimizar la adquisición de nutrientes y energía en forma de C, proveniente de distintos sustratos. Este conjunto de estrategias ha permitido la permanencia y la evolución de las bacterias en diferentes ecosistemas (Tapia- Torres & García- Oliva, 2013).

Una de las estrategias utilizadas por las bacterias para cubrir sus demandas energéticas y nutricionales, es la secreción al medio de exoenzimas sustrato-específicas (Burns, 1982). Por ejemplo, las exoenzimas β -1,4-glucosidasa (BG) y cellobiohidrolasa (CBH) han sido identificadas como indicadores de la demanda y deficiencia de energía en forma de C (Schimel & Weintraub, 2003), mientras que la enzima β -1,4-N-acetilglucosaminidasa (NAG) es considerada indicador de la deficiencia de N (Sinsabaugh & Follstad-Shah, 2012), y las fosfatasas como la fosfomonoesterasa (FM) y la fosfodiesterasa (FD) se consideran indicadores de la demanda por P (Olander & Vitousek, 2000).

Otro de los mecanismos utilizados por las bacterias para adquirir N, P o C es la inmovilización de estos nutrientes en su biomasa. Si el P disponible en el suelo es muy limitado, los microorganismos inmovilizan en su biomasa entre el 20-50% del P total contenido en las superficies del suelo (Walbridge, 1991). Existen bacterias como las Gemmatimonadetes con la capacidad metabólica para remover el Pi

de la solución del suelo y acumularlo dentro de la célula en forma de polifosfatos (Martin *et al.*, 2006; Fukushima *et al.*, 2010).

Por último, una de las estrategias bacterianas más sorprendentes para hacer uso eficiente de sus recursos, es la capacidad de reducción del genoma. Por ejemplo, *Prochlorococcus*, una *Picocyanobacteria* que domina en ambientes oligotróficos, posee el genoma más pequeño de todos los organismos fotosintéticos reportados (Bertilsson *et al.*, 2003). Otro ejemplo es la especie *Bacillus coahuilensis* que tiene el genoma más pequeño hasta ahora secuenciado dentro de este género (3640 Mpb; Alcaraz *et al.*, 2008; Cerritos *et al.*, 2008).

Debido a lo anterior, la identificación y almacenamiento de los recursos genéticos de los microorganismos involucrados en los procesos que contribuyen a la presencia de nutrientes disponible en la solución del suelo es sumamente importante para analizar los procesos que controlan su distribución, así como para explicar las interacciones que se dan entre la limitación de nutrientes y los microorganismos presentes.

4.2.1. Obtención potencial de energía en forma de C en el Bosque Mesófilo de Montaña

En los ecosistemas terrestres, el ciclo biogeoquímico del carbono (C) depende en gran medida de la naturaleza y la calidad de la materia orgánica proporcionada por la vegetación (Schlesinger, 1990). Los ecosistemas forestales contienen el 90% y 80% de la vegetación total y los almacenes de C del suelo, respectivamente (Gower, 2003). Debido a ello, el bosque puede asimilar hasta el 67% de todo el dióxido de carbono (CO₂) que es eliminado hacia la atmósfera (Tremblay *et al.*, 2005).

El origen del C influye en la calidad del sustrato, el contenido de nutrientes y la estequiometría C: nutrientes para llevar a cabo la descomposición de la materia orgánica (Melillo *et al.*, 1982). El material orgánico de "baja calidad" es relativamente rico en lignina y pobre en otros nutrientes, por lo que se descompone lentamente (Meentemeyer, 1978). En contraste, la materia orgánica de "alta calidad" cuenta con una mayor disponibilidad relativa de nutrientes (Melillo *et al.*, 1982; Parton *et al.*, 1994). En el caso del BMM, la materia orgánica tiende a ser rica en lignina, que los microorganismos descomponen lentamente debido a su complejidad molecular (Schlesinger & Bernhardt, 2013).

Al llegar al suelo, generalmente, la biota transforma y redistribuye el C bajo diferentes formas químicas que pueden ser utilizadas por la vegetación y otros organismos (Martínez *et al.*, 2008). El C incorporado de la atmósfera por fotosíntesis es posteriormente liberado al suelo durante la descomposición de la materia orgánica. Parte de ese C liberado es transformado bioquímicamente por la

biota para su nutrición, durante este proceso los microorganismos convierten el C en materiales celulares, CO₂ o sustancias orgánicas disueltas o en fase sólida (Tremblay *et al.*, 2005), mismo proceso que puede ocurrir en el suelo del BMM.

Otros procesos importantes en el BMM pueden ser la mineralización y la humificación representan las dos fases que conducen a la transformación completa de las entradas de C en los suelos. La mineralización libera solutos inorgánicos simples, gases y nutrientes en forma iónica (K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺). El resto de la fase sólida de C orgánico es asimilada por los descomponedores del suelo y se acumula en sus tejidos o se transforma en humus (Baldock & Nelson, 2000).

Finalmente, existen sustancias no húmicas como ácidos de azúcar, grasas, proteínas, aminoácidos, lignina, ceras y otros lípidos que representan del diez al 50% de la materia orgánica soluble. Los mejores ejemplos de estas sustancias son los ácidos orgánicos de baja masa molecular presentes en suelos forestales, los cuales tienen una masa molecular que oscila entre 46.03 y 192.2 g mol⁻¹ (Fox, 1995). Estos ácidos son principalmente el producto de los procesos de exudación de raíces y de microorganismos (McKeague *et al.*, 1986).

4.2.2. Obtención potencial de P en el Bosque Mesófilo de Montaña

El P es un elemento importante para la vida, que compone a las biomoléculas esenciales de la célula, tales como ARN, ADN, ATP y los fosfolípidos de la membrana (White & Metcalf, 2007). Su principal fuente son los minerales primarios, de donde el P es incorporado a la solución del suelo mediante el intemperismo del material parental, en forma de iones fosfato (Walker & Syers, 1976). De esta manera las bacterias, hongos y plantas pueden incorporarlo en su biomasa, iniciando así la ruta biológica del P (Cross & Schlesinger, 1995).

El ortofosfato (PO₄³⁻) es la forma del P preferentemente utilizada por los organismos (Tapia-Torres *et al.*, 2016). Sin embargo, es sumamente reactivo y llega a formar más de 200 formas químicas estables. En suelos ácidos (como los del BMM de este estudio), el P se precipita químicamente formando compuestos estables con elementos como hierro (Fe) y aluminio (Al; Bünemann *et al.*, 2011). Mientras que en los suelos alcalinos se llegan a formar fosfatos con el calcio (Ca) y el magnesio (Mg), moléculas que forman parte de las fracciones de P ocluido que ya no se encuentra disponible para los organismos (Buckingham *et al.*, 2010; Tapia-Torres & García-Oliva, 2016).

El proceso de oclusión de P en almacenes inorgánicos puede ser reversible por medio del mecanismo de solubilización que es llevado a cabo por bacterias como *Pseudomonas*, *Bacillus*,

Rhizobium, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Yarrowia*, *Streptosporangium*, *Rahnella*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Gordonia*, *Kitasatospora*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ralstonia*, *Rhodobacter*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Sinorhizobium*, *Streptomyces*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pantoea*, *Herbaspirillum*, *Thiobacillus* y *Erwinia* (Fernández *et al.*, 2005; Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010; Restrepo-Franco *et al.*, 2014; Beltrán-Pineda, 2014; Alori *et al.*, 2017).

La solubilización de P consiste en la capacidad bacteriana de sintetizar ácidos orgánicos, los cuales liberan iones fosfato a las superficies de intercambio del suelo, a partir de una fuente de P inorgánica (Coyne, 1999) principalmente por la oxidación periplasmática de la glucosa a ácido glucónico por la vía de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (Liu *et al.*, 1992; Babu-Khan *et al.*, 1995). Goldstein y Liu, 1987, identificaron a *Erwinia herbicola* con la capacidad de llevar a cabo este mecanismo.

Las bacterias también pueden adquirir P de formas orgánicas lábiles como los ésteres de fosfato, caracterizados por tener uniones C-O-P fácilmente hidrolizables mediante la acción de enzimas fosfatasas ácidas o alcalinas, dependiendo del pH óptimo (Kononova & Nesmeyanova, 2002; Acosta-Martínez & Tabatabai, 2011). A este proceso se le conoce como mineralización bioquímica, y es llevado a cabo en suelos con baja disponibilidad de P, principalmente (Walker & Syers, 1976; McGill & Cole, 1981; Cross & Schlesinger, 2001).

Bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Nostoc*, *Caulobacter*, *Pseudomonas*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Corynebacterium*, entre otras, tienen la capacidad de sintetizar fosfatasas alcalinas (Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012). Mientras que la síntesis de fosfatasas ácidas se ha reportado en *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Lysobacter*, *Pedobacter*, *Serratia*, *Rhodobacter* y *Rhizobium* (Restrepo-Franco *et al.*, 2014; Neal *et al.*, 2017).

De igual manera, algunas bacterias tienen la capacidad de utilizar como fuente de P compuestos organofosforados, los cuales se caracterizan por tener un enlace directo C-P, que requiere de mayor energía para romperse (White & Metcalf, 2007). Por lo que, se ha reportado que cuando estos compuestos ingresan al suelo, pueden ser degradados casi exclusivamente por medio de la actividad microbiana (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013). Los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Erwinia* y

Actinobacteria son capaces de utilizar fosfonatos como única fuente de P (Kononova & Nesmeyanova, 2002; Quinn *et al.*, 2007; Morón-Cruz, 2014; Tapia-Torres *et al.*, 2016).

4.2.3. Obtención potencial de N en el Bosque Mesófilo de Montaña

La fijación biológica de N consiste en la reducción del N₂ atmosférico a NH₄⁺, este último biológicamente disponible para otros organismos (Vitousek & Howarth, 1991; Aber *et al.*, 1998). Este proceso es fundamental para mantener el buen funcionamiento de los ecosistemas, ya que ayuda a disminuir la escasez de N (Vitousek & Howarth 1991; Vitousek *et al.*, 2002).

La capacidad para fijar N se encuentra taxonómicamente restringida a las bacterias heterotróficas de ambientes aerobios. Dichos organismos tienen la capacidad de proteger su nitrogenasa contra el dióxígeno (O₂), mediante barreras de difusión en su membrana, o a través de altas tasas de respiración, e incluso con la combinación de ambos mecanismos (Vitousek *et al.*, 2002).

Los microorganismos responden a la inactivación de las enzimas nitrogenasas manteniendo el equilibrio entre esta y la eficiencia en el uso de O₂ como un electrón aceptor; mientras que los fijadores de N fotosintéticos de vida libre segregan el O₂ que producen en su sistema de nitrogenasa (Vitousek *et al.*, 2002). Además de estos mecanismos, Ribbe y sus colaboradores (1997) describieron una nitrogenasa vinculada a la actividad de la monóxido de carbono (CO) deshidrogenasa en *Streptomyces thermoautotrophicus*, que usaba el O₂ para generar radicales O₂⁻ como electrones transportadores.

En ecosistemas forestales el alto costo de adquirir N a través de su fijación tiende a verse sustituido por la absorción celular como medio más eficiente para obtener N biológicamente disponible (Chadwick *et al.*, 1999). Ya que, en la mayoría de los organismos fijadores de N, la síntesis y/o actividad de las nitrogenasas se inhibe en presencia de altos niveles de N (Vitousek *et al.*, 2002).

4.3. Características biogeoquímicas del suelo y su relación con la diversidad bacteriana edáfica

Wright y Coleman (2000) observaron que los valores absolutos de las relaciones C: N de la biomasa microbiana pueden usarse para indicar si la comunidad microbiana estaba dominada por bacterias (relación C: N más baja) u hongos (relación C: N más alta), debido a que los hongos presentan típicamente menor concentración de N que las bacterias, considerando una biomasa equivalente entre ambos grupos microbianos (Paul & Clark 1996). Las comparaciones globales de la relación C: N de biomasa microbiana del suelo forestal, en ese mismo estudio, indicaron que las comunidades microbianas, en la escala global, están dominadas por bacterias.

De acuerdo con Zhu y sus colaboradores (2017), las cinco principales especies dominantes de bacterias en el suelo son *Actinobacterias*, *Bacillus*, α -*proteobacterias*, y *Cianobacterias*. Además, observaron que las especies bacterianas dominantes del suelo en cuatro tipos de vegetación, incluida la de BMM, típicos en las montañas en Qilian (China) son las *Actinobacterias*, (23.10%), *Acidobacterias* (18.90%), α -*proteobacterias* (10.59%), *Firmicutes* (8.13%) y *Gemmatimonadetes* (6.12%), con una abundancia relativa promedio mayor a 5%, γ -*proteobacteria*, *Cloroflexi*, *Verrucomicrobia*, β -*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, δ -*Proteobacteria* y *Phytophthora*.

Respecto a las características biogeoquímicas que tienden a modificar la composición y estructura de las comunidades bacterianas del suelo, se ha reportado que el pH, el contenido de agua, el C orgánico, el N total, específicamente la relación C: N y la baja disponibilidad de P afectan la abundancia y diversidad α de las bacterias edáficas, limitando fuertemente a los microorganismos en su biomasa, actividad y otros procesos indispensables para el buen funcionamiento de los ecosistemas (Cleveland *et al.*, 2002; Cleveland & Townsend 2006; Reed *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017).

En condiciones ácidas, como las del suelo del BMM, la biomasa y la diversidad microbiana del suelo son generalmente bajas, lo que refleja un entorno adverso que prevalece. Además de que las coníferas que generalmente dominan la composición de la vegetación en los ecosistemas forestales otorgan al suelo materia orgánica de baja calidad rica en lignina y de lenta descomposición (Schlesinger, 1990).

En relación con la composición vegetal de los bosques y su influencia sobre la microbiota del suelo, en un estudio en Nueva Zelanda se encontró que donde el bosque de pino había sido reemplazado por pastos nativos, el C en biomasa microbiana disminuyó en un 50%, y la biomasa microbiana modificó su relación C: P en un 33%, lo que sugiere que los cambios en el tipo de la vegetación influyen sobre la diversidad microbiana (Yeates & Sagar, 1998; Chen *et al.*, 2003).

Cleveland y sus colaboradores (2007) mostraron que en condiciones de laboratorio la adición de C al suelo impulsa el aumento de *Proteobacterias*, lo que tuvo correlación con un aumento en el flujo de CO₂ del suelo. Similar a estos resultados Nemergut y sus colaboradores (2010) mostraron, mediante la manipulación experimental de las entradas de hojarasca, que el aumento de las entradas de C condujo a una disminución relativa en la abundancia de bacterias oligotróficas del suelo (*Acidobacterias*) y aumentos relativos de bacterias putativas copiotróficas (α -*proteobacteria*).

Por su parte, Fierer y sus colaboradores (2007) observaron que la disponibilidad de C se correlacionó positivamente con la abundancia relativa de *Bacteroidetes* y β -proteobacteria. Estos taxones fueron descritos como bacterias copiotróficas (estrategas r, es decir de rápida reproducción y ambientes ricos en nutrientes), mientras que la abundancia relativa de *Acidobacterias*, descrita como oligotrófica generalmente, (estratega K, de lenta reproducción y ambientes escasos en nutrientes), estaba inversamente relacionado con la disponibilidad de C.

5. Pregunta de investigación

¿Cuál es la composición taxonómica y función en la dinámica de nutrientes de las bacterias edáficas cultivables en un área conservada de Bosque Mesófilo de Montaña?

6. Hipótesis

La actividad enzimática se acentúa en aquellas enzimas útiles para la obtención del nutriente limitante en el sistema, junto con la presencia de los grupos bacterianos con la capacidad de sintetizarlas.

7. Objetivo general

Aislar e identificar la diversidad bacteriana edáfica cultivable del Bosque Mesófilo de Montaña de Santiago Comaltepec, Oaxaca, e inferir su participación en los ciclos biogeoquímicos del suelo.

8. Objetivos específicos

1. Aislar la diversidad bacteriana presente en el suelo utilizando medios de cultivo ricos y pobres en nutrientes.
2. Identificar la diversidad bacteriana aislada a través del análisis del gen 16S ARNr.
3. Preservar ex situ las cepas bacterianas en una colección de cultivos
4. Analizar la dinámica de C, N, y P en el suelo.
5. Identificar al elemento limitante del ecosistema con base en las relaciones estequiométricas C: N: P.
6. Cuantificar la actividad de cinco exoenzimas: β -glucosidasa, cellobiohidrolasa, glucosaminidasa, fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa.
7. Evaluar la relación entre la composición taxonómica y función de las bacterias aisladas con las características biogeoquímicas del suelo.

9. Materiales y métodos

9.1. Sitio de estudio

El municipio de Santiago Comaltepec tiene una superficie total de 65.07 Km² a una altura promedio de 2000 msnm, entre las coordenadas 17° 33' 54" N y 96° 32' 54" O, dentro de la provincia fisiográfica denominada Sistema Montañoso del Norte de Oaxaca (Robson & Berkes, 2011). El clima predominante de la zona es templado-húmedo (Cf) y la temperatura media anual es de 18 °C con una precipitación promedio anual de 2000 mm (García, 1998). El tipo de suelo que predomina en la región es Acrisol húmico, característico de selvas y bosque, fuertemente ácido, con un horizonte subsuperficial de acumulación de arcilla con baja capacidad de retención de nutrientes (Figura 1; Gardi *et al.*, 2014).

Esta región se encuentra catalogada como una de las más importantes y prioritarias de BMM a nivel nacional (CONABIO-CONANP, 2007). Además de la vegetación característica de un BMM, presenta, selva alta perennifolia, selva baja caducifolia y bosque de pino-encino (Rzedowski & Huerta, 1978). Se han registrado 2,207 especies vegetales dentro de la región, lo que equivale al 20% de las plantas vasculares de Oaxaca en más del 5.0% de su territorio (Robson, 2012). Cuenta con una gran diversidad especies de mamíferos, aves, anfibios y reptiles tales como: jaguar, puma, tigrillo, águila, tucán, faisán, ajolote, víbora de cascabel, entre otros (INEGI, 2005). Además de especies endémicas como *Habromys chinanteco* y *Oreomunnea mexicana* (Estrada *et al.*, 2012; Corrales *et al.*, 2015).

El 64% del territorio de BMM en esta zona presenta algún tipo de perturbación causada por el cambio de uso de suelo por la actividad antropogénica, como el sobrepastoreo y la deforestación para cultivos (Rosete-Vergés *et al.*, 2014), propiciando directamente la generación de los fenómenos de erosión, tanto hídrica como eólica (Muñoz-Villers & McDonnel, 2013; Gardi *et al.*, 2014). Debido a ello, la comunidad decretó dentro de su plan de ordenamiento territorial y estatuto comunal, una zona de BMM como área de reserva bajo la modalidad de área comunal protegida y pago por servicios ambientales con una extensión de 4,420.85 hectáreas, que es uno de los sitios mejor conservados que funciona como refugio para la vida silvestre (H. Ayuntamiento de Santiago Comaltepec; Ixtlán, Oaxaca, 2011).

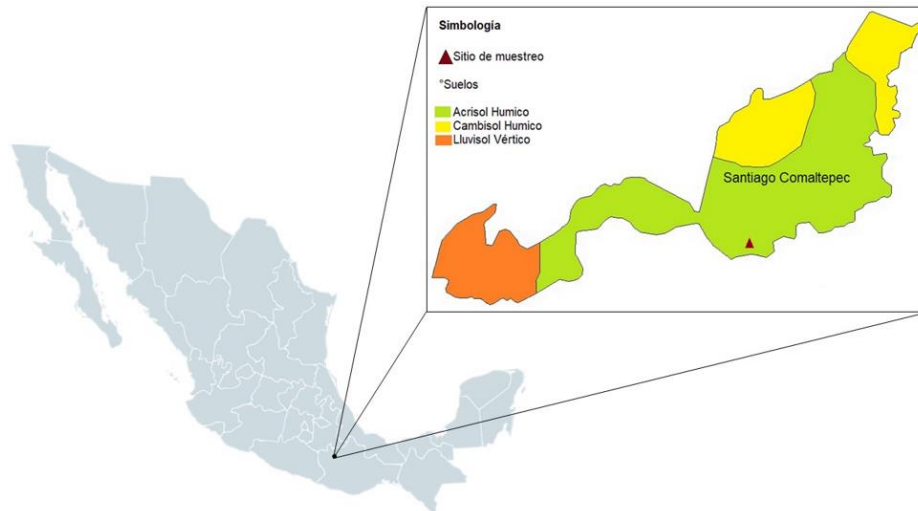


Figura 1. Sitio de estudio y tipos de suelo (modificado de H. Ayuntamiento de Santiago Comaltepec; Ixtlán, Oaxaca, 2011)

9.2. Diseño de muestreo

La toma de muestras fue llevada a cabo en septiembre de 2018 en el cerro “El Relámpago”, el cual pertenece al área de conservación de BMM con mayor altura del estrato arbóreo (Hernández-Aquino, 2015). En este sitio se ubicaron tres puntos de muestreo a una distancia de diez m entre sí, en un transecto triangular (Figura 2): el sitio uno entre las coordenadas $17^{\circ}35'0.36''$ N y $96^{\circ}23'36.6''$ O en la base del árbol *Oreomunnea mexicana*; el sitio dos entre las coordenadas $17^{\circ}35'18.4''$ N y $96^{\circ}23'57.7''$ O bajo un helecho, y el sitio tres entre las coordenadas $17^{\circ}34'51.83''$ N y $96^{\circ}24'5.17''$ O debajo de un árbol caído en descomposición.

En cada sitio de muestreo se trazó un triángulo de 1.0 m por lado, y en cada vértice del triángulo se colectó una réplica, obteniendo un total de tres réplicas de la muestra por sitio. Esto se llevó a cabo con un tubo de plástico de 50 mL, procurando tomar los primeros 5.0 cm de suelo, por ser aquellos en los que se ha reportado la mayor acumulación de materia orgánica, C y N (Anderson & Domsch, 1989; Kaiser *et al.*, 1992). Posteriormente, se trazó una circunferencia imaginaria alrededor de cada triángulo y se tomaron tres replicas de la muestra con un nucleador en los puntos opuestos a los vértices del triángulo (Figura 2). Para este muestreo se abarcaron los primeros 15 cm del suelo por ser aquellos en los que se estima que existe la mayor concentración de microorganismos (Foster, 1988). Las muestras tomadas con el nucleador fueron guardadas en bolsas de cierre hermético y almacenadas junto con las muestras en tubos de 50 mL en una hielera, para mantenerlas frías hasta su procesamiento en el laboratorio.

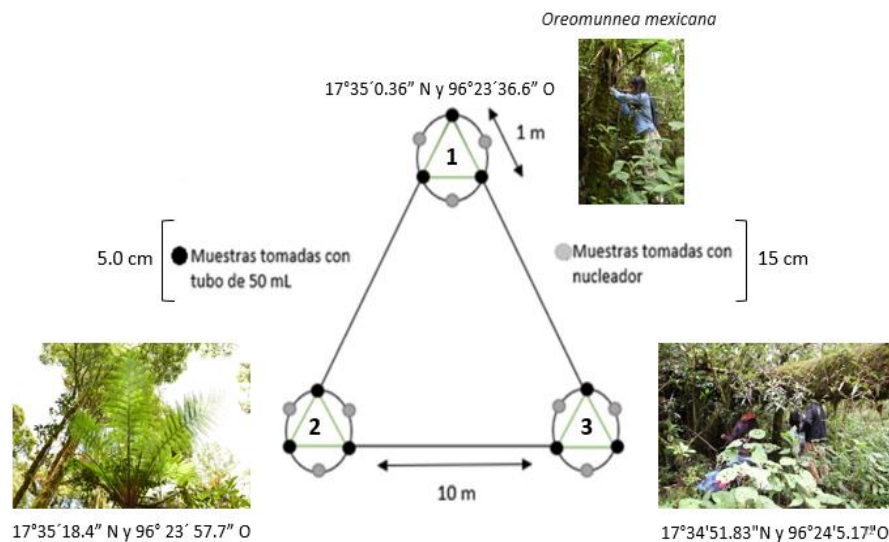


Figura 2. Diseño de muestreo para la colecta de suelo. Los puntos en negro indican los sitios donde se tomaron muestras abarcando los primeros 5.0 cm de suelo con tubos de 50 mL. Los puntos grises indican a los sitios donde fueron tomadas las muestras con nucleador

9.3. Análisis microbiológicos

9.3.1. Aislamiento de la diversidad bacteriana

Las cepas bacterianas se aislaron mediante la técnica de diluciones seriadas y siembra por vertido en placa. Esta técnica ha sido utilizada en microbiología para reducir la concentración de microorganismos o células de una muestra (Chesters & Thornton, 1956). En el caso de las bacterias, el número de colonias que crecen en una placa de Petri depende de su concentración (Brock & Madigan, 1993), por lo que las diluciones son útiles para tener un número definido de colonias en cada placa.

Se llevaron a cabo seis diluciones seriadas 1:10 (1.0×10^{-1} a 1.0×10^{-6}) por triplicado a cada para de las muestras colectadas con los tubos de 50 mL, obteniendo un total de nueve series de diluciones correspondientes a las tres réplicas de la muestra por cada uno de los tres sitios. Para ello, se agregó 1.0 g de suelo a 10 mL de agua destilada estéril en el primer tubo de ensaye, se agitó por vórtex durante 1.0 min a la velocidad máxima del equipo (3000 rpm) y se tomó 1.0 mL de solución para agregar al tubo siguiente hasta terminar la serie, manteniendo la agitación por vórtex entre cada toma de solución.

Posteriormente, se realizó la técnica de siembra por vertido en placa por triplicado, inoculando 200 μ L de cada dilución en una placa de Petri con medio de cultivo LB (*Lysogeny broth*) sólido, rico y pobre en nutrientes (LB⁺ y LB⁻, respectivamente; Tabla 2), con el fin de obtener una mayor diversidad de aislados bacterianos, ya que las bacterias presentan distintos requerimientos nutricionales para su

crecimiento (Varela & Grotiuz, 2008). Para la distribución del inóculo se utilizaron perlas de cristal estériles. Cada placa de Petri fue rotulada con el sitio y replica de la muestra (p. ejem. 1.1), dilución y replica de la dilución con que fue inoculada (p. ejem. D1.1) y medio de cultivo al que pertenecía, rico LB⁺ o pobre LB⁻.

El medio de cultivo LB sólido presenta la posibilidad de aislar y diferenciar a los microorganismos de manera estática, por lo que ha sido ampliamente utilizado para observar el crecimiento bacteriano (Bertani, 1951). Además de los nutrientes contenidos en el medio (Tabla 2) se le adiciona agar como agente solidificante, el cual se encuentra hecho a base de carbohidratos que no pueden ser digerido por bacterias, por lo que no constituye ningún elemento nutritivo dentro del medio (López-Tévez & Torres, 2006).

Tabla 2. Compuestos utilizados para la preparación de medio de cultivo LB

Compuesto	Aporte	Nutrientes	Contribución al crecimiento microbiano	g/L	
				Medio rico (LB ⁺)	Medio pobre (LB ⁻)
Triptona	Péptidos y peptonas	N y C	Aminoácidos y energía	10 g	5.0 g
Extracto de levadura	Vitaminas y oligoelementos	Vitaminas del complejo B y aminoácidos.	Compuestos orgánicos nutricionales	5.0 g	2.5 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	Iones de Na ⁺	Na ⁺	Transporte y equilibrio osmótico	10 g	5.0 g
Agar*					

*A ambos medios de cultivo se agregó agar al 1.5% como componente solidificante

En total se inocularon 324 placas de Petri: 162 por medio de cultivo, 108 por sitio y 18 por cada réplica de la muestra. Estas placas se incubaron a temperatura ambiente durante una semana, con un fotoperíodo de 12h luz/ 12h de oscuridad, analizándolas periódicamente para detectar desarrollo de colonias bacterianas.

9.3.2. *Conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC)*

Las colonias bacterianas obtenidas fueron clasificadas por morfotipos, de acuerdo con las características macroscópicas que presentaban como: forma, tamaño, color, textura, y forma de crecimiento del lado anverso y reverso de cada placa de Petri (Koch,1881).

A cada morfotipo distinto se le asignó una etiqueta de identificación y se le contabilizaron el número de UFC resultado de la dilución 1×10^{-4} , esta dilución fue elegida debido a que las placas de Petri presentaban colonias circulares individuales, representativas y sin superposición (entre 25 y 250 UFC; Swanson *et al.*,2001). Para obtener el número de UFC/mL se utilizó la ecuación siguiente:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{No. de colonias por caja} \times \text{factor de dilución}}{\text{mL de la muestra inoculada}}$$

9.3.4. *Aislamiento y purificación de los morfotipos bacterianos seleccionados*

Para asegurar que el cultivo fuese axénico, cada morfotipo fue aislado a través de la técnica de estriado (Madigan & Martinko, 2005) por duplicado (Figura 3a). De acuerdo con la técnica utilizada el inóculo fue distribuido con un asa bacteriológica estéril en forma de zigzag, tratando de ir disminuyendo la cantidad de inóculo sobre el medio de cultivo. Cada placa de Petri inoculada fue rotulada con el nombre del morfotipo que contenía y el medio de cultivo del que había sido aislado.

Las placas de Petri con cultivos axénicos se incubaron a temperatura ambiente durante tres días para poder observar el crecimiento de las colonias bacterianas. Al cabo de los días de incubación, las colonias fueron fotodocumentadas (Figura 3b; Anexo I). Los subcultivos se dejaron a temperatura ambiente por tres días y el resto de las placas de Petri fueron selladas con papel parafilm y almacenadas a 4.0°C para su posterior procesamiento.

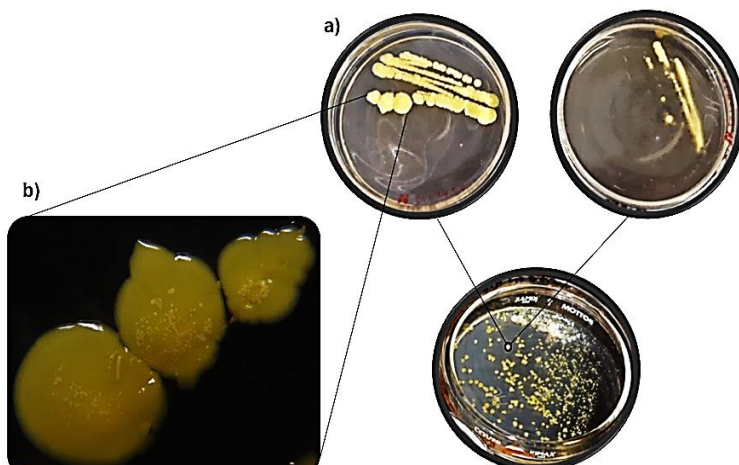


Figura 3. Aislamiento y purificación de los morfotipos seleccionados. a) Aislados mediante la técnica de estriado por duplicado y b) colonia bacteriana a los tres días de crecimiento

9.3.5. Preservación *ex situ* de las cepas bacterianas aisladas

Se conformó el cepario inoculando cada uno de los morfotipos obtenidos con un asa bacteriológica estéril en 0.2 μ L de glicerol al 70%, dentro de tubos de 0.6 mL a -20°C (Figura 4). Posteriormente, las muestras fueron preservadas a -80°C . Esta técnica puede mantener a las cepas viables hasta por diez años o más, ya que la congelación tiende a reducir la actividad metabólica de la célula (Tedeschi & De Paoli, 2011).



Figura 4. Cepario bacteriano en glicerol al 70%

9.3.6. Extracción de ADN genómico de las cepas bacterianas aisladas del suelo

El ADN genómico de los aislados seleccionados se obtuvo mediante el uso de kit de extracción DNeasy Blood & Tissue Kit[®] (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del proveedor, como se detalla a continuación: El material biológico se tomó con un asa bacteriológica, a partir de los cultivos axénicos. La biomasa fue resuspendida en 180 μ L de buffer de lisis enzimático en tubos de 1.5 mL. Para preparar buffer de lisis enzimático suficiente para diez reacciones, se utilizaron 43.2 μ L de Tris-HCl pH8 20 mM, 8.64 μ L de EDTA 2mM, 25.92 μ L de Tritón X-100 1.2%, 43.2 mg de Lisozima y 2082.24 μ L de H₂O destilada, desionizada y estéril en un tubo de 1.5 mL.

Posteriormente, los tubos fueron incubados por 30 min a 37°C , después de la incubación se les añadieron 25 μ L de proteinasa K y 200 μ L de buffer AL, se volvió a incubar a 56°C por 30 min y al término de la incubación se añadieron 200 μ L de etanol al 100%, se agitó por vórtex y cada mezcla fue transferida por separado a una minicolumna y centrifugada a 8000 rpm por un min. Al término de la centrifugación, la minicolumna con el ADN extraído fue recuperada, y el resto de la columna con líquido

se descartó. Cada minicolumna fue colocada en un tubo de 2 mL, al que se le añadieron 500 μ L de buffer AW1 y se centrifugó por un min a 8000 rpm. Al término del centrifugado la minicolumna fue colocada en otro tubo de 2 mL, se le añadieron 500 μ L de buffer AW2 y se centrifugó a 14000 rpm durante 3 min, se recuperó la minicolumna en un tubo de 1.5 mL y se le añadieron 200 μ L de buffer AE. Se incubó por un min a TA, se centrifugó a 8000 rpm durante un min y, finalmente, se descartó la minicolumna, cerrando y rotulando cada tubo de 1.5 mL con el nombre de la muestra de ADN que contenía.

Finalmente, la integridad del ADN extraído fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% (Fierro, 2014).

9.3.7. Técnica de PRC en gradiente de temperatura y de magnesio (Mg)

Se amplificó la longitud completa del gen 16S rRNA (unidad V1 a la V9 de aproximadamente 1500 pb; Gray *et al.*, 1984) con los cebadores universales 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') obtenidos de Sigma (Weisburg *et al.*, 1991; Tapia-Torres *et al.*, 2016). Este gen fue utilizado debido a que además de los sitios de unión de cebadores altamente conservados, sus secuencias contienen regiones hipervariables que proporcionan información puntual para la identificación de bacterias a nivel específico (Kolbert & Persing, 1999; Pereira *et al.*, 2010).

Se llevó a cabo la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) en nueve muestras del ADN genómico, extraído de los aislados bacterianos seleccionados, más un control, teniendo un total de diez reacciones iniciales. Cada una de estas reacciones fue preparada para una concentración final de magnesio (Mg) de 1.5 mM (Tabla 3), y llevada a cabo en un termociclador (PTC-2000 DNA Engine Cycler) con 52 °C en la temperatura de alineación (Figura 5).

Posteriormente para llevar a cabo la estandarización de las condiciones de PCR acorde a las muestras del presente estudio, se implementó la técnica de PCR en gradiente de temperatura y Mg con tres diferentes condiciones de concentración de Mg en combinación con tres diferentes temperaturas de alineación (Tabla 4).

Decidimos modificar la temperatura de alineamiento y concentración de Mg debido a que la enzima polimerasa requiere de iones Mg^{+} para funcionar adecuadamente. En general la concentración de Mg 1.5 mM es la más común, más puede probarse un rango de uno a cuatro mM. Además, una mayor temperatura de alineación tiende a incrementar la unión de los oligonucleótidos con sus sitios complementarios, resultando, ambas modificaciones, en una mayor especificidad del producto de PCR

(Asuar, 2007). Las combinaciones de temperatura de alineación y concentración de Mg realizadas fueron llevadas a cabo con una sola muestra de ADN total, como se describe a continuación: seleccionamos la combinación siete de 56 °C y 1.5 mM para continuar con el resto de las muestras de ADN genómico, debido a que notamos un mayor efecto del incremento a la temperatura de alineación, que del incremento a la concentración de Mg (Tabla 4).

Los productos de PCR amplificados exitosamente fueron enviados al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y Salud, IB, UNAM para su secuenciación mediante el método de didesoxinucleótidos, comúnmente conocido como Sanger, que se basa en la síntesis secuencial de una hebra de ADN complementaria, sobre una hebra molde de cadena simple, en presencia de la enzima ADN polimerasa y didesoxinucleótidos marcados con fluoróforos que sirven como terminadores de la reacción (Sanger *et al.*, 1977).

Tabla 3. Condiciones de PCR para diferentes concentraciones de Mg

Reactivos	Cantidad de reacciones (μL)					
	1		10		10	
	Concentración final de Mg (mM)					
	1.5		2		2.5	
Buffer	5	50	5	50	5	50
H ₂ O	36.8	368	35.8	358	34.8	348
Mg	3	30	4	40	5	50
dNTP's	1	10	1	10	1	10
27F	1.5	15	1.5	15	1.5	15
1492R	1.5	15	1.5	15	1.5	15
Polimerasa	0.2	2	0.2	2	0.2	2
*ADN						

*Se agregó 1.0 μL del ADN correspondiente a cada una de las nueve muestras. A la reacción control no le fue agregado ADN

Tabla 4. Combinaciones realizadas para la técnica de PCR en gradiente

Combinación	Temperatura de alineación (°C)	Concentración de Mg (mM)
1	52	1.5
2	52	2
3	52	2.5
4	54	1.5
5	54	2
6	54	2.5
* 7	56	1.5
8	56	2
9	56	2.5

*Combinación seleccionada

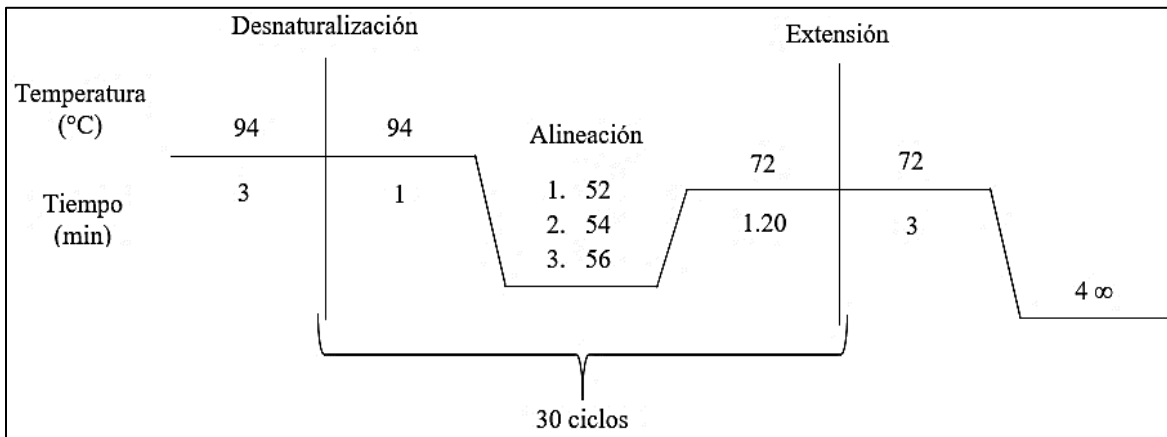


Figura 5. Programa del termociclador para el gradiente de temperatura. En la temperatura de alineación se muestran las tres temperaturas puestas a prueba

9.3.8. Identificación taxonómica de especies bacterianas potenciales

Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas con los comandos Phred y Phrap en Consed 2.0. Phred ayuda a otorgar puntajes de calidad para una determinación automática de secuencias consenso precisas y basadas en la calidad otorgada (Ewing *et al.*, 1998). Por su parte, Phrap se encarga de ensamblar las secuencias de ADN completas, no solo la parte de alta calidad, dando como resultado la “secuencia contig” como un mosaico de segmentos de lectura de la más alta calidad en lugar de un consenso (Bonfield & Staden, 1995) y, finalmente, Consed sirve para ver, editar y terminar los ensamblajes de secuencia creados con Phrap (Gordon *et al.*, 1998).

Las asignaciones taxonómicas se realizaron comparando manualmente con secuencias registradas en la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando un porcentaje de identidad mayor o igual al 97%, y una cobertura del 90% (Stackebrandt & Ebers 2006; Vos, 2011) dentro de los diez primeros resultados arrojados por la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Aquellas secuencias que arrojaron resultados conflictivos fueron asignadas a la categoría taxonómica inmediata superior (Anexo I; Tabla 6; Yarza *et al.*, 2014).

9.4. Análisis biogeoquímicos del suelo

La determinación de humedad, pH y el análisis de la actividad enzimática del suelo fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Microbiómica, ENES Morelia, UNAM, mientras que la cuantificación de nutrientes fue realizada en el Laboratorio de Biogeoquímica de Suelos, IIES, UNAM.

9.4.1. Determinación del pH del suelo

Para hacer las correcciones por humedad a los cálculos de nutrientes y enzimas se determinó el porcentaje de humedad a través del método gravimétrico (Radulovich, 2009). Este análisis, consistió en pesar 10 g de suelo de cada muestra tomada con el nucleador, y secarla en un horno a 105° C por 48 h. Se registró el peso del suelo húmedo, y el peso del suelo seco después de las 48 h. Finalmente el porcentaje de humedad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso húmedo}} \times 100$$

Para determinar el pH del suelo se utilizó una solución 1:10 de suelo con agua desionizada y se determinó utilizando un potenciómetro previamente calibrado (LAQUA-pH-1200-S).

9.4.2. Análisis de la actividad enzimática del suelo

La actividad enzimática de las bacterias del suelo es un importante indicativo del mecanismo biológico de la descomposición de la materia orgánica, la deficiencia y la adquisición de nutrientes del suelo (Burns & Dick, 2002; Wittmann *et al.*, 2004; Allison *et al.*, 2010).

Se cuantificó la actividad de las siguientes enzimas: β -glucosidasa (BG), cellobiohidrolasa (CBH), N-acetilglucosaminidasa (NAG), fosfomonoesterasa (FM) y fosfodiesterasa (FD; Tabla 5).

Tabla 5. Enzimas cuantificadas

Enzima	Sustrato	Función de la enzima	Producto	Nutriente	Referencia
β -glucosidasa (BG)	pNP-glucopiranoside	Despolimeriza celulosa	β -D-glucosa	C	Ljungdahl & Eriksson, 1985
Cellobiohidrolasa (CBH)	pNP-cellobioside	Despolimeriza celulosa	celobiosa	C	Ljungdahl & Eriksson, 1985
N-acetilglucosaminidasa (NAG)	pNP- β -N acetylglucosaminide	Despolimeriza quitina	glucosamina	C y N	Sinsabaugh, 2005
Fosfomonoesterasa (FM)	pNP-fosfate	Mineraliza P	OH + fosfato	P	Turner <i>et al.</i> , 2002
Fosfodiesterasa (FD)	pNP-fosfate	Mineraliza P	OH + fosfato	P	Toor <i>et al.</i> , 2003

pNP: paranitrofenol

Los ensayos fueron llevados a cabo mediante métodos espectrofotométricos (Tabatabai & Bremner, 1969; Verchot & Borelli, 2005), ya que algunos sustratos y los productos de las reacciones enzimáticas absorben luz dentro del espectro visible. El paranitrofenol (pNP) fue leído en la región ultravioleta a 410 nm (Bigat & Saifer, 1972).

La determinación espectrofotométrica cuantifica la cantidad de producto que es liberada por gramo de suelo sobre unidad de tiempo, al incubar muestras de suelo después de haber extraído la enzima,

y en presencia de un sustrato a temperatura, tiempo y pH específicos en una solución buffer (Tabatabai *et al.*, 2002; Fioretto *et al.*, 2009).

Se prepararon 500 mL de solución MUB 5X (Modified Universal Buffer), útil para mantener a las enzimas sin desnaturalizar (Ferreira *et al.*, 2016); añadiendo 6.05 g de aminometano tris-hidroclorhídrico, 5.8 g de ácido maléico, 7.0 g de ácido cítrico, 3.15 g de ácido bórico y agua desionizada hasta aforar. De esa solución MUB 5X se preparó buffer MUB 1X a diferentes pH: se tomaron 20 mL de MUB 5X que fueron añadidos a 100 mL de agua desionizada para obtener una concentración MUB 1X para un pH 5 (muestras 1.1, 2.3,3.1 y 3.3). Otra solución MUB 1X fue preparada agregando 45 mL de MUB 5X a 250 mL de agua desionizada para un pH 4.5 (muestras 1.2,1.3,2.1,2.2 y 3.2). El pH de ambas soluciones fue ajustado con un potenciómetro (LAQUA-pH-1200-S) e hidróxido de sodio (NaOH) 1.0 N.

Para preparar el sustrato específico para cada enzima se utilizó un buffer de acetatos pH 5, hecho con una solución de 22.2 mL de ácido acético (CH_3COOH) 0.2 M, 52.8 mL de acetato de sodio trihidratado ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) 0.2 M y agua desionizada hasta aforar a 150 mL. El pH fue ajustado con NaOH 1 N. Del sustrato pNP-glucopiranoside se utilizaron 0.07535 g para obtener una concentración final de 10 mM, de pNP-cellobioside 0.04635 g para 4 mM, pNP- β -N-acetylglucosaminide 0.03425 g para obtener una concentración final de 4 mM y pNP- phosphate 0.0928 g para obtener una concentración final de 10 mM. Cada cantidad de sustrato fue adicionada a 25 mL buffer de acetatos por separado.

Para realizar la extracción enzimática de las muestras ambientales, por cada una de las muestras se colocaron 2.0 g de suelo fresco en tubos de 50 mL. Estos contenían 30 mL de MUB 1X al pH correspondiente, y se agitaron durante 25 min a 250 rpm. Al cabo de este proceso, usando tubos de 1.5 mL se tomaron por triplicado 670 μL del extracto resultante, y se añadieron 670 μL del sustrato específico de cada enzima (Tabla 5).

Cada una de las muestras con sus controles, así como los controles de sustrato por enzima, fueron agitados por vórtex e incubados a 28°C durante diferentes tiempos: 2.0 h con agitación a 250 rpm para las enzimas BG y NAG, 2.5 h para CBH y 1.5 h para FM y FD, con el fin de lograr acelerar la formación del producto de la reacción enzimática (pNP). Por último, al término de la incubación, se centrifugó cada muestra a 10,000 rpm durante 2 min.

Para llevar a cabo la lectura de absorbancia, se utilizó un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible (UV-Vis; Thermo Scientific, Genesys 10S) a una longitud de onda de 410 nm. Se tomaron 750

μL del producto final de la centrifugación en tubos de 15 mL, a los que se adicionaron 75 μL de NaOH 1.0 N, para detener la reacción y 3 mL de agua desionizada, se agitó la mezcla y se llevó a cabo la lectura de las muestras y todos los controles. Durante este proceso se utilizó una celda adecuada para el espectrofotómetro, enjuagando la celda entre lecturas.

9.4.3. Cuantificación de nutrientes

Todas las formas de C fueron determinadas con el analizador de C (UIC-COULOMETRICS mod. 50120; Chicago, E.U.A). El C total (CT) fue cuantificado en el módulo para líquidos con monohetanolamina y un indicador de pH colorimétrico (TOC CM5012). El C inorgánico disuelto (CID) se determinó en el módulo de acidificación con H_2SO_4 a 2.0N (CM513). Por su parte, las formas de N y P se analizaron en un autoanalizador Bran-Lubbe III (Bran-Lubbe mod. AA3; Norderstedt Alemania).

9.4.3.1. Cuantificación de C, N y P totales

El análisis de C total (CT) determina la concentración de este elemento en el suelo dentro de diferentes reservorios (Nelson & Sommers, 1996). Para determinarlo se utilizó el método coulométrico (Huffman, 1977) secando las muestras en un horno sin circulación forzada de aire a 100 °C por 48 h, posteriormente, las muestras fueron molidas en un mortero de ágata para evitar su contaminación, y se pesaron entre 0.015 y 0.020 g de suelo en cazuelas de porcelana, anotando el peso exacto de cada muestra.

El C inorgánico total (CIT) fue determinado por medio del módulo inorgánico del Analizador de Carbono que utiliza ácido sulfúrico (H_2SO_4). La medición de CT y CIT fue calibrada con carbonato de calcio (CaCO_3) puro. Finalmente, el C orgánico total (COT) fue determinado restando el CIT al CT.

Para estimar el N y P total (NT y PT, respectivamente), las muestras fueron secadas en un horno sin circulación forzada de aire a 100 °C por 48 h. Después del secado, se pesaron 2.0 g de suelo en tubos digestores de 250 mL. Se añadió 1.0 g de mezcla digestora (10g de sulfato de potasio (K_2SO_4) / 1.0 g de sulfato cúprico (CuSO_4), 3 mL de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 30%), y se dejó reposar por 15 min. Se adicionaron 20 mL de H_2SO_4 concentrado, dejando reposar por 24 h antes de la digestión a 375°C durante 4 h.

Al término de la digestión, los tubos se dejaron enfriar y fueron aforados a 250 mL con agua destilada, se agitaron hasta obtener una solución homogénea que fue filtrada por papel Whatman #1, y recuperada en viales. El extracto fue leído por medio de colorimetría a 660 nm.

Finalmente, el NT se determinó mediante el método Semi-Kjeldahl que incluye a las formas orgánicas e inorgánicas (Bremner, 1996), y el PT se determinó por el método Colorimétrico de Molibdato de amonio, sometiendo el heteropoliácido formado a una reducción con ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$), que fue leída por espectrometría a 660 nm con una solución amortiguadora de H_2SO_4 y cloruro de sodio (NaCl; Murphy & Riley, 1962).

9.4.3.2. Cuantificación de C, N y P disueltos

Para la extracción de C, N y P inorgánicos disueltos (CID, NID y PID, respectivamente) se pesaron 10 g de suelo fresco, a los que se adicionaron 80 mL de agua desionizada. La mezcla se agitó lentamente por 30 min y el extracto fue filtrado en papel Whatman $0.42 \mu m$ (Jones & Willett, 2006), seguido de otra filtración al vacío en membranas Millipore de $0.45 \mu m$. De este extracto se leyó directamente CID y C total disuelto (CTD); mientras que el NID se determinó como NH_4^+ y NO_3^- , y el PID como PO_4^{3-} .

Posteriormente, en un vial se tomó una alícuota de 20 mL del extracto anterior, para leer N y P total digeribles (NTd y PTd respectivamente). La digestión se llevó a cabo con H_2SO_4 y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) a $250^\circ C$, después se adicionaron 25 mL de agua desionizada, se neutralizó el extracto con NaOH al 20% y H_2SO_4 5.0 N. La solución final se aforó a 50 mL y se filtró a través de Whatman 1 (Robertson *et al.*, 1999). La determinación se realizó mediante el método colorimétrico del hipoclorito-fenol (Solórzano, 1969).

Las formas orgánicas de C, N y P (COD, NOD y POD, respectivamente) se determinaron calculando la diferencia entre el total digerido y el inorgánico disuelto, con excepción del NOD que fue calculado por la diferencia del NTd y el NH_4^+ , ya que en el método Semi-Kjeldahl, durante la digestión todas las formas de N orgánico se transforman en NH_4^+ y no hay formación de nitratos (NO_3^-).

9.4.3.3. Cuantificación de C, N y P en biomasa microbiana

Esta fracción de nutrientes se refiere a la concentración de C, N y P inmovilizada en la biomasa de los microorganismos totales presentes en el suelo. Para su determinación se llevó a cabo el método de extracción-fumigación con cloroformo ($CHCl_3$; Vance *et al.*, 1987). Este método tiene como principio que los microorganismos mueran al ser atacadas sus membranas celulares por el $CHCl_3$, y parte de sus constituyentes celulares, especialmente los que están presentes en el citoplasma, que serán degradados por auto lisis enzimática y transformados en componentes extraíbles (Joergensen, 1996).

Para determinar el C y N en biomasa microbiana (C_{mic} y N_{mic} , respectivamente) se pesaron 20g de suelo fresco en vasos de Nalgene para las muestras sin fumigación, y 20 g de suelo fresco en vasos de vidrio para ser fumigados con 80 mL de $CHCl_3$. Ambos tratamientos se incubaron dentro de un desecador en un intervalo de temperaturas de 24 a 27 °C durante 24 h. Al término de la incubación se les adicionó 80 mL de sulfato de potasio (K_2SO_4) 0.5 N, y se agitaron por 30 min (Brookes *et al.*, 1985). Las muestras se filtraron al vacío con membranas Millipore de 0.45 μm .

El C total microbiano (CT_{mic}) fue determinado mediante el método coulométrico; el C inorgánico (CI) se determinó por medio del módulo inorgánico que utiliza H_2SO_4 2N y el C orgánico microbiano (CO_{mic}) fue determinado con la resta de $CT_{mic} - CI$. Para la extracción del N microbiano (N_{mic}), el extracto se llevó a cabo con H_2SO_4 y $CuSO_4$ como catalizador a 300°C y se filtró en Whatman # 1, leyéndose finalmente por medio del método colorimétrico.

El P en biomasa microbiana (P_{mic}) se obtuvo pesando 5 g de cada muestra por duplicado, para llevar a cabo un tratamiento de fumigación con $CHCl_3$ y otro sin fumigación (Anderson & Domsch, 1978). Ambos tratamientos se incubaron durante 24 h a 27°C. Al término de la incubación se les agregaron 30 mL de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) 0.5 M a pH de 8.5, para extraer la fracción de P lábil (Hedley *et al.*, 1982). Se agitó por 16 h a 350 rpm, seguido de una centrifugación a 6000 rpm por 25 min. Posteriormente, se filtraron con papel Whatman No. 42 y se les agregó H_2SO_4 11 N y persulfato de amonio ($(NH_4)_2S_2O_8$) al 50%, para colocar en el autoclave a 121 °C por 1 h. Finalmente, las muestras fueron neutralizadas entre pH 4.5-5 y aforadas a 25 mL con agua desionizada.

La concentración de P_{mic} se determinó a través del método de cuantificación de P inorgánico (P_i) por colorimetría, utilizando el sistema reductor de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) y antimonio (Sb) como catalizador (Murphy & Riley, 1962) con una solución para desarrollo de color compuesta por: molibdato de amonio ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$), tartrato de antimonio ($C_8H_{10}K_2O_{15}Sb_2$), potasio (K), H_2SO_4 14N y $C_6H_8O_6$. Del extracto digerido y neutralizado se tomaron 5 mL y se añadieron 5 mL de la solución para desarrollo de color, se aforó a 50 mL y finalmente cada muestra fue leída en un espectrofotómetro de UV-Visible (Thermo Scientific, mod. Genesys 10S) a 882 nm.

Las concentraciones finales de Cmic, Nmic y Pmic se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\text{Nut-mic} = \frac{\text{Nfumigado} - \text{Nnofumigado}}{Kp^*}$$

Donde:

Nut-mic= nutriente en biomasa microbiana de interés

Nfumigado= resultado del tratamiento fumigado

Nnofumigado= resultado del tratamiento no fumigado

Kp= coeficiente de extracción

*Se utilizó un coeficiente de extracción de 0.45 para el Cmic y Nmic (Joergesen & Mueller, 1996) y 0.4 para Pmic (Hedley & Stewart, 1982; Lajtha *et al.*, 1999).

10. Análisis de resultados

Se utilizó el programa R versión 3.6.2 para realizar todos los análisis. Mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía se determinaron las diferencias significativas de las variables biogeoquímicas medidas, la actividad enzimática y la estequiometría de nutrientes entre sitios y dentro de cada sitio. Se llevó a cabo una prueba a posteriori de comparación múltiple de Tukey para las variables que presentaron diferencias significativas.

Para analizar la diversidad bacteriana, se realizó una prueba de diversidad α con el índice de Simpson, que toma en cuenta tanto la riqueza como la equitatividad de especies en cada sitio, es decir, la probabilidad de que dos individuos, dentro de una misma región y que hayan sido seleccionados al azar, pertenezcan a la misma especie. Su rango va de 0 a 1, de mayor a menor diversidad. Para la diversidad β se realizó un análisis de clúster utilizando la medida de distancia de Jaccard, que toma en cuenta únicamente la presencia y ausencia de las especies en cada sitio.

Posteriormente, debido a la naturaleza de nuestros datos se realizó un análisis de correlación de Spearman entre las variables biogeoquímicas del suelo y la actividad enzimática medidas. Finalmente, se llevó a cabo un análisis de correspondencia canónica (CCA) entre la actividad enzimática del suelo y la distribución de las especies, y entre las características biogeoquímicas del suelo y la distribución de las especies.

11. Resultados

11.1. Diversidad cultivable obtenida y especies bacterianas cultivables más ampliamente distribuidas

Se obtuvieron un total de 70 morfotipos bacterianos: 49 aislados en medio de cultivo LB⁺ y 21 en medio de cultivo LB⁻. El sitio uno obtuvo el mayor número de UFC en el medio de cultivo LB⁻, mientras que en los sitios dos y tres las UFC resultaron ser mayores en el medio de cultivo LB⁺. El sitio que presentó un mayor número de UFC fue el sitio dos, seguido por el sitio uno y finalmente el sitio tres (Tabla 6).

Tabla 6. Unidades Formadoras de Colonias por medio de cultivo y sitio de muestreo

Medio de cultivo	Sitio		
	1	2	3
LB ⁺	13x10 ⁴	5x10 ⁶	4x10 ⁶
LB ⁻	7x10 ⁶	3x10 ⁶	2x10 ³

LB+: medio de cultivo rico en nutrientes, LB-: medio de cultivo Lb pobre en nutrientes

Se obtuvieron 58 extractos de ADN, de los cuales se amplificó con éxito el gen 16S ARNr de 54 muestras, resultando en un total de 50 secuencias agrupadas en 20 contigs (4 secuencias no pasaron los filtros de calidad), como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Asignaciones taxonómicas

Contig	Cobertura (%)	Identidad (%)	Especie potencial	Sitio	Phyla
1	100	100	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	1	Actinobacteria
2	100	98.45	<i>Arthrobacter agilis</i>	3	
3	100	99.78	<i>Sporosarcina globispora</i>	1	Firmicutes
4	100	98.22	<i>Viridibacillus arenosi</i>	1	
5	100	97.93	<i>Viridibacillus arvi</i>	1	
6	100	97.86	<i>Planomicrobium flavidum</i>	3	
7	99	97	<i>Planococcus salinus</i>	1 y 3	
8	100	99.77	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	1,2 y 3	
9	100	100	<i>Bacillus mycoides</i>	1,2 y 3	
10	100	98.31	<i>Burkholderia thailandensis</i>	1	β-proteobacteria

Tabla 7. Asignaciones taxonómicas (continuación)

11	100	99.66	<i>Pseudomonas</i> sp.1	1	} <i>γ-proteobacteria</i>
12	100	99	<i>Pseudomonas songnenensis</i>	1	
13	100	98.86	<i>Pseudomonas</i> sp.2	1	
14	100	99.57	<i>Pseudomonas koreensis</i>	3	
15	100	98.73	<i>Lysobacter agri</i>	2 y 3	
16	100	100	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	2 y 3	
17	100	99.32	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1,2 y 3	
18	100	99.96	<i>Pseudomonas marginalis</i>	1,2 y 3	
19	100	99.38	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	1,2 y 3	
20	100	99.93	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	1,2 y 3	

Se identificaron, cinco géneros con siete especies pertenecientes al phylum *Firmicutes*, dos géneros con dos especies del phylum *Actinobacteria* y cinco géneros con 11 especies del phylum *Proteobacteria*. Este último fue dividido en las clases γ -proteobacteria (tres géneros con diez especies), y β -proteobacteria (un género con una especie; Tabla 6)

De acuerdo con la presencia de las especies potenciales en cada sitio de muestreo, el sitio uno presentó una mayor riqueza con 15 especies, ocho exclusivas, seis compartidas con los sitios dos y tres, y una compartida solo con el sitio tres. El sitio dos presentó el menor número de especies con solo ocho especies, seis compartidas con los sitios uno y tres, y dos compartidas únicamente con el sitio tres. Por último, el sitio tres tuvo 12 especies, tres exclusivas, seis compartidas con los sitios uno y dos, dos compartidas solo con el sitio dos y una con el sitio uno (Tabla 7).

11.1.2. Diversidad bacteriana α y β entre los sitios de muestreo

De acuerdo con el índice de diversidad de Simpson, la diversidad α fue baja para los tres sitios de muestreo, pues se obtuvo un valor de $D' = 0.89$ para el sitio uno, $D' = 0.84$ para el sitio dos y $D' = 0.85$ para el sitio 3. El dendograma resultante del análisis de diversidad β mostró una gran similitud entre los tres sitios de muestreo, respecto a las especies bacterianas potenciales compartidas, ya que las submuestras no se agruparon por sitio. Sólo las submuestras del sitio dos se hallaron en el mismo gran subgrupo (Figura 6).

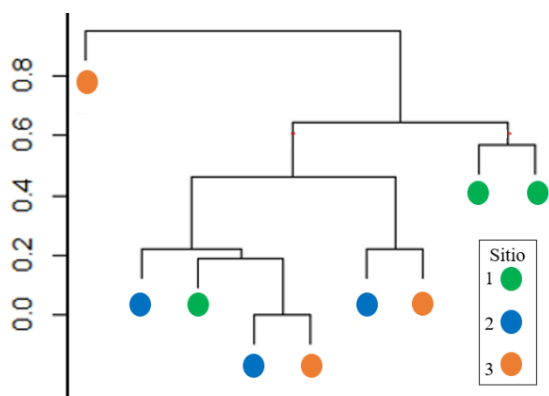


Figura 6. Dendrograma resultante de la diversidad β . Los puntos en verde corresponden al sitio de muestreo 1, los puntos en azul señalan al sitio dos y los puntos en naranja al sitio de muestreo 3

11.2. Características biogeoquímicas y actividad enzimática del suelo

El pH del suelo resultó ser fuertemente ácido y sin diferencias significativas entre los tres sitios de muestreo. Obteniéndose un pH de 4.50 (± 0.10) para el sitio uno, 4.78 (± 0.18) para el sitio dos y 4.69 (± 0.45) para el sitio tres.

11.2.1. Actividad enzimática bacteriana del suelo de BMM

Para los tres sitios de muestreo, la enzima mayormente producida fue la FM. Respecto a las diferencias significativas entre sitios, el sitio tres presentó la menor actividad de las enzimas BG y NAG (Tabla 8).

Tabla 8. Media y desviación estándar (\pm sd) de la actividad enzimática del suelo para cada sitio de muestreo

Enzima	BG _P	CBH _P	NAG _P	FM _P	FD _P	p
Sitio						
1	0.1268 ^A (± 0.00)	0.0194 ^A (± 0.01)	0.1559 ^A (± 0.02)	1.4713 ^B (± 0.11)	0.0645 ^A (± 0.03)	<0.05
2	0.1504 ^A (± 0.04)	0.4175 ^A (± 0.46)	0.1782 ^A (± 0.02)	2.3671 ^B (± 0.74)	0.2537 ^A (± 0.21)	<0.05
3	0.0509 ^{A*} (± 0.02)	0.0349 ^A (± 0.02)	0.0415 ^{A*} (± 0.01)	1.5679 ^B (± 0.92)	0.1205 ^A (± 0.05)	<0.05
p	<0.05	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	

BG: β -Glucosidasa, CBH: Cellobiohidrolasa, NAG: N-acetilglucosaminidasa, FM: Fosfomonoesterasa, FD: Fosfodiesterasa

p: $\mu\text{mol pNP h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{SS}$

^{A, B o C} diferencias significativas ($p \leq 0.05$) dentro de cada sitio

* diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre sitios

11.2.2. Nutrientes en el suelo y en biomasa microbiana

De acuerdo con la concentración de nutrientes presentes en el suelo, no se hallaron diferencias significativas entre sitios. Sin embargo, dentro de cada sitio, el Cmic resultó ser significativamente mayor. Para el sitio uno, además del Cmic, el COD también arrojó diferencias significativas en comparación con el resto de las variables biogeoquímicas del suelo medidas (Tabla 9).

Tabla 9. Media y desviación estándar (\pm sd) de la concentración de nutrientes para cada sitio de muestreo

Parámetro ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Sitio			p
	1	2	3	
CT	28.82 ^B (\pm 8.28)	53.44 ^A (\pm 29.66)	41.37 ^A (\pm 27.42)	>0.05
COD	117.43 ^A (\pm 33.80)	170.7 ^A (\pm 117.33)	103.36 ^A (\pm 20.92)	>0.05
Cmic	240.96 ^C (\pm 24.09)	891.67 ^B (\pm 316.25)	511.26 ^B (\pm 323.63)	>0.05
NT	1.98 ^B (\pm 0.22)	3.35 ^A (\pm 1.27)	2.82 ^A (\pm 1.02)	>0.05
NOD	6.51 ^B (\pm 2.91)	7.56 ^A (\pm 2.00)	4.23 ^A (\pm 2.53)	>0.05
Nmic	37.31 ^B (\pm 8.03)	60.38 ^A (\pm 24.84)	56.71 ^A (\pm 42.51)	>0.05
PT	0.12 ^B (\pm 0.02)	0.20 ^A (\pm 0.08)	0.12 ^A (\pm 0.04)	>0.05
POD	1.20 ^B (\pm 0.30)	1.35 ^A (\pm 0.40)	1.65 ^A (\pm 0.74)	>0.05
Pmic	6.41 ^B (\pm 2.44)	6.84 ^A (\pm 2.38)	11.11 ^A (\pm 4.50)	>0.05
p	<0.05	<0.05	<0.05	

CT:carbono total, COD: carbono orgánico disuelto, Cmic: carbono microbiano, NT: nitrógeno total, NOD: nitrógeno orgánico disuelto, Nmic: nitrógeno microbiano, PT: fósforo total, POD: fósforo orgánico disuelto, Pmic: fósforo microbiano

^{A, B o C} diferencias significativas ($p \leq 0.05$) dentro de cada sitio

* diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre sitios

11.3. Estequiometría de nutrientes

Los cocientes estequiométricos de nutrientes en el suelo y en la biomasa microbiana mostraron diferencias significativas entre los sitios de muestreo: el cociente CT: PT resultó ser mayor para los tres sitios. En el sitio uno el cociente COD: POD obtuvo diferencias significativas con todos los demás cocientes cuantificados, excepto con Cmic: Pmic. El sitio dos presentó el mayor Cmic: Pmic de los tres sitios. Por último, en el sitio tres se obtuvo el mayor NT: PT (Tabla 10).

Tabla 10. Media y desviación estándar (\pm sd) de los cocientes estequiométricos de nutrientes en el suelo y la biomasa microbiana para cada sitio de muestreo

Cociente ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Sitio			p
	1	2	3	
CT: PT	222.23 ^A (\pm 52.76)	248.68 ^A (\pm 64.53)	296.77 ^A (\pm 121.10)	>0.05
CT: NT	14.52 ^C (\pm 3.55)	14.96 ^C (\pm 3.98)	13.65 ^B (\pm 4.95)	>0.05
NT: PT	15.36 ^C (\pm 0.93)	16.64 ^C (\pm 0.18)	21.48 ^{B*} (\pm 2.03)	<0.05
COD: POD	100.80 ^B (\pm 34.29)	103.78 ^{BC} (\pm 52.02)	71.93 ^B (\pm 34.90)	>0.05
COD: NOD	21.64 ^C (\pm 12.84)	26.81 ^C (\pm 24.05)	31.35 ^B (\pm 18.68)	>0.05
NOD: POD	5.59 ^C (\pm 2.41)	5.76 ^C (\pm 3.59)	2.57 ^B (\pm 0.93)	>0.05
Cmic: Pmic	41.58 ^{BC} (\pm 15.90)	140.19 ^{B*} (\pm 62.69)	42.04 ^B (\pm 16.21)	<0.05
Cmic: Nmic	6.76 ^C (\pm 2.23)	15.68 ^C (\pm 5.67)	20.63 ^B (\pm 26.92)	>0.05
Nmic: Pmic	6.63 ^C (\pm 3.55)	10.60 ^C (\pm 8.45)	5.69 ^B (\pm 4.39)	>0.05
p	<0.05	<0.05	<0.05	

CT: carbono total, PT: fósforo total, NT: nitrógeno total, COD: carbono orgánico disuelto, POD: fósforo orgánico disuelto, NOD: nitrógeno orgánico disuelto, Cmic: carbono microbiano, Pmic: fósforo microbiano, Nmic: nitrógeno microbiano

A, B, BC o C diferencias significativas ($p \leq 0.05$) dentro de cada sitio

* diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre sitios

11.4. Relación entre las variables biogeoquímicas del suelo, actividad enzimática y diversidad bacteriana obtenida

Se obtuvieron un total de 33 correlaciones significativas positivas y una negativa entre el pH y el POD. Siendo las enzimas FM y FD aquellas que obtuvieron el mayor número de correlaciones significativas positivas, dónde la correlación más fuerte se dio entre el NT y la FM.

Tabla 11. Matriz de correlación (Spearman) entre las variables biogeoquímicas del suelo y la actividad enzimática. En negritas se resaltan las correlaciones significativas

	pH	BG	CBH	NAG	FM	FD	CT	NT	PT	COD	NOD	POD	Cmic	Nmic	Pmic
pH	1.00														
BG	0.07	1.00													
CBH	0.33	0.43	1.00												
NAG	0.17	0.93	0.52	1.00											
FM	-0.10	0.28	0.47	0.55	1.00										
FD	0.07	0.07	0.57	0.32	0.88	1.00									
CT	-0.32	0.13	0.40	0.37	0.95	0.88	1.00								
NT	-0.07	0.18	0.55	0.45	0.97	0.90	0.93	1.00							
PT	-0.20	0.15	0.33	0.42	0.93	0.75	0.92	0.93	1.00						
COD	-0.15	-0.02	0.05	0.25	0.65	0.48	0.67	0.53	0.68	1.00					
NOD	0.22	0.52	0.50	0.47	0.00	-0.10	-0.12	0.13	0.03	-0.42	1.00				
POD	-0.52	-0.17	0.37	-0.08	0.45	0.55	0.67	0.55	0.48	0.32	0.05	1.00			
Cmic	-0.10	0.15	0.67	0.40	0.88	0.87	0.88	0.90	0.78	0.60	0.05	0.65	1.00		
Nmic	0.38	-0.12	0.18	0.06	0.43	0.52	0.40	0.40	0.47	0.47	-0.40	-0.05	0.25	1.00	
Pmic	-0.35	-0.32	0.00	-0.21	0.42	0.48	0.47	0.40	0.28	0.15	-0.47	0.27	0.48	0.00	1.00

BG: β -Glucosidasa, CBH: Cellobiohidrolasa, NAG: N-acetilglucosaminidasa, FM: Fosfomonoesterasa, FD: Fosfodiesterasa, CT: carbono total, NT: nitrógeno total, PT: fósforo total, COD: carbono orgánico disuelto, NOD: nitrógeno orgánico disuelto, POD: fósforo orgánico disuelto, Cmic: carbono microbiano, Nmic: nitrógeno microbiano, Pmic: fósforo microbiano

11.4.1. Relación entre actividad enzimática del suelo y la distribución de las bacterias cultivables obtenidas

De acuerdo con el modelo de Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) entre la actividad enzimática del suelo (variables explicativas) y la distribución de las bacterias cultivables obtenidas (variables de respuesta). Los primeros dos componentes lograron explicar el 67.03 % de la variación entre nuestros datos. El CCA1 explicó el 24.32 % de la proporción acumulada de la varianza, mientras que el CCA2 explicó el 42.71 % (Figura 7). Para el CCA1 la variable positiva más explicativa fue la enzima FM con una puntuación de 0.4712, seguida por la CBH con 0.2366 y BG con 0.2002. De manera negativa la variable más explicativa fue la enzima NAG con -0.0377, seguida por FD con -0.0220. En el caso del CCA2 la variable positiva más explicativa fue la FD con 0.4445, seguida por FM con 0.2791 y CBH con

0.2678. Negativamente las variables más explicativas fueron las enzimas NAG con -0.5254 y BG con -0.3985 (Figura 7).

En el cuadrante 1, la enzima FD se relaciona con el grupo de bacterias formado por *Sporosarcina psychrophila*, *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas vancouverensis*, *Arthrobacter agilis* y *Stenotrophomonas rhizophila*. En el cuadrante 2, el grupo formado por *Planomicrobium flavidum* y *Pseudomonas koreensis*, además de *Lysobacter agri* se relacionaron con las enzimas FM y CBH. El cuadrante tres mostró relación entre la enzima BG y el grupo formado por las bacterias *Pseudomona sp.1*, *Pseudomona sp.2*, *Pseudomona songnenensis* y *Burkholderia thailandensis*. En el cuadrante cuatro el grupo formado por las bacterias *Viridibacillus arvi*, *Sporosarcina globispora*, *Viridibacillus arenosi* y *Microbacterium hydrocarbonoxydans* se relacionó con la enzima NAG.

Las bacterias *Pseudomona oryzihabitans*, *P. marginalis* y *P. tolaasii* formaron un grupo asociado con las enzimas FM y BG. Por su parte *Planococcus salinus* se relacionó con las enzimas FD y NAG (Figura 7)

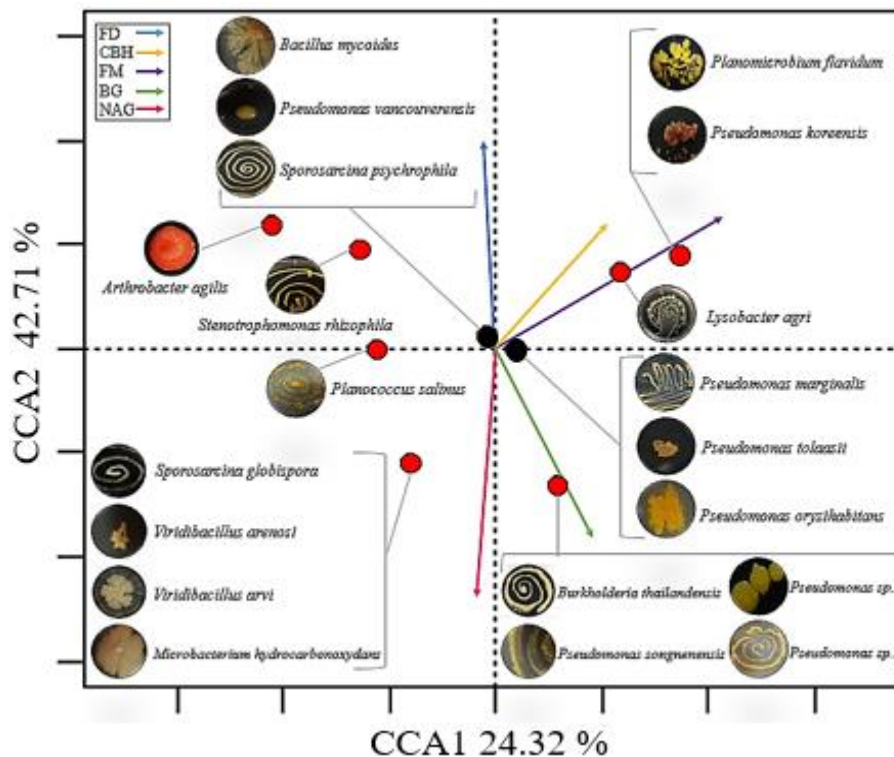


Figura 7. Análisis de correspondencia canónica entre la actividad enzimática del suelo y la diversidad de bacterias cultivables

11.4.2. Relación entre las características biogeoquímicas del suelo y la distribución de las bacterias cultivables obtenidas

Nuestro modelo de CCA llevado a cabo entre las características biogeoquímicas del suelo (variables explicativas) y la distribución de las bacterias cultivables obtenidas (variables de respuesta), explicó un 83.24% de la variación entre nuestros datos con los primeros dos componentes. El CCA1 explicó el 27.76% de la proporción acumulada de la varianza, mientras que el CCA2 explicó el 55.48% (Figura 8).

Para el CCA1, la variable positiva más explicativa fue el NOD con una puntuación de 0.4843, seguido por POD con 0.2410 y pH con 0.0873. La variable negativa más explicativa fue el Pmic con -0.3563, CT con -0.1985, COD con -0.1549, Nmic con -0.0524 y Cmic con -0.0168. Por su parte, en el CCA2, la variable positiva más explicativa también fue el NOD con 0.4609. El resto de las variables fueron negativas, siendo el pH la puntuación más alta con -0.5742, seguido por Nmic con -0.2440, COD con -0.1033, POD con -0.0668, Cmic con -0.0663, CT con -0.0262 y Pmic con -0.0111.

En el cuadrante uno, el grupo formado por las bacterias *Viridibacillus arvi*, *Sporosarcina globispora*, *Viridibacillus arenosi* y *Microbacterium hydrocarbonoxydans* no mostró relación con alguna de nuestras variables explicativas. El grupo formado por *Pseudomona oryzihabitans*, *P. marginalis* y *P. tolaasii* se relacionó con NOD y Pmic. En el cuadrante dos se agruparon las bacterias *Pseudomona sp.1*, *P. sp.2*, *P. songnenensis* y *Burkholderia thailandensis* asociadas con el NOD igualmente (Figura 8).

El grupo formado por *Lysobacter agri*, *Planomicrobium flavidum* y *Pseudomonas koreensis* se relacionó con todas las variables explicativas (COD, NOD, POD, CT, Cmic, Nmic, Pmic y pH). *Stenotrophomonas rhizophila*, *Planococcus salinus* y *Arthrobacter agilis* se relacionaron con el pH, mientras que el grupo conformado por *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas vancouverensis* y *Sporosarcina psychrophila*, además de con el pH se relacionó con COD, POD, Cmic y Nmic.

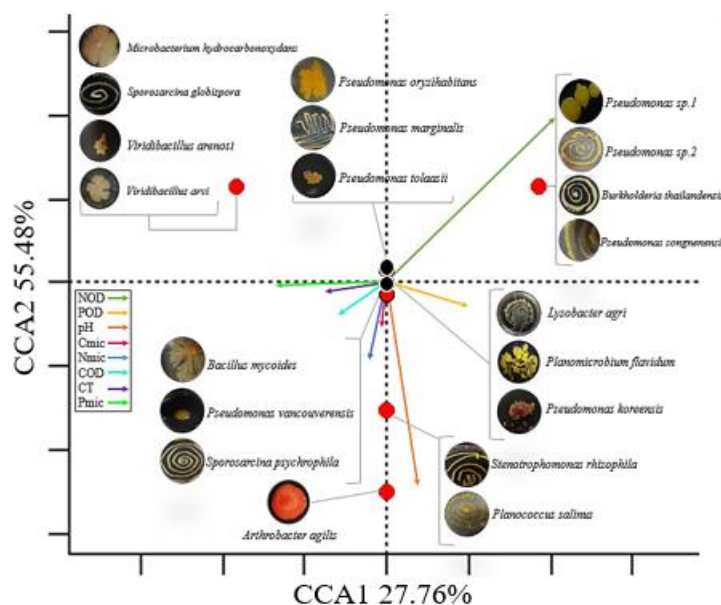


Figura 8. Análisis de Correlación Canónica entre las variables biogeoquímicas del suelo y la diversidad de bacterias cultivables

12. Discusión

12.1 Diversidad α y β cultivable

Dentro de los sistemas montañosos, los phyla bacterianos *Actinobacteria*, (23.10%), *Acidobacteria* (18.90%), α -*proteobacteria* (10.59%), *Firmicutes* (8.13%), *Gemmatimonadetes* (6.12%), γ -*proteobacteria*, *Cloroflexi*, *Verrucomicrobia*, β -*proteobacteria*, *Bacteroidetes*, δ -*proteobacteria* y *Phytophthora*. (>5.00%), han sido reportados como dominantes en el suelo (Nadal-Rocamora, 2015; Zhu *et al.*, 2017; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018). De estos 12 phyla, en el presente trabajo se identificaron cuatro: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, β -*proteobacteria* y γ -*proteobacteria*, siendo este último el phylum cultivable más ampliamente distribuido en el suelo del BMM de Santiago Comaltepec, Oaxaca, de acuerdo con nuestros datos.

Estos cuatro phyla han sido reportados como bacterias que pueden degradar celulosa, hemicelulosa, pectina y quitina para la obtención de glucosa (Horwath, 2017). Por otra parte, estos phyla pueden obtener el P mediante el mecanismo de solubilización (Fernández *et al.*, 2005; Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010; Restrepo-Franco *et al.*, 2014; Beltrán-Pineda, 2014; Alori *et al.*, 2017), por la síntesis de fosfatasa alcalinas (Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012), y/o por el uso de compuestos organofosforados como única fuente de este elemento (Kononova & Nesmeyanova, 2002; Quinn *et al.*, 2007; Morón-Cruz, 2014; Tapia-Torres *et al.*, 2016).

Dividiendo a los phyla encontrados por la clasificación de Gram, *Actinobacteria* y *Firmicutes* pertenecen a las Gram⁺, mientras que β y γ -*proteobacteria* son Gram⁻. Las bacterias Gram⁺ se asocian con un perfil funcional de tipo oligotrófico, mejor representado en condiciones de poca humedad del suelo (Curiel Yuste *et al.*, 2014), razón por la que se ha propuesto que este tipo de bacterias son más resistentes a la sequía (Schimel *et al.*, 2007; Manzoni *et al.*, 2012).

Por su parte las bacterias Gram⁻, con un estilo de vida generalmente copiotrófico se ven beneficiadas por el incremento de exudados de raíces u hongos en condiciones altas de humedad (Treonis *et al.*, 2004; Deneff *et al.*, 2009; Curiel Yuste *et al.*, 2014). Por lo que, se sugiere que existe una separación funcional de estos dos grupos bacterianos que responde, principalmente, a las características estructurales de su membrana celular y pared interna de peptidoglicano que desempeñan un papel central contra la desecación en bacterias Gram⁺ (Curiel Yuste *et al.*, 2014).

De acuerdo con la información otorgada por el índice de diversidad de Simpson (D'), la baja diversidad cultivable obtenida en los tres sitios de muestro puede deberse a la existencia de especies cultivables dominantes, ya que en este índice los valores cercanos a uno corresponden a sitios cuya

abundancia total está dominada por una (o muy pocas), o bien a las especies totales presentes en el sitio, o al enfoque dependiente de cultivo y la selección de medios y condiciones (Sommerfield *et al.*, 2008).

Aunque el sitio uno presentó la mayor riqueza de especies, su diversidad es igualmente baja, debido a que las especies bacterianas cultivables exclusivas de este sitio (*Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Sporosarcina globispora*, *Viridibacillus arenosi*, *Viridibacillus arvi*, *Burkholderia thailandensis*, *Pseudomonas* sp.1, *Pseudomonas songnenensis* y *Pseudomonas* sp.2) solo se encontraron en una de sus submuestras.

Las especies bacterianas cultivables más ampliamente distribuidas en el suelo del BMM de Santiago Comaltepec, Oaxaca fueron: *Sporosarcina psychrophila* (Firmicutes), *Bacillus mycoides* (Firmicutes), *Pseudomonas oryzae* (γ -proteobacteria), *Pseudomonas marginalis* (γ -proteobacteria), *Pseudomonas vancouverensis* (γ -proteobacteria) y *Pseudomonas tolaasii* (γ -proteobacteria; Anexo II).

El phylum *Proteobacteria* ha sido reportado como predominante en suelos forestales (Kim *et al.*, 2007). Ello puede deberse a que *Proteobacteria* presenta una gran diversidad de capacidades metabólicas esenciales en los ciclos biogeoquímicos de nutrientes (Zehr *et al.*, 2003; Roesch *et al.*, 2007; Gaby & Buckley, 2011). La clase γ -proteobacteria se ha asociado a suelos con un alto contenido de nutrientes disponibles (Hermans *et al.*, 2016). Mientras que el phylum *Firmicutes* tiene preferencia por sitios en los que existe una baja productividad vegetal y condiciones óptimas de humedad (Curiel Yuste *et al.*, 2014; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018).

Los géneros *Pseudomonas* (γ -proteobacteria) y *Bacillus* (Firmicutes) de estos dos phyla se consideran abundantes en la rizósfera (Saharan & Nehra, 2011), tienen la capacidad de obtener glucosa mediante la síntesis de enzimas amilasas que degradan almidón (Horwath, 2017) y ejercen un efecto positivo sobre el crecimiento vegetal, permitiendo la disponibilidad N y P (Saharan & Nehra, 2011). Individualmente, en el género *Bacillus* se han detectado exoenzimas fitasas para la obtención de P (Idriss *et al.*, 2002), mientras que la síntesis de fosfatasa ácida se ha reportado en *Pseudomonas* (Restrepo-Franco *et al.*, 2014; Neal *et al.*, 2017).

Por lo que, las bacterias cultivables más ampliamente distribuidas en este sitio (Anexo II) pueden representar a las bacterias edáficas cultivables involucradas en la dinámica de nutrientes en sistemas conservados de BMM. Debido a que el análisis de diversidad β mostró que existe una gran similitud de especies entre los tres sitios, resultados que coinciden con un estudio llevado a cabo por Fulthorpe y colaboradores (2008), el cual ha sido considerado como el mayor esfuerzo de muestreo sobre diversidad

bacteriana del suelo, con 139 819 secuencias bacterianas analizadas. En este estudio se encontró una gran similitud, respecto a la composición de especies entre distintos suelos elegidos al azar, separados por hasta 9000 km de distancia.

La similitud de especies entre sitios podría deberse a los cortos tiempos de generación bacteriana y el gran potencial de las bacterias para adquirir genes a través de mutaciones o transferencia horizontal (Whitman *et al.*, 1998; Doolittle & Papke, 2006; Achtman & Wagner, 2008), mecanismos que se ha sugerido que contribuyen a una alta capacidad para colonizar rápidamente una amplia gama de nuevos nichos ecológicos (Curiel Yuste *et al.*, 2014).

12.2. Dinámica hipotética de nutrientes

El suelo es considerado el principal almacén de C, N y P, ya que guarda más del 80% de las formas orgánicas de estos elementos (Schlesinger, 1990). Las plantas suelen ser la principal fuente de CT y NT, mientras que la erosión de los minerales primarios proporciona la fuente más importante de PT (Walker & Syers, 1976; Chadwick *et al.*, 1999). Por lo que, cuando la materia orgánica se acumula en un ecosistema, las concentraciones de CT y NT en el suelo se desacoplan cada vez más de la concentración de PT, dando lugar a que el P orgánico, se convierta en una considerable fuente de P lábil para los organismos presentes en el ecosistema, y la actividad microbiana es casi exclusivamente la única responsable de su degradación (Johnson *et al.*, 2003; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013).

En suelos forestales con acumulación de arcillas (como el Acrisol húmico presente en el BMM de este estudio), se ha reportado que existe una correlación entre C, N y arcilla, generalmente explicada por la capacidad de las arcillas para retener la materia orgánica (Wardle, 1992). Esta correlación suele tener efectos positivos sobre la cantidad de nutrientes acumulados en biomasa microbiana (Vance *et al.*, 1987; Insam & Domsch, 1988; Badalucco *et al.*, 1990), puesto que el C y N presente en la materia orgánica pueden ser incorporados fácilmente por los microorganismos en su biomasa (Sorenson, 1983; Stott *et al.*, 1983; Ocio *et al.*, 1991).

Además de la acumulación de arcillas, el pH del suelo y la temperatura tienden a influir sobre la proporción de C y N inmovilizado en la biomasa microbiana del suelo (Wardle, 1992), dándose una mayor inmovilización de nutrientes a temperaturas más bajas (Ledgard *et al.*, 1989; Sarathchandra *et al.*, 1989; Wardle, 1992). Debido a esto, la biomasa microbiana del suelo es considerada como una fuente lábil de nutrientes, potencialmente disponibles para las plantas y otros organismos (Smith & Paul, 1990; Grandy *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2012).

En el caso del P, las bacterias pueden inmovilizarlo en su biomasa en forma inorgánica y para ello requieren mineralizar el POD, que es la forma orgánica más lábil de este elemento (Johnson *et al.*, 2003). La mineralización de P se lleva a cabo de manera extracelular por medio de la producción de fosfatasas como la FM y FD. La producción de estas enzimas, y de todas en general, es altamente demandante de energía, agua y nutrientes (Bünemann *et al.*, 2008).

En ecosistemas húmedos como el BMM, el C, N y P en sus formas orgánicas y disueltas (COD, NOD y POD, principalmente) se encuentran en proteínas, ácidos nucleicos y aminoácidos, siendo esta última la forma más lábil de estos nutrientes (Osler & Sommerkorn, 2007). El ingreso de agua al sistema favorece la hidrólisis de estas formas químicas, otorgando a las bacterias edáficas el agua, la energía y los nutrientes iniciales, necesarios para poder llevar a cabo sus funciones metabólicas y producir enzimas (Qualls, 2000; Paul, 2007; Montiel-González, 2011).

La síntesis de enzimas extracelulares por parte de las bacterias edáficas contribuye a la alteración de la disponibilidad de nutrientes en la solución del suelo, y su posterior inmovilización en biomasa (Sinsabaugh *et al.*, 2009). En suelos forestales, se ha reportado que existe un patrón relativamente constante de las proporciones elementales en biomasa microbiana, a pesar de las diferencias en la disponibilidad de nutrientes (Tabla 1; Cleveland & Liptzin, 2007). Esto último produce relaciones estequiométricas $C_{mic}:N_{mic}$, $C_{mic}:P_{mic}$ y $N_{mic}:P_{mic}$ relativamente más bajas en comparación con los almacenes de nutrientes totales y disueltos del suelo (Figura 9; Sterner & Elser, 2002; McGroddy *et al.*, 2004; Cleveland & Liptzin, 2007; Turner & Wright, 2014).

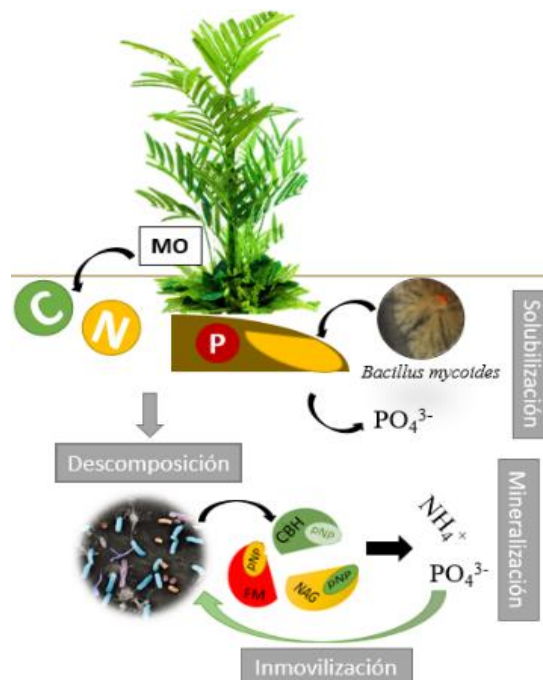


Figura 9. Dinámica hipotética de nutrientes en el Bosque Mesófilo de Montaña

El patrón descrito anteriormente sobre la posible dinámica de nutrientes en el suelo del BMM, fue consistente en los tres sitios de muestreo analizados (ver ANEXO III), dónde además sólo se presentaron diferencias significativas de nutrientes ($p > 0.05$) dentro de cada sitio, y no entre sitios (Tabla 9). Ello podría deberse a que las variaciones entre sitios suelen ser captadas solo si se evalúan adicionalmente condiciones a largo plazo, como el clima o la productividad del sistema; mientras que la variación dentro de cada sitio a menudo se explica por las interacciones dadas a microescala entre los organismos y sus recursos (Wright & Coleman, 2000).

Adicionalmente, se ha encontrado que la variabilidad en las concentraciones de C y, N, y el pH del suelo no son significativamente diferentes a escala regional que a escala local dentro de un mismo ecosistema (Wardle, 1992). Por lo que, la estequiometría de nutrientes en biomasa microbiana de un mismo ecosistema a diferentes escalas, generalmente, resulta ser similar (Tabla 1; Wardle, 1992; McGroddy *et al.*, 2004; Reich & Oleksyn, 2004; Cleveland & Liptzin, 2007). Esto sugiere que los parámetros del suelo que influyen sobre los nutrientes acumulados en la biomasa microbiana a una microescala también podrían ser aquellos que influyan a nivel local.

Para este sitio la estequiometría promedio de nutrientes (C: N: P) fue de 256:18:1, mientras que para la biomasa microbiana fue de 75:8:1. El resultado en la biomasa microbiana fue similar al hallado por Cleveland y Liptzin (2007) para los ecosistemas forestales de distintas partes del mundo (Tabla 1), razón por la que se sugiere que las bacterias de suelos forestales tienden a la homeostasis estequiométrica para poder cubrir sus demandas de energía y nutrientes (Sturner & Elser, 2002).

Con respecto a la actividad de las exoenzimas bacterianas, la mayor actividad de la enzima FM en los tres sitios, podría estar respondiendo a la baja disponibilidad de nutrientes, asignando un mayor esfuerzo al nutriente más escaso (Sinsabaugh & Moorhead, 1994; Allison *et al.*, 2010). Por lo que, es probable que la comunidad microbiana edáfica del BMM se encuentra potencialmente limitada por P (Cusack *et al.*, 2011), pues esta enzima responde a las deficiencias de P disponible (Sinsabaugh & Moorhead, 1994; Olander & Vitousek, 2000; Treseder & Vitousek, 2001; Allison *et al.*, 2007).

La posible baja disponibilidad de P en este sistema podría estar explicada por el hecho de que en suelos ácidos este elemento se precipita fácilmente con el Fe y el Al, formando compuestos estables que pasan a ser parte de las fracciones de P ocluido (Buckingham *et al.*, 2010; Bünemann *et al.*, 2011; Tapia-Torres & García-Oliva, 2016). Cuando esto sucede, la comunidad microbiana del suelo con la capacidad de mineralizar y/o solubilizar P adquiere mayor importancia, al contribuir al reciclaje, manutención y

disponibilidad de este elemento en el sistema (Coyne, 1999; Cross & Schlesinger, 2001; Cleveland *et al.*, 2002; Kononova & Nesmeyanova, 2002).

El alto contenido de Cmic para los tres sitios de muestreo (Tabla 9), podría estar relacionado con la acumulación de materia orgánica en el suelo (Jenkinson & Lad, 1981), el contenido de COD y NT (Wardle, 1992). De acuerdo con la matriz de correlación, la mayor correlación positiva se obtuvo entre el Cmic y el NT, posiblemente porque el N influye en la inmovilización de C, al requerirse en la síntesis de enzimas que contribuyen a dicha acción (Wardle, 1992; Allison & Vitousek, 2005; Allison *et al.*, 2010, Loladze & Elser, 2011).

Para los tres sitios de muestreo, el cociente estequiométrico CT:PT fue significativamente mayor al cociente Cmic: Pmic, debido, quizás, a que la poca disponibilidad de P induce a que los microorganismos del suelo inmovilicen a este elemento en su biomasa (Cleveland, 2002; Zhao *et al.*, 2014).

En el caso particular del sitio dos el cociente Cmic: Pmic fue mayor, debido, quizá, a que fue el sitio con la mayor cantidad de Cmic (Tablas 9 y 10; Anexo III), más no por una menor proporción de Pmic. Por lo que se sugiere que en este sistema la biomasa microbiana del suelo tiende a la homeostasis en relación con la disponibilidad de P, y potencialmente contribuye al reciclaje y disponibilidad de este elemento en el sistema.

12.3. Relación entre los nutrientes del suelo y la diversidad bacteriana cultivable obtenida

De acuerdo con el CCA de la actividad enzimática del suelo, las tres enzimas que explicaron la presencia de las especies bacterianas cultivables más ampliamente distribuidas fueron la BG, NAG y FM (Figura 7). Empatando estos resultados con aquellos obtenidos en la matriz de correlación, la enzima BG se correlacionó positivamente con la enzima NAG (Tabla 11) posiblemente porque ambas actúan en conjunto para la obtención de energía en forma de C, y N para la producción de otras enzimas y proteínas (Horn *et al.*, 2012), influyendo sobre la actividad, biomasa y composición de las comunidades microbianas del suelo (Treseder & Allen, 2002).

Las bacterias que solo se presentaron en el sitio uno, en el cual las muestras fueron tomadas al pie de *Oreomunnea mexicana*, un árbol que forma asociaciones micorrícicas para obtener N (Miguel *et al.*, 2020), se asociaron con la enzima NAG, y el NOD (Figuras 7 y 8, ANEXO III). Ello podría deberse a que se ha reportado que estas pertenecen a phylums generalmente abundantes en sitios con altos niveles

de N (Iizuka *et al.*, 1998; Cleveland *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2010; Nemergut *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2012).

La enzima FM, mayormente cuantificada en este estudio, se relacionó con uno de los dos grupos formados por las especies bacterianas cultivables más ampliamente distribuidas, el segundo grupo se relacionó con la enzima FD y el POD (Figuras 7 y 8). Estas bacterias pertenecen a los phyla *Firmicutes* y *γ-proteobacteria* (Anexo II), los cuales han sido reportados con la capacidad de sintetizar FM y FD para la obtención de P, aún en sistemas con deficiencia de este nutriente (Idriss *et al.*, 2002; Restrepo-Franco *et al.*, 2014; Neal *et al.*, 2017). Por lo que sugerimos que la presencia de estas bacterias podría estar contribuyendo a la disponibilidad y el flujo de P en el suelo del BMM de Santiago Comaltepec, Oaxaca.

13. Conclusiones

- Los resultados de este estudio confirman la hipótesis propuesta, ya que la actividad enzimática y las bacterias edáficas cultivables más ampliamente distribuidas en este sitio se asociaron a la obtención del elemento más escaso
- Este sistema podría tener una mayor limitación de P en comparación con el N, de acuerdo con nuestros resultados de estequiometría de nutrientes y actividad enzimática.
- Para el P, la biomasa microbiana del suelo tiende a la homeostasis, en relación con la estequiometría de los nutrientes totales en el suelo, mediante la síntesis de FM y FD.
- Las bacterias cultivables más ampliamente distribuidas en este sitio (*Sporosarcina psychrophila* (*Firmicutes*), *Bacillus mycoides* (*Firmicutes*), *Pseudomonas oryzihabitans* (*γ-proteobacteria*), *Pseudomonas marginalis* (*γ-proteobacteria*), *Pseudomonas vancouverensis* (*γ-proteobacteria*) y *Pseudomonas tolaasii* (*γ-proteobacteria*) pertenecen a géneros asociados a la obtención de P, por lo que podrían estar contribuyendo a la disponibilidad y el flujo de este elemento en el sistema.

14. Perspectivas

- Los resultados de este estudio pueden ser comparados con un sitio de BMM perturbado, para poder inferir cuáles son las especies bacterianas cultivables más vulnerables frente a una perturbación.
- Los aislados bacterianos almacenados en el cepario final de este estudio podrían ser utilizados en pruebas posteriores sobre uso y preferencia de distintas fuentes de nutrientes.

- Las especies bacterianas cultivables más ampliamente distribuidas en este sistema, pueden ser analizadas en estudios posteriores más detallados, para su posible implementación en la biorremediación del suelo.
- Para poder tener un enfoque más integral de la limitación de nutrientes en este ecosistema, las relaciones estequiométricas en las plantas podrían ser analizadas en estudios posteriores.

15. Referencias

1. Aber, J., McDowell, W., Nadelhoffer, K., Magill, A., Berntson, G., Kamakea, M., & Fernandez, I. (1998). *Nitrogen saturation in temperate forest ecosystems: hypotheses revisited*. *BioScience*, 48(11), 921-934.
2. Achtman, M., & Wagner, M. (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature reviews microbiology*, 6(6), 431-440.
3. Acosta-Martínez V & Tabatabai MA (2011). *Phosphorus Cycle Enzymes*. En *Methods of Soil Enzymology* (págs. 161-183). Richard P. Dick, editor. SSSA Book Series, no. 9.
4. Alcaraz, L. D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., & López, V. (2008). *The genome of Bacillus coahuilensis reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5803-5808.
5. Alele, P. O., Sheil, D., Surget-Groba, Y., Lingling, S., & Cannon, C. H. (2014). *How does conversion of natural tropical rainforest ecosystems affect soil bacterial and fungal communities in the Nile River watershed of Uganda?* *PloS one*, 9(8), e104818.
6. Allison, S. D., & Vitousek, P. M. (2005). *Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs*. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 937-944.
7. Allison, S. D., Czimczik, C. I., & Treseder, K. K. (2008). *Microbial activity and soil respiration under nitrogen addition in Alaskan boreal forest*. *Global Change Biology*, 14(5), 1156-1168.
8. Allison, S. D., Weintraub, M. N., Gartner, T. B., & Waldrop, M. P. (2010). *Evolutionary-economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function*. In *Soil enzymology* (pp. 229-243). Springer, Berlin, Heidelberg.
9. Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). *Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture*. *Frontiers in microbiology*, 8, 971.
10. Anderson, J. P., & Domsch, K. H. (1978). *A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils*. *Soil biology and biochemistry*, 10(3), 215-221.
11. Anderson, T. H., & Domsch, K. H. (1989). *Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils*. *Soil biology and biochemistry*, 21(4), 471-479.
12. Aronsson, A., Ingestad, T., & LÖÖF, L. G. (1976). *Carbohydrate metabolism and frost hardiness in pine and spruce seedlings grown at different photoperiods and thermoperiods*. *Physiologia Plantarum*, 36(2), 127-132.
13. Asuar, L. E. (2007). *Guía práctica sobre la técnica de PCR*. *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, 574p.
14. Babu-Khan, S., Yeo, T. C., Martin, W. L., Duron, M. R., Rogers, R. D., & Goldstein, A. H. (1995). *Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(3), 972-978.
15. Babu, G. R. V., Wolfram, J. H., Marian, J. M., & Chapatwala, K. D. (1995). *Pseudomonas marginalis: its degradative capability on organic nitriles and amides*. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(4), 739-745.
16. Eglezos, S., & Dykes, G. (2014). *Bacillus cereus*. In *Encyclopedia of Meat Sciences*, 324-329.
17. Badalucco, L., Nannipieri, P., Grego, S., & Ciardi, C. (1990). *Microbial biomass and anthrone-reactive carbon in soils with different organic matter contents*. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(7), 899-904.
18. Baldock, J. A., & Nelson, P. N. (2000). *Handbook of soil science*. CRC Press, Boca Raton FL, B25.
19. Bardgett, R. D., Freeman, C., & Ostle, N. J. (2008). *Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks*. *The ISME journal*, 2(8), 805.
20. Beltrán-Pineda, M. E. B. (2014). *La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113.
21. Bertani, G. (1951). *Studies on lysogenesis I.: the mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62(3), 293.

22. Bertilsson, S., Berglund, O., Karl, D. M., & Chisholm, S. W. (2003). *Elemental composition of marine Prochlorococcus and Synechococcus: Implications for the ecological stoichiometry of the sea*. *Limnology and oceanography*, 48(5), 1721-1731.
23. Bigat, T. K., & Saifer, A. (1972). *Some Methodological Modifications of the Technicon" SMA 12/60 AutoAnalyzer" System*. *Clinical chemistry*, 18(7), 630-642.
24. Bonfield, J. K., & Staden, R. (1995). *The application of numerical estimates of base calling accuracy to DNA sequencing projects*. *Nucleic acids research*, 23(8), 1406-1410.
25. Bremner, J. M. (1996). *Nitrogen-total*. *Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods*, 5, 1085-1121.
26. Brock, T. D., & Madigan, M. T. (1993). *Microbiología*. Prentice-Hall Hispanoamericana.
27. Brookes, P. C., Landman, A., Pruden, G., & Jenkinson, D. S. (1985). *Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil*. *Soil biology and biochemistry*, 17(6), 837-842.
28. Buckingham, K. J., Lee, C., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Dent, K. M., & Shendure, J. (2010). *Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder*. *Nature genetics*, 42(1), 30.
29. Bünemann, E. K., Prusisz, B., & Ehlers, K. (2011). *Characterization of phosphorus forms in soil microorganisms*. In *Phosphorus in Action*. Springer, Berlin, Heidelberg, 37-57.
30. Bünemann, E. K., Prusisz, B., & Ehlers, K. (2011). *Characterization of phosphorus forms in soil microorganisms*. In *Phosphorus in Action* (pp. 37-57). Springer, Berlin, Heidelberg.
31. Burns, R. G. (1982). *Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology*. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(5), 423-427.
32. Burns, R. G., & Dick, R. P. (Eds.). (2002). *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. CRC press.
33. Bushway, R. J., & Wilson, A. M. (1982). *Determination of α - and β -carotene in fruit and vegetables by HPLC*. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J*, 15(3), 165-169.
34. Campbell, J. L., Soccia, A. M., & Templer, P. H. (2014). *Increased nitrogen leaching following soil freezing is due to decreased root uptake in a northern hardwood forest*. *Global Change Biology*, 20(8), 2663-2673.
35. Campbell, J. L., Soccia, A. M., & Templer, P. H. (2014). *Increased nitrogen leaching following soil freezing is due to decreased root uptake in a northern hardwood forest*. *Global Change Biology*, 20(8), 2663-2673.
36. Cavellier, J. (1992). *Fine-root biomass and soil properties in a semideciduous and a lower montane rain forest in Panama*. *Plant and Soil*, 142(2), 187-201.
37. Cavellier, J., & Mejia, C. A. (1990). *Climatic factors and tree stature in the elfin cloud forest of Serrania de Macuira, Colombia*. *Agricultural and Forest Meteorology*, 53(1-2), 105-123.
38. Cerón-Rincón L. & Aristizábal-Gutiérrez A. (2012). *Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14 (1): 285-295.
39. Cerritos, R., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Herrera-Estrella, L., Alcaraz-Peraza, L. D., Arvizu-Gomez, J. L., & Souza, V. (2008). *Bacillus coahuilensis* sp. nov., a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(4), 919-923.
40. Chadwick, O. A., Derry, L. A., Vitousek, P. M., Huebert, B. J., & Hedin, L. O. (1999). *Changing sources of nutrients during four million years of ecosystem development*. *Nature*, 397(6719), 491.
41. Challenger, A. (1998). *Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México, pasado, presente y futuro*. México: CONABIO-IB-UNAM-Agrupación Sierra Madre.
42. Chen, C. R., Condon, L. M., Davis, M. R., & Sherlock, R. R. (2003). *Seasonal changes in soil phosphorus and associated microbial properties under adjacent grassland and forest in New Zealand*. *Forest Ecology and Management*, 177(1-3), 539-557.
43. Chesters, C. G. C., & Thornton, R. H. (1956). *A comparison of techniques for isolating soil fungi*. *Transactions of the British Mycological Society*, 39(3), 301-313.
44. Claus, D. & Berkeley, R.C.W. (1986) *Genus Bacillus Cohn 1872, 174AL*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ed. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, 1105 1139.
45. Cleveland, C. C., & Liptzin, D. (2007). *C: N: P stoichiometry in soil: is there a "Redfield ratio" for the microbial biomass?* *Biogeochemistry*, 85(3), 235-252.
46. Cleveland, C. C., & Townsend, A. R. (2006). *Nutrient additions to a tropical rain forest drive substantial soil carbon dioxide loss to the atmosphere*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10316-10321.
47. Cleveland, C. C., Townsend, A. R., & Schmidt, S. K. (2002). *Phosphorus limitation of microbial processes in moist tropical forests: evidence from short-term laboratory incubations and field studies*. *Ecosystems*, 5(7), 0680-0691.

48. CONABIO-CONANP (2007). *Análisis de vacíos y omisiones en conservación de la biodiversidad terrestre de México: espacios y especies*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, The Nature Conservancy-Programa México, Pronatura, A.C., Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México City, México.
49. Corrales, A., Turner, B. L., Tedersoo, L., Anslan, S., & Dalling, J. W. (2017). *Nitrogen addition alters ectomycorrhizal fungal communities and soil enzyme activities in a tropical montane forest*. *Fungal Ecology*, 27, 14-23.
50. Coyne, M. S. (1999). *Soil microbiology: an exploratory approach*. New York: Delmar.
51. Cross, A. F., & Schlesinger, W. H. (1995). *A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems*. *Geoderma*, 64(3-4), 197-214.
52. Cross, A. F., & Schlesinger, W. H. (2001). *Biological and geochemical controls on phosphorus fractions in semiarid soils*. *Biogeochemistry*, 52(2), 155-172.
53. Curiel Yuste, J., Fernandez-Gonzalez, A. J., Fernandez-Lopez, M., Ogaya, R., Penuelas, J., & Lloret, F. (2014). *Functional diversification within bacterial lineages promotes wide functional overlapping between taxonomic groups in a Mediterranean forest soil*. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 54-67.
54. Cusack, D. F., Silver, W. L., Torn, M. S., Burton, S. D., & Firestone, M. K. (2011). *Changes in microbial community characteristics and soil organic matter with nitrogen additions in two tropical forests*. *Ecology*, 92(3), 621-632.
55. Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A. M., Brewer, T. E., Benavent-González, A., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., & Fierer, N. (2018). *A global atlas of the dominant bacteria found in soil*. *Science*, 359(6373), 320-325.
56. De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N., & Verstraete, W. (2013). *Influence of temperature on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 1335-1347.
57. Deneff, K., Roobroeck, D., Wadu, M. C. M., Lootens, P., & Boeckx, P. (2009). *Microbial community composition and rhizodeposit-carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils*. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(1), 144-153.
58. Devi, N. B., & Yadava, P. S. (2006). *Seasonal dynamics in soil microbial biomass C, N and P in a mixed-oak forest ecosystem of Manipur, North-east India*. *Applied Soil Ecology*, 31(3), 220-227.
59. Doolittle, W. F., & Papke, R. T. (2006). *Genomics and the bacterial species problem*. *Genome biology*, 7(9), 1-7.
60. Dussart-Baptista, L., Bodilis, J., Barry, S., Frébourg, N., Fournier, M., Dupont, J. P., & Jouenne, T. (2007). *Recurrent recovery of Pseudomonas oryzihabitans strains in a karstified chalk aquifer*. *Water research*, 41(1), 111-117.
61. Ellis, R. J., Morgan, P., Weightman, A. J., & Fry, J. C. (2003). *Cultivation-dependent and-independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(6), 3223-3230.
62. Elser, J. J., Sterner, R. W., Gorokhova, E. A., Fagan, W. F., Markow, T. A., Cotner, J. B., ... & Weider, L. W. (2000). *Biological stoichiometry from genes to ecosystems*. *Ecology Letters*, 3(6), 540-550.
63. Estrada, Y. Q., Luna, R. A., & Escalante, T. (2012). *Patrones de distribución de los mamíferos en la provincia Oaxaca-Tehuacanense, México*. *Therya*, 3(1), 33-51.
64. Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., & Green, P. (1998). *Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment*. *Genome research*, 8(3), 175-185.
65. Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. (2008). *The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles*. *Science*, 320(5879), 1034-1039.
66. Fernández L, Zalba P, Gómez M, Sagardoy M (2005). *Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera*. *CI. Suelo (Argentina)* 23 (1): 3137.
67. Ferreira, A. S., Espindola, S. P., & Campos, M. R. C. (2016). *Assessment and kinetics of soil phosphatase in Brazilian Savanna systems*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88, 1035-1044.
68. Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2007). *Toward an ecological classification of soil bacteria*. *Ecology*, 88(6), 1354-1364.
69. Fierer, N., Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Zaneveld, J., Bradford, M. A., & Knight, R. (2012). *Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients*. *The ISME journal*, 6(5), 1007.
70. Fierro, F. F. (2014). *Electroforesis de ADN*. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 27.
71. Fioretto, A., Papa, S., Pellegrino, A., & Ferrigno, A. (2009). *Microbial activities in soils of a Mediterranean ecosystem in different successional stages*. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(10), 2061-2068.
72. Foster, R. C. (1988). *Microenvironments of soil microorganisms*. *Biology and fertility of soils*, 6(3), 189-203.

73. Fox, T. R. (1995). *The influence of low-molecular-weight organic acids on properties and processes in forest soils*. Carbon forms and functions in forest soils, 43-62.
74. Freney, J. E. A. N., Hansen, W., Etienne, J., Vandenesch, F., & Fleurette, J. (1988). *Postoperative infant septicemia caused by Pseudomonas luteola (CDC group Ve-1) and Pseudomonas oryzihabitans (CDC group Ve-2)*. Journal of Clinical Microbiology, 26(6), 1241-1243.
75. Fukushima, T., Horike, S., Inubushi, Y., Nakagawa, K., Kubota, Y., Takata, M., & Kitagawa, S. (2010). *Solid Solutions of Soft Porous Coordination Polymers: Fine-Tuning of Gas Adsorption Properties*. Angewandte Chemie International Edition, 49(28), 4820-4824.
76. Fulthorpe, R. R., Roesch, L. F., Riva, A., & Triplett, E. W. (2008). *Distantly sampled soils carry few species in common*. The ISME journal, 2(9), 901-910.
77. Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2011). *A global census of nitrogenase diversity*. Environmental Microbiology, 13(7), 1790-1799.
78. Garavito, N. T., Álvarez, E., Caro, S. A., Murakami, A. A., Blundo, C., Espinoza, T. B., ... & León, B. (2012). *Evaluación del estado de conservación de los bosques montanos en los Andes tropicales*. Revista Ecosistemas, 21(1-2).
79. García, E. (1998). *Climas (Clasificación de Köppen, modificada por García) Escala 1: 1 000 000*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, DF, México.
80. García-Oliva, F., Tapia-Torres, Y., Montiel-Gonzalez, C., & Perroni-Ventura, Y. (2018). *Carbon, Nitrogen, and Phosphorus in Terrestrial Pools: Where are the Main Nutrients Located in the Grasslands of the Cuatro Ciénegas Basin?* In Ecosystem Ecology and Geochemistry of Cuatro Cienegas (pp. 1-13). Springer, Cham.
81. Gardi, C., Angelini, M., Barceló, S., Comerma, J., Cruz Gaistardo, C., Encina Rojas, A. & Muñiz Ugarte, O. (2014). *Atlas de suelos de America Latina y el Caribe*. Luxembourg: Comisión Europea, Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2014.
82. Goldstein, A. H., & Liu, S. T. (1987). *Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from Erwinia herbicola*. Bio/technology, 5(1), 72-74.
83. Gordon, D., Abajian, C., & Green, P. (1998). *Consed: a graphical tool for sequence finishing*. Genome research, 8(3), 195-202.
84. Gower, S. T. (2003). *Patterns and mechanisms of the forest carbon cycle*. Annual Review of Environment and Resources, 28(1), 169-204.
85. Grandy, A. S., Strickland, M. S., Lauber, C. L., Bradford, M. A., & Fierer, N. (2009). *The influence of microbial communities, management, and soil texture on soil organic matter chemistry*. Geoderma, 150(3-4), 278-286.
86. Gray, M. W., Sankoff, D., & Cedergren, R. J. (1984). *On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA*. Nucleic Acids Research, 12(14), 5837-5852.
87. H. Ayuntamiento de Santiago Comaltepec; Ixtlán, Oaxaca, (2011). *Plan Municipal de Desarrollo Urbano de Santiago Comaltepec; Ixtlán, Oaxaca*.
88. Hedley, M. J., & Stewart, J. W. B. (1982). *Method to measure microbial phosphate in soils*. Soil Biology and Biochemistry, 14(4), 377-385.
89. Henrot, J., & Robertson, G. P. (1994). *Vegetation removal in two soils of the humid tropics: effect on microbial biomass*. Soil biology and Biochemistry, 26(1), 111-116.
90. Hermans, S. M., Buckley, H. L., Case, B. S., Curran-Courmane, F., Taylor, M., & Lear, G. (2017). *Bacteria as emerging indicators of soil condition*. Applied and environmental microbiology, 83(1), e02826-16.
91. Hernández Aquino, S. (2015). *Diagnóstico del estado de conservación del Bosque Mesófilo de Montaña en la Sierra Norte de Oaxaca y estudio de caso de la comunidad chinanteca de Santiago Comaltepec*. Universidad de Sherbrooke, Manizales, Colombia.
92. Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., & Eijsink, V. (2012). *Novel enzymes for the degradation of cellulose*. Biotechnology for biofuels, 5(1), 1-13.
93. Horwath, W. R. (2017). *The role of the soil microbial biomass in cycling nutrients*. Microbial Biomass (World Scientific Europe, 2016), 41-66.
94. Huffman jr, E. W. (1977). *Performance of a new automatic carbon dioxide coulometer*. Microchemical Journal, 22(4), 567-573.
95. Idriss, E. E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H. & Borriss, R. (2002). *Extracellular phytase activity of Bacillus amyloliquefaciens FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effecta*. Microbiology, 148(7), 2097-2109.
96. Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., & Yamanaka, S. (1998). *Isolation of myxobacteria from the marine environment*. FEMS microbiology letters, 169(2), 317-322.

97. INEGI (2005). *Anuario Estadístico del Estado de Oaxaca*. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, Oaxaca, México.
98. Insam, H., & Domsch, K. H. (1988). Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. *Microbial ecology*, 15(2), 177-188.
99. Janssens, D., Arahál, D. R., Bizet, C., & Garay, E. (2010). *The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research*. *Research in microbiology*, 161(6), 422-429.
100. Jenkinson, D.S. & J.N. Lad. (1981). *Microbial biomass in soil: Measurement and turnover*. In: *Soil Biochemistry*. (Eds.): E.A. Paul and J.N. Ladd, Vol. 5, Marcel Dekker, New York, 415-471.
101. Jobbágy, E. G., & Jackson, R. B. (2000). *The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation*. *Ecological applications*, 10(2), 423-436.
102. Joergensen, R. G., & Mueller, T. (1996). *The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the k_{EN} value*. *Soil biology and biochemistry*, 28(1), 33-37.
103. Johnson, A. H., Frizano, J., & Vann, D. R. (2003). *Biogeochemical implications of labile phosphorus in forest soils determined by the Hedley fractionation procedure*. *Oecologia*, 135(4), 487-499
104. Jones, D. L., & Willett, V. B. (2006). *Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil*. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5), 991-999.
105. Kaiser, E. A., Mueller, T., Joergensen, R. G., Insam, H., & Heinemeyer, O. (1992). *Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter*. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(7), 675-683.
106. Kim, J. S., Sparovek, G., Longo, R. M., De Melo, W. J., & Crowley, D. (2007). *Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon*. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 684-690.
107. Koch, R. (1881). *Methods for the study of pathogenic organisms*. *Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, 2, 1-88.
108. Kolbert, C. P., & Persing, D. H. (1999). *Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens*. *Current opinion in microbiology*, 2(3), 299-305.
109. Kononova SV & Nesmeyanova MA (2002). *Phosphonates and their degradation by microorganisms*. *Biochemistry (Moscow)* 67(2): 184-195.
110. Lajtha, K., & Jarrell, W. M. (1999). *Soil phosphorus. Standard soil methods for long-term ecological research*. Oxford University Press, New York, 115-142.
111. Larkin, J. M., & Stokes, J. L. (1967). *Taxonomy of psychrophilic strains of Bacillus*. *Journal of Bacteriology*, 94(4), 889-895.
112. Layton, E. D., Barman, S., Wilburn, D. B., Krystle, K. Q., Smith, M. T., Altman, J. D., & Seshadri, C. (2021). *T Cells Specific for a Mycobacterial Glycolipid Expand after Intravenous Bacillus Calmette–Guérin Vaccination*. *The Journal of Immunology*, 206(6), 1240-1250.
113. Ledgard, S. F. (1989). *Nutrition, moisture and rhizobial strain influence isotopic fractionation during N₂ fixation in pasture legumes*. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(1), 65-68.
114. Leff, J. W., Wieder, W. R., Taylor, P. G., Townsend, A. R., Nemergut, D. R., Grandy, A. S., & Cleveland, C. C. (2012). *Experimental litterfall manipulation drives large and rapid changes in soil carbon cycling in a wet tropical forest*. *Global change biology*, 18(9), 2969-2979.
115. Liu, S. T., Lee, L. Y., Tai, C. Y., Hung, C. H., Chang, Y. S., Wolfram, J. H., ... & Goldstein, A. H. (1992). *Cloning of an Erwinia herbicola gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in Escherichia coli HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone*. *Journal of Bacteriology*, 174(18), 5814-5819.
116. Loladze, I., & Elser, J. J. (2011). *The origins of the Redfield nitrogen-to-phosphorus ratio are in a homeostatic protein-to-rRNA ratio*. *Ecology letters*, 14(3), 244-250.
117. López-Tévez, L. & Torres, C. (2006). *Medios de cultivo*. [online] Universidad Nacional del Nordeste. Available at: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf> [Accessed 3 Nov. 2018].
118. Madigan, M. T., & Martinko, J. (2005). *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edn.
119. Madsen E.L. 2011. *Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles*. *Current opinion in biotechnology*. 22(3): 456-464. doi: 10.1016/j.copbio.2011.01.008.
120. Maithani, K., Tripathi, R. S., Arunachalam, A., & Pandey, H. N. (1996). *Seasonal dynamics of microbial biomass C, N and P during regrowth of a disturbed subtropical humid forest in north-east India*. *Applied Soil Ecology*, 4(1), 31-37.
121. Manzoni, S., Taylor, P., Richter, A., Porporato, A., & Ågren, G. I. (2012). *Environmental and stoichiometric controls on microbial carbon-use efficiency in soils*. *New Phytologist*, 196(1), 79-91.

122. Martin, H. G., Ivanova, N., Kunin, V., Warnecke, F., Barry, K. W., McHardy, A. C., ... & Dalin, E. (2006). *Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities*. Nature biotechnology, 24(10), 1263.
123. Martínez, E., Fuentes, J. P., & Acevedo, E. (2008). *Carbono orgánico y propiedades del suelo*. Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal, 8(1), 68-96.
124. McGill, W. B., & Cole, C. V. (1981). *Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter*. Geoderma, 26(4), 267-286.
125. McGroddy, M. E., Daufresne, T., & Hedin, L. O. (2004). *Scaling of C: N: P stoichiometry in forests worldwide: Implications of terrestrial redfield-type ratios*. Ecology, 85(9), 2390-2401.
126. McKeague, J. A., Cheshire, M. V., Andreux, F., & Berthelin, J. (1986). *Organo-mineral complexes in relation to pedogenesis*. Interactions of soil minerals with natural organics and microbes, 17, 549-592.
127. Meentemeyer, V. (1978). *Macroclimate and lignin control of litter decomposition rates*. Ecology, 59(3), 465-472.
128. Melillo, J. M., Aber, J. D., & Muratore, J. F. (1982). *Nitrogen and lignin control of hardwood leaf litter decomposition dynamics*. Ecology, 63(3), 621-626.
129. Melo, V. S., Desjardins, T., Silva Jr, M. L., Santos, E. R., Sarrazin, M., & Santos, M. M. L. S. (2012). *Consequences of forest conversion to pasture and fallow on soil microbial biomass and activity in the eastern Amazon*. Soil Use and Management, 28(4), 530-535.
130. Miguel, A. A. R., Díaz, A. F. H., Encinas, C. V., Garibay-Orijel, R., & Truong, C. (2020). *Ectomycorrhizal fungi associated with Pinus patula and Quercus crassifolia in plantations reforested from clear*. Scientia FungRun.
131. Minderman, G. (1968). *Addition, decomposition and accumulation of organic matter in forests*. The Journal of Ecology, 355-362.
132. Mohn, W. W., Wilson, A. E., Bicho, P., & Moore, E. R. (1999). *Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids*. Systematic and applied microbiology, 22(1), 68-78.
133. Montiel-González, C., Tapia-Torres, Y., Souza, V., & García-Oliva, F. (2017). *The response of soil microbial communities to variation in annual precipitation depends on soil nutritional status in an oligotrophic desert*. PeerJ, 5, e4007.
134. Morón-Cruz JA (2014). *Degradación de N-fosfonometil glicina (glifosato) por bacterias edáficas de Cuatro Ciénegas, Coahuila*. (Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica). Instituto Tecnológico de Morelia.
135. Muñoz-Villers, L. E., & McDonnell, J. J. (2013). *Land use change effects on runoff generation in a humid tropical montane cloud forest region*. Hydrology and Earth System Sciences, 3543-3560.
136. Murphy, J. A. M. E. S., & Riley, J. P. (1962). *A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters*. Analytica chimica acta, 27, 31-36.
137. Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., & Tenover, R. C. (2009). *Manual of clinical microbiology*. 2003. American Society for Microbiology, Washington, DC.
138. Nair, U. S., Asefi, S., Welch, R. M., Ray, D. K., Lawton, R. O., Manoharan, V. S. & Pounds, J. A. (2008). *Biogeography of tropical montane cloud forests. Part II: Mapping of orographic cloud immersion*. Journal of Applied Meteorology and Climatology, 47(8), 2183-2197.
139. Nakamura, L. K. (1984). *Bacillus psychrophilus sp. nov.*, nom. rev. Int J Syst Bacteriol 34, 121-123.
140. Neal A, Blackwell M, Akkari E, Guyomar C, Clark I, Hirsch PR (2017). *Phylogenetic distribution, biogeography and the effects of land management upon bacterial nonspecific Acid phosphatase Gene diversity and abundance*. Plant Soil: 1-15.
141. Nelson, D. W., & Sommers, L. E. (1996). *Total carbon, organic carbon, and organic matter*. Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods, 5, 961-1010.
142. Nemergut, D. R., Cleveland, C. C., Wieder, W. R., Washenberger, C. L., & Townsend, A. R. (2010). *Plot-scale manipulations of organic matter inputs to soils correlate with shifts in microbial community composition in a lowland tropical rain forest*. Soil Biology and Biochemistry, 42(12), 2153-2160.
143. Ocio, J. A., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1991). *Field incorporation of straw and its effects on soil microbial biomass and soil inorganic N*. Soil Biology and Biochemistry, 23(2), 171-176.
144. Olander, L. P., & Vitousek, P. M. (2000). *Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability*. Biogeochemistry, 49(2), 175-191.
145. Osler, G. H., & Sommerkorn, M. (2007). *Toward a complete soil C and N cycle: incorporating the soil fauna*. Ecology, 88(7), 1611-1621.
146. Pacheco, L., & Bautista, L. (2001). *¿Son los helechos una alternativa en la alimentación?* Contactos, 42, 5-10.
147. Paredes-Mendoza M & Espinosa-Victoria D (2010). *Ácidos Orgánicos Producidos por Rizobacterias que Solubilizan Fosfato: Una Revisión Crítica*. Terra Latinoamericana 28 (1): 61-70.

148. Parton, W. J., Ojima, D. S., Cole, C. V., & Schimel, D. S. (1994). *A general model for soil organic matter dynamics: sensitivity to litter chemistry, texture and management*. Quantitative modeling of soil forming processes, 39, 147-167.
149. Paul, E. A. (2007). *Soil microbiology, ecology, and biochemistry in perspective*. In *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (pp. 3-24). Academic Press.
150. Paul, E.A. and Clark, F.E. (1989) *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, 272p.
151. Paul, E.A. and Clark, F.E. (1996). *Soil Microbiology and Biochemistry*. 2nd Edition, Academic Press, London.
152. Pemberton, J.M., Stephen, P.K. and Radomir, S. 1997. *Secreted enzymes of Aeromonas*. FEMS Microbiology Letters, 152 : 1-10
153. Pereira, F., Carneiro, J., Matthiesen, R., van Asch, B., Pinto, N., Gusmao, L., & Amorim, A. (2010). *Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences*. Nucleic acids research, 38(22), e203-e203.
154. Post, W. M., Emanuel, W. R., Zinke, P. J., & Stangenberger, A. G. (1982). *Soil carbon pools and world life zones*. Nature, 298(5870), 156.
155. Qualls, R. G., & Richardson, C. J. (2000). *Phosphorus enrichment affects litter decomposition, immobilization, and soil microbial phosphorus in wetland mesocosms*. Soil Science Society of America Journal, 64(2), 799-808.
156. Quinn JP, Kulakova AN, Cooley NA, McGrath J W (2007). *New ways to break an old bond: the bacterial carbon-phosphorus hydrolases and their role in biogeochemical phosphorus cycling*. Environmental microbiology 9(10): 2392-2400.
157. Radulovich, R. (2009). *Método gravimétrico para determinar in situ la humedad volumétrica del suelo*. Agronomía costarricense.
158. Ramirez, K. S., Craine, J. M., & Fierer, N. (2012). *Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes*. Global change biology, 18(6), 1918-1927.
159. Redfield, A. C. (1958). *The biological control of chemical factors in the environment*. American scientist, 46(3), 230A-221.
160. Reed, S. C., Cleveland, C. C., & Townsend, A. R. (2007). *Controls over leaf litter and soil nitrogen fixation in two lowland tropical rain forests*. Biotropica, 39(5), 585-592.
161. Reich, P. B., & Oleksyn, J. (2004). *Global patterns of plant leaf N and P in relation to temperature and latitude*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(30), 11001-11006.
162. Restrepo-Franco G, Marulanda-Moreno S, De la Fe-Pérez Y, Díaz-de la Osa A, LuciaBaldani V, Hernández-Rodríguez A (2014). *Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica*. Revista CENIC Ciencias Biológicas 46 (1): 63-76.
163. Ribbe, M., Gadkari, D., and Meyer, O. (1997) *N₂ fixation by Streptomyces thermoautotrophicus involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase*. J Biol Chem 272: 26627–26633.
164. Rivett, D. W., & Bell, T. (2018). *Abundance determines the functional role of bacterial phylotypes in complex communities*. Nature microbiology, 3(7), 767.
165. Robertson, G. P., Coleman, D. C., Sollins, P., & Bledsoe, C. S. (Eds.). (1999). *Standard soil methods for long-term ecological research* (Vol. 2). Oxford University Press on Demand.
166. Robson, J. P., & Berkes, F. (2011). *Exploring some of the myths of land use change: Can be rural to urban migration drive declines in biodiversity?* Global environmental change, 21(3), 844-854.
167. Robson, J.P. (2012). *Out-migration and commons management: social and ecological change in a high biodiversity region of Oaxaca, Mexico*. International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management, 5, pp.21-34.
168. Rocamora, I. N. (2015). *Alteraciones fisiológicas, metabólicas y de la composición de las poblaciones bacterianas de la microbiota de un suelo agrícola tras la aplicación de residuos orgánicos urbanos* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
169. Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A. D., & Triplett, E. W. (2007). *Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity*. The ISME journal, 1(4), 283-290.
170. Rosete-Vergés, F. A., Pérez-Damián, J. L., Villalobos-Delgado, M., Navarro-Salas, E. N., Salinas-Chávez, E., & Remond-Noa, R. (2014). *The progress of the deforestation in Mexico 1976-2007*. Maderas y bosques, 21-35.
171. Rzedowski, J. (1986) *Vegetación de México*. Mexico City: Editorial Limusa.
172. Rzedowski, J., & Huerta, L. (1978). *Vegetación de México*. Editorial limusa. México, DF.
173. Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). *Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review*. Life Sci Med Res, 21(1), 30.
174. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the national academy of sciences, 74(12), 5463-5467.

175. Sarathchandra, S. U., Perrott, K. W., & Littler, R. A. (1989). *Soil microbial biomass: influence of simulated temperature changes on size, activity and nutrient-content*. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(8), 987-993.
176. Schimel, J. P., & Bennett, J. (2004). *Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm*. *Ecology*, 85(3), 591-602.
177. Schimel, J. P., & Weintraub, M. N. (2003). *The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model*. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(4), 549-563.
178. Schimel, J., Balsler, T. C., & Wallenstein, M. (2007). *Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function*. *Ecology*, 88(6), 1386-1394.
179. Schlesinger, W. H. (1990). *Evidence from chronosequence studies for a low carbon-storage potential of soils*. *Nature*, 348(6298), 232.
180. Schlesinger, W. H. (2000). *Biogeoquímica: un análisis del cambio global*. Ariel.
181. Schlesinger, W. H., & Bernhardt, E. S. (2013). *Biogeochemistry: an analysis of global change*. Academic press.
182. Shen, C., Xiong, J., Zhang, H., Feng, Y., Lin, X., Li, X., & Chu, H. (2013). *Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain*. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 204-211.
183. Shen, J. W., Nemergut, D. R., Grandy, A. S., O'Neill, S. P., Wickings, K., Townsend, A. R., & Cleveland, C. C. (2012). *The effects of soil bacterial community structure on decomposition in a tropical rain forest*. *Ecosystems*, 15(2), 284-298.
184. Silva, G. B., Ionashiro, M., Carrara, T. B., Crivellari, A. C., Tiné, M. A., Prado, J., & Buckeridge, M. S. (2011). *Cell wall polysaccharides from fern leaves: evidence for a mannan-rich Type III cell wall in Adiantum raddianum*. *Phytochemistry*, 72(18), 2352-2360.
185. Silva, F. (2015). *Pseudomonas (Flavimonas) oryzihabitans*. *Revista chilena de infectología*, 32(4), 445-446.
186. Sinsabaugh, R. L., & Follstad Shah, J. J. (2012). *Ecoenzymatic stoichiometry and ecological theory*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 313-343.
187. Sinsabaugh, R. L., & Moorhead, D. L. (1994). *Resource allocation to extracellular enzyme production: a model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition*. *Soil biology and biochemistry*, 26(10), 1305-1311.
188. Sinsabaugh, R. L., Hill, B. H., & Shah, J. J. F. (2009). *Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment*. *Nature*, 462(7274), 795-798.
189. Smith, J. L., Paul, E. A., Bollag, J., & Stotzky, G. (1990). *The significance of soil microbial biomass estimations*. *Soil biochemistry*. Vol. 6, 357-396.
190. Soares, R. A., Roesch, L. F. W., Zanatta, G., de Oliveira Camargo, F. A., & Passaglia, L. M. P. (2006). *Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (Avena sativa) assessed by molecular and microbiological techniques*. *Applied Soil Ecology*, 33(3), 221-234.
191. Solorzano, L. (1969). *Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method 1 1 This research was fully supported by US Atomic Energy Commission Contract No. ATS (11-1) GEN 10, PA 20*. *Limnology and oceanography*, 14(5), 799-801.
192. Somerfield, P. J., Clarke, K. R., Warwick, R. M., & Dulvy, N. K. (2008). *Average functional distinctness as a measure of the composition of assemblages*. *ICES Journal of Marine Science*, 65(8), 1462-1468.
193. Sorenson LH (1983) *Size and persistence of the microbial biomass formed during the humification of glucose, hemicellulose, cellulose, and straw in soils containing different amounts of clay*. *Plant and Soil* 75:121-130
194. Sprent, J. I., & Sprent, P. (1990). *Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects*. *Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects*.
195. Stackebrandt, & Ebers (2006). *Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards*. *Microbiol. Today*, 33, 152-155.
196. Sterner, R. W., & Elser, J. J. (2002). *Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton university press.
197. Stott, D. E., Kassim, G., Jarrell, W. M., Martin, J. P., & Haider, K. (1983). *Stabilization and incorporation into biomass of specific plant carbons during biodegradation in soil*. *Plant and Soil*, 70(1), 15-26.
198. Swanson K.M., Petran R.L., Hanlin J.H. (2001). *Culture Methods for Enumeration of Microorganisms*. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 53-67.
199. Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1969). *Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity*. *Soil biology and biochemistry*, 1(4), 301-307.
200. Tabatabai, M. A., & Dick, W. A. (2002). *Enzymes in soil: research and developments in measuring activities*. *Enzymes in the environment: Activity, ecology, and applications*, 567-596.

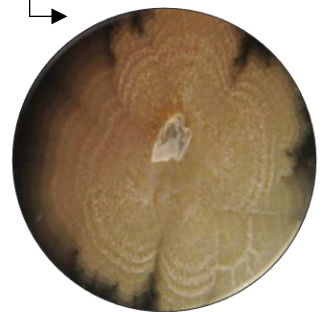
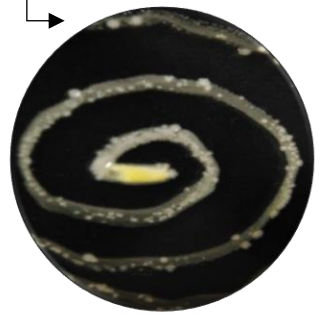
201. Tapia-Torres y García Oliva. (2016). *Fósforo: la nueva arista de la crisis global ambiental*. 20.oct.19, de Oikos Sitio web: <http://web.ecologia.unam.mx/oikos3.0/index.php/articulos/plantas-arvenses/8-articulos/182-fosforo-y-la-crisis-ambiental>.
202. Tapia-Torres Y, Rodríguez-Torres MD, Elser JJ, Islas A, Souza V, García-Oliva F, Olmedo-Álvarez G (2016). *How to live with phosphorus scarcity in soil and sediment: lessons from bacteria*. Appl Environ Microbiol 82:4652–4662.
203. Tapia-Torres, Y., & García-Oliva, F. (2013). *La disponibilidad del fósforo es producto de la actividad bacteriana en el suelo en ecosistemas oligotróficos: una revisión crítica*. Terra Latinoamericana, 31(3), 231-242.
204. Tapia-Torres, Y., Rodríguez-Torres, M. D., Elser, J. J., Islas, A., Souza, V., García-Oliva, F., & Olmedo-Álvarez, G. (2016). *How to live with phosphorus scarcity in soil and sediment: lessons from bacteria*. Applied and environmental microbiology, 82(15), 4652-4662.
205. Tedeschi, R., & De Paoli, P. (2011). *Collection and preservation of frozen microorganisms*. In Methods in biobanking. Humana Press, Totowa, NJ, 313-326.
206. Tiessen, H. J. W. B., Stewart, J. W. B., & Cole, C. V. (1984). *Pathways of phosphorus transformations in soils of differing pedogenesis I*. Soil Science Society of America Journal, 48(4), 853-858.
207. Tremblay, A., Therrien, J., Hamlin, B., Wichmann, E., & LeDrew, L. J. (2005). *GHG emissions from boreal reservoirs and natural aquatic ecosystems. In Greenhouse gas emissions—fluxes and processes*. Springer, Berlin, Heidelberg, 209-232.
208. Tremblay, A., Varfalvy, L., Garneau, M., & Roehm, C. (Eds.). (2005). *Greenhouse gas Emissions-Fluxes and Processes: hydroelectric reservoirs and natural environments*. Springer Science & Business Media.
209. Treonis, A. M., Ostle, N. J., Stott, A. W., Primrose, R., Grayston, S. J., & Ineson, P. (2004). *Identification of groups of metabolically-active rhizosphere microorganisms by stable isotope probing of PLFAs*. Soil Biology and Biochemistry, 36(3), 533-537.
210. Treseder, K. K., & Allen, M. F. (2002). *Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test*. New phytologist, 155(3), 507-515.
211. Treseder, K. K., & Vitousek, P. M. (2001). *Effects of soil nutrient availability on investment in acquisition of N and P in Hawaiian rain forests*. Ecology, 82(4), 946-954.
212. Turner, B. L., & Wright, S. J. (2014). *The response of microbial biomass and hydrolytic enzymes to a decade of nitrogen, phosphorus, and potassium addition in a lowland tropical rain forest*. Biogeochemistry, 117(1), 115-130.
213. Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). *An extraction method for measuring soil microbial biomass C*. Soil biology and Biochemistry, 19(6), 703-707.
214. Varela, G., & Grotiuz, G. (2008). *Fisiología y metabolismo bacteriano*. Uruguay, Editorial Cefa, 43-58.
215. Verchot, L. V., & Borelli, T. (2005). *Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme assays in degraded tropical soils*. Soil Biology and Biochemistry, 37(4), 625-633.
216. Vitousek, P. M., & Howarth, R. W. (1991). *Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur?* Biogeochemistry, 13(2), 87-115.
217. Vitousek, P. M., Cassman, K. E. N., Cleveland, C., Crews, T., Field, C. B., Grimm, N. B., ... & Sprent, J. I. (2002). *Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. In The nitrogen cycle at regional to global scales*. Springer, Dordrecht, 1-45.
218. Vos, M. (2011). *A species concept for bacteria based on adaptive divergence*. Trends in microbiology, 19(1), 1-7.
219. Walbridge, M. R. (1991). *Phosphorus availability in acid organic soils of the lower North Carolina coastal plain*. Ecology, 72(6), 2083-2100.
220. Walker, T. W., & Syers, J. K. (1976). *The fate of phosphorus during pedogenesis*. Geoderma, 15(1), 1-19.
221. Wall, D. H., Ritz, K., Six, J., Strong, D. R., & van der Putten, W. H. (2012). *Soil ecology and ecosystem services*. Oxford University Press.
222. Wardle, D. A. (1992). A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biological reviews*, 67(3), 321-358.
223. Wardle, D. A. (1998). *Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: a global-scale synthesis*. Soil Biology and Biochemistry, 30(13), 1627-1637.
224. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. Journal of bacteriology, 173(2), 697-703.
225. White, A. K., & Metcalf, W. W. (2007). *Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds*. Annu. Rev. Microbiol., 61, 379-400.
226. Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.
227. Wittmann, T., Bokoch, G. M., & Waterman-Storer, C. M. (2004). *Regulation of microtubule destabilizing activity of Op18/stathmin downstream of Rac1*. Journal of Biological Chemistry, 279(7), 6196-6203.

228. Wright, C. J., & Coleman, D. C. (2000). *Cross-site comparison of soil microbial biomass, soil nutrient status, and nematode trophic groups*. *Pedobiologia*, 44(1), 2-23.
229. Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., ... & Rosselló-Móra, R. (2014). *Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-645.
230. Yeates, G. W., & Saggiar, S. (1998). *Comparison of soil microbial properties and fauna under tussock-grassland and pine plantation*. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 28(3), 523-535.
231. Zak, D. R., Tilman, D., Parmenter, R. R., Rice, C. W., Fisher, F. M., Vose, J., & Martin, C. W. (1994). *Plant production and soil microorganisms in late-successional ecosystems: A continental-scale study*. *Ecology*, 75(8), 2333-2347.
232. Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M., & Steward, G. F. (2003). *Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison*. *Environmental microbiology*, 5(7), 539-554.
233. Zhang X. F., Zhao L., Xu Jr. S. J., Liu Y. Z., Liu H. Y., Cheng G. D. (2013) *Soil moisture effect on bacterial and fungal community in Beil River (Tibetan Plateau) permafrost soils with different vegetation types*. *Journal of Applied Microbiology*, 114 (4) : 1054-1065.
234. Zhao, N., He, N., Wang, Q., Zhang, X., Wang, R., Xu, Z., & Yu, G. (2014). *The altitudinal patterns of leaf C:N:P stoichiometry are regulated by plant growth form, climate and soil on Changbai Mountain, China*. *PloS one*, 9(4), e95196.
235. Zhu P., Chen R. S., Song Y. X., Han C. T., Liu G. X., Chen T., Zhang W. (2017). *Soil bacterial community composition tyoes in the middle section of the Qilian Mountains, China*. *Acta Ecologica Sinica*, 37 (10) : 3505-3514.

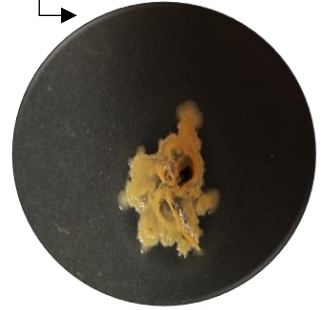
ANEXO I

Asignación taxonómica de especies bacterianas potenciales

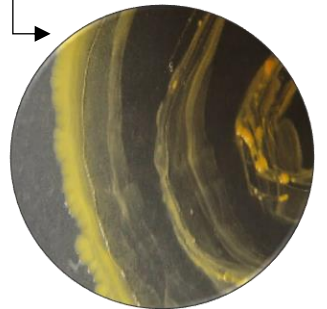
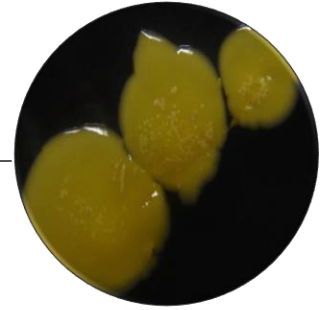
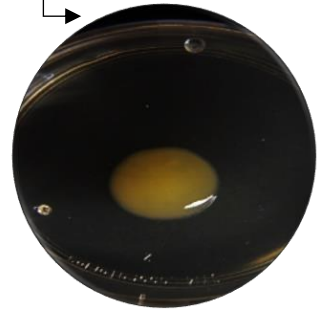
Contig	Especie potencial	Lugar de aislamiento	Acceso	Cobertura (%)	Identidad (%)
1.1	<i>Arthrobacter agilis</i>	Colección	NR_026198.1	100	98.45
1.2	<i>Arthrobacter pityocampae</i>	Turquía	NR_133969.1	100	97.79
1.3	<i>Arthrobacter echini</i>	Corea del sur	NR_148833.1	100	96.68
1.4	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	Japón	NR_041401.1	100	95.36
1.5	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	Corea del sur	NR_043546.1	100	95.35
1.6	<i>Arthrobacter pigmenti</i>	Biofilm	NR_042250.1	100	94.71
1.7	<i>Arthrobacter liuii</i>	Suelo	NR_134700.1	100	94.73
1.8	<i>Arthrobacter pokkalii</i>	Rizosfera	NR_149802.1	100	94.69
1.9	<i>Paenarthrobacter ilicis</i>	Colección	NR_026235.1	100	94.47
1.10	<i>Arthrobacter cupressi</i>	Suelo	NR_109302.1	100	94.26
2.1	<i>Sporosarcina globispora</i>	Colección	NR_113837.1	100	99.78
2.2	<i>Sporosarcina globispora</i>	Colección	NR_029233.1	100	99.78
2.3	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	Colección	NR_113752.1	100	99.57
2.4	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	Colección	NR_036942.1	100	99.57
2.5	<i>Filibacter limicola</i>	Colección	NR_042024.1	100	98.06
2.6	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	Colección	NR_118965.1	100	95.89
2.7	<i>Sporosarcina soli</i>	Suelo	NR_043527.1	100	96.54
2.8	<i>Sporosarcina koreensis</i>	Suelo	NR_043526.1	100	96.54
2.9	<i>Sporosarcina thermotolerans</i>	Desconocido	NR_116956.1	100	96.32
2.10	<i>Sporosarcina contaminans</i>	Desconocido	NR_116955.1	100	96.1
3.1	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	Colección	NR_042263.1	100	100
3.2	<i>Microbacterium murale</i>	Pared interior	NR_117603.1	100	99.47
3.3	<i>Microbacterium arthrosphaerae</i>	Heces	NR_117046.1	100	97.87
3.4	<i>Microbacterium sediminicola</i>	Mar	NR_112647.1	100	97.07
3.5	<i>Microbacterium flavescens</i>	Colección	NR_112001.1	100	97.07
3.6	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	Colección	NR_044935.1	100	96.81
3.7	<i>Microbacterium aureliae</i>	Medusa	NR_152652.1	100	96.81
3.8	<i>Microbacterium ginsengiterrae</i>	Ginseng	NR_116483.1	100	96.82
3.9	<i>Microbacterium natoriense</i>	Suelo	NR_042983.1	100	96.81
3.10	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	Pastos	NR_025405.1	100	96.81



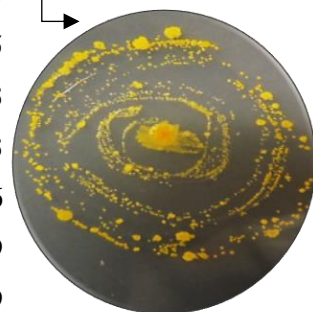
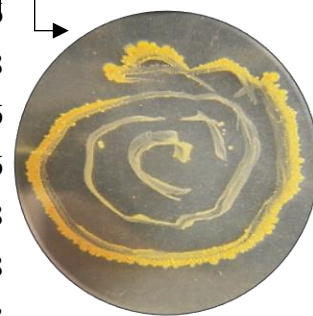
4.1	<i>Viridibacillus arenosi</i>	Suelo	NR_025628.1	100	98.22
4.2	<i>Viridibacillus arvi</i>	Suelo	NR_025627.1	100	97.93
4.3	<i>Rummeliibacillus suwonensis</i>	Suelo	NR_109749.1	100	97.63
4.4	<i>Rummeliibacillus pycnus</i>	Colección	NR_041521.1	100	97.63
4.5	<i>Kurthia zopfii</i>	Heces	NR_118296.1	100	97.33
4.6	<i>Kurthia zopfii</i>	Colección	NR_041522.1	100	97.33
4.7	<i>Kurthia zopfii</i>	Colección	NR_119003.1	100	97.03
4.8	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	Colección	NR_114270.1	100	97.03
4.9	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	Sala limpia	NR_043992.1	100	97.03
4.10	<i>Kurthia gibsonii</i>	Heces	NR_118298.1	100	96.44
5.1	<i>Viridibacillus arvi</i>	Suelo	NR_025627.1	100	97.93
5.2	<i>Viridibacillus arenosi</i>	Suelo	NR_025628.1	100	97.67
5.3	<i>Viridibacillus neidei</i>	Colección	NR_025029.1	100	95.61
5.4	<i>Rummeliibacillus pycnus</i>	Colección	NR_041521.1	100	95.09
5.5	<i>Kurthia senegalensis</i>	Microbioma	NR_144702.1	100	94.07
5.6	<i>Paenisporosarcina macmurdoensis</i>	Cianobacterias	NR_025573.1	100	93.8
5.7	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	Colección	NR_114270.1	100	93.8
5.8	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	Sala limpia	NR_043992.1	100	93.8
5.9	<i>Paenisporosarcina indica</i>	Suelo	NR_108473.1	100	93.54
5.10	<i>Paenisporosarcina antarctica</i>	Antártico	NR_044122.1	100	93.54
6.1	<i>Burkholderia thailandensis</i>	Colección	NR_118629.1	100	98.31
6.2	<i>Burkholderia thailandensis</i>	Colección	NR_074312.2	100	98.31
6.3	<i>Burkholderia thailandensis</i>	Agua	NR_116051.1	100	98.31
6.4	<i>Burkholderia thailandensis</i>	Colección	NR_027587.1	100	98.31
6.5	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Colección	NR_043553.1	100	98.03
6.6	<i>Burkholderia humptydoensis</i>	Colección	NR_152629.1	100	98.03
6.7	<i>Burkholderia mallei</i>	Colección	NR_074299.2	100	98.03
6.8	<i>Burkholderia mallei</i>	Colección	NR_041725.1	100	98.03
6.9	<i>Burkholderia plantarii</i>	Colección	NR_037064.2	100	97.18
6.10	<i>Burkholderia plantarii</i>	Nódulos	NR_118074.1	100	97.18



7.1	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	Resina acida	NR_041953.1	100	99.38
7.2	<i>Pseudomonas reinekei</i>	Colección	NR_042541.1	100	99.08
7.3	<i>Pseudomonas koreensis</i>	Suelo	NR_025228.1	99	98.93
7.4	<i>Pseudomonas turukhanskensis</i>	Suelo	NR_152710.1	99	98.92
7.5	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	Suelo	NR_043314.1	99	98.92
7.6	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	Colección	NR_113855.1	100	98.77
7.7	<i>Pseudomonas parafulva</i>	Colección	NR_104278.1	100	98.77
7.8	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	Bosque	NR_126220.1	100	98.62
7.9	<i>Pseudomonas parafulva</i>	Colección	NR_113856.1	99	98.76
7.10	<i>Pseudomonas parafulva</i>	Colección	NR_040859.1	99	98.76
8.1	<i>Pseudomonas zhaodongensis</i>	Suelo salino	NR_148295.1	100	99.66
8.2	<i>Pseudomonas songnenensis</i>	Colección	NR_103934.2	100	99.66
8.3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Suelo salino	NR_134795.1	100	99.66
8.4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Colección	NR_113652.1	100	99.66
8.5	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	Sedimento	NR_117756.1	100	99.66
8.6	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Colección	NR_041715.1	100	99.66
8.7	<i>Pseudomonas chloritidismutans</i>	Colección	NR_115115.1	100	99.66
8.8	<i>Pseudomonas balearica</i>	Colección	NR_025972.1	100	99.66
8.9	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Colección	NR_118798.1	100	99.66
8.10	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	Arcilla	NR_041044.1	100	99.49
9.1	<i>Pseudomonas songnenensis</i>	Suelo salino	NR_148295.1	100	99
9.2	<i>Pseudomonas zhaodongensis</i>	Suelo salino	NR_134795.1	100	97.84
9.3	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Colección	NR_037000.1	100	97.84
9.4	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Colección	NR_113653.1	100	97.67
9.5	<i>Pseudomonas chloritidismutans</i>	Colección	NR_115115.1	100	97.51
9.6	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Colección	NR_114478.1	100	97.34
9.7	<i>Pseudomonas entomophila</i>	Colección	NR_102854.1	100	97.51
9.8	<i>Pseudomonas flavescens</i>	Colección	NR_114195.1	100	97.51
9.9	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Colección	NR_113617.1	100	97.34
9.10	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	Sedimento	NR_117756.1	100	97.51



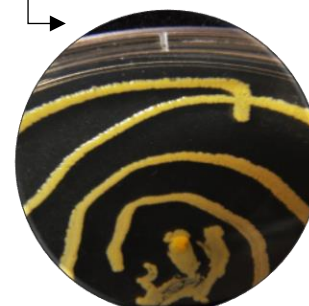
10.1	<i>Pseudomonas grimontii</i>	Colección	NR_025102.1	100	98.86
10.2	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Colección	NR_043935.1	100	98.86
10.3	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Colección	NR_112072.1	100	98.78
10.4	<i>Pseudomonas veronii</i>	Agua mineral	NR_028706.1	100	98.86
10.5	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	Agua mineral	NR_024911.1	100	98.86
10.6	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Colección	NR_114473.1	100	98.78
10.7	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Colección	NR_119340.1	100	98.78
10.8	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Colección	NR_164626.1	100	98.78
10.9	<i>Pseudomonas prosekii</i>	Colección	NR_132724.1	100	98.78
10.10	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Colección	NR_117821.1	100	98.78
11.1	<i>Lysobacter agri</i>	Suelo	NR_145550.1	100	98.73
11.2	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Clínicos	NR_028930.1	100	98.37
11.3	<i>Stenotrophomonas bentonitica</i>	Bentos	NR_157765.1	100	98.18
11.4	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Raíz	NR_121739.1	100	98.18
11.5	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i>	Ginseng	NR_117406.1	100	98.18
11.6	<i>Lysobacter enzymogenes</i>	Colección	NR_036925.1	100	98.18
11.7	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	Biopelícula	NR_148818.1	100	97.64
11.8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Colección	NR_113648.1	100	97.64
11.9	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	Colección	NR_118008.1	100	97.64
11.10	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	Caña	NR_116793.1	100	97.64
12.1	<i>Planococcus salinus</i>	Suelo	NR_159342.1	99	97.00
12.2	<i>Planomicrobium soli</i>	Suelo salino	NR_134133.1	96	94.59
12.3	<i>Planococcus plakortidis</i>	Esponja	NR_109414.1	99	94.45
12.4	<i>Planococcus donghaensis</i>	Agua de mar	NR_044073.1	99	94.43
12.5	<i>Planococcus maritimus</i>	Agua de mar	NR_025247.1	99	94.43
12.6	<i>Planococcus antarcticus</i>	Cianobacterias	NR_025469.1	99	94.26
12.7	<i>Planococcus halocryophilus</i>	Permafrost	NR_118149.2	99	94.09
12.8	<i>Planococcus salinarum</i>	Solar salino	NR_116802.1	99	94.09
12.9	<i>Planococcus ruber</i>	Suelo	NR_157741.1	99	93.91
12.10	<i>Planococcus versutus</i>	Suelo	NR_156838.1	99	93.92



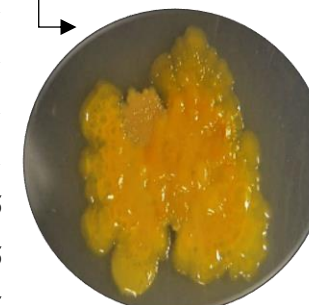
13.1	<i>Planomicrobium flavidum</i>	Solar salino	NR_116601.1	100	97.86
13.2	<i>Planococcus citreus</i>	Colección	NR_113814.1	100	97.69
13.3	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Algas	NR_025553.1	100	97.69
13.4	<i>Planomicrobium psychrophilum</i>	Cianobacterias	NR_028950.1	100	97.69
13.5	<i>Planococcus dechangensis</i>	Suelo salino	NR_148301.1	100	97.51
13.6	<i>Planomicrobium soli</i>	Suelo	NR_134133.1	100	97.51
13.7	<i>Planococcus salinarum</i>	Solar salino	NR_116802.1	100	97.51
13.8	<i>Planococcus maritimus</i>	Agua de mar	NR_025247.1	100	97.51
13.9	<i>Planomicrobium mcmeekinii</i>	Antártico	NR_024881.1	100	97.51
13.10	<i>Planococcus salinus</i>	Suelo salino	NR_159342.1	100	97.33



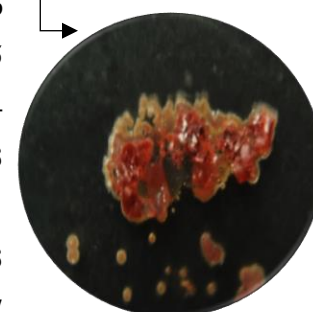
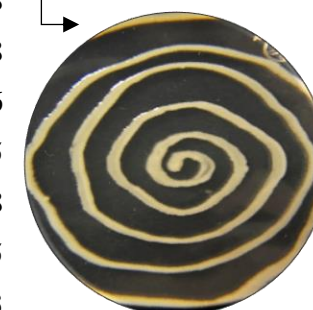
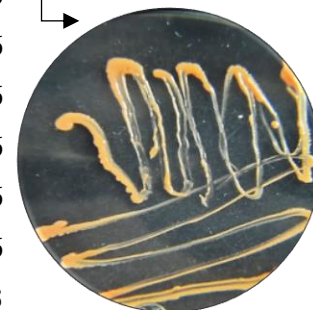
14.1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Raíz	MN421356.1	100	100
14.2	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Raíz	MN421196.1	100	100
14.3	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Raíz	MN421195.1	100	100
14.4	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Raíz	MN421193.1	100	100
14.5	<i>Stenotrophomonas sp</i>	Suelo	MK967821.1	100	100
14.6	<i>Stenotrophomonas sp</i>	Raíz	MK905493.1	100	100
14.7	<i>Stenotrophomonas sp</i>	Río	MH885483.1	100	100
14.8	<i>Stenotrophomonas sp</i>	Colección	MK828188.1	100	100
14.9	<i>Stenotrophomonas sp</i>	Sedimento	MH231460.1	100	100
14.10	<i>Stenotrophomonas sp</i>	Colección	MK737108.1	100	100



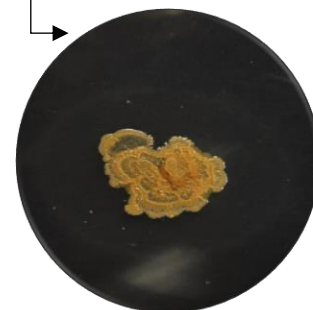
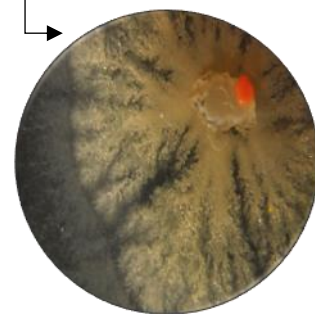
15.1	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	Colección	NR_025881.1	100	99.32
15.2	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Colección	NR_114226.1	100	99.01
15.2	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	Colección	NR_116172.1	100	99.01
15.3	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Colección	NR_024662.1	100	99.01
15.4	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	Suelo	NR_029063.1	100	99.01
15.6	<i>Pseudomonas monteilii</i>	Colección	NR_114224.1	100	98.85
15.7	<i>Pseudomonas monteilii</i>	Colección	NR_112073.1	100	98.85
15.8	<i>Pseudomonas monteilii</i>	Clínicos	NR_024910.1	100	98.85
15.9	<i>Pseudomonas graminis</i>	Pastos	NR_026395.1	99	98.85
15.10	<i>Pseudomonas entomophila</i>	Suelo	NR_102854.1	100	98.68



16.1	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Mantillo	NR_117821.1	100	99.96
16.2	<i>Pseudomonas trivialis</i>	Filiosfora	NR_028987.1	100	99.86
16.3	<i>Pseudomonas poae</i>	Filiosfora	NR_028986.1	100	99.86
16.4	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	Antártico	NR_114911.1	100	99.86
16.5	<i>Pseudomonas meridiana</i>	Antártico	NR_025587.1	100	99.86
16.6	<i>Pseudomonas antarctica</i>	Antártico	NR_025586.1	100	99.86
16.7	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	Agua	NR_025174.1	100	99.86
16.8	<i>Pseudomonas veronii</i>	Agua mineral	NR_028706.1	100	99.73
16.9	<i>Pseudomonas constantinii</i>	Hongo	NR_025164.1	100	99.59
16.10	<i>Pseudomonas veronii</i>	Colección	NR_112075.1	100	99.59
17.1	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	Colección	NR_113752.1	100	99.77
17.2	<i>Sporosarcina globispora</i>	Colección	NR_113837.1	100	99.08
17.3	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	Colección	NR_036942.1	100	99.08
17.4	<i>Sporosarcina globispora</i>	Colección	NR_029233.1	100	98.86
17.5	<i>Sporosarcina globispora</i>	Colección	NR_118912.1	100	97.25
17.6	<i>Filibacter limicola</i>	Colección	NR_042024.1	100	97.48
17.7	<i>Sporosarcina soli</i>	Suelo	NR_043527.1	100	97.25
17.8	<i>Planococcus halocryophilus</i>	Permafrost	NR_118149.2	100	97.03
17.9	<i>Paenisporosarcina indica</i>	Suelo	NR_108473.1	100	97.03
17.10	<i>Sporosarcina koreensis</i>	Suelo	NR_043526.1	100	97.03
18.1	<i>Pseudomonas koreensis</i>	Suelo	NR_025228.1	100	99.57
18.1	<i>Pseudomonas baetica</i>	Pescado	NR_116899.1	100	99.36
18.3	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	Suelo	NR_043314.1	100	99.15
18.4	<i>Pseudomonas umsongensis</i>	Suelo	NR_025227.1	100	99.14
18.5	<i>Pseudomonas jessenii</i>	Agua mineral	NR_024918.1	100	98.93
18.6	<i>Pseudomonas reinekei</i>	Colección	NR_042541.1	100	99
18.7	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	Bosque	NR_126220.1	100	98.93
18.8	<i>Pseudomonas mohnii</i>	Colección	NR_042543.1	100	98.57
18.9	<i>Pseudomonas lutea</i>	Rizosfera	NR_029103.1	100	98.79
18.10	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	Resina acida	NR_041953.1	100	98.79

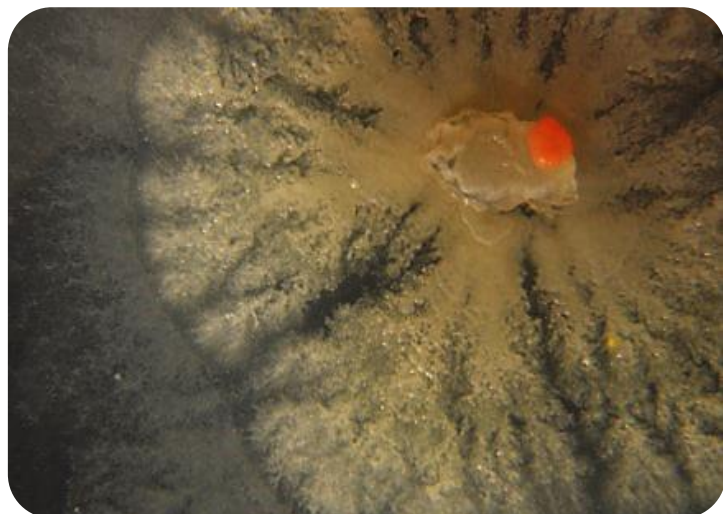


19.1	<i>Bacillus mycoides</i>	Colección	NR_113990.1	100	100
19.2	<i>Bacillus mycoides</i>	Colección	NR_115993.1	100	100
19.3	<i>Bacillus mycoides</i>	Colección	NR_024697.1	100	100
19.4	<i>Bacillus mycoides</i>	Colección	NR_036880.1	100	100
19.5	<i>Bacillus wiedmannii</i>	Leche cruda	NR_152692.1	100	99.63
19.6	<i>Bacillus pacificus</i>	Colección	NR_157733.1	100	99.4
19.7	<i>Bacillus mobilis</i>	Colección	NR_157731.1	100	99.26
19.8	<i>Bacillus paranthracis</i>	Colección	NR_157728.1	100	99.26
19.9	<i>Bacillus proteolyticus</i>	Colección	NR_157735.1	100	99.26
19.10	<i>Bacillus toyonensis</i>	Suelo	NR_121761.1	100	99.26
20.1	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Colección	NR_114481.1	99	99.93
20.2	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Colección	NR_114227.1	99	99.93
20.3	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Hongo	NR_041799.1	99	99.93
20.4	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Hoja dañada	NR_117823.1	99	99.86
20.5	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Colección	NR_114595.1	99	99.79
20.6	<i>Pseudomonas lurida</i>	Filiosfora	NR_042199.1	99	99.71
20.7	<i>Pseudomonas costantinii</i>	Hongo	NR_025164.1	99	99.71
20.8	<i>Pseudomonas palleroniana</i>	Arroz	NR_029050.1	99	99.57
20.9	<i>Pseudomonas poae</i>	Filiosfora	NR_028986.1	99	99.5
20.20	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Colección	NR_115613.1	99	99.43



ANEXO II

Especies bacterianas más ampliamente distribuidas en el suelo del Bosque Mesófilo de Montaña de Santiago Comaltepec, Oaxaca



Bacillus mycoides

El género *Bacillus* es considerado el más representativo del grupo de solubilizadores de fosfato (Layton *et al.*, 2013), y catalizadores de la biosíntesis de fosfonatos mediante la acción de fosfonatasas (Quinn *et al.*, 2007). *Bacillus mycoides* tiene la particularidad de formar cadenas no móviles con ácidos orgánicos desde la oxidación directa de la glucosa, ayudando a inhibir el crecimiento de bacterias y hongos dañinos a su alrededor (Claus & Berkeley, 1986). La forma de sus colonias responde a la concentración de nutrientes, exhibiendo filamentos alineados verticalmente en el sitio con mayor concentración de nutrientes, y posteriormente los filamentos tienen diferentes orientaciones debido a la variación de nutrientes en el medio (Eglezos & Dykes, 2014).

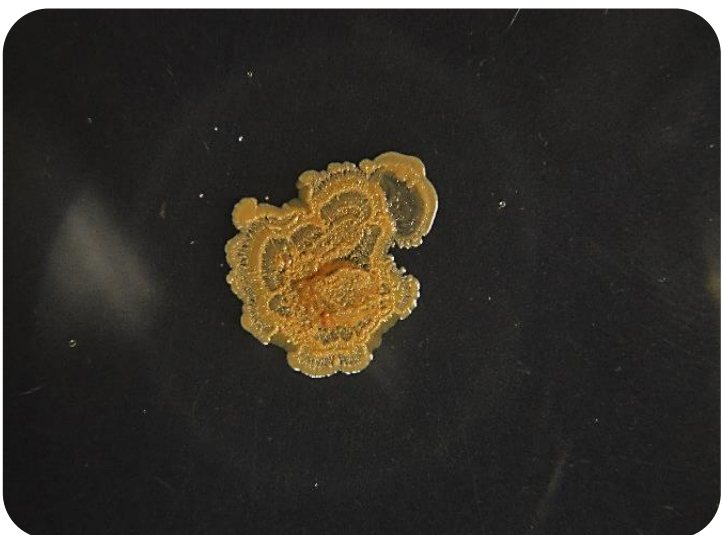
Sporosarcina psychrophila

Bacteria heterotrófica, Gram⁺ perteneciente al phylum *Firmicutes*, caracterizado por la formación de endosporas (Larkin & Stokes, 1967). Su metabolismo se basa en la respiración o fermentación, y puede reducir NO₃⁻ a NO₂⁻ durante la desnitrificación (Nakamura, 1984). Utiliza fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, ribosa, sacarosa, trehalosa, xilosa, acetato, fumarato, malato y succinato como fuente de C, más en condiciones anaeróbicas usa la glucosa. Similar a *Sporosarcina pasteurii*, *S. psychrophila* también puede producir carbonato de calcio (CaCO₃) por medio de la enzima ureasa (De Muynek *et al.*, 2013).



Pseudomonas oryzae

Se considera que *P. oryzae* es un agente saprófito, aislado típicamente de cultivos de arroz, suelos y aguas estancadas (Freney *et al.*, 1988). Se caracteriza por ser una bacteria estrictamente aerobia, Gram⁻ y de forma bacilar. Este microorganismo no fermenta la glucosa, ni reduce NO₃⁻ (Silva, 2015). Su metabolismo está restringido a un sistema respiratorio aeróbico, es oxidativa, pero no fermentativa (Dussart-Baptista *et al.*, 2007). En medios sólidos, en las primeras 24 h se puede observar a pequeñas colonias lisas, que de 48 a 72 h se tornan firmes, rugosas, de un tamaño entre 1-2 mm, con un pigmento amarillo característico (Silva, 2015).



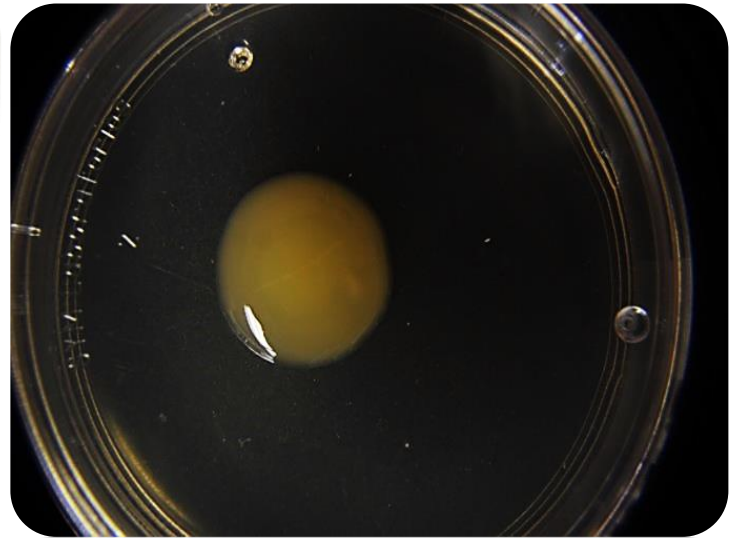


Pseudomonas tolaasii

Bacteria Gram⁻, que mediante la producción de la toxina tolaasina (Soler-Rivas *et al.*, 1999) causa la enfermedad de mancha bacteriana en hongos cultivados (*Agaricus bisporus*; Brodey, 1991). Esta enfermedad no es fácil de eliminar debido a que diferentes cepas de *P. tolaasii* producen síntomas variables de la enfermedad (Tajalipour *et al.*, 2015), pues *P. tolaasii* cuenta con la capacidad de modificar sus vías bioquímicas para sobrevivir en ambientes adversos (Nair & Fahy, 1973).

Pseudomonas vancouverensis

Bacteria aerobia estricta, Gram⁻, no formadoras de esporas, que se encuentra agrupada dentro de la subclase γ de las *Proteobacterias*. Fue aislada por primera vez del suelo del bosque en Vancouver, Canadá, donde se descubrió que puede crecer en ácidos de resina (Mohn *et al.*, 1999). Además, tiene una alta producción de enzimas y su viscosidad se ha sugerido que se debe a su alto contenido de lipopolisacárido (Pemberton *et al.*, 1997).



Pseudomonas marginalis

Las actividades específicas de las enzimas nitrilo aminohidrolasa y amidasa de *P. marginalis* han sido sugeridas como biodegradadoras de nitrilos orgánicos y bioproductoras de ácidos orgánicos, ya que ambas enzimas pueden hidrolizar una amplia gama de nitrilos y amidas. Esto debido a que esta bacteria cuenta con la capacidad de utilizar acetonitrilo (C_2H_3N) como única fuente de C y N, metabolizándolo en amoníaco y acetato. Además de que su sistema enzimático implicado en la hidrólisis del acetonitrilo es intracelular e inducible (Babu *et al.*, 1995).



ANEXO III
Tablas y figuras

Tabla 1. Estequiometría de nutrientes en sistemas de BMM y ecosistemas forestales de todo el mundo

Altitud m.s.n.m.	Estequiometría de nutrientes						Cita
	Totales			Microbianos			
	C:N	C:P	N:P	C:N	C:P	N:P	
910	10	138	15	12	58	5	Devi & Yadava, 2006
910	10	256	26	13	49	4	Devi & Yadava, 2006
1900	12	259	22	10	65	6	Maithani <i>et al.</i> , 1996
Consenso de ecosistemas forestales	15	212	15	8	74	9	Cleveland & Liptzin, 2007

Tabla 2. Compuestos utilizados para la preparación de medio de cultivo LB

Compuesto	Aporte	Nutrientes	Contribución al crecimiento microbiano	g/L	
				Medio rico (LB ⁺)	Medio pobre (LB ⁻)
Triptona	Péptidos y peptonas	N y C	Aminoácidos y energía	10 g	5.0 g
Extracto de levadura	Vitaminas y oligoelementos	Vitaminas del complejo B y aminoácidos.	Compuestos orgánicos nutricionales	5.0 g	2.5 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	Iones de Na ⁺	Na ⁺	Transporte y equilibrio osmótico	10 g	5.0 g
Agar*					

*A ambos medios de cultivo se agregó agar al 1.5% como componente solidificante

Tabla 3. Condiciones de PCR para diferentes concentraciones de Mg

Reactivos	Cantidad de reacciones (μL)					
	1		10		10	
	Concentración final de Mg (mM)					
	1.5		2		2.5	
Buffer	5	50	5	50	5	50
H ₂ O	36.8	368	35.8	358	34.8	348
Mg	3	30	4	40	5	50
dNTP's	1	10	1	10	1	10
27F	1.5	15	1.5	15	1.5	15
1492R	1.5	15	1.5	15	1.5	15
Polimerasa	0.2	2	0.2	2	0.2	2

*ADN

*Se agregó 1.0 μL del ADN correspondiente a cada una de las nueve muestras. A la reacción control no le fue agregado ADN

Tabla 4. Combinaciones realizadas para la técnica de PCR en gradiente

Combinación	Temperatura de alineación ($^{\circ}\text{C}$)	Concentración de Mg (mM)
1	52	1.5
2	52	2
3	52	2.5
4	54	1.5
5	54	2
6	54	2.5
* 7	56	1.5
8	56	2
9	56	2.5

*Combinación seleccionada

Tabla 5. Enzimas cuantificadas

Enzima	Sustrato	Función de la enzima	Producto	Nutriente	Referencia
β -glucosidasa (BG)	pNP-glucopiranoside	Despolimeriza celulosa	β -D-glucosa	C	Ljungdahl & Eriksson, 1985
Cellobiohidrolasa (CBH)	pNP-cellobioside	Despolimeriza celulosa	celobiosa	C	Ljungdahl & Eriksson, 1985
N-acetilglucosaminidasa (NAG)	pNP- β -N acetylglucosaminide	Despolimeriza quitina	glucosamina	C y N	Sinsabaugh, 2005
Fosfomonoesterasa (FM)	pNP-fosfate	Mineraliza P	OH + fosfato	P	Turner <i>et al.</i> , 2002
Fosfodiesterasa (FD)	pNP-fosfate	Mineraliza P	OH + fosfato	P	Toor <i>et al.</i> , 2003

pNP: paranitrofenol

Tabla 6. Unidades Formadoras de Colonias por medio de cultivo y sitio de muestreo

Medio de cultivo	Sitio		
	1	2	3
LB ⁺	13×10^4	5×10^6	4×10^6
LB ⁻	7×10^6	3×10^6	2×10^3

LB+: medio de cultivo rico en nutrientes, LB-: medio de cultivo Lb pobre en nutrientes

Tabla 7. Asignaciones taxonómicas

Contig	Cobertura (%)	Identidad (%)	Especie potencial	Sitio	Phyla
1	100	100	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	1	Actinobacteria
2	100	98.45	<i>Arthrobacter agilis</i>	3	
3	100	99.78	<i>Sporosarcina globispora</i>	1	Firmicutes
4	100	98.22	<i>Viridibacillus arenosi</i>	1	
5	100	97.93	<i>Viridibacillus arvi</i>	1	
6	100	97.86	<i>Planomicrobium flavidum</i>	3	
7	99	97	<i>Planococcus salinus</i>	1 y 3	
8	100	99.77	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	1,2 y 3	
9	100	100	<i>Bacillus mycoides</i>	1,2 y 3	
10	100	98.31	<i>Burkholderia thailandensis</i>	1	
11	100	99.66	<i>Pseudomonas sp.1</i>	1	γ -proteobacteria
12	100	99	<i>Pseudomonas songnenensis</i>	1	
13	100	98.86	<i>Pseudomonas sp.2</i>	1	
14	100	99.57	<i>Pseudomonas koreensis</i>	3	
15	100	98.73	<i>Lysobacter agri</i>	2 y 3	
16	100	100	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	2 y 3	
17	100	99.32	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1,2 y 3	
18	100	99.96	<i>Pseudomonas marginalis</i>	1,2 y 3	
19	100	99.38	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	1,2 y 3	
20	100	99.93	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	1,2 y 3	

Tabla 8. Media y desviación estándar (\pm sd) de la actividad enzimática del suelo para cada sitio de muestreo

Enzima	BG _P	CBH _P	NAG _P	FM _P	FD _P	p
Sitio						
1	0.1268 ^A (\pm 0.00)	0.0194 ^A (\pm 0.01)	0.1559 ^A (\pm 0.02)	1.4713 ^B (\pm 0.11)	0.0645 ^A (\pm 0.03)	<0.05
2	0.1504 ^A (\pm 0.04)	0.4175 ^A (\pm 0.46)	0.1782 ^A (\pm 0.02)	2.3671 ^B (\pm 0.74)	0.2537 ^A (\pm 0.21)	<0.05
3	0.0509 ^{A*} (\pm 0.02)	0.0349 ^A (\pm 0.02)	0.0415 ^{A*} (\pm 0.01)	1.5679 ^B (\pm 0.92)	0.1205 ^A (\pm 0.05)	<0.05
p	<0.05	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	

BG: β -Glucosidasa, CBH: Cellobiohidrolasa, NAG: N-acetilglucosaminidasa, FM: Fosfomonoesterasa, FD: Fosfodiesterasa

p: $\mu\text{mol pNP h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{SS}$

^{A, B o C} diferencias significativas ($p \leq 0.05$) dentro de cada sitio

* diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre sitios

Tabla 9. Media y desviación estándar (\pm sd) de la concentración de nutrientes para cada sitio de muestreo

Parámetro ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Sitio			p
	1	2	3	
CT	28.82 ^B (\pm 8.28)	53.44 ^A (\pm 29.66)	41.37 ^A (\pm 27.42)	>0.05
COD	117.43 ^A (\pm 33.80)	170.7 ^A (\pm 117.33)	103.36 ^A (\pm 20.92)	>0.05
Cmic	240.96 ^C (\pm 24.09)	891.67 ^B (\pm 316.25)	511.26 ^B (\pm 323.63)	>0.05
NT	1.98 ^B (\pm 0.22)	3.35 ^A (\pm 1.27)	2.82 ^A (\pm 1.02)	>0.05
NOD	6.51 ^B (\pm 2.91)	7.56 ^A (\pm 2.00)	4.23 ^A (\pm 2.53)	>0.05
Nmic	37.31 ^B (\pm 8.03)	60.38 ^A (\pm 24.84)	56.71 ^A (\pm 42.51)	>0.05
PT	0.12 ^B (\pm 0.02)	0.20 ^A (\pm 0.08)	0.12 ^A (\pm 0.04)	>0.05
POD	1.20 ^B (\pm 0.30)	1.35 ^A (\pm 0.40)	1.65 ^A (\pm 0.74)	>0.05
Pmic	6.41 ^B (\pm 2.44)	6.84 ^A (\pm 2.38)	11.11 ^A (\pm 4.50)	>0.05
p	<0.05	<0.05	<0.05	

CT:carbono total, COD: carbono orgánico disuelto, Cmic: carbono microbiano, NT: nitrógeno total, NOD: nitrógeno orgánico disuelto, Nmic: nitrógeno microbiano, PT: fósforo total, POD: fósforo orgánico disuelto, Pmic: fósforo microbiano

^{A, B o C} diferencias significativas ($p \leq 0.05$) dentro de cada sitio

* diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre sitios

Tabla 10. Media y desviación estándar (\pm sd) de los cocientes estequiométricos de nutrientes en el suelo y la biomasa microbiana para cada sitio de muestreo

Cociente ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Sitio			p
	1	2	3	
CT: PT	222.23 ^A (\pm 52.76)	248.68 ^A (\pm 64.53)	296.77 ^A (\pm 121.10)	>0.05
CT: NT	14.52 ^C (\pm 3.55)	14.96 ^C (\pm 3.98)	13.65 ^B (\pm 4.95)	>0.05
NT: PT	15.36 ^C (\pm 0.93)	16.64 ^C (\pm 0.18)	21.48 ^{B*} (\pm 2.03)	<0.05
COD: POD	100.80 ^B (\pm 34.29)	103.78 ^{BC} (\pm 52.02)	71.93 ^B (\pm 34.90)	>0.05
COD: NOD	21.64 ^C (\pm 12.84)	26.81 ^C (\pm 24.05)	31.35 ^B (\pm 18.68)	>0.05
NOD: POD	5.59 ^C (\pm 2.41)	5.76 ^C (\pm 3.59)	2.57 ^B (\pm 0.93)	>0.05
Cmic: Pmic	41.58 ^{BC} (\pm 15.90)	140.19 ^{B*} (\pm 62.69)	42.04 ^B (\pm 16.21)	<0.05
Cmic: Nmic	6.76 ^C (\pm 2.23)	15.68 ^C (\pm 5.67)	20.63 ^B (\pm 26.92)	>0.05
Nmic: Pmic	6.63 ^C (\pm 3.55)	10.60 ^C (\pm 8.45)	5.69 ^B (\pm 4.39)	>0.05
p	<0.05	<0.05	<0.05	

CT: carbono total, PT: fósforo total, NT: nitrógeno total, COD: carbono orgánico disuelto, POD: fósforo orgánico disuelto,

NOD: nitrógeno orgánico disuelto, Cmic: carbono microbiano, Pmic: fósforo microbiano, Nmic: nitrógeno microbiano

A, B, BC o C diferencias significativas ($p \leq 0.05$) dentro de cada sitio

* diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre sitios

Tabla 11. Matriz de correlación (Spearman) entre las variables biogeoquímicas del suelo y la actividad enzimática. En negritas se resaltan las correlaciones significativas

	pH	BG	CBH	NAG	FM	FD	CT	NT	PT	COD	NOD	POD	Cmic	Nmic	Pmic
pH	1.00														
BG	0.07	1.00													
CBH	0.33	0.43	1.00												
NAG	0.17	0.93	0.52	1.00											
FM	-0.10	0.28	0.47	0.55	1.00										
FD	0.07	0.07	0.57	0.32	0.88	1.00									
CT	-0.32	0.13	0.40	0.37	0.95	0.88	1.00								
NT	-0.07	0.18	0.55	0.45	0.97	0.90	0.93	1.00							
PT	-0.20	0.15	0.33	0.42	0.93	0.75	0.92	0.93	1.00						
COD	-0.15	-0.02	0.05	0.25	0.65	0.48	0.67	0.53	0.68	1.00					
NOD	0.22	0.52	0.50	0.47	0.00	-0.10	-0.12	0.13	0.03	-0.42	1.00				
POD	-0.52	-0.17	0.37	-0.08	0.45	0.55	0.67	0.55	0.48	0.32	0.05	1.00			
Cmic	-0.10	0.15	0.67	0.40	0.88	0.87	0.88	0.90	0.78	0.60	0.05	0.65	1.00		
Nmic	0.38	-0.12	0.18	0.06	0.43	0.52	0.40	0.40	0.47	0.47	-0.40	-0.05	0.25	1.00	
Pmic	-0.35	-0.32	0.00	-0.21	0.42	0.48	0.47	0.40	0.28	0.15	-0.47	0.27	0.48	0.00	1.00

BG: β -Glucosidasa, CBH: Cellobiohidrolasa, NAG: N-acetilglucosaminidasa, FM: Fosfomonoesterasa, FD: Fosfodiesterasa, CT: carbono total, NT: nitrógeno total, PT: fósforo total, COD: carbono orgánico disuelto, NOD: nitrógeno orgánico disuelto, POD: fósforo orgánico disuelto, Cmic: carbono microbiano, Nmic: nitrógeno microbiano, Pmic: fósforo microbiano

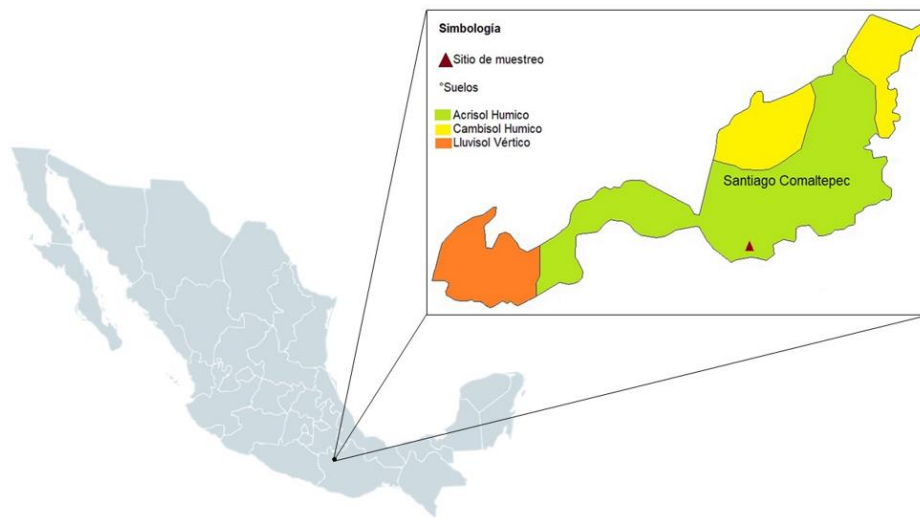


Figura 1. Sitio de estudio y tipos de suelo (modificado de H. Ayuntamiento de Santiago Comaltepec; Ixtlán, Oaxaca, 2011)

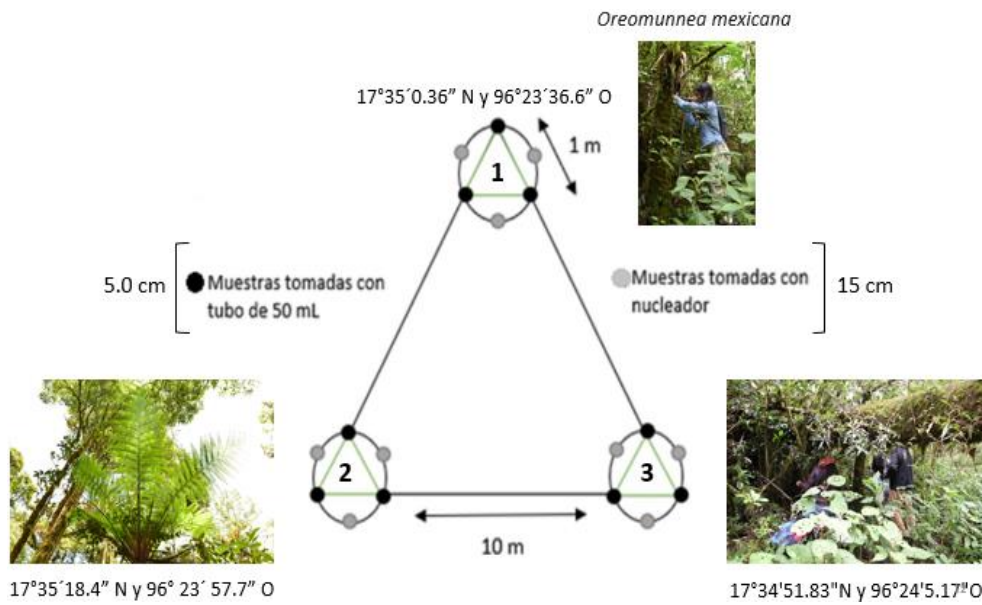


Figura 2. Diseño de muestro para la colecta de suelo. Los puntos en negro indican los sitios donde se tomaron muestras abarcando los primeros 5.0 cm de suelo con tubos de 50 mL. Los puntos grises indican a los sitios donde fueron tomadas las muestras con nucleador

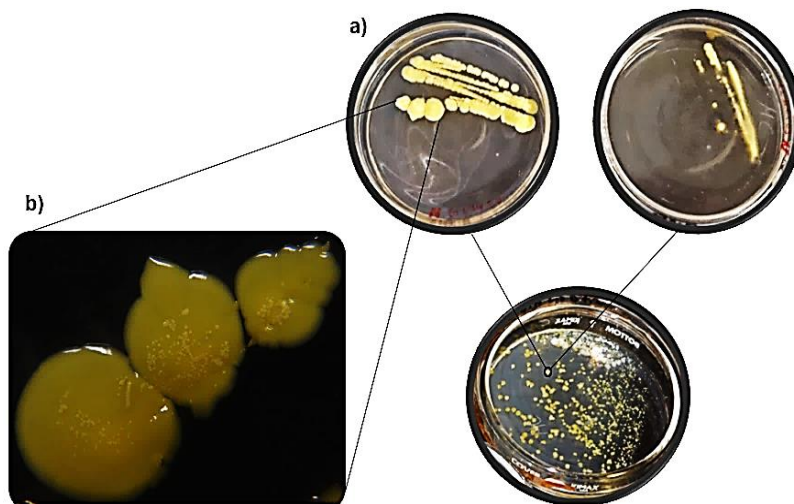


Figura 3. Aislamiento y purificación de los morfotipos seleccionados. a) Aislados mediante la técnica de estriado por duplicado y b) colonia bacteriana a los tres días de crecimiento



Figura 4. Cepario bacteriano en glicerol al 70%

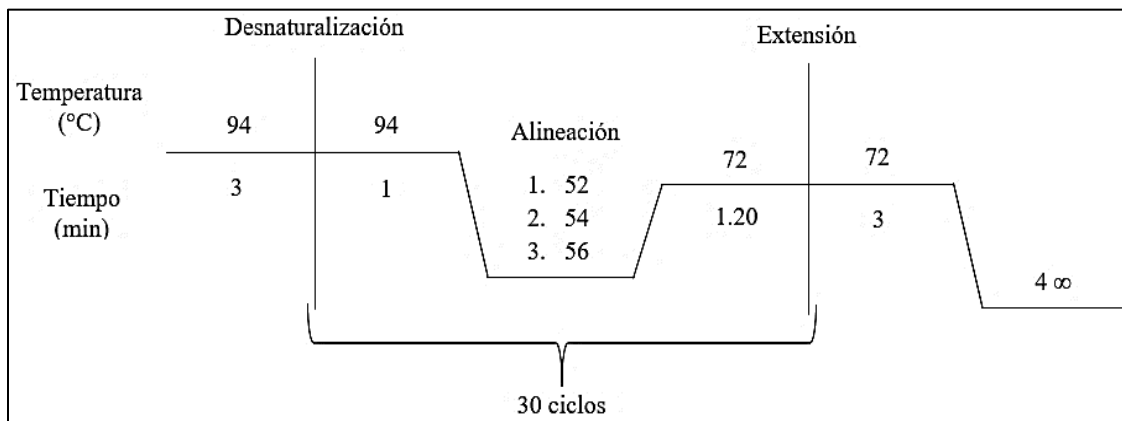


Figura 5. Programa del termociclador para el gradiente de temperatura. En la temperatura de alineación se muestran las tres temperaturas puestas a prueba

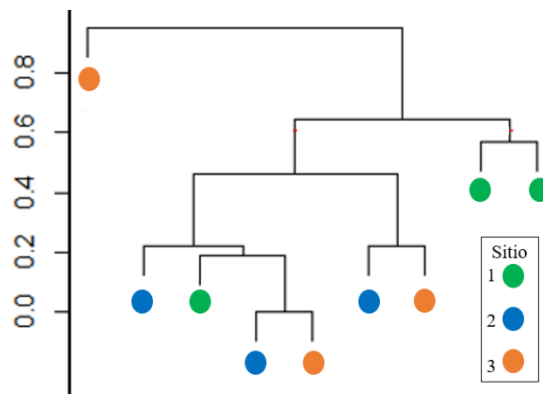


Figura 6. Dendrograma resultante de la diversidad β . Los puntos en verde corresponden al sitio de muestreo 1, los puntos en azul señalan al sitio dos y los puntos en naranja al sitio de muestreo 3

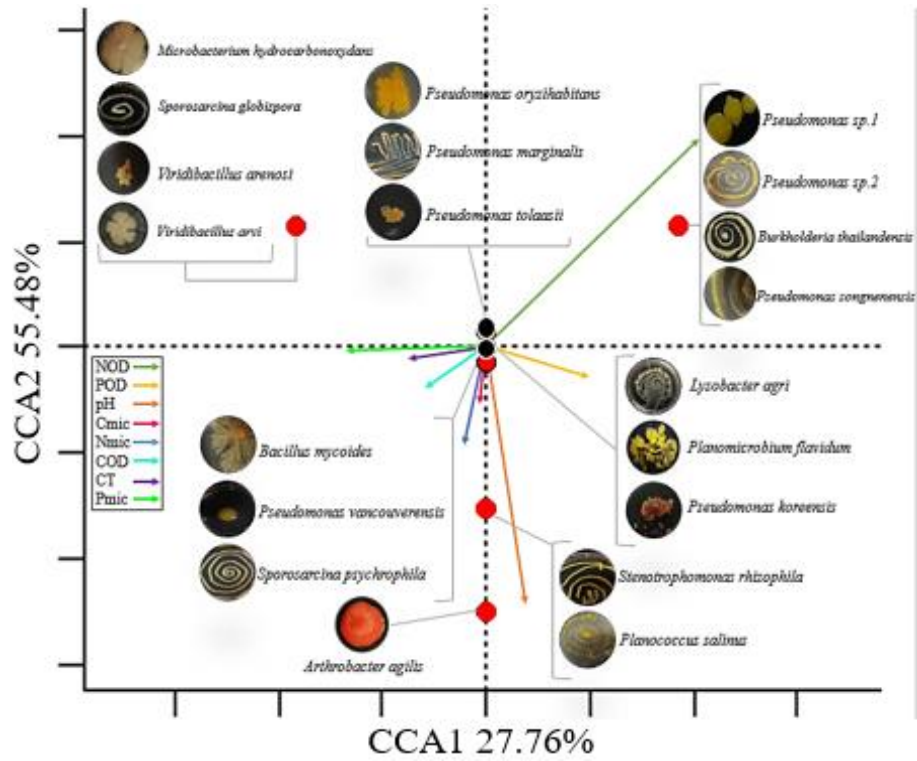


Figura 7. Análisis de correspondencia canónica entre la actividad enzimática del suelo y la diversidad de bacterias cultivables

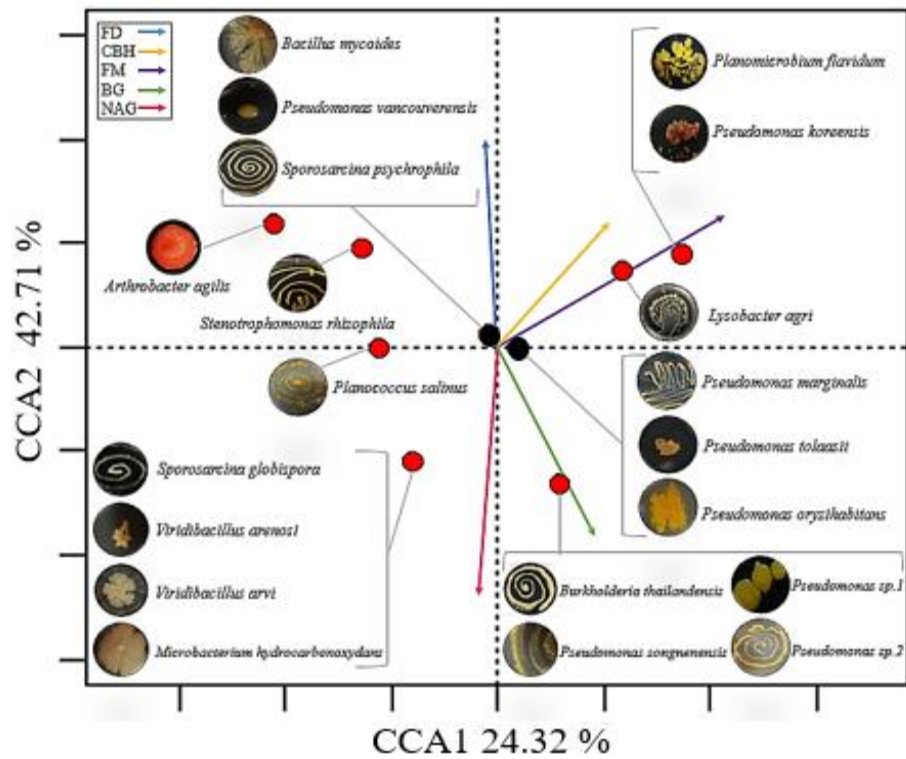


Figura 8. Análisis de Correlación Canónica entre las variables biogeoquímicas del suelo y la diversidad

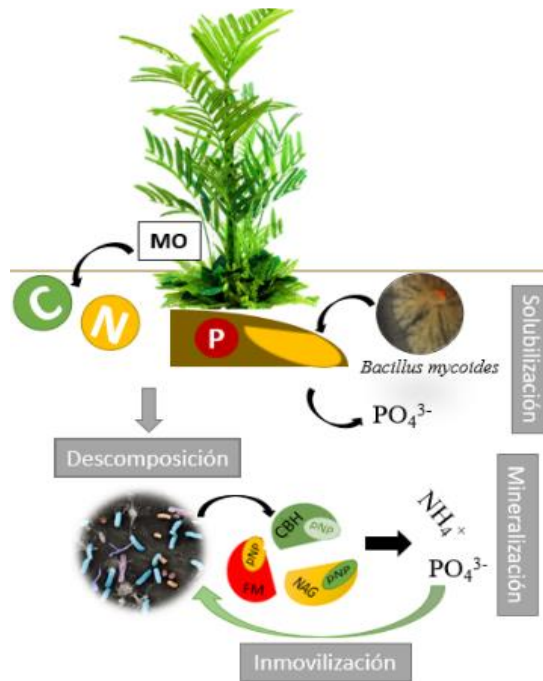
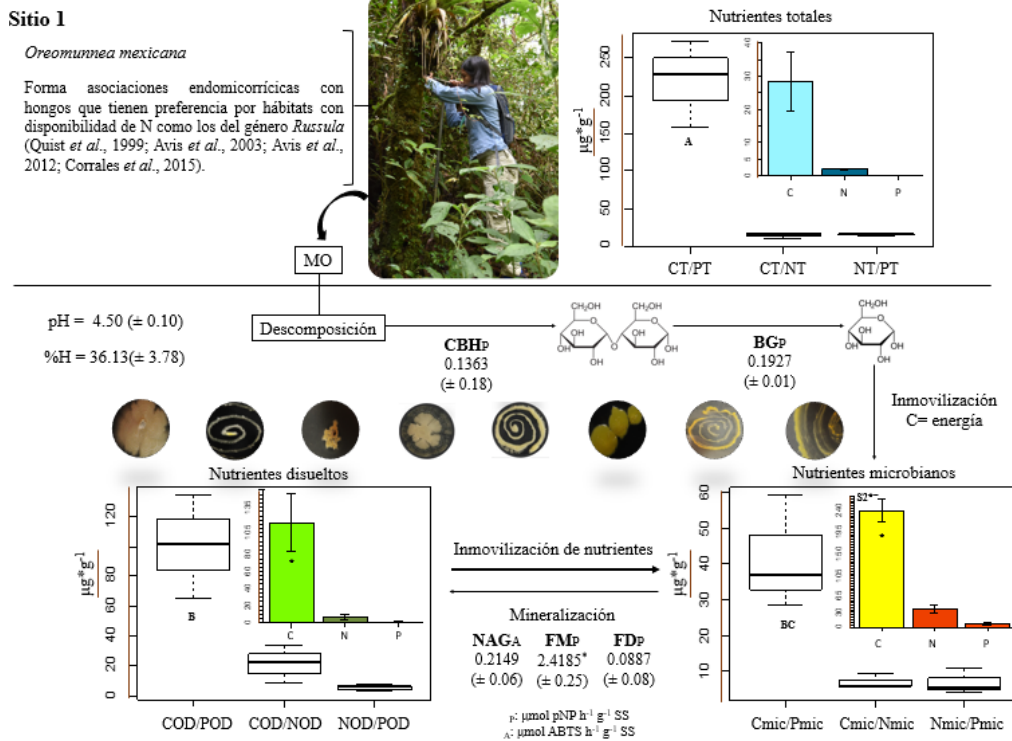
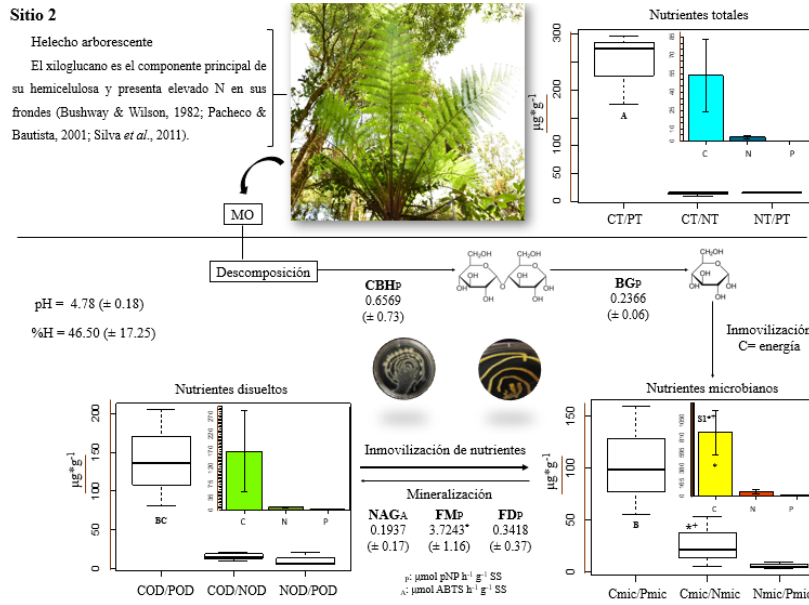


Figura 9. Dinámica hipotética de nutrientes en el Bosque Mesófilo de Montaña

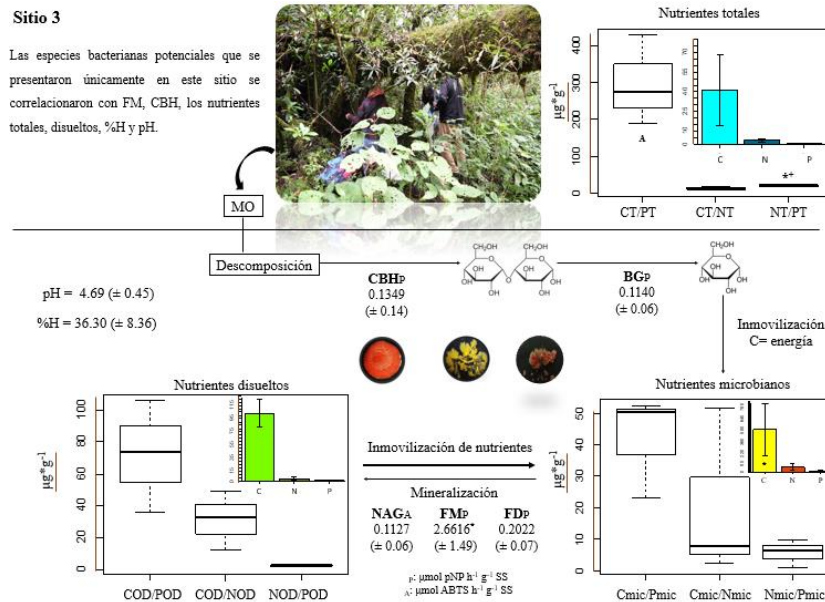
DINÁMICA HIPOTÉTICA DE NUTRIENTES EN CADA SITIO



Modelo hipotético de la dinámica de nutrientes en el sitio 1. La línea horizontal divide a la parte superficial de la dinámica hipotética en el suelo. Los gráficos de barras representan la cantidad obtenida de C, N y P total (azul), disuelto (verde) y en biomasa microbiana (amarillo). La estequiometría de nutrientes para cada almacén se muestra en los diagramas de caja y bigote. Las letras en negritas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los nutrientes dentro del sitio 1. El "*" muestra las diferencias significativas entre sitios. Las flechas muestran la actividad de la enzima debajo (BG: β -Glucosidasa, CBH: Cellobiohidrolasa, NAG: N-acetilglucosaminidasa, FM: Fosfomonoesterasa y FD: Fosfodiesterasa) y en la parte media se ubican las bacterias halladas únicamente en este sitio *M. hydrocarbonoxydans*, *S. globispora*, *V. arenosi*, *V. arvi*, *B. thailandensis*, *P.sp1*, *P. songnenensis* y *P.sp2* en orden de izquierda a derecha.



Modelo hipotético de la dinámica de nutrientes en el sitio 2. La línea horizontal divide a la parte superficial de la dinámica hipotética en el suelo. Los gráficos de barras representan la cantidad obtenida de C, N y P total (azul), disuelto (verde) y en biomasa microbiana (amarillo). La estequiometría de nutrientes para cada almacén se muestra en los diagramas de caja y bigote. Las letras en negritas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los nutrientes dentro del sitio 1. El "*" muestra las diferencias significativas entre sitios. Las flechas muestran la actividad de la enzima debajo (BG: β -Glucosidasa, CBH: Cellobiohidrolasa, NAG: N-acetilglucosaminidasa, FM: Fosfomonoesterasa y FD: Fosfodiesterasa) y en la parte media se ubican las bacterias halladas únicamente en este sitio *L. agri* y *S. rhizophila* en orden de izquierda a derecha.



Modelo hipotético de la dinámica de nutrientes en el sitio 3. La línea horizontal divide a la parte superficial de la dinámica hipotética en el suelo. Los gráficos de barras representan la cantidad obtenida de C, N y P total (azul), disuelto (verde) y en biomasa microbiana (amarillo). La estequiometría de nutrientes para cada almacén se muestra en los diagramas de caja y bigote. Las letras en negritas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los nutrientes dentro del sitio 1. El "*" muestra las diferencias significativas entre sitios. Las flechas muestran la actividad de la enzima debajo (BG: β -Glucosidasa, CBH: Cellobiohidrolasa, NAG: N-acetilglucosaminidasa, FM: Fosfomonoesterasa y FD: Fosfodiesterasa) y en la parte media se ubican las bacterias halladas únicamente en este sitio *A. agilis*, *P. flavidum* y *P. korensis* en orden de izquierda a derecha.