



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**DINÁMICA POBLACIONAL DE BACTERIAS  
FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE EN  
SUELO DE DOS TERRAZAS ALUVIALES CON  
DIFERENTE NIVEL DE DETERIORO DEL SUELO EN EL  
VALLE DE ZAPOTITLÁN DE LAS SALINAS, PUEBLA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**TERESA GONZÁLEZ RUIZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA**

**MÉXICO, D. F**

**AGOSTO, 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 25 de Febrero de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **TERESA GONZÁLEZ RUÍZ** con número de cuenta **86141622** con la tesis titulada "**Dinámica poblacional de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en suelo de dos terrazas aluviales con diferente nivel de deterioro del suelo en el valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla**", realizada bajo la dirección del **DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA**:

Presidente:	DR. HOMERO JULIO EUDES CAMPO ALVES
Vocal:	DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
Vocal:	DR. GUSTAVO ALBERTO MONTEJANO ZURITA
Vocal:	DR. RONALD FERRERA CERRATO
Secretario:	DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA
Suplente:	DRA. MAYRA ELENA GAVITO PARDO
Suplente:	DR. HÉCTOR OCTAVIO GODÍNEZ ÁLVAREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARÉ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 23 de Junio de 2008.

Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

## Agradecimientos

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México
- Al CONACyT (Registro No. 172150), y a la DGEP de la UNAM por las becas recibidas durante el Doctorado.
- A los miembros del Comité Tutoral
  - Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza (director de tesis, FES Iztacala)
  - Dr. Héctor Godínez Álvarez (FES, Iztacala)
  - Dr. Ronald Ferrera Cerrato (Colegio de Postgraduados)

Esta tesis fue financiada por los proyectos:

- CONACYT-SEMARNAT 2002-Co1-0790
- CONACYT-DAIC 200 clave 34897-V

## Otros agradecimientos...

- A los que siempre han estado y estarán.

A Cristina y Lola. En estricto orden alfabético. Lo siento mucho, no pueden estar exactamente en el mismo lugar en este papel, pero sí en mi corazoncito... Gracias porque a pesar de que no están de acuerdo en muchas de mis decisiones de vida, y a que tampoco las han entendido, han hecho lo posible por respetarlas. Gracias porque sólo me basta llamarlas para saber que estarán conmigo para apoyarme, criticarme, darme de comer o brindarme posada. Gracias por todo.

A mis padres, DOÑA CUCA Y DON DELFINO, así con mayúsculas, porque así son ellos, unos gigantes.

- A los que he conocido es esta aventura que ha sido mi vida:

Patricia, gracias porque a pesar de la distancia geográfica, nunca de cariño, nos unen muchas horas de regaños y conversaciones que si bien no han resuelto el mundo (al menos no el nuestro), nos han ayudado a hacerlo más llevadero. Te acuerdas todas las veces que me decías “como puedes trabajar con algo que ni se ve”, y te referías a las bacterias (claro, siempre las comparaste con tus tortugas). Pero ya ves, ahora me están dando una gran satisfacción. Gracias por todo, todo, todo lo que hemos vivido juntas.

Araceli, gracias por mostrarme la realidad de combinar dos aspectos tan diferentes de la vida.

Martha, gracias por hacerme participe de tu visión resistente, civil y pacífica de la vida, que aunque en algunas (¿muchas?) ocasiones no hemos estado de acuerdo, con el tiempo y el trato cotidiano, aprendimos a tolerarnos, aceptarnos y querernos tal como somos. p.d. en la tesis es indispensable el recuento de VOTO x VOTO.

Elizabeth, acuérdate que “la claridad de la duda puede sacarte de la oscuridad”. Sigo sin saber que significa, pero el ponerlo aquí es mi manera de decirte “gracias” por todo el apoyo y cariño que siempre me has mostrado.

Luis, mi cuñis. Te quiero mucho amiguito.

Toño, que decirte, sólo que TQM.

- A los que reencontré ( y los que conocí en este reencuentro):

César, gracias por todos los permisos y por el café vespertino. Gracias por tu confianza laboral, ya que sin haber trabajado juntos dejaste en mis manos un enorme paquete (¡...de banderitas de colores!). Pero sobre todas las cosas, gracias por tu confianza personal. Este reencuentro ha sido muy agradable para mí y sólo espero que algún día se te olvide el descuentón de la salida de Geología. Y acuérdate, ¡eres Doctor!

Miguel. Gracias por tu ayuda en los mapas, y por las muchas conversaciones en las horas de comida o de café y fuera de ellas. Y por supuesto por tu confianza en muchas de esas conversaciones.

Vero, gracias por la oportunidad de conocerte y por tus muestras de confianza a pesar del corto tiempo que nos hemos tratado. Gracias por tu apoyo y complicidad.

Dr. Arturo Flores. Por la oportunidad de laborar con él. Esto me ha permitido conocer otro ámbito de trabajo y revalorar el que ya conocía.

- A los que aparecieron en este proceso:

Anita Bores. Nos faltaban horas para platicar y platicar y platicar y platicar en los pasillos de la UBIPRO o en los laboratorios. Mil gracias por tu apoyo y múltiples palabras de aliento y por prestar tus oídos a mis quejas, planes e ilusiones.

Ernestina. Ya anímate a hacer el doctorado, ¡no es tan difícil!

A mi gran porra oficial del laboratorio de Microbiología. Por favor créanme cuando les digo que ustedes no forman parte de ese laboratorio, ustedes SON ese laboratorio. Ustedes le han dado vida y calor a ese lugar. Le inyectaron dinamismo y alegría, cada uno a su manera. Laura, Sandra, Candis, y más recientemente Angélica y Miguel. Y por supuesto al maestro Ramón.

Laura, el balón sigue rodando y estoy segura que sabrás vencer todas las porterías que la vida te ponga enfrente. Cuando necesites que alguien te dé consejos que no vayas a seguir pero que de todas maneras quieras escuchar, por favor avísame. Siempre habrá tiempo para ello. Gracias por toda tu confianza, gracias por los discos de LOST, gracias por todos los artículos buscados, gracias por tus pláticas, gracias por las crónicas del fútbol y de las competencias. Gracias por ser tan tan tan...tú. Esas cosas me hacen sentirme (aún) parte de ese equipo que ustedes han formado.

Sandra, esa particular forma que tienes de vivir la vida. Eres la mujer dark más fresca que conozco. Y esa combinación que has logrado es simplemente fabulosa. Ahora que yo ya terminé sigues tú en la lista, así que ni modo, hay que hacerlo. Y lo harás muy bien. Nunca, nunca, nunca, dudes de tu capacidad.

Candis, mil gracias por todas tu palabras de apoyo y por todas las veces que me dijiste ¡ya termina! Gracias por tu confianza personal. Eso es invaluable.

Angélica, ¡regresaste a tu origen académico! Estoy segura que esta nueva aventura que has decidido comenzar, será sumamente exitosa. ¿Te acuerdas cuando nos mudamos de laboratorio? Te toco que yo aprendiera muchas cosas contigo, y a pesar de ello, ahora estás de nuevo en él, y eso me da muchísimo gusto.

Miguel, aunque realmente he estado muy poco tiempo contigo, gracias por permitirme preguntar y por satisfacer mi curiosidad sobre cómo van las cosas.

Maestro Ramón. Gracias por todas tus pláticas y por los consejos. Ojala que las cosas buenas de las que tanto hablamos puedan concretarse.

- A los que me ayudaron en este proceso de formación.

Al Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza, por la oportunidad de haber hecho la tesis con lo que a mi me gusta. Por su confianza en la toma de decisiones sobre la propia tesis y por todo su apoyo conceptual y logístico. Pero sobre todo por creer en mi capacidad académica para hacerme cargo de situaciones ajenas a la tesis.

Al Biól Abraham Lozada Rojas, que al realizar su tesis de licenciatura me ayudo enormemente al trabajo de campo y a los cultivos que permitieron realizar esta tesis. Sin su ayuda quizá todavía estaría sembrando...

Al Dr. Héctor Godínez Álvarez y Ronald Ferrera Cerrato, que como miembros del Comité Tutorial, me hicieron muchos comentarios que ayudaron a concluir satisfactoriamente este proceso.

De manera particular al Dr. Héctor Godínez Álvarez por las revisiones y críticas a la publicación que surgió de este trabajo.

Al jurado revisor: Dras. Pilar Ortega y Mayra Gavito y Drs. Julio Campo, Salvador Rodríguez, Ronald Ferrera, Gustavo Montejano y Héctor Godínez. Las observaciones y críticas realizadas nutrieron de manera significativa este trabajo y me han ayudado integrar y valorar de mejor manera los resultados obtenidos. Espero haber captado la esencia de sus comentarios.

A las instituciones académicas públicas en las que me he formado. La UNAM fue el inicio en sentido estricto. En ella hice el bachillerato y la licenciatura. Luego me pase al Poli a la Maestría, pero regrese a la UNAM en donde ahora concluyó este proceso. Gracias por permitirme llegar hasta aquí. Sin la educación pública yo no hubiera tenido la posibilidad de llegar hasta aquí. Gracias por ser un mosaico de pensamientos. De ustedes como instituciones, he tomado cosas buenas y supongo que también malas (sinceramente espero que sean las menos). Gracias por todas las personas que conocí en sus instalaciones y que han estado conmigo en un algún tramo de mi vida. Gracias porque muchas de ellas continúan conmigo.

- A todos los que cuyo nombre no se encuentra escrito aquí, ya sea por un imperdonable olvido o por otras circunstancias. Gracias por todos sus regaños, por sus críticas, por sus palabras de aliento y por sus abrazos.

A todos, gracias eternas.

You can't always get what you want  
But if you try sometimes you just might find  
You get what you need...  
(Jagger y Richards. En *Let it bleed*, 1969).

What are you doing the rest of your life?  
(M. Legrand. En: *The happy ending*, 1969).

De la  
ilusión  
a la  
erosión  
no hay  
más que  
medio  
siglo.

(Efraín Huerta.  
En: *50 Poemínimos*, 1978)

## ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	ii
Introducción general	1
Fijación de nitrógeno	1
Fijación de nitrógeno en zonas áridas y semiáridas	5
Degradación de suelo	10
Hipótesis y objetivos	12
Área de estudio	15
Literatura citada	26
Capítulo 1.	30
Variación espacio-temporal de nutrimentos del suelo en dos terrazas aluviales en Zapotitlán Salinas, Puebla	
Introducción	30
Materiales y métodos	32
Resultados	33
Discusión	35
Figuras	38
Literatura citada	43
Capítulo II. Publicación.	45
Fertility islands around <i>Prosopis laevigata</i> and <i>Pachycereus hollianus</i> in the drylands of Zapotitlán Salinas, México.	
Abstract	46
Introduction	46
Materials and methods	47
Results	49
Discussion	51
References	55
Capítulo III.	
Establecimiento y actividad reductora de acetileno de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en suelo de Zapotitlán Salinas, Puebla, en condiciones experimentales	
Introducción	57
Materiales y métodos	58
Resultados	60
Discusión	62
Figuras	65
Literatura citada	71

Capítulo IV.	74
Secuenciación del gene <i>nifH</i> en una cepa de <i>Microbacterium</i> sp. aislada del suelo de la zona semiárida de Zapotitlán Salinas, Puebla.	
Introducción	74
Materiales y métodos	75
Resultados	77
Discusión	78
Literatura citada	81
Discusión general	83
Conclusiones y perspectivas	85

## RESUMEN

Los suelos de las zonas áridas y semiáridas se caracterizan por la gran heterogeneidad en la distribución de los nutrimentos y el agua. Está última, junto con el nitrógeno, se consideran como los principales elementos limitantes de la productividad primaria en estos ecosistemas. Se determinó la dinámica poblacional de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en una terraza aluvial conservada y una degradada, las cuales están ubicadas en Zapotitlán, Puebla. En cada terraza se consideraron tres microambientes, la zona de raíces de *Prosopis laevigata* (leguminosa), *Pachycereus hollianus* (cactácea) y suelo libre de vegetación. Se determinó el contenido de materia orgánica, ortofosfatos, nitratos, amonio, humedad, pH y la actividad de la enzima nitrogenasa así como la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) durante un ciclo de lluvia-sequía. También se analizó la capacidad de establecimiento en suelo esterilizado de bacterias aisladas en medio de cultivo libre de nitrógeno reducido, las cuales fueron identificadas por la secuenciación del 16S rRNA. Se registró una acumulación de compuestos nitrogenados (amonio y nitrato) y de ortofosfatos al inicio de la temporada de lluvias. La mayor cantidad de UFC se registró en el máximo nivel de humedad del suelo. Se determinó la formación de islas de fertilidad por la acumulación de materia orgánica alrededor de *Prosopis laevigata* sólo en la terraza degradada. La reducción de acetileno mostró un patrón indefinido de variación temporal en ambas terrazas y entre microambientes. Se aislaron 18 cepas bacterianas de las cuales se pudieron identificar a 11 de ellas. 1 cepa pertenece al género *Rhizobium*, una a *Sphingomonas*, una a *Microbacterium*, una más al género *Gordonia*, y el resto al grupo de actinomicetes filamentosos del género *Streptomyces*. Sólo en la cepa de *Microbacterium* se pudo secuenciar una fracción del gene *nifH*, responsable de la fijación biológica de nitrógeno; aunque todas las cepas presentaron características que sugieren su pertenencia al grupo funcional de fijadoras de nitrógeno de vida libre, como son el crecimiento en medio de cultivo libre de nitrógeno reducido y la capacidad para reducir acetileno. Todas las cepas aisladas se encontraron presentes en los tres microambientes de suelo, aunque con diferente número de UFC. Estas mismas cepas se establecieron de manera diferencial en suelo estéril de los tres microambientes, mostrando mayor incremento relativo las cepas no filamentosas (*Rhizobium*, *Gordonia*, *Sphingomonas* y *Microbacterium*). Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre podrían estar desempeñando una actividad más importante en la dinámica nutrimental de las zonas áridas y semiáridas que la que anteriormente se les había asignado, debido a que pueden estar presentes en microambientes

en los cuales los microorganismos fijadores simbióticos no pueden realizar su función, como la zona de raíces de cactáceas y el suelo desnudo. Por ello, es importante determinar las condiciones en las cuales pueden realizar su actividad fijadora y aportar nitrógeno disponible para la vegetación, particularmente en los suelos que ya están degradados, y de esta manera contribuir al sostenimiento mínimo de esas especies vegetales, las cuales al aportar materia orgánica al suelo, retroalimentan la actividad microbiana.

## ABSTRACT

The soils of arid and semi-arid areas are characterized by highly heterogeneous distribution of nutrients and water. This, along with nitrogen, are seen as major factors limiting primary productivity in these ecosystems. It was determined the population dynamics of nitrogen-fixing free living bacteria in a terrace alluvial preserved and a degraded, which are located in Zapotitlán, Puebla. In each terrace, soil samples were taken from the root zone of *Prosopis laevigata* (legume), *Pachycereus hollianus* (cactus) and three interspaces (bare soil). It was determined the content of organic matter, orthophosphates, nitrate, ammonia, soil moisture, pH and activity of the enzyme nitrogenase as well as the amount of colony forming units (CFU) during a rain-drought cycle. It also assessed the ability of establishment in sterilized soil bacteria isolated in the medium without nitrogen, which were identified by sequencing 16S rRNA. There was an accumulation of nitrogen compounds (ammonium and nitrate) and orthophosphates at the beginning of the rainy season. The largest number of CFU was recorded at the highest level of moisture. It was determined the formation of islands of fertility by the accumulation of organic matter around *Prosopis laevigata* only on the terrace degraded. The reduction of acetylene showed a pattern indefinite of variation in both terraces temporary and between microenvironments. 18 bacterial strains were isolated from which, and we could identify 11 of them. One strain belongs to the genus *Rhizobium*, one to *Sphingomonas*, one to *Microbacterium* and one more to *Gordonia*, and the rest of the group of the genus filamentous actinomycetes *Streptomyces*. Only the strain *Microbacterium* could be a fraction of gene sequencing *nifH*, responsible for biological fixation of nitrogen, although all strains showed characteristics that suggest they belong to the functional group of nitrogen-fixing free living, such as growth in the medium free nitrogen and the ability to reduce acetylene. All isolates were found in the three microenvironment of soil, although with different numbers of CFU. These same strains were established so differential in sterile soil of the three microenvironments showing greater relative increase than the strains not filamentous (*Rhizobium*, *Gordonia*, *Microbacterium* and *Sphingomonas*). The nitrogen-fixing free living bacteria could be played a more important activity in the dynamics of arid and semiarid ecosystems than they were previously assigned, because that might be present in microenvironments in which the symbiotic fixers not can perform its role as the root zone of cacti and bare soil. It is important to determine the conditions under which they can conduct their activity fixing nitrogen and make available

for vegetation, particularly in soils that are already degraded, and thus help support the plant species, which contribute to organic matter and more microbial activity.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### Fijación de nitrógeno

El nitrógeno (N) o *azote*, que significa *sin vida* es el cuarto elemento más común en nuestro planeta, después del carbono, el hidrógeno y el oxígeno; y uno de los principales constituyentes de moléculas esenciales para la vida como proteínas, ácidos nucleicos y clorofilas (Postgate, 1998). El N se mueve entre las formas orgánica e inorgánica a través de procesos asociados con la conversión de compuestos nitrogenados (nitratos, amonio, aminoácidos) y de su captura por la biomasa vegetal, microbiana e indirectamente, animal; y con su regreso a la atmósfera en forma de gas (Chapin et al. 2002).

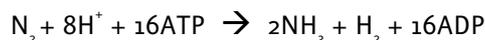
La atmósfera es el principal reservorio de N en el planeta. Se calcula que contiene  $4 \times 10^{21}$  g; en contraste, en los sedimentos hay  $5 \times 10^{20}$  g; en el océano,  $2.2 \times 10^{19}$  g N disuelto y  $6 \times 10^{17}$  g N inorgánico; en el suelo  $3 \times 10^{17}$  g; y en la biomasa terrestre ( $1.3 \times 10^{16}$  N) (Binkley et al. 2000).

La molécula de N gaseoso está conformada por dos átomos de N unidos por un triple enlace (N•N); pero en esta forma no puede ser utilizado directamente por los sistemas biológicos para su crecimiento y reproducción. Antes de su incorporación, se combina con el hidrógeno en un proceso denominado fijación de nitrógeno, que es la reducción del N molecular a amonio. La fijación puede ser química o biológica (Postgate, 1998).

En la fijación química, la radiación ultravioleta produce la formación de óxidos de N, particularmente en las capas superiores de la atmósfera; mientras que la combustión, principalmente de motores de combustión interna y las luces de la ciudad los generan en los niveles bajos. Estos gases pueden ser incorporados al suelo por la lluvia o llegar en forma de deposición seca, contribuyendo a las entradas de N atmosférico a la superficie del planeta (Postgate, 1998).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso mediado exclusivamente por organismos procariotes, a través de la actividad de la enzima nitrogenasa. Esta enzima es un complejo conformado por dos partes llamadas subunidad I, que tiene a la dinitrogenasa  $\alpha_2\beta_2$  (donde  $\alpha$ =proteína nifD;  $\beta$ =proteína nifK) y la subunidad II, que es la nitrogenasa reductasa (proteína nifH). La subunidad  $\alpha$  contiene el sitio activo para la reducción de N que típicamente incluye un núcleo de molibdeno, el cual en algunos microorganismos puede ser reemplazado por hierro o vanadio (Raymond et al. 2004). La nitrogenasa requiere de iones  $Mg_2^+$  para estar activa y es inhibida, además del oxígeno, por el ADP (Postage, 1998) y regulada entre otros factores, por el N disponible y la humedad (Herman et al. 1993; Rudnick et al. 1997).

La reacción principal catalizada por la nitrogenasa es la misma en todos microorganismos fijadores:



El proceso requiere de 6 e<sup>-</sup> provenientes de 12 ATP's, pero en la reacción se consumen 16 ATP's porque la reducción está acompañada de la formación de una molécula de H<sub>2</sub>, lo cual implica el gasto de 2 e<sup>-</sup> provenientes de 4 ATP's.

La FBN es un proceso energéticamente muy costoso. Los datos disponibles para la fijación simbiótica la estiman en 22.8 g de glucosa por gramo de N fijado. Esta cantidad incluye el costo energético directo de la fijación (12 g glucosa g<sup>-1</sup> N) y el costo de construir y mantener los nódulos (10.8 g glucosa g<sup>-1</sup> N) (Hartley y Schlesinger, 2002). Por ello, se inhibe en presencia de N disponible en forma de amonio o nitrato (Postgate, 1998).

Otros elementos reguladores de la actividad de los microorganismos fijadores incluyen mayor cantidad de ciertos elementos, como fósforo, molibdeno y hierro, que son necesarios para la actividad y conformación de la nitrogenasa (Postgate, 1998; Rastetter et al. 2001); y la humedad del suelo (en el caso de los fijadores terrestres), debido a que estimula la productividad primaria y en consecuencia el aporte del C y de nutrientes al suelo (Hartley y Schlesinger, 2002).

Además de la reducción del N molecular a amonio, la nitrogenasa puede catalizar otras reacciones de reducción como H<sup>+</sup> a H<sub>2</sub>, acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) a etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), azidas (N<sub>3</sub><sup>+</sup>) a N<sub>2</sub> y CN<sup>-</sup> a CH<sub>4</sub> y NH<sub>3</sub>. El acetileno es un sustrato particularmente importante porque su producto, el etileno, puede ser detectado rápidamente por cromatografía de gases. Esta reacción es la base de la prueba de reducción de acetileno utilizada para estimar la fijación de N y se puede realizar en preparaciones enzimáticas, bacterias vivas, plantas con nódulos o nódulos extirpados, suelo o muestras de agua (Postgate, 1998).

En las Archeas, la capacidad de diazotrofia se encuentra solamente dentro del reino Euryarchaeota en las divisiones Methanosarcinales, Methanobacteriales, Halobacteriales y Methanococcales; mientras que en Bacteria se presenta en 6 de los más de 50 phyla descritos hasta el momento. Éstos son: bacterias verdes del azufre, cianobacterias, Gram positivas de bajo y alto contenido de G+C, Spirochaetas, Firmicutes y Proteobacteria. Estos grupos están ampliamente distribuidos en diferentes estilos de vida y metabolismos que incluyen aerobios, anaerobios, heterótrofos, autótrofos, metanótrofos; de morfología celular individual o en filamentos (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

Por su estilo de vida, los microorganismos diazotrofos se agrupan en fijadores simbióticos y de vida libre. La FBN en asociación simbiótica incluye tres grupos de interacciones: a) Cianobacterias con líquenes (*Lobaria* con *Nostoc* o *Calothrix*), hepáticas (*Marchantia* con *Nostoc*), helechos acuáticos (*Azolla* con *Anabaena* y *Nostoc*), cícadas (*Macrozamia* y *Cycas* con *Nostoc*) y un género de angiospermas (*Gunnera* con *Nostoc*); b) Actinobacterias representadas por el género *Frankia* que forma nódulos con plantas no leguminosas de los géneros *Casuarina*, *Agnus* y *Myrica*, entre otros; y c) Alphaproteobacterias llamadas genéricamente rizobios que forma nódulos en muchas especies de leguminosas (Lloret y Martínez-Romero, 2005). En estas interacciones, ni la planta ni la bacteria pueden realizar el proceso de manera independiente, y cuando el N ya se encuentra en forma de amonio, existe un intercambio de compuestos nitrogenados de los nódulos de *Frankia* y *Rhizobium* hacia la planta por compuestos carbonados y agua hacia las bacterias del nódulo.

En el segundo grupo, denominado bacterias de vida libre, los microorganismos crecen libremente en el suelo y no tienen o no necesariamente tienen una relación simbiótica con las plantas para la fijación de N. Por ello, éste proceso se realiza de manera independiente a ellas, lo que les permite utilizar el amonio para su propio consumo. Dentro de este grupo se encuentran algunas cianobacterias que también pueden formar asociaciones simbióticas con las plantas.

Con excepción las propias cianobacterias, que son fijadores autótrofos que producen su propio carbono orgánico por fotosíntesis; el resto de los microorganismos fijadores de vida libre son heterótrofos y requieren de una fuente externa de carbono, la materia orgánica, además de condiciones adecuadas de humedad y de tensión de oxígeno (Postgate, 1998; Chapin et al. 2002). Otros fijadores heterótrofos de vida libre habitan en la rizosfera o la filosfera y dependen de los exudados radicales y de la muerte de las propias raíces como fuente de carbono (Chapin, et al. 2002). En la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos de la variabilidad metabólica de los fijadores de vida libre.

Tabla 1. Tipos de metabolismo en bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

	Géneros representativos
Anaerobios estrictos	<i>Clostridium, Desulfovibrio Methanosarcina, Methanococcus</i>
Facultativos (Aerobios cuando no fijan)	<i>Kleibsel, Bacillus, Enterobacter, Citrobacter Escherichia, Propionibacterium</i>
Microaerofilos (Normalmente aerobios cuando no fijan)	<i>Xantobacter, Thiobacillus, Azospirillum, Aquaspirillum, Methylosinus, Burkholderia</i>
Aerobios	<i>Azotobacter, Azomonas, Beijerinckia, Derxia</i>
Fotótrofos (Anaerobios)	<i>Chromatium, Chlorobium, Thiopedia, Ectothiospira</i>
Fotótrofos (Facultativos)	<i>Rhodospirillum, Rhodopseudomonas</i>
Fotótrofos (Microaerofilos)	<i>Plectonema, Lyngbya, Oscillatoria, Spirullina</i>
Fotótrofos (Aerobios)	<i>Anabaena, Nostoc, Calothrix, Gloeotheca</i>

Tomado de Postgate, 1998.

## Fijación de nitrógeno de zonas áridas y semiáridas

El N es esencial para la vida, por ello, es de considerable interés conocer sus formas, ciclos y reservorios en los diversos ecosistemas del planeta (Graham et al. 2008). Después del agua, la baja disponibilidad de este elemento es la principal variable abiótica que limita la productividad en los ecosistemas terrestres del mundo, incluyendo las zonas áridas, así como un importante determinante de la composición de las comunidades vegetales (Vitousek y Howarth, 1991, Evans y Ehleringer, 1993). Esta condición se relaciona con la gran demanda de las plantas, las bajas entradas en formas inorgánicas, la lenta tasa de recambio en los almacenes orgánicos, y las pérdidas gaseosas y a través del fuego, lixiviación y extracción de biomasa (Binkley et al. 2000, Whitford, 2002).

Las zonas secas cubren alrededor de una tercera parte de la superficie del planeta; sin embargo sus almacenes y procesos relacionados con el N no están completamente entendidos (Graham et al. 2008). Se caracterizan por la heterogeneidad en las propiedades microclimáticas y fisicoquímicas del suelo, originadas por la propia heterogeneidad en la topografía y en la distribución de la vegetación. Esto produce diferentes patrones de descomposición, acumulación y mineralización de materia orgánica. Las variables ambientales incluyen la estacionalidad de las lluvias y su relación con la temperatura, el viento, la intensidad, duración y frecuencia de las tormentas, los patrones microclimáticos diarios, y la extensión de los periodos de sequía entre un evento de lluvia y otro (Whitford, 2002).

Las entradas de agua por precipitación están contrarrestadas por las salidas por evaporación y transpiración de las plantas (evapotranspiración). Esto produce un déficit que repercute en la productividad vegetal de los sistemas naturales y manejados, con consecuencias negativas para los habitantes de estas zonas (Millenium Ecosystem Assessment, 2004).

La vegetación está dominada por matorrales espinosos y cactáceas, y aún con la baja disponibilidad de agua, hay fragmentos con elevada productividad biológica (Whitford, 2002). Los suelos son rocosos, de colores claros, someros, pobres en materia orgánica y se desarrollan sobre material no consolidado. Tienen un pobre a moderado desarrollo de los perfiles, acumulaciones de sales solubles de sílice y de carbonato de calcio en la capa superficial (caliche) y están expuestos a eventos extremos, como tormentas fuertes o sequías prolongadas. Su fertilidad es variable y por lo regular su productividad está condicionada por su profundidad y pedregosidad. Debido a esto, tienen mínima vocación agrícola.

Las zonas áridas son ecosistemas muy importantes dentro del ciclo global de N, a pesar de su baja productividad general, ya que contribuyen con más de 30% de las emisiones gaseosas totales ( $N_2$ ,  $N_2O$ ,  $NO_x$ ,  $NH_3$ ) provenientes de zonas no perturbadas (Evans y Ehleringer, 1993; Schaffer y Evans, 2005). Esto se contrapone con la bajas cantidades de N biológicamente disponible en el suelo (amonio y nitrato) y la baja tasa de entrada por fijación biológica y deposición atmosférica (Schaffer y Evans, 2005). En estos ecosistemas, la fijación está regulada principalmente por la humedad del suelo y la disponibilidad de N, C, y P. Este último puede estar no disponible para los organismos debido a que forma complejos que se precipitan en presencia de carbonatos y metales bivalentes como el  $Ca^+$  y el  $Mg^+$  en pH alcalinos (Shaffer y Evans, 2005).

El estudio del N en las zonas áridas se ha abordado desde diferentes enfoques: cantidades de bacterias en la rizosfera de diferentes especies de plantas (Xie y Steinberger, 2002); formación de islas de fertilidad (García-Moya y McKell, 1970; Herman et al. 1993, 1994, 1995; Schaeffer y Evans, 2005), descripción de la diversidad bacteriana y de genes *nifH* por herramientas moleculares (Dunbar et al. 1999, 2002; Kuske et al. 2002, Yeager et al. 2004) y producción de hojarasca en leguminosas fijadoras (Pavón et al. 2005).

Los estudios de fijación de N están centralizados en la fijación simbiótica y las costras microbióticas. Wullstein (1989) y Zahran (1999) señalan que la fijación por *Rhizobium*-leguminosas es la principal vía de entrada de N en estos ecosistemas, y que su tasa de fijación es mayor en comparación con los fijadores heterótrofos de vida libre y con la simbiosis actinorrízica. Esta importancia se acrecienta en las zonas dominadas por mesquite (Geesing et al. 2000; Golubov et al. 2001), en cuyas raíces se han encontrado nódulos hasta 220 cm de profundidad (Jonson y Mayeux, 1990). Otros autores asumen que la fijación simbiótica es efectiva a partir del uso de indicadores como el contenido de N en las hojas (Pavón et al. 2005), en el suelo (Perroni-Ventura, et al. 2006) o ambos (Geesing et al. 2000).

Desde otro enfoque, Belnap (2002) considera que la fijación de N por costras microbióticas es la principal vía de ingreso de este elemento a las zonas áridas. Las costras son asociaciones de cianobacterias, líquenes, algas verdes y musgos, que pueden crecer sobre el suelo o entre las capas superiores del suelo (Belnap y Lange, 2001). Representan una barrera física entre éste y la atmósfera, y pueden afectar la tasa de intercambio de materia y energía en el nivel de ecosistema, así como la distribución y abundancia de herbáceas, arbustos y árboles (Belnap et al. 2003).

La tasa de fijación varía de manera importante en el tiempo y en los ecosistemas debido a los límites que interponen múltiples factores bióticos y abióticos (Vitousek et al. 2002). Esto se observa en la cantidad de N fijado por las costras microbióticas de las zonas áridas (Evans y Ehleringer, 1993; Belnap, 2002; Hartley y Schlesinger, 2002; Billings et al. 2003; Yeager et al. 2004) (Tabla 2). Sin embargo, no existen métodos estandarizados para su estimación, por lo que se sugiere una posible sobrestimación de sus valores (West et al. 1990). Por ello, Hartley y Schlesinger (2002) sugieren la realización de más estudios sobre el tema.

La fijación por bacterias de vida libre ha sido menos estudiada en comparación con *Rhizobium* y las costras microbióticas. Los datos disponibles señalan que en el desierto del Negev (Israel) se encuentran en gran cantidad bajo el dosel y en la zona de las raíces, y que en el suelo libre de vegetación están en menor cantidad, lo que indica un fuerte efecto de la planta en este grupo de bacterias (Xie y Steinberger, 2002). Otro estudio, también en el Negev, determinó que las fijadoras heterótrofas cohabitan con cianobacterias formando costras microbióticas, pero debido a la baja cantidad de clorofila registrada, se sugiere que la mayor parte del N fijado por las costras proviene de la actividad heterótrofa (Zaady et al. 1998). Yeager et al (2004) menciona la presencia del gene *nifH* en alphaproteobacterias de costras microbióticas del desierto Chihuahuense, sin reportar valores de la tasa de fijación. No se cuenta con estimaciones puntuales en campo sobre la tasa de fijación de nitrógeno heterótrofa.

La menor cantidad de estudios relacionados con la fijación de vida libre así como la falta de consenso sobre su aportación a la dinámica del N, no es exclusiva de las zonas áridas. En bosques templados (coníferas, encinos) se reporta un rango de fijación no simbiótica de 0.01 a 12 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, con una media de 3 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>; y se señalan discrepancias en las metodologías utilizadas para su estimación. A pesar de la gran cantidad de trabajos realizados sobre el tema, la contribución de los fijadores no simbióticos y su importancia absoluta en este tipo de ecosistemas no es clara, por lo que se sugiere más investigación al respecto (Son, 2001). Desde otro enfoque, existen reportes sobre métodos moleculares específicos para la identificación de fijadores de vida libre en el suelo (Bürgmann et al. 2004) y sobre su diversidad en suelos forestales que señalan también la necesidad de profundizar en su investigación (Rösh et al. 2002). Esto se hace necesario porque la capacidad fijadora varía ampliamente dependiendo de las necesidades específicas de cada grupo de microorganismos, con respecto a la disponibilidad de C y N o la presión parcial de oxígeno (Bürgmann et al. 2004).

En México, los estudios sobre el N en las zonas áridas se han hecho a partir de la actividad reductora de acetileno en bacterias asociadas a raíces de cactáceas, en Mina, Nuevo León (Loera et al. 1996); de la influencia de algunas especies vegetales en la cantidad de bacterias, hongos y actinomicetes y con el C y N del suelo en Dolores Hidalgo, Guanajuato (Frías-Hernández, et al. 1998; Reyes-Reyes, et al. 2002); del contenido de N y la producción de hojarasca en 17 especies vegetales (Pavón et al. 2005) y de la relación entre la disponibilidad de nutrimentos del suelo y la riqueza de especies vegetales (Perroni-Ventura, et al. 2006), ambos en Zapotitlán Salinas, Puebla. En ninguno de ellos se estimó la tasa de fijación, ni el tipo de microorganismos que la realizan.

Tabla 2. Tasas de fijación de N por asociaciones microbianas en ecosistemas áridos. Se incluyeron dos ejemplos de bosques boreales con fines de comparación.

Microorganismos fijadores	Habitat	Tasa de fijación de N	Método utilizado para la estimación de la FBN	Referencia
Ensamblaje epilítico (dominado por <i>Calothrix</i> ).	Arroyo intermitente en el N del Desierto de Sonora (Arizona, EU)	42 mg N m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup>	Actividad reductora de acetileno (Incubaciones <i>in situ</i> )	Grimm y Petrone, 1997
Tapetes de <i>Anabaena</i>	Arroyo intermitente en el N del Desierto de Sonora (Arizona, EU)	144 mg N m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup>	Actividad reductora de acetileno (Incubaciones <i>in situ</i> )	Grimm y Petrone, 1997
Tapetes de cianobacterias ( <i>Cladophora-Anabaena-Nostoc</i> )	Arroyo intermitente en Desierto de Sonora (Arizona, EU)	83 mg N m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup>	Actividad reductora de acetileno (Incubaciones <i>in situ</i> )	Grimm y Petrone, 1997
Costras formadas por musgos: ( <i>Crossidium crassinerve</i> y <i>Aloina bifrons</i> ); cianobacterias <i>Microcoleus vaginatus</i> , <i>Nostoc punctiforme</i> , <i>Chroococcus</i> sp., y alga verde ( <i>Palmella</i> )	Desierto de Negev, Israel	34 nmoles N cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup>	Actividad reductora de acetileno (Incubaciones en laboratorio)	Zaady et al. 1998

Tabla 2. Continuación				
Microorganismos fijadores	Habitat	Tasa de fijación de N	Método utilizado para la estimación de la FBN	Referencia
Costras microbióticas formadas por bacterias de vida libre ( <i>Azotobacter</i> ), cianobacterias de vida libre ( <i>Nostoc commune</i> ), y cianobacterias en simbiosis con líquenes ( <i>Collera</i> , <i>Psora</i> , <i>Peltula</i> y <i>Heppia</i> )	Las Cruces, Desierto Chihuahuense, Nuevo México, EU	0.01 g N ha <sup>-1</sup>	Actividad reductora de acetileno (incubaciones en laboratorio)	Hartley y Schlesinger, 2002.
Costras formadas por <i>Microcoleus-Scytonema-Nostoc-Collea</i>	Parque Nacional Cañón del Colorado, Colorado Plateau, Utah, EU	0.8 – 4.4 kg N ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup>	Actividad reductora de acetileno (Incubaciones en laboratorio)	Belnap, 2002
Costras formadas por <i>Microcoleus</i>	Parque Nacional Cañón del Colorado, Colorado Plateau, Utah.	0.1 – 0.7 kg N ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup>	Actividad reductora de acetileno (Incubaciones en laboratorio)	Belnap, 2002
Rhizobium-leguminosa	Desierto Chihuahuense	21 kg N ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup>	ND	Schlesinger, 2002
Carpetas de musgos ( <i>Pleurozium schreberi</i> ) con <i>Nostoc</i>	Bosques boreales prístinos en Suecia, Noruega y Finlandia		Actividad reductora de acetileno calibrada con <sup>15</sup> N (incubaciones en campo)	De Luca et al. 2002
Fijación no simbiótica	Bosques boreales de Estados Unidos, Alaska, Japón, Canadá, y Suiza	0.01 – 12 kg N ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup>	Actividad reductora de acetileno	Son (2001)

Notas: a) se respetó la escritura de las unidades con las que se expresa la fijación de nitrógeno con el fin de expresar la dificultad para su comparación directa. b) aunque todas las referencias señalan la actividad reductora de acetileno como método de estimación, algunas incubaciones se realizaron en campo y otras en laboratorio. c) ND = datos no disponibles

## Degradación de suelo

La degradación del suelo es un fenómeno muy complejo que representa uno de los principales problemas ambientales que enfrenta la humanidad. Se refiere a los procesos inducidos por las actividades humanas que provocan la disminución de su productividad biológica y de su biodiversidad, así como de la capacidad actual y/o futura para sostener la vida humana y para producir bienes y servicios (Oldeman, 1988). Una de las consecuencias más graves de la degradación del suelo es la disminución de su calidad, entendiéndose ésta como la capacidad de un tipo específico de suelo para sostener la productividad vegetal y animal, mantener o mejorar la calidad del aire y del agua y sostener la salud humana, todo esto dentro de los límites de un ecosistema natural o manejado (Doran y Parkin, 1994).

A diferencia de la antigua visión que sólo consideraba al suelo como fuente de nutrimentos y sostén para las plantas cultivadas, el concepto de calidad de suelo ubica a este recurso como el centro de procesos ambientales en todos los niveles. Así, la calidad del suelo incluye a) la productividad, que se refiere a la habilidad del suelo para promover la productividad del ecosistema o agroecosistema; b) la calidad ambiental, entendida como la capacidad de un suelo para atenuar los contaminantes ambientales, los patógenos, y cualquier posible daño hacia el exterior del sistema, incluyendo también los servicios ambientales como fijación de N, reservorio de C, mantenimiento de la biodiversidad, recarga de acuíferos, etc., y c) la salud, que se refiere a la capacidad de un suelo para producir alimentos sanos y nutritivos para todos los organismos, incluyendo el humano (Astier et al. 2002)

En las zonas áridas y semiáridas, la degradación del suelo puede intensificar la limitación de N debido a las características propias de sus suelos, al régimen climático, o a su uso en actividades pecuarias y agrícolas para las cuales no son aptos (Evans y Ehleringer, 1993; Rapport y Whitford, 1999). En este tipo de ecosistemas, en el valle semiárido de Tehuacán-Cuicatlán, se encontraron los vestigios más antiguos de domesticación de maíz y calabaza, y actualmente las zonas agrícolas de la región, producen cantidades mínimas de frijol y maíz (McAuliffe, et al. 2001). Cuando las zonas áridas son utilizadas para la agricultura, la extracción de la biomasa producida no se repone por la baja cantidad de raíces de los cultivos anuales lo que contribuye al decremento de los almacenes netos de nutrimentos en el suelo (Millenium Ecosystem Assessment, 2004).

Las zonas áridas también se han ocupado de manera intensiva para la producción comercial de ganado (Evans y Ehleringer, 1993; Rapport y Whitford, 1999, Millenium Ecosystem

Assessment, 2004), impactando de manera negativa a los ciclos biogeoquímicos. Se tiene evidencia de que la ruptura y disminución de la cobertura de las costras microbióticas producen una considerable variación en el contenido de N del suelo y que el suelo libre de vegetación tiene significativamente menor cantidad de este elemento que los suelos debajo del dosel (Evans y Ehleringer, 1993). Además, debido a la alta tasa de consumo de vegetación por parte del ganado, gran parte del C orgánico y del N fijado no regresan a enriquecer el suelo porque se pierden vía respiración o desnitrificación, o por su extracción en forma de carne, leche y otros productos animales (Millenium Ecosystem Assessment, 2004).

En México, la degradación del suelo por actividades humanas es un problema que afecta a 45% del territorio nacional. En las zonas secas (zonas muy áridas, áridas, semiáridas y subhúmedas secas) este porcentaje se incrementa a 48% del total de la superficie que ocupan, debido a su uso intensivo como zonas de pastoreo y agrícolas (SEMARNAT, 2005). Además, están sujetas a procesos de degradación natural por agua y viento. Por ello, es necesario realizar investigación que permita entender la dinámica de estos ecosistemas con el objeto de prevenir y/o recuperar los servicios ambientales que en ellos se desarrollan.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En México no se cuenta con estudios que describan la dinámica y composición de las comunidades microbianas relacionadas con el ciclo del N en suelos de zonas secas. Estos ecosistemas son muy frágiles entre otras razones, por las condiciones climáticas y por la baja cantidad de biomasa vegetal que sustentan. La degradación del suelo que afecta el establecimiento de las plantas, debe también afectar a los microorganismos, incluyendo a los fijadores de vida libre. Estas bacterias podrían tener patrones diferentes dependiendo de la especie vegetal con la que tienen contacto, de la disponibilidad estacional de agua, o de los factores fisicoquímicos del suelo que habitan.

Este trabajo se realizó en el valle semiárido de Zapotitlán Salinas, Puebla, en el marco de las siguientes preguntas generales: ¿existe un grupo funcional de bacterias fijadoras de N de vida libre, heterótrofas, en el suelo de esta zona?, asumiendo que sí, ¿es posible aislarlas y mantenerlas en un medio de cultivo libre de N reducido?, ¿cómo es su ambiente edáfico?, ¿responden de manera diferente a la presencia de especies vegetales distintas o a la ausencia de ellas?, ¿quiénes conforman este grupo y cuáles son sus características fenotípicas y genotípicas?, ¿cuál es su respuesta en número y actividad de la enzima nitrogenasa a los cambios estacionales de la zona y a la condición de degradación y conservación del suelo?, y ¿pueden establecerse y mantener su actividad nitrogenasa en un ambiente edáfico que fue modificado de manera experimental?

Para responder estas preguntas se plantearon los siguientes objetivos:

1) describir la dinámica estacional del fósforo (ortofosfatos) y nitrógeno (amonio, nitrato) disponibles, materia orgánica, pH y humedad del suelo de la zona de raíces de *Prosopis laevigata* (leguminosa) y *Pachycereus hollianus* (cactácea) y del suelo libre de vegetación, en dos sitios con diferente nivel de degradación suelo.

2) describir la dinámica poblacional y la actividad reductora de acetileno de bacterias fijadoras de N de vida libre en un ciclo de lluvia-sequía y su relación con la materia orgánica y la humedad del suelo en dos sitios con diferente nivel de degradación del suelo y tres microambientes inmersos en cada uno de ellos: zona de raíces de *Prosopis laevigata* y *P. hollianus* y suelo libre de vegetación.

3) caracterizar por genotipo y fenotipo a las bacterias cultivables, heterótrofas que conforman el grupo funcional de fijadoras de N de vida libre aisladas de los tres microambientes de suelo.

4) determinar por incubaciones en laboratorio, la capacidad de establecimiento y de actividad reductora de acetileno del grupo funcional de fijadoras de N de vida libre, en suelo estéril de la zona de raíces de *Prosopis laevigata*, *P. hollianus* y suelo libre de vegetación.

El trabajo está dividido en cuatro capítulos y una discusión general en la cual se integran los principales resultados de cada uno de ellos. La secuencia en la que se presentan los capítulos corresponde los objetivos anteriores.

Los objetivos 1 y 2 se abordaron con un diseño experimental general consistente en la selección de tres individuos de dos especies vegetales, una leguminosa (*Prosopis laevigata*) y una cactácea (*Pachycereus hollianus*), y tres sitios libres de vegetación. Estos tres microambientes se ubicaron en una zona degradada (nivel extremo de erosión de suelo y escasa cobertura vegetal) y en otra conservada (sin degradación de suelo y cubierta vegetal continua). Se tomaron muestras de suelo de los tres individuos de cada microambiente en las dos zonas (degradada y conservada). Se realizaron siete muestreos cuya distribución cubría desde el inicio de la temporada de lluvias, hasta el siguiente periodo de sequía. Este diseño general permitió describir el ambiente del suelo dónde habitan las fijadoras de N de vida libre (Capítulo I) y la dinámica de dichas bacterias en el tiempo y en los tres microambientes, así como su relación con la materia orgánica y la humedad del suelo (Capítulo II).

Los objetivos 3 y 4 se abordaron, en primera instancia, con el aislamiento de bacterias heterótrofas en medio de cultivo libre de N reducido. Estas bacterias se aislaron del suelo de los tres microambientes, se purificaron y caracterizaron por morfología y tinción de Gram, y se identificaron por la amplificación del gene 16S DNA (Capítulo II y III). Después, se inocularon en suelo estéril para determinar su capacidad de establecimiento y de actividad reductora de acetileno (como medida de la fijación biológica de N). Como parte final de la caracterización, se intentó amplificar y secuenciar el gene *nifH* de las bacterias aisladas. En el capítulo IV se describen estos resultados.

El diseño experimental y los métodos utilizados en este trabajo están enfocados a las bacterias de vida libre, cultivables y heterótrofas; es decir a aquellas que no requieren de la planta para realizar su actividad fijadora y que es posible mantener en un medio de cultivo libre de N reducido. Por ello, el grupo funcional de fijadores de N al que se hace referencia esta formado sólo por bacterias de este tipo.

## ÁREA DE ESTUDIO

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán es la región desértica más sureña en Norteamérica y se encuentra alejada de las otras dos zonas áridas mexicanas, los desiertos Chihuahuense y Sonorense, por cientos de kilómetros (Rzedowski, 1978). Es una región semiárida intertropical que se forma por efecto de la sombra orográfica de la Sierra Madre Oriental (Pavón et al. 2005, UNEP, 2006).

El valle de Tehuacán-Cuicatlán fue decretado como reserva de la biosfera en 1998 y actualmente es considerado como una de las zonas protegidas más importantes del país debido a su alta biodiversidad; por la cual es reconocido como un centro de diversidad y endemismo a nivel mundial por la International Union for the Conservation of Nature (IUCN) (Dávila et al. 2002). La Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán se ubica entre los 17°32'10" y 18°53'00" N y los 96°01'50" y 97°47'50" O en los estados de Puebla y Oaxaca, fuera del cinturón de los grandes desiertos del mundo (25° a 35° de latitud en ambos hemisferios) (UNEP, 2006).

La conformación fisiográfica actual del valle de Tehuacán-Cuicatlán es resultado de una compleja historia geológica que incluye eventos de deposición de sedimentos marinos ricos en sales durante el Cretácico Inferior; movimientos orogénicos que conformaron las principales sierras de la cuenca y que lo aislaron de la cuenca del Balsas, dando origen a un lago endorreico en un periodo que va del Cretácico Inferior a finales del Terciario. Sin embargo, el periodo más importante es la captación del río Salado y sus tributarios por parte del río Santo Domingo, que es un afluente del Papaloapan, a finales del Cuaternario. La unión de estos ríos provocó gran cantidad de erosión remontante y heterogeneidad ambiental con formación de zonas de deposición de materiales aluviales a lo largo del río Salado, cerros con cimas planas, laderas con diferente inclinación, orientación y litología superficial muy variada en la que predominan los afloramientos de calizas, areniscas y lutitas, y en menor medida, depósitos de material ígneo (Osorio-Beristain et al. 1996; Valiente-Banuet et al. 2000).

El valle de Tehuacán-Cuicatlán forma parte de la Provincia fisiográfica Mizteca-Oaxacaqueña, en la cual existen otros pequeños valles de origen tectónico entre los que destacan Cuicatlán, Huajuapán, Tehuacán y Zapotitlán Salinas (Villaseñor et. al. 1990). El presente trabajo se realizó el valle de Zapotitlán Salinas, ubicado en la porción occidental de Tehuacán-Cuicatlán, al Sureste de Puebla y Noreste de Oaxaca. Limita al este con las Sierras de Atzingo y Miahutepec, al norte con los cerros Chacateca y Pajarito, al oeste con los cerros Gordo y Otate, y al sur con los cerros Yistepec y Acatepec. El valle de Zapotitlán tiene una superficie aproximada de 270 km<sup>2</sup>, y

se ubica entre los 18°12' y 18°24' N y 97°24' y 97°36' O; con un rango altitudinal de 1460 a 2600 msnm (López-Galindo et al. 2003 y referencias citadas) (Figura 1).

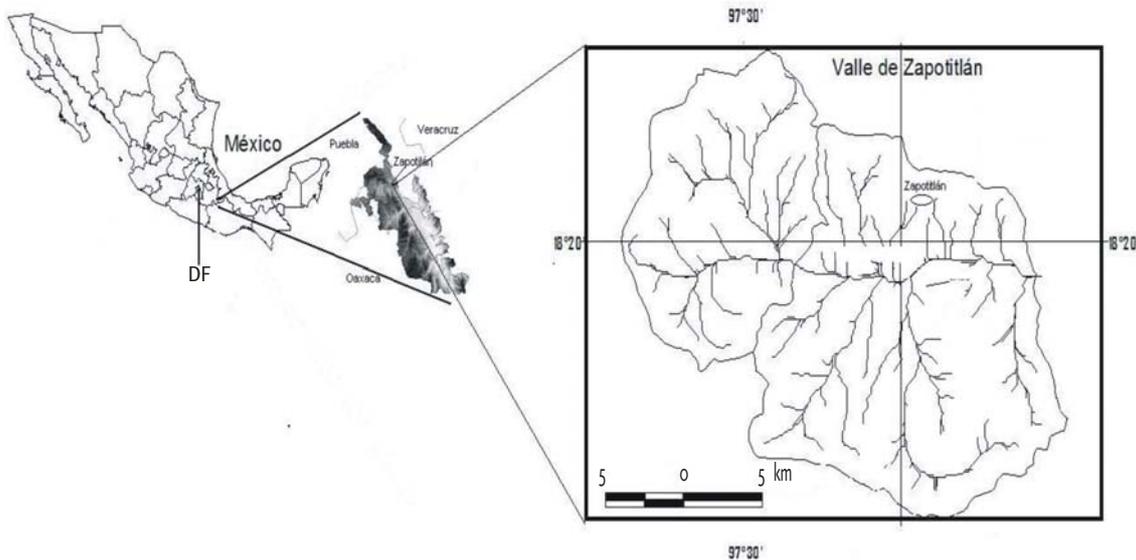


Figura 1. Ubicación geográfica del valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.

El clima de Zapotitlán Salinas está determinado por la Sierra de Zongolica, que detiene los vientos húmedos provenientes del Golfo de México, formando una sombra de lluvia sobre el valle (Osorio-Beristaín et al. 1996). Con base en la clasificación de Köppen modificada por García (1988) es seco semicálido con lluvias de verano (BSohw), con canícula a mitad del periodo de lluvias y precipitación media anual de 412.4 mm. Existe poca oscilación térmica con un rango entre los 17.6 y 23.7°C. El mes más caliente se presenta antes del solsticio de verano (López-Galindo et al. 2003).

Por su hidrología, Zapotitlán pertenece en su mayor parte a la cuenca alta del río Papaloapan y en menor proporción, a la cuenca del Balsas. Además, la cuenca de Zapotitlán está dividida naturalmente en dos subcuencas: Santa Ana y Zapotitlán (López Galindo et al. 2003). Tiene numerosos arroyos intermitentes que corren en varias direcciones, concentrándose en un arroyo principal al centro-este llamado Agua El Gavilán, que es el principal afluente del río Zapotitlán. Debido a que éste río arrastra una gran cantidad de sales de sodio provenientes de las depresiones de Zapotitlán, cuando se une al río Tehuacán forman el río Salado, uno de los principales afluentes del Papaloapan en esta región. En el extremo Sur-Oeste destacan los arroyos Las Manzanas y Acatepec, afluentes del Acatlán, el cual ya pertenece a la cuenca del Balsas ([www.puebla.gob.mx](http://www.puebla.gob.mx)).

En el valle de Zapotitlán Salinas la vegetación dominante es matorral crasicale y desértico rosetófilo, generalmente asociados con cardonales, y ocasionalmente con vegetación secundaria arbustiva. Se han identificado siete tipos de comunidades vegetales: matorral espinoso, tetecheras, selva baja espinosa perennifolia, tetechera-cardonal, cardonal de *Stenocereus stellatus*, cardonal de *Cephalocereus columnatrajani* y selva baja caducifolia. En estas comunidades se encontraron 184 especies, 130 géneros y 50 familias de las cuales, las Cactaceae (21 especies), Leguminosae (19 especies), Asteraceae (16 especies), Euphorbiaceae (13 especies) y Poaceae (12 especies) se encuentran entre las más representativas (Osorio-Beristain et al. 1996).

Los suelos del valle de Zapotitlán Salinas son someros y pedregosos en la mayor parte del área, con diferentes niveles de alcalinidad y salinidad, dependiendo de los sustratos geológicos (López-Galindo et al. 2003). Los principales grupos son Leptosoles y Regosoles. Los Leptosoles son delgados, pedregosos, con limitada vocación agrícola porque la gran el material calcáreo que contienen inmoviliza los nutrimentos minerales. b) Los Regosoles son suelos delgados que se encuentran sobre material no consolidado. Se caracterizan por tener una capa superficial conocida como *ócrica*, que cuando se retira la vegetación se vuelve dura y costrosa, impidiendo la penetración de agua hacia el subsuelo, lo que se vuelve un factor adverso para el establecimiento de las plantas. Esta combinación (baja cubierta vegetal y dificultad de penetración del agua al suelo) favorece la escorrentía superficial y con ello, la erosión.

En el municipio de Zapotitlán, 28% (12,203 ha) de su superficie presenta degradación de gsuelos causada por el hombre, el resto (78%; 31,459 ha) se considera como tierras sin uso con influencia humana ubicadas principalmente en cerros y montañas y sujetas a procesos de degradación natural (SEMARNAT-COLPOS, 2003).

La degradación del suelo en el municipio de Zapotitlán se puede describir por tres aspectos: causas, tipos y niveles de afectación.

#### a) Causas

La degradación del suelo es originada a) sobrepastoreo, que tiene efectos en la compactación del suelo por el pisoteo y en la disminución de la cubierta vegetal por la alimentación del ganado. Estos elementos están asociados con la erosión eólica e hídrica. b) actividades agrícolas mal desarrolladas que tienen como consecuencia la erosión hídrica y eólica, y la degradación química por la pérdida de nutrientes, y c) por el uso de suelo en actividades no biológicas como minas, aguas residuales, canteras, basureros y actividades industriales en general (Tabla 3; Figura 2).

Tabla 3. Causas de la degradación del suelo causada por el hombre en Zapotitlán Salinas, Puebla.

Causas de degradación	Superficie Afectada	
	Ha	%
Sobrepastoreo	5161	11.8
Agricultura	3602	8.2
Agricultura y sobrepastoreo	3191	7.3
Actividades no-biológicas	249	0.6
Total	12203	28

Nota: todos los porcentajes se obtuvieron con respecto a la superficie total de municipio de Zapotitlán (43 662 ha)

Fuente: Elaboración propia con datos de SEMARNAT-COLPOS, 2003 .

#### b) Tipos de degradación

En el suelo degradado, el tipo de degradación dominante es la erosión eólica con disminución del horizonte superficial del suelo por la remoción uniforme de las partículas. Le sigue la degradación química, en la cual hay un decremento neto de la cantidad de nutrientes y materia orgánica del suelo, lo que origina la pérdida de la productividad biológica. En tercer lugar se encuentra la erosión hídrica superficial que con escorrentías arrastra los materiales del horizonte superficial; y la erosión hídrica con deformación del terreno, en la que hay remoción irregular o el movimiento en masa de los materiales, mostrando la formación de canales y cárcavas. Finalmente, la degradación física por uso no biológico del suelo (Tabla 4, Figura 3).

Tabla 4. Tipos de degradación del suelo causada por el hombre en el municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla.

Tipos de degradación	Superficie afectada	
	Ha	%
Erosión eólica con pérdida superficial de suelo	6279	14.4
Degradación química por pérdida de la fertilidad	2565	5.9
Erosión hídrica con pérdida de suelo superficial	2074	4.7
Erosión hídrica deformación de terreno (canales y cárcavas)	1036	2.4
Degradación física por uso no biológico del suelo	249	0.6
<b>Total</b>	<b>12203</b>	<b>28</b>

Nota: todos los porcentajes se obtuvieron con respecto a la superficie total de municipio de Zapotitlán (43 662 ha).

Fuente: Elaboración propia con datos de SEMARNAT-COLPOS, 2003.

c) Nivel de afectación. Depende de las consecuencias en la productividad de los sistemas locales de uso forestal, pecuario y agrícola. En Zapotitlán se encuentran tres niveles: 1) Ligero: la reducción en la productividad es apenas perceptible; 2) Moderado: los terrenos presentan una marcada reducción en su productividad; 3) Extremo: la productividad del suelo es irrecuperable y su restauración es materialmente imposible (Tabla 5; Figura 4).

Tabla 5. Niveles de degradación del suelo causada por el hombre en el municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla.

Nivel de degradación	Tipo de degradación	Superficie afectada	
		Ha	%
Ligero	Degradación química por pérdida de la fertilidad	2565	5.9
	Erosión hídrica con pérdida de suelo superficial	2073.6	4.8
	Erosión eólica con pérdida de suelo superficial	1673.7	3.8
Moderado	Erosión eólica con pérdida de suelo superficial	4605	10.6
	Erosión hídrica con deformación de terreno	1037	2.4
Extremo	Degradación física por uso no biológico	249 ha	0.6
	<b>Total</b>	<b>12203</b>	<b>28</b>

Nota: todos los porcentajes se obtuvieron con respecto a la superficie total de municipio de Zapotitlán (43 662 ha)

Fuente: Elaboración propia con datos de SEMARNAT-COLPOS, 2003.

Figura 2. Causas de la degradación del suelo causada por el hombre en el municipio de Zapotitlán Salinas

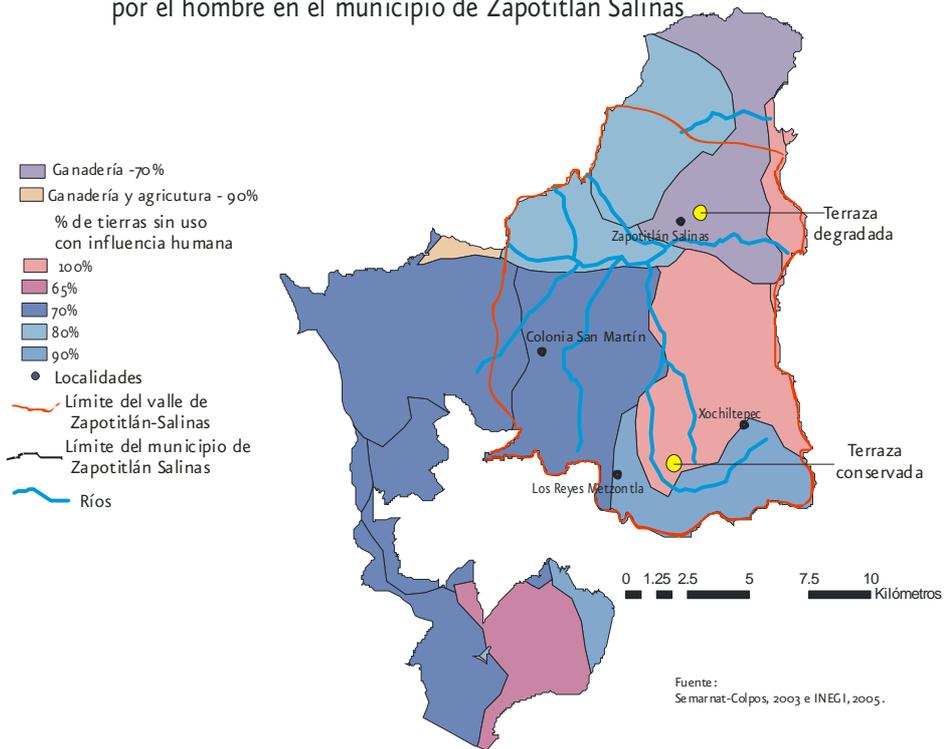


Figura 3. Tipos de degradación del suelo causada por el hombre en el municipio de Zapotitlán Salinas

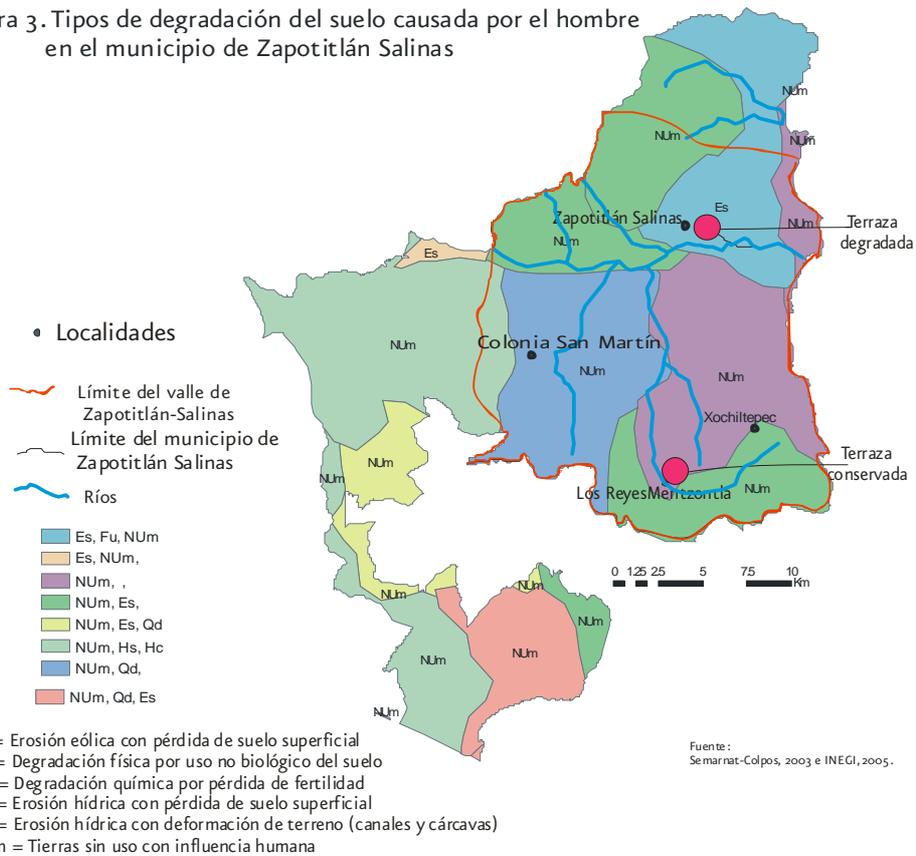


Figura 4. Niveles de degradación del suelo causada por el hombre en el municipio de Zapotitlán Salinas



De la descripción anterior en el nivel municipal sobre la degradación del suelo, se desprende que específicamente en el valle de Zapotitlán, la degradación causada por el hombre tiene su origen en las actividades agrícolas y pecuarias, que el tipo de degradación dominante es la eólica y la física, que también existen tierras sin uso sujetas a procesos de degradación natural, y que los niveles de degradación se encuentran entre ligero y extremo (Figuras 2, 3 y 4).

El valle de Zapotitlán Salinas es una de las regiones de depósito de material aluvial particulado, el cual se acumuló en las orillas del río Zapotitlán y formó unidades fisiográficas denominadas terrazas aluviales. Las terrazas ocupan diferente superficie y muestran diferente nivel de deterioro ambiental que va desde zonas conservadas sin signos evidentes de degradación de suelo y de extracción y manejo de la vegetación, hasta sitios con suelos erosionados y con vegetación distribuida en fragmentos aislados (López-Galindo, et al. 2003).

En este trabajo se seleccionaron dos terrazas aluviales. La primer terraza, denominada *degradada*; se encuentra cerca de la localidad de Zapotitlán. La segunda terraza, denominada *conservada* se encuentra cerca de la localidad Los Reyes Metzontla. Esta categorización fue hecha por López-Galindo et al. (2003) con base en la cobertura vegetal y en el estado de degradación del suelo (López-Galindo, et al. 2003). En ninguna de estas terrazas, específicamente en los sitios

donde se tomaron las muestras de suelo, se han realizado prácticas agrícolas; sin embargo, los pobladores tienen la libertad de utilizarlas como zonas de pastoreo para ganado caprino.

La terraza degradada forma parte de una región geomorfológica conocida como tierras malas (badlands). Estas zonas se definieron originalmente como sitios extremadamente diseccionados en donde era muy difícil transitar a caballo y que no se podían usar con fines agrícolas. Actualmente se les considera sitios con escasa cobertura vegetal y con una gran proporción de suelo severamente degradado y expuesto a los agentes erosivos (viento y agua). Se caracterizan por la formación de canales y cárcavas que incrementan el movimiento en masa y los procesos de arrastre del suelo durante las tormentas. El efecto combinado del clima y el uso del suelo impiden la recuperación de su fertilidad e incrementan su erosión (Torri y Rodolfi, 2000; Noguera et al. 2000).

La mayor parte del deterioro del suelo en la terraza degradada (18°19' N y 97°27' O; 1495 msnm) tuvo su origen en los eventos de erosión remontante que se dieron por la unión de los ríos Salado y sus tributarios (uno de los cuales es el río Zapotitlán) con el Santo Domingo, a finales del Cuaternario (Osorio-Beristain et al. 1996). Sin embargo, en los alrededores de la terraza se han encontrado evidencias de erosión de suelo causada por las actividades agrícolas que se han practicado desde la época precolombina (McAuliffe et al. 2001).

Aunque no se cuenta con datos sobre las causas, tipos y niveles de degradación específicamente para las terrazas (ver figuras 2, 3 y 4), en la degradada existen signos evidentes que indican niveles severos y extremos de deterioro, como la distribución fragmentada de la vegetación, en la cual los fragmentos formados incluso por un solo individuo están rodeados por cárcavas o suelo desprovisto de vegetación, haciéndola más susceptible a la erosión eólica e hídrica. Además, el suelo muestra degradación física por compactación lo cual dificulta la infiltración del agua, y promueve las escorrentías superficiales y con ello el movimiento en masa con la formación de nuevos canales. En el suelo desprovisto de cobertura vegetal no existe un horizonte orgánico; y en los fragmentos de vegetación es apenas perceptible y sujeto a los agentes erosivos por la falta de protección que brinda la cubierta vegetal densa. La textura del suelo es franco-arcillosa (Figura 5).

## Terraza degradada

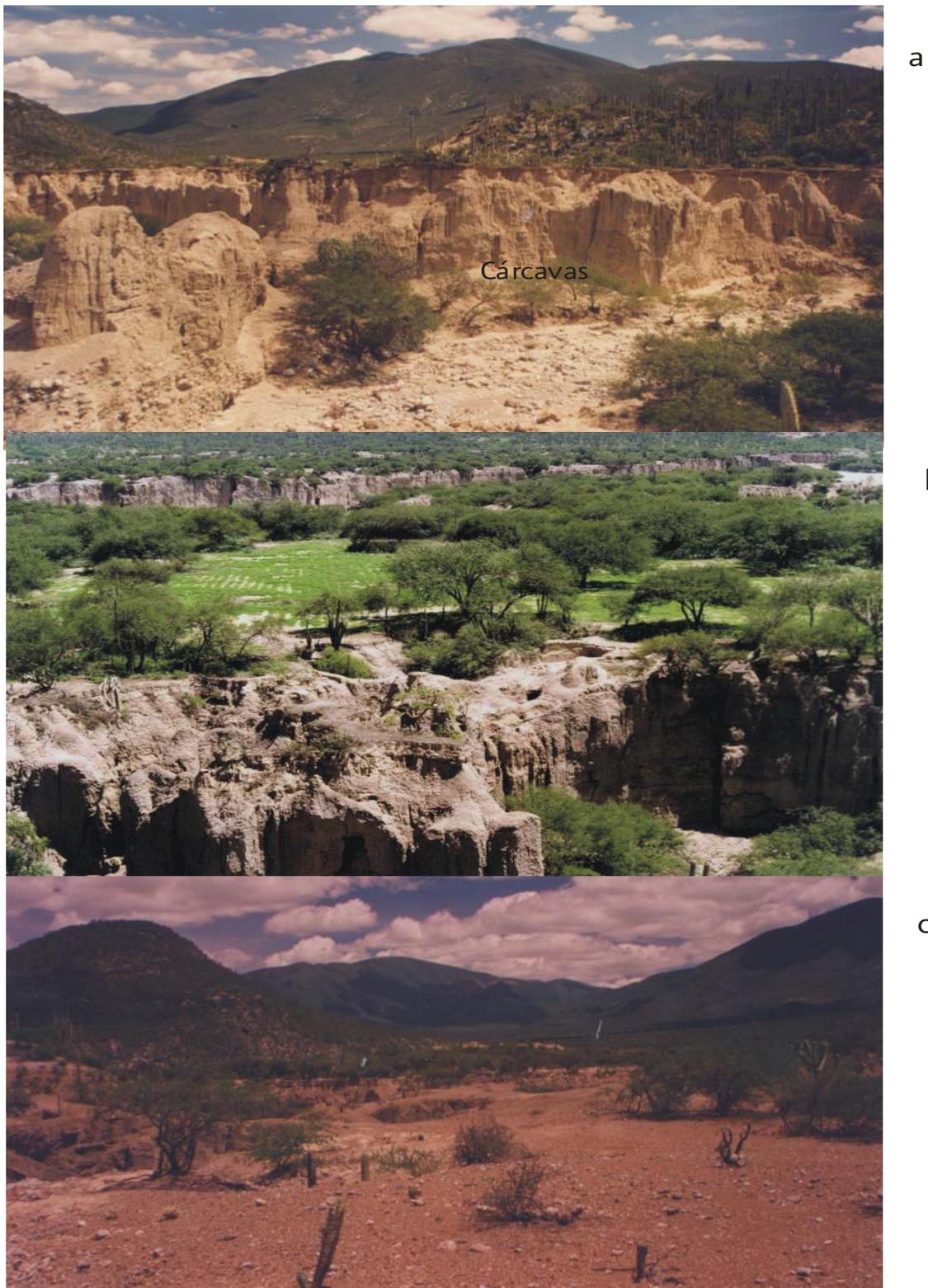


Figura 5. Panorámica de la terraza degradada. La distribución de la vegetación es en fragmentos. No hay formación de horizonte orgánico ni acumulación de hojarasca en el suelo expuesto. a) Zona de cárcavas en temporada de sequía, b) Zona de cárcavas con cultivos en temporada de lluvias; c) Acercamiento de la zona de muestreo durante la temporada de sequía.

La segunda terraza se denominó conservada ( $18^{\circ}18' N$  y  $97^{\circ} 29' 0$ ; 1560 msnm) porque en la mayoría de su superficie los terrenos son estables con cobertura vegetal natural permanente (López-Galindo et al. 2003). Existe un horizonte superficial delgado (4 mm aprox) con acumulación de hojarasca. La textura del suelo es franco-arenosa. La cubierta vegetal es continua y está dominada por leguminosas arbustivas o arbóreas que raramente exceden los 3 metros de altura y por cactáceas columnares, y diversas herbáceas. El suelo es profundo y pedregoso con textura areno-limosa y no se observan signos evidentes de erosión ni de formación de canales o cárcavas.

El riesgo de degradación del suelo y de la vegetación en esta terraza puede ser muy alto, ya que por sus características, algunas partes contiguas a la zona de muestreo ya están siendo transformadas en tierras de cultivo de temporal por la población local. Esto, sumado a las condiciones climáticas, hidrológicas y edáficas, y los altos niveles de pobreza y marginación de las poblaciones humanas asentadas en el área, (que obligan al uso intensivo de suelos no aptos para actividades agrícolas o a la extracción de madera en pie o leña), podría acelerar el proceso de degradación natural del suelo con la consecuente alteración del funcionamiento de este ecosistema semiárido y quizá la formación de paisajes fragmentados similares a la terraza degradada (Figura 6).

## Terraza conservada



a



b



c

Figura 6. Panorámica de la terraza conservada. La distribución de la vegetación es continua. Hay acumulación de hojarasca en toda la superficie del suelo. a) Temporada de lluvia. b) Temporada de sequía.; c) Acercamiento a la zona de muestreo durante la temporada de lluvias.

## LITERATURA CITADA

- Astier-Calderón, M., Maass-Moreno, M., Etchevers-Barra, J. 2002. Derivación de indicadores de calidad de suelos en el contexto de la agricultura sustentable. *Agrociencia* 36, 605-620.
- Belnap, J., Lange, O.L. (eds). 2001. *Biological soil crusts: structure, function and management*. Springer, Berlin.
- Belnap, J. 2002. Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA. *Biology and Fertility of Soils* 35, 128-135.
- Belnap, J. Hawkes, C.V., Firestone, M.K. 2003. Boundaries in miniature: two examples from soil. *Bioscience* 53: 739-749.
- Billings, S.A., Schaeffer, S.M., Evans, R.D. 2003. Nitrogen fixation by biological soil crusts and heterotrophic bacteria in a Mojave Desert ecosystem with elevated CO<sub>2</sub> and added soil carbon. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 643-649.
- Binkley, D., Son, Y., Valentine, D.W. 2000. Do forests receive occult inputs on nitrogen?. *Ecosystems* 3: 321-331.
- Bürgmann, H., Widmer, F., Von Sigler, W., Zeyer, J. 2004. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 240-247.
- Chapin III, S.F., P.A. Matson & H.A. Mooney. 2002. *Principles of terrestrial ecosystem ecology*. Springer-Verlag, New York. 436 pp.
- Dávila, A.P., Arizmendi, M.C., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J.L., Casas, A., Lira, R. 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Biodiversity and Conservation* 11: 421-442.
- De Luca, T., Zackrisson, O., Nilsson, M.C., Sellstedt, A. 2002. Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests. *Nature* 419: 917-920.
- Doran, J.W., Parkin, B.T. 1994. *Defining soil quality for a sustainable environment*. Soil Science Society of America, Inc. Special Publication 35. Madison, Wisconsin, USA.
- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A., Kuske, C.R. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1662-1669.
- Dunbar, J., Barns, S.M. Ticknor, L.O., Kuske, C.R. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3035-3040.
- Evans, R.D., Ehleringer, J.R. 1993. A break in the nitrogen cycle in aridlands? Evidence from <sup>15</sup>N of soils. *Oecologia* 94: 314-317.
- Frías-Hernández, J.T., Aguilar-Ledesma, L., Olalde-Portugal, V., Balderas-López, J.A., Gutiérrez-Juárez, G., Alvarado-Gil, J.J., Vargas, H., Albores, A., Dendooven, L., Miranda, C.M. 1999. Soil characteristics in semiarid highlands of central México as affected by mesquite trees (*Prosopis laevigata*). *Arid Soil Research and Rehabilitation* 13: 305-312.
- García E. 1988. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Instituto de Geografía, UNAM, México.

- García-Moya, E., McKell, C.M. 1970. Contribution of shrubs to the nitrogen economy of a desert-wash plant community. *Ecology* 51: 81-88.
- Geesing, D., Felker, P., Bingham, R.L. 2000. Influence of mesquite (*Prosopis glandulosa*) on soil nitrogen and carbon development: implications for global carbon sequestration. *Journal of Arid Environments* 46: 157-180.
- Golubov, J., Mandujano, M.C., Eguiarte, L.E. 2001. The paradox of mesquites (*Prosopis* spp.): invading species or biodiversity enhancers. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 69: 23-30.
- Graham, R.C., Hirmas, D.R., Wood, E.A. 2008. Large near-surface nitrate pools in soils capped by desert pavement in the Mojave Desert, California. *Geology* 36: 259-262.
- Grimm, N.B., Petrone, K.C. 1997. Nitrogen fixation in a desert stream ecosystem. *Biogeochemistry* 37: 33-61.
- Hartley, A.E., Schlesinger, W.H. 2002. Potential environmental controls on nitrogenase in biological crusts of the northern Chihuahuan Desert. *Journal of Arid Environments* 52: 293-304.
- Herman, R.P., Provencio, K., Torrez, R., Seager, G.M. 1993. Effect of water and nitrogen additions on free-living nitrogen fixer populations in desert grass root zones. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3021-3026.
- Herman, R.P., Provencio, K., Torrez, R., Seager, G.M. 1994. Seasonal and spatial population dynamics of the nitrogen efficient guild in a desert Bajada grassland. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1160-1165.
- Herman, R.P., Provencio, K.R., Herrera-Matos, J., Torrez, R.J. 1995. Resource islands predict the distribution of heterotrophic bacteria in Chihuahuan Desert soils. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1816-1821.
- Johnson, H.B., Mayeux, Jr., H.S. 1990. *Prosopis glandulosa* and the nitrogen balance of rangelands: extent and occurrence of nodulation. *Oecologia* 84: 176-185.
- Kuske C.R., Ticknor, L.O., Miller, M.E., Dunbar, J.M., Davis, J.A., Barns, S.M., Belnap, J. 2002. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1854-1863.
- Loera T.M.L., Sánchez Yañez, J.M., Peña-Cabriales, J.J. 1996. Acetylene reduction activity on the root of cactaceous plants. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 38:7-15.
- López-Galindo, F., Muñoz-Iniestra, D., Hernández-Moreno, M., Soler-Aburto, A., Castillo-López, M.C., Hernández-Arzate, I. 2003. Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación del suelo en la subcuena de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* LVI: 19-41.
- Lloret, L., Martínez-Romero, E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47: 43-60.

- McAuliffe, J.R., Sundt, P.C., Valiente-Banuet, A., Casas, A., Viveros, J.L. 2001. Pre-columbian soil erosion, persistent ecological changes, and collapse of a subsistence agricultural economy in the semi-arid Tehuacán Valley, Mexico's 'Cradle of Maize'. *Journal of Arid Environments* 47: 47-75.
- Millenium Ecosystems Assessment, 2005. Ecosystems and human well-being: current state and trends. *Dryland Systems*. Hassan, R., Scholes, R., Ash, N. (Eds). Island Press, Washinton, D.C., pp. 625- 662.
- Oldeman, L.R. 1998. Guidelines for general assessment of the status of human-induced soil degradation. Working paper 88/4. Internacional Soil Reference and Information Centre (ISRIC), Wageningen, 151 pp.
- Nogueras, P. Burjachs, F. Gallart, F. Puigdefábregas, J. 2000. Recent gully erosion in the El Cautivo badlands (Tabernas, SE Spain). *Catena* 40, 203-215
- Osorio-Beristain, O., Valiente-Banuet, A., Dávila, P., Medina, R. 1996. Tipos de vegetación y diversidad  $\beta$  en le valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 59: 35-58.
- Pavón, N.P., Briones, O., Flores-Rivas, J. 2005. Litterfall production and nitrogen content in an intertropical semi-arid Mexican scrub. *Journal of Arid Environments* 60, 1-13.
- Perroni-Ventura, Y., Montaña, C., García-Oliva, F. 2006. Relationship between soil nutrient availability and plant species richness in a tropical semi-arid environment. *Journal of Vegetation Science* 17, 719-728.
- Postgate, J. 1998. *Nitrogen Fixation*. 3<sup>a</sup> ed. Cambridge University Press. Great Britain.
- Rapport, D.J., Whitford, W.G. 1999. How ecosystems respond to stress. *Bioscience* 49, 193-203.
- Rastetter, E.B., Vitousek, P.M., Field, C., Shaver, G.R., Herbert, D., Agren, G.I. 2001. Resource optimization and symbiotic nitrogen fixation. *Ecosystems* 4: 369-388.
- Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., Blankenship, R.E. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution* 21: 541-554.
- Rösh. C., Mergel, A., Bothe, H. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in a acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3818-3829.
- Rudnick, P., Meletzus, D., Green, A., He, L., Kennedy, C. 1997. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 831-841.
- Rzedowski, J. 1978. *La vegetación de México*. Limusa. México.
- Schaeffer, S.M., Evans R.D. 2005. Pulse additions of soil carbon and nitrogen affect soil nitrogen dynamics in an arid Colorado Plateau shrubland. *Oecologia* 145: 425-433.
- Schlesinger, W.H. 2002. Desertification: changes in soil biogeochemistry in the Chihuahuan desert. *Geology, Biogeochemistry, and Ecology: a new synthesis for arid landscape processes*. Paper No. 28-1. October 27-30, 2002. Disponible en: [www.gsa.confex.com/gsa/2002AM/finalprogram/abstrac\\_42469.htm](http://www.gsa.confex.com/gsa/2002AM/finalprogram/abstrac_42469.htm).
- SEMARNAT-COLPOS, 2003. Evaluación de la degradación del suelo causada por el hombre en la República Mexicana. Escala 1: 250, 000. Memoria Nacional 2001-2002. México.
- SEMARNAT, 2005. Informe de la situación del medio ambiente en México en 2005. Disponible en: [www.semarnat.gob.mx/informaciónambiental](http://www.semarnat.gob.mx/informaciónambiental)

- Son, Y. 2001. Non-symbiotic nitrogen fixation in forest ecosystem. *Ecological Research* 16:183-196.
- Torri, D., Rodolfi, G. 2000. Badlands in changing environments: an introducción. *Catena* 40: 119-125.
- UNEP, 2006. Global deserts outlook. Ezcurra, E. (Ed). UNEP. San Diego.
- Valiente-Banuet, A., Casas, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arizmendi, M.C., Villaseñor, J.L., Ortega, J. 2000. La vegetación del valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 67: 24-27.
- Vitousek, P.M. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57:1-45.
- Villaseñor, J.L., Dávila, P. Chiang, F. 1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 50: 135-149.
- Vitousek, P.M., Howarth, R.W. 1991. Nitrogen limitation on land and the sea: how can it occur? *Biogeochemistry* 13: 87-115.
- West, N.E. 1990. Structure and function of microphytic soil crusts in wildland ecosystems of arid to semiarid regions. *Advances in Ecological Research* 20: 179-223.
- Whitford, W.G., 2002. Ecology of desert systems. Academic Press, Great Britain.
- Wullstein, L.H. 1989. Evaluation and significance of associative dinitrogen fixation for arid soil rehabilitation. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 3: 259-256.
- Xie, G., Steinberger, Y. 2002. Dynamics of the nitrogen-efficient guild and its relationship to nitrogen and carbon patterns in two desert soil ecosystems. *Arid Land Research and Management*. 16: 69-81.
- Yeager, C.M., Kornosky, J.L., Housman, D.C, Grote, E.E., Belnap, J., Kuske, J. 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 973-983.
- Zaady, E., Groffman, P., Shachak, M. 1998. Nitrogen fixation in macro- and microphytic patches in the Negev Desert. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 449-454.
- Zahran, H.H. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 968-989.

# CAPÍTULO I

## VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE NUTRIMENTOS DEL SUELO EN DOS TERRAZAS ALUVIALES EN ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA

### INTRODUCCIÓN

Los suelos de las zonas áridas y semiáridas presentan una gran heterogeneidad temporal y espacial en la distribución de los nutrientes y del agua (Xie y Steinberger, 2001) debido entre otros factores a la microtopografía del terreno y a la distribución de la cobertura vegetal (Schlesinger et al. 1996). La modificación o eliminación de esta última, ya sea por eventos naturales o antropogénicos repercute en las propiedades fisicoquímicas del suelo (Le Houérou, 1996) como el contenido de carbono orgánico y el incremento de la densidad aparente, lo que a su vez afecta el ciclo hidrológico y la productividad primaria (Albaladejo et al. 1998).

En estos ecosistemas la naturaleza estacional de la disponibilidad de agua tiene consecuencias significativas en los ciclos biogeoquímicos (Austin et al. 2004). La intensidad, frecuencia y estacionalidad de la precipitación repercuten en la productividad primaria, la actividad microbiana y los procesos relacionados con éstos (Schaeffer y Evans, 2005). Incluso, los procesos de descomposición tienen diferencias entre sistemas semiáridos y áridos dependiendo de la disponibilidad de agua en el suelo (Whitford, 2002).

La limitación nutrimental de la productividad primaria de los ecosistemas áridos está dada principalmente por el N y el P (Whitford, 2002), y su dinámica se relaciona con los pulsos de agua en el suelo seco. El N mineral se puede acumular durante la temporada seca debido a la disminución en la demanda de los microorganismos y las plantas y porque su difusión requiere de la presencia de una película de agua (Austin et al. 2004). Además, la entrada repentina produce un choque osmótico en las células microbianas, que al romperse dejan libres compuestos orgánicos con P y N (Austin et al. 2004). El N liberado es relativamente lábil y puede ser tomado rápidamente por plantas y microorganismos o transformado por organismos quimioautótrofos o heterótrofos vía nitrificación y desnitrificación. La dinámica del N también está particularmente afectada por el C, ya que éste provee la energía necesaria para las transformaciones que realizan las bacterias heterótrofas como la mineralización, fijación e inmovilización del N inorgánico (Schaeffer y Evans, 2005).

La dinámica de los nutrientes en el suelo de las zonas áridas, particularmente de aquellos que son limitantes de la productividad primaria, depende directamente de la transformación microbiana de la materia orgánica (Perroni-Ventura et al. 2006). En el valle semiárido de Zapotitlán Salinas, estos elementos afectan la abundancia y la riqueza de las especies vegetales que crecen bajo el dosel de *Prosopis laevigata* y *Cercidium praecox*. La abundancia de especies vegetales se relacionó de manera positiva con la mineralización del C y N, mientras que en la riqueza de especies, además de la mineralización de estos dos elementos, interviene el incremento en los almacenes totales de C, N y P y la actividad de la biomasa microbiana (Perroni-Ventura et al. 2006). En este estudio también se encontró que el suelo bajo el dosel de *P. laevigata* contiene más C y N que el suelo de *C. praecox*, lo cual se explica porque *P. laevigata* tiene la capacidad de fijar N atmosférico en asociación con bacterias del grupo de los rizobios (Perroni-Ventura et al. 2006), y produce mayor cantidad de hojarasca con mayor concentración de N (Pavón et al. 2005).

En esta misma comunidad vegetal, la producción promedio de hojarasca se estima en  $25 \text{ g m}^{-2} \text{ año}^{-1}$ , con concentración media de N de  $0.65 \text{ g m}^{-2} \text{ año}^{-1}$ . Esta producción ocurre en pulsos cuya magnitud depende de la cantidad de lluvia que cae durante la etapa de crecimiento vegetal. Por ello se sugiere que la disponibilidad de los nutrientes en suelo también se realiza en forma de pulsos asociados a los eventos lluviosos que ocurren después la sequía (Pavón et al. 2005). Los ciclos biogeoquímicos en las zonas áridas y semiáridos dependen de la capacidad de los microorganismos del suelo para utilizar estos pulsos de recursos (Shaeffer y Evans, 2005).

El agua es el elemento que dirige la dinámica del ecosistema en Zapotitlán (Pavón y Briones, 2001), y con base en su estacionalidad, los estudios sobre los nutrientes se han enfocado a la producción de hojarasca en especies perennes y su contenido de N (Pavón et al. 2005), y a la concentración de C, N y P y su relación con la riqueza y abundancia de especies vegetales (Perroni-Ventura et al. 2006); sin embargo, la dinámica estacional de los nutrientes del suelo (N y P) entre dos especies de familias diferentes (una cactácea y una leguminosa) no se había realizado.

El objetivo del presente capítulo fue comparar la dinámica del P en forma de ortofosfatos ( $\text{P-HCO}_3$ ) y el N en forma de  $\text{NO}_3$ , y  $\text{NH}_4$  y el pH del suelo de la zona de raíces de dos especies vegetales, una cactácea (*Pachycereus hollianus*) y una leguminosa (*Prosopis laevigata*) y el suelo libre de vegetación, durante un ciclo de lluvia-sequía en dos sitios que se diferencian por el nivel de degradación del suelo y la vegetación (terrazza conservada y degradada). Se esperaba que en el

nivel de microambientes, la mayor concentración de nutrientes estuviera en el suelo de *P. laevigata*, y en el nivel de terrazas, en la conservada. Asimismo, se esperan diferencias entre los diferentes tiempos de muestreo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras de suelo**

Este trabajo se realizó en dos terrazas aluviales, una conservada y una degradada en el valle de Zapotitlán Salinas. Dentro de cada terraza, se seleccionaron tres individuos de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex Willd) (Mimosaceae); tres de *Pachycereus hollianus* (F.A.C.Weber) Buxb (Cactaceae) y tres sitios de suelo libre de vegetación. Estos sitios se consideraron como tres microambientes diferentes.

El suelo se tomó en un radio de 20 a 50 cm alrededor de las plantas en los primeros 10 cm de profundidad, utilizando un nucleador. El suelo libre de vegetación se colectó a la misma profundidad, pero alejados de las plantas: en la terraza degradada, la planta más cercana se encontraba en un radio de 10 m y la superficie del suelo no presentaba costras microbióticas u hojarasca. En la terraza conservada no fue posible mantener esta distancia por las condiciones de cobertura vegetal. En este caso, la mayor distancia correspondió a un radio de 1 m de la planta más cercana y antes de tomar la muestra, se retiró la capa superficial de hojarasca.

Se realizaron 7 muestreos en el ciclo de lluvia-sequía 2002-2003. Se realizaron 4 muestreos durante la temporada de lluvias entre los meses de julio a septiembre y 3 muestreos en la temporada de sequía en octubre y noviembre de 2002 y marzo de 2003. Este diseño se aplicó en ambas terrazas, por lo cual se obtuvieron 3 microambientes x 3 réplicas de cada uno x 7 muestreos.

### **Análisis de suelo**

#### **Ortofosfatos**

El P disponible, medido como ortofosfato extraíble en bicarbonato de sodio 0.5 M ( $\text{P-HCO}_3$ ), se registró por colorimetría a 660 nm (Espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR, Spectrum 2000) (Cajuste, 1986, Muñoz et al. 2000). Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g g}^{-1}$  suelo seco.

## Amonio y Nitrato

La concentración de amonio ( $\text{NH}_4$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3$ ) extraíble se determinó por colorimetría a partir de extractos de suelo realizados con sulfato de potasio 0.5 M. El  $\text{NH}_4$  se registró a 660 nm y el  $\text{NO}_3$  a 410 nm (Espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR, Spectrum 2000) (Forster, 1995). Los resultados de las dos variables se expresaron en  $\mu\text{g g}^{-1}$  suelo seco, con los cuales se obtuvo la relación  $\text{NO}_3:\text{NH}_4$  de cada muestra de suelo.

## pH

Se determinó con potenciómetro (Waterproof pH test 2), utilizando una relación de 1 parte de suelo y 2.5 partes de agua destilada.

## Análisis estadístico

Los valores de  $\text{P-HCO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_3:\text{NH}_4$  y pH, se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis para los factores microambiente y tiempo. El análisis se realizó de manera independiente en cada terraza. Las diferencias se consideraron significativas a  $P \leq 0.05$ . Todos los análisis se realizaron con el programa STATISTICA<sup>®</sup> Edition'99. No se realizó la comparación estadística entre las terrazas debido a que no se cuenta con réplicas de ellas.

## RESULTADOS

### P-HCO<sub>3</sub>

En la terraza degradada hubo dos momentos en que la concentración de  $\text{P-HCO}_3$  disminuyó significativamente ( $P=0.005$ ): cuando la humedad del suelo se encontraba en su máximo nivel (septiembre, 14.2%, Capítulo 2), y mínimo (marzo, 1.7%; Capítulo 2). (Figura 1a).

En la terraza conservada no hubo diferencias significativas ni entre los meses de muestreo, ni entre los microambientes; pero se observó su acumulación en julio y octubre, al inicio de las lluvias y la sequía, respectivamente (Figura 1b).

En ninguna de las dos terrazas se registraron diferencias significativas entre los microambientes, sin embargo, la tendencia de acumulación de  $\text{P-HCO}_3$  fue de mayor concentración en *P. laevigata*, después *P. hollianus* y al final el suelo libre de vegetación.

## **NH<sub>4</sub> y NO<sub>3</sub>**

En la terraza degradada, la concentración de NH<sub>4</sub> en el primer mes de muestreo (inicio de las lluvias) fue significativamente mayor que el resto de los meses (P=0.000), y aunque en el nivel de microambiente no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, su concentración en *P. hollianus* y *P. laevigata* fue mayor que el suelo libre de vegetación (Figura 2a).

En la terraza conservada, la principal diferencia del NH<sub>4</sub> se registró con su acumulación significativa en el primer muestreo (inicio de la temporada de lluvias) con respecto al resto de los meses (P=0.005). En los microambientes, la concentración de NH<sub>4</sub> en el suelo de *P. laevigata* y *P. hollianus* fue significativamente mayor que el suelo de interespacio (P=0.008) (Figura 2b).

Aunque no se realizó una comparación estadística entre las terrazas, la concentración de NH<sub>4</sub> al inicio de las lluvias en la terraza degradada fue menor a la registrada en la conservada.

La concentración de NO<sub>3</sub> no mostró diferencias significativas ni en la temporalidad ni en los microambientes en ninguna de las terrazas debido a la elevada variabilidad en los resultados (Figuras 3a y b).

## **Relación NO<sub>3</sub>:NH<sub>4</sub>**

No se registraron diferencias estadísticamente significativas ni en los meses ni en los microambientes en ninguna de las terrazas; sin embargo el promedio de todos los valores de NO<sub>3</sub>:NH<sub>4</sub> de la terraza degradada fue mayor (0.62) que en la terraza conservada (0.45) (Figura 4a y b).

## **pH**

En la terraza degradada, las diferencias significativas en el pH del suelo sólo se presentaron en el nivel de temporalidad (P=0.000), con los valores más bajos al inicio de ambas temporadas (julio pH=7.5; octubre pH= 7.6), y valores máximos en el segundo muestreo de las lluvias (agosto, pH=7.9) y en el segundo y tercero de la temporada de sequía (pH=8 en ambos muestreos) (Figura 5a).

En la terraza conservada, el pH mostró diferencias significativas tanto en el nivel de tiempo (P=0.0001) como de microambiente (P=0.04). En el nivel de temporalidad, el nivel más bajo de pH (7.5) se registró en dos meses de muestreo: al inicio de la temporada de lluvias (julio) y al inicio de la temporada de sequía (octubre). En el resto de los meses se presentaron los valores

más altos. En el nivel de microambiente, el pH del suelo de *P. hollianus* y el suelo libre de vegetación fueron significativamente mayores que el del suelo de *P. laevigata* (Figura 5b).

## DISCUSIÓN

La disponibilidad de nutrientes en el suelo limita la productividad de los ecosistemas. En el caso de los ecosistemas áridos, el N es el más frecuentemente citado (Whitford, 2002), aunque también el P tiene un papel importante (James et al. 2005, Reed et al. 2007) entre otras razones porque su disponibilidad regula la propia fijación de N (Reed et al. 2007).

Los reservorios de N y P en el suelo tienen origen distinto. El N depende principalmente de procesos biológicos; mientras que en el P, además de éstos, intervienen procesos geoquímicos que lo mantienen en forma no disponible para las plantas (Adams et al. 2004). El P se precipita en presencia de carbonatos y de metales bivalentes como el  $\text{Ca}^+$  y el  $\text{Mg}^+$  a pH neutro y alcalino (Whitford, 2002). El pH de los suelos estudiados fluctuó entre 7.5 y 8 en los tres microambientes de ambas terrazas, por lo que se sugiere que existe un secuestro de los  $\text{P-HCO}_3$  que impidió detectar diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Sin embargo, en la terraza degradada si se registraron diferencias significativas de  $\text{P-HCO}_3$  en el tiempo, ya que en los meses de mayor y menor humedad del suelo (septiembre y marzo), hubo menor concentración, lo cual podría deberse a los cambios en la demanda microbiana y vegetal durante los picos de la temporada de lluvia y de sequía y a la retención en la matriz del suelo.

En ninguna de las dos terrazas se observaron diferencias significativas en la concentración de  $\text{P-HCO}_3$  entre el suelo de la zona de raíces de *P. laevigata*, *P. hollianus* y el suelo libre de vegetación. El rango de concentración reportado en este trabajo es similar a los valores promedio reportados para el suelo dentro y fuera del dosel de *P. levigata*, *Acacia tortuosa*, y *Mimosa biuncifera* ( $20 \mu\text{g P Kg}^{-1}$ ) en otra zona seca del centro de México (Frías-Hernández et al. 1999, Barajas-Aceves y Dendooven, 2001; Reyes-Reyes, 2002).

El  $\text{NH}_4$  se puede formar por amonificación ( $\text{N orgánico} \rightarrow \text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_4$ ), reducción de  $\text{NO}_3$  ( $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NH}_4$ ) o fijación de nitrógeno, y se puede perder por lixiviación o volatilización, la cual es común en suelos con pH mayor a 7 (Whitford, 2002), como es el caso de las terrazas consideradas en este estudio. En estos dos sitios se encontró mayor concentración de  $\text{NH}_4$  en el suelo alrededor de las plantas que en el suelo libre de vegetación, por lo cual su origen al menos en parte, podría ser a través de la amonificación de las proteínas presentes en la materia orgánica

del suelo de ambas plantas, la cual a su vez puede promover la actividad de los fijadores de vida libre, incrementando con ello, la cantidad de  $\text{NH}_4$  disponible en el suelo.

En las dos terrazas se registró la acumulación significativa de  $\text{NH}_4$  al inicio de la temporada de lluvias. Esto puede explicarse por la acumulación de N inorgánico que ocurre en los periodos secos, ya que la difusión de los iones depende de la película de agua en el suelo (Paul y Clark, 1996). En la terraza degradada, la textura del suelo es areno-arcillosa, lo cual podría favorecer su acumulación durante la temporada de sequía. El  $\text{NH}_4$  tiene alta capacidad de adsorción en las arcillas, especialmente cuando el suelo está seco, por lo cual baja su captura biológica (Paul y Clark, 1996). Además, en esta terraza existe menor cobertura vegetal y microorganismos en el suelo (González-Ruiz et al. 2008), que aunque lo prefieren sobre el  $\text{NO}_3$  para incorporarlo a proteínas, la disminución en su actividad biológica e incluso la muerte de parte de la biomasa microbiana, favorecen su acumulación (Austin et al. 2004).

En el  $\text{NO}_3$  no hubo diferencias significativas en ninguna de las terrazas ni entre los microambientes ni a lo largo del tiempo. El  $\text{NO}_3$  es altamente soluble y sólo se acumula de manera significativa en suelos excepcionalmente secos donde la infiltración de agua y la lixiviación son mínimas (Graham et al. 2008). Se tiene registro de que la acumulación de nitrato en los suelos del desierto Chihuahuense, Sonorense, de Mojave (Walvoord et al. 2003), e hiperáridos como el de Atacama (2-21 mm lluvia año<sup>-1</sup> Ewing et al. 2006) es mayor en comparación con los sistemas semiáridos (Graham et al. 2008), como Zapotitlán (400 mm lluvia año<sup>-1</sup>, Pavón et al. 2005) debido a que la precipitación media anual es mayor lo cual favorece la lixiviación y la actividad biológica (Graham et al. 2008)

En la disponibilidad de  $\text{NO}_3$ , además del agua, intervienen otros factores como su rápida captura por las plantas y por los microorganismos del suelo, y por sus pérdidas hacia la atmósfera vía denitrificación. En este proceso hay una serie de reacciones microbianas que lo reducen a  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$ . En el suelo existen muchas bacterias heterotróficas denitrificantes que están reguladas por el pH, la temperatura, el carbono disponible, la disponibilidad de nitrógeno y la presión parcial de oxígeno (Whitford, 2002).

Aunque no se encontraron diferencias significativas en la relación  $\text{NO}_3:\text{NH}_4$  entre los microambientes y el tiempo en ninguna de las terrazas, el cociente promedio  $\text{NO}_3:\text{NH}_4$  de la terraza degradada fue mayor que en la terraza conservada, lo que podría sugerir mayor nitrificación ( $\text{NH}_4 \rightarrow \text{NO}_3$ ) que amonificación. En este último proceso el sustrato es la materia

orgánica, la cual se encuentra en menor cantidad en la terraza degradada (González-Ruiz, et al. 2008, capítulo 2).

Los objetivos del presente capítulo se enfocaron a describir la dinámica del  $\text{P-CO}_3$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$  en un diseño experimental específico y no permiten establecer la limitación por nutrientes en los suelos analizados. Sin embargo, en otro estudio realizado en comunidad vegetal de Zapotitlán, se encontró que en los espacios abiertos y bajo el dosel de *Cercidium praecox* (leguminosa sin capacidad simbiótica para fijar N), el N y el C limitaban la riqueza de especies vegetales; mientras que bajo el dosel de *P. laevigata* (leguminosa con capacidad simbiótica para fijar N), la limitación se debía a la concentración de P disponible (Perroni-Ventura et al. 2006).

En las zonas áridas y semiáridas, la lluvia es altamente variable en tiempo y espacio pero las consecuencias de esta estacionalidad en los ciclos biogeoquímicos y particularmente en el N, son muy complicadas de establecer y varían dependiendo de las condiciones de cada sitio (Austin et al. 2004). Por ejemplo, en el desierto de Mojave, la volatilización del amonio se estimó en  $120 \mu\text{g m}^2 \text{ día}^{-1}$ , (Billings et al. 2002) y en el Chihuahuense entre 9 y  $11 \mu\text{g m}^2 \text{ día}^{-1}$ , la cual se incrementó hasta  $95 \mu\text{g m}^2 \text{ día}^{-1}$  cuando el suelo fue humedecido de manera experimental (Schlesinger y Peterjohn, 1991).

En Zapotitlán no se cuenta con datos de este estilo, los cuales son necesarios para comprender de mejor manera el balance de N en cada terraza. En esta comunidad vegetal, *P. laevigata* es un árbol que mantiene hojas durante todo el año y es la segunda especie productora de hojarasca rica en nitrógeno (Pavón et al. 2005). Estas características pueden ayudar a explicar la tendencia de acumulación de  $\text{P-HCO}_3$  y  $\text{NH}_4$  registrada en su zona de raíces. Aunque no se realizó la comparación estadística entre las terrazas, la concentración de  $\text{P-HCO}_3$  y de  $\text{NH}_4$  en la terraza degradada fue menor que en la conservada. Esto podría apuntar hacia el incremento en la limitación por C, N y P en la abundancia y riqueza de especies vegetales sugerida para la comunidad vegetal de Zapotitlán (Perroni-Ventura, 2006). De esta manera, la ausencia de una cubierta vegetal continua redujo los almacenes de nutrientes en el suelo, y éstos a su vez, se sugiere que limitan la productividad primaria de la zona. Este círculo hace necesaria una mayor investigación sobre la dinámica de nutrientes en el suelo y su relación con las plantas en las diferentes condiciones de degradación y conservación del suelo.

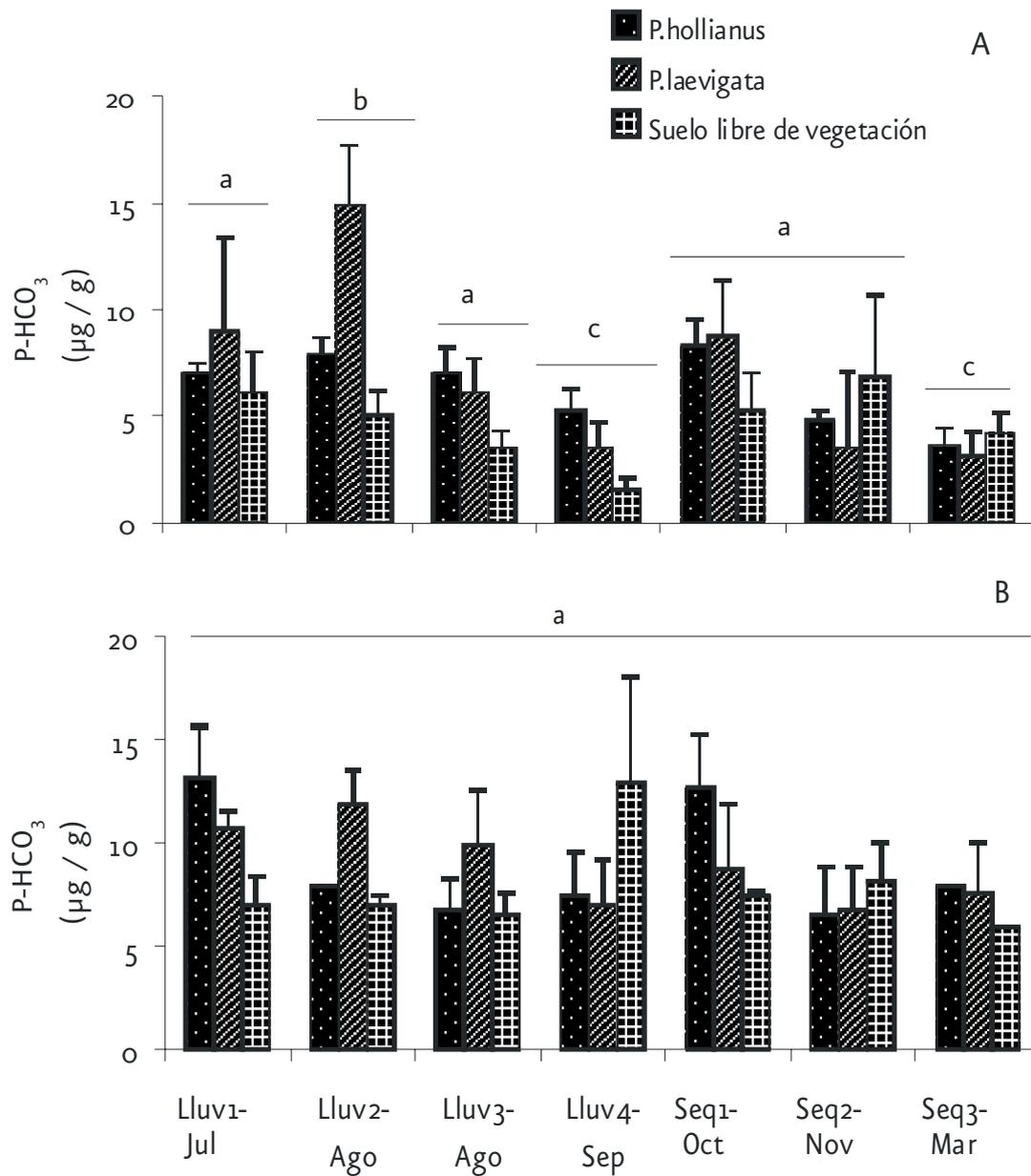


Figura 1. Distribución estacional de la concentración de P-HCO<sub>3</sub> en tres microambientes de suelo en una terraza degradada (A) y una conservada (B) en Zapotitlán Salinas. Cada barra representa la media de tres réplicas con error estándar. Las letras minúsculas diferentes sobre los grupos de barras indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los diferentes tiempos de muestreo. La leyenda del eje de las abscisas indica la estacionalidad (Lluv=temporada de lluvia; Seq=temporada de sequía); el número de muestreo de cada temporada y el mes en que se realizó.

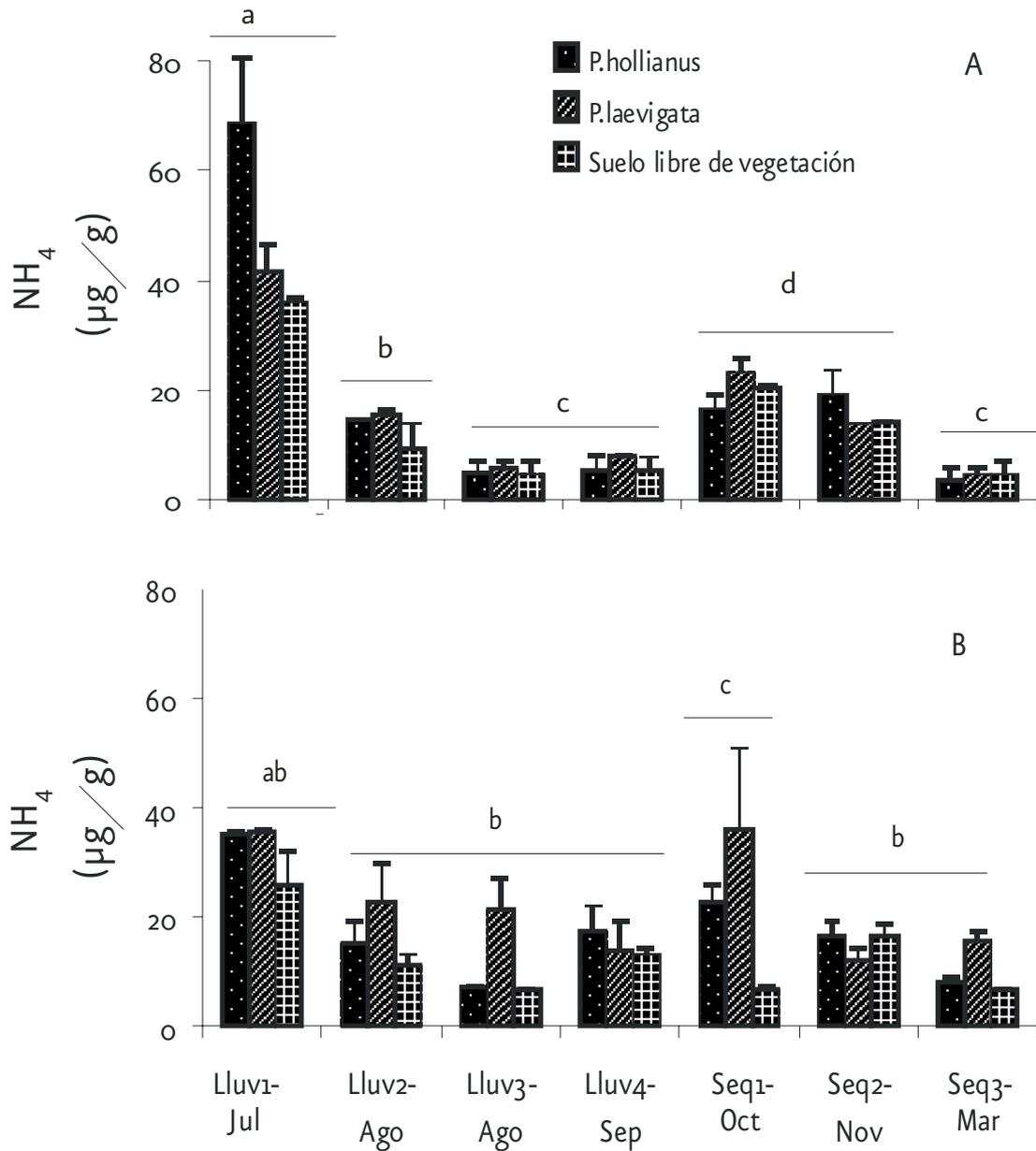


Figura 2. Distribución estacional de la concentración de  $\text{NH}_4$  en tres microambientes de suelo en una terraza degradada (A) y una conservada (B) en Zapotitlán Salinas. Cada barra representa la media de tres réplicas con error estándar. Las letras minúsculas diferentes sobre los grupos de barras indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los diferentes tiempos de muestreo. La leyenda del eje de las abscisas indica la estacionalidad (Lluv=temporada de lluvia; Seq=temporada de sequía); el número de muestreo de cada temporada y el mes en que se realizó.

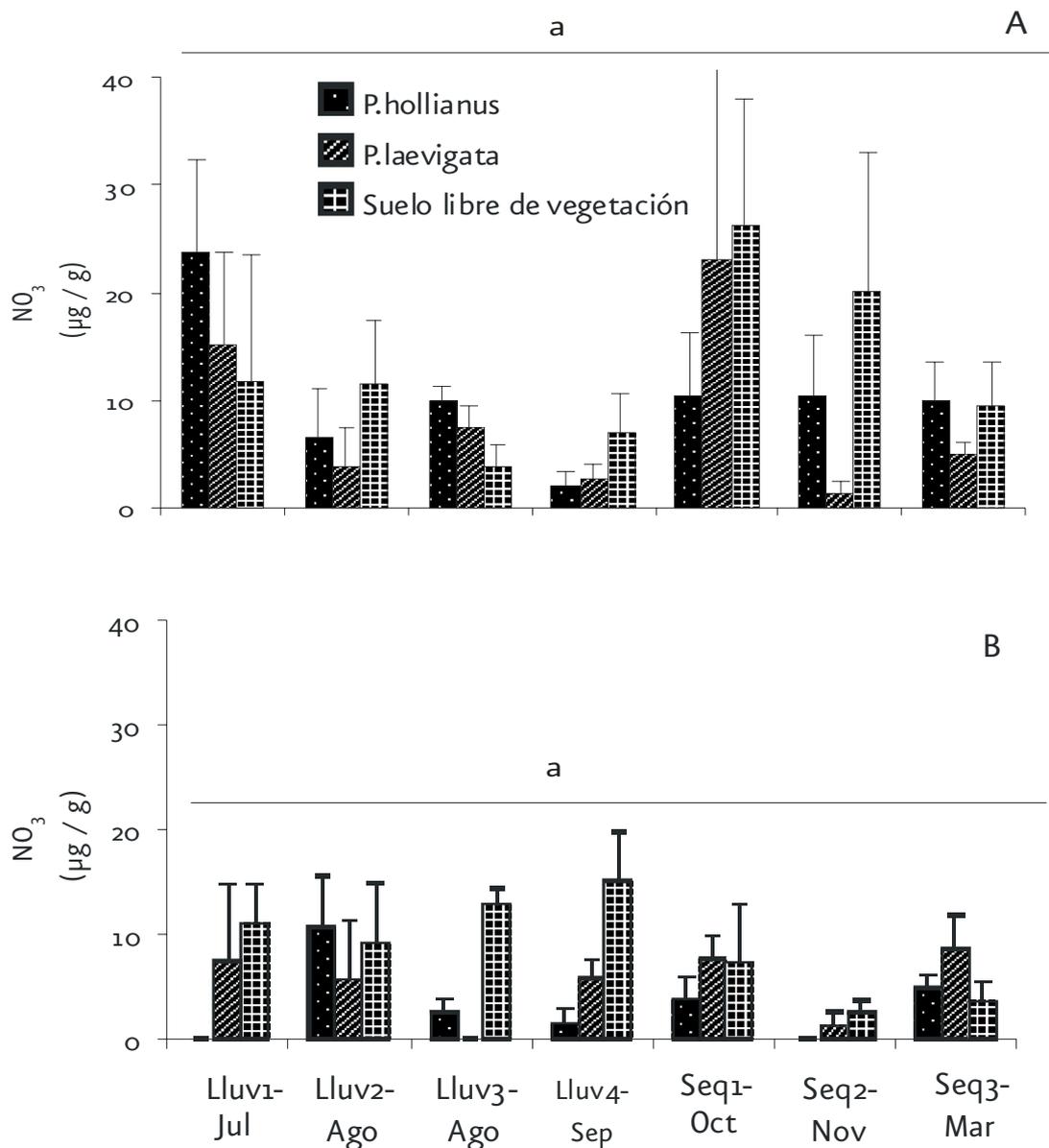


Figura 3. Distribución estacional de la concentración de  $\text{NO}_3$  en tres microambientes de suelo en una terraza degradada (A) y una conservada (B) en Zapotitlán Salinas. Cada barra representa la media de tres réplicas con error estándar. La letra a (minúscula) sobre los grupos de barras de ambas figuras indica que no hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las diferentes fechas de muestreos. La leyenda del eje de las abscisas indica la temporada de muestreo (Lluv=temporada de lluvia; Seq=temporada de sequía); el número de muestreo de cada temporada y el mes en que se realizó.

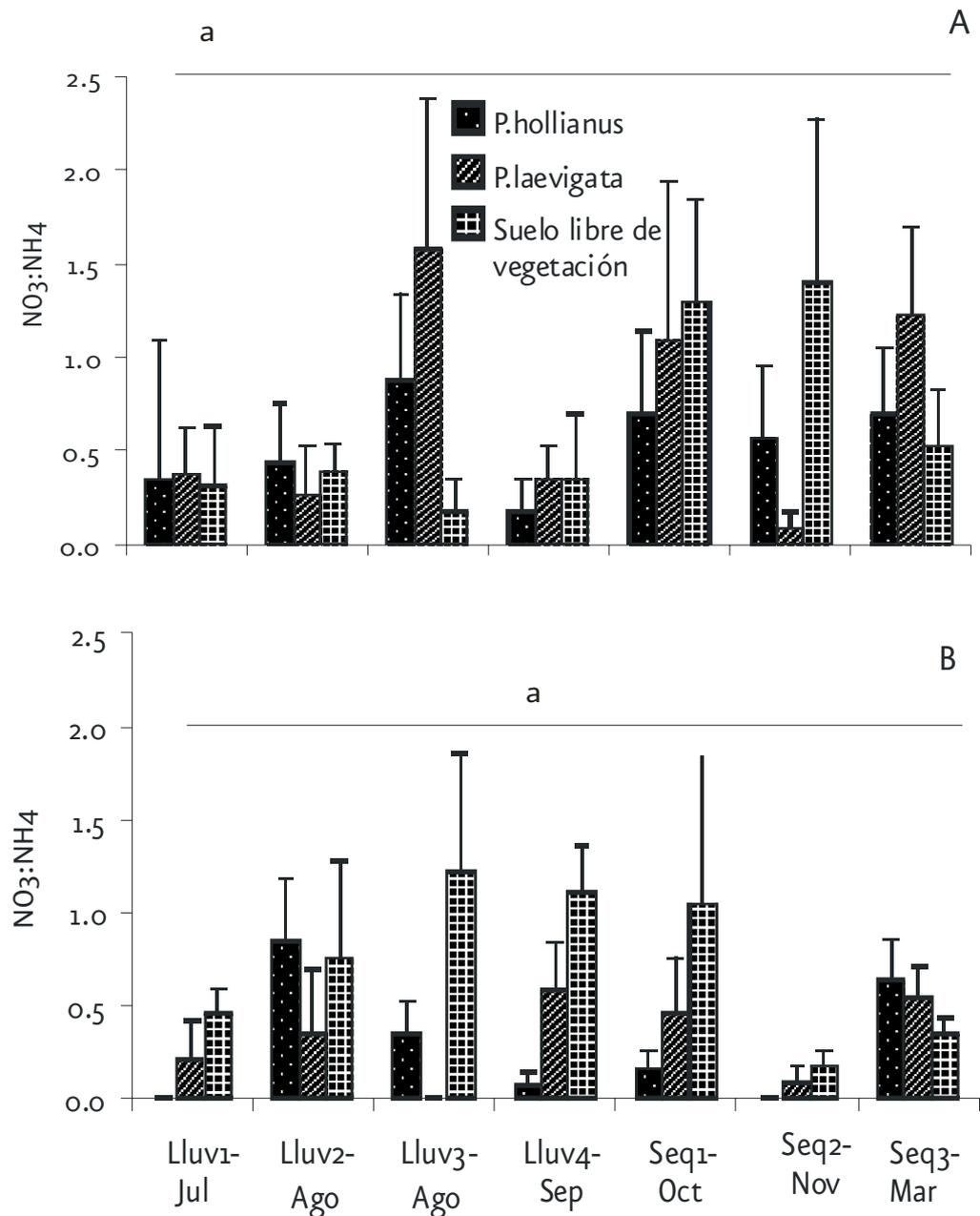


Figura 4. Distribución estacional de la relación  $\text{NO}_3:\text{NH}_4$  de tres microambientes de suelo en una terraza degradada (A) y una conservada (B) en Zapotitlán Salinas. Cada barra representa la media de tres réplicas con error estándar. Las letras minúsculas diferentes sobre los grupos de barras indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las diferentes fechas de muestreos. La leyenda del eje de las abscisas indica la estacionalidad (Lluv=temporada de lluvia; Seq=temporada de sequía); el número de muestreo de cada temporada y el mes en que se realizó.

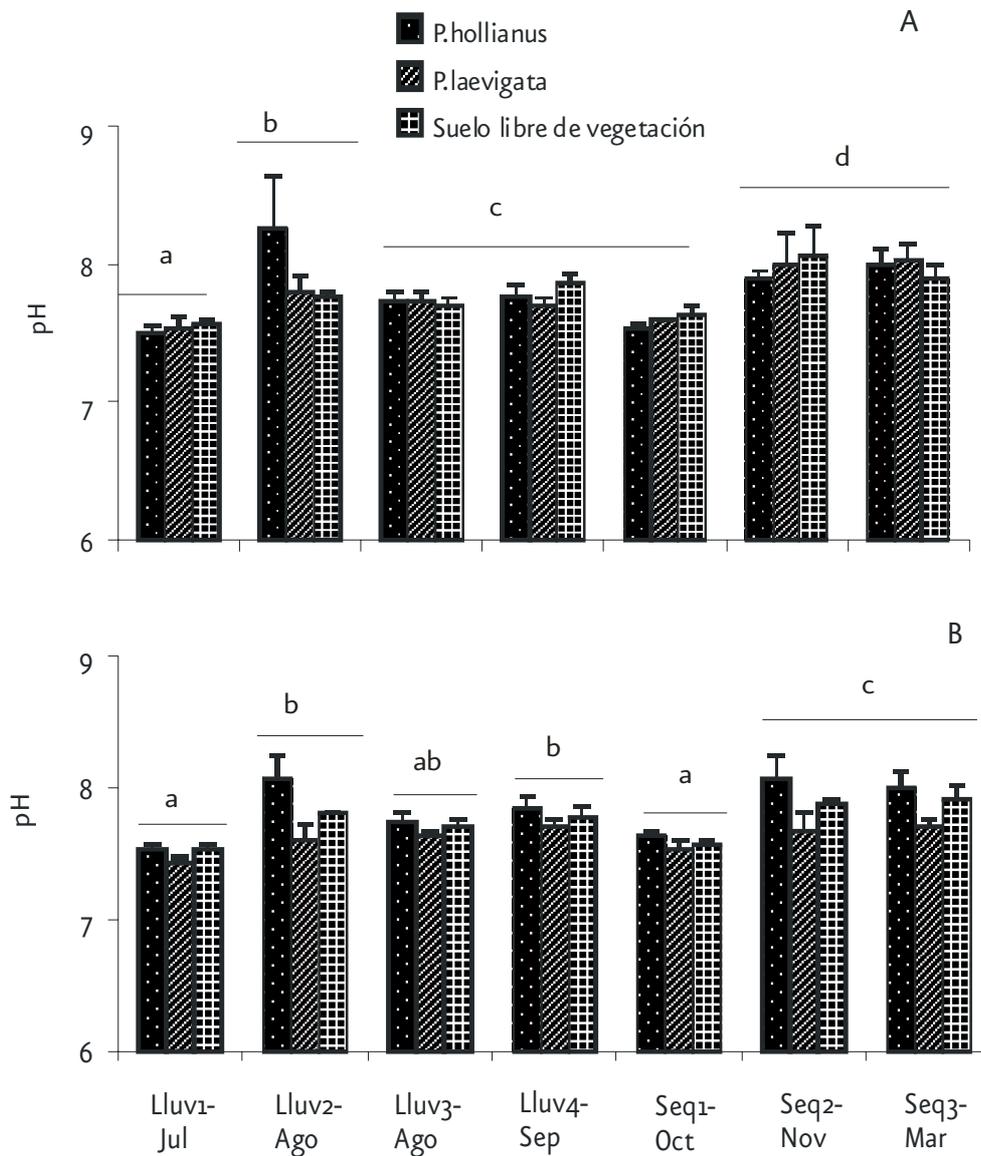


Figura 5. Distribución estacional del pH en tres microambientes de suelo en una terraza degradada (A) y una conservada (B) en Zapotitlán Salinas. Cada barra representa la media de tres réplicas con error estándar. Las letras minúsculas diferentes sobre los grupos de barras indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las diferentes fechas de muestreos. La leyenda del eje de las abscisas indica la estacionalidad (Lluv=temporada de lluvia; Seq=temporada de sequía); el número de muestreo de cada temporada y el mes en que se realizó.

## LITERATURA CITADA

- Adams, M., Ineson, P., Binkley, D., Cadisch, G., Tokuchi, N., Scholes, M., Hicks, K. 2004. Soil functional responses to excess nitrogen inputs at global scale. *Ambio* 33, 530-536.
- Albaladejo, J., Martínez-Mena, M., Roldan, A., Castillo, V. 1998. Soil degradation and desertification induced by vegetation removal in a semiarid environmental. *Soil Use and Management* 14, 1-5.
- Astier-Calderón, M., Maass-Moreno, M., Etchevers-Barra, J. 2002. Derivación de indicadores de calidad de suelos en el contexto de la agricultura sustentable. *Agrociencia* 36, 605-620.
- Austin, A.T., Yahdjian, L., Stark, J.M., Belnap, J., Porporato, A., Norton, U., Ravetta, J. Schaeffer, S.M. 2004. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* 141, 221-235.
- Barajas-Aceves, M., Dendooveen, L., 2001. Nitrogen, carbon and phosphorus mineralization in soils from semi-arid highlands of central Mexico amended with tannery sludge. *Bioresource Technol.* 77, 121-130.
- Billings, S.A., Schaeffer, S.M., Evans, R.D. 2002. Trace N gas losses and N mineralization in Mojave desert soils exposed to elevated CO<sub>2</sub>. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1777-1784.
- Cajuste, L.J. 1986. El fósforo aprovechable en los suelos. Serie Cuadernos de Edafología 6, Colegio de Posgraduados-Chapingo, México.
- Ewing, S.A., Sutter, B., Owen, J., Nishiizumi, K., Sharp, E., Cliff, S.S., Perry, K., Dietrich, W., McKay, C.P. Amundson, R. 2006. A threshold in soil formation at Earth's arid-hyperarid transition. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 5293-5322.
- Forster, J.C. 1995. Soil nitrogen. In: Kassem, A., P. Nannipieri (Eds). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, London. pp: 79-87.
- Frías-Hernández, J.T., Aguilar-Ledesma, L., Olalde-Portugal, V., Balderas-López, J.A., Gutiérrez-Juárez, G., Alvarado-Gil, J.J., Vargas, H., Albores, A., Dendooven, L., Miranda, C.M. 1999. Soil characteristics in semiarid highlands of central México as affected by mesquite trees (*Prosopis laevigata*). *Arid Soil Research and Rehabilitation* 13, 305-312.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- González-Ruiz, T., Rodríguez-Zaragoza, S., Ferrera-Cerrato, R. 2008. Fertility islands around *Prosopis laevigata* and *Pachycereus hollianus* in the drylands of Zapotitlán Salinas, México. *Journal of Arid Environments* 72, 1202-1212.
- Graham, R.C., Hirmas, R.D., Wood, Y.A. 2008. Large near-surface nitrate pools in soils capped by desert pavement in the Mojave Desert, California. *Geology* 36, 259-262.
- James, J.J., Tiller, R.L. Richards, J.H. 2005. Multiple resources limit plant growth and function in a saline-alkaline desert community. *Journal of Ecology* 93, 113-126.

- Le Houérou, N.H. 1996. Climate change, drought and desertification. *Journal of Arid Environments* 34, 133-185.
- Muñoz, I.D., Mendoza, C.A., López G.F., Hernández M.M., Soler A.A. 2000. Manual de análisis de suelos. FES-Iztacala, UNAM, México.
- Paul, E.A., Clark, F.E. 1996. *Soil Biology and Biochemistry*. Academic Press. USA.
- Pavón, N.P., Briones, O. 2001. Phenological patterns of nine perennial plants in an intertropical semi-arid Mexican scrub. *Journal of Arid Environments* 49,265-277.
- Pavón, N.P., Briones, O., Flores-Rivas, J. 2005. Litterfall production and nitrogen content in an intertropical semi-arid Mexican scrub. *Journal of Arid Environments* 60, 1-13.
- Perroni-Ventura, Y., Montaña, C., García-Oliva, F. 2006. Relationship between soil nutrient availability and plant species richness in a tropical semi-arid environment. *Journal of Vegetation Science* 17, 719-728.
- Reed, S., Seastedt, T.R., Mann, C.M., Suding, K.N., Townsend, A.R., Cherwin, K.L. 2007. Phosphorus fertilization stimulates nitrogen fixation and increases inorganic nitrogen concentrations in a restored prairie. *Applied Soil Ecology* 36, 238-242.
- Reyes-Reyes, G., Baron-Ocampo, L., Cuali-Alvárez, I., Frías-Hernández, J.T., Olalde-Portugal, V., Varela-Fregoso, L., Dendooven, L., 2002. C and N dynamics in soil from the central highlands of Mexico as affected by mesquite (*Prosopis* sp.) and huizache (*Acacia tortuosa*): a laboratory investigation. *Applied Soil Ecology*. 19, 27-34.
- Schaeffer, S.M., Evans, R.D. 2005. pulse additions of soil carbon and nitrogen effect soil nitrogen dynamics in an arid Colorado Plateau shrubland. *Oecologia* 145, 425-433.
- Schlesinger, W.H. Peterjohn, W.T. 1992. Processes controlling ammonia volatilization from Chihuahuan desert soils. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 637-642.
- Schlesinger, W.H., Raikes, J.A., Hartley, A.E., Cross, A.F. 1996. On the spatial pattern of soil nutrients in desert ecosystems. *Ecology* 77, 364-374.
- Walvoord, M.A., Phillips, F.M., Stonestrom, D.A., Evans, R.D., Hartsough, P.C., Newman, B.D., Striegl, R.G. 2003. A reservoir of nitrate beneath desert soils. *Science* 302, 1021-1024.
- Whitford, W.G. 2002. *Ecology of desert systems*. Academic Press. London.
- Xie G., Steinberger, Y. 2001. Temporal patterns of C and N under shrub canopy in a loessial soil desert ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1371-1379.

## CAPÍTULO II

FERTILITY ISLANDS AROUND *Prosopis laevigata* AND *Pachycereus hollianus* IN THE DRYLANDS OF ZAPOTITLÁN SALINAS, MÉXICO

Publicado en: Journal of Arid Environments 72, 1202-1212. 2008.



## Fertility islands around *Prosopis laevigata* and *Pachycereus hollianus* in the drylands of Zapotitlán Salinas, México

T.G. Ruiz<sup>a,\*</sup>, S.R. Zaragoza<sup>a</sup>, R.F. Cerrato<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Lab. de Microbiología, UBIPRO-FES Iztacala, UNAM, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, CP 54090, Mexico

<sup>b</sup>Programa en Edafología, Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Edo. de México, CP 56230, Mexico

Received 26 October 2006; received in revised form 13 November 2007; accepted 19 December 2007  
Available online 7 February 2008

### Abstract

The abundance of microorganisms in desert soil environments is closely related to the accumulation of resources around individual plants, called “islands of fertility”. This research was undertaken (1) to study the formation of islands of fertility in soils under *Prosopis laevigata* and *Pachycereus hollianus* in a preserved terrace and a degraded terrace in Zapotitlán Salinas, México and (2) to probe the relationships between the insularity under the plants and cultivable bacteria. Islands of fertility were evaluated for total organic carbon accumulation, water content, and acetylene reduction activity. Insularity was only evident in degraded soil, while resources were more evenly distributed in preserved soil. Acetylene reduction activity showed an undefined pattern of seasonal variation in both terraces. All parameters had maximum values in the preserved terrace, including colony-forming units of cultivable bacteria. The bacteria belonged to genus *Rhizobium* (one strain) and *Streptomyces* (six strains) according to 16S rDNA sequencing, revealing an unsuspected dominance of actinobacteria. Fertility islands formed under *P. laevigata* are the most important nutrient sources, enhancing microbial activity in degrading soils. This plant–microbe interaction delays badlands transformation and could be an important strategy for avoiding the degradation of cultivated lands.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Badlands; Fertility islands; Mesquite; Nitrogen; Soil-culturable bacteria

### 1. Introduction

Water availability, high temperatures, and nutrient limitation, particularly nitrogen, are the main factors affecting plant establishment and growth in drylands (Schlesinger et al., 1996). Such systems are highly vulnerable to the intensity, extent, and frequency of perturbations in these factors, which may lead to ecosystem deterioration (Odum, et al., 1979). Soils with sparse plant cover are exposed to deterioration through strong physical, chemical, and microclimatic variations where growth of individual plants forms

\*Corresponding author. Fax: +52 555623 12 25.

E-mail addresses: [gonzalezteresa@correo.unam.mx](mailto:gonzalezteresa@correo.unam.mx) (T.G. Ruiz), [rodrigo@campus.iztacala.unam.mx](mailto:rodrigo@campus.iztacala.unam.mx) (S.R. Zaragoza), [ronaldfc@colpos.mx](mailto:ronaldfc@colpos.mx) (R.F. Cerrato).

“islands of fertility” (García-Moya and McKell, 1970), while patterns of soil humidity and organic matter accumulation is more evenly distributed in vegetated soils (Whitford, 2002). These islands arise due to the accumulation of nutrients and organic matter around individual plants. Because of the humidity and organic matter, microbial communities can grow in the islands and play an important role in nitrogen cycling (Herman et al., 1993, 1994, 1995; Schaeffer and Evans, 2005) as well as the mobilization of many other nutrients, like P, K, Ca, S, Mg, Na, and F (Cross and Schlesinger, 1999; Whitford, 2002). The response of bacterial community composition to environmental changes in arid soils has, however, received little attention (Kuske et al., 2002).

From the islands of fertility model, it follows that the abundance of microorganisms is closely related to the concentrations of available resources. Thus, microorganisms will be more numerous around individual plants in savanna-like ecosystems, and more evenly distributed in grasslands (Herman et al., 1995; Schlesinger et al., 1996). Resource availability promotes higher microbial biomass (Kuske et al., 2002) and higher numbers of free-living nitrogen-fixing bacteria (Herman et al., 1993; Xie and Steinberger, 2002) in the islands of fertility. Also, microbial degradation of organic matter mobilizes sequestered nutrients.

Thus, plants can benefit either from nitrogen mobilized by organic matter degradation or from newly fixed nitrogen. The nitrogen becomes ready for plant uptake after being released by predation on bacteria. These plant–bacterial processes are among the main mechanisms for soil recovery after perturbation, besides the importance of accumulation and transportation of soil particles, soil texture, cation exchange capacity and litter quality as environmental modulators of biotic activity (Cross and Schlesinger, 1999). Thus, drylands recovery is restricted to windows of activity when conditions are appropriate.

The Zapotitlán Salinas drylands are located in the natural reserve of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico, where there have been intense stresses due to human land use dating back to the first Indian cultures in the valley (McAuliffe et al., 2001; López-Galindo et al., 2003). Low productivity, desertification, biodiversity loss, and decrease of ecological services are some of the consequences of changing land use. These processes have had a greater effect on the alluvial terraces on both sides of the “El Salado” River than on the other parts of the hills or surrounding mountains. This is because of the alluvial soils at Zapotitlán are sandy-clay to sandy-loam with high levels of alkalinity, non-sodic salinity; and are poor in nitrogen and organic matter content (1.8%), resulting highly susceptible to erosion (López-Galindo et al., 2003). At present, alluvial terraces are forming patchy landscapes where badlands and well-preserved soils are intermixed, with gradients from preserved to deteriorated lands. On these terraces, there are patches with undisturbed vegetation, patches where soils are starting to erode, and patches that are already transformed in badlands (López-Galindo et al., 2003).

The use of soil for agriculture, together with the climatic variations typical of arid zones, accelerates the loss of organic matter and diminishes microbial populations. This decline of bacterial populations may further increase soil deterioration, especially in places, such as the badlands, where vegetation is already fragmented. Modification of the plant cover itself alters soil nutrient cycling, including nitrogen, as denitrification and ammonium volatilization increases in uncovered soils (Schlesinger et al., 1996). The aim of this study was to elucidate the response of cultivable bacteria to the formation of islands of fertility in soils transforming into badlands. The first step was to determine if fertility islands are actually formed around *Prosopis laevigata* (mesquite) and *Pachycereus hollianus* (columnar cactus). In order to do this, organic matter was quantified under each plant. Soil nitrogenase activity was then monitored to assess the activity of nitrogen-fixing bacteria. Then, the cultivable bacterial fraction was determined by enumerating colony forming units (CFUs), assessing colonial morphology, and performing molecular identification. Lastly, seasonal population dynamics were analyzed in soils from both plant species at the preserved terrace and badlands.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area and soil collection

Zapotitlán Salinas, located in the western part of the Tehuacán-Cuicatlán Reserve, Mexico, has a semiarid climate with an average annual rainfall of 400–450 mm, and an average annual temperature of 21 °C. The soil class is calcareous fluvisol, with a loamy sand texture.

**Table 1**  
General characteristics of preserved and degraded terraces in Zapotitlán Salinas, Mexico

Preserved terrace (18° 18' N, 97° 29' W)	Degraded terrace (18° 19' N, 97° 27' W)
<i>Climate</i>	
Dry-hot (Bsh) with mean annual rainfall of 375–450 mm and mean annual temperature 18–22°. Rainy season typically starts in May and lasts until early October, in summer, with June the rainiest month. The rainy season has a dry period during July (García, 1988).	
<i>Vegetation</i>	
Mesquite is the dominant plant association on the terraces. This association consists mainly of legume shrubs, such as <i>Prosopis laevigata</i> (mesquite) and <i>Parkinsonia praecox</i> (palo verde), and the columnar cactus <i>Pachycereus hollianus</i> (Valiente-Banuet et al., 2000).	
<i>Preservation level</i>	
Plant cover is continuous without signs of changes in soil use or erosion. Vegetation is clearly differentiated in herbs, shrubs and trees. Soil is deep and stony; showing a 4 mm superficial organic horizon and sandy-loam texture (López-Galindo et al., 2003).	Plant cover is fragmented. Each fragment may have one or more trees, shrubs, and cacti located about 2–10 m apart from each other. Landscape is dominated by badlands, with the highest level of erosion. Soil is deep and stony, with no organic matter deposition on the exposed surface between plants. However, microbial soil crusts were forming small patches which were avoided during sampling. Soil texture is sandy-clayish (López-Galindo et al., 2003).

Alluvial terraces are the major landscape component in this region (López-Galindo et al., 2003). Two alluvial terraces were selected, one preserved and the other degraded, which significantly differ in their soil and vegetation characteristics (Table 1). Soil at the preserved terrace is sandy-loam with high calcium content, while soil at the degraded one is sandy clayish with high content of calcium.

In each terrace, soil samples were taken from the root zone of three individual plants of *P. laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M.C. Johnst. (Mimosaceae), three individual plants of *P. hollianus* (F.A.C. Weber) Buxb. (Cactaceae), and three interspaces (bare soil), at 10 cm depth and 20–40 cm distance from the shoot. Sampling was conducted every 4 weeks in both terraces during the rainy (July–September 2002) and dry seasons (October–November 2002). One extra sampling was conducted in March 2003.

### 2.2. Determination of soil water content and organic matter

Soil water content was determined immediately after sampling by gravimetric analysis, which consisted of weighing 10 g of fresh soil, drying overnight at 120 °C, and reweighing the dried sample. Water content was calculated as the difference between fresh and dry weight (dw). Thereafter, soil was sieved in 2 mm mesh and stored at 4 °C until analysis.

Soil organic matter was quantified in 0.5 g (dw) samples by oxidation with potassium dichromate and sulfuric acid, followed by titration with ammonium ferrous sulfate ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) and *N*-phenylanthranilic acid as indicator. Organic matter content was used to determine the presence of fertility islands beneath *P. laevigata* and *P. hollianus*. The content under these species was compared to that in the interspaces. This comparison was conducted in both the preserved and degraded terraces.

### 2.3. Determination of nitrogenase activity

Nitrogenase activity, measured as acetylene reduction activity (ARA) (Hardy et al., 1973), was determined by gas chromatography as follows: 2 g of soil from each sample were deposited into 37-ml vial flasks in triplicate, then water was added to soil taking care to reach up to 40% of water-holding capacity. Then, each flask was capped with cotton and incubated at 28 °C for 24 h. After incubation, the cotton caps were changed for rubber ones in order to produce a hermetic seal on the flasks. Ten percent (v/v) of the total volume of air in the flasks (approximately 3.7 ml) was then removed with a syringe, and substituted with 3.7 ml of acetylene. Flasks were incubated again at 28 °C for 24 h, after which 7 ml of air were withdrawn and deposited into sterile vacuum Vacutainer® tubes. Tubes had no additives and were coating-free. The amount of ethylene produced during incubation was measured by injecting 0.1 ml of air extracted from each Vacutainer tube into

a Perkin-Elmer 900 gas chromatograph with a flame ionization detector and a Poropak-N column. Settings were 25 ml min<sup>-1</sup> nitrogen flux, 150 °C detector temperature, and 120 °C injector temperature.

#### 2.4. Colony forming units: enumeration, characterization, and molecular identification

Pure cultures of 14 different cultivable strains were done before establishing the number, characterization, and molecular identification of the cultivable soil bacteria. These strains were the most abundant in the Rennie (1981) medium, and they were used as a reference collection to record and count the growing colonies in subsequent samples. Gram staining was also performed for each purified strain. These pure strains were then used for the amplification and sequencing of 16S rDNA genes in order to determine their taxonomic position. The fourteen strains were divided into three morphological groups (groups I, II, and III).

CFUs for each group were counted by the plate dilution method. One gram of soil was homogenized in 9 ml sterilized distilled water for 1 min and left untouched for 5 min. The supernatant was used for dilutions up to 10<sup>-3</sup>. Then, 20 µl were seeded by duplicate in Rennie media plates and were incubated at 28 °C for 7 days. Results are presented as CFU g<sup>-1</sup> soil dw.

Amplification of 16S rDNA from all 14 strains were performed after DNA extraction from bacterial cultures in a nitrogen-free medium. Bacterial DNA was obtained by a DNeasy tissue kit (QIAGEN<sup>®</sup>). Universal primers were used for bacterial SSU amplification (FPL27 and RPL1492) to perform the PCR amplification. The primer sequences are (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and (3'-TACGGY-TACCTGTTACGACTT-5') (Lane, 1991). The thermal cycler (MJ Research) was set up for an initial period of 3 min at 94 °C, then 1 min at 94 °C, followed by 1 min at 52 °C, and 1 min at 72 °C. These conditions were repeated for 30 cycles, with a final step of 3 min at 72 °C. After amplification, the 16S rDNA was separated by electrophoresis in 1% agarose gel at 75 V for 30 min. The DNA was purified using the Gel Extraction Kit (QIAquick, QIAGEN<sup>®</sup>) as directed by the manufacturer. The PCR amplification for sequencing was set up for an initial period of 5 min at 95 °C, then 10 s at 95 °C, followed by 10 s at 50 °C, and 4 min at 60 °C. These conditions were used for 45 cycles. After precipitation with alcohol, the amplification product was sequenced in an ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer Auto-sequencer apparatus. The 16S rDNA sequences were compared with other prokaryotic sequences available in the GenBank using the BLAST database software (Benson et al., 2004), and were deposited in the GenBank with accession numbers DQ164420, DQ164421, DQ16442, DQ164423, DQ164424, DQ164425, DQ164427, DQ164428, DQ164429, and DQ164430.

#### 2.5. Statistical analyses

Percentages of organic matter and soil humidity were normalized using an arcsine transformation and CFU results were normalized using a log transformation (Sokal and Rohlf, 2003). Differences in organic matter, soil water content, and CFU among microenvironments were assessed by analyses of variance (ANOVA). The correlations between CFU and organic matter and between CFU and soil humidity were analyzed with Spearman's coefficient. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ , and all analyses were conducted using STATISTICA<sup>®</sup> 99 Edition.

### 3. Results

Soil water content variation was very similar among the three microenvironments (*P. laevigata*, *P. holianus*, and interspaces) within each terrace. There were not significant differences ( $P = 0.12$ ) between terraces (Fig. 1a and b). However, soil water content in the preserved terrace tended to be slightly higher around the root zone of the plants, particularly under mesquite, than in the interspaces (Fig. 1b). Soil water content increased during the rainy season, with September having the highest values (14% in the degraded terrace and 16% in the preserve terrace). Contents in March, the driest month of the year, were only 1.4% in all microenvironments (Fig. 1).

The soil organic matter content showed different patterns depending on the microenvironment and terrace. The content of soils from the degraded terrace was significantly ( $P < 0.05$ ) higher under *P. laevigata* than

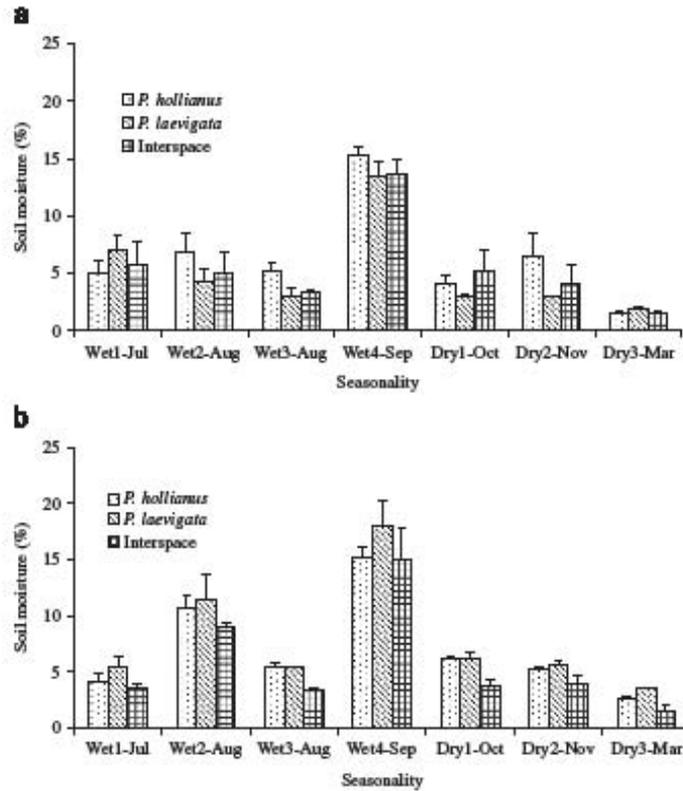


Fig. 1. Seasonal distribution (mean  $n = 3 \pm$  S.E.) of soil moisture in microenvironments in (a): degraded and (b): preserved terraces.

*P. hollianus* and the interspaces (Fig. 2a). In the preserved terrace, however, organic matter contents were significantly higher under both *P. laevigata* and *P. hollianus* than in the interspaces (Fig. 2b). Soils from the degraded terrace generally had lower average organic matter contents than those from the preserved terrace. However, the organic matter content of soils remained constant during the course of the year (Fig. 2a and b).

ARA varied among microenvironments and seasons in both terraces (Fig. 3a and b). In the degraded terrace, mesquite showed higher ARA than *P. hollianus* and the interspaces during the dry season (November, Fig. 3a), while in the preserved terrace, mesquite had the highest ARA during the rainy season (late August, Fig. 3b). ARA was documented consistently along the wet–dry cycle in the preserved terrace. In the degraded terrace, however, it was barely detectable after the point of highest soil humidity content.

The bacterial colony morphologies of the purified strains provided easily observable criteria for the classification of bacteria into three groups (Table 2). Bacterial identification by sequence analysis of the SSU rDNA help form the following groups: group I is composed of one strain (*Rhizobium*), group II contains three strains (*Gordonia*, *Microbacterium* and *Sphingomonas*), and group III contains 10 strains (mostly genus *Streptomyces*). Group I was the most abundant in all microenvironments and throughout the seasons (Fig. 4a and b), contributing more than 70% of the total counts. The following groups in order of abundance were group III and group II (Fig. 4c–f). The highest number of CFU in the degraded terrace was found under *P. laevigata*, followed by *P. hollianus* and the interspaces (Fig. 4a, c, and e). There were no significant differences between microenvironments in the preserved terrace (Fig. 4b, d, and f).

The direct correlations between the different groups of bacteria and soil organic matter were low for all microenvironments despite the terrace. However, there were differences between terraces. Group II and group

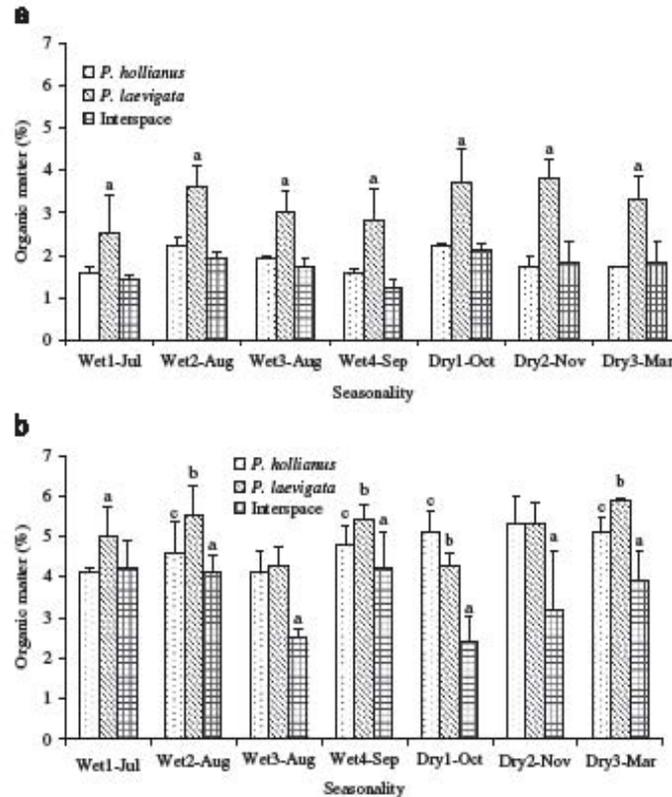


Fig. 2. Seasonal distribution (mean  $n = 3 \pm$  S.E.) of soil organic matter in three different microenvironments in (a): degraded and (b): preserved terraces. Letters indicate significant differences.

III showed statistically significant correlations with soil organic matter in the preserved ( $r^2 = 0.16$ ) and degraded terraces ( $r^2 = 0.21$ ), respectively. *Rhizobium* (group I) was the only group significantly correlated with soil organic matter in both terraces (preserved terrace:  $r^2 = 0.18$ , degraded terrace:  $r^2 = 0.16$ ), though these correlations were low. Regarding soil water content, bacteria from group I ( $r^2 = 0.28$ ) and group III ( $r^2 = 0.21$ ) were significantly correlated with soil water in the preserved terrace, while bacteria from group I ( $r^2 = 0.2$ ) were correlated with soil water in the degraded terrace.

## 5. Discussion

The results from this study indicate that soil organic matter has accumulated around individual plants of *P. laevigata* and *P. hollianus* in the degraded terrace. In contrast, soil organic matter was more evenly distributed in the preserved terrace because the vegetation forms a continuous soil cover. The results identified a gradient of increasing organic matter accumulation from the control soil to mesquite. Only organic matter clearly formed fertility islands in the degraded terrace. These patterns agree with predictions made by the islands of fertility model (Herman et al., 1995).

The high organic matter contents found in the soil under mesquite could be due to its leaf nutrients content and the gum chemistry that is secreted by bark. Mesquite leaves have high concentrations of saccharose, glucosidated flavonoids, pipecolic acids (an iminoacid), and pinitol (poly-alcohol) (García-Bores, 2003). The gum contains proteins and several sugars, such as manose, arabinose, and galactose (López-Franco et al.,

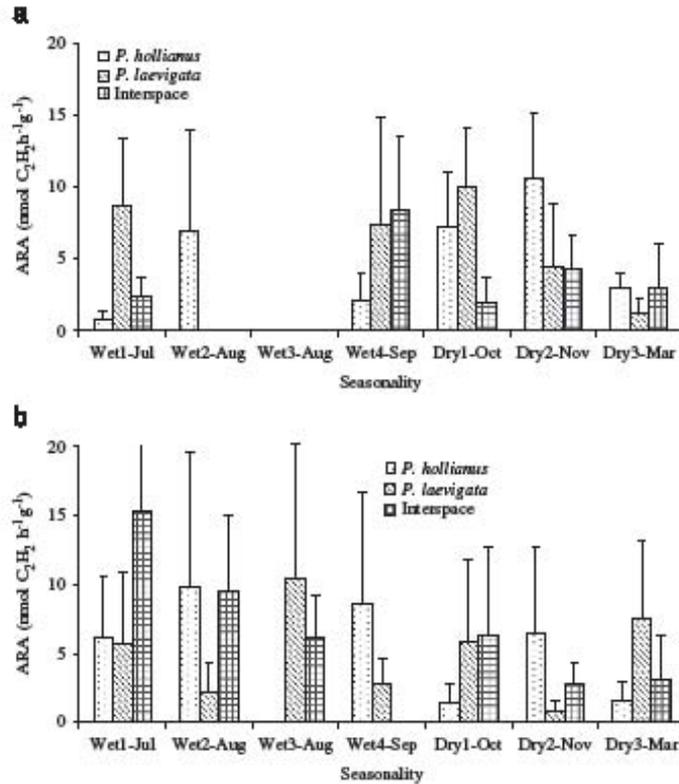


Fig. 3. Seasonal distribution (mean  $n = 3 \pm$  S.E.) of acetylene reduction activity (ARA) in three different microenvironments in (a): degraded and (b): preserved terraces.

2006). These compounds may enhance soil microbial activity under the mesquite because of their high energetic content, thus contributing to soil food webs development in soil.

Mesquite is the most important contributor for soil nutrient enrichment because of the nitrogen fixed at its root zone. Consequently, the greatest quantity of cultivable bacteria was found in the root zone of mesquite, followed by *P. hollianus*, and then the control soils. This sequence is consistent with the islands of fertility-promoting microbial growth (Barajas-Aceves and Dendooven, 2001; Frías-Hernández et al., 1999; Purohit et al., 2002). This trend was observed in both terraces, but was statistically significant only in the badlands. A possible explanation is that the more even distribution of organic matter in the preserved terrace allowed the bacterial populations in the control soil to reach quantities comparable to those under the plants, although roots development may be partly responsible for this organic matter distribution in soil. Organic matter contents in the degraded terrace are more localized and closely tied to the plants, leading to higher bacterial counts under the vegetation. The effects of organic matter could be observed at both terraces; however, the quantity of cultivable bacteria in the preserved terrace was always higher than in the degraded terrace.

Besides organic matter per se, the quality of organic matter (C/N ratio), the kind of plant exudes, water availability, temperature variations, the structure of the external bacterial cell surface, and the amensalist relationship between soil microorganisms are among the factors worth of consideration for explaining the variation of bacterial numbers in soil. Then, organic matter has low correlation with bacterial numbers because all the former factors act together under field conditions.

After water, soil nitrogen availability is a critical limiting resource of primary productivity in arid soil systems. The shortage of nitrogen can be overcome by biological fixation, which in most desert soils is carried

Table 2  
Characteristics of strains isolated from Zapotitlán Salinas soils

Groups	Morphological description
I	<i>Rhizobium</i> sp. Zapt-1 (Alphaproteobacteria). Normally rod-shaped. Colonies developed after 24–48h incubation at 28°, yellow, circular, convex, semitranslucent and mucilaginous. Gram negative, ARA positive.
II	<i>Microbacterium</i> sp. Zapt-11 (Actinobacteria). Irregularly shaped rods that sometimes form a V-shape. Colonies developed after 72h incubation at 28°, no coloration, translucent, shiny, slightly convex, and rounded with entire margins. Mycelia-type growth was not observed. Gram positive, ARA inconclusive. <i>Gordonia</i> sp. Zapt-15 (Actinobacteria). Cocci and short rods. Colonies developed after 72 h incubation at 28°, circular, low convex, smooth, light pink. No aerial hyphae and diffusible pigments. Gram positive, ARA positive. <i>Sphingomonas</i> sp. Zapt-16 (Alphaproteobacteria). Small rods. Colonies developed after 72 h incubation at 28°, circular, slightly convex, light yellow, smooth. Gram negative, ARA positive.
III	<i>Streptomyces</i> sp. Zapt-2 (Actinobacteria). Mycelial. Colonies developed after 96 h incubation at 28°, white, opaque, 0.5–2 mm diameter. Gram positive, ARA positive. <i>Streptomyces</i> Zapt-3 (Actinobacteria). Mycelial. Colonies developed after 96 h incubation at 28°, brown, opaque. Diffusible pigments. Gram positive, ARA positive. Zapt-4. Mycelial. Colonies developed after 96 h incubation at 28°, obverse side white and reverse side gray, opaque. Non-diffusible pigments. Gram positive, ARA positive. <i>Streptomyces</i> sp. Zapt 6 (Actinobacteria). Mycelial. Colonies developed after 72 h incubation at 28°, red, opaque, 7 mm diameter. Diffusible pigments. Gram positive, ARA positive. <i>Streptomyces</i> sp. Zapt-8 (Actinobacteria). Mycelial. Colonies developed after 96 h incubation at 28°, obverse side white and reverse side brown, opaque, 2 mm diameter. Diffusible pigments. Gram positive, ARA positive. Zapt-9. Mycelial. Colonies developed after 96 h incubation at 28°, obverse side white and reverse side green, opaque. Non-diffusible pigments. Gram positive, ARA positive. <i>Streptomyces</i> sp. Zapt-12 (Actinobacteria). Mycelial. Colonies developed after 96h incubation at 28°, yellow, opaque. Non-diffusible pigments. Gram positive, ARA positive. Zapt-13. Mycelial. Colonies developed after 96 h incubation at 28°, grey, opaque, 1–2mm diameter. Non-diffusible pigments. Gram positive, ARA positive Zapt-14. Mycelial. Colonies developed after 96 h incubation at 28°, brown, opaque, 7 mm diameter. Non-diffusible pigments. Gram positive, ARA positive. <i>Streptomyces</i> sp. Zapt-18 (Actinobacteria). Mycelial. Colonies developed after 96h incubation at 28°, green, opaque, 5 mm diameter. Non-diffusible pigments. Gram positive, ARA positive.

Molecular identification was done after amplification and sequencing of 16S rDNA genes.

out mainly by microbial soil crusts. Estimations of nitrogen fixation by biological crusts through ARA range from 0 to 250 nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> cm<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> in the Chihuahuan Desert (Hartley and Schlesinger, 2002; Yeager et al., 2004), and from 30 to 770 nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> cm<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> in the Mojave Desert (Billings et al., 2003). Acetylene reduction of soil heterotrophic bacteria is highly variable and ranges from 0.001 to 5.55 nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> g h on the root surfaces of sugar cane (Döbereiner et al., 1972) and from 100 to 1400 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(nmol g<sup>-1</sup>) in *Stipa hymenoides* (xeric grasses) (Wullstein, 1991). However, lower mean rates of AR were determined at the Mojave desert, such as 4.8 μmol m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> in *Pleuraphis rigida*, 8.5 μmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> production in *Larrea tridentata* and 4.3 μmol m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> in *Lycium* spp. (Billings et al., 2003). Bacteria isolated from roots of cacti in Nuevo León, México produced from 0.50 to 8.21 nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> tube h in pure cultures (Loera et al., 1996) and *Burkholderia* isolated from maize and coffee on several regions of México produced 10–436 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h (Estrada-de los Santos et al., 2001). The results presented here showed that nitrogen fixation in Zapotitlán Salinas is relatively low (0–15 nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> g dw h) compared to other North American desert crusts or bacterial cultures; however, these yields are within the range of production at the root zone reported at previous studies. It is important to bear in mind, however, that these measurements were conducted only for soil bacteria rather than microbial soil crusts or pure cultures. Although the estimates of ARA were low, the nitrogen-fixing bacteria may be important in nitrogen mobilization because they are able to obtain this nutrient from low-energy sources, which can in turn be incorporated in soil food webs. Ultimately, this nitrogen can return to plant biomass when protozoa and nematodes feed on bacteria and release part of the nitrogen near the root system (Mayzlish and Steinberger, 2004). This process becomes important at the end of the window of activity.

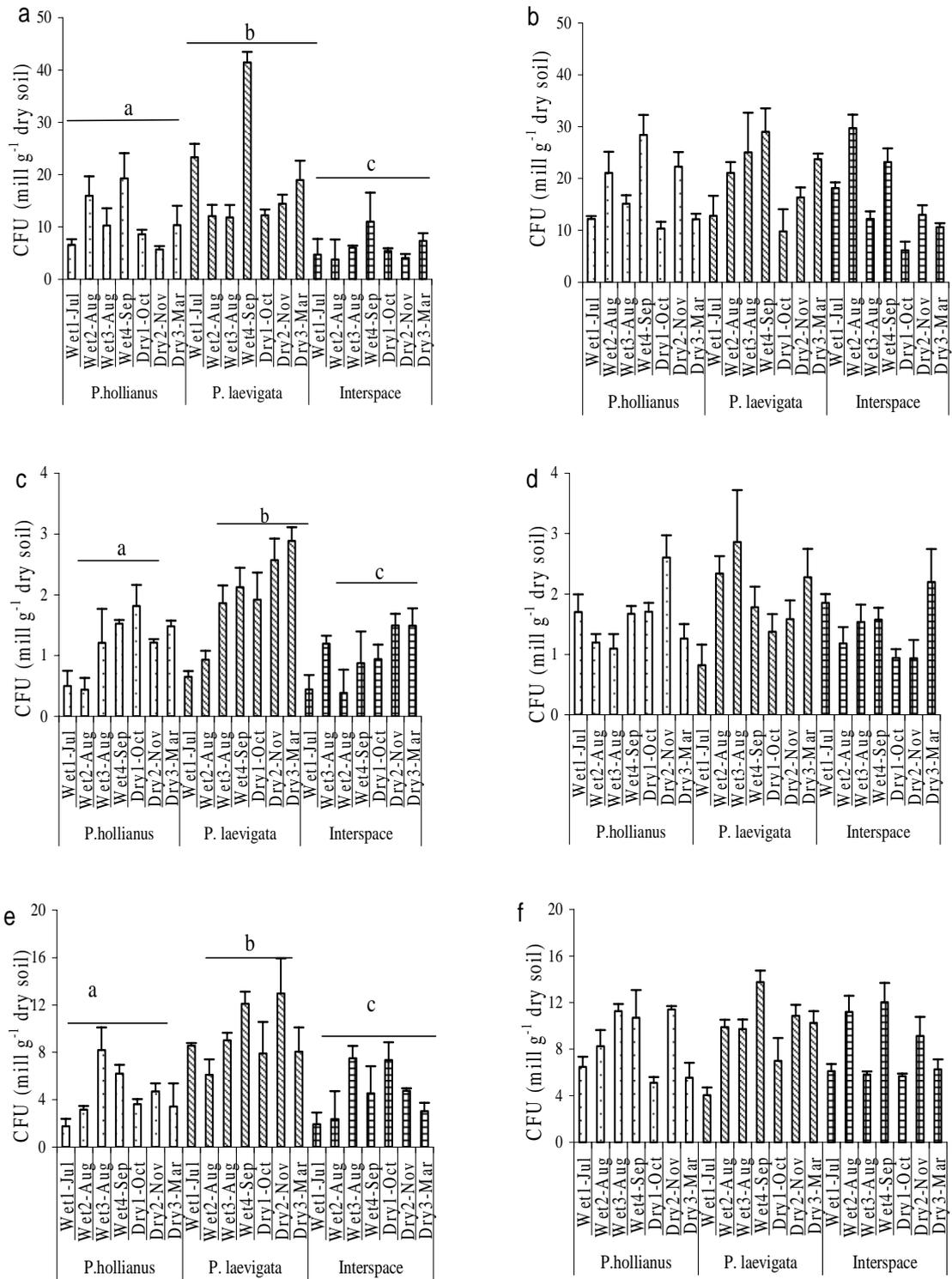


Fig. 4. Seasonal distribution (mean  $n=3 \pm$  standar error) of soil organic matter in three different microenvironments at degraded and preserved terraces. Different letters indicate significant differences between three microenviromnets.

At that time, plants accumulate biomass and energy for the next season and nitrogen demand can exceed the system's capacity to supply it.

Nodules were not seen in mesquite roots at 0–10 cm, even during periods of greater water availability. However, there may be nodules at greater depths. It is also possible that nodules are absent due to either an inability of the bacteria to produce nodules or stressful soil conditions (Serraj et al., 1999). The proliferation of *Rhizobium* both inside and outside of the islands of fertility indicates that these bacteria are efficient at acquiring resources from the soil. Based on the ARA values registered in this study and those reported for microbial soil crusts, the lack of nodule formation suggests that non-symbiotic nitrogen fixation plays an important role in the nitrogen cycle (Belnap, 2002; Billings et al., 2003; Evans and Ehleringer, 1993). Thus, this study gives support to the Hartley and Schlesinger (2002) proposition that nitrogen fixation by non-nodulating microorganisms contributes to the total supply of nitrogen to arid ecosystems.

In conclusion, islands of fertility around mesquite are the principal sites of microbiological activity, including nitrogen fixation, and accumulation of organic matter, and humidity especially in degraded sites such as badlands. At preserved sites, the full vegetation cover (e.g. grasslands) provides a more favorable environment for cultivable microorganisms to grow. Soil microbial population analysis by molecular tools may help in understanding the effects of vegetation removal or changes in plant species on soil nutrient dynamics. This is of paramount importance for very fragile systems such as the two alluvial terraces analyzed at Zapotitlán Salinas, which have been historically subjected to changes in soil use for agriculture. Such activity has impoverished soil nutrient stores, limiting the productivity of cultivars (McAuliffe et al., 2001) and compromising their future use.

#### Acknowledgments

The authors thank Héctor Godínez Álvarez for his contribution to this study and his review of this manuscript. This research was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Fondo Sectorial SEMARNAT, Grant CONACyT-SEMARNAT 2002-C01-0790. T. González-Ruiz also acknowledges CONACyT and Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, for their support provided to get her doctor degree.

#### References

- Barajas-Aceves, M., Dendooven, L., 2001. Nitrogen, carbon and phosphorus mineralization in soils from semi-arid highlands of central Mexico amended with tannery sludge. *Bioresource Technology* 77, 121–130.
- Benson, D.A., Karch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J.O., Wheeler, D.L., 2004. GenBank: update. *Nucleic Acids Research* 32, D23–D26.
- Belnap, J., 2002. Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA. *Biology and Fertility of Soils* 35, 128–135.
- Billings, S.A., Schaeffer, S.M., Evans, R.D., 2003. Nitrogen fixation by biological soil crusts and heterotrophic bacteria in a Mojave Desert ecosystem with elevated CO<sub>2</sub> and added soil carbon. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 643–649.
- Cross, A.F., Schlesinger, W.H., 1999. Plant regulation of soil nutrient distribution in the northern Chihuahuan desert. *Plant Ecology* 145, 11–25.
- Döbereiner, J., Day, J.M., Dart, P.J., 1972. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. *Plant and Soil* 37, 191–196.
- Estrada-de los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., Caballero-Mellado, J., 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2790–2798.
- Evans, R.D., Ehleringer, J.R., 1993. A break in the nitrogen cycle in aridlands? Evidence from  $\delta^{15}\text{N}$  of soils. *Oecologia* 94, 314–317.
- Frias-Hernández, J.T., Aguilar-Ledesma, L., Olalde-Protugal, V., Balderramos-López, J.A., Gutiérrez-Juárez, G., Alvarado-Gil, J.J., Vargas, H., Albores, A., Dendooven, L., Miranda, C.M., 1999. Soil characteristics in semiarid highlands of central México as affected by mesquite trees (*Prosopis laevigata*). *Arid Soil Research and Rehabilitation* 13, 305–312.
- García, E., 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, UNAM, México.
- García-Bores, A.M., 2003. Estudio fitoquímico y antibacteriano de *Prosopis laevigata* (H.B. ex Willd), Mezquite de Zapotitlán de las Salinas. Master Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- García-Moya, E., McKell, C.M., 1970. Contribution of shrubs to the nitrogen economy of a desert-wash plant community. *Ecology* 51, 81–88.
- Hardy, R.W.F., Burns, R.D., Holsten, R.D., 1973. Applications of the acetylene–ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry* 5, 59–72.

- Hartley, A.E., Schlesinger, W.H., 2002. Potential environmental controls on nitrogenase activity in biological crusts of the northern Chihuahuan desert. *Journal of Arid Environments* 52, 293–304.
- Herman, R.P., Provencio, K.R., Torrez, R.J., Seager, G.M., 1993. Effect of water and nitrogen additions on free-living nitrogen fixer populations in desert grass root zones. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3021–3026.
- Herman, R.P., Provencio, K., Torrez, R., Seager, G.M., 1994. Seasonal and spatial population dynamics of the nitrogen efficient guild in a desert Bajada grassland. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1160–1165.
- Herman, R.P., Provencio, K.R., Herrera-Matos, J., Torrez, R.J., 1995. Resource islands predict the distribution of heterotrophic bacteria in Chihuahuan Desert soils. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1816–1821.
- Kuske, C.R., Ticknor, L.O., Miller, M.E., Dunbar, J.M., Davis, J.A., Barns, S.M., Belnap, J., 2002. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1854–1863.
- Lane, D.L., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrand, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, New York, pp. 115–175.
- Loera, T.M.L., Sánchez-Yañez, J.M., Peña-Cabral, J.J., 1996. Acetylene reduction activity on the root of cactaceous plants. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 38, 7–15.
- López-Franco, Y., Goycoolea, F.M., Valdez, M.A., Calderón de la Barca, A.M., 2006. Goma de mezquite: una alternativa de uso industrial. *Interciencia* 31, 183–189.
- López-Galindo, F., Muñoz-Iniesta, D., Hernández-Moreno, M., Soler-Aburto, A., Castillo-López, M.C., Hernández-Arzate, I., 2003. Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación del suelo en la subcuencia de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* LVI, pp. 19–41.
- Mayzlish, E., Steinberger, Y., 2004. Effects of chemical inhibitors on soil protozoan dynamics in a desert ecosystem. *Biology and Fertility of Soils* 39, 415–421.
- McAuliffe, J.R., Sundt, P.C., Valiente-Banuet, A., Casas, A., Viveros, J.L., 2001. Pre-columbian soil erosion, persistent ecological changes, and collapse of a subsistence agricultural economy in the semi-arid Tehuacán Valley, Mexico's 'Cradle of Maize'. *Journal of Arid Environments* 47, 47–75.
- Odum, E., Finn, J.T., Franz, E.H., 1979. Perturbation theory and the subsidy-stress gradient. *Bioscience* 29, 349–352.
- Purohit, U., Mehar, S.K., Sundaramoorthy, S., 2002. Role of *Prosopis cineraria* on the ecology of soil fungi in Indian desert. *Journal of Arid Environments* 52, 17–27.
- Rennie, R.J., 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixation) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology* 27, 8–14.
- Schaeffer, S.M., Evans, R.D., 2005. Pulse additions of soil carbon and nitrogen affect soil nitrogen dynamics in an arid Colorado Plateau shrubland. *Oecologia* 145, 425–433.
- Schlesinger, W.H., Raikes, J.A., Hartley, A.E., Cross, A.F., 1996. On the spatial pattern of soil nutrients in desert ecosystems. *Ecology* 77, 364–374.
- Serraj, R., Sinclair, T.H., Puercedl, L., 1999. Symbiotic N<sub>2</sub> fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany* 50, 143–155.
- Sokal, R., Rohlf, J., 2003. *Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, third ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Valiente-Banuet, A., Casas, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arizmendi, M.C., Villaseñor, J.L., Ortega, J., 2000. La vegetación del valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 67, 24–27.
- Whitford, W.G., 2002. *Ecology of Desert Systems*. Academic Press, Great Britain.
- Wullstein, L.H., 1991. Variation in nitrogen fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) associated with rhizosheaths of Indian ricegrass (*Sipa hymenoides*). *American Midland Naturalist* 126, 76–81.
- Xie, G., Steinberger, Y., 2002. Dynamics of the nitrogen-efficient guild and its relationship to nitrogen and carbon patterns in two desert soil ecosystems. *Arid Land Research and Management* 16, 69–81.
- Yeager, C.M., Kornosky, J.L., Housman, D.C., Grote, E., Belnap, J., Kuske, C.R., 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 973–983.

## CAPÍTULO III

### ESTABLECIMIENTO Y ACTIVIDAD REDUCTORA DE ACETILENO DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE EN SUELO DE ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA, EN CONDICIONES EXPERIMENTALES

#### INTRODUCCIÓN

Las interacciones mutualistas, tróficas y de competencia afectan directamente los procesos ecosistémicos porque modifican los flujos de materia y energía, o indirectamente porque modifican la abundancia de las especies con fuerte efecto en el ecosistema. Muchas de estas interacciones tienen alto grado de especificidad, lo cual incrementa la probabilidad de que la pérdida de una especie tenga efectos en cascada en el resto del ecosistema (Chapin et al. 2000). Esto es particularmente importante en ecosistemas pobres en especies ya que los de mayor riqueza tienen mayor oportunidad de que las especies que se pierden sean compensadas por las especies remanentes (Ekschmitt y Griffiths, 1998).

Todos los procesos que son regulados por las bacterias del suelo son esenciales para la productividad y la estabilidad de cualquier ecosistema; pero se desconoce la importancia funcional del total de la diversidad de especies microbianas que realizan estos procesos (Dickens y Anderson, 1999). Se estima que el banco de genes microbianos en el suelo es de 2000 a 18000 genomas  $g^{-1}$  (Dunbar et al. 2002), lo cual es mayor al número de microorganismos a los que se les ha identificado alguna función en el ecosistema (Griffiths et al. 2001).

Debido a la gran cantidad de microorganismos que existen en el suelo, se considera que los procesos que son regulados por ellos nunca podrían estar comprometidos por la falta de diversidad microbiana, siempre y cuando el ecosistema permanezca dentro de los límites fisicoquímicos adecuados para la actividad microbiana (Finlay, 2002).

Los grupos funcionales o tipos funcionales son grupos de especies, permanentes o temporales, que tienen efectos ecológicamente similares en los procesos del ecosistema (Chapin et al. 2002, Blondel, 2003). La diversidad de especies del grupo funcional o la diversidad genética dentro de las especies producen diferentes respuestas a los cambios ambientales, lo que puede tener consecuencias en los procesos ecosistémicos (Chapin et al. 2000, 2002); por ello, la gran

cantidad de especies funcionalmente similares incrementa la probabilidad de que alguna de ellas sobreviva a cambios direccionales o estocásticos en el ambiente, y mantenga las propiedades del ecosistema (Chapin et al. 2000). Sin embargo, la redundancia funcional no debe ser tomada como si el suelo tuviera capacidad infinita para continuar con sus funciones y procesos microbiológicos (Girvan et al. 2005).

El grupo funcional de fijadores de N de vida libre está ampliamente distribuido en el suelo, pero el conocimiento acerca de su importancia ecológica y de su diversidad es incompleto (Bürgmann et al. 2004). En las zonas áridas se encuentran en grandes cantidades alrededor de las raíces de las plantas (Herman et al. 1993; Xie y Steinberger, 2002). Otro tipo de estudios se relaciona con su diversidad a través de herramientas moleculares (Dunbar et al. 1999, 2002; Yeager et al. 2004).

En México, la investigación sobre los microorganismos relacionados con el ciclo del N de las zonas secas se ha abordado desde los enfoques de la ARA en cultivos bacterianos de la rizosfera de cactáceas (Loera et al. 1996); la propuesta de utilizar a *Azospirillum brasilense* como promotora del crecimiento vegetal, particularmente en cactáceas utilizadas en la reforestación de zonas urbanas (Bashan, et al. 1999), la interacción microorganismo-*Propospis laevigata* (Frías-Hernández, et al. 1999, 2000, Barajas-Aceves, 2001, Reyes-Reyes et al. 2002), o la influencia del agua y de la disponibilidad de N en la emisión de gases (Ponce-Mendoza et al. 2006).

En el capítulo II del presente trabajo se describió la relación del grupo funcional de fijadoras de nitrógeno vida libre de la zona de raíces de *P. laevigata* y *P. hollianus* y suelo libre de vegetación con la materia orgánica y la humedad del suelo. En este capítulo se planteó como objetivo general determinar si estas bacterias, consideradas como parte del grupo funcional de fijadores de vida libre, podrían establecerse y mantener su ARA en un ambiente edáfico que fue modificado de manera experimental. Debido a que fueron inoculadas en suelo del mismo sitio de donde fueron aisladas, se esperaba que la mayoría de ellas se pudiera establecer y mantener su ARA en el suelo estéril.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de cepas**

Se utilizaron las cepas aisladas previamente y de las cuales se presenta parte de su caracterización en la tabla 2 y su dinámica temporal en la Figura 4 del capítulo II. Además se utilizaron otras cuatro cepas de bacterias filamentosas que fueron aisladas posteriormente y que

también crecían en los tres microambientes de suelo (zona de raíces de *P. laevigata*, *P. hollianus*, y suelo libre de vegetación). En este capítulo se presenta información complementaria de la caracterización fenotípica y genotípica de las primeras 14 cepas así como de las otras 4 que se aislaron posteriormente. Estas 18 cepas se consideraron como un grupo funcional de fijadores de vida libre cultivables y heterótrofos.

Todos los cultivos utilizados para la inoculación en suelo estéril se realizaron en medio líquido libre de nitrógeno reducido y para contar las unidades formadoras de colonias (UFC), se utilizó el mismo medio, pero sólido (Rennie, 1981).

### **Preparación del suelo estéril**

El suelo se colectó en la terraza conservada en septiembre de 2002 con el diseño descrito en los capítulos anteriores. En el laboratorio se prepararon tres tipos de mezclas compuestas, una por cada microambiente: la primera se formó con suelo de la zona de raíces de tres árboles de *P. laevigata*; la segunda de la zona de raíces de tres individuos de *P. hollianus*, y la tercera de tres sitios libres de vegetación.

Se pesaron 5 gramos de suelo de cada mezcla compuesta en frascos de vidrio transparentes de 37 ml, se taparon con tapón de algodón y se esterilizaron en autoclave en tres ciclos de 121°C y 1.5 lb de presión por 15 min. La esterilidad se comprobó mediante siembras de diluciones sucesivas de suelo de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . Se utilizaron cuatro frascos de cada mezcla para cada cepa.

### **Establecimiento de cepas bacterianas en suelo estéril**

Los frascos con suelo estéril fueron inoculados con 0.8 ml de cultivos bacterianos líquidos y se incubaron por 72 horas a 28°C. A las 24 y 48 horas, se adicionaron 2 ml de extracto de suelo estéril<sup>1</sup> a cada frasco con el fin de mantener la humedad del suelo a 16% durante el tiempo de incubación, la cual se continuó hasta las 72 horas. En este nivel de humedad se registro el mayor número de bacterias en el suelo de los tres microambientes durante el ciclo anual (Capítulo 2).

La cuantificación del las UFC inoculadas se realizó sembrando en medio sólido 10 µl de los mismos cultivos líquidos utilizados como fuente de inóculo, e incubando por 96 horas a 28°C. Se contó el número de UFC y esta cantidad se extrapoló al volumen de inóculo adicionado al suelo. La cuantificación del inóculo se realizó de esta manera debido a que aún en medio líquido, las

---

<sup>1</sup> El extracto de suelo de cada mezcla compuesta (microambiente) se preparó con 100 g de suelo y 500 ml de agua destilada. Esta mezcla se mantuvo a 4° durante una semana, se filtro y se esterilizó en autoclave por 15 min a 121° y 1.5 lb de presión. Se comprobó la esterilidad por siembra de alicuanta de 20 µl en medio sólido libre de nitrógeno reducido.

bacterias filamentosas formaron colonias de 2-4 mm de diámetro que se adherían a las paredes del tubo o se quedaban suspendidas en el medio de cultivo, por lo cual no fue posible registrar su crecimiento por espectrofotometría. La cuantificación del inóculo de las bacterias con morfología de bacilos y cocos también se realizó de esta manera con el fin de homogeneizar los procedimientos utilizados. La cuantificación del número de UFC que se establecieron en el suelo estéril se hizo mediante la siembra de 20 µl de una dilución de suelo de  $10^{-3}$  en cajas Petri con medio de cultivo sólido. Las cajas se incubaron por 5 días a 28°C y se contó el número de UFC.

Se calculó la cantidad de UFC por gramo de suelo. Los resultados se reportaron para cada cepa en cada mezcla de suelo, como el promedio de las UFC establecidas en los cuatro frascos inoculados entre el promedio de las que fueron inoculadas (UFC establecidas / UFC inoculadas). A este cociente se le denominó incremento relativo.

#### **Actividad reductora de acetileno (ARA) de bacterias en suelo estéril**

Se utilizaron los mismos frascos en donde ya se encontraban inoculadas las bacterias. Después de que se tomó la muestra de suelo para cuantificar las UFC establecidas, los tapones de algodón de los frascos de incubación se sustituyeron por tapones de plástico flexible a través de los cuales se extrajo 10% de su volumen de aire y se inyectó el mismo volumen de acetileno.

Los frascos se incubaron por 24 horas más y después se tomó una muestra de la mezcla de gases en un tubo al vacío. La cantidad de etileno producido se determinó por cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo Perkin-Elmer 900, con detector de ionización de flama y columna Poropak-N, con flujo de nitrógeno de 25 ml/min, detector de temperatura de 150°C y temperatura del inyector de 120 °C. Los datos se reportaron como el promedio de cuatro réplicas en µmoles etileno/gramo de suelo<sup>-1</sup> hora de incubación. Debido al alto grado de variabilidad entre los datos, no fue posible aplicar ningún tipo de análisis estadístico (Figura 2).

## **RESULTADOS**

### **Caracterización fenotípica y genotípica del grupo funcional de fijadores de vida libre cultivables**

De las 18 cepas aisladas, 14 fueron de morfología filamentosas Gram positivos (cepas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 17 y 18), 2 bacilos y cocos irregulares Gram positivos (cepas 11 y 15) y 2 bacilos Gram negativos (cepas 1 y 16) (tabla 1). 7 de las 14 cepas filamentosas pertenecen al

género de actinobacterias *Streptomyces* (capítulo 2, tabla 2), y debido a que las cepas 4, 5, 7, 9, 13, 14 y 17 mostraron características fenotípicas (morfología, tiempo de crecimiento y tinción de Gram) similares a las identificadas a éstas, se sugiere su pertenencia a dicho género. En las figuras 1, 2 y 3 se presentan ejemplos de las cepas aisladas.

Para complementar la descripción fenotípica y genotípica de estas bacterias, en la tabla 1 se presenta el número de bases obtenidas para cada cepa y el porcentaje de similitud con otras secuencias depositadas en el GenBank.

### **Incremento relativo de bacterias en suelo estéril**

El incremento relativo de las bacterias inoculadas se presenta en la figura 1. Todas las cepas no filamentosas de ambas divisiones (Alphaproteobacteria y Actinobacteria) mostraron incremento relativo en el suelo de los tres microambientes. En la división de las Alphaproteobacterias, *Rhizobium* Zapt1 tuvo un incremento relativo de alrededor de 18 veces en el suelo de ambas plantas, el cual bajó a 12 en el suelo libre de vegetación. *Sphingomonas* Zapt16 mostró menor incremento que *Rhizobium*, con sólo 8 veces más crecimiento en las tres condiciones de suelo.

En las actinobacterias filamentosas, sólo 4 cepas (Zapt 5, 13, 17 y 18) mostraron esta característica y el resto decreció en al menos uno de los suelos probados. En 5 de estos casos (Zapt 2, 4, 7, 12 y 14), el decremento se registró en las tres condiciones de suelo.

En las Actinobacterias no filamentosas, *Gordonia* (cepa Zapt 15; Actinobacteria no-filamentosa) fue la cepa con mayor incremento relativo con 32 veces su población inicial en el suelo de *P. hollianus*, 30 en el suelo de *P. laevigata* y 25 en el suelo de interespacio (Figura 4). En la otra cepa de Actinobacterias-no filamentosas, *Microbaterium* Zapt11, el incremento relativo fue de entre 12 y 14 veces.

En los actinomicetos filamentosos, la cepa Zapt13 fue la que mostró mayor incremento con 14 a 27 veces la cantidad inicial en el suelo de *P. hollianus* y *P. laevigata*, respectivamente.

### **Actividad reductora de acetileno de bacterias en suelo estéril**

La ARA mostró alta variabilidad entre las cepas, entre las tres condiciones de suelo e incluso de manera interna entre los cuatro frascos inoculados con cada cepa (Figura 5).

En las Alphaproteobacterias, la ARA se registró en el suelo de *P. laevigata* e interespacio en *Rhizobium* Zapt1 y en el suelo de ambas plantas en *Sphingomonas* Zapt16.

En las actinobacterias no filamentosas, ninguna de las cepas expresó ARA en el suelo libre de vegetación. *Microbacterium* lo hizo únicamente en el suelo de *P. laevigata*, y *Gordonia* en el suelo de ambas plantas.

En las Actinobacterias filamentosas, la ARA fue positiva en 13 de las 14 cepas. En 5 de ellas (2, 3, 9, 14 y 17) se registró en los tres microambientes y en dos cepas más (6 y 18) sólo en el suelo de ambas plantas. En el resto de las cepas se presentaron diferentes combinaciones de ARA positiva entre los tres microambientes de suelo.

### **Relación entre el incremento relativo y la actividad reductora de acetileno**

Del total de las cepas que se establecieron en los tres microambientes de suelo, sólo la cepa Zapt17 mostró actividad reductora de acetileno en las tres condiciones de suelo.

En las cepas Zapt2 y Zapt14, la cantidad de bacterias mostró un decremento en los tres microambientes de suelo, sin embargo, la ARA fue positiva también en los tres microambientes.

La cepa que tuvo mayor incremento relativo (*Gordonia* Zapt 15) no fue la de mayor ARA (Zapt 9).

## **DISCUSIÓN**

La necesidad experimental de producir un ambiente controlado para las bacterias, sin ningún tipo de microorganismo ni de raíces vivas o muertas que interfirieran con las cepas inoculadas, obligó a retirar los restos de raíces y a esterilizar el suelo en autoclave. Esto modificó el ambiente edáfico original de donde las bacterias fueron aisladas, el cual tenía en promedio 5% de humedad y 3.5% de materia orgánica. Ésta humedad se elevó a 16% durante el tiempo de incubación y además, la adición de medio de cultivo con inóculo bacteriano modificó el carbono disponible que había en el suelo.

La esterilización también eliminó de manera automática las interacciones ecológicas en donde intervienen los microorganismos como la depredación, el amensalismo, el comensalismo o el mutualismo. En los suelos con plantas, los exudados rizosféricos representan una fuente constante de carbono de fácil acceso, mientras que en los suelos sin vegetación, el establecimiento de las bacterias depende en gran medida de su capacidad para metabolizar compuestos más recalcitrantes una vez que se agota el carbono lábil remanente. La ausencia de vegetación obligó a los microorganismos a metabolizar el carbono proveniente del medio de cultivo con el cual fueron inoculadas, el del extracto de suelo utilizado para ajustar la humedad y

el presente en la materia orgánica que en parte proviene del rompimiento de las células microbianas lisadas por la esterilización. Además, la esterilización del suelo detuvo la producción de sustancias que pueden inhibir o promover el crecimiento de otros microorganismos (de Boer et al. 2003), modificar los almacenes de nitrato y amonio (Ramsay y Bawden, 1983) y la absorción de ácidos fenólicos (Dalton et al. 1989).

La expresión de incremento relativo y ARA en al menos uno de los tres microambientes de suelo manipulado experimentalmente, indica que estas bacterias pueden resistir cambios en el ambiente edáfico, pero con diferencias muy marcadas en su nivel de tolerancia. El grupo que presentó mayor incremento relativo y ARA en al menos un microambiente podría tener mayor capacidad de supervivencia en condiciones ambientales cada vez más adversas como sequías, temperaturas elevadas o muy bajas o perturbación mecánica del suelo (Ekschmitt y Griffiths, 1998). Por el contrario, las bacterias que no lograron establecerse podrían pertenecer a un grupo altamente sensible a los cambios ambientales y por lo tanto, ser afectadas de manera más severa e incluso eliminadas por la presión ambiental.

Los resultados positivos en ambas propiedades (incremento relativo y ARA) sugiere que el grupo de 18 cepas que fueron utilizadas en este experimento conforman un grupo funcional: fijadores de nitrógeno de vida libre, heterótrofas, cultivables. Xie y Steinberger (2002) aislaron bacterias con capacidad para crecer en medio de cultivo similar al utilizado en este trabajo, por ello las consideraron como parte de este grupo funcional. Sin embargo, esta capacidad también puede estar sugiriendo la existencia de otro grupo funcional bacteriano en el suelo: el de los microtrófos para el nitrógeno, cuyos miembros pueden extraer las trazas de este elemento que se encuentran en el agar o en el extracto de levadura e incorporarlo a su biomasa (Herman et al. 1993, 1994). Debido a ello, el crecimiento en medios de cultivo sin nitrógeno se debe complementar con la ARA, la cual es comúnmente utilizada para medir fijación de N (Introducción general -tabla 1; Yeager et al. 2004; DeLuca et al. 2008).

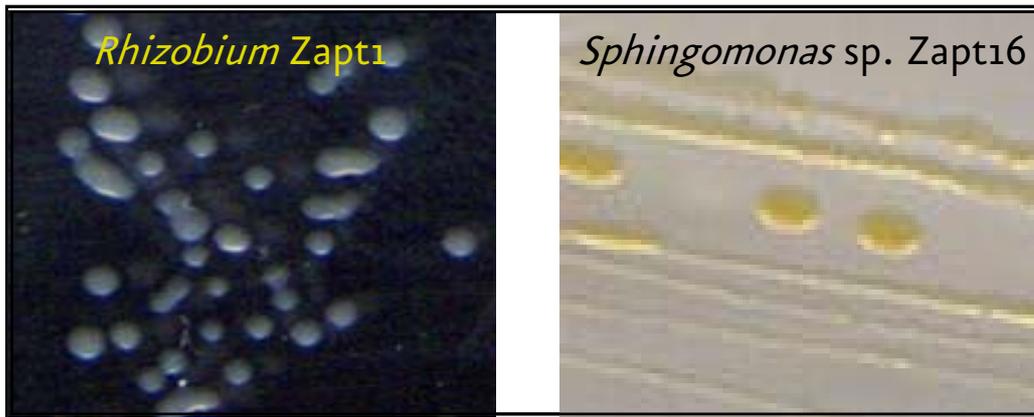
En este grupo funcional fue notorio el número de UFC de *Rhizobium* en los tres microambientes de suelo tanto en conteos de cultivos directos de suelo sin manipular (Figura 4, Capítulo 2) como en de suelo modificado (Figura 2). Estas bacterias son heterótrofas en vida libre pero fijan el nitrógeno de manera simbiótica con muchas especies de leguminosas. Sin embargo, se ha reportado que diversas cepas de rhizobios han expresado ARA en ausencia de las leguminosas, ya sea formando biopelículas con *Penicillium* sp (Jayasinghearachchi y Seneviratne, 2004; Seneviratne y Jayasinghearachchi, 2005) o en cultivos en donde se encuentra en vida libre

(Postgate, 1975; Pagan et al. 1975, Kurz y LaRue, 1975, Kenster y Evans, 1976; Manian et al. 1984, Bender et al. 1986, García-Plazaola, 1996), siendo el C y N disponibles, la concentración de oxígeno y la densidad celular los elementos más importantes para la actividad nitrogenasa de *Rhizobium* en vida libre (Keister y Evans, 1976). En el presente trabajo, la cepa de *Rhizobium* Zapt1 expresó ARA en el suelo de *P. laeviaga* y el suelo libre de vegetación.

La variabilidad en la expresión de la ARA de todas las cepas es congruente con la reportada en costras microbióticas (Belnap, 2002, Hartley y Schlesinger, 2002, Billings et al. 2003, Hawkes, 2003, Yeager et al. 2004) y en fijadores de vida libre de otros sistemas áridos (Xie y Steinberger, 2002). Los valores de ARA obtenidos en el presente trabajo no pueden compararse directamente con los reportados por los autores anteriores debido a que se obtuvieron de consorcios microbianos (costras y suelo) de zonas secas que caen en la categoría de áridas (Desiertos Chihuahuense y Sonorense, y de Negev); mientras que Zapotitlán es considerado como semiárido. Además, no existen datos de ARA o de fijación de nitrógeno para ningún grupo de microorganismos en Zapotitlán, por lo que estos resultados representan un primer acercamiento al entendimiento del proceso de fijación de nitrógeno en estos suelos.

Se esperaba que debido a que las bacterias fueron inoculadas en el mismo suelo de donde fueron aisladas, mantuvieran su capacidad de establecimiento y de ARA; sin embargo, mostraron diferentes rangos de tolerancia a los cambios experimentales que llevó a algunas de ellas a disminuir su población. Por ello, se sugiere que las variaciones ambientales y las interacciones biológicas que se dan en la zona de estudio, también las podrían afectar de diferente manera, y al formar parte del grupo funcional de fijadores de N de vida libre, la muerte de algunas ellas, contribuiría con la circulación de N en este ecosistema.

División Alphaproteobacteria



División Actinobacteria Cepas No filamentosos



Figura 1. Cepas bacterianas no filamentosas aisladas de suelo de las terrazas aluviales de Zapotitlán Salinas, Puebla. Se utilizaron fondos de color diferente dependiendo de la coloración de la colonia bacteriana.

División Actinobacteria Cepas filamentosas

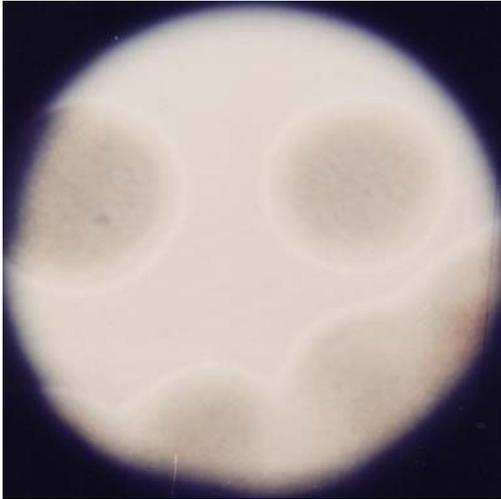


Figura 2. Cepas bacterianas filamentosas aisladas de suelo de las terrazas aluviales de Zapotitlán Salinas, Puebla. El pigmento de las colonias bacterianas se produce de manera natural en medio de cultivo libre de N reducido. En *Streptomyces* sp. Zapt2, 4 y 7, se utilizó fondo negro para lograr el contraste de colores.

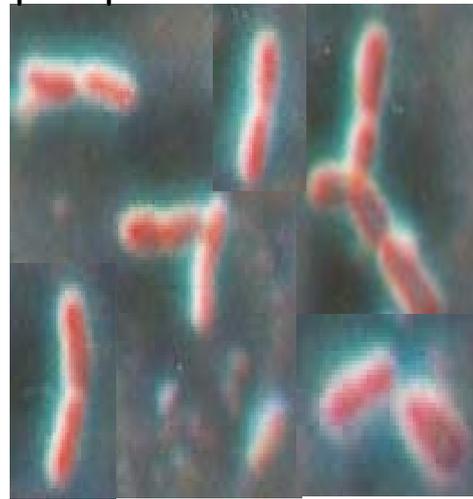
Morfología Colonial

Morfología celular

*Rhizobium* sp. Zapt1

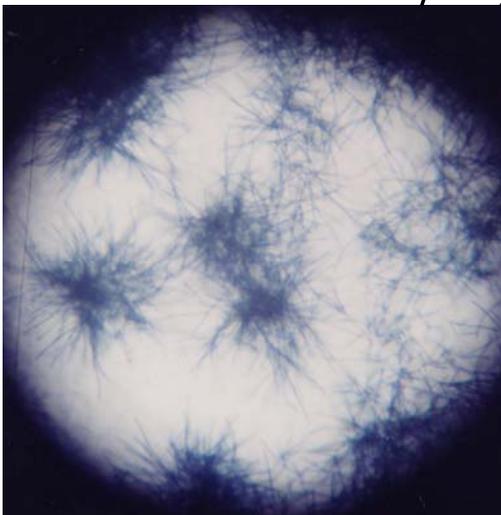


Colonias convexas, circulares,  
semitraslucidas y mucilaginosas

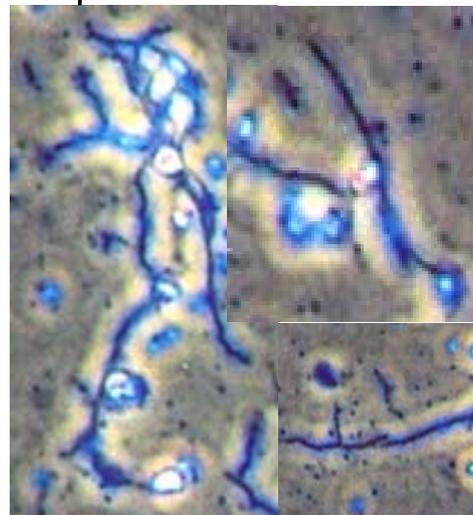


Báctilos  
Gram negativo

*Streptomyces* Zapt 6



Crecimiento micelial,  
rojas, opacas, 7 mm diámetro aprox



Filamentos  
Gram positivo

Figura 3. Ejemplos de morfologías colonial y celular de cepas bacterianas aisladas del suelo de las terrazas aluviales de Zapotitlán Salinas, Puebla.

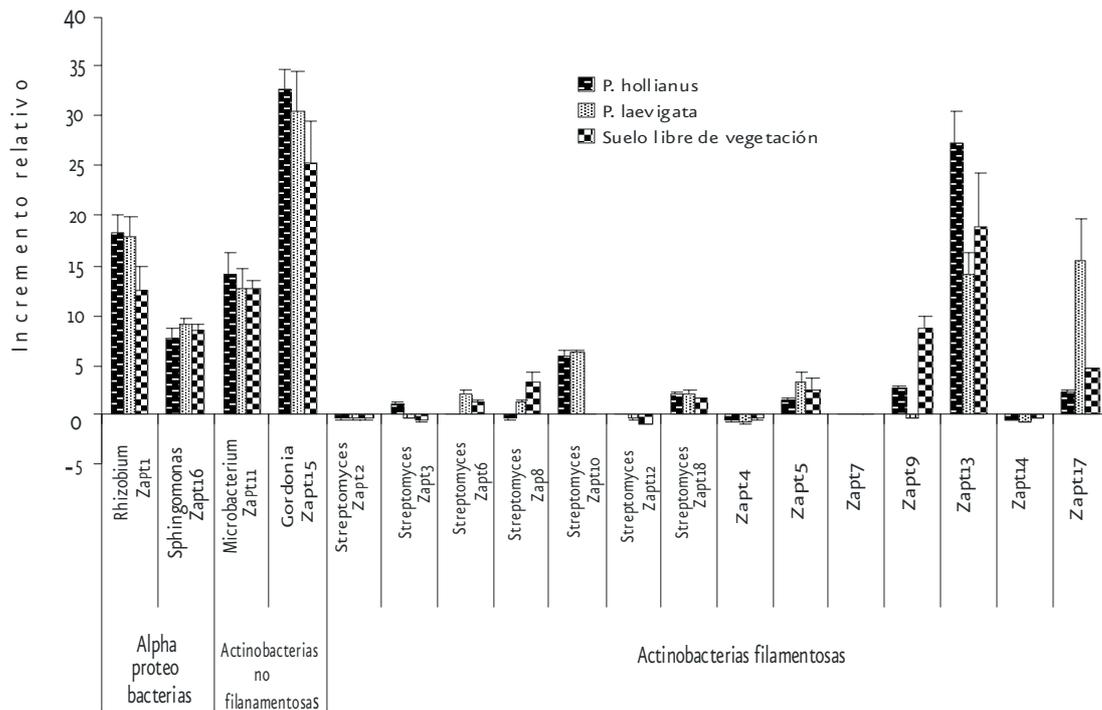


Figura 4. Incremento relativo de 18 cepas bacterianas inoculadas en suelo estéril. Cada barra representa la media de cuatro réplicas con error estándar.

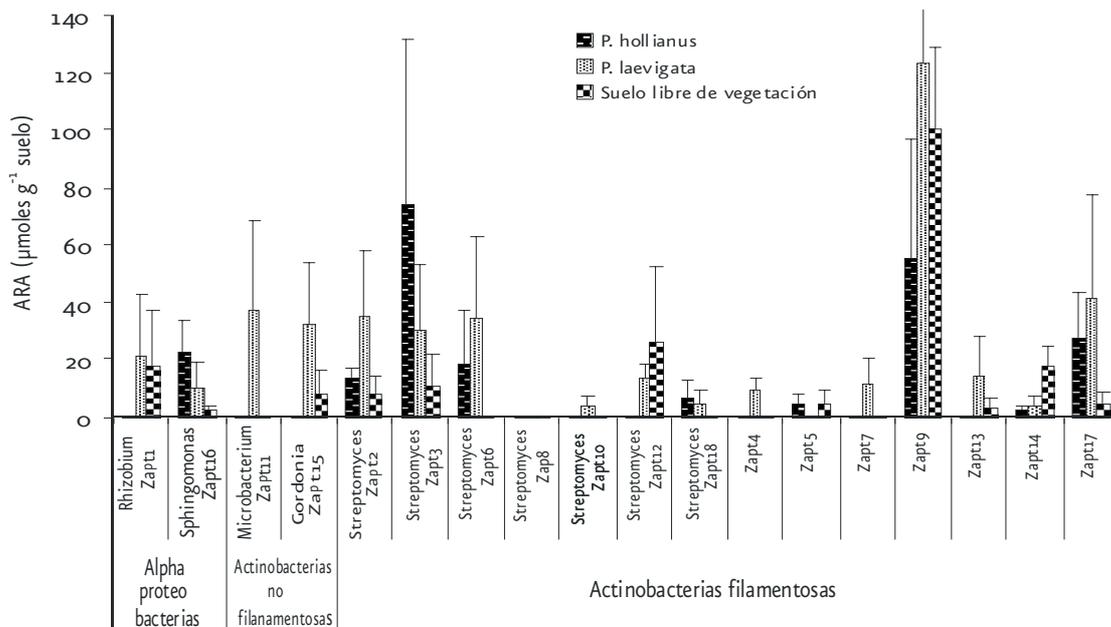


Figura 5. Actividad reductora de acetileno de 18 cepas inoculadas en suelo estéril. Cada barra representa la media de cuatro réplicas con error estándar.

Tabla 1. Identificación molecular por la secuenciación del 16S rDNA de 9 cepas bacterianas. Se muestra número de acceso de la secuencia asignado por el GenBank. La segunda y tercer columna muestran el número de bases que se compararon y el porcentaje de similitud entre las secuencias.

Nombre y número de acceso asignado por el GenBank	Comparación del número de bases de cepas de Zapotitlán y las del GenBank	Similitud entre las secuencias de bases (%)	Género obtenido de la comparación de secuencias
<hr/>			
División Alphaproteobacteria	Morfología bacilar Gram negativas		
<hr/>			
Rhizobium sp. Zapt -1 DQ164421	867 / 877	98	Rhizobium sp. Y210710
	867 / 877	98	Rhizobium etli bv. phaseoli AY998046
	865 / 877	98	Rhizobium leguminosarum bv. viciae U89829
Sphingomonas sp. Zapt -16 DQ164429	800 / 828	96	Sphingomonas sp. AJ575817
	797 / 828	96	Sphingomonas pruna Y09637
	798 / 828	96	Sphingomonas sp. AB033948
<hr/>			
División Actinobacteria	Morfología cocoide y bacilos irregulares, Gram positivos		
<hr/>			
Microbacterium Zapt- 11 DQ164420	930 / 956	97	Microbacterium foliorum AJ249780
	930 / 957	97	Microbacterium sp. B04207
	928 / 956	97	Microbacterium hydrocarbonoxydans AJ698726
Gordonia sp. Zapt -15 DQ164428	898 / 913	98	Gordonia terrea AY771330
	849 / 866	98	Gordonia bronchialis X79287
	849 / 866	98%	Gordonia rhizosphaera AB004729
<hr/>			

Tabla 1. Continuación

Nombre y número de acceso asignado por el GenBank	Comparación del número de bases de cepas de Zapotitlán y las del GenBank	Similitud entre las secuencias de bases (%)	Género obtenido de la comparación de secuencias
<b>División Actinobacteria</b>	<b>Morfología filamentosa, Gram positivos</b>		
Streptomyces sp. Zapt -2 DQ164422	852 / 886	96	Streptomyces sp AF012739
	852 / 886	96	Streptomyces somaliensis AJ007401
	845 / 886	95	Streptomyces setonii D63872
Streptomyces sp. Zapt-3 DQ164423	785 / 801	98	Streptomyces cyaneus AF346475
	785 / 801	98	Streptomyces indigocolor AF346474
	785 / 801	98	Streptomyces indigocolor AJ399464
Streptomyces sp. Zapt-6 DQ164424	756 / 786	96	Streptomyces maritimus AF233338
	755 / 786	96	Streptomyces shandongensis AY875718
	756 / 786	96	Streptomyces steffisburgensis AB045889
Streptomyces sp. Zapt-8 DQ164425	560 / 568	98	Streptomyces africanus AY208912
	560 / 568	98	Streptomyces cyaneus AJ399470
	561 / 569	98	Streptomyces afghaniensis AJ399483
Streptomyces sp. Zapt-10 DQ164426	749 / 762	98	Streptomyces pseudogriseolus X80827
	749 / 762	98	Streptomyces sp. AF026080
	749 / 762	98	Actinomycetales bacterium AY944259
Streptomyces sp. Zapt -12 DQ164427	772 / 784	98	Streptomyces alboniger AY845349
	771 / 784	98	Streptomyces resistomycificus AJ310926
	769 / 784	98	Streptomyces chartreusis AJ399468
Streptomyces sp. Zapt -18 DQ164430	605 / 627	96	Streptomyces cyaneus AF346475
	605 / 627	96	Streptomyces indigocolor AF346474

## LITERATURA CITADA

- Barajas-Aceves, M., Dendooveen, L., 2001. Nitrogen, carbon and phosphorus mineralization in soils from semi-arid highlands of central Mexico amended with tannery sludge. *Bioresource Technology* 77, 121-130.
- Belnap, J. 2002. Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA. *Biology and Fertility of Soils* 35, 128-135.
- Blondel, J. 2003. Guilds or functional groups: does it matter? *Oikos* 100, 223-231.
- Bender, G.L., Plazinski, J., Rolfe, B.G. 1986. Asymbiotic acetylene reduction by a fast-growing cowpea rhizobium strain with nitrogenase structural genes located on a symbiotic plasmid. *Applied Environmental Microbiology* 52, 868-871.
- Billings, S.A., Scaffer, S.M., Evans, R.D. 2003. Nitrogen fixation by biological soil crusts and heterotrophic bacteria in a Mojave Desert ecosystem with elevated CO<sub>2</sub> and added soil carbon. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 643-649.
- Bürgmann, H., Widmer, F., Von Sigler, W., Zeyer, J. 2004. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 240-247.
- Bashan, Y., Rojas, A., Puente, M.E. 1999. Improved establishment and development of tree cacti species inoculated with *Azospirillum brasilense* transplanted into disturbed urban desert soil. *Canadian Journal of Microbiology* 45, 441-451.
- Chapin III, F.S., Zavaleta, E.S., Eviner, T.V., Rosamond, L.N., Vitousek, P.M., Reynolds, H.L., Hooper, D.U., Lavoirel, S., Sala, O.E., Hobbie, S.E., Mack, M.C., Díaz, S. 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature* 405, 234-242.
- Chapin III, S.F., Matson, P.A., Mooney, H.A. 2002. *Principles of terrestrial ecosystem ecology*. Springer-Verlag, New York. 436 pp.
- Dalton, B.R., Blum, U., Weed, S.B. 1989. Plant phenolic acids in soils: sorption of ferulic acid by soil and soil components sterilized by different techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 21, 1011-1018.
- de Boer, W., Verheggen, P., Paulien, J. A. Gunnewiek, K., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A. 2003. Microbial Community Composition Affects Soil Fungistasis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 835-844.
- DeLuca, T., Zackrisson, Gundale, M.J., Nilson, M.C. 2008. Ecosystem feedbacks and nitrogen fixation in Boreal forests. *Science* 230, 1181.
- Dickens, H.E., Anderson, J.M. 1999. Manipulation of soil microbial community structure in bog and forest soils using chloroform fumigation. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 2049-2058.
- Dunbar, J., Barns, S.M., Ticknor, L.O., Kuske, C.R. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3035-3045.

- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A., Kuske, C.R. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S r RNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1662-1669.
- Ekschmitt, K., Griffiths, B.S. 1998. Soil biodiversity and its implications for ecosystem functioning in a heterogeneous and variable environment. *Applied Soil Ecology* 10, 201-215.
- Finlay, B. 2002. Global Dispersal of Free-Living Microbial Eukaryote Species. *Science* 296, 1061-1063.
- Frías-Hernández, J.T., Aguilar-Ledesma, L., Olalde-Protugal, V., Balderas-López, J.A., Gutiérrez-Juárez, G., Alvarado-Gil, J.J., Vargas, H., Albores, A., Dendoover, L., Miranda, C.M., 1999. Soil characteristics in semiarid highlands of central México as affected by mesquite trees (*Prosopis laevigata*). *Arid Soil Research and Rehabilitation* 13, 305-312.
- García-Plazaola, I., Arrese-Igor, C., González, A., Aparicio-Tejo, P.M., Becerril, J.M. 1996. Denitrification in lucerne nodules is not involved in nitrite detoxification. *Plant and Soil* 182, 149-155.
- Girvan, M.S., Campbell, C.D., Killham, K., Prosser, J.I., Glover, L.A. 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation *Environmental Microbiology* 7, 301-313.
- Griffiths B., M. Bonkowski, J. Roy y K. Ritz. 2001. Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil Ecology* 16:49-61.
- artley A.E., Schlesinger, W.H. 2002. Potential environmental controls on nitrogenase in biological crusts of the northern Chihuahuan Desert. *Journal of Arid Environmental* 52, 293-304.
- Hawkes, C.V. 2003. Nitrogen cycling mediated by biological soil crusts and arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84, 1553-1562.
- Herman R.P., Provencio, K.R., Torrez, R.J., Seager, G.M. 1993. Effect of water and nitrogen additions on free-living nitrogen fixer populations in desert grass root zones. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3021-3026.
- Herman, R.P., Provencio, K., Torrez, R. Seager, G.M. 1994. Seasonal and spatial population dynamics of the nitrogen efficient guild in a desert Bajada grassland. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1160-1165.
- Jayasinghearachchi H.S., Senevirante, G. 2004. Can mushrooms fix atmospheric nitrogen? *Journal of Bioscience* 29, 293-296.
- Keister, D. L., Evans. W. R. 1976. Oxygen requirement for acetylene reduction by pure cultures of rhizobia. *Journal of Bacteriology* 127, 149-153.
- Kurz, W.G.W. LaRue, T.A. 1975. Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. *Nature* 256, 407-408.
- Loera T.M.L., Sánchez Yañez, J.M., Peña-Cabriales, J.J. 1996. Acetylene reduction activity on the root of cactaceous plants. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 38, 7-15.

- Manian, S.S., Gumbleton, R., Buckley, A.M., O'gara, F. 1984. Nitrogen Fixation and Carbon Dioxide Assimilation in *Rhizobium japonicum* Applied and Environmental Microbiology 48, 276-279.
- Pagan, J.D., Child, J.J., Scowcroft, W.R., Gibson, A.H. 1975. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. Nature 256, 406-407.
- Perroni-Ventura, Y., Montaña, C., García-Oliva, F. 2006. Relationship between soil nutrient availability and plant species richness in a tropical semi-arid environment. Journal of Vegetation Science 17, 719-728.
- Ponce-Mendoza, A., Boeckx, P., Gutierrez-Miceli, F., Van Cleemput, O., Dendooven, L. 2006. Influence of water regime and N availability on the emission of nitrous oxide and carbon dioxide from tropical, semi-arid soils of Chiapas, Mexico. Journal of Arid Environments 64, 137-151.
- Postgate, 1975. *Rhizobium* as a free-living nitrogen fixer. Nature 256, 363
- Ramsay, A., Bawden, A.J., 1983. Effects of sterilization and storage on respiration, nitrogen status and direct counts of soil bacteria using acridine orange. Soil Biology and Biochemistry 15, 263-268
- Rennie R. J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixation) bacteria from soils. Canadian Journal Microbiology 27, 8-14.
- Reyes-Reyes, G., Baron-Ocampo, L., Cuali-Alvarez, I., Frías-Hernández, J.T., Olalde-Portugal, V., Varela-Fregoso, L., Dendooven, L., 2002. C and N dynamics in soil from the central highlands of Mexico as affected by mesquite (*Prosopis* spp.) and huizache (*Acacia tortuosa*): a laboratory investigation. Applied Soil Ecology 19, 27-34.
- Senevirante, G., Jayasinghearachchi, H.S. 2005. A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. Soil Biology and Biochemistry 37, 1975-1978.
- Xie, G., Steinberger, Y. 2002. Dynamics of the nitrogen-efficient guild and its relationship to nitrogen and carbon patterns in two desert soil ecosystems. Arid Land Research and Management 16, 69-81.
- Yeager, C.M., Kornosky, J.L., Housman, D.C., Grote, E.E., Belnap, J. Kuske, C.R. 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan desert. Applied and Environmental Microbiology 70, 973-983.

## CAPÍTULO IV

### SECUENCIACIÓN DEL GENE *nifH* EN UNA CEPA DE *Microbacterium* sp. AISLADA DEL SUELO DE LA ZONA SEMIÁRIDA DE ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA

#### INTRODUCCIÓN

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la reducción de N gaseoso ( $N_2$ ) a N biológicamente disponible ( $NH_4$ ). Todos los fijadores de nitrógeno (diazótrofos) que se conocen son procariotes y están ampliamente distribuidos en los dominios Archea y Bacteria (Izquierdo y Nüsslein, 2006). La gran diversidad de los diazotrofos también se extiende a sus características fisiológicas ya que la realizan microorganismos anaerobios estrictos, facultativos, aerobios, microaerobios, fotótrofos, quimioautótrofos y heterótrofos (Postgate, 1998)

La capacidad fijadora de nitrógeno recae exclusivamente en el complejo enzimático nitrogenasa, específicamente en el gene *nifH* (Raymond et al. 2004).

La secuencia del *nifH* esta bien conservada y es ampliamente utilizada como marcador molecular para la fijación de nitrógeno (Zehr et al. 2003). El *nifH* cuenta con una amplia colección de secuencias de organismos cultivados y no cultivados de diversos ambientes que incluyen mar abierto, la región de la Antártida, biopelículas, lagos, sedimentos estuarinos, estromatolitos, pozas hidrotermales, pastos marinos, suelo agrícola y forestal y de costras microbióticas, rizosfera de diversas especies, tracto digestivo de termitas, e invertebrados marinos (Zehr et al. 2003, Yeager et al. 2004, Izquierdo y Nüsslein, 2006). Como resultado de estos estudios, se encontró alta diversidad en el gene *nifH* (Izquierdo y Nüsslein, 2006).

En un análisis comparativo de las secuencias de estos ambientes depositadas en el GenBank, el suelo tuvo menor número de secuencias de *nifH* que los ambientes acuáticos, tanto en organismos cultivados como no cultivados (Zehr et al. 2003, Izquierdo y Nüsslein, 2006). Esto podría explicarse, al menos parcialmente por la propia heterogeneidad fisicoquímica del suelo, debido a que la distribución de los microorganismos varía en función del tipo de suelo y de la escala utilizada (Izquierdo y Nüsslein, 2006).

En las zonas áridas, la investigación sobre el gene *nifH* se ha centralizado en las costras microbióticas (Omeregíe, 2004, Yeager et al. 2004, 2007) mientras que para las bacterias heterótrofas cultivables, la información es escasa. De manera particular, para Zapotitlán no existe información al respecto. Por ello, teniendo presente que las bacterias cultivables descritas en los

capítulos III y IV crecieron en medio libre de nitrógeno reducido y que la mayoría mostró actividad reductora de acetileno, el objetivo del presente capítulo fue amplificar y secuenciar el gene *nifH* a partir del ADN previamente extraído, partiendo de la hipótesis de que por las características antes descritas, se sugiere su pertenencia a los fijadores de vida libre.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Amplificación y secuenciación del gene *nifH*

A partir del ADN extraído de las cepas *Rhizobium* Zapt1, *Microbacterium* Zapt11, *Gordonia* Zapt 11, *Sphingomonas* Zapt 16, y *Streptomyces* Zapt2, 3, 6, 8, 12, y 18 (capítulos II y III), se intentó secuenciar gene *nifH* por PCR anidados. En el primer ciclo de PCR se utilizó 1  $\mu$ l de ADN y los iniciadores *nifH*-3 y *nifH*-4. Para el segundo ciclo de PCR se tomó 1  $\mu$ l del producto del primer ciclo de PCR y los iniciadores *nifH*-F y *nifH*-R (Zehr y McReynolds, 1989) (tabla 1). El gene *nifH* se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 75 V por 30 min, y purificado usando Gel Extraction Kit (QIAquick QIAGEN) siguiendo las especificaciones del fabricante. Después de la precipitación con alcohol, el producto del segundo PCR se secuenció en un secuenciador ABI Prism 3100 Avant Genetic Analizar. Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en el GenBank mediante la opción nucleotide-BLAST (Benson et al. 2004). Los volúmenes de reactivos para las reacciones de PCR se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. Secuencias de iniciadores utilizados en las reacciones de PCR para amplificación del gene *nifH*.

	Iniciador	Secuencia 5' a 3'
<i>Primer PCR</i>	<i>nifH</i> <sub>3</sub>	ATR TTR TTN GCN GCR TA
	<i>nifH</i> <sub>4</sub>	TTY TAY GGN AAR GGN GG
<i>Segundo PCR</i>	<i>nifH</i> F	TGT GAT CCT AAA GCT GA
	<i>nifH</i> R	CCT CTT TAC TAC CGT AA

En los casos en los que no se logró la amplificación del *nifH* con el protocolo descrito en las primeras dos columnas de la tabla 2, se optó por adicionar al PCR, de manera independiente, DMSO (dimetil-sulfóxido), que se ha reportado tiene el efecto de mejorar la apertura de las hebras de ADN, y BSA (albúmina bovina sérica), cuya función principal es proporcionar un sustrato físico sobre el cual se realice la reacción de PCR. Estos protocolos se describen en la tabla 2.

Para todas las reacciones de PCR se utilizó un termociclador (MJ Research) programado con un solo ciclo inicial de 2 min a 94°, 30 ciclos de 1 min a 95°, 30 ciclos de 1 min a 55°, 30 ciclos de 1 min a 72° y un ciclo final de 30 min a 72°, para posteriormente mantener a 4° C.

Tabla 2. Protocolo para la realización de reacciones de PCR con y sin aditivos

Reactivo (volumen en microlitros)	Primer ciclo sin aditivos	Segundo ciclo sin aditivos	Primer ciclo con DMSO	Segundo ciclo con DMSO	Primer ciclo con BSA	Segundo ciclo con BSA
Agua	34.5	34.5	30.86	33.5	30.86	33.5
Buffer	5	5	5	5	5	5
ClMg	8	8	8	8	8	8
dNTP	1	1	1	1	1	1
Primer <i>nifH3</i>	2	—	2	—	2	—
Primer <i>nifH4</i>	2	—	2	—	2	—
Primer <i>nifHR</i>	—	2	—	2	—	2
Primer <i>nifHF</i>	—	2	—	2	—	2
dDNTP	1	1	1	1	1	1
Taq	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
ADN	1	—	1	—	1	—
Producto de PCR de primer ciclo	—	1	—	1	—	1
DMSO	—	—	2.64	—	2.64	—
BSA	—	—	—	2.64	—	2.64
Volumen total por reacción	53.75	53.75	53.75	53.75	53.75	53.75

## RESULTADOS

Se logró amplificar y secuenciar el *nifH* sólo en *Microbacterium* sp. (cepa Zapt 11). En *Rhizobium* (cepa Zapt1) se observaron bandas múltiples entre los 350 y 500 pb, lo que sugiere que el gene es multicopia y diverso, lo cual no permitió la secuenciación de las bandas (Figura 1).

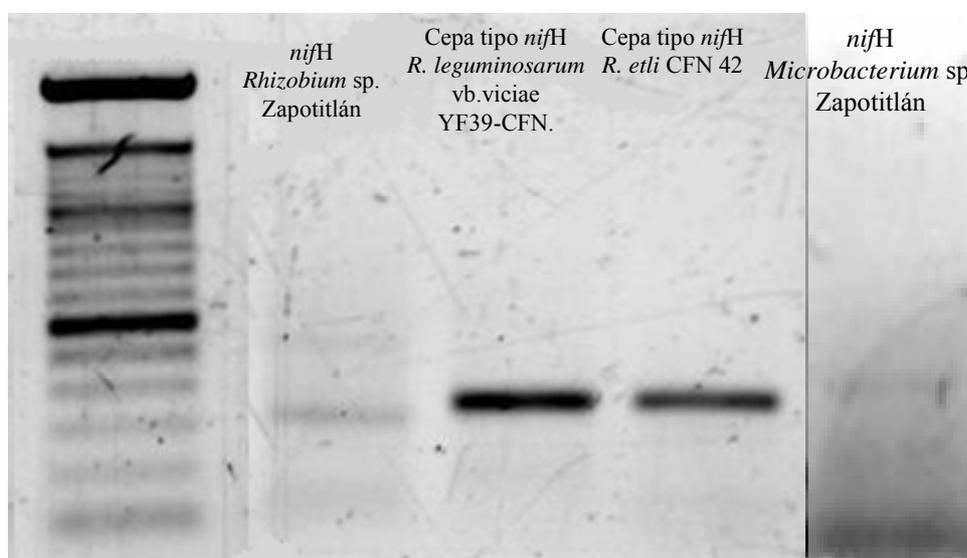


Figura 1. Bandas de la secuencia parcial del gene *nifH* de *Rhizobium* sp. y *Microbacterium* sp. comparadas con las bandas obtenidas de dos cepas tipo.

En *Microbacterium* se obtuvo una banda de 245 pares de bases entre los 300 y 400 pb (Figura 1). Esta secuencia parcial fue depositada en el GenBank con el número de acceso DQ164419. La máxima identidad (similitud) de esta secuencia fue de 89%, la cual se obtuvo con 6 secuencias de *nifH* provenientes de ambientes acuáticos, 4 de las cuales pertenecen a bacterias no cultivables de sedimentos de la zona de raíces de *Spartina patens* (gramínea de estuarios) (Genbank: EF208158, EF208157, EF208160, EF208151); una secuencia a una cepa bacteriana no cultivable del Mar Mediterráneo (EF568533) y la última a otra cepa bacteriana no cultivable de la Bahía Guanabara en Brasil (EF468437) (Figura 2).

El GenBank mostró 32 secuencias parciales del *nifH* con 80% o más de similitud (Figura 2) con la fracción de *nifH* de *Microbacterium*, 29 de las cuales corresponde a bacterias no cultivables, 2 al género *Bacillus* y 1 a *Sulfurospirillum*. El 94% de estas secuencias provienen de microorganismos asociados a ambientes acuáticos, principalmente estuarinos y marinos. El 6% restante son dos secuencias parciales obtenidas de *Bacillus arseniciselenatis* y *B. alkalidiazotrophicus*, que son bacterias alcalófilas, tolerantes a bajas concentraciones de sal,

aisladas de suelos sódicos de Mongolia. Estas dos secuencias tienen 80% de similitud con *nifH* de *Microbacterium*.

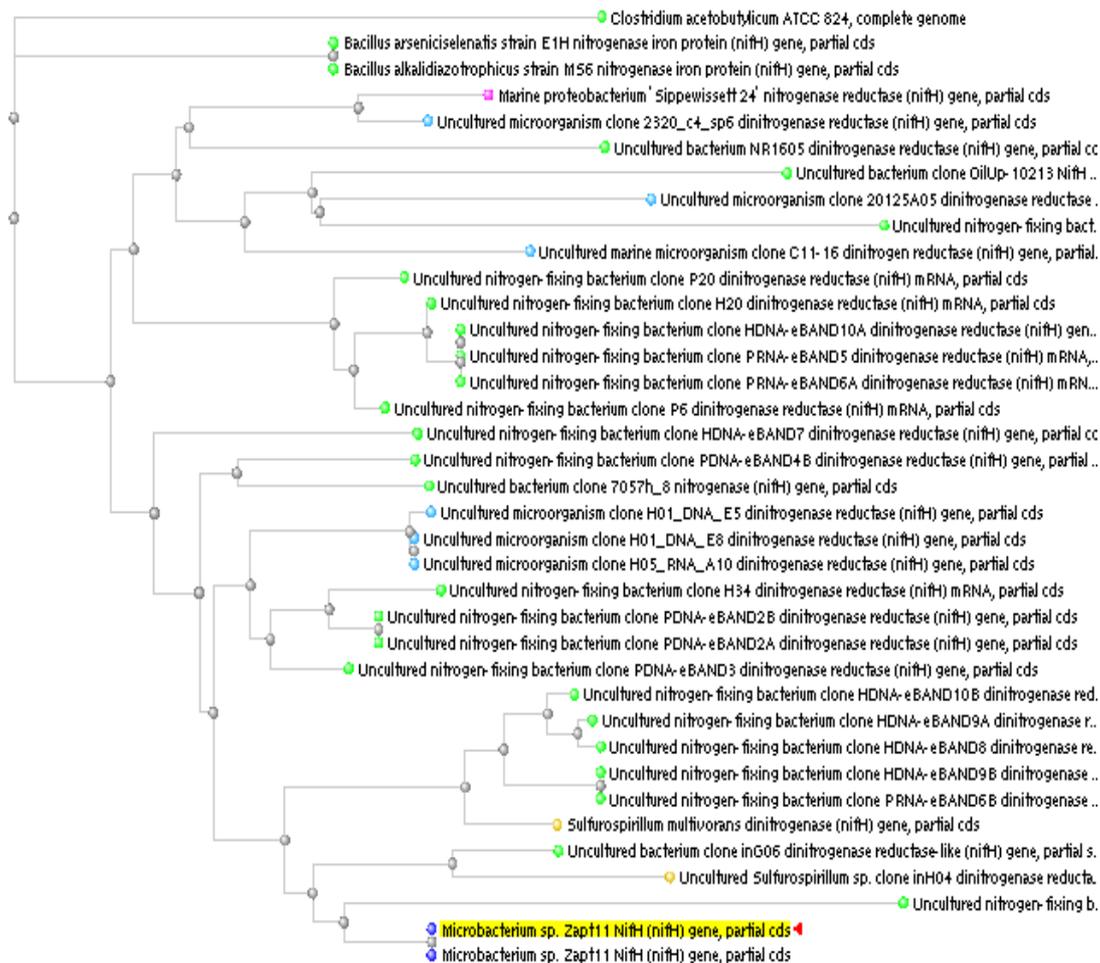


Figura 2. Posición de la secuencia parcial de *nifH* de *Microbacterium sp* (Zapt 11; ZDQ164419) con respecto las depositadas en el GenBank. El código entre paréntesis señala el porcentaje de similitud y el ambiente de procedencia de las secuencias.

Debido a los resultados negativos en la amplificación del gene *nifH* para la mayoría de las cepas, se optó por utilizar compuestos que incrementaran la eficiencia de la reacción de PCR, el DMSO y el BSA. Sin embargo, ni aún con la adición de estos compuestos se logró la amplificación del gene *nifH* de todas las cepas de *Streptomyces*, *Sphingomonas* y *Gordonia*.

## DISCUSIÓN

La actinobacteria *Microbacterium* pertenece a la Familia Microbacteriaceae, y al suborden Microccinea. Las especies de este género son de amplia distribución y se han aislado de

ambientes muy diversos, como el aire (Zlamala et al. 2002), superficie de hojas (Behrendt et al. 2001; Rivas et al. 2004), suelo (Wen-Jun et al. 2005), agua (Matsuyama et al. 1999), aceite (Pattanapitpaisal et al. 2001), productos lácteos (Brennan et al. 2001) animales (Orozco-Medina et al. 2002), y petróleo (Schippers et al. 2005) por lo cual no es extraño que se encuentre en el suelo de la zona semiárida de Zapotitlán; aunque no se había reportado su presencia en este tipo de ecosistemas.

El estudio de las actinobacterias en el ciclo del nitrógeno se ha centrado en el género *Frankia* y en otras especies filamentosas no-simbióticas aisladas de nódulos de *Casuarina equisetifolia* (Valdés et al. 2005).

La capacidad para reducir acetileno de la cepa de *Microbacterium* (cepa Zapt 11) inoculada en el suelo de Zapotitlán se describió anteriormente (capítulo III, Figura 1). Esto, junto con la presencia de una secuencia parcial de 245 pares de bases que coincide con el gene *nifH*, sugieren la participación activa de esta bacteria en la fijación de nitrógeno en vida libre. En las zonas secas, los pulsos de agua producen continuos ciclos de secado y humedecimiento del suelo que controlan indirectamente la tasa de recambio de N y C (Austin et al. 2004), por ello la lisis de las bacterias diazótrofes por efecto de la entrada repentina de agua, libera compuestos nitrogenados provenientes de la propia fijación, que quedan potencialmente disponibles para otros microorganismos y para la vegetación. Al incrementarse el nivel de humedad en el suelo, suben también las poblaciones de protozoarios y nemátodos, que son los principales depredadores de bacterias y de otros microorganismos en el suelo por lo que su consumo y posterior excreción promueve la transferencia de nitrógeno entre la biomasa microbiana y las plantas (Bonkowski, 2003),

El análisis en el GenBak ubicó a la secuencia de *Microbacterium* en un grupo de secuencias de bacterias no cultivables. En el subgrupo del *nifH* de *Microbacterium* se encuentra secuencias con las cuales comparte 86 a 89% de similitud y que provienen de ambientes marinos. Esto podría explicarse, al menos parcialmente, por el menor número de secuencias de suelo que se encuentran en este banco de datos. En una revisión realizada en abril de 2004, en el GenBank estaban depositadas 1113 secuencias del *nifH* de ambientes acuáticos y 475 de ambientes terrestres, muchas de las cuales pertenecen a las  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -Proteobacterias; y muy pocas a organismos anaerobios del suelo (Izquierdo y Nüsslein, 2006).

En el caso de *Rhizobium* se observaron varias bandas de *nifH* lo que sugiere que este gene es multicopia y diverso. En el capítulo III (figura 1) se describió la actividad reductora de

acetileno de *Rhizobium* inoculado en suelo de Zapotitlán por que la presencia de estas bandas y la actividad reductora de acetileno, indican que la bacteria también podría ser fijadora de nitrógeno en simbiosis con las leguminosas de la zona.

El hecho de que en la mayoría de las bacterias no se haya podido amplificar y secuenciar el gene *nifH* es contrastante con los resultados obtenidos con la reducción de acetileno, en la cual la mayoría de las bacterias mostró actividad de la enzima nitrogenasa (capítulo III). Esto puede estar relacionado con la propia dificultad para extraer el ADN y que quizá no haya sido de la calidad suficiente para amplificar el *nifH*, a la inespecificidad de los iniciadores o a que alguna sustancia inhibió la reacción de PCR.

El análisis de las poblaciones bacterianas diazótroficas basadas en cultivo puede tener interpretaciones erróneas debido a que la mayoría son no cultivables, y con excepción de los heterocistos de las cianobacterias (Postgate, 1998), es imposible identificar morfológicamente a las especies fijadoras de nitrógeno. Por ello, el uso de marcadores moleculares como el *nifH*, proporciona evidencias de la fijación biológica de nitrógeno (Izquierdo y Nüsslein, 2006).

Es importante señalar que no todas las bacterias que tienen genes *nif* se expresan en el ambiente y de manera simultánea. Se desconocen muchos de los factores que regulan la expresión de estos genes. Las interacciones entre los microorganismos, el aporte de fotosintetatos de los autotrófos a las bacterias heterótroficas, los factores fisicoquímicos del suelo y ambientales y los ritmos biológicos endógenos podrían estar involucrados (Zehr et al. 2003). Para las bacterias de Zapotitlán con secuencias de *nifH*, es necesario determinar cuales son los factores que podrían estar influyendo en su expresión, teniendo en cuenta que se ha sugerido que existe limitación por N y C fuera del área de influencia de una leguminosa (*Prosopis laevigata*) y por P, dentro del dósel de ésta especie (Perroni-Ventura, et al. 2006); además de la limitación por agua, que es característica de las zonas áridas en general.

La información obtenida con las herramientas moleculares (amplificación de 16S DNA y gene *nifH*), y por cultivos es importante para conocer la diversidad de los fijadores de nitrógeno de vida libre en los suelos de Zapotitlán, siendo éste el primer paso para entender las diferentes vías a través de las cuales entra el nitrógeno a este ecosistemas. En este sentido, las actinobacterias de vida libre, como *Microbacterium*, podrían ser mucho más importantes en el mantenimiento del ciclo del nitrógeno de las zonas áridas que lo que anteriormente se había descrito.

## LITERATURA CITADA

- Austin, A.T., Yahdjian, L., Stark, J.M., Belnap, J., Porporato, A., Norton, U., Ravetta, J. Schaeffer, S.M. 2004. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* 141, 221-235.
- Behrendt, U., Ulrich, A. Schumann, P. 2001. Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* (Funke et al. 1998) as *Microbacterium resistens* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1267-1276.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J.O., Wheeler, D.L., 2004. GenBank: Update. *Nucleic Acids Res.* 32, D23-D26.
- Bonkowski, M. 2004. Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist* 162, 617-631.
- Brennan, N.M., Brown, R., Goodfellow, M., Ward, C., Beresford, T.P., Vancanneyt, M., Cogan T.M., Fox, P.F. 2001. *Microbacterium gubbeenense* sp. nov., from the surface of a smear-ripened cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1969-1976.
- Housman, D.C., Powers, H.H., Collins, A.D., Belnap, J. 2006. Carbon and nitrogen fixation differ between successional stages of biological soil crusts in the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Journal of Arid Environments* 66, 620-634.
- Izquierdo, J.A, Nüsslein, K. 2006. Distribution of extensive nifH gene diversity across physical soil microenvironments. *Microbial Ecology* 51, 441-452.
- Matsuyama, H., Kawasaki, K., Yumoto, I. Shida, O. 1999. *Microbacterium kitamiense* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from the wastewater of a sugar-beet factory. *Int. J. Systematic Bacteriology* 49, 1353-1357.
- Omeregíe, E.O., Crumbliss, L.L., Bebout, B.M., Zehr, J.P. 2004. Comparison of diazotroph community structure in *Lyngbya* sp. and *Microcoleus chthonoplastes* dominated microbial mats from Guerrero Negro, Baja, Mexico *FEMS Microbiology Ecology* 47, 305-308
- Orozco-Medina, C., Maeda-Martínez, A. López-Cortés, A. (2002) Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquaculture* 213, 15-29.
- Pattanapitpaisal, P., Brown, N.L. Macaskie, L.E. 2001. Chromate reduction by *Microbacterium liquefaciens* immobilised in polyvinyl alcohol. *Biotechnology Letters* 23, 61-65.
- Perroni-Ventura, Y., Montaña, C., García-Oliva, F. 2006. Relationship between soil nutrient availability and plant species richness in a tropical semi-arid environment. *Journal of Vegetation Science* 17:719-728.
- Postgate, J. 1998. Nitrogen fixation. Cambridge University Press, 3ra. ed.
- Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., Blankenship, R.E. 2004. The Natural History of Nitrogen Fixation. *Molecular Biology and Evolution* 21:541-554.

- Rivas, R., Trujillo, M.E., Sánchez, M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. Velázquez, E. 2004. *Microbacterium ulmi* sp. nov., a xylanolytic, phosphate-solubilizing bacterium isolated from sawdust of *Ulmus nigra*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 513–517.
- Schippers A., Bosecker, K., Sproer, C. Schumann, P. 2005. *Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 655–660.
- Valdés, M., Pérez, N.O., Estrada-de los Santos, P., Caballero-Mellado, J., Peña-Cabriales, J.J., Normand, P., Hirsch, A.M. 2005. Non-Frankia actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. Applied and Environmental Microbiology 71:460-466.
- Wen-Jun L., Chen, H.C., Kim, C., Park, D.J., Tang, S., Lee, J., Xu, L. Jiang, C.L. 2005. *Microbacterium halotolerans* sp. nov., isolated from a saline soil in the west of China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 67–70.
- Yeager, C.M., Kornosky, J.L., Housman, D.C, Grote, E.E., Belnap, J., Kuske, J. 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. Applied and Environmental Microbiology 70, 973-983.
- Yeager, C.M., Kornosky, J.L., Morgan, R.E., Cain, E.C., Garcia-Pichel, F., Housman, D.C., Belnap, J., Kuske, C.R. 2007. Three distinct clades of cultured heterocystous cyanobacteria constitute the dominant N<sub>2</sub>-fixing members of biological soil crusts of the Colorado Plateau, USA. FEMS Microbiology Ecology 60, 85–97.
- Zehr, J.P., McReynolds, L.A., 1989. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. Applied and Environmental Microbiology, 55, 2522-2526.
- 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, 539-55
- Zlamala, C., Schumann, P., Kampfer, P., Valens, M., Rossello-Mora, R., Lubitz, W., Busse, H. 2002. *Microbacterium aerolatum* sp. nov., isolated from the air in the 'Virgilkapelle' in Vienna. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 1229–1234.

## DISCUSIÓN GENERAL

El tema central de este trabajo fueron las bacterias fijadoras de N de vida libre en las terrazas aluviales del valle semiárido de Zapotitlán Salinas. Debido a que no se contaba con ningún antecedente directo sobre su existencia y menos aún sobre sus características, se plantearon una serie de preguntas y objetivos básicos cuya respuesta permitiría un primer acercamiento al ciclo del N en este ecosistema.

Con base en los resultados obtenidos es posible señalar que en el suelo de las terrazas aluviales del valle de Zapotitlán Salinas existe un grupo funcional de bacterias fijadoras de N de vida libre, que se encuentra ampliamente distribuido en el suelo, aún en las zonas libres de vegetación. Esto se detectó en primera instancia por la ARA en el suelo fresco, misma que fue corroborada en inoculación directa en suelo estéril. Estas bacterias son heterótrofas, cultivables y con capacidad para crecer en medio de cultivo libre de nitrógeno reducido.

No se registraron cambios en el grupo de especies bacterianas cultivables que pudieran asociarse al estado actual de degradación y conservación de las terrazas, ni al microambiente de suelo; pero sí en su número. Es decir, las especies cultivables que conforman al grupo de fijadores de nitrógeno son las mismas en la terraza degradada y conservada, y en la zona de raíces de *P. laevigata*, *P. hollinaus* y suelo libre de vegetación, pero estos ambientes difieren en el número de bacterias que sustentan. Este aspecto podría marcar una diferencia en la tasa en que se dan los ciclos biogeoquímicos en las dos terrazas.

En la terraza conservada la distribución de la vegetación es continua y la hojarasca cae hacia los espacios abiertos, por lo que las bacterias tienen mayor disponibilidad de materia orgánica para su actividad heterótrofa. En la terraza degradada, la distribución fragmentada de la vegetación hace que la materia orgánica se concentre alrededor de las plantas y forme las islas de fertilidad que son aprovechadas por los microorganismos.

El grupo de fijadores de vida libre se encuentra en un ambiente edáfico altamente heterogéneo en donde los elementos que se consideran limitantes para los ecosistemas áridos y semiáridos (N y P) se acumulan en forma de  $\text{NH}_4$  y de  $\text{P-HCO}_3$  durante la temporada seca, lo que permitió que fueran detectados en mayor medida al inicio de la temporada de lluvias. Estos mismos nutrientes tienden a acumularse en la zona de raíces de las plantas, particularmente de *P. laevigata*, que es el microambiente en el que se registró el mayor número de bacterias.

Este grupo de bacterias también se relaciona de diferente manera con la materia orgánica y con la humedad del suelo. Se encuentran en mayor número cuando sube la disponibilidad de

agua y la concentración de materia orgánica. Su número varía dependiendo de la especie vegetal más cercana y disminuye cuando el suelo no está en contacto directo con las plantas.

En las terrazas aluviales de Zapotitlán, este grupo funcional está conformado por Alphaproteobacterias y Actinobacterias filamentosas y no filamentosas. La mayor cantidad de las Alphaproteobacterias contabilizadas en suelo fresco corresponde al género *Rhizobium*, lo que sugiere que la fijación por vía simbiótica con leguminosas podría ser efectiva. Todas las Actinobacterias filamentosas identificadas pertenecen al género *Streptomyces*, y las que no fue posible identificar muestran características similares a éste.

En condiciones experimentales, cada una de las cepas mostró diferente rango de tolerancia a los cambios experimentales en el ambiente edáfico, y en algunas sus poblaciones disminuyeron y no expresaron ARA.

Hasta ahora sólo ha sido posible secuenciar una fracción del gene *nifH* en una sola cepa (*Microbacterium Zapt11*), pero no se descarta que en el resto de las bacterias también se presente, debido a que mostraron ARA en al menos un microambiente cuando fueron crecidas de manera experimental en el suelo estéril.

Los métodos empleados para la extracción de ADN no funcionaron en muchas de las bacterias aisladas y en las que se pudo obtener, se presentaron otros inconvenientes metodológicos que impidieron la amplificación del *nifH*. Se requiere de mayor trabajo molecular con iniciadores y protocolos específicos para este tipo de bacterias cuyos resultados permitan corroborar o en su caso descartar, que estas bacterias realmente son fijadoras de N.

Existen diferentes técnicas de estudio de las comunidades microbianas del suelo y cada una de ellas aporta diferente tipo de información. También cada una de ellas tiene sus propias limitaciones. Entre las principales se encuentran las técnicas de cultivo, moleculares y bioquímicas. En este trabajo se optó por tomar algún elemento de cada una de ellas.

Con las técnicas de cultivo se registraron las características morfológicas del grupo de fijadores de vida libre, heterótrofos. Pero la conformación de este grupo se restringió a las que tenían la capacidad para crecer en el medio de cultivo utilizado. Por ello, si en el suelo la zona hubiese fijadoras de vida libre no cultivables, quedaron fuera del alcance de este trabajo.

Con las técnicas moleculares se extrajo el ADN, y se amplificó y secuenció el 16S DNA de algunas cepas. Esto permitió su identificación hasta el nivel de género. Sin embargo, el desconocimiento de los requerimientos metodológicos para este grupo particular de bacterias; por

ejemplo, la falta de protocolos e iniciadores específicos para la extracción, impidieron la identificación de todas las cepas y la amplificación del gene *nifH*.

Finalmente, de las técnicas que consideran algún aspecto de la bioquímica microbiana, se tomó el registro de la actividad de la enzima nitrogenasa a través de la reducción de acetileno. A pesar de que es una técnica ampliamente utilizada para registrar la fijación de nitrógeno, no existe un protocolo único de aplicación que permita hacer directamente comparables los resultados obtenidos.

Teniendo presente las limitaciones de las técnicas utilizadas, los resultados de esta investigación son los primeros datos básicos relacionados directamente con los microorganismos fijadores de N de este ecosistema semiárido mexicano.

## **CONCLUSIÓN**

En las terrazas de Zapotitlán Salinas, el número de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre está relacionado con las condiciones de conservación y degradación de cada sitio, con la temporalidad y con las especies vegetales más cercanas. Debido a que estas bacterias tienen diferente rango de tolerancia a los cambios ambientales, los eventos naturales o las actividades humanas que conducen finalmente a la degradación del suelo (y que tienen consecuencias aún cuando han dejado de actuar), pueden eliminar o disminuir los procesos que son regulados por ellas cuando se sobrepasa el límite de resiliencia del propio ecosistema. De esta manera, las afectaciones a su número y actividad forman parte de las consecuencias de la degradación, y al mismo tiempo contribuyen a su retroalimentación porque no pueden realizar su actividad fijadora por las limitaciones nutrimentales originadas por la ausencia de la vegetación.

## **PERSPECTIVAS**

Este trabajo se puede considerar como una línea base a partir de la cual se generan nuevas preguntas sobre la participación de las fijadoras de nitrógeno de vida libre en la economía nutrimental de este ecosistema. Desde esta perspectiva, es importante entonces determinar cuál es la diversidad de fijadores de vida libre no cultivables, cuál es la diversidad de genes *nifH*, cuál es la aportación cuantitativa de la fijación por costras microbióticas, por simbiosis, y por fijación en vida libre, cuáles son los factores fisicoquímicos y biológicos que regulan que la fijación de nitrógeno, y cuál es la tasa de pérdida vía extracción de biomasa (vegetal o animal), lixiviación o denitrificación, en que condiciones esta tasa es superior o inferior a la tasa de entrada vía

fijación. Esto permitiría determinar de manera cuantitativa la limitación de nitrógeno en esta zona árida.

De esta manera, quedan expuestas las características básicas de la fijación por vida libre en Zapotitlán, para que puedan ser utilizadas, ampliadas y/o en su caso, ratificadas y rectificadas por investigaciones posteriores que tengan como ejes principales la dinámica microbiana y nutrimental de las terrazas aluviales de Zapotitlán Salinas y su relación con la degradación del suelo.