



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Diversidad y funcionalidad de las comunidades  
diazotróficas de las costras biológicas del suelo en dos  
ecosistemas áridos, Cuatro Ciénegas, Coahuila y el Valle  
de Guadalupe, Baja California, México**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

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

**Alberto Barrón Sandoval**



**DIRECTORA DE TESIS:  
Dra. Ana Elena Escalante Hernández**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F. 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Barrón  
Sandoval  
Alberto  
52 95 18 57  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
409025550

### 2. Datos del tutor

Dra.  
Ana Elena  
Escalante  
Hernández

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de María de Guadalupe  
Souza  
Saldívar

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Eberto  
Novelo  
Maldonado

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Zenón  
Cano  
Santana

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.  
Luciana  
Raggi  
Hoyos

### 7. Datos del trabajo escrito

Diversidad y funcionalidad de las comunidades diazotróficas de las costras biológicas del suelo en dos ecosistemas áridos, Cuatro Ciénegas, Coahuila y el Valle de Guadalupe, Baja California, México.

99 p.  
2015

## **Agradecimientos**

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Ana Elena Escalante Hernández en el Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo del proyecto PAPIIT- IA200814 “Consecuencias funcionales de la composición de procariontes de costras biológicas de suelos áridos: de la diversidad biológica a la función ecosistémica”.

A mis padres, Blanca y Alberto, que sin su guía no sería la persona que soy hoy. Por su incondicional apoyo en mi formación académica, por su incansable ejemplo de vida y por que he aprendido de ustedes muchas mas cosas de las de las que me han enseñado y que aún sigo aprendiendo.

A mi asesora la Dra. Ana E. Escalante ya que sin su guía no sabría todo lo que he aprendido con este trabajo. Por introducirme al tema de ecología microbiana y haberme permitido conocer dos lugares muy bellos de México, Cuatro Ciénegas y el Valle de Guadalupe. Por la gran paciencia que me tuvo durante este proceso, por todos los consejos que me brindó y por haberme enseñado con su ejemplo. Mis agradecimientos son infinitos.

A la Dra. Valeria Souza ya que con su conocimiento me atrajo a la ecología microbiana y por su incansable esfuerzo en la conservación de Cuatro Ciénegas. Por haberme permitido realizar el trabajo de laboratorio en su laboratorio, estos agradecimientos también son para el Dr. Luis E. Eguiarte.

A la Dra. Georgina Hernández del Centro de Ciencias Genómicas por haberme permitido realizar parte de este trabajo en su laboratorio. Al Dr. Alfonso Leija Salas por su incondicional apoyo y asistencia técnica con el ensayo de reducción de acetileno, sin el esa parte da la tesis no se hubiera podido realizar. También por brindarme su amistad y por las charlas que tuvimos en los ratos de trabajo.

A los Doctores Eberto Novelo y Zenón Cano y a la Dra. Luciana Raggi ya que con sus revisiones como sinodales de esta tesis me ayudaron a que este fuera un mejor trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología por haberme hecho tan agradable la estancia ahí. A Doña Silvia por ser tan alegre y de tan buen humor y por su trabajo en mantener en orden ese laboratorio, fue de gran ayuda en este trabajo. A Enrique Scheinvar por su ayuda en la recolección de muestras en Valle de Guadalupe y por haberme enseñado Genética de Poblaciones, este agradecimiento también es para Jaime Gasca. A Laura Espinosa por su asistencia técnica en el

procesamiento y análisis de los T-RFLPs. A Christine Rooks por haberme enseñado la técnica “artesanal” de extracción de DNA.

A todos los amigos que hice durante esta etapa de mi vida ya que de ellos también aprendí muchas cosas tanto académicas como personales. A los integrantes del Hoyo Funky club por haber hecho tan amenos estos años de mi vida. Y por que en cada uno de ustedes he visto un ejemplo a seguir. No los menciono por que se llenarían varias paginas, pero ustedes saben quienes son ☺.

A Olmo López Cappello por su ayuda en la edición de algunas imágenes de este trabajo. A Valeria Thomas por ser una gran amiga y por darme alojamiento durante mis visitas a Cuernavaca.

“En momentos de crisis, sólo la imaginación es mas importante que el conocimiento”  
Albert Einstein

# Índice

Resumen.....	7
Abstract.....	9
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Relevancia ecológica de los microorganismos y paradigmas en ecología microbiana.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Métodos y técnicas en el estudio de la diversidad de comunidades microbianas y sus funciones.....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Fingerprinting.....	14
1.2.1.1 DGGE/TGGE (Denaturing Gradient/ Temperautre Gradient Gel Electrophoresis/ Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante/ de Temperatura).....	16
1.2.1.2 T-RFLP's (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism/ Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos Terminales de Restricción).....	17
1.2.1.3 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis/ Análisis de Restricción del DNA Ribosomal Amplificado).....	17
1.2.2 Secuenciación.....	18
1.2.3 Técnicas para evaluar el funcionamiento de las comunidades microbianas.....	19
<b>1.3 Herramientas analíticas de la ecología en el estudio de la diversidad en comunidades.....</b>	<b>22</b>
1.3.1 Índices y estimadores de diversidad alfa y gama.....	23
1.3.2 Medidas de similitud o estimados de diversidad beta.....	25
1.3.3 Análisis de agrupamiento.....	25
1.3.4 Análisis de ordenamiento.....	25
<b>1.4 Suelos.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5 Los ecosistemas áridos.....</b>	<b>27</b>
<b>1.6 Las costras biológicas del suelo.....</b>	<b>30</b>
<b>1.7 Fijación de nitrógeno.....</b>	<b>36</b>
<b>1.8 Justificación.....</b>	<b>39</b>
<b>1.9 Objetivos e Hipótesis.....</b>	<b>41</b>
<b>II. MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>2.1 Sitio de estudio.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2 Muestreo.....</b>	<b>43</b>
<b>2.3 Extracción de DNA.....</b>	<b>44</b>
<b>2.4 Análisis de la diversidad del gen <i>nifH</i>.....</b>	<b>45</b>
2.4.1 Amplificación (PCR).....	45
2.4.2 Restricción enzimática de los amplicones de <i>nifH</i> .....	47
2.4.3 Análisis de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLPs).....	47
<b>2.5 Ensayo de reducción de acetileno para evaluar la actividad catalítica de la nitrogenasa.....</b>	<b>48</b>
2.5.1 Cuantificación de biomasa por el método de cenizas.....	50
<b>2.6 Análisis de la diversidad de OTUs de <i>nifH</i>.....</b>	<b>51</b>
2.6.1 Índices de diversidad.....	51
2.6.2 Curva de rarefacción.....	53
2.6.3 Análisis de similitud en composición.....	53
<b>2.7 Correlación entre diferencias en composición y características fenotípicas...</b>	<b>54</b>

<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>3.1 Análisis de diversidad.....</b>	<b>56</b>
3.1.1 Riqueza y diversidad alfa.....	56
3.1.2 Riqueza y diversidad beta.....	56
<b>3.2 Análisis de similitud en composición y estructura de la comunidad.....</b>	<b>58</b>
<b>3.3 Ensayo de reducción de acetileno.....</b>	<b>61</b>
<b>3.4 Análisis de correlación entre composición y estructura de la comunidad y actividad catalítica de la nitrogenasa.....</b>	<b>61</b>
<b>IV. DISCUSIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Análisis de diversidad.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2 Análisis de composición y estructura de la comunidad diazotrófica.....</b>	<b>68</b>
<b>4.3 Evaluación de la actividad metabólica de la comunidad diazotrófica de costras biológicas.....</b>	<b>72</b>
<b>V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>77</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>79</b>
<b>Apéndices.....</b>	<b>94</b>



Barrón, A. 2015. Diversidad y funcionalidad de las comunidades diazotróficas de las costras biológicas del suelo en dos ecosistemas áridos, Cuatro Ciénegas, Coahuila y el Valle de Guadalupe, Baja California, México. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 99 pp.

## Resumen

Los microorganismos son fundamentales en el funcionamiento de los ecosistemas debido a que están involucrados en procesos como los ciclos biogeoquímicos y la descomposición de materia orgánica. A pesar de esto, aún no se tiene conocimiento sobre cuáles son los factores que influyen en la distribución de los microorganismos y cómo afecta la composición específica de una comunidad microbiana en los procesos ecosistémicos que participa. En ese sentido, este trabajo busca evaluar la distribución de organismos diazotrófos en una escala local e investigar la relación entre la composición y estructura de la comunidad y las funciones ecosistémicas que llevan a cabo. Se utilizó como modelo de estudio la comunidad diazotrófica de costras biológicas del suelo de dos ecosistemas áridos en México: Cuatro Ciénegas, Coahuila (CC) y el Valle de Guadalupe, Baja California (VG). Se generaron perfiles de T-RFLPs del gen *nifH* para evaluar la composición y estructura de la comunidad. De igual forma, se realizó el ensayo de reducción de acetileno para evaluar la actividad catalítica de la nitrogenasa como una aproximación para medir la capacidad de la comunidad para la fijación de nitrógeno. Se encontraron 23 OTUs de los cuales 14 están presentes en CC y 15 en VG compartiendo seis en ambos sitios. La diversidad de estas comunidades no es diferente entre los dos sitios. Se observan patrones de distribución en 64 m<sup>2</sup> similares a los observados en macroorganismos en escalas regionales (VG:  $z = 0.28$ ; CC:  $z = 0.23$ ). Los análisis de agrupamiento muestran una mayor similitud entre las muestras de cada sitio que entre sitios y estas diferencias podrían estar explicadas por posibles adaptaciones a los regímenes climáticos en los sitios de estudio. El ensayo de reducción de

acetileno muestra que las comunidades de CC tienen una mayor actividad catalítica de la nitrogenasa que las de VG bajo condiciones experimentales ( $t = 3.04$ , g.l. = 43,  $p < 0.005$ ). No obstante, no se encontró una relación entre la composición específica de las muestras y la actividad catalítica de la nitrogenasa ( $r = -0.0048$ ;  $P = 0.49$ ) a pesar de haber diferencias entre la composición de la comunidad de ambos sitios y las diferencias en la actividad catalítica de la nitrogenasa. Estos resultados sugieren una influencia de las condiciones climáticas en la estructuración de estas comunidades, no obstante datos obtenidos mediante otras aproximaciones son necesarios para apoyar esta hipótesis.

Barrón, A. 2015. Diversity and functionality of the diazotrophic communities of the biological soil crusts in two arid ecosystems, Cuatro Ciénegas, Coahuila and the Valley of Guadalupe, Baja California, México. Undergraduate Thesis. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico city. 99 pp.

## **Abstract**

Microorganisms are essential for the functioning of ecosystems because they are involved in processes such as biogeochemical cycles and decomposition of organic matter. However, despite the importance of microorganisms for ecosystems, there is a lack of knowledge about which are the factors driving the distribution of microorganisms and how the specific composition of a microbial community affects the ecosystem processes in which they are involved. This work aims to assess the distribution of diazotrophs on a local scale and investigate the relationship between diversity and ecosystemic function. Using as a model of study the diazotrophic community of the biological soil crusts from two arid ecosystems in Mexico, Cuatro Cienegas, Coahuila (CC) and the Valle de Guadalupe, Baja California (VG). *nifH* gene T-RFLP profiles were generated to assess the composition and structure of the community. Additionally, the acetylene reduction assay was performed to assess the catalytic activity of nitrogenase as a proxy for measuring community's capacity for nitrogen fixation. 23 OTUs were found of which 14 are present in CC and 15 in VG sharing six OTUs between sites. Diversity analyzes show no differences between diversity of these communities. Distribution patterns observed in 64 m<sup>2</sup> are similar to those observed in regional scales for macroorganisms (VG:  $z = 0.28$ ; CC:  $z = 0.23$ ). Cluster analysis shown a greater similarity between samples from each site than between sites and these differences could be explained by possible adaptations to climate regimes in the study sites. The acetylene reduction assay shows that CC communities have higher nitrogenase catalytic activity than the VG communities under experimental conditions ( $t = 3.04$ ,  $df = 43$ ,  $p < 0.005$ ).

Nevertheless, no correlation was found between the specific composition of each sample and nitrogenase catalytic activity ( $r = -0.0048$ ;  $P = 0.49$ ) despite differences in community composition between sites and nitrogenase catalytic activity between sites. These results suggest the influence of climatic conditions on the structure of the communities, however data obtained from different approaches is necessary to support this.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Relevancia ecológica de los microorganismos y paradigmas en ecología microbiana

Los microorganismos, y específicamente los procariontes, llevan a cabo funciones indispensables para sostener la vida en la Tierra. Forman parte fundamental de los ciclos biogeoquímicos ya que poseen la mayor parte de la diversidad genética responsable de las proteínas y enzimas que hacen posible la transformación química de los elementos con los cuales se construyen las macromoléculas biológicas (Falkowski et al. 2008). Además, participan en la descomposición de materia orgánica y mineralización de nutrientes, lo cual repercute en las comunidades vegetales que se desarrollan sobre el suelo (Wardle et al. 2004). En este sentido, la ecología microbiana busca explicar los factores que moldean la distribución actual de los microorganismos y las implicaciones que tiene esta distribución en las funciones ecosistémicas que llevan a cabo.

Las características intrínsecas de los microorganismos dificultan su estudio en ambientes naturales. En primera instancia, la inmensa diversidad procariota resulta un reto para cualquier investigación ecológica, pues se estima que la Tierra alberga  $>10^{30}$  células procariotas, donde en 1 g de suelo pueden haber aproximadamente  $10^9$  células de microorganismos pertenecientes probablemente a cientos o incluso miles de especies (Torsvik et al. 2002). Asimismo, los procariontes constituyen aproximadamente el 60% de la biomasa del planeta (Whitman et al. 1998); por lo que se ha argumentado que son prácticamente ubicuos (Darling et al. 2000, Finlay 2002). Por otro lado, la definición de especies procariotas aún es un tema altamente discutido en la microbiología (Fisher et al. 2006), lo cual dificulta hacer estimaciones precisas sobre la diversidad de estos organismos en sus hábitats naturales. Finalmente, también existen limitaciones metodológicas que hacen que el estudio de los

microorganismos sea más complicado en comparación con los macroorganismos. La principal limitante es el bajo porcentaje de la diversidad procarionte que se puede recuperar con técnicas de cultivo tradicionales, pues se estima que menos del 1% de la diversidad total de microorganismos de muestras ambientales puede ser cultivable mediante estas técnicas (Vartoukian et al. 2010, Pham y Kim 2012). Estas características han llevado a los ecólogos a hacer supuestos en los que se omiten los mecanismos biológicos a través de los cuales se llevan a cabo procesos ecosistémicos en los que los microorganismos están involucrados (Allison y Martiny 2008, Bradford y Fierer 2012).

Debido a la enorme diversidad procarionte, la adaptabilidad a distintas condiciones ambientales y la aparente ubiquidad (Torsvik et al. 2002, Meyer et al. 2004, Finlay 2002) en ecología microbiana se considera que las comunidades microbianas funcionarán de la misma manera mientras las condiciones ambientales sean las mismas, asumiendo que el ambiente es el principal factor que regula los procesos ecosistémicos que dichas comunidades llevan a cabo (Strickland et al. 2009). Esta hipótesis sobre el funcionamiento de las comunidades microbianas está basada en una serie de supuestos que se mencionan a continuación. (1) La redundancia funcional que es definida como la capacidad que tienen dos taxa distintos para llevar a cabo la misma función (e. g., fijación de nitrógeno) a la misma tasa bajo las mismas condiciones ambientales (Allison y Martiny 2008). (2) La similitud funcional se refiere a la habilidad que tienen dos comunidades microbianas para llevar a cabo el mismo proceso con tasas similares, independientemente de las diferencias en composición (Allison y Martiny 2008). (3) La equivalencia funcional se define como la habilidad que tienen dos comunidades microbianas para llevar a cabo el mismo proceso con tasas similares, independientemente de las diferencias en composición, fisiología o interacciones entre los organismos de la comunidad (Strickland et al. 2009).

La predominancia de este paradigma en la ecología microbiana, en el cual se asume que las condiciones ambientales regulan la diversidad y el funcionamiento de una comunidad, puede ser bien representada por los modelos desarrollados en ecología de ecosistemas, los cuales en su mayoría son modelos empíricos (también llamados modelos correlativos o estadísticos). Estos modelos buscan predecir el resultado de funciones ecosistémicas que ocurren en el suelo como el flujo de energía y los ciclos biogeoquímicos en función de variables ambientales (e. g., temperatura y disponibilidad hídrica). Estos modelos utilizan observaciones de distintas variables como la temperatura (variable regulatoria) y la tasa de respiración (variable de respuesta) para obtener relaciones estadísticas entre ellas, con las cuales se elaboran modelos predictivos (Bradford y Fierer 2012). Se asume que estas relaciones se mantienen a través de distintos ambientes con condiciones ambientales distintas y a lo largo del tiempo. Y también se asume que la diversidad y abundancia de microorganismos que llevan a cabo estas funciones no influyen (o influyen muy poco) en estos procesos, relegando a la diversidad que lleva a cabo estos procesos simplemente como el medio a través de los cuales suceden estos procesos sin buscar entender la importancia que tiene la composición taxonómica e interacciones bióticas de las comunidades de microorganismos en estos procesos (Allison y Martiny 2008, Bradford y Fierer 2012).

No obstante, trabajos recientes han demostrado que, en algunos casos (Schimel y Gullledge 1998, Bell et al. 2005, Fierer et al. 2007, Reed y Martiny 2007, Strickland et al. 2009, Reed y Martiny 2013), la composición específica de una comunidad influye en la función ecosistémica que lleva a cabo. Estos resultados dan pauta a la formulación de preguntas que relacionen la diversidad microbiana con los procesos ecosistémicos que llevan a cabo, como: (1) cuáles son los factores relevantes, tanto bióticos como abióticos, que influyen en la diversidad de una comunidad; (2) cuál es la respuesta funcional que pueda tener ante disturbios ambientales; (3) cuál es la importancia de la diversidad de un grupo funcional. Estas preguntas se contraponen a las ideas de redundancia

funcional y similitud funcional bajo las cuales se han modelado los procesos ecosistémicos en los cuales los microorganismos están involucrados.

Sin embargo, para incorporar datos sobre diversidad microbiana en modelos de funciones ecosistémicas es necesario obtener información enfocada en describir cuantitativamente la diversidad microbiana junto con sus capacidades fisiológicas y las variables ambientales asociadas (Prosser et al. 2007, Allison y Martiny 2008). Estos datos tendrían el potencial de mejorar el entendimiento sobre las funciones que las comunidades realizan y ,de esta forma, permitir hacer predicciones más certeras sobre estos procesos o mejorar el funcionamiento de estos para aplicaciones de interés socioeconómico (Prosser et al. 2007). El entendimiento de la relación entre la diversidad y el funcionamiento ecosistémico de las comunidades tiene aplicaciones en el manejo, conservación y restauración de los ecosistemas, y más aún en escenarios de cambio climático (Prosser et al. 2007, Belnap 2013).

## **1.2 Métodos y técnicas en el estudio de la diversidad de comunidades microbianas y sus funciones**

Desde hace un par de décadas se han desarrollado diversas técnicas de biología molecular que han permitido superar las deficiencias de los métodos de cultivo en el estudio de las comunidades microbianas y de manera que se puedan abordar preguntas sobre los factores que influyen en la distribución y abundancia de distintos taxa procariotas en distintos ambientes, así como la relación entre esta diversidad y las funciones ecosistémicas que realizan (Fierer et al. 2007, Yeager et al. 2004, Martiny et al. 2006; Hanson et al. 2012, Keiser et al. 2011). Estas innovaciones técnicas, llamadas independientes de cultivo, utilizan principalmente a los ácidos nucleicos como el objeto de estudio de la diversidad microbiana. A continuación se revisan algunas técnicas moleculares que se han desarrollado para el estudio de las comunidades microbianas.

*1.2.1 Fingerprinting.* Las técnicas enfocadas en describir patrones de la diversidad de la comunidad basados en la diversidad de las secuencias de



genes marcadores de diversidad filogenética se conocen como “fingerprinting” o huella de DNA. Con éstas se analiza la variación en las secuencias de DNA presentes en la comunidad mediante la generación de fragmentos de esta molécula de regiones particulares del genoma (marcadores genéticos) mediante las diferencias electroforéticas de las secuencias o restricciones enzimáticas que resultan en fragmentos de distintos tamaños, los cuales están relacionados con la composición específica de una comunidad. De esta forma distintos patrones de los fragmentos generados representan diferencias en la composición de especies o unidades taxonómicas operacionales (UTOs u OTUs, por sus siglas en inglés) de la comunidad ( Liu et al. 1997, Marsh 1999, Tiedje et al. 1999, Dunbar et al. 2000). Dado que con la mayoría de estas técnicas no se puede conocer la secuencia de los fragmentos obtenidos, es imposible asignarles una identidad específica. El uso de estas técnicas tiene como objetivo describir patrones amplios de la diversidad que contiene la comunidad completa a expensas de la resolución que puedan tener (Dunbar et al. 2001). No obstante, esta aproximación es muy utilizada para analizar distintas comunidades de una manera rápida y con bajo costo económico, ya que permiten comparar la composición y diversidad de muchas muestras simultáneamente (Dunbar et al. 2001). Aunque es posible hacer análisis de la diversidad de una comunidad utilizando el DNA total de la comunidad, se han popularizado las técnicas que utilizan genes codificantes para determinar secuencias o patrones de dichos genes (Hill et al. 2000). Esta aproximación resulta útil por varias razones: (1) la mayoría de los genes pueden ser amplificados fácilmente mediante PCR.; (2) algunos genes tienen regiones altamente conservadas y otras regiones con mayor variación debido a las tasas evolutivas diferentes en cada región, por lo que es posible establecer relaciones filogenéticas de las secuencias (Hill et al. 2000); (3) algunos genes están ampliamente distribuidos dentro de los procariontes y otros organismos, tal como el gen que codifica la subunidad pequeña ribosomal (SSU, 16S para los procariontes (Woese et al. 1990). Una vez amplificado el gen en cuestión por PCR es posible analizar su diversidad

dentro de la comunidad mediante diferentes estrategias que se describen a continuación.

1.2.1.1 DGGE/TGGE/ EGGDT (Denaturing Gradient/ Temperature Gradient Gel Electrophoresis/ Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante/ de temperatura). Esta técnica permite la separación de mezclas de productos de PCR que son idénticos en tamaño pero difieren en secuencia. El poder de separación de esta técnica yace en el comportamiento desnaturalizante de la molécula de doble cadena de DNA. Conforme las moléculas de DNA corren en el gel en un gradiente creciente de temperatura, las moléculas de DNA permanecen en su estructura de doble cadena hasta que alcanzan la concentración o temperatura de desnaturalización, lo que reduce su movilidad en el gel (Fig. 1.1). Debido a que la temperatura de desnaturalización esta principalmente dictada por la secuencia de nucleótidos, la separación resolverá bandas individuales, cada una correspondiendo a una secuencia única (Hill et al. 2000). Una limitación de sobre esta técnica es que diferentes secuencias pueden generar una misma banda, o incluso que diferentes bandas representen una de la misma especie debido a que el número de operones de rRNA puede variar entre grupos taxonómicos (Binder y Liu 1998) y por lo tanto pueden haber diferentes secuencias de un gen en células de la misma especie (Hill et al. 2000).

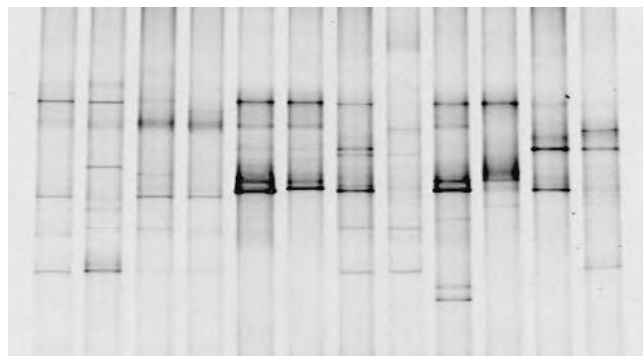


Fig. 1.1. Fotografía de un gel de DGGE en el que se puede observar los patrones de bandas que se generan a partir del amplicón de un gen. Cada carril representa a una comunidad.

1.2.1.2 T-RFLP/PLFTR (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism/ Polimorfismo de la longitud de fragmentos terminales de restricción). Esta técnica se basa en la variación en la posición de sitios de restricción terminales que hay entre las secuencias de un fragmento de ADN en los miembros una comunidad (Dunbar et al. 2001). Para esto, se generan amplicones de una secuencia específica con oligonucleótidos marcados fluorescentemente y después los amplicones son cortados con enzimas de restricción. Esto resulta en fragmentos terminales de distintos tamaños que son separados por electroforesis capilar y analizados en un secuenciador automático para determinar el tamaño de cada fragmento, que será considerado como un OTU. De esta forma, cada comunidad es representada por un perfil de restricción específico y relacionado con la diversidad de secuencias presentes en una muestra, permitiendo así comparar distintas muestras (Liu et al. 1997; Marsh 1999) (Fig. 1.2). Este método puede ser utilizado para identificar comunidades con diferente composición, para comparar la riqueza relativa de filotipos y la estructura de la comunidad, y para la identificación de organismos específicos en una comunidad a partir de la clonación y secuenciación de fragmentos (Dunbar et al. 2001). Sin embargo, es un método de baja resolución, ya que se puede subestimar la riqueza de una comunidad debido a que existe la posibilidad de que diferentes secuencias estén representadas por un mismo fragmento (Dunbar et al. 2001).

1.2.1.3 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis/ Análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado). Esta técnica consiste en amplificar por PCR el gen 16S rARN de toda la comunidad, aislar una por una las distintas copias que se encuentran en la mezcla y, posteriormente, digerir enzimáticamente cada una de las copias, no obstante también se puede digerir la muestra total sin separar cada una de las copias (Martin-Laurent et al. 2001).

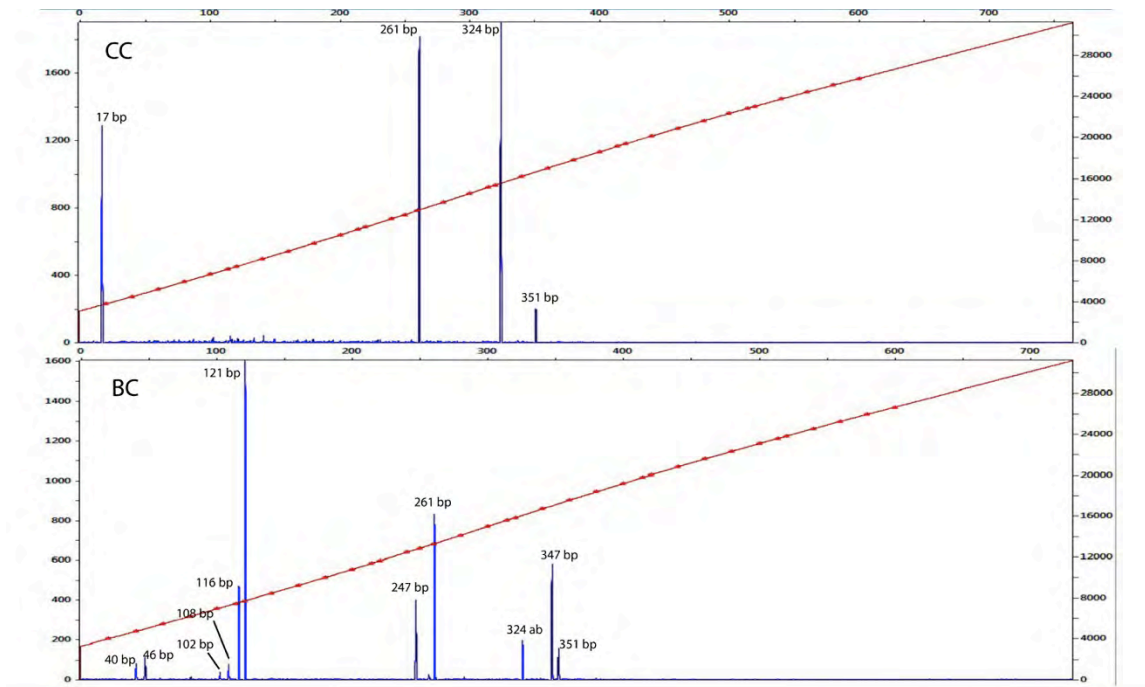


Fig. 1.2. Patrones de perfiles de T-RFLPs generados para este estudio. En el eje de X se muestran los pares de bases del tamaño de los fragmentos y en el eje de Y están la unidades de fluorescencia reportadas por el secuenciador.

La manera más fácil de separar las distintas copias del gen 16S rRNA es mediante la clonación de los fragmentos en un vector de clonación y, mediante una transformación bacteriana, incorporar el vector en células competentes para su posterior extracción. Una vez obtenido cada gen individual, se somete a una digestión enzimática que resulta en un patrón de bandas en electroforesis en geles de agarosa. Si la digestión se realizó sin separar las distintas copias del gen en cuestión, los patrones resultantes permiten identificar comunidades distintas. Si esta técnica se realiza con las copias separadas del gen, el análisis permite hacer estimaciones de diversidad y/o elegir representantes de los patrones distintos para obtener las secuencias e identificar los grupos taxonómicos específicos a los que pertenecen o con los que se relacionan (Martin-Laurent et al. 2001).

**1.2.2 Secuenciación.** Si es requerido, es posible caracterizar las secuencias individuales de una región específica del genoma de los organismos presentes

en una comunidad microbiana. La secuenciación de muestras ambientales permite mejores estimados de diversidad en comunidades complejas a diferencia de las subestimaciones que pueden surgir al utilizar alguna de las técnicas de "fingerprinting" para obtener estimados de diversidad (Dunbar et al. 2001). Una limitante para el uso de secuencias en el estudio de las comunidades microbianas es que debido a la gran diversidad que pueden llegar a presentar, hacer un muestreo exhaustivo para recuperar la mayor diversidad posible puede resultar muy costoso en términos económicos y de tiempo debido a los procedimientos técnicos que conlleva elaborar una genoteca (librería de clones), ya que, para esto, es necesario separar individualmente cada una de las copias generadas a partir de PCR para la secuencia en cuestión e insertar cada una de estas copias en un vector de clonación que será utilizado para realizar una transformación bacteriana y, posteriormente, llevar a cabo el crecimiento, selección y extracción del plásmido de las colonias seleccionadas (Sambrook et al. 1989). Todos estos pasos requieren una considerable cantidad de tiempo y recursos como para realizarlos a una escala que permita obtener miles de secuencias necesarias para caracterizar de manera menos sesgada una comunidad microbiana. Sin embargo, en la última década esta limitante ha sido superada gracias al desarrollo de distintas tecnologías de secuenciación masiva, las cuales han permitido reducir el tiempo y costos en la obtención de un considerable número de secuencias (Metzker 2010). Estas tecnologías han revolucionado la forma en que se aborda el estudio de las comunidades microbianas ya que permiten realizar un muestreo exhaustivo de la diversidad de la comunidad y detectar aquellas taxa presentes que tienen poca abundancia, lo cual permite una comparación significativa de la diversidad de distintas muestras (Sogin et al. 2006).

### *1.2.3 Técnicas para evaluar el funcionamiento de las comunidades microbianas.*

La diversidad funcional de las comunidades microbianas en ecosistemas terrestres incluye actividades tales como la descomposición de la materia orgánica, la respiración y la transformación de nutrientes, entre otras. Dentro de

los indicadores de estas funciones se encuentran el patrón de uso de fuentes de carbono y las medidas de actividad enzimática (Kandeler 2007).

Con respecto al uso de fuentes de carbono, se han desarrollado técnicas enfocadas a describir tanto cualitativamente como cuantitativamente estas actividades. Por ejemplo, la técnica de sondas de isótopos estables (SIE) (Fig. 1.3) utiliza isótopos estables (e.g.  $C^{13}$ ) con los que se marcan sustratos específicos los cuales se proveen a la comunidad bacteriana, de esta forma, los organismos metabólicamente activos que utilizan este sustrato lo incorporan a su biomasa en forma de DNA, RNA, fosfolípidos y proteínas entre otros. Después, las biomoléculas (DNA o RNA) marcadas son aisladas por distintos métodos bioquímicos y la identidad filogenética de los microorganismos que metabolizan este sustrato es establecida mediante técnicas moleculares (Wellington et al. 2003).

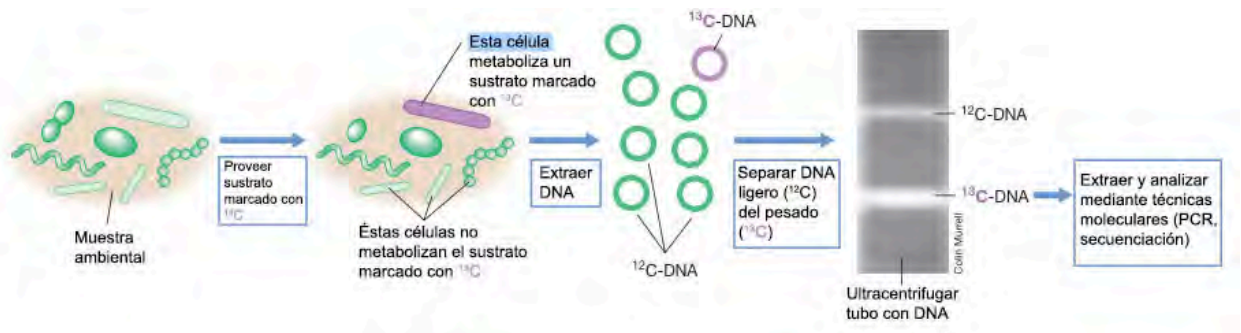


Fig 1.3. Diagrama que muestra la metodología del sondeo con isótopos estables. Modificado de Madigan et al. (2012)

Uno de los métodos más utilizados en el análisis de comunidades microbianas es el perfil fisiológico a nivel de comunidad. Esta técnica utiliza los métodos de taxonomía bacteriana en los cuales las especies bacterianas son identificadas basándose en el uso de diferentes fuentes de carbono. Esta técnica ha sido facilitada mediante el uso de un sistema que se maneja comercialmente conocido como BIOLOG. Este sistema está basado en el uso de una gama de 95 fuentes de carbono que han sido previamente descritas (Garland y Mills 1991). El uso de cada sustrato es detectado por la reducción de un colorante de tetraxolio, el cual resulta en un cambio de color que puede ser cuantificado

espectrofotométricamente (Fig. 1.4) El patrón de sustratos que son oxidados puede ser comparado entre distintas muestras de suelo como indicador de las diferencias en en las funciones fisiológicas de las comunidades microbianas (Hill et al. 2000).

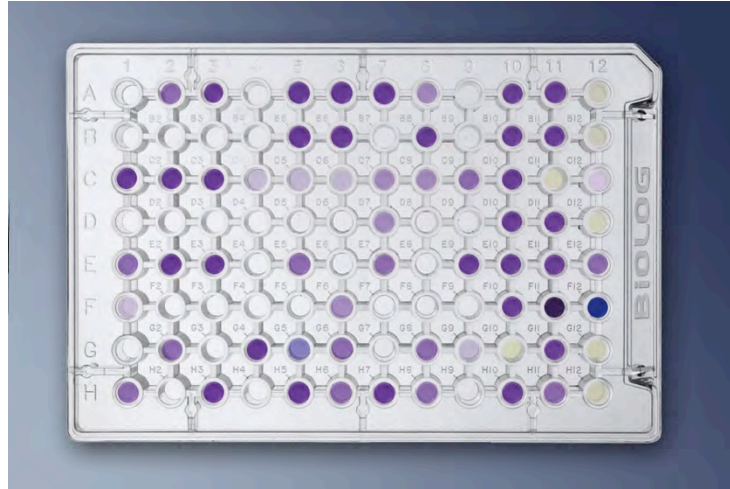


Fig. 1.4. Placa utilizada para realizar el perfil fisiológico a nivel de comunidad. Cada uno de los pozos contiene un sustrato diferente, en los que se coloca una muestra de agua o suspensión (suelo, sedimento, etc.). La placa es incubada por determinado tiempo y analizada.

Por otro lado, para medir procesos fisiológicos realizados por la comunidad completa, tales como la tasa de respiración o la producción de gases traza, se ha utilizado ampliamente la cromatografía de gases. Las mediciones pueden ser realizadas tanto en laboratorio como *in situ* en cámaras herméticas en las cuales son colocadas las muestras que contengan la comunidad completa. Con esta técnica se puede cuantificar la emisión de gases como dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ) u óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) muestreando la cabeza de aire de la cámara en la que esta contenida la muestra (Kandeler 2007). Una metodología similar se ha desarrollado para medir la fijación de nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) aprovechando la inespecificidad que presenta la nitrogenasa para reducir otras moléculas además del nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) (Hardy et al.1973) (Fig. 1.5)

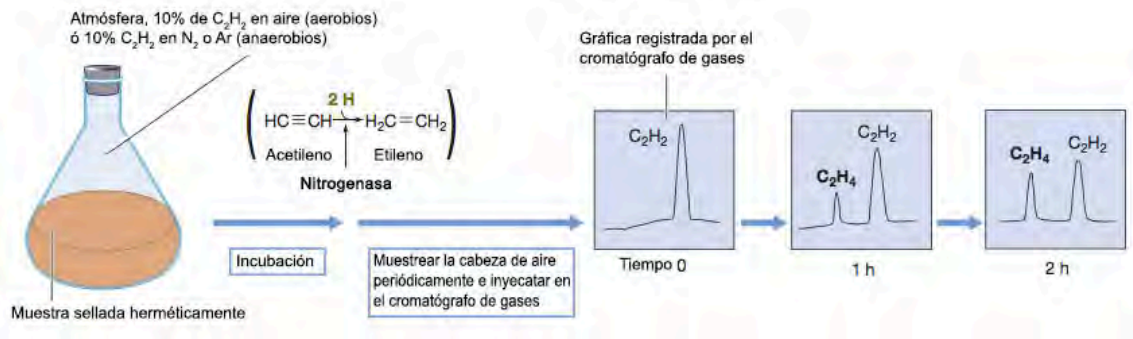


Fig. 1.5. Diagrama que muestra la metodología del ensayo de reducción de acetileno en la cual se utiliza cromatografía de gases. Modificado de Madigan et al. (2012)

Finalmente, el método más común para medir la actividad de enzimas extracelulares en el suelo involucra añadir un substrato sintético ligado a un fluoróforo o a un cromóforo en una mezcla diluida y homogenizada del suelo. Se mide el incremento en fluorescencia o absorbancia en un determinado tiempo utilizando un espectrofotómetro (Saiya-Cork et al. 2002). Mediante este método es posible evaluar la actividad de enzimas como la celulasa,  $\beta$ -fructofuranosidasa,  $\beta$ -glucosidasa, proteinasas y ureasas, entre otras, las cuales están involucradas en la descomposición de materia orgánica. No obstante, la principal limitante de este método es que mide el potencial de actividad enzimática, el cual puede no ser un buen indicador de la actividad real *in situ* (Wallenstein y Weintraub 2008).

### 1. 3 Herramientas analíticas de la ecología en el estudio de la diversidad en comunidades.

El conjunto de especies que coexisten en el tiempo y el espacio son definidos como una comunidad biológica (Begon et al. 2006). El concepto de diversidad de especies es el principal atributo de una comunidad que se utiliza para describirla. Para comparar distintas comunidades, los ecólogos han desglosado la diversidad en tres componentes (Whittaker 1970): diversidad alfa, beta y gama. La diversidad alfa ( $\alpha$ ) es la diversidad local, la diversidad que se encuentra en



una muestra o en un solo sitio de muestreo. La diversidad gama ( $\gamma$ ) es la diversidad total en un conjunto de muestras o sitios de muestreo, también es llamada diversidad regional. La diversidad beta ( $\beta$ ) es una medida de qué tan diferentes son las comunidades (o muestras de una comunidad) en distintos sitios, o en un gradiente espacial.

De igual forma, el concepto de diversidad de especies involucra dos conceptos distintos, la riqueza de especies y la equidad. Riqueza de especies se define como el número de especies distintas (que también pueden ser UTOs, o cualquier otra definición taxonómica válida para el objetivo del estudio) presentes en una comunidad (Begon et al. 2006). Equidad es una medida de la similitud de las abundancias de cada una de estas especies (Begon et al. 2006). Juntas, estas dos medidas de la diversidad de una comunidad forman el concepto de estructura de una comunidad; es decir, se toma en cuenta la composición de especies junto con la abundancia relativa de cada una de ellas (Begon et al. 2006).

Una manera de caracterizar a las comunidades es la descripción de las especies que contiene, sin embargo, en la práctica ésta es una tarea ardua, en parte debido a problemas taxonómicos, pero principalmente porque generalmente sólo se puede contar una submuestra de la comunidad total, por lo que el número de especies que se puedan registrar dependerá del esfuerzo de muestreo (Krebs 1999). Esto genera que las especies más comunes (i.e., abundantes) sean representadas con pocas muestras mientras que las especies raras (i.e., poco abundantes) necesitarán más muestras para que sean representadas. Esto representa un problema cuando se quiere comparar cuantitativamente la diversidad de distintas comunidades. Para esto se han desarrollado distintas metodologías que permiten analizar y comparar estadísticamente distintas comunidades incorporando datos sobre la riqueza de especies y su abundancia.

*1.3.1 Índices y estimadores de diversidad alfa y gama.* Uno de los métodos más utilizados para cuantificar la diversidad de las comunidades son los índices (o

estimadores) no paramétricos. Su nombre se debe a que estos no requieren supuestos de cuál es la distribución estadística de las abundancias de las especies en una comunidad (Magurran 1988). Dentro de éstos se encuentra el índice de Simpson ( $D$ ), el cual se pondera a partir de la abundancia de las especies más comunes más que a partir de una medida de la riqueza de especies. Este índice está fuertemente influenciado por las especies más comunes mientras que las especies raras influyen poco en el estimado de éste. Por otro lado, las medidas de diversidad más ampliamente usadas son los índices basados en la teoría de la información. Éstos se basan en la lógica de que la diversidad, o la información, en un sistema natural puede ser medido de un modo similar a la información contenida en un código o mensaje. El más utilizado de estos índices es el de Shannon-Wiener ( $H'$ ), que considera que los individuos se muestrean al azar a partir de una población infinita y asume que todas las especies están representadas en la muestra (Magurran 1988).

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las comunidades que ocurren naturalmente están dominadas por pocas especies con gran abundancia mientras que la mayoría de las especies muestran una abundancia media o baja, lo cual genera una relación positiva entre el esfuerzo de muestreo y el número de especies observadas. Esto plantea preguntas sobre cuál es el tamaño de muestra adecuado para representar a la comunidad completa y cómo comparar dos comunidades en las cuales no se tienen parámetros de cuál es la riqueza total de especies. Una forma de resolver este problema es estandarizar todas las muestras de diferentes comunidades a un tamaño de muestra común del mismo número de individuos. La rarefacción (o enrarecimiento) es un método estadístico para estimar el número de especies en una muestra aleatoria de individuos tomada de una muestra más grande. La rarefacción responde a la siguiente pregunta: si la muestra consistiera de  $n$  individuos, ¿qué número de especies ( $s$ ) habría sido observado con mayor probabilidad? Dado que en la muestra total hay  $S$  especies y  $N$  individuos, en la muestra rarificada siempre habrán  $n < N$  y  $s < S$  (Krebs 1999).

*1.3.2 Medidas de similitud o estimados de diversidad beta.* Otro parámetro que se puede evaluar de las comunidades es la similitud, principalmente cuando se desean comparar una o varias comunidades. Hay dos tipos de medidas de similitud: los coeficientes binarios de similitud y los coeficientes cuantitativos (Krebs 1999). Los primeros son utilizados cuando sólo se cuenta con datos de presencia/ausencia, mientras que los segundos requieren de alguna medida de la abundancia relativa de cada especie. Estos coeficientes sólo pueden hacer comparaciones entre pares de muestras (Krebs 1999).

*1.3.3 Análisis de agrupamiento.* Cuando es necesario comparar la similitud entre un gran número de muestras resulta útil clasificarlas a través de grupos de muestras. Los análisis de agrupamiento son utilizados para este fin. El agrupamiento de objetos (o muestras) es una operación mediante la cual un conjunto de objetos es particionado en subconjuntos, utilizando reglas preestablecidas de aglomeración o división (Legendre y Legendre 1998). Este método requiere del cálculo de una matriz de coeficientes de similitud para todos los pares de muestras posibles a analizar. Después, los grupos son formados aglomerando progresivamente los objetos (o muestras) de mayor a menor similitud definida por los valores del coeficiente de similitud utilizado.

Un método de agrupamiento muy utilizado es el de UPGMA (por sus siglas en inglés Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages), en el cual la distancia entre dos grupos es el promedio de la distancia entre todos los pares de objetos que forman dichos grupos (Krebs 1999). Al final, la agrupación resultante puede ser visualizada mediante dendrogramas.

*1.3.4 Análisis de ordenamiento.* El ordenamiento es una operación mediante la cual los objetos (o muestras) son posicionados en un espacio que contiene menos dimensiones que el conjunto de datos original, y la posición de los objetos con respecto a cada uno de los otros puede también ser utilizada para agruparlos (Legendre y Legendre 1998). El análisis de componentes principales (PCA por su siglas en inglés Principal Components Analysis) es uno de los análisis de ordenamiento más utilizados. En breve, el procedimiento del PCA

calcula nuevas variables sintéticas (componentes principales), las cuales son combinaciones lineales de las variables originales, y que constituyen la mayor contribución a la varianza del conjunto de datos original. El objetivo es representar los objetos y sus variables asociadas en un nuevo sistema de coordenadas (generalmente en dos o tres ejes o dimensiones), donde la mayor cantidad de la variación del conjunto de datos originales puede ser representada. Los resultados del PCA generalmente son presentados en un plano bidimensional donde los ejes corresponden al nuevo sistema de coordenadas y tanto las muestras (puntos) como las variables (componentes) son representadas (Ramette 2007).

En ecología microbiana los análisis de agrupamiento y ordenamiento son utilizados para evaluar si las especies o muestras se agrupan de acuerdo a alguna variable de interés, así como para clasificar clonas de muestras ambientales basándose en marcadores genotípicos o fenotípicos (Ramette 2007).

#### **1.4 Suelos**

El suelo es referido como el material orgánico y mineral que se encuentra de forma natural suelto en la superficie terrestre (Voroney 2007). Éste se forma en largos periodos a través de la interacción de la roca madre, la topografía, el clima y los organismos vivos. Hay dos grandes grupos de suelos: los suelos minerales, los cuales se forman por la intemperización de la roca madre y otros materiales inorgánicos; y los suelos orgánicos que se forman a través de la sedimentación en cuerpos acuáticos y acumulación de materia orgánica que no ha sido degradada completamente en la superficie terrestre. Aunque la mayoría de los suelos son una mezcla de estos dos tipos de suelos, el componente mineral es el que predomina más en su composición (Voroney 2007, Fanning y Fanning 1989). Los suelos se componen de al menos cuatro componentes: (1) materia mineral inorgánica, típicamente alrededor del 40% del volumen del suelo; (2) materia orgánica, que constituye el 5% del volumen; (3) agua y aire

que forman en conjunto alrededor del 50% de volumen; y (4) microorganismos y macroorganismos, que ocupan alrededor del 5% del volumen del suelo (Fanning y Fanning 1989). El rango de tamaño de partículas que componen el suelo varía desde los 0.002 mm hasta los 2 mm, partículas de mayor tamaño son consideradas como grava o rocas (Fanning y Fanning 1989). El hecho de que el suelo esté compuesto por partículas finas permite la generación de un amplio rango de hábitats ocupados por distintas formas de vida pero predominantemente microorganismicas (Voroney 2007). Es por esto que los suelos portan una enorme biomasa de microorganismos, entre los que podemos encontrar microartrópodos, protozoarios, nemátodos, hongos y bacterias (Voroney 2007). Desde una perspectiva ecológica los suelos son el hábitat terrestre más extenso y diverso (Fitter et al. 2005). Tomando en cuenta las funciones ecosistémicas que llevan a cabo los microorganismos (e.g. ciclaje de nutrientes ó descomposición de materia orgánica entre otros), los suelos tienen una gran relevancia ecosistémica debido a que es en estos hábitats donde se llevan a cabo dichas funciones (Wardle et al. 2004). Es por esto que los suelos se consideran como un componente fundamental de la “zona crítica” de la Tierra, la cual se define como el ambiente heterogéneo cercano a la superficie en donde ocurren las interacciones que involucran rocas, suelo, agua, aire y los organismos vivos, y que regulan el hábitat natural y determinan la disponibilidad de recursos indispensables para sustentar la vida (Amundson et al. 2007).

### **1.5 Los ecosistemas áridos**

Los desiertos o ambientes áridos son aquéllos donde la evapotranspiración supera a la precipitación y constituyen el bioma terrestre más extenso (Peel et al. 2007, Thomas 2011), ya que más del 35% de la superficie terrestre es permanente o temporalmente árida (MEA 2005). Se han utilizado distintas aproximaciones para definir a los desiertos basadas en el clima, geomorfología, hidrología y vegetación (Thomas 2011). Aunque el criterio más ampliamente utilizado actualmente es el índice de aridez empleado por el Programa Ambiental

de las Naciones Unidas (UNEP, por sus siglas en inglés). El índice de aridez refleja el déficit de humedad en un sistema y es expresado como el cociente de la precipitación media anual y la evapotranspiración potencial media anual (P/EP). Este índice está basado en observaciones meteorológicas directas en un tiempo fijo para todas las locaciones donde se realizan estas observaciones. De esta forma los desiertos son clasificados como regiones donde  $P/EP < 0.5$  (Thomas 2011). La aridez se origina a partir de la combinación de cuatro factores que no son mutuamente excluyentes, los cuales son (Thomas 2011):

- (1) Estabilidad atmosférica, lo que genera que masas de aire seco y caliente desciendan alrededor de las latitudes  $30^{\circ}$  norte y  $30^{\circ}$  sur (Fig. 1.6).
- (2) Continentalidad, algunas regiones áridas se generan por la gran distancia a fuentes de humedad como los océanos.
- (3) Topografía, cuando las masas de aire húmedo y caliente ascienden por el barlovento de una barrera montañosa se enfrían y pierden su humedad, lo que genera que del lado de sotavento este aire descienda sin humedad y conforme desciende se calienta evaporando la humedad del suelo; lo que genera una "sombra de lluvia".
- (4) Corrientes marinas frías, éstas tienen un efecto desecante en las costas de los continentes adyacentes debido a que las aguas superficiales frías producen poca humedad atmosférica a través de la evaporación; lo cual limita la cantidad de lluvia que se puede generar.

Debido a que estos factores pueden actuar en conjunto para generar una región árida, distintos desiertos están sujetos a distintos regímenes ambientales. Y aunque la característica que define a los desiertos es el déficit hídrico, otras variables ambientales como la temperatura media anual (TMA) y la estacionalidad de lluvias son utilizadas para clasificar a los desiertos en calientes ( $TMA > 18^{\circ}\text{C}$ ) ó fríos ( $TMA < 18^{\circ}\text{C}$ ) (Peel et al. 2007).

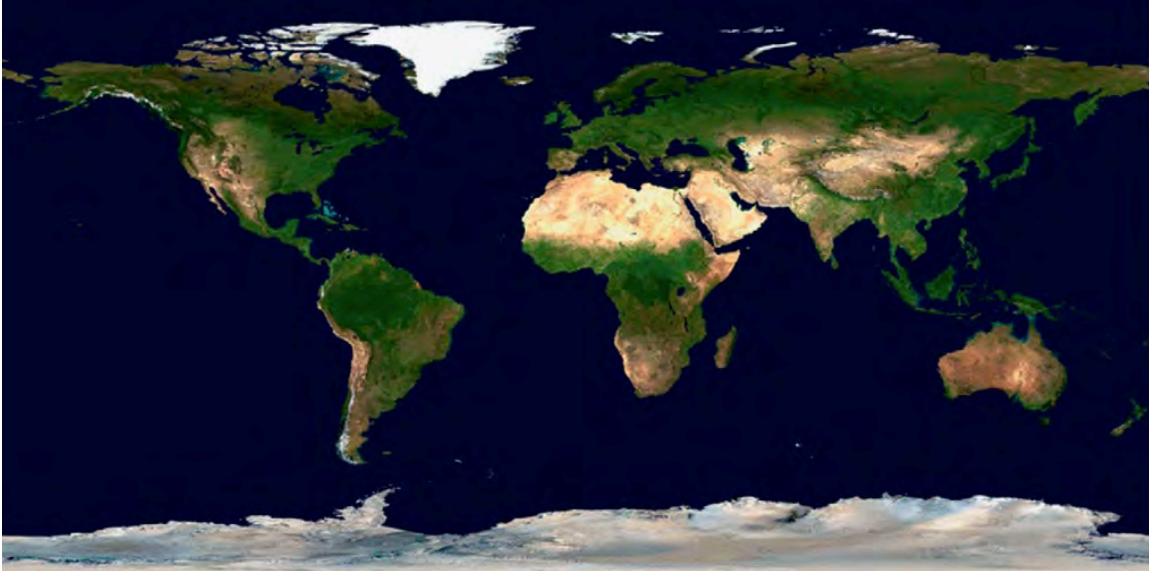


Fig. 1.6. Imagen satelital de la Tierra, en la que se pueden observar los dos cinturones de desiertos que se forman arriba y abajo del ecuador. Imagen tomada de la NASA (2005)

Esta clasificación también refleja el régimen de lluvias al que están sujetas diferentes zonas áridas, por lo que la estacionalidad de lluvias en los desiertos calientes se da principalmente en los meses más cálidos del año (verano), mientras que en los desiertos fríos la estacionalidad de lluvias ocurre en los meses más fríos del año (invierno) (Ezcurra et al. 2014). Muchas regiones áridas del mundo muestran un gradiente en la estacionalidad de lluvias; por ejemplo, el desierto de Sonora recibe principalmente lluvias en invierno en la zona noroeste, cerca del desierto del Mojave, mientras que la zona sureste recibe lluvias en verano (Huenneke y Noble 1996, Ezcurra et al. 2014).

Noy-Meir (1973) identifica tres principales atributos de los desiertos: (1) baja precipitación, por lo que el agua es el principal factor que regula los procesos biológicos; (2) la precipitación es altamente variable a través del año y ocurre en eventos discretos e infrecuentes; y (3) la variación en los eventos de lluvia es altamente impredecible. Por eso, este autor define a los desiertos como ecosistemas controlados por la disponibilidad de agua en los que las entradas de agua son discretas y altamente impredecibles. Propone que en los desiertos

la dinámica de cada población (y en su conjunto la comunidad) está determinada principalmente por su reacción independiente al ambiente, en particular a la altamente intermitente disponibilidad de agua. Bajo esta rigurosidad las poblaciones de animales y plantas son muy escasas (Noy-Meir 1973).

Una de las características más conspicuas del paisaje desértico es la baja densidad de plantas que hay. Este espaciamiento entre plantas se ha propuesto como una estrategia para evitar la competencia por el agua (Nobel 1981). Esto también genera grandes porciones de suelo descubierto (aproximadamente el 70-80%; Dunkerley 2011). Como se mencionó anteriormente, la formación del suelo es promovida por la actividad biológica, por lo tanto, los suelos de desierto son clasificados como entisoles y aridisoles (Fanning y Fanning 1989), que se caracterizan por ser suelos poco desarrollados y superficiales (poca profundidad), lo que afecta su capacidad para almacenar agua en la columna de suelo (Dunkerley 2011). La falta de cobertura crea circunstancias de suma importancia para la hidrología del suelo desértico, expone al suelo a los efectos erosivos de la intemperización, principalmente la lluvia, la escorrentía, el viento y el intenso calentamiento debido a la radiación solar (Dunkerley 2011). Además, los espacios abiertos entre el dosel de las plantas vasculares proveen un ambiente donde hay suficiente luz y humedad que pueden ser aprovechados por organismos más especializados, como algas y líquenes (Dunkerley 2011). Algunos de estos organismos obtienen agua del aire o del rocío en cantidades suficientes, y pueden construir comunidades extensas que colectivamente son conocidas como costras biológicas del suelo (Dunkerley 2011). Como se detallará a continuación, estas comunidades tienen un fuerte impacto en distintos procesos ecosistémicos.

## **1.6 Las costras biológicas del suelo**

Las costras biológicas del suelo se forman a través de una íntima asociación entre las partículas del suelo con cianobacterias, algas, hongos microscópicos, líquenes y briófitas (algunos de estos organismos pueden estar presentes en



diferentes proporciones o incluso ausentes) que se desarrollan en la superficie y en los primeros centímetros del suelo (Belnap y Gardner 1993) (Fig. 1.7B). Estas comunidades se pueden encontrar en distintos ambientes donde la vegetación no es tan abundante y permite que la luz alcance la superficie del suelo. Tienen bajos requerimientos de humedad y una alta tolerancia a temperaturas extremas y radiación solar, por lo que pueden sobrevivir bajo condiciones que limitan el crecimiento de plantas vasculares (Belnap 2006). Debido a estas características, pueden cubrir hasta un 70% del suelo en ambientes de baja productividad como regiones hiperáridas, áridas, semiáridas, subhúmedas, alpinas y polares (Belnap y Lange 2003) (Fig. 1.7A). El término "costra" se refiere a la cohesividad que se crea en la superficie del suelo por los organismos que habitan estas comunidades. La mayoría de esta cohesión se debe a las cianobacterias filamentosas, principalmente a aquéllas del género ubicuo en estas comunidades, como *Microcoleus*. Cuando están húmedas, los filamentos de *Microcoleus* se extienden y se retraen conforme el suelo se seca. Este movimiento resulta en una abundante cubierta de material que queda en la capa superior de suelo, y que aglutina las partículas de suelo para formar agregados de suelo más grandes (Belnap 2003a, García-Pichel y Wojciechowski 2009).

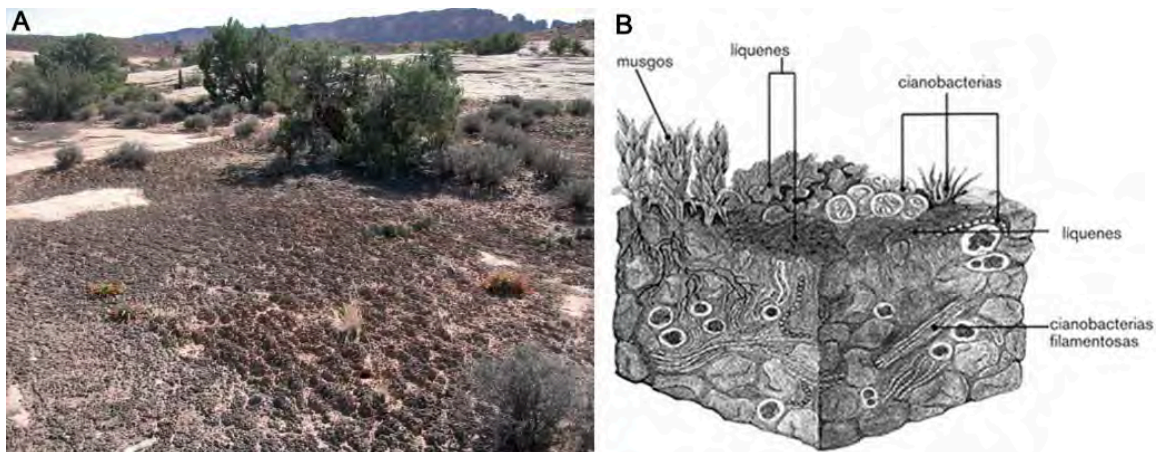


Fig. 1.7. Costras biológicas del suelo. A) Fotografía que muestra el aspecto y cobertura del suelo dominado por costras biológicas. Imagen tomada de Pointing y Belnap (2012). B) Diagrama en el que se muestran los principales taxa de las costras biológicas. Imagen modificada de Belnap y Lange (2003).

Los factores que influyen en la distribución de los organismos de las costras biológicas del suelo son diversos, desde la elevación, tipo de suelo y topografía, hasta la estructura de las comunidades vegetales y la temporada de lluvias son factores que determinan la composición de estas comunidades (Belnap et al. 2003). Las cianobacterias son un componente principal de estas comunidades, se ha observado en particular que géneros como *Microcoleus* y *Nostoc* son comunes en distintas regiones geográficas, climáticas y con distintos tipos de vegetación (Belnap et al. 2003). Se ha demostrado que la distribución de los microorganismos está dictada tanto por factores ambientales contemporáneos como procesos que han ocurrido en el pasado geológico y que han influido en la composición de las comunidades microbianas (Martiny et al. 2006; Hanson et al. 2012). En este sentido, algunos estudios han encontrado una distribución diferencial de cianobacterias que habitan en desiertos fríos y calientes. Bahl et al. (2011) observaron que variantes del género cianobacteriano *Chroococcidiopsis* se agrupan filogenéticamente dependiendo del tipo de desierto de origen (frío o caliente), independientemente de la distancia geográfica entre los sitios de muestreo. Por otra parte, García-Pichel et al. (2013) encontraron que la comunidad fotótrofa de las costras biológicas del suroeste de Estados Unidos están dominadas por dos especies de cianobacterias: *Microcoleus vaginatus* y *Microcoleus steenstrupii*. Sin embargo, aunque ambas especies fueron detectadas en todas las muestras tomadas en el estudio, la dominancia de una u otra variaba en un gradiente latitudinal dependiendo principalmente de la temperatura media anual, siendo *M. vaginatus* más abundante en localidades con temperaturas frías (<15°C) mientras que *M. steenstrupii* dominaba en localidades con temperaturas más cálidas (>15°C). Aunado a esto, una serie de pruebas fisiológicas revelaron que *M. vaginatus* es un taxón psicrófilo mientras que *M. steenstrupii* representa un taxón más termotolerante. Estos hallazgos sugieren que, al menos, la comunidad procarionte fotótrofa de las costras biológicas está determinada por variables ambientales relacionadas con la temperatura, y además podrían estar

indicando que estas taxa muestran adaptaciones a los distintos regímenes ambientales a los que están sujetas las zonas áridas del planeta.

En las costras biológicas se pueden identificar distintos niveles tróficos en los que se diferencian dos principales elementos: (1) el componente autotrófico, compuesto por musgos, líquenes, hepáticas, cianobacterias, algas clorofitas, diatomeas u otras algas eucariontes; y (2) el componente heterotrófico compuesto por hongos microscópicos, protozoarios, bacterias y arqueas (Lalley et al. 2006, Darby et al. 2007). Debido a su composición específica y la estructura física que se forma al desarrollarse estas comunidades, las costras biológicas juegan roles diferentes en una amplia gama de funciones ecosistémicas (Fig. 1.8), lo cual permite emprender investigaciones en cuanto a la relación diversidad-función. Estas funciones comprenden:

- 1) Fijación de carbono: realizada por cianobacterias, algas eucariontes, briófitas y líquenes. Son todos productores primarios que proveen una vía de entrada de carbono al suelo (Lange et al. 1992).
- 2) Fijación de nitrógeno: es llevada a cabo por líquenes con fotobiontes cianobacterianos, cianobacterias heterocísticas y bacterias heterótrofas (Belnap 2002).
- 3) Resistencia a la erosión: realizada por organismos con estructuras filamentosas (cianobacterias, hongos y musgos), los que producen exudados extracelulares orgánicos (cianobacterias) y los que sellan físicamente el suelo de las fuerzas erosivas (briofitas y líquenes), todos los cuales reducen la cantidad de sedimento que se pierde por el efecto de la erosión (Bowker et al. 2008).
- 4) Funciones hidrológicas: realizada por organismos que reducen el espacio de los poros en una escala microscópica, los que incrementan la rugosidad en una escala macroscópica y los que disminuyen la escorrentía (Maestre et al. 2002).
- 5) Ciclaje de nutrientes: llevada a cabo organismos consumidores y contribuidores del reservorio de nutrientes los cuales alteran el estatus

químico o hídrico en el suelo, y pueden alterar la disponibilidad de nutrientes y la tasa de ciclaje de los mismos (Harper y Belnap 2001). Los hongos, bacterias, arqueas y microfauna son responsables de la descomposición de la materia orgánica de la costra biológica.

- 6) Efectos indirectos a través de la interacción entre especies: realizada por organismos de las costras biológicas que interactúan con otros, como las plantas vasculares y sus simbiontes fúngicos (Rivera-Aguilar et al. 2005, Escudero et al. 2007, Green et al. 2008).

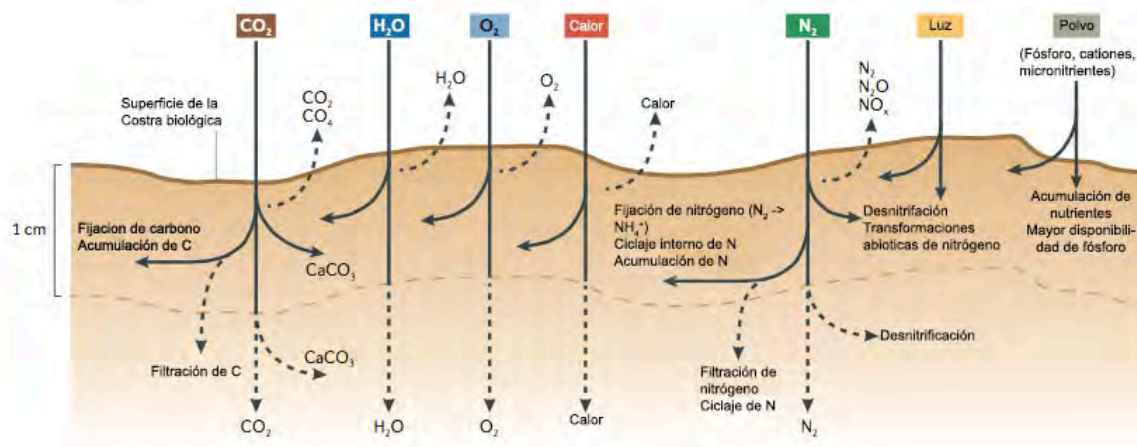


Fig. 1.8. Diagrama que muestra las diferentes funciones que llevan a cabo las costras biológicas. Es en los primeros centímetros de las costras biológicas donde las funciones más importantes se llevan a cabo. Modificado de Pointing y Belnap (2012).

Dadas a las funciones anteriormente mencionadas, Bowker et al. (2010) proponen a las costras biológicas como un sistema modelo para estudiar la relación entre diversidad y función ecosistémica, debido a las siguientes razones:

- 1) Exhiben múltiples niveles tróficos y complejidad funcional en un espacio reducido, típico de ecosistemas del suelo, lo que facilita su manipulación experimental.

- 2) A diferencia de otro tipo de comunidades del suelo, una de las funciones de las costras biológicas es la producción primaria, lo que permite hacer comparaciones con estudios basados en plantas vasculares.
- 3) La taxonomía de algunos de los grupos de organismos fotótrofos que comprenden la mayor parte de la biomasa de las costras biológicas está razonablemente bien resuelta, por lo que se pueden hacer estimaciones de la diversidad y los roles funcionales están parcialmente entendidos (Yeager et al. 2007).
- 4) Al igual que las plantas y a diferencia de la mayoría de la biota del suelo, algunos grupos de la biota de las costras biológicas son visibles a simple vista lo que facilita la recolección de datos.
- 5) La mayoría de los componentes autótrofos de las costras biológicas son cultivables, lo que permite la manipulación experimental (Yeager et al. 2007, Garcia-Pichel et al. 2013).

Aunque las razones anteriormente mencionadas se ajustan al conocimiento que se tiene sobre la diversidad macroscópica y la diversidad microscópica cultivable de las costras biológicas, algunos aspectos funcionales de las costras biológicas aún no han sido ampliamente estudiados. Particularmente, la fijación de nitrógeno ha sido ampliamente descrita y reconocida como una de las principales funciones que llevan a cabo las costras biológicas (Belnap 2002, Billings et al. 2003, Housman et al. 2006, Veluci et al. 2006, Zhao et al. 2010, Elbert et al. 2012, Barger et al. 2013). Sin embargo, la caracterización de la comunidad diazotrófica responsable de este proceso no ha sido tan extensamente estudiada y ha sido principalmente descrita en desiertos de Norteamérica (Yeager et al. 2004, 2007, 2012, Zhang et al. 2014). La fijación de nitrógeno mediada por las costras biológicas es quizás la función más importante que llevan a cabo estas comunidades ya que se ha estimado que globalmente pueden llegar a fijar aproximadamente 33 Tg ( $33 \times 10^{12}$  g) de nitrógeno al año, lo que representa aproximadamente el 30% del nitrógeno fijado biológicamente (Elbert et al. 2012). Esto revela la gran importancia de las costras

biológicas del suelo, sobre todo considerando que el nitrógeno es el segundo recurso limitante para la producción primaria de los ecosistemas áridos, sólo después del agua (Fisher et al. 1988, Vitousek y Howarth 1991).

### **1.7 Fijación de nitrógeno**

La fijación de nitrógeno es el segundo proceso biológico más importante en la Tierra, después de la fotosíntesis (Vitousek y Howarth 1991). En la ausencia de los fertilizantes modernos, los ecosistemas naturales dependen de la conversión biológica del nitrógeno molecular atmosférico ( $N_2$ ) a formas disponibles para el crecimiento de plantas y diversos microorganismos (Vitousek y Howarth 1991). La fijación de nitrógeno es realizada exclusivamente por procariontes y aquéllos que pueden utilizar el  $N_2$  como única fuente de nitrógeno son llamados diazótrofos (Bottomley y Myrold 2007). Aunque sólo un limitado número de especies de bacterias puede fijar nitrógeno, éstas representan una amplia variedad de tipos filogenéticamente y fisiológicamente distintos que ocupan diferentes nichos ecológicos. Estas bacterias utilizan diferentes fuentes de energía incluyendo la luz (fotótrofos), elementos y compuestos inorgánicos reducidos (litótrofos) y una plétora de distintos compuestos orgánicos (heterótrofos) y pueden ser aerobios obligados, anaerobios facultativos y obligados (Bottomley y Myrold 2007). Esta diversidad metabólica indica que los diazótrofos pueden contribuir al nitrógeno fijado para otras formas de vida en una amplia variedad de ambientes (Bottomley y Myrold 2007).

La fijación de nitrógeno ha sido descrita en detalle por Brill (1980), según se expresa a continuación. Este es un proceso mediante el cual el nitrógeno atmosférico es reducido a amoníaco ( $NH_3$ ). Esta reacción es mediada por un complejo enzimático llamado nitrogenasa (Fig. 1.9), que está compuesto de dos proteínas: dinitrogenasa y nitrogenasa reductasa. Existen tres formas diferentes de nitrogenasas que difieren en sus requerimientos de molibdeno (Mo), vanadio (V) o hierro (Fe) como el componente metálico esencial del cofactor asociado con el sitio catalítico. La proteína dinitrogenasa es la que tiene como un cofactor

de molibdeno-hierro (Mo-Fe) en el sitio catalítico encargado de la reducción de  $N_2$  a  $NH_3$ . La proteína dinitrogenasa reductasa usa hierro como cofactor encargado de transferir electrones (reducir) a la dinitrogenasa. La asimilación del nitrógeno atmosférico es energéticamente muy costosa. Dos moléculas de ATP son requeridas por cada electrón transferido de la nitrogenasa reductasa a la dinitrogenasa. La nitrogenasa reductasa es recargada con electrones provistos por una proteína llamada ferredoxina o falvodoxina (Fd). Ocho electrones deben ser transferidos a la dinitrogenasa para que una molécula de nitrógeno ( $N_2$ ) sea reducida a amoníaco ( $NH_3$ ). Un total de 16 moléculas de ATP son requeridas para proveer 6 electrones necesarios para reducir una molécula de  $N_2$  en dos moléculas de  $NH_3$  por que el 25% de la energía "se pierde" en la reducción de  $2H^+$  a  $H_2$ . Un mol de  $H_2$  es producido por cada dos moles de  $N_2$  transformado a  $NH_3$ . La reacción global se describe de la siguiente manera:



Además del alto costo de ATP para reducir  $N_2$  a  $NH_3$ , por lo menos 20 genes y sus productos son requeridos para la síntesis de un sistema enzimático fijador de nitrógeno completamente funcional. Los genes involucrados colectivamente en la síntesis de la nitrogenasa y el proceso catalítico de fijación de nitrógeno son llamados genes *nif*. Adicionalmente, hay genes accesorios llamados genes *fix*, que son necesarios para la función y regulación de la nitrogenasa en bacterias diazótrofes aerobias o microaerobias (Dixon y Kahn 2004). El proceso catalítico de fijación de nitrógeno es notablemente lento e ineficiente. Las dos proteínas involucradas deben unirse y disociarse ocho veces para reducir una molécula de  $N_2$  a dos de  $NH_3$ . Para compensar este proceso tan tardado, la nitrogenasa comprende aproximadamente el 10% de las proteínas celulares en un organismo diazótrofo (Bottomley y Myrold 2007). Finalmente, la reacción es fuertemente inhibida por el oxígeno por lo que la fijación de nitrógeno debe ser espacialmente o temporalmente separada de la evolución del oxígeno durante la fotosíntesis y la entrada de oxígeno a la células debe ser limitada o prevenida (Stal 1995).

Además del oxígeno, otros factores también afectan la actividad de la nitrogenasa. Particularmente en las costras biológicas, el agua es el factor que más limita la actividad de la nitrogenasa debido a que el agua es necesaria para reactivar la actividad metabólica de los organismos que habitan estas comunidades (Belnap 2003b).

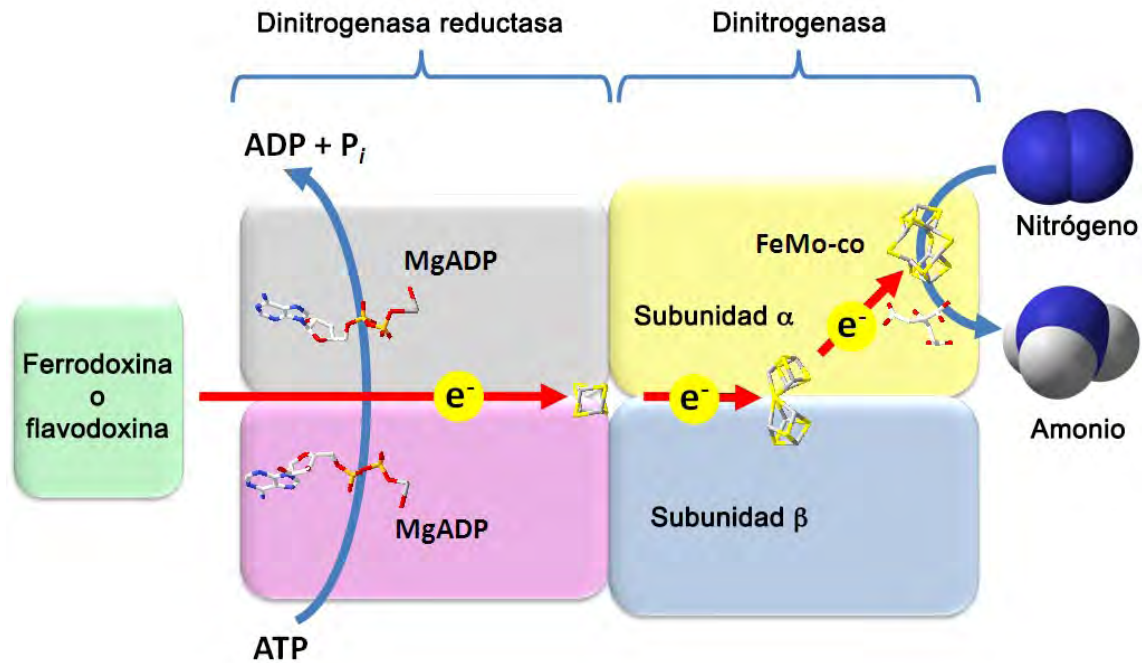


Fig. 1.9. Diagrama que muestra el complejo enzimático de la nitrogenasa y el flujo de electrones que ocurre en ésta. MgADP: Adenosina difosfato mas un átomo de magnesio; FeMo-co: Coensima de hierro-molibdeno; Subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ : Subunidades de la dinitrogenasa. Modificada de Conn y Stumpf (2009).

Debido a esto, en los periodos de sequía generalmente la actividad de la nitrogenasa está ausente; sin embargo, ésta se reanuda rápidamente después de que las costras biológicas son rehidratadas (Evans y Johansen 1999). Por otra parte, otros factores como la disponibilidad de hierro o molibdeno pueden limitar la actividad de la nitrogenasa; ya que estos son requeridos para las reacciones catalíticas de la nitrogenasa (Vitousek y Howarth 1991). También el fósforo se ha identificado como un elemento que puede ser limitante debido al



alto costo de ATP que representa la fijación de nitrógeno (Howarth y Marino 1988, Vitousek y Howarth 1991, Wu et al. 2000,).

El marcador filogenético más frecuentemente empleado para explorar la diversidad de diazótrofos ha sido el gen *nifH* (Zehr et al. 2003, Gaby y Buckley 2011). Esto se debe a que las secuencias de *nifH* son las que más se han acumulado en las bases de datos, lo que permite una comparación con nuevas secuencias obtenidas para su identificación. Además, las filogenias realizadas con el gen *nifH* y el gen 16S rRNA resultan en árboles con topologías muy similares (Zehr et al. 2003).

## **1.8 Justificación**

A pesar de la importancia que tienen las costras biológicas para el funcionamiento ecosistémico en zonas áridas, en México, donde aproximadamente el 40% del territorio forma parte de este tipo de ambientes (Challenger y Soberón 2008), las costras biológicas han sido poco estudiadas (Castillo-Monroy y Maestre 2011). Los estudios realizados en México se han enfocado en describir la diversidad y distribución de organismos que las componen con un enfoque morfológico para su clasificación (Rivera-Aguilar et al. 2006, 2009). Otros estudios han tomado un enfoque experimental para evaluar la influencia de las costras biológicas en la germinación y crecimiento de plantas vasculares (Rivera-Aguilar et al. 2005, Godínez-Alvarez et al. 2012). Sin embargo, se han realizado pocos estudios para describir a la comunidad diazotrófica de las costras biológicas y otros pocos han complementado esta descripción con una evaluación de la capacidad metabólica de la comunidad para llevar a cabo la fijación de nitrógeno (e.g., Yeager et al. 2004, 2012). Además, algunos estudios sugieren que las comunidades cianobacterianas de las costras biológicas muestran adaptaciones a distintos regímenes climáticos (Bahl et al. 2011, Garcia-Pichel et al. 2013), lo cual podría estar indicando que las capacidades metabólicas de estos organismos difieren en distintas regiones geográficas. Dada la importancia global que tiene la fijación de nitrógeno

mediada por las costras biológicas (Elbert et al. 2012), este trabajo está enfocado a aportar información que permita integrar el estudio de la diversidad con el funcionamiento ecosistémico en estas comunidades. Por otra parte, se busca enmarcar este estudio en un contexto de las preguntas fundamentales de ecología microbiana como: ¿cuál es la importancia de la diversidad en los distintos procesos que llevan a cabo los microorganismos?

## 1.9 Objetivos e hipótesis

El objetivo general de este trabajo es caracterizar la estructura de la comunidad de diazótrofos y evaluar el potencial de fijación de nitrógeno en costras biológicas del suelo de dos ecosistemas áridos de México con condiciones contrastantes de precipitación y temperatura. Los objetivos particulares, por su parte son los siguientes:

1. Conocer cuantitativamente la diversidad de diazótrofos en una escala espacial local en dos ecosistemas áridos con condiciones contrastantes de estacionalidad en precipitación y temperatura.
2. Determinar las diferencias en la actividad metabólica entre las muestras tomadas en los dos sitios.
3. Evaluar si las diferencias en composición y estructura de la comunidad de diazótrofos en cada muestra está relacionada con las diferencias en la actividad metabólica de las muestras.

En este trabajo se formulan las siguientes hipótesis:

1. Dado que la distribución de los microorganismos puede estar determinada por las condiciones ambientales actuales, en dos ecosistemas áridos con condiciones contrastantes de precipitación y temperatura, se espera que la estructura y composición de la comunidad de diazótrofos sea diferente entre las muestras de los dos sitios de estudio; por lo que el ambiente determina esos parámetros de las comunidades.
2. Dado que la composición de las comunidades microbianas puede influir en el funcionamiento de estas en algún proceso ecosistémico y dadas las hipótesis de redundancia y similitud funcional, se espera que bajo condiciones ambientales o de incubación similares, si la composición de la comunidad influye en su funcionamiento, la actividad metabólica evaluada mediante la fijación de nitrógeno de las muestras será diferente entre ambos sitios. Así mismo, se espera que la actividad metabólica de las muestras esté relacionada con la composición y estructura de la comunidad. De esta manera muestras con

composición y estructura similares mostrarán valores similares en la estimación de la actividad metabólica en condiciones de incubación idénticas.

## II. MÉTODOS

### 2.1 Sitio de estudio

Con el objetivo de analizar diferencias en niveles y distribución de diversidad de diazótrofos asociados a las costras biológicas del suelo (CBS), se eligieron dos sitios de estudio ubicados en ecosistemas áridos con condiciones contrastantes de temperatura y estacionalidad de lluvias. El primer sitio está localizado en Cuatro Ciénegas, Coahuila (Churince, 26.50° N, 102.08° O), tiene una temperatura media anual de 21.5°C (SMN 2014) y una precipitación media anual menor a los 150 mm con una estacionalidad de lluvias en verano y una vegetación es de tipo pastizal halófilo (López-Lozano et al. 2012). El segundo sitio se localiza en el Valle de Guadalupe, Baja California (Rancho El Mogor, 32.04° N, 116.60° O), presenta una temperatura media anual de 17.1°C (SMN 2014), precipitación media anual de 200 mm, estacionalidad de lluvias en invierno-primavera (Franco-Vizcaíno y Sosa-Ramírez, 1997, León-Arizmendi 2012), y vegetación tipo chaparral mixto (Franco-Vizcaíno y Sosa-Ramírez 1997) (Fig. 2.1)

### 2.2 Muestreo

En los dos sitios mencionados se realizó un muestreo sistematizado en un cuadro de 8 × 8 m, el cual se subdividió en cuadros de 1 m<sup>2</sup>. Se obtuvieron 32 muestras de CBS de cada sitio en un esquema de tablero de ajedrez (Noguez et al. 2005) (Fig. 2.2B). Este esquema cuenta con réplicas de cuadros de diferentes tamaños, A1 (32 réplicas de 1 m<sup>2</sup>), A2 (16 réplicas de 4 m<sup>2</sup>) y A3 (4 réplicas de 16 m<sup>2</sup>) lo que permite una fácil estimación de la diversidad beta o heterogeneidad en la distribución espacial de la diversidad mediante la construcción de una curva especies-área (SAR por sus siglas en inglés; Arita y Rodríguez 2002).



Fig. 2.1. Ubicación geográfica y fotografías de los sitios de muestreo. A) Sitio en Valle de Guadalupe, Baja California, Rancho el Mogor (32.04° N, 116.60° O), diciembre de 2012. B) Sitio en Cuatro Ciénegas, Coahuila, Churince (26.50° N, 102.08° O), noviembre de 2012. Fotografía: Alberto Barrón.

En cada cuadro de 1m<sup>2</sup> se tomaron dos tipos de muestras; una destinada a análisis fisiológicos y biogeoquímicos, y otra destinada a análisis moleculares de diversidad. La primera muestra se colectó utilizando platos cilíndricos de PVC en los cuales se colocaron muestras de CBS de aproximadamente 5 cm de profundidad y 11 cm de diámetro. Para la segunda muestra (análisis moleculares), también se obtuvieron muestras compuestas de tres tomas adyacentes a las colectadas con los platos de PVC. Estas muestras compuestas se tomaron usando tubos Falcon estériles (Fig. 2.2A) y fueron transportadas en nitrógeno líquido. Al llegar al laboratorio, las muestras para análisis fisiológicos fueron secadas y mantenidas en obscuridad hasta su análisis y las muestras para análisis moleculares fueron almacenadas en ultracongelador (-80°C) hasta su procesamiento para extracción de ácidos nucleicos.

### 2.3 Extracción de DNA

De las 32 muestras obtenidas de cada sitio se realizó la extracción de DNA ambiental con el protocolo de extracción de Purdy (2005) que se detalla en el apéndice 1. El DNA obtenido fue objeto de distintas técnicas moleculares para la obtención de resultados sobre diversidad genética.

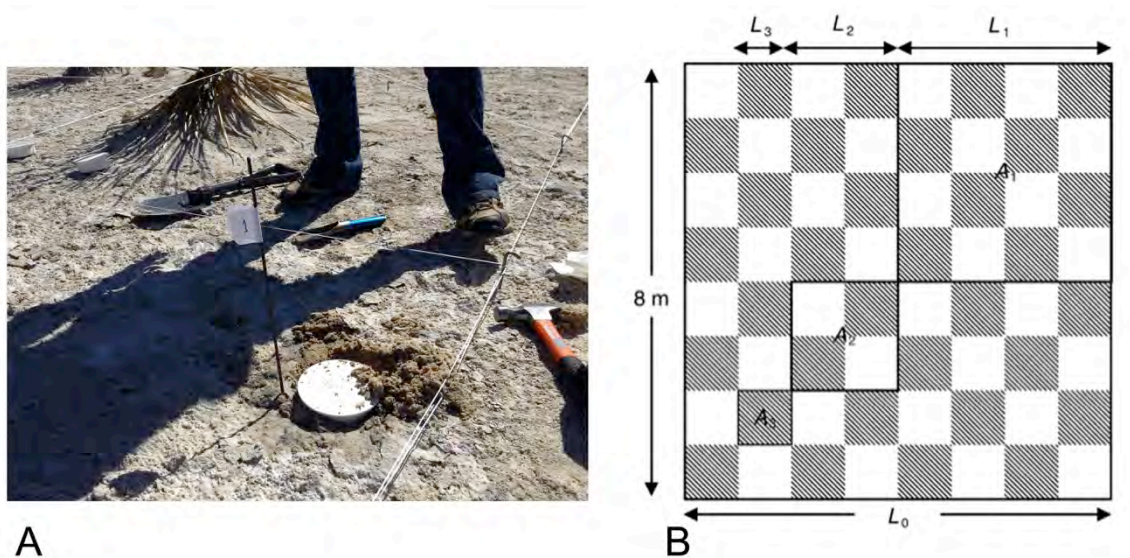


Fig. 2.2. A) Toma de muestras de costras biológicas del suelo. B) Esquema de muestreo en tablero de ajedrez. Los 32 cuadros de 1 m<sup>2</sup> en blanco fueron muestreados (tomada de: Noguez et al. 2005)

## 2.4 Análisis de diversidad del gen *nifH*

La fijación de nitrógeno es catalizada por la enzima nitrogenasa, la cual ha sido altamente conservada entre los organismos fijadores de nitrógeno (Zehr et al. 2003, Gaby y Buckley 2011). Los análisis filogenéticos de las secuencias de *nifH*, gen que codifica para una de las subunidades de la nitrogenasa, resultan en árboles con topologías muy similares a las producidas con filogenias del gen 16S rRNA, por lo cual resulta ser un marcador molecular útil para la identificación taxonómica de diazótrofos de vida libre (Zehr et al. 2003).

La evaluación de la diversidad en la secuencias de *nifH* en la comunidad de diazótrofos se realizó mediante una técnica de perfiles comunitarios o “fingerprinting” del tipo T-RFLPs (Terminal Restriction Fragment Length Polimorfism).

**2.4.1 Amplificación (PCR).** Se generaron amplicones de la secuencia parcial del gen *nifH* mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en

inglés. Los oligonucleótidos usados fueron los previamente reportados por Yeager et al. (2004). La amplificación de esta secuencia se realiza mediante un protocolo de PCR anidado, el cual consiste en realizar una PCR para generar un amplicón que será utilizado como templado para una PCR subsecuente. Para el primer PCR se utilizaron los oligonucleótidos nifH19F (5'-GCIWTYTAYGGIAARGGIGG-3') y nifH3R (5'-ATRTTRTTNGCNGCRTA-3'). Cada reacción se llevó a cabo en 50  $\mu$ L con 0.8  $\mu$ M de cada primer, buffer para PCR al 1X, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM de una mezcla de dNTPs, 10  $\mu$ g de albúmina de suero bovino (BSA), 2.5 unidades de Taq polimerasa y de 1 a 2  $\mu$ L de ADN obtenido de la muestra (~20-40 ng de ADN obtenido de las muestras de Cuatro Ciénegas y ~160-320 ng de ADN obtenido de las muestras del Valle de Guadalupe). Todas las reacciones se realizaron en un termociclador (Veriti 96-well thermal cycler, Applied Biosystems) con el siguiente programa: 95°C por 5 min, seguido de 20 ciclos de 94°C por 45 s, 48°C por 1 min y 72°C por 1 min con una extensión final de 72°C por 10 min. Para la segunda PCR se utilizó el oligonucleótido marcado fluorescentemente nifH11F-FAM (5'-GAYCCNAARGCNGACTC-3') y el oligonucleótido nifH22R (5'-ADWGCCATCATYTCRCC-3'). Cada reacción se llevó a cabo en 25  $\mu$ L con una mezcla de reacción idéntica a la de la primera PCR exceptuando que contenía 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ g de BSA, 0.5 unidades de Taq polimerasa y 1 a 2  $\mu$ L del amplicón de la primera PCR. El programa de la segunda PCR fue idéntico al de la primera exceptuando la temperatura de alineación que fue de 55°C y se realizaron 32 ciclos de reacción. Cada PCR se realizó por triplicado para cada muestra con el objetivo de obtener una suficiente cantidad de DNA para realizar la digestión enzimática después de la purificación del gel y evitar sesgos por deriva de la PCR (Acinas et al., 2005). Al finalizar la segunda PCR, los tres amplicones generados fueron mezclados y cargados en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE (Tris Acetato EDTA) 0.5X y corridos a 90 mV por 45 min. El amplicón de 358 pb fue purificado del gel de agarosa utilizando el kit QIAquick gel extraction kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.



*2.4.2 Restricción enzimática de amplicones de nifH.* Los amplicones de nifH purificados, fueron cuantificados en un espectrofotómetro (NanoDrop, Thermo Scientific). Se calculó el volumen necesario de cada uno de los amplicones para obtener una cantidad de 75 ng de producto, los cuales se sometieron a una reacción de digestión en un volumen total de 12.5  $\mu$ L con 1X del buffer de reacción y 0.5 unidades de la enzima Mae III (Roche). Para las muestras con baja concentración de producto purificado de PCR (<12.5 ng/ $\mu$ L), se realizaron reacciones de digestión en 25  $\mu$ L con 1X del buffer de reacción y 1.0 unidades de la enzima Mae III (Roche). Las reacciones de digestión se llevaron a cabo en un termociclador a una temperatura de 55°C por 12 h. La limpieza y precipitación de la reacción de digestión se detalla en el apéndice 2. Una vez limpios y precipitados los fragmentos, fueron resuspendidos en 9.75  $\mu$ L de formamida (HiDi Applied Biosystems) y 0.25  $\mu$ L del marcador de peso molecular GS600LIZ (Applied Biosystems), los cuales fueron cargados en una placa de secuenciación y desnaturalizados a 95°C.

*2.4.3 Análisis de fragmentos terminales de restricción (T-RFLPs).* Para el análisis de los tamaños e intensidad de fluorescencia de cada fragmento, estos fueron separados por electroforesis capilar en un secuenciador (ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Se utilizó el software Genescan versión 3.1 (Applied Biosystems), utilizando el programa TRFLPS 2012G510V10000RT35S con los siguientes parámetros de corrida: temperatura de la electroforesis: 60°C, voltaje: 10 kV, tiempo de inyección: 35 s, tiempo de corrida: 10000 s. Para cada una de las muestras se realizaron tres lecturas (inyecciones capilares) independientes.

Para el análisis de los datos generados por los perfiles de T-RFLP se utilizó el software Peak Scanner 2.0 (Applied Biosystems). Las alturas de los picos de cada muestra fueron convertidas a porcentajes de la suma de las alturas de todos los picos para cada muestra. Solo los picos que presentaron más de 20 unidades de altura y que estuvieron presentes en las tres réplicas para cada muestra fueron incluidos en el análisis. Cada perfil de T-RFLP fue

inspeccionado visualmente para verificar la correspondencia de tamaños de los picos en cada una de las réplicas para cada muestra.

## **2.5 Ensayo de reducción de acetileno para evaluar la actividad catalítica de la nitrogenasa.**

La enzima nitrogenasa, indispensable para la fijación de nitrógeno, es un complejo proteico de cuatro subunidades que tiene la capacidad de romper triples enlaces como los que presenta la molécula de nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>). Esta capacidad es el sustento del ensayo de reducción de acetileno para medir el potencial de fijación de nitrógeno en muestras ambientales o biológicas. En este ensayo, se somete a la muestra a una concentración conocida de acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, molécula con triple enlace) y, tras incubación de la muestra con este gas, se cuantifica por medio de cromatografía de gases la reducción de acetileno a etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) (Hardy et al. 1973) y a etano (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>) (Dilworth et al. 1988). Dichas mediciones permiten estimar de manera indirecta la actividad catalítica de la nitrogenasa (Hardy et al. 1973).

En este caso, las muestras colectadas en campo y colocadas en platos de PVC fueron sometidas a este ensayo para estimar el potencial de fijación de nitrógeno. Cada una de las muestras colectadas para cada sitio (29 muestras de CC y 31 muestras de VG) fue sellada herméticamente, cubriendo el plato de colecta con una lámina de acrílico a la cual se le instaló una válvula de goma para la toma de muestras de gas en la cabeza de aire. El acrílico se adhirió al borde superior del plato utilizando masilla de fontanero para asegurar el sello hermético. Se reemplazó el 10% de la cabeza de aire con acetileno utilizando jeringas para sustraer el aire e inyectar el acetileno. Para calcular el volumen de la cabeza de aire se utilizó la fórmula del volumen de un cilindro. La cual se describe de la siguiente manera:

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot h$$

donde  $r$  es el radio de la circunferencia del plato y  $h$  es la distancia que hay entre la muestra y el borde superior del plato (Fig. 2.3).

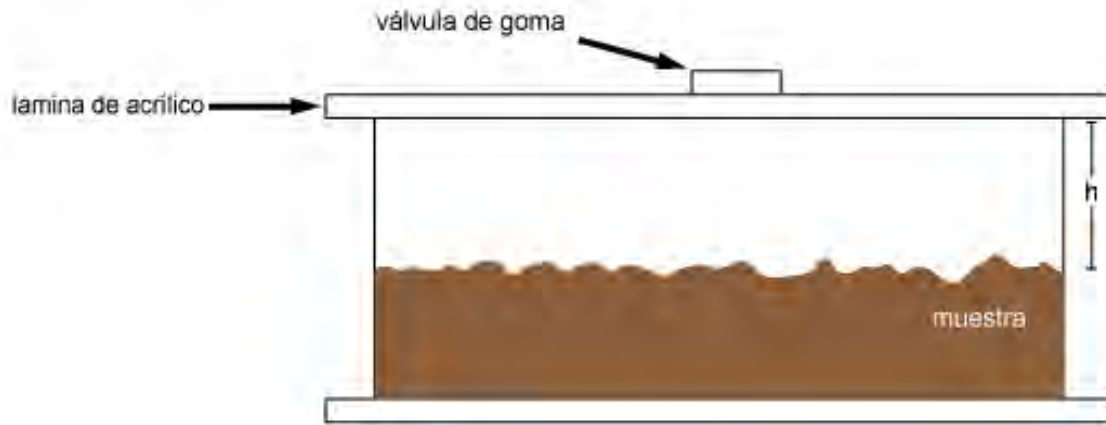


Fig. 2.3. Diagrama de un corte transversal de la cámara de incubación (plato de PVC) para el ensayo de reducción de acetileno. En el interior de la cámara se encuentra contenida la muestra.

Después de la inyección se incubaron las muestras durante 24 h en un régimen de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, la iluminación fue de 2000 luxes y la temperatura de incubación fue de 27°C. Transcurrida la incubación, con una jeringa de insulina se tomó una muestra de 1 mL de la cabeza de aire que fue inyectada directamente en un cromatógrafo de gases para ser analizada [Varian 3300, columna empacadora: Poropak mallas 2 m x 1/8 de pulgada, detector de ionización de flama; nitrógeno como gas acarreador (80 Psi), aire (60 Psi) e hidrógeno (40 Psi)]. Los parámetros de lectura del gas inyectado fueron: atenuación, 0.2; velocidad del papel, 0.5 con tiempos de retención para etileno de 1.33, etano de 1.515 y acetileno de 1.823 (unidades arbitrarias).

Para realizar el cálculo de la concentración de los gases en la cabeza de aire se realizó una curva estándar inyectando volúmenes desde 0.2 hasta 1 mL del gas en cuestión al 100% y anotando las unidades de área que reporta el cromatógrafo de dicho gas para cada volumen inyectado. Siguiendo el volumen molar de un gas (22.4 L = 1 mol) en un mL hay 44.6  $\mu$ moles, con lo cual se

obtuvo la pendiente de la curva estándar (etileno:  $m=0.0003703$ , etano:  $m=0.0000784$ ) (Fig. 2.4) que fue utilizada como el factor de conversión de unidades de área del cromatógrafo a  $\mu\text{moles}$  de gas.

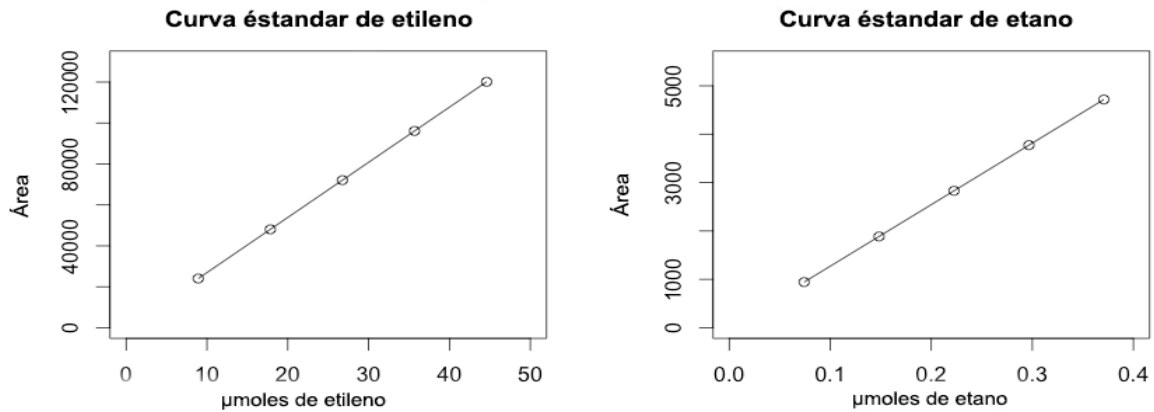


Fig. 2.4. Curvas estándar para la calibración cromatográfica.

Para calcular la producción de  $\mu\text{moles}$  de gas por hora y por gramo de suelo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\mu\text{moles h}^{-1}\text{g}^{-1} = ((A \times m) \times V) / (T \times W \times B)$$

donde  $A$  son las unidades de área reportadas por el cromatógrafo,  $m$  es la pendiente obtenida con la curva estándar,  $V$  es el volumen de la cabeza de aire,  $T$  es el tiempo de incubación en horas,  $W$  es el peso en gramos de la muestra seca y  $B$  es el porcentaje de biomasa en cada muestra expresado como fracción.

*2.5.1 Cuantificación de biomasa por el método de cenizas.* Para estandarizar las mediciones del ensayo de reducción de acetileno por el contenido de biomasa se siguió un protocolo de incineración para cuantificar la biomasa contenida en cada una de las muestras colectadas. Para ello se utilizaron aproximadamente 2 g de la muestra colectada y congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El protocolo de incineración se

llevó a cabo en crisoles lavados y secados a 105°C por 2 h. Se pesaron con una balanza analítica y se registró el peso de los crisoles antes de colocar las muestras de suelo. Las muestras de suelo fueron colocadas dentro de los crisoles, pesadas y secadas en una estufa de desecación a 105°C por 12 horas. Después se sacaron las muestras de la estufa de desecación, se colocaron en cámaras ambientales para enfriarlas a temperatura ambiente y se volvieron a pesar. Finalmente, se colocaron en una mufla (Felisa, modelo FE360, digital de tres pasos, temperatura máxima 1100°C) para su incineración a 550°C por 2 h, terminado el proceso de incineración se colocaron de nuevo en cámaras ambientales para enfriarlas a temperatura ambiente y posteriormente fueron pesadas.

Para determinar el porcentaje de biomasa (%*B*) en cada muestra se debió restar el peso del crisol vacío. Para calcular el porcentaje biomasa se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%B = \left( 1 - \left( \frac{MI}{MS} \right) \right) \times 100$$

donde *MI* es el peso de la muestra incinerada y *MS* es el peso de la muestra seca.

## **2.6 Análisis de la diversidad de OTUs de *nifH***

**2.6.1 Índices de diversidad.** Las abundancias relativas de cada fragmento (OTU) para cada muestra fueron utilizadas para calcular los índices de Simpson y Shannon-Wiener de diversidad. El índice de Simpson equivale al inverso de la dominancia que hay en cada comunidad:

$$H = 1 / \left( \sum_{i=1}^S p_i^2 \right)$$

donde  $p_i$  es la abundancia relativa de cada OTU ( $i$ ) en cada muestra. Este índice está basado en la probabilidad de tomar dos individuos de una comunidad al azar y que estos sean de la misma especie (Brown y Bowman 2001).

Para estimar la diversidad en relación al tamaño de muestra se utilizó el índice de Shannon-Wiener:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \log p_i$$

Este índice calcula la incertidumbre que hay para predecir la especie de algún miembro de la comunidad tomado al azar, por lo tanto mientras más especies contenga una comunidad con un número igual de individuos en cada especie mayor será el valor de este índice (Brown y Bowman 2001).

Para calcular el coeficiente de Sørensen de similitud como estimador de la diversidad  $\beta$  se construyó una matriz de presencia/ausencia. El coeficiente de Sørensen compara pares de muestras y se describe de la siguiente forma:

$$S = \frac{2a}{b + c}$$

donde  $a$  es el número de especies compartidas por ambos sitios,  $b$  es el número de especies u OTUs presentes sólo en el primer sitio o muestra y  $c$  es el número de especies u OTUs presentes sólo en el segundo sitio. Este índice va de 0 a 1 donde cero significa muestras totalmente diferentes y 1 como muestras totalmente similares. El coeficiente Sørensen pondera las similitudes en composición de especies más que las desigualdades entre dos muestras (Krebs

1999). Este coeficiente fue estimado para todos los pares de muestras posibles utilizando el paquete *vegan* (Oksanen et al. 2013) implementado en el software R (R Core Team 2014).

Adicionalmente se estimaron dos medidas de diversidad beta a través de regresiones lineales; en la primera se grafica el logaritmo de la riqueza de OTUs (análogo a la riqueza de especies) en función de la escala, donde la pendiente de esta regresión lineal es igual a  $-\log\beta$  donde  $\beta$  es la diversidad beta (Whittaker 1972, Arita y Rodríguez 2002). La segunda estimación se obtuvo mediante una regresión lineal, graficando el logaritmo de la riqueza de OTUs en función del logaritmo del área muestreada, donde el valor de esta pendiente es equivalente a  $z$  en la fórmula  $S = cA^z$ , donde  $S$  es el número de especies,  $A$  es el área muestreada y  $c$  es la ordenada al origen en las regresiones lineales de funciones log-log y semilog (Arita y Rodríguez 2002, Scheiner 2003).

*2.6.2 Curva de rarefacción.* Curvas de rarefacción fueron construidas para los dos sitios graficando el número acumulativo de OTUs en función de un número creciente de muestras. Se utilizó el programa EstimateS version 9.1 (Colwell 2004) para calcular los puntos en las curvas de rarefacción, utilizando el método de Colwell et al. (2004) que permite calcular la diversidad esperada para  $n$  número de muestras y sus varianzas asociadas.

*2.6.3 Análisis de similitud en composición.* Para comparar la similitud en la composición de OTUs entre cada una de las muestras se construyó una matriz de distancia con el índice de disimilitud de Bray-Curtis (Bray y Curtis 1957) utilizando el paquete *vegan* (Oksanen et al. 2013) implementado en R (R Core Team 2014). Con esta matriz de distancia se realizó un análisis de UPGMA con el método de promedio utilizando el software R (R Core Team 2014).

Para identificar muestras que sean similares en composición y estructura se realizó un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés). Para esto las abundancias de cada OTU fueron transformadas utilizando la transformación de Hellinger (Legendre y Gallagher 2001), que se describe de la siguiente manera:

$$y'_{ij} = \sqrt{\frac{y_{ij}}{y_{i+}}}$$

Donde  $y_{ij}$  es el valor original de abundancia para la muestra  $i$  y la especie  $j$ ,  $y_{i+}$  es la suma de todas las abundancias para la muestra  $i$ . Esta transformación resulta útil para manejar matrices de composición de comunidades que contienen muchos ceros y adecuarlas para análisis de métodos lineales tales como el PCA (Ramette 2007). Con la matriz de datos estandarizada se realizó el PCA en un análisis modo Q sobre una matriz de covarianza utilizando el software R (R Core Team 2014).

## **2.7 Correlación entre diferencias en composición y características fenotípicas**

Para probar la correlación entre las diferencias en composición de OTUs y diferencias en la actividad catalítica de la nitrogenasa, estimada mediante el ensayo de reducción de acetileno, se construyeron dos matrices de distancias pareadas para ambos parámetros (composición y actividad catalítica). La primera matriz se construyó utilizando los datos de abundancia con el índice de disimilitud de Bray-Curtis (Bray y Curtis, 1957). La segunda matriz se construyó con la distancia euclideana entre pares de muestras utilizando los datos obtenidos por el ensayo de reducción de acetileno. Utilizando las matrices de distancia se realizó la prueba de Mantel (Mantel 1967, Smouse et al. 1986) con 9,999 permutaciones utilizando el coeficiente de correlación de Pearson para probar la correlación entre los datos en conjunto de ambos sitios. De manera similar, se realizaron dos pruebas de Mantel con las matrices de distancia de los datos de cada sitio independientemente. Las matrices de distancia y las pruebas de Mantel fueron realizadas utilizando el paquete vegan (Oksanen et al. 2013) en el software R (R Core Team 2014). Todos estos análisis se realizaron considerando una  $\alpha = 0.05$ .





### III. RESULTADOS

#### 3.1 Análisis de diversidad

**3.1.1 Riqueza y diversidad alfa.** En total se encontraron 23 OTUs mediante el análisis de T-RFLPs del gen *nifH*, de los cuales 14 se encuentran en Cuatro Ciénegas (CC) y 15 en el Valle de Guadalupe (VG), compartiendo 6 OTUs ambos sitios. En las 32 muestras tomadas en CC el número de OTUs presente varía desde tres hasta ocho OTUs, con un promedio de  $3.9 \pm d.e 1.2$  OTUs por muestra; mientras que en VG el intervalo es desde dos hasta once OTUs con un promedio de  $6.0 \pm 2.4$  OTUs por muestra (Fig. 3.1A). Los estimadores de diversidad utilizados indican que el sitio en VG es más diverso (Fig. 3.1B y 3.1C)

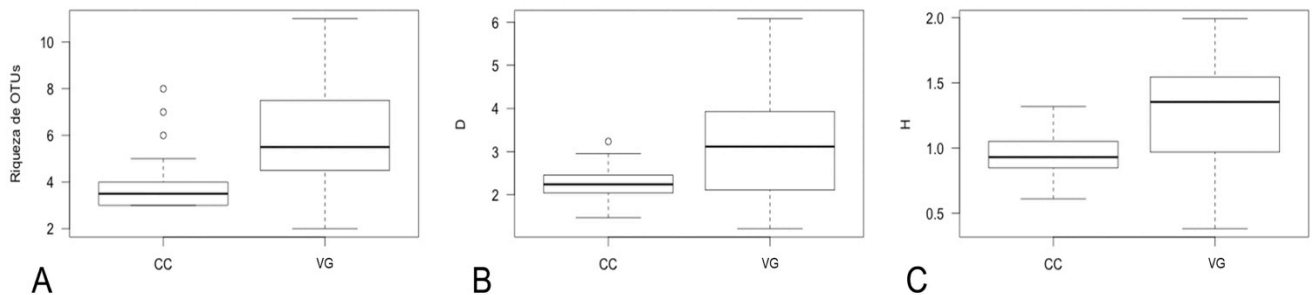


Fig. 3.1. Índices de diversidad estimados a partir de la riqueza de OTUs en cada muestra. CC: Cuatro Ciénegas; y VG: Valle de Guadalupe, respectivamente. A) Diversidad  $\alpha$  promedio para ambos sitios estimada por S (riqueza de especies/OTUs) ( $n=32$  para ambos sitios). B) Diversidad  $\alpha$  promedio estimada mediante el índice de Simpson ( $n=32$  para ambos sitios). C) Diversidad  $\alpha$  promedio estimada mediante la función Shannon-Wiener ( $n=32$  para ambos sitios).

**3.1.2 Riqueza y diversidad beta:** El análisis de rarefacción indica que el muestreo realizado en CC no es representativo de toda la comunidad mientras que en VG sí lo es (Fig. 3.2). Esto es concordante con el estimado de diversidad  $\beta$  que se obtuvo a través del índice de Sørensen, el cual va de 0 (no similitud) a 1 (completamente similares), ya que este índice es mayor para VG (Fig. 3.3C);

esto significa que el sitio en VG es más homogéneo que en CC, o que el recambio de “especies” es mayor en CC. Adicionalmente, el estimado de diversidad  $\beta$  realizado mediante la regresión lineal del logaritmo de la riqueza de OTUs en función de la escala implica que la pendiente es igual a  $-\log\beta$  donde  $\beta$  es la diversidad beta (Whittaker 1972, Arita y Rodríguez 2002). Este análisis arroja una pendiente de  $-0.38$  ( $\beta = 0.68$ ,  $r^2 = 0.34$ ) para VG y  $-0.32$  ( $\beta = 0.72$ ,  $r^2 = 0.38$ ) para CC, lo cual indica que al aumentar el área muestreada cuatro veces la riqueza de OTUs aumentará por un factor de  $\beta = 0.68$  en VG y  $\beta = 0.72$  en CC (Fig. 3.3A). El estimado de diversidad  $\beta$  obtenido mediante una regresión lineal del logaritmo de la riqueza de OTUs en función del logaritmo del área implica un relación OTU-área de la forma  $S = cA^z$  donde la pendiente de la regresión lineal es  $z$ . Se estimó que para VG  $z = 0.28$  ( $r^2 = 0.34$ ) y para CC  $z = 0.23$  ( $r^2 = 0.38$ ) (Fig. 3.3B).

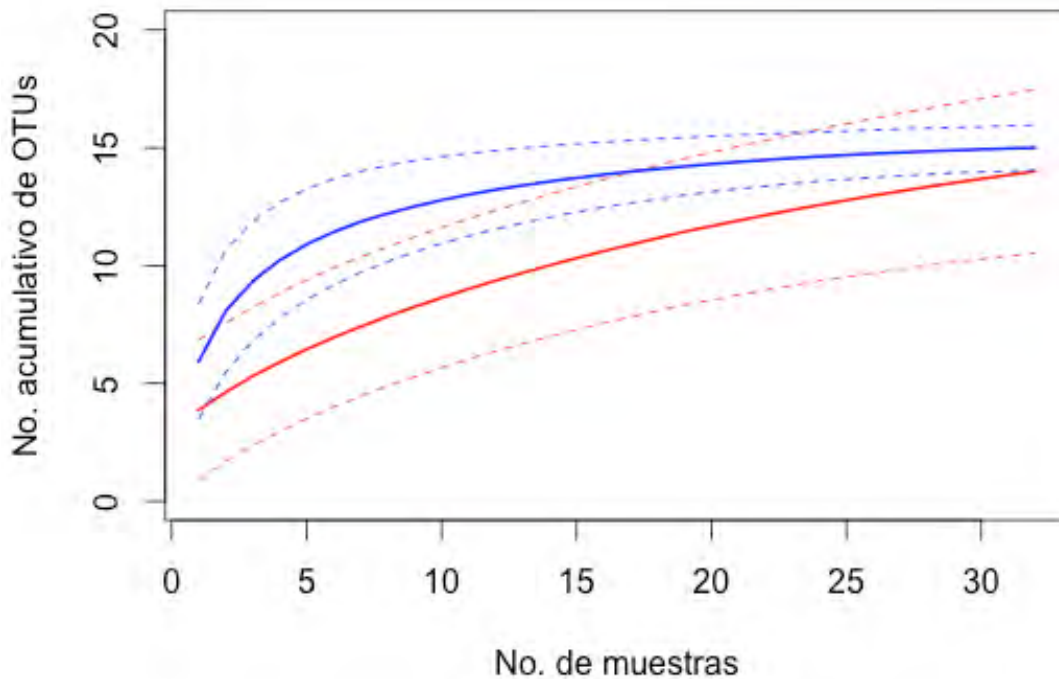


Fig. 3.2. Curva de rarefacción de la diversidad de OTUs extrapoladas a partir de 32 muestras de suelo de cada sitio; Cuatro Ciénegas (líneas rojas) y Valle de Guadalupe (líneas azules). Las líneas punteadas indican los intervalos de confianza al 95% para las medias (líneas continuas).

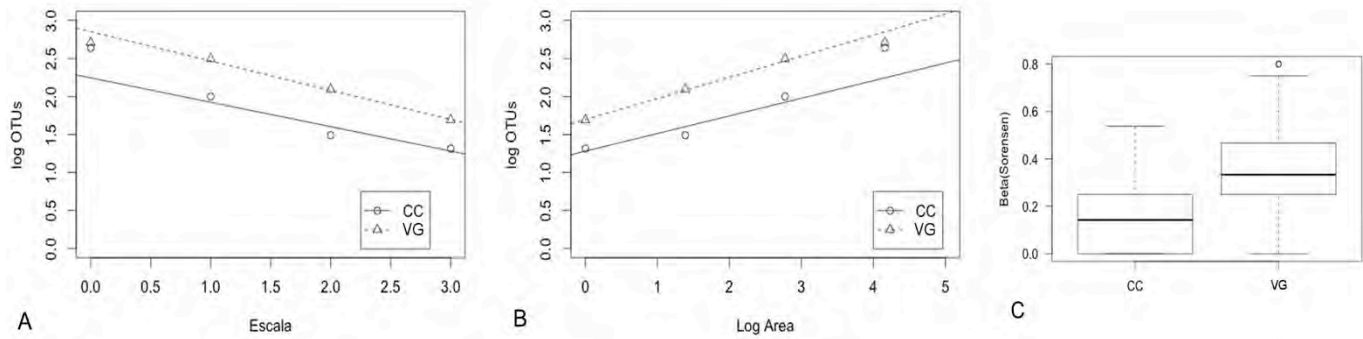


Fig. 3.3. A) Regresión lineal del logaritmo de la riqueza de OTUs en función la escala (0 = 64 m<sup>2</sup>, 1 = 16 m<sup>2</sup>, 2 = 4 m<sup>2</sup>, 3 = 1 m<sup>2</sup>) (CC: m = -0.3211; VG: m = -0.3851). B) Regresión lineal del logaritmo de la riqueza de OTUs contra el logaritmo del área muestreada (CC: m = 0.23; VG: m = 0.28). C) Diversidad  $\beta$  promedio estimada mediante el coeficiente de Sørensen para muestras pareadas (n = 496 para ambos sitios)

### 3.2 Análisis de similitud en composición y estructura de la comunidad

Se encontraron 6 OTUs (26%) compartidos por ambos sitios, de los cuales dos están presentes en casi todas las muestras de ambos sitios; sin embargo, estos OTUs no presentan la misma abundancia en ambos sitios (Fig. 4). La presencia de OTUs altamente recurrentes (T-RF 261 y T-RF 324) en muestras de ambos sitios, propició que el análisis de UPGMA se realizara sobre una matriz de disimilitud creada con un índice que incorporara datos de abundancia en su estimación por lo que se utilizó el índice de Bray-Curtis para realizar este análisis. El UPGMA realizado agrupa a las muestras por el sitio de origen (Fig. 3.4

De manera similar, el análisis de componentes principales (PCA) muestra un agrupamiento de las muestras por su sitio de origen, aunque las muestras de VG parecen formar un grupo más disperso que las muestras de CC (Fig. 3.5). El componente principal 1 (CP1) explica el 48.2% de la variación total de los datos y está otorgada mayoritariamente por los OTUs T-RF 121, T-RF 324 y T-RF 347; mientras que el componente principal 2 (CP2) explica el 14.7% y es otorgada mayoritariamente por los OTUs T-RF 261, T-RF 324 y T-RF 347. La posición relativa de cada muestra en el espacio definido por los ejes de componentes

principales puede ser usada para describir el grado de similitud en composición de la comunidad entre las muestras, lo cual indica una mayor similitud entre las muestras de cada sitio a pesar de los OTUs compartidos

Los análisis de agrupamiento que se realizaron para comparar la similitud en estructura y composición de OTUs de las muestras indican una mayor similitud de la comunidad diazotrófica en las muestras dentro de cada sitio que entre los sitios.

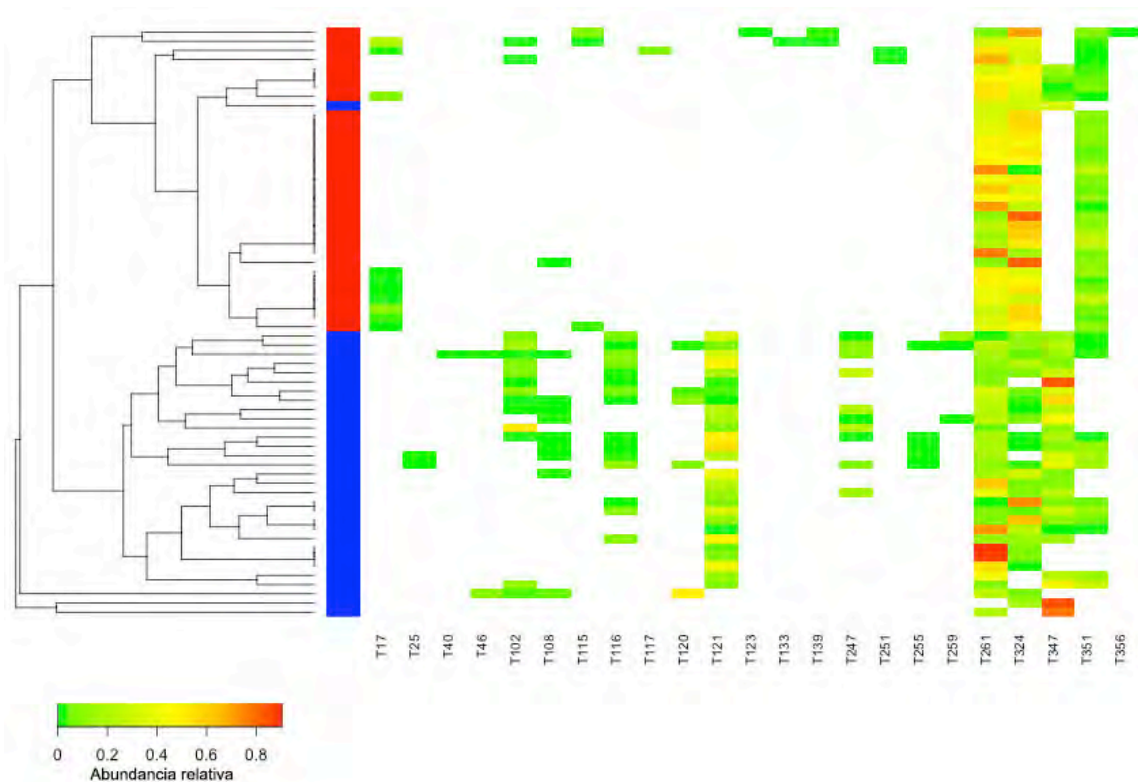


Fig. 3.4. Mapa de calor que muestra la abundancia relativa de cada OTU por muestra. El análisis de UPGMA mediante el cual se ordenaron las muestras fue realizado sobre una matriz de disimilitud creada con el índice Bray-Curtis para muestras pareadas. En color azul se observan las muestras de Valle de Guadalupe (VG) y en rojo las muestras de Cuatro Ciénegas (CC)

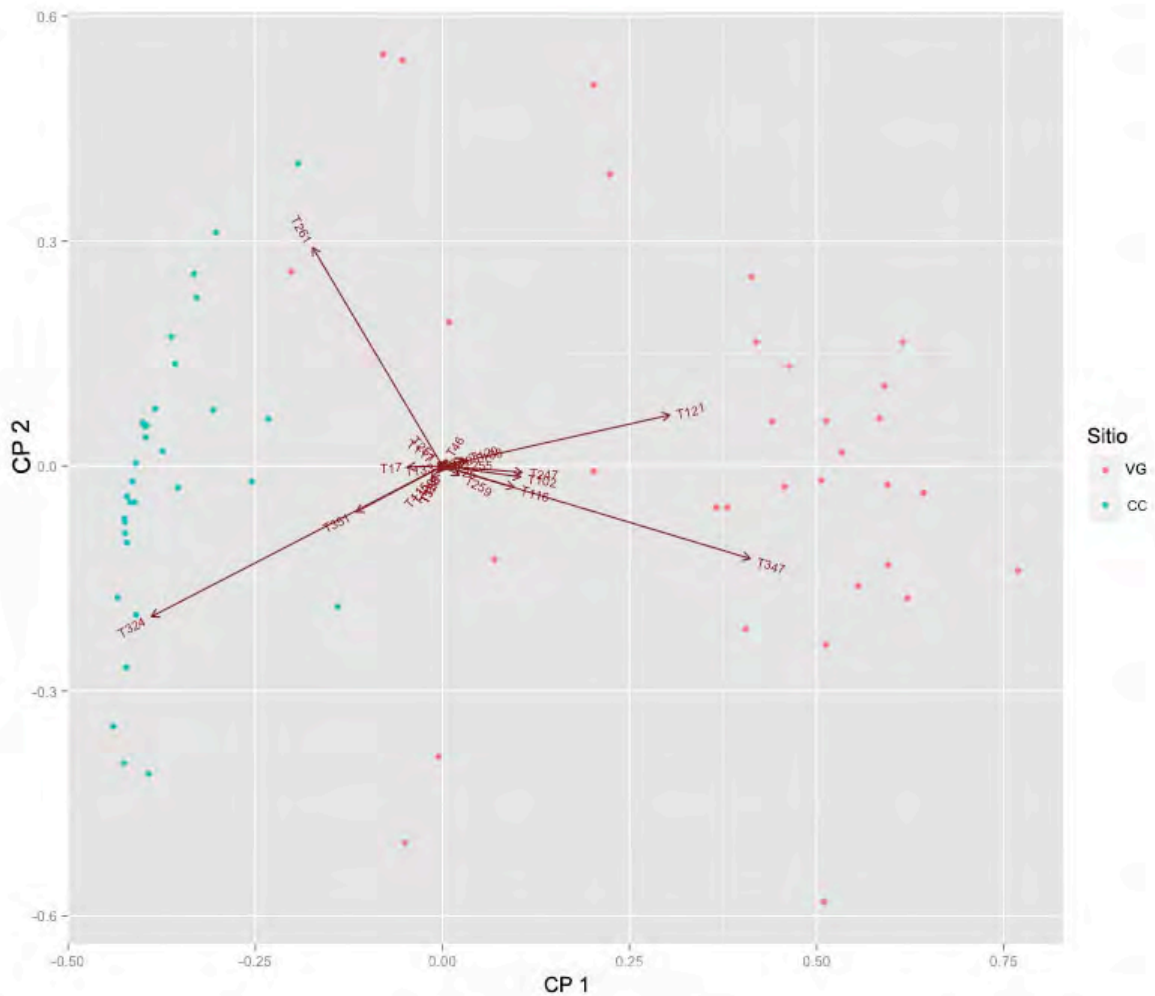


Fig. 3.5. Análisis de componentes principales realizado con los datos transformados de abundancias de OTUs. El componente principal 1 explica el 48.2% de la varianza de los datos mientras que el componente principal 2 explica el 14.7% de la varianza.

### 3.3 Ensayo de reducción de acetileno

Se obtuvieron valores que estiman la actividad catalítica de la nitrogenasa expresados como  $\mu\text{moles h}^{-1} \text{g}^{-1}$  de peso seco. Los valores más altos que se obtuvieron corresponden a las muestras de CC (Fig. 3.6). Cabe resaltar, que aunque en la mayoría de los estudios reportados donde se realiza el ensayo de reducción de acetileno sólo se presentan datos de reducción de acetileno ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) a etileno ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ), se ha reportado que algunas variantes de la nitrogenasa pueden reducir el acetileno hasta etano ( $\text{C}_2\text{H}_6$ ) (Dilworth et al. 1988). En este

estudio se encontró, además de la producción de etileno a partir de acetileno, la producción de etano en las muestras de ambos sitios, aunque los valores son mucho menores a los obtenidos de etileno. Los promedios de la producción de etileno fueron significativamente diferentes entre CC y VG ( $t = 3.04$ , g.l. = 43,  $p < 0.005$ ), mientras que las medias de producción de etano no fueron significativamente diferentes entre los dos sitios ( $t = 0.38$ , g.l. = 30,  $p = 0.7$ ).

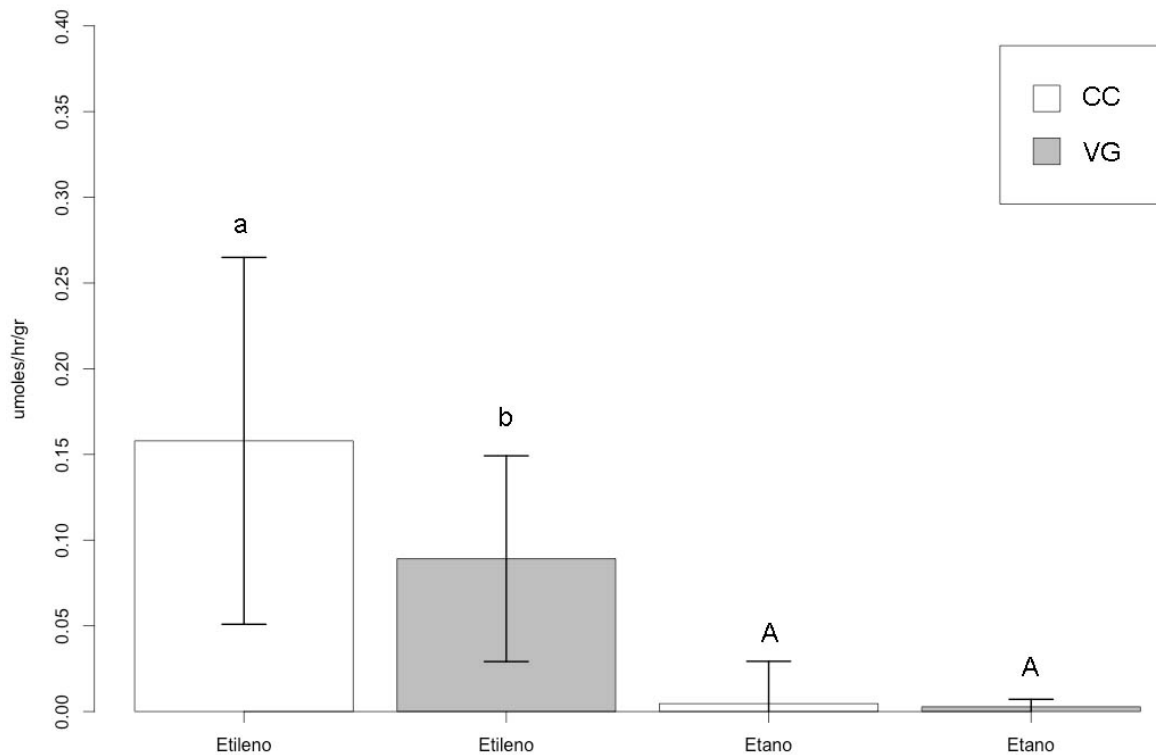


Fig. 3.6. Producción de etileno y etano por h.

### 3.4 Análisis de correlación entre composición y estructura de la comunidad y actividad catalítica de la nitrogenasa

Con el objetivo de probar si las diferencias en composición y estructura de cada una de las muestras podían explicar los valores de producción de etileno, se realizaron tres pruebas de Mantel entre los datos de estructura y composición de la comunidad y los datos derivados del ensayo de reducción de acetileno. En la

primera, se evaluaron los datos de ambos sitios en conjunto dando una correlación no significativa ( $r = -0.005$ ,  $p = 0.49$ ). Para la segunda prueba de Mantel se compararon únicamente los datos obtenidos de las muestras de CC y no se encontró una correlación significativa ( $r = -0.123$ ,  $p = 0.81$ ). En la tercera prueba de Mantel que se realizó se compararon únicamente los datos provenientes de las muestras obtenidas en VG y se encontró una correlación positiva y significativa ( $r = 0.3088$ ,  $p = 0.016$ ).



## IV. DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis de diversidad

De acuerdo con la primera hipótesis se esperaba que las comunidades presentaran una composición y estructura distinta. Y en efecto, los resultados muestran que a pesar de compartir seis OTUs las comunidades de ambos sitios se distinguen claramente en composición. En primera instancia, los estimadores de diversidad alfa que se emplearon (Figs. 3.1 A, B y C) indican que el sitio de Valle de Guadalupe (VG) es más diverso que el sitio de Cuatro Ciénegas (CC). Sin embargo, se debe considerar que el uso de datos de técnicas de “fingerprinting” para estimar la diversidad mediante índices de diversidad presenta ciertas limitantes. Se ha observado que las técnicas de “fingerprinting” subestiman la diversidad presente en una comunidad (Dunbar et al. 2001). Particularmente, al realizar análisis de T-RFLPs esta subestimación se debe principalmente a tres factores: (1) distintos taxa puede generar el mismo tamaño de fragmento, (2) algunos fragmentos son excluidos cuando están fuera del rango que la electroforesis puede resolver confiablemente, y (3) algunos fragmentos no son detectados por estar por debajo del umbral de fluorescencia (Blackwood et al. 2007). Por estas razones los estimados de diversidad basados en datos de T-RFLPs son limitados en proveer información precisa sobre la diversidad real de las comunidades bacterianas. No obstante, trabajos empíricos a menudo encuentran diferencias significativas entre comunidades de diferentes ambientes al utilizar índices de diversidad (Fierer y Jackson 2006), lo cual apunta a que los índices no varían aleatoriamente en el campo. En este sentido, se deben tomar consideraciones al interpretar los índices como estimadores de la diversidad, no obstante, éstos pueden estar indicando cambios en la estructura de las comunidades. Adicionalmente, Blackwood et al. (2007) encontraron, a través de un análisis de simulaciones de perfiles de T-RFLPs, que el índice de Shannon-Wiener obtenido de los datos de los perfiles de T-

RFLPs se correlaciona bien con el que se obtiene del análisis de las secuencias en comunidades no tan diversas (<1200 especies/OTUs). Considerando los argumentos anteriores, los índices de diversidad deben interpretarse como indicadores de comunidades distintas, mas que comunidades más diversas que otras. Sin embargo, los análisis multivariados basados en abundancias son más sensibles y apropiados para detectar este tipo de cambios en las comunidades (Hartmann y Widmer 2006). Por otra parte, el análisis de enrarecimiento apunta a que la riqueza de OTUs observada con el muestreo realizado no es diferente entre ambos sitios (Fig.3.2). Esto debido a que los intervalos de confianza de ambas curvas se sobreponen (Hughes y Hellmann 2005). La forma de las curvas de enrarecimiento pueden estar indicando que el muestreo en CC no es representativo de la comunidad. Los análisis de diversidad realizados muestran que la diversidad de diazótrofos de las costras biológicas de los sitios de estudio no es diferente a pesar de observarse un OTU más en VG.

La evaluación de la diversidad beta a través del índice de Sørensen (Fig. 3.3C) revela que el recambio de especies en CC es mayor que en VG. Esto puede deberse a la presencia de OTUs raros (aquéllos presentes con baja abundancia en sólo una o dos muestras). El esquema de muestreo realizado permite no sólo evaluar la diversidad alfa en distintas muestras y tener un muestreo representativo de un sitio sino también hace posible evaluar la diversidad beta en cuatro escalas espaciales mediante regresiones lineales de la riqueza de OTUs en función del área muestreada (Fig. 3.3A). Este análisis ha sido realizado previamente para evaluar la distribución de procariontes en un bosque tropical caducifolio de la costa oeste de México (Noguez et al. 2005), encontrando valores de diversidad beta ( $\beta$ ) que van de 1.78 a 1.91. Los valores de diversidad beta obtenidos de las comunidades de diazótrofos de CC ( $\beta = 0.72$ ) y VG ( $\beta = 0.68$ ) son mucho menores que los obtenidos por Noguez et al. (2005). Esto puede estar explicado por el enfoque taxonómico de los estudios realizados ya que el presente estudio describe sólo un subconjunto de la diversidad procarionte total. Además, cabe la posibilidad de que en total las

comunidades procariontes de suelos de bosques tropicales sean más heterogéneas espacialmente que las comunidades de suelos de desierto.

Por otra parte, por medio de regresiones lineales del logaritmo de la riqueza de especies en función del logaritmo del área muestreada (Fig.3.3B) se obtuvo un valor de  $z$  de 0.28 para VG y 0.23 para CC. Estos valores son considerablemente menores a los obtenidos por Noguez et al. (2005) ( $z = 0.42-0.47$ ). En la tabla 4.1 se muestran distintos estudios que evalúan el valor  $z$  y se busca comparar éste en función de el ambiente estudiado y el método empleado encontrándose que los valores de  $z$  varían sustancialmente (0.019-0.47). Tal variación puede deberse a distintos factores, desde las diferencias en la distribución espacial de los microorganismos en distintos ambientes, la resolución taxonómica que permiten las técnicas empleadas, hasta artefactos del muestreo influyen en los patrones de distribución observados. En ese sentido, en algunos estudios se ha observado que en escalas locales las limitaciones a la dispersión (distancia geográfica) y deriva ecológica podrían estar dictando los patrones de distribución observados. Mientras que en escalas regionales y continentales los factores ambientales influyen más en la distribución de los microorganismos (Martiny et al. 2011, Hanson et al. 2012). De acuerdo con esto, los resultados obtenidos nos indican que a la escala del muestreo en cada sitio la distribución de los organismos diazótrofos de costras biológicas es similar a la que se observa en plantas y animales en escalas regionales ( $z \approx 0.25$ ) con hábitats contiguos (Rosenzweig 1995). Considerando la escala del muestreo ( $64 \text{ m}^2$ ), es poco probable que los patrones de distribución observados se deban a la heterogeneidad ambiental, por lo que es plausible que los patrones observados se deban a procesos estocásticos o limitaciones en la dispersión. Por otra parte, al comparar la composición de las comunidades de ambos sitios se observan diferencias en composición y estructura que podrían estar relacionados con las condiciones ambientales de cada sitio, este punto se discute más adelante. Por otra parte, se debe tomar en cuenta que el valor de  $z$  varía dependiendo de la resolución taxonómica que se utilice.

Tabla 4.1. Tabla comparativa donde se muestran distintos estudios que han obtenido el valor z en distintos ambientes y con distintas técnicas de muestreo. Datos ordenados de forma creciente por el valor de z.

Organismo	Método de caracterización de riqueza	Hábitat	z	Escala aproximada	Referencia
Bacterias	Secuencias del gen 16S ribosomal	Sedimentos de marismas costeros	0.019-0.040 <sup>a</sup>	$9 \times 10^{-10}$ - $0.9\text{km}^2$	Horner-Devine et al. (2004)
Bacterias	T-RFLPs (gen 16S)	Suelo	0.030	$400$ - $10^8\text{km}^2$	Fierer y Jackson (2006)
Ciliados	Morfoespecies	Bentos	0.043	$9 \times 10^{-9}$ - $2 \times 10^6\text{km}^2$	Finlay (2002)
Diatomeas	Morfoespecies	Bentos	0.066	$10^{-4}$ - $10^{12}\text{km}^2$	Azovsky (2002)
Hongos	ARISA	Suelos de desierto	0.074	$4 \times 10^{-11}$ - $10^4\text{km}^2$	Green et al. (2004)
Ciliados	Morfoespecies	Bentos	0.077	$10^{-4}$ - $10^{12}\text{km}^2$	Azovsky (2002)
Bacterias	GeoChip	Suelos de bosque	0.047-0.095 <sup>a</sup>	$2 \times 10^{-8}$ - $0.5\text{km}^2$	Zhou et al. (2008)
Bacterias	DGGE (gen 16S)	Lagos	0.104	$0.1$ - $1.5\text{km}^2$	Reche et al. (2005)
Diazótrofos	T-RFLPs (gen <i>nifH</i> )	Costras biológicas del suelo	0.230 y 0.280 <sup>b</sup>	$10^{-6}$ - $6 \times 10^{-5}\text{km}^2$	Este estudio
Bacterias	DGGE (gen 16S)	Tanques recolectores de fluidos	0.246-0.294 <sup>c</sup>	9-180 L	Van Der Gast et al. (2005)
Bacterias	DGGE (gen 16S)	Huecos de árboles	0.260	0.05-18 L	Bell et al. (2005)
Bacterias	T-RFLPs (gen 16S)	Suelos de bosque	0.420 y 0.470 <sup>b</sup>	$10^{-6}$ - $6 \times 10^{-5}\text{km}^2$	Noguez et al. (2005)

<sup>a</sup> El valor de z varía dependiendo de la resolución taxonómica y enfoque taxonómico.

<sup>b</sup> Los distintos valores se refieren a sitios de muestreo distintos.

<sup>c</sup> Los distintos valores se refieren a muestreos realizados en distintos tiempos

Horner-Devine et al. (2004) observaron que el valor de z incrementaba de 0.019 cuando definían los OTUs al 97% de similitud en las secuencias a 0.040 cuando definían OTUs con 99% de similitud en las secuencias. Adicionalmente, en un estudio realizado en suelos de un bosque caducifolio se calcularon distintos valores de z en transectos de 1 km; evaluando la riqueza de taxa mediante

arreglos de genes que contienen sondas para genes funcionales (GeoChip; Zhou et al. 2008). Al calcular el valor de  $z$  utilizando todas las secuencias individuales de genes funcionales se obtuvo un valor de 0.0624. Sin embargo, los valores de  $z$  obtenidos varían considerablemente entre distintos grupos funcionales y filogenéticos ( $z = 0.0475-0.0959$ ). Por ejemplo, el valor de  $z$  obtenido para los genes involucrados en la fijación de nitrógeno (*nifH*) es de 0.0898, mucho mayor que el valor obtenido para los genes involucrados en la reducción de nitratos ( $z = 0.0485$ ).

También es importante notar que aquellos trabajos que obtienen valores bajos de del valor  $z$  ( $\leq 0.1$ ) son aquéllos realizados en escalas que varían desde la local hasta la continental ( $1 \times 10^{10}-10^{12} \text{ km}^2$ ), en los que se intenta representar áreas muy grandes con muestras puntuales. Por otra parte los trabajos que muestran valores de  $z > 0.1$ , son aquéllos realizados en una escala local ( $1 \times 10^{10}-1 \times 10^4 \text{ km}^2$ ) en los cuales varias muestras son tomadas para representar un área pequeña y un solo ambiente. En este sentido, es posible que las diferencias entre los valores de  $z$  obtenidos entre estos estudios se deba a un muestreo inequitativo. Cuando un área pequeña es muestreada más extensivamente (más número de muestras o individuos) la riqueza de especies observadas incrementará incluso cuando la diversidad real de la comunidad permanezca sin cambios (Cam et al. 2002, Turner y Tjørve 2005). Por el contrario, cuando áreas en la escala regional son representadas con muestras muy distantes es posible que se estén muestreando comunidades distintas pero al estar subrepresentadas por una muestra puntual la diversidad que se observa en esta muestra estaría representando sólo a aquellos organismos con una gran abundancia y amplios rangos de dispersión, por lo que se generarían bajos valores de  $z$ . En ese sentido, las técnicas utilizadas para explorar la diversidad microbiana por lo general presentan sesgos al muestrear una comunidad. También los métodos de análisis crean un sesgo, desde los métodos de extracción de ácidos nucleicos hasta la amplificación de una secuencia por medio de PCR presentan sesgos en su capacidad para capturar la diversidad

microbiana. En el caso del PCR, generalmente, solo una pequeña porción de la comunidad (< 1%) es muestreada aleatoriamente (Woodcock et al. 2006). Una comunidad de suelo contiene típicamente 2000-18000 genomas (Torsvik y Øvreås 2002), al muestrear por PCR una comunidad repetidas veces la probabilidad de muestrear la misma porción de la comunidad es muy baja. Debido a que diferentes porciones de una comunidad son muestreadas en diferentes eventos de muestreo la heterogeneidad en composición observada aumentará. Las limitantes que presentan las técnicas independientes de cultivo implican que es difícil detectar simultáneamente a los miembros comunes y a los miembros raros de una comunidad microbiana (los cuales contribuyen mayoritariamente a la diversidad de una comunidad). Por lo tanto, al realizar análisis en escalas regionales o más grandes de comunidades microbianas la acumulación de taxa raros que dictan el valor de  $z$  en las relaciones taxa-área es difícil de detectar (Woodcock et al. 2006). Debido a los argumentos previamente expuestos, se debe considerar que los hallazgos de este estudio pueden ser el reflejo de un patrón local dado que el área de muestreo es de sólo de 64 m<sup>2</sup>, el cual puede no cumplirse a una escala biogeográfica.

## **4.2 Análisis de composición y estructura de la comunidad diazotrófica**

Los análisis multivariados que se realizaron para clasificar las muestras basándose en la abundancia de los taxa presentes nos muestran que las comunidades de ambos sitios son diferentes, esto de acuerdo con la primera hipótesis planteada. En general, estos análisis muestran una mayor similitud de la comunidad diazotrófica entre las muestras de cada sitio que entre sitios a pesar de los OTUs compartidos. El análisis de agrupamiento (Fig. 3.4) muestra dos grupos de muestras, uno formado por las muestras de CC y otro por las muestras de VG. También se observa el cambio de abundancia de los OTUs T-RF 261, T-RF 324 y T-RF 347 el cual está presente solo en el 12% de las muestras de CC. En cambio, este OTU está presente en el 88% de las muestras

de VG. De acuerdo con esto, el análisis de componentes principales (Fig. 3.5) indica que la mayor parte de la variación de los datos proviene de los OTUs anteriormente mencionados, además del OTU T-RF 121 el cual está presente en el 94% de las muestras de VG. Se observa una disminución de la abundancia de los OTUs T-RF 261 y T-RF 324 en las muestras de VG en comparación con las muestras de CC. De manera similar, se observa el incremento de la presencia del OTU T-RF 347 y T-RF 121 el cual está sólo presente en VG y representado en casi todas las muestras de este sitio. En general, se observa el cambio de la dominancia de los OTUs compartidos entre las muestras de ambos sitios, mientras que aquellos OTUs únicos de cada sitio están presentes en baja abundancia.

Con el objetivo de darles identidad filogenética a los OTUs observados se compararon con los reportados en otros estudios en los que analizan las comunidades diazotróficas de las costras biológicas mediante perfiles de T-RFLPs y secuenciación de clonas del gen *nifH* (Yeager et al. 2004, 2012). Esta comparación es válida ya que se realizaron los mismos procedimientos metodológicos para obtener los perfiles de T-RFLPs (i.e. mismos oligonucleótidos, enzimas de restricción). En la tabla 4.2 se señalan los OTUs observados y los previamente reportados en la literatura. De acuerdo con esta tabla, se puede asumir que los organismos más abundantes de la comunidad diazotrófica de las costras biológicas en los sitios de estudio son cianobacterias. Este hallazgo es concordante con estudios previos en los que se reportan las cianobacterias como los procariontes más abundantes en las costras biológicas (Belnap 2003c). Las cianobacterias han desarrollado distintos mecanismos que les permiten lidiar con el déficit hídrico e intensa radiación solar, características de ambientes áridos. Estos mecanismos comprenden pigmentos fotoprotectores (Gao y Garcia-Pichel 2011), osmoregulación y respuestas a la desecación (Billi y Potts 2002, Potts 1999).

Tabla 4.2. Tabla comparativa de correspondencia e identidad putativa de los OTUs observados con los reportados en trabajos previos (Yeager et al. 2004, 2012). Los OTUs sombreados en rojo corresponden a los encontrados en CC, los azules corresponden a los encontrados en VG y los amarillos corresponden a los OTUs compartidos entre ambos sitios.

Tamaño de T-RF observado (pb)	Tamaño de T-RF con correspondencia a posible reportado en Yeager et al. (2004)(pb)	Posible identidad según Yeager et al. (2004)	Tamaño de T-RF con correspondencia a posible reportado en Yeager et al. (2012) (pb)	Posible identidad según Yeager et al. (2012)
115	113	Desconocida*		
123	126	Nostoc	126	Scytonema hyalinum/Nostoc commune
356	358	$\alpha$ -Proteobacteria		
25	26	Nostoc	29	Spirirestsis rafaensis/Nostoc commune
120 121	120	$\alpha$ -Proteobacteria	120	$\alpha$ -Proteobacteria
247	250	Nostoc	250	Nostoc commune
108	107	Desconocida*		
261	266	<i>Nostoc</i> /Cyanobacteria	266	Scytonema hyalinum
324	330	Cyanobacteria	330	Spirirestsis rafaensis

\*No se encontraron secuencias que otorgaran este tamaño

Además, la producción de polisacáridos extracelulares otorga una protección extra contra la desecación al regular la retención de agua de la célula y sirve como matriz para la inmovilización de compuestos fotoprotectores (Mazor et al. 1996, Caiola et al. 1996). Estas características confieren a las cianobacterias ventajas para su establecimiento en ambientes áridos. No obstante, no todas las especies cianobacterianas presentan la misma capacidad para tolerar tales condiciones. Distintos tipos de evidencia sugieren que distintas especies de cianobacterias de la comunidad diazotrófica difieren en características que les permiten soportar tales condiciones ambientales. Se ha observado que *Scytonema hyalinum* produce una mayor cantidad de



scitonemina (fotopigmento protector) que *Spirirestis rafaensis* en condiciones de cultivo (Yeager et al. 2012). Lo cual permitiría soportar más la radiación UV a *S. hyalinum*. Por otra parte, la distribución geográfica de secuencias del gen 16S rRNA más cercanamente relacionadas ( $\geq 98\%$  de similitud) a *S. hyalinum* han sido encontradas en regiones hiperáridas de América del sur y Asia (Pointing et al. 2007, Lacap et al. 2011, Azúa-Bustos et al. 2011). Por el contrario, las secuencias más relacionadas con *S. rafaensis* han sido encontradas en una variedad de ambientes además de desiertos (Korelusová 2008). Esto puede estar indicando que *Scytonema* está mejor adaptado a condiciones áridas. No obstante, secuencias relacionadas con ambas especies han sido obtenidas en desiertos fríos y calientes del suroeste de Estados Unidos (Flechtner et al. 2002; Yeager et al. 2007). Además, estudios enfocados en describir la diversidad de las comunidades hipolíticas (que habitan debajo de las rocas) cianobacterianas de desiertos en todo el mundo han observado patrones biogeográficos relacionados con el clima entre las comunidades de desiertos fríos y calientes (Pointing et al. 2007; Bahl et al. 2011). Por otra parte, un estudio reciente reveló a través de pruebas fisiológicas que los taxa cianobacterianos más dominantes en las costras biológicas del suroeste de Estados Unidos, *Microcoleus vaginatus* y *Microcoleus steenstrupii*, muestran características psicrófilas y termófilas, respectivamente (García-Pichel et al. 2013). De igual manera, observaron que la dominancia de estos dos taxa variaba en una gradiente latitudinal dependiendo principalmente de la temperatura media anual, siendo que *M. vaginatus* dominaba en las localidades más al norte y con temperaturas más frías mientras que *M. steenstrupii* dominaba en las localidades más al sur con temperaturas más cálidas. Los resultados del análisis de T-RFLPs obtenidos en este estudio muestran un patrón similar ya que se observa un cambio en la dominancia de los OTUs más abundantes. Los OTUs más abundantes en CC (T-RF 261 y T-RF 324) bajan su abundancia en VG y por el contrario los OTUs T-RF 347 y T-RF 121 (éste último que se encuentra presente sólo en VG) aumentan su presencia y abundancia en VG. En otras palabras, se observa un cambio de dominancia de

los OTUs más abundantes de un desierto frío a un desierto caliente. De acuerdo con las posibles identidades de los OTUs presentes (Tabla 4.2, Yeager et al. 2012), se observa que *Scytonema hyalinum* y *Spirirestis rafaensis* son los OTUs más abundantes en CC. Mientras que en VG la presencia de  $\alpha$ -proteobacterias es más abundante y la identidad del T-RF 347 es desconocida. La identidad específica de los diazotófos pertenecientes a las  $\alpha$ -proteobacterias ha sido revisada en otros trabajos (Roesch et al. 2010, Pereira e Silva et al. 2011). Algunos autores han propuesto la interacción entre *M. vaginatus* y diazotófos heterótrofos, ya que esta cianobacteria es incapaz de fijar nitrógeno mientras que los polisacáridos exudados proveen un hábitat propicio para diazotófos heterótrofos (Steppe et al. 1996). Este podría ser el caso de la comunidad de VG en la que se observa una alta frecuencia de OTUs posiblemente correspondientes a  $\alpha$ -proteobacterias y ya que al ser un desierto frío es posible que haya una mayor abundancia de *M. vaginatus*.

Para poder asignar identidad taxonómica a cada uno de los OTUs observados es necesario obtener secuencias de los amplicones de *nifH*. Sería ideal utilizar técnicas de cultivo con el objetivo de recuperar a las cianobacterias diazotófas más abundantes para complementar la identificación taxonómica mediante observaciones morfológicas y secuenciación e identificación de los genes *nifH* y 16S rRNA. Adicionalmente, se podrían implementar pruebas fisiológicas como las reportadas por Garcia-Pichel et al. (2013) para determinar si distintos taxa de cianobacterias diazotófas también muestran características psicrófilas o termófilas.

### **4.3 Evaluación de la actividad metabólica de la comunidad diazotrófica de costras biológicas**

Se realizó el ensayo de reducción de acetileno para evaluar la actividad catalítica de la nitrogenasa como un estimado de la capacidad metabólica de la comunidad diazotrófica de las costras biológicas para fijar nitrógeno. Este procedimiento mostró que las muestras de costras biológicas de CC presentan

una mayor actividad catalítica de la nitrogenasa en comparación con las muestras de VG bajo las condiciones experimentales utilizadas (Fig. 3.6). De igual forma se observan cambios en la estructura de las comunidades diazotróficas de ambos sitios, dictadas principalmente por el cambio de dominancia de los OTUs más abundantes (Figs. 3.4 y 3.5). Tomando en consideración la posible identidad de los OTUs observados (Tabla 4.2), en CC hay una mayor abundancia de las cianobacterias heterocísticas *Scytonema hyalinum* y *Spirirestis rafaelenisis*. Estas especies muestran una mayor actividad de la nitrogenasa, evaluada mediante el ensayo de reducción de acetileno, que las especies de la familia Nostocales. Esto debido a que las cepas relacionadas con *Nostoc* presentan un envoltorio mucilaginoso más grueso que las especies mencionadas anteriormente, lo cual puede estar limitando la incidencia de luz en la célula y la difusión de gases lo que provocaría una menor tasa de fijación de nitrógeno (Hrčková et al. 2010). Además, se ha observado que a pesar de que *Scytonema* y *Spirirestis* son especies filamentosas, *Scytonema* puede llegar a producir un envoltorio de mucílago más grueso que *Spirirestis* (Yeager et al. 2012). Por lo tanto, es posible que *Spirirestis* tenga la capacidad de fijar nitrógeno a mayores tasas que otras especies presentes típicamente en costras biológicas. Adicionalmente, mediciones hechas en campo han mostrado que la actividad de la nitrogenasa (evaluada mediante el ensayo de reducción de acetileno) llega a ser de 5 a 20 veces más alta en primavera cuando *Spirirestis* comprende una fracción más grande de la comunidad diazotrófica que en otoño en costras biológicas de la meseta de Colorado (Housman et al. 2006). Tomando en consideración los argumentos anteriores, las diferencias en abundancia de los OTUs T-RF 261 y T-RF 324, que posiblemente corresponden con *Scytonema hyalinum* y *Spirirestis rafaelenisis*, respectivamente, podrían explicar las diferencias en la actividad catalítica de la nitrogenasa observadas en este trabajo.

De acuerdo con la segunda hipótesis, se observó que comunidades diazotróficas con diferente composición y estructura, bajo las mismas

condiciones experimentales, muestran diferencias en la tasa de fijación de nitrógeno evaluada mediante el ensayo de reducción de acetileno. De manera similar, la posible identidad taxonómica de los OTUs observados podrían estar explicando estas diferencias en la actividad metabólica de las muestras. También se observó la producción de etano en el ensayo de reducción de acetileno (Fig. 3.6). Se ha observado que esta reacción de reducción de etileno a etano está catalizada por las nitrogenasas que tienen vanadio como cofactor (Dilworth et al. 1988). El análisis de secuencias de amplicones del gen *nifH* permitirían confirmar la presencia de estas variantes de la nitrogenasa en costras biológicas. Por otra parte, si se deseara investigar cuáles taxa son responsables de las diferencias en la actividad metabólica hay distintas aproximaciones que se pueden tomar para abordar esta pregunta. Por una parte, se pueden aislar en cultivos puros los distintos taxa cianobacterianos identificados como fijadores de nitrógeno y evaluar la actividad catalítica de la nitrogenasa por medio del ensayo de reducción de acetileno en condiciones de laboratorio (Hrčková et al. 2010), para determinar cuál de los taxa presentes en costras biológicas podrían estar contribuyendo mayoritariamente a la fijación de nitrógeno en campo. Por medio de PCR cuantitativo (qPCR) con retrotranscripción se puede cuantificar la expresión del RNA mensajero del gen *nifH* y determinar si ésta se correlaciona con una mayor actividad catalítica de la nitrogenasa (ensayo de reducción de acetileno). Finalmente, por medio de un análisis de transcriptómica se puede determinar que taxa estarían aportando más complejos de nitrogenasa en la comunidad de las costras biológicas determinando la identidad y abundancia de los RNA mensajeros del genes del *nifH*.

De acuerdo con la segunda hipótesis, se esperaba que las muestras con composición y estructura similar mostraran valores similares de actividad catalítica de la nitrogenasa evaluada mediante el ensayo de reducción de acetileno. Sin embargo, a pesar de que hay diferencias significativas en la actividad catalítica de la nitrogenasa entre las muestras de ambos sitios y que la

composición y estructura de las comunidades diazotróficas es distinta, no hay una correlación entre la composición y estructura de la comunidad y la actividad catalítica de la nitrogenasa. Sólo al realizar la prueba de Mantel con los datos obtenidos únicamente de las muestras de VG es significativa la correlación. Estos resultados pueden deberse a distintos factores. En primera instancia, cabe la posibilidad de que los organismos más abundantes en una comunidad microbiana no siempre son los más metabólicamente activos. En ese sentido, se debe considerar que al muestrear una comunidad utilizando el DNA como unidad de muestreo se observa solamente la presencia de un gen o un organismo (a través del gen 16S ribosomal), mas no se puede determinar si dicho gen está siendo constitutivamente expresado ni tampoco si dicho organismo es metabólicamente activo al momento de realizar las mediciones, por lo que los patrones de composición y estructura de las comunidades diazótroficas muestreadas mediante perfiles de T-RFLPs no necesariamente estarían relacionados con las mediciones actividad catalítica de la nitrogenasa. Es posible que los datos de expresión del gen *nifH* obtenidos mediante PCR de tiempo real con retro transcripción se correlacionen mejor con los datos obtenidos del ensayo de reducción de acetileno, ya que de esta forma se estarían comparando datos sobre la actividad catalítica de la nitrogenasa con datos de la expresión de la nitrogenasa, y no con datos sobre presencia de genes. Además, hay otros factores que afectan la actividad catalítica de la nitrogenasa que son independientes de la abundancia de los organismos diazótroficos. Las condiciones preexistentes a la toma de muestras también pueden afectar la actividad de la nitrogenasa en el momento de realizar las mediciones, ya que influye en la cantidad de nutrientes, ATP y las reservas de compuestos nitrogenados (Belnap 2003b). De igual forma la salinidad y el pH del suelo influyen en la actividad catalítica de la nitrogenasa (Belnap 2003b). Si las muestras recibieron agua antes de ser colectadas es probable que se hayan generado fotosintatos necesarios para la producción de ATP y otras moléculas necesarias para la fijación de nitrógeno, por lo que la actividad de la nitrogenasa

se reanuda más rápido en muestras que recibieron humedad antes del muestreo. Aunque en este estudio no se determinaron las características fisicoquímicas de las muestras de suelo obtenidas, es posible que variaciones en dichos parámetros puedan estar influyendo en la actividad de la nitrogenasa. De esta forma se explica que no haya una relación lineal entre la actividad catalítica de la nitrogenasa y la composición y estructura de la comunidad para poder ser detectado por las pruebas de Mantel.

## V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos sobre la composición y estructura de las comunidades diazotróficas de costras biológicas de desiertos de México son concordantes con otros estudios en los que se observa que las cianobacterias que habitan desiertos muestran patrones de distribución relacionados con la temperatura y estacionalidad de lluvias (Pointing et al. 2007; Bahl et al. 2011; Garcia-Pichel et al. 2013). Los organismos diazótrofos de las costras biológicas muestran patrones de distribución espacial en una escala local (64 m<sup>2</sup>) similares a los que se observan en macroorganismos en escalas regionales.

Por otro lado, a pesar de haber diferencias en la composición y estructura de las comunidades de ambos sitios y de haber detectado diferencias significativas entre el potencial de la actividad catalítica de la nitrogenasa (evaluada mediante el ensayo de reducción de acetileno) de ambos sitios, no se encontró una correlación entre la composición de las muestras y la actividad catalítica de nitrogenasa. Esto puede deberse a distintos factores que afectan la actividad catalítica de la nitrogenasa además de la presencia de organismos diazótrofos.

Es probable que las diferencias en composición de taxa de las costras biológicas de los sitios de estudio se deban a la influencia del ambiente y que distintos taxa presenten adaptaciones para soportar distintas condiciones ambientales. De acuerdo con esto, diversos estudios han aportado información que apoya la hipótesis de que la distribución los microorganismos, al igual que los macroorganismos, esta determinada por factores ambientales contemporáneos, así como eventos históricos sucedidos en el pasado geológico. Sin embargo, se necesitan datos obtenidos mediante distintas aproximaciones metodológicas que permitan revelar si estos microorganismos muestran adaptaciones a las distintas condiciones ambientales en las que se encuentran. Por otra parte, para determinar si efectivamente la composición de una comunidad influye en la capacidad para llevar a cabo alguna función

ecosistémica se debe abordar esta interrogante con una metodología experimental que permita, simultáneamente, probar la influencia del ambiente y la influencia de la composición en el proceso ecosistémico que se está evaluando. Distintos autores han señalado la necesidad de utilizar un mismo marco teórico en los estudios que sigan esta línea de investigación con el objetivo de generar información sistematizada y comparable bajo los mismos conceptos (Prosser et al. 2007, Allison y Martiny 2008). En este sentido, se ha sugerido utilizar tres metodologías experimentales que se utilizan a menudo en estudios con macroorganismos: tratamientos ambientales, jardines comunes y trasplantes recíprocos (Reed y Martiny 2007). A pesar de que la composición microbiana no puede ser fácilmente manipulada en el campo, estos experimentos permiten probar y discernir los efectos de la composición microbiana y los parámetros ambientales en el funcionamiento ecosistémico de las comunidades. Esta información tiene el potencial de mejorar el entendimiento sobre la relación que guarda la diversidad microorganísmica con los procesos ecosistémicos que llevan a cabo, lo cual permitirá predecir de forma más certera los efectos del cambio climático en los ecosistemas, establecer prioridades de conservación y manipular comunidades microbianas con fines de biorremediación y de interés socioeconómico.



## LITERATURA CITADA

- Acinas, S.G., R. Sarma-Rupavtarm, V. Klepac-Ceraj y M.F. Polz. 2005. PCR-induced sequence artifacts and bias : insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8966–69.
- Allison, S.D. y J.B.H. Martiny. 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 11512–19.
- Amundson, R., D.D. Richter, G.S. Humphreys, E.G. Jobbágy y J. Gaillardet. 2007. Coupling between biota and earth materials in the critical zone. *Elements* 3: 327–32.
- Arita, H.T. y P. Rodríguez. 2002. Geographic range, turnover rate and the scaling of species diversity. *Ecography* 5: 541–50.
- Azúa-Bustos, A., C. González-Silva, R.A. Mancilla, L. Salas, B. Gómez-Silva, C.P. McKay y R. Vicuña. 2011. Hypolithic Cyanobacteria Supported Mainly by Fog in the Coastal Range of the Atacama Desert. *Microbial Ecology* 61: 568–81.
- Bahl, J., M.C.Y. Lau, G.J.D. Smith, D. Vijaykrishna, S.C. Cary, D.C. Lacap, C.K. Lee, R.T. Papke, K.A. Warren-Rhodes, F.K.Y. Wong, C.P. McKay y S.B. Pointing. 2011. Ancient origins determine global biogeography of hot and cold desert cyanobacteria. *Nature Communications* 2. Nature Publishing Group: 163.
- Barger, N.N., S.C. Castle y G.N. Dean. 2013. Denitrification from nitrogen-fixing biologically crusted soils in a cool desert environment, Southeast Utah, USA. *Ecological Processes* 2: 16.
- Begon, M, J.L. Harper y C.R. Townsend. 2006. *Ecology: Individuals, Populations and Communities*. Blackwell Science. Londres. 738 pp.
- Bell, T., J.A. Newman, B.W. Silverman, S.L. Turner y A.K. Lilley. 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436: 1157–60.

- Belnap, J., B. Büdel y O.L. Lange. 2003. Biological soil crusts: characteristics and distribution. En *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*, editado por J. Belnap y O.L. Lange, pp. 3–30. Ecological Studies. Springer, Berlin.
- Belnap, J. 2002. Nitrogen fixation in biological soil crusts from Southeast Utah, USA. *Biology and Fertility of Soils* 35: 128–35.
- Belnap, J. 2003a. The world at your feet: desert biological soil crusts. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1:181-189.
- Belnap, J. 2003b. Factors influencing nitrogen fixation and nitrogen release in biological soil crusts. En *Biological Soil Crusts: Structure, Function, And Management*, editado por J. Belnap y O.L. Lange, pp. 241–61. Ecological Studies. Springer, Berlin.
- Belnap, J. 2003c. Biological soil crusts in deserts: a short review of their role in soil fertility, stabilization, and water relations. *Algological Studies* 109: 113–26.
- Belnap, J. 2006. The potential roles of biological soil crusts in dryland hydrologic cycles. *Hydrological Processes* 20: 3159–78.
- Belnap, J. 2013. Some like it hot, some not. *Science* 340: 1533–34.
- Belnap, J. y J.S. Gardner. 1993. Soil microstructure in soils of the Colorado Plateau: the role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Western North American Naturalist* 53: 40–47.
- Belnap, J. y O.L. Lange. 2003. *Biological Soil Crusts: Structure, Function and Management* editado por J. Belnap y O.L. Lange. Springer Berlin Heidelberg.
- Billi, D. y M. Potts. 2002. Life and death of dried prokaryotes. *Research in Microbiology* 153: 7–12.
- Billings, S.A., S.M. Schaeffer y R.D. Evans. 2003. Nitrogen fixation by biological soil crusts and heterotrophic bacteria in an intact Mojave Desert ecosystem with elevated CO<sub>2</sub> and added soil carbon. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 643–49.
- Binder, B.J. y Y.C. Liu. 1998. Growth rate regulation of rRNA content of a marine *Synechococcus* (Cyanobacterium) strain. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3346–51.

- Blackwood, C.B., D. Hudleston, D.R. Zak y J.S. Buyer. 2007. Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: Insights from simulated microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5276–83.
- Bottomley, P.J. y D.D. Myrold. 2007. Biological N inputs. En *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, editado por E.A. Paul, pp. 365–87. Elsevier, Londres.
- Bowker, M.A., J. Belnap, V.B. Chaudhary y N.C. Johnson. 2008. Revisiting classic water erosion models in drylands: The strong impact of biological soil crusts. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2309–16.
- Bowker, M.A., F.T. Maestre y C. Escolar. 2010. Biological crusts as a model system for examining the biodiversity–ecosystem function relationship in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 405–17.
- Bradford, M.A. y N. Fierer. 2012. The biogeography of microbial communities and ecosystem processes: implications for soil and ecosystem models. En *Soil Ecology and Ecosystem Services*, editado por D.H. Wall, pp. 189–200. Oxford University Press.
- Bray, J.R. y J.T. Curtis. 1957. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27: 325–49.
- Brill, W.J. 1980. Biochemical genetics of nitrogen fixation. *Microbiological Reviews* 44: 449–67.
- Brown, M.V. y J.P. Bowman. 2001. A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiology Ecology* 35: 267–75.
- Caiola, M.G., D.B. y E.I. Friedmann. 1996. Effect of desiccation on envelopes of the cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. (Chroococcales). *European Journal of Phycology* 31: 97–105.
- Cam, E., J.D. Nichols, J.E. Hines, J.R. Sauer, R. Alpizar-Jara y C.H. Flather. 2002. Disentangling sampling and ecological explanations underlying species-area relationships. *Ecology* 83: 1118–30.
- Castillo-Monroy, A.P. y F.T. Maestre. 2011. La costra biológica del suelo: Avances recientes en el conocimiento de su estructura y función ecológica. *Revista Chilena de Historia Natural* 84: 1–21.

- Challenger, A. y J. Soberón. 2008. Los ecosistemas terrestres. En *Capital Natural de México*, vol. 1: *Conocimiento Actual de la Biodiversidad*, pp. 87–108. Editorial Conabio, Ciudad de México.
- Colwell, R.K., C.X. Mao y J. Chang. 2004. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology* 85: 2717–27.
- Conn, E. y P. Stumpf. 2009. *Outlines Of Biochemistry*. Wiley India Pvt. Limited, Nueva York.
- Darby, B.J., D.A. Neher y J. Belnap. 2007. Soil nematode communities are ecologically more mature beneath late- than early-successional stage biological soil crusts. *Applied Soil Ecology* 35: 203–12.
- Darling, K.F., C.M. Wade, I.A. Stewart, D. Kroon, R. Dingle y A.J. Brown. 2000. Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers. *Nature* 405: 43–47.
- Dilworth, M.J., R.R. Eady y M.E. Eldridge. 1988. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. Reduction of acetylene and ethylene to ethane. *The Biochemical Journal* 249: 745–51.
- Dixon, R. y D. Kahn. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature reviews. Microbiology* 2: 621–31.
- Dunbar, J., L.O. Ticknor y C.R. Kuske. 2000. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2943–50.
- Dunbar, J., L.O. Ticknor y C.R. Kuske. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 190–97.
- Dunkerley, D.L. 2011. Desert Soils. En *Arid Zone Geomorphology: Process, Form and Change in Drylands*, editado por D.S. G. Thomas, pp. 101–29. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Elbert, W., B. Weber, S. Burrows, J. Steinkamp, B. Büdel, M.O. Andreae y U. Pöschl. 2012. Contribution of cryptogamic covers to the global cycles of carbon and nitrogen. *Nature Geoscience* 5: 459–62.

- Escudero, A., I. Martínez, A. de la Cruz, M.A.G. Otálora y F.T. Maestre. 2007. Soil lichens have species-specific effects on the seedling emergence of three gypsophile plant species. *Journal of Arid Environments* 70: 18–28.
- Evans, R.D. y J.R. Johansen. 1999. Microbiotic crusts and ecosystem processes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 183–225.
- Ezcurra, E., E. Mellink y A. Martínez-Berdeja. 2014. Hot Deserts. En *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Falkowski, P.G., T. Fenchel y E.F. Delong. 2008. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* 320: 1034–39.
- Fanning, D.S. y M.C.B. Fanning. 1989. *Soil Morphology, Genesis and Classification*. John Wiley and Sons Inc., Nueva York.
- Fierer, N., M.A. Bradford y R.B. Jackson. 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88: 1354–64.
- Fierer, N. y R.B. Jackson. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 626–31.
- Finlay, B.J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061–63.
- Fisher, F.M., J.C. Zak, G.I. Cunningham y W.G. Whitford. 1988. Water and nitrogen effects on growth and allocation patterns of creosotebush in the Northern Chihuahuan Desert. *Journal of Range Management* 41: 387–91.
- Fisher, M.C., B.G. Spratt y J.T. Staley. 2006. Introduction: species and speciation in microorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361: 1897–98.
- Fitter, A.H., C.A. Gilligan, K. Hollingworth, A. Kleczkowski, R.M. Twyman y J.W. Pitchford. 2005. Biodiversity and ecosystem function in soil. *Functional Ecology* 19: 369–77.

- Flechtner, V.R., S.L. Boyer, J.R. Johansen y M.L. Denoble. 2002. *Spirirestis rafaensis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils. *Nova Hedwigia* 74: 1–24.
- Franco-Vizcaíno, E. y J. Sosa-Ramírez. 1997. Soil properties and nutrient relations in burned and unburned mediterranean-climate shrublands of Baja California, Mexico. *Acta Oecologica* 18: 503–17.
- Gaby, J.C. y D.H. Buckley. 2011. A global census of nitrogenase diversity. *Environmental Microbiology* 13: 1790–99.
- Gao, Q. y F. Garcia-Pichel. 2011. Microbial ultraviolet sunscreens. *Nature Reviews Microbiology* 9: 791–802.
- Garcia-Pichel, F., V. Loza, Y. Marusenko, P. Mateo y R.M. Potrafka. 2013. Temperature drives the continental-scale distribution of key microbes in topsoil communities. *Science* 340: 1574–77.
- Garcia-Pichel, F. y M.F. Wojciechowski. 2009. The evolution of a capacity to build supra-cellular ropes enabled filamentous cyanobacteria to colonize highly erodible substrates. *PLoS ONE* 4: 4–9.
- Garland, J.L. y A.L. Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2351–59.
- Godínez-Alvarez, H., C. Morín y V. Rivera-Aguilar. 2012. Germination, survival and growth of three vascular plants on biological soil crusts from a Mexican tropical desert. *Plant Biology* 14: 157–62.
- Green, L.E., A. Porras-Alfaro y R.L. Sinsabaugh. 2008. Translocation of nitrogen and carbon integrates biotic crust and grass production in desert grassland. *Journal of Ecology* 96: 1076–85.
- Hanson, C.A., J.A. Fuhrman, M.C. Horner-Devine y J.B.H. Martiny. 2012. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology* 10: 497–506.

- Hardy, R.W.F., R.C. Burns, y R.D. Holsten. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 47–81.
- Harper, K.T. y J. Belnap. 2001. The influence of biological soil crusts on mineral uptake by associated vascular plants. *Journal of Arid Environments* 47: 347–57.
- Hartmann, M. y F. Widmer. 2006. Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7804–12.
- Hill, G.T., N.A. Mitkowski, L. Aldrich-Wolfe, L.R. Emele, D.D. Jurkonie, A. Ficke, S. Maldonado-Ramirez, S.T. Lynch y E.B. Nelson. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 15: 25–36.
- Horner-Devine, M.C., M. Lage, J.B. Hughes y B.J.M. Bohannan. 2004. A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* 432 (7018): 750–53.
- Housman, D.C., H.H. Powers, A.D. Collins y J. Belnap. 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: 620–34.
- Howarth, R.W. y R. Marino. 1988. Nitrogen fixation in freshwater , estuarine , and marine ecosystems. 2. Biogeochemical controls. *Limnology and Oceanography* 33: 688–701.
- Hrčková, K., M. Šimek, P. Hrouzek y A. Lukešová. 2010. Biological dinitrogen fixation by selected soil cyanobacteria as affected by strain origin, morphotype, and light conditions. *Folia Microbiologica* 55: 467–73.
- Huenneke, L.F. y I. Noble. 1996. Ecosystem function of biodiversity in arid ecosystems. En *Functional Roles of Biodiversity: a Global Perspective*, editado por H.A. Mooney et al., pp. 99–128. John Wiley & Sons Ltd., Nueva York.
- Hughes, J.B. y J.J. Hellmann. 2005. The application of rarefaction techniques to molecular inventories of microbial diversity. *Methods in Enzymology* 397: 292–308.
- Kandeler, E. 2007. Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function. En *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, editado por E.A. Paul, pp. 53–83. Elsevier, Londres.

- Keiser, A.D., M.S. Strickland, N. Fierer y M.A. Bradford. 2011. The effect of resource history on the functioning of soil microbial communities is maintained across time. *Biogeosciences* 8: 1477–86.
- Korelusová, J. 2008. Phylogeny of heterocytous Cyanobacteria (Nostocales and Stigonematales). Tesis de licenciatura. Universidad de Bohemia del Sur, České Budeřovice.
- Krebs, C.J. 1999. *Ecological Methodology*. Addison-Wesley Educational Publishers, Inc., Menlo Park.
- Lacap, D.C., K.A. Warren-Rhodes, C.P. McKay y S.B. Pointing. 2011. Cyanobacteria and chloroflexi-dominated hypolithic colonization of quartz at the hyper-arid core of the Atacama Desert, Chile. *Extremophiles* 15: 31–38.
- Lalley, J.S., H.A. Viles, J.R. Henschel y V. Lalley. 2006. Lichen-dominated soil crusts as arthropod habitat in warm deserts. *Journal of Arid Environments* 67: 579–93.
- Lange, O.L., G.J. Kidron, B. Budel, A. Meyer, E. Kilian y A. Abeliovich. 1992. Taxonomic composition and photosynthetic characteristics of the "biological soil crusts" covering sand dunes in the Western Negev Desert. *Functional Ecology* 6: 519-27.
- Legendre, P. y E. Gallagher. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129: 271–80.
- Legendre, P. y L. Legendre. 2012. *Numerical Ecology*. Elsevier, Londres.
- Liu, W.T., T.L. Marsh, H. Cheng y L.J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4516–22.
- López-Lozano, N.E., L.E. Eguiarte, G. Bonilla-Rosso, F. García-Oliva, C. Martínez-Piedragil, C. Rooks y V. Souza. 2012. Bacterial communities and the nitrogen cycle in the gypsum soils of Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila: a Mars analogue. *Astrobiology* 12: 699–709.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap y D.P. Clark. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc., San Francisco.



- Maestre, F.T., M. Huesca, E. Zaady, S. Bautista y J. Cortina. 2002. Infiltration, penetration resistance and microphytic crust composition in contrasted microsites within a Mediterranean semi-arid steppe. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 895–98.
- Magurran, A.E. 1988. *Ecological diversity and its measurements*. Princeton University Press, Princeton.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209–20.
- Marsh, T L. 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* 2: 323–27.
- Martin-Laurent, F., L. Philippot, S. Hallet, R. Chaussod, J.C. Germon, G. Soulas y G. Catroux. 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2354–59.
- Martiny, J.B.H., J.A. Eisen, K. Penn, S.D. Allison y M.C. Horner-Devine. 2011. Drivers of bacterial beta-diversity depend on spatial scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 7850–54.
- Martiny, J.B.H., B.J.M. Bohannan, J.H. Brown, R.K. Colwell, J.A. Fuhrman, J.L. Green, M.C. Horner-Devine, M. Kane, J.A. Krumins, C.R. Kuske, P.J. Morin, S. Naeem, L. Øvreas, A. Reysenbach, V.H. Smith y J.T. Staley. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* 4: 102–12.
- Mazor, G., G.J. Kidron, A. Vonshak y A. Abeliovich. 1996. The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crusts. *FEMS Microbiology Ecology* 21: 121–30.
- Millenium Ecosystems Assessment. 2005. Ecosystems and human well-being: desertification synthesis. World Resources Insitutute.
- Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11: 31–46.

- Meyer, A.F., D.A. Lipson, A.P. Martin, C.W. Schadt y S.K. Schmidt. 2004. Molecular and metabolic characterization of cold-tolerant alpine soil *Pseudomonas sensu stricto*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 483–89.
- Nobel, P.S. 1981. Spacing and transpiration of various sized clumps of a desert grass, *Hilaria rigida*. *The Journal of Ecology* 69: 735–42.
- Noguez, A.M., H.T. Arita, A.E. Escalante, L.J. Forney, F. García-Oliva y V. Souza. 2005. Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. *Global Ecology and Biogeography* 14: 241–48.
- Noy-Meir, I. 1973. Desert Ecosystems: Environment and Producers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4: 25-51
- Oksanen J., F.G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P.R. Minchin, R.B. O'Hara, G.L. Simpson, P. Solymos, M.H.H. Stevens y H. Wagner. 2015. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.3-0. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Peel, M.C., B.L. Finlayson y T A. McMahon. 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences* 11: 1633–44.
- Pereira e Silva, M.C., A.V. Semenov, J.D. Van Elsas y J.F. Salles. 2011. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. *FEMS Microbiology Ecology* 77: 57–68.
- Pham, V.H.T. y J. Kim. 2012. Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in Biotechnology* 30: 475–84.
- Pointing, S.B. y J. Belnap. 2012. Microbial colonization and controls in dryland systems. *Nature Reviews Microbiology* 10: 551-62.
- Pointing, S.B., K.A. Warren-Rhodes, D.C. Lacap, K.L. Rhodes y C.P. McKay. 2007. Hypolithic community shifts occur as a result of liquid water availability along environmental gradients in China's hot and cold hyperarid deserts. *Environmental Microbiology* 9: 414–24.
- Potts, M. 1999. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 34: 319–28.

- Prosser, J.I., B.J.M. Bohannan, T.P. Curtis, R.J. Ellis, M.K. Firestone, R.P. Freckleton, J.L. Green, L.E. Green, K. Killham, J.J. Lennon, A.M. Osborn, M. Sloan, C.J. van der Gast y J.P.W. Young. 2007. The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology* 5: 384–92.
- Purdy, K.J. 2005. Nucleic acid recovery from complex environmental samples. *Methods in Enzymology* 397: 271–92.
- R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramette, A. 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 142–60.
- Reed, H.E. y J.B.H. Martiny. 2007. Testing the functional significance of microbial composition in natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 161–70.
- Reed, H.E. y J.B.H. Martiny. 2013. Microbial composition affects the functioning of estuarine sediments. *The ISME Journal* 7: 868–79.
- Rivera-Aguilar, V., H. Godínez-Alvarez, I. Manuell-Cacheux y S. Rodríguez-Zaragoza. 2005. Physical effects of biological soil crusts on seed germination of two desert plants under laboratory conditions. *Journal of Arid Environments* 63: 344–52.
- Rivera-Aguilar, V., H. Godínez-Alvarez, R. Moreno-Torres y S. Rodríguez-Zaragoza. 2009. Soil physico-chemical properties affecting the distribution of biological soil crusts along an environmental transect at Zapotitlán drylands, Mexico. *Journal of Arid Environments* 73: 1023–28.
- Rivera-Aguilar, V., G. Montejano, S. Rodríguez-Zaragoza y A. Durán-Díaz. 2006. Distribution and composition of cyanobacteria, mosses and lichens of the biological soil crusts of the Tehuacán Valley, Puebla, México. *Journal of Arid Environments* 67: 208–25.
- Roesch, L.F.W., R.R. Fulthorpe, R.J.S. Jaccques, F.M. Bento, y F.A. de Oliveira Camargo. 2010. Biogeography of diazotrophic bacteria in soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 1503–8.

- Rosenzweig, M.L. 1995. *Species Diversity in Space and Time*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Saiya-Cork, K.R., R.L. Sinsabaugh, y D.R. Zak. 2002. The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 1309–15.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- Scheiner, S.M. 2003. Six types of species-area curves. *Global Ecology and Biogeography* 12: 441–47.
- Schimel, J.P. y J. Gullledge. 1998. Microbial community structure and global trace gases. *Global Change Biology* 4: 745–58.
- Smouse, P.E., J.C. Long y R.R. Sokal. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic zoology* 35: 627–32.
- Sogin, M.L., H.G. Morrison, J.A. Huber, D.M. Welch, S.M. Huse, P.R. Neal, J.M. Arrieta y G.J. Herndl. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored 'rare biosphere'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 12115–20.
- Stal, L.J. 1995. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytologist* 131: 1–32.
- Steppe, T.F., J.B. Olson, H.W. Paerl, R.W. Litaker y J. Belnap. 1996. Consortial N<sub>2</sub> fixation: A strategy for meeting nitrogen requirements of marine and terrestrial cyanobacterial mats. *FEMS Microbiology Ecology* 21: 149–56.
- Strickland, M.S., C. Lauber, N. Fierer y M.A. Bradford. 2009. Testing the functional significance of microbial community composition. *Ecology* 90 (2): 441–51.
- Thomas, D.S.G. 2011. Arid zone geomorphology. Editado por D.S.G. Thomas. *Arid Zone Geomorphology: Process, Form and Change in Drylands*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

- Tiedje, J.M., S. Asuming-Brempong, K. Nüsslein, T.L. Marsh y S.J. Flynn. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13: 109–22.
- Torsvik, V. y L. Øvreås. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5: 240–45.
- Torsvik, V., L. Øvreås y T.F. Thingstad. 2002. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296: 1064–66.
- Turner, W.R. y E. Tjørve. 2005. Scale-dependence in species-area relationships. *Ecography* 28: 721–31.
- Vartoukian, S.R., R.M. Palmer y W.G. Wade. 2010. Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 309: 1–7.
- Veluci, R.M., D.A. Neher y T.R. Weicht. 2006. Nitrogen fixation and leaching of biological soil crust communities in mesic temperate soils. *Microbial Ecology* 51: 189–96.
- Vitousek, P.M. y R.W. Howarth. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13: 87–115.
- Voroney, R.P. 2007. The Soil Habitat. En *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, editado por E.A. Paul, pp. 25–49. Elsevier, Londres.
- Wallenstein, M.D. y M.N. Weintraub. 2008. Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2098–2106.
- Wardle, D.A., R.D. Bardgett y J.N. Klironomos. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304: 1629–33.
- Wellington, E.M.H., A. Berry y M. Krsek. 2003. Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. *Current Opinion in Microbiology* 6: 295–301.
- Whitman, W.B., D.C. Coleman y W.J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 6578–83.
- Whittaker, R H. 1970. *Communities and ecosystems*. Macmillan, Londres.

- Whittaker, R.H. 1972. Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon* 21: 213–51.
- Woese, C.R., O. Kandler y M.L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 4576–79.
- Woodcock, S., T.P. Curtis, I.M. Head, M. Lunn y W.T. Sloan. 2006. Taxa-area relationships for microbes: the unsampled and the unseen. *Ecology Letters* 9: 805–12.
- Wu, J., W. Sunda, E.A. Boyle y D.M. Karl. 2000. Phosphate depletion in the western North Atlantic Ocean. *Science* 289: 759–62.
- Yeager, C.M., J.L. Kornosky, D.C. Housman, E.E. Grote, J. Belnap y C.R. Kuske. 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: 973–83.
- Yeager, C.M., J.L. Kornosky, R.E. Morgan, E.C. Cain, F. Garcia-Pichel, D.C. Housman, J. Belnap y C.R. Kuske. 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.
- Yeager, C.M., C.R. Kuske, T.D. Carney, S.L. Johnson, L.O. Ticknor y J. Belnap. 2012. Response of biological soil crust diazotrophs to season, altered summer precipitation, and year-round increased temperature in an arid grassland of the Colorado Plateau, USA. *Frontiers in Microbiology* 3: 1-14.
- Zehr, J.P., B.D. Jenkins, S.M. Short y G.F. Steward. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure : a cross-system comparison. *Environmental Microbiology* 5: 539–54.
- Zhang, Y., C. Cao, M. Peng, X. Xu, P. Zhang, Q. Yu y T. Sun. 2014. Diversity of nitrogen-fixing, ammonia-oxidizing, and denitrifying bacteria in biological soil crusts of a revegetation area in Horqin Sandy Land, Northeast China. *Ecological Engineering* 71: 71–79.
- Zhao, Y., M. Xu y J. Belnap. 2010. Potential nitrogen fixation activity of different aged biological soil crusts from rehabilitated grasslands of the hilly Loess Plateau, China. *Journal of Arid Environments* 74: 1186–91.

Zhou, J., S. Kang, C.W. Schadt y C.T. Garten. 2008. Spatial scaling of functional gene diversity across various microbial taxa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 7768–73.

## Apéndices

### Apéndice 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS DE SUELO Y SEDIMENTOS

Todos los reactivos y materiales deben ser esterilizados en autoclave antes de ser utilizados.

#### *A. Preparación de las columnas*

##### Materiales

- Pinzas de relojero
- Puntas de micropipeta de 1 mL con la punta recortada.
- Jeringas de 1 mL (insulina) y 3 mL
- Fibra de vidrio
- Tubos tipo “Falcon” de 50 mL

##### Reactivos

- Agua grado molecular libre de RNasas
- Suspensión de hidroxiapatita (HTP) 10 g en 50 mL (BioRad 130-0420)
- Suspensión de Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich) 10 g en 100 mL.

Los tubos de 50 mL se deben adaptar para sostener las jeringas, para lo cual se hacen orificios en la tapa que se ajusten a las jeringas. Se deben colocar las jeringas dentro de los tubos introduciendo en su totalidad la jeringa por el orificio de la tapa del tubo, de tal manera que la tapa sostenga a la jeringa (Fig. A1). Se retira el embolo de la jeringa y se coloca de nuevo en la bolsa de la jeringa.

1. Colocar la fibra de vidrio dentro de las jeringas con las pinzas de relojero, enrollando un pequeño trozo de fibra de vidrio con una pinza sobre la



- punta de la otra pinza de manera que se haga un rollo delgado de fibra de vidrio. Cuidar que la fibra de vidrio no toque nada fuera de la jeringa y entre directamente en la columna.
2. Comprimir la fibra de vidrio con el embolo de manera que el tapón ocupe un volumen aproximado de 0.1 mL (en las jeringas de 1mL) y 0.5 mL en las jeringas de 3 ml.
  3. Columnas de HTP. (Se utilizan las jeringas de 1mL). Antes de agregar la solución de HTP (debe estar almacenada a 4°C), se agita suavemente con movimientos circulares. Para cargarlo en las columnas se utilizan puntas recortadas y se agrega 1 mL de HTP gota por gota. Se centrifugan a 100 g por 1 min, la columnas deben quedar con un volumen aproximado de 0.5 mL de HTP. Repetir hasta obtener el volumen deseado cuidando de no exceder de 0.6 mL (Fig. A1.A) Se cubren con aluminio hasta que sean utilizadas.
  4. Columnas de sephadex. Se utilizan las jeringas de 3 ml. El sephadex se debe utilizar en la campana de flujo laminar. Se agrega en la jeringa hasta llenarla y se centrifuga a 1600 g por 2 min. La columna debe tener un volumen aproximado de 2 mL de Sephadex (Fig. A1.C). Agregar 400 µL de agua grado molecular libre de RNAsas para acondicionar la columna y centrifugar a 1600 g por 8 min (repetir tres veces), una vez terminado se cubren con aluminio hasta que sean utilizadas.

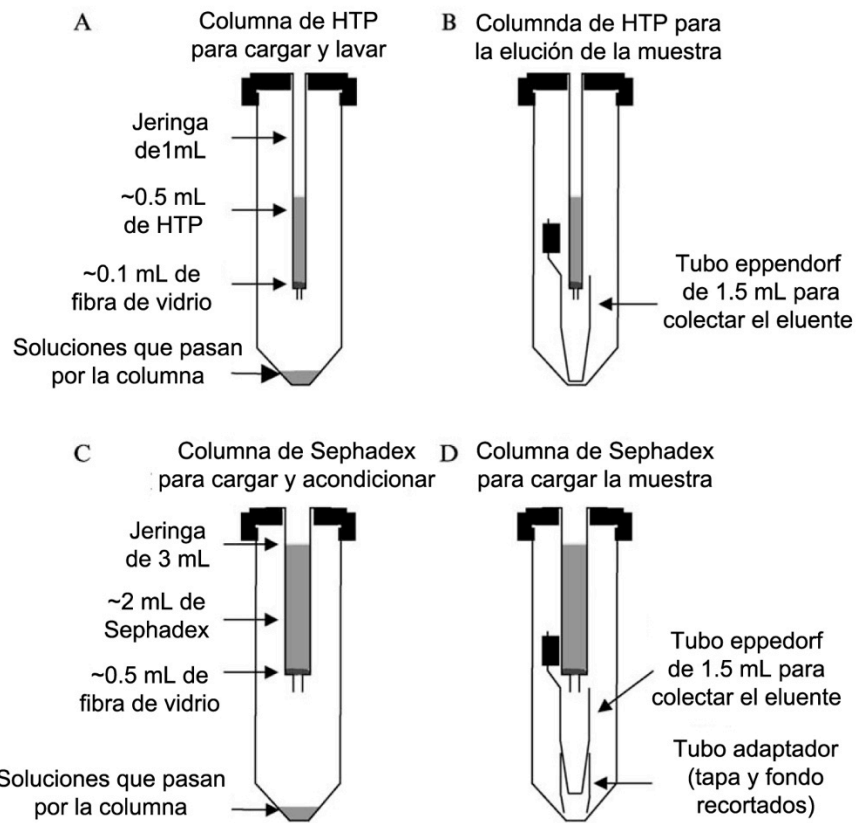


Fig. A1. Esquema que muestra cómo se deben montar las columnas en el tubo tipo 'Falcon' y como deben quedar para ser utilizadas (modificado de Purdy, 2005).

## **B. Lisis de muestras**

### **Materiales**

- Tubos de lisis de 1.5 mL
- Cuentas de vidrio (glass beads)

### **Reactivos**

- Fosfato de sodio 120 mM ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) pH 8.0 + 1% (p/v) PVPP

- Fenol equilibrado con Tris pH 8.0 + 1% (p/v) de 8-hidroxiquinelona
- SDS al 20%
- Fosfato de sodio 120 mM ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) pH 8.0

1. Agregar aprox. 0.5 mL de cuentas de vidrio para lisis en un tubo de lisis de 2 mL y agregar aproximadamente el mismo volumen de muestra. Procurar mantener la muestra en hielo.

2. Agregar las soluciones de lisis :

600  $\mu\text{L}$  de fosfato de sodio 120 mM pH 8, 1 % (p/v) PVPP

400  $\mu\text{L}$  Tris-fenol equilibrado pH 8.0 + 1% (p/v) de 8-hidroxiquinelona

40  $\mu\text{L}$  SDS (20%) pH 8

3. Agitar los tubos en un “bead beater” durante 30 s a máxima velocidad y colocar rápidamente en hielo por 30 s (repetir el paso 3 veces).

4. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 min.

5. Se observaran tres fases: botón (pellet), fenol y fase líquida. Cuidadosamente coleccionar la fase líquida (máximo 0.7 mL) y cargar en la columna de HTP. Si faltó recoleccionar fase líquida, guardar en un tubo eppendorf (1.5-2 mL) (manteniéndolo en hielo) y cargar posteriormente en la columna.

6. Centrifugar columna de HTP durante 2 min a 100 g.

7. Agregar 600  $\mu\text{L}$  de fosfato de sodio 120 mM pH 8 al tubo de lisis y agitar en vórtex hasta desprender el botón.

8. Agitar los tubos en el “bead beater” durante 30 s a máxima velocidad e inmediatamente colocar en hielo por 30s (una sola vez).

9. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 min.

10. Coleccionar la fase acuosa como en el paso 5 y centrifugar como en el paso 6.

### **C. Purificación de ácidos nucleicos totales**

#### Reactivos

- Fosfato de sodio 120 mM ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) pH 7.2
- Fosfato dipotásico 300 mM ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) pH 7.2
- Agua grado molecular libre de RNasas

11. Lavar la columna con 500  $\mu\text{L}$  de fosfato de sodio 120 mM pH 7.2 y centrifugar a 100 g por 2- 6 min, o el tiempo necesario para que pase todo el líquido por la columna. Repetir este paso tres veces. Con esto se eluyen todas las proteínas que están unidas en la columna.
12. Eluir los ácidos nucleicos de la columna en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL estéril (Fig. A1.B), agregando 400  $\mu\text{L}$  de fosfato dipotásico 300 mM pH 7.2, centrifugar a 100 g por (2-6 min).
13. Cargar el eluyente en la columna de Sephadex, a la cual se le ha cambiado a un tubo tipo "Falcon" limpio y centrifugar a 1600 g por 8 min, colectando los ácidos nucleicos en un tubo tipo Eppendorf (1.5 mL) (Fig. A1.D).
14. Agregar 2  $\mu\text{L}$  de Glycoblue (opcional), 40  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3M y 1 mL de etanol 100%. Dejar el precipitado a  $-20^\circ\text{C}$  toda la noche.
15. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min, observar el botón y decantar el sobrenadante por aspiración.
16. Agregar 1 mL de etanol frío al 70% y agitar el botón con vórtex a baja velocidad por 10 s.
17. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 min y remover el sobrenadante por aspiración cuidadosamente.
18. Evaporar el etanol. Secar el pellet por 1 hora en la campana de flujo laminar y resuspender en 20 o 50  $\mu\text{L}$  de agua grado molecular libre de RNasas.

19. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **Apéndice 2. PRECIPITACIÓN DE FRAGMENTOS**

1. Se divide la reacción en dos partes y se aforan ambas a 50  $\mu\text{L}$ . Una parte se guardará como reserva.
2. Añadir 0.1 volúmenes de EDTA 125mM (5  $\mu\text{L}$  para 50  $\mu\text{L}$ ).
3. Añadir 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M (5  $\mu\text{L}$  para 50  $\mu\text{L}$ ).
4. Añadir 2.5 volúmenes de etanol frío al 100% (125  $\mu\text{L}$  para  $\mu\text{L}$ ).
5. Incubar a temperatura ambiente por 15 min.
6. Centrifugar a 14000 rpm por 25 min.
7. Remover el etanol por aspiración cuidando de no tomar el botón.
8. Añadir 100  $\mu\text{L}$  de etanol frío al 70% y repetir pasos 6 y 7.
9. Secar al aire libre y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
10. Resuspender sólo para cargar en placa.