



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Escuela Nacional de Estudios Superiores,
Unidad Morelia

Clásico y moderno: utilización de técnicas
clásicas dependientes del cultivo y técnicas
moleculares para explorar la capacidad
metabólica bacteriana asociada al ciclo del
fósforo

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A

Emily Sol García Martínez

DIRECTOR(A) DE TESIS: Dra. Yunuen Tapia Torres

MORELIA, MICHOACÁN

MAYO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE

DIRECTORA

DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

PRESENTE

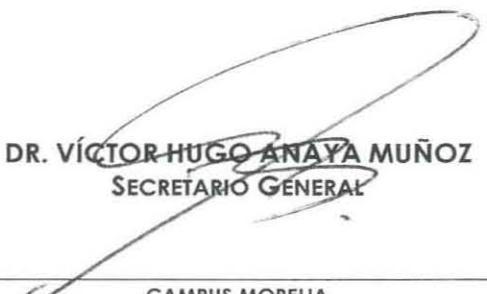
Por medio de la presente me permito informar a usted que en la **sesión ordinaria 03** del **H. Consejo Técnico** de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad Morelia celebrada el día **07 de marzo del 2018**, acordó poner a su consideración el siguiente jurado para la presentación del Trabajo Profesional del alumno (a) Emily Sol García Martínez de la Licenciatura en **Ciencias Ambientales**, con número de cuenta **414004755**, con el trabajo titulado: "Clásico y moderno: utilización de técnicas clásicas dependientes del cultivo y técnicas moleculares para explorar la capacidad metabólica bacteriana asociada al ciclo del fósforo" bajo la dirección como **tutor** de la Dra. Yunuen Tapia Torres.

El jurado queda integrado de la siguiente manera:

Presidente: Dr. Felipe Francisco García Oliva
Vocal: Dr. Antonio González Rodríguez
Secretario: Dra. Yunuen Tapia Torres
Suplente: Dr. Luis Eduardo Servín Garcidueñas
Suplente: Dr. Alfonso Méndez Bravo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Morelia, Michoacán a, 23 de abril del 2018.


DR. VÍCTOR HUGO ANAYA MUÑOZ
SECRETARIO GENERAL

CAMPUS MORELIA

Antigua Carretera a Pátzcuaro N° 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta
58190, Morelia, Michoacán, México. Tel: (443)689.3500 y (55)56.23.73.00, Extensión Red UNAM: 80614
www.enesmorelia.unam.mx

Agradecimientos

A la Licenciatura en Ciencias Ambientales de la ENES Morelia, UNAM

A la Dra. Yunuen Tapia Torres, por aceptar ser mi asesora y guiarme durante todo el proyecto.

A mis sinodales, Dr. Antonio González, Dr. Felipe García Oliva, Dr. Luis Eduardo Servín y Dr. Alfonso Méndez Bravo, por todos sus consejos y por los aportes que hicieron a este trabajo

Al financiamiento del proyecto “Uso eficiente del fósforo en sistemas agroecológicos de México: ejemplos de sistemas áridos y templados” PAPIIT IA206617, del cual forma parte esta tesis.

Al proyecto “Estudios biogeográficos, ecofisiológicos y genético-moleculares para la construcción de un macrosistema para la conservación de los bosques templados de México” PAPIIT RV201015, por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

A la fundación Flor de la Paz y a las personas que trabajan en ella, por todas las atenciones que tuvieron con nosotros al momento de desarrollar los muestreos.

Al Rancho “La Paz” y al Dr. Dieter Le Noir, por permitirnos usar su propiedad como sitio de estudio para llevar a cabo este trabajo y por todo el apoyo y la atención que nos brindaron en cada visita.

A los siguientes laboratorios, por su apoyo en el préstamo de equipos y material:

- Laboratorio de Microbiómica de la ENES Morelia, UNAM.
- Laboratorio de Biología Molecular de la ENES Morelia, UNAM.
- Laboratorio de Genética de la Conservación del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIEs), UNAM.
- Laboratorio de Biogeoquímica de suelos del IIEs, UNAM.
- Laboratorio de Docencia en Química de la ENES Morelia, UNAM.

Al Dr. Jesús Llanderal Mendoza, por su apoyo técnico en la realización de los análisis moleculares.

A la señora Claudia María Brenes Bautista, por ayudarme con todo el material que necesitaba para realizar las técnicas moleculares, teniéndolo siempre limpio y disponible para su uso.

¡¡GRACIAS, MUCHÍSIMAS GRACIAS!!!

A las personas que aportaron su conocimiento y experiencia

A Yun, muchas gracias por toda la paciencia y la gran comprensión que tuviste hacia mí. Ya lo he mencionado antes, pero insisto: no todos tienen la dicha de tener una asesora que te permita entrar en su vida y que se preocupe por cuestiones que van más allá de lo académico. Contigo no sólo aprendí a cultivar bacterias y a combatir la crisis mundial del fósforo, también me enseñaste que uno trabaja mejor cuando ama lo que hace, así como tú. Eres una mujer admirable.

A Toño González, gracias por la ayuda con los análisis estadísticos, pero sobre todo, gracias por soportar mis dramas, por las charlas motivacionales y por apoyar mi precaria economía estos últimos meses. Desde el fondo de mi corazón, en verdad, muchas gracias.

A Chucho Llanderal (si lees esto, imagina que grito “Chuchooooooo”, como siempre), este trabajo simple y sencillamente no hubiera sido posible sin ti. Gracias y mil gracias más por todo lo que me enseñaste, por tu inquebrantable paciencia y optimismo, y por siempre brindarme una sonrisa sincera, incluso en aquellos momentos en los que el estrés y el drama dominaban en mí.

A Pamela Chavéz y Alberto Morón, mis grandes maestros. Gracias por incursionarme en el trabajo de laboratorio y por haber seguido apoyándome durante todo este tiempo, respondiendo a cualquier duda o inquietud.

A todos los demás compañeros del laboratorio: Rocío, Brenda, Karla y Gaby. Gracias por su amistad, por escuchar, reír y compartir todas las experiencias que sólo los que trabajamos en un laboratorio podemos comprender.

A la señora Claudia, muchas gracias por ser mi hada madrina y apoyarme con material, consejos y abrazos, muchos abrazos.

A Olga, Vinicio y Shura, que llegaron en momentos donde innegablemente requería su ayuda.

A Agustín Martínez Morales, Alex Rebollar y todo el equipo de servicios escolares, por el apoyo que me brindaron en los trámites administrativos. Agus, ¿qué hubiera sido de mí sin ti? Gracias por siempre recibirme siempre con una sonrisa y con todos los ánimos del mundo.

A Morelia llegué con maletas y ahora me voy con amigos...

A Liz, por comenzar la licenciatura haciendo la tarea juntas y terminar escribiendo la tesis en su casa.

A Dani, por darme una mano siempre que tropezaba o cuando estaba a punto de caer.

A Anibal, por ser mi compañero durante estos 5 años (Sip, 5 años, ni yo termino de creerlo todavía).

A Josh, por echarme la mano con los idiomas ¡siempre! Gracias también por estar incluso cuando una nube gris cubría tu presencia.

A mis amados geotics, Memo, Denise, Gerardo, Itzel y Zaldívar, por todo el apoyo que me brindan siempre, por haberme escuchado hablar de esta tesis una y otra vez, por todas las risas y esa amistad tan bonita que llegó justo en el momento indicado.

A Paquito tango, ¡Mil gracias! Espero de corazón que nunca dejemos de bailar juntos.

A mi familia

A mi mamá, por estar siempre. Gracias por todos los ánimos y el apoyo incondicional que me has brindado desde que era pequeña, gracias por no decir que “no” incluso en aquellas ocasiones donde temías por mí, por alentarme en todo momento a cumplir mis sueños y por enseñarme a luchar por aquello que me hace feliz. No hubiera podido lograrlo sin ti.

A mi abuela, por ser la mejor maestra de vida que alguien pudiera pedir y por los abrazos más reparadores que existen.

A mi hermana pequeña, Sel, por ser mi cómplice en toda situación y por el gran amor y admiración que tiene hacia mi persona. ¡Me ayudas a no perder la fe en la humanidad!

A mis tías (Mari, Helen, Gise, Lupe, Kat y Adi), por sus mensajes motivacionales y todas las porras que me han echado desde que tengo memoria.

A los pequeños de la casa: Feru, Alan, Ivana, Mau, Lia y Panchito. ¡Jamás vi tanta admiración como la que veo en sus ojitos cada que me miran! ¡Me hacen sentir grande siempre! Muchas gracias por eso.

A mi papá, por no frenarme cuando le dije que quería ser científica.

A Coco, porque sin importar lo que suceda en un futuro, estuvo presente desde que esto comenzó y “se bancó” todo. Gracias infinitas por nuestro ahora.

Dedicada a...

Mi mamá, Pilarica, porque siempre que me caía, me levantaba, reparaba mis alas y me animaba a volar de nuevo.

Índice

Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Antecedentes	10
Formas químicas del P	10
Estrategias de Obtención de P.....	11
Consecuencias del cambio de uso de suelo sobre las comunidades microbianas edáficas y sus capacidades metabólicas	16
Pregunta de investigación	20
Objetivo General	20
Objetivos Específicos	20
Hipótesis	20
Materiales y Métodos	21
Sitio de Estudio	21
Análisis Biogeoquímicos.....	26
Análisis Enzimáticos.....	29
Aislamiento de Microorganismos	30
Evaluación de la capacidad de los aislados para utilizar distintas fuentes de fósforo.....	32
Extracción de ADN	32
Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	34
Identificación de organismos	34
Construcción del árbol filogenético	35
Análisis Estadísticos.....	35
Resultados	36
Caracterización de los sitios: análisis biogeoquímicos y análisis enzimáticos	36
Experimento de Capacidades Metabólicas.....	38
Clasificación taxonómica de los aislados.....	44
Discusión	50
Conclusión	60
Referencias	61
Anexos	70

Resumen

México es el mayor centro de riqueza y evolución de encinos (*Quercus sp.*) en América, con 161 especies y 12% de su superficie cubierta por bosques de encinos y bosques mixtos de pino-encino. Sin embargo, la expansión de la frontera agrícola ha ocasionado una disminución de estos ecosistemas templados. La pérdida de vegetación y la alteración de las características físicas y químicas del suelo ocasionadas por la implementación de cultivos, influyen directamente en la diversidad y la actividad de la comunidad microbiana edáfica y, por ende, en los ciclos biogeoquímicos. No obstante, existe poca información acerca del efecto que tiene el cambio de uso de suelo sobre las capacidades metabólicas de las comunidades microbianas, y cómo esto modifica los procesos de transformación y adquisición de nutrientes esenciales para el desarrollo y el crecimiento de los seres vivos, como el fósforo (P), que es indispensable en innumerables rutas metabólicas y frecuentemente limitante en los ecosistemas. Por lo tanto, este trabajo se centró en entender cómo el cambio de uso de suelo modifica la capacidad metabólica bacteriana para hacer uso del P en bosques templados del centro de México. Para dar respuesta a esa pregunta, se realizó un experimento con aislados bacterianos provenientes de un gradiente de uso de suelo compuesto por tres sitios (uno abandonado con historial de manejo intensivo de agroquímicos, uno agrícola en el que se siembra manzanilla, y un sitio conservado representado por un bosque de pino-encino) con el fin de analizar su capacidad metabólica para utilizar diversas fuentes de P. Posteriormente, los aislados bacterianos fueron identificados utilizando marcadores moleculares, específicamente el gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal. Los resultados indican que todos los aislados bacterianos analizados tienen la capacidad metabólica para adquirir fuentes inorgánicas de P, sin que existan diferencias significativas entre aislados de distintos sitios. Mientras que la adquisición de P a partir de fuentes orgánicas (2AEP y AMPA), fue dominante en las cepas aisladas del mantillo del encinar. No obstante, sí se encontraron diferencias en la diversidad bacteriana cultivable (1%), lo cual sugiere que el cambio de uso de suelo modifica la composición de la comunidad microbiana. Los resultados de este trabajo permitirán una mayor comprensión de la diversidad funcional bacteriana asociada al ciclo del fósforo en encinares templados de México, así como el papel que los microorganismos edáficos desempeñan en la fertilidad del suelo.

Abstract

Mexico has the largest biodiversity of oaks (*Quercus sp.*) in America and it is the main center of its evolution in the continent, with 161 species in total and 12% of national territory covered by oak forests and mixed pine-oak forests. However, the expansion of the agricultural frontier has caused a decline in these temperate ecosystems. Vegetation loss and physical and chemical changes in the soil's characteristics caused by the implementation of crops, directly influence on the diversity and activity of the soil microbial community and therefore in the biogeochemical cycles. Nonetheless, there is little information about how land use changes affects the microbial metabolic capacity and how this modifies the processes of transformation and acquisition of essential nutrients for the development and growth of living beings, such as phosphorus (P), which is indispensable in innumerable metabolic pathways and frequently limiting in ecosystems. Therefore, this work focused on how land use change modifies bacterial metabolic capacity to obtain phosphorus in temperate oak forests in central Mexico. In order to answer this question, an experiment was realized to an isolated bacterial community from three sites (abandoned parcel with a background of intense agrochemical use, agricultural parcel of chamomile, and pine-oak forest) with the purpose to analyze their metabolic capacity to use diverse sources of P. Subsequently, the bacterial isolates were identified using molecular markers, specifically the gene that codes for the 16S subunit of the ribosomal RNA. Results showed that all the bacterial isolates analyzed have the metabolic capacity to acquire inorganic sources of P, without finding significant differences between isolates from distinct sites. While the acquisition of P from organic sources (2AEP and AMPA), was dominant in the strains isolated from oak forest mulch. However, differences were found in the cultivable bacterial diversity (1%), which suggests that the land use changes modifies the composition of the microbial community. The results of this work will lead to a greater understanding of the bacterial functional diversity associated with the phosphorus cycle in temperate oak forests of Mexico, as well as the role that edaphic microorganisms play in soil fertility.

Introducción

En la actualidad, la población mundial es de aproximadamente 7 mil millones de personas y se espera que para el 2050 aumente a 9 mil millones, ocasionando un incremento del 70% en la demanda de alimentos a nivel mundial (FAO, 2011). Esto generará una gran presión sobre los sistemas agrícolas, incrementando la conversión de bosques naturales en tierras de cultivo y pastizales, así como el abandono de tierras cultivables degradadas (Tischer et al., 2015; Wang et al., 2017).

México, considerado como el mayor centro de riqueza y evolución de encinos en América, con 161 especies en total y 109 endémicas (Arizaga et al., 2009), posee una distribución potencial de bosques de encinos y bosques mixtos de pino-encino de más de 32 millones de hectáreas (ha). Sin embargo, se ha reportado que únicamente prevalecen 24 millones de ha, equivalentes al 12% de la superficie nacional, de las cuales un tercio se encuentran en condiciones de vegetación secundaria (Challenger & Soberón, 2008), siendo la expansión de la frontera agrícola un factor importante en la disminución de estos ecosistemas (Arizaga et al., 2009).

En sistemas forestales, la producción de la hojarasca que forma al mantillo y su descomposición, representan la principal transferencia de materia orgánica (MO) proveniente de la parte aérea a la superficie del suelo (López-Hernández et al., 2013). Asimismo, se considera que estos procesos son la fuente de fertilización natural más importante, ya que proporcionan al suelo más de la mitad de los nutrientes absorbidos anualmente por las plantas (López-Hernández et al., 2013).

La incorporación de MO al suelo, además, ocasiona un aumento en la actividad y el crecimiento de la comunidad microbiana edáfica, principalmente de microorganismos heterótrofos, los cuales al descomponer la MO proveen de nutrientes disponibles a las plantas y a toda la comunidad de bacterias y hongos con diferentes metabolismos (Stark et al, 2008; López-Hernández et al., 2013; Montaña & Sánchez-Yañez, 2014). Por ende, cuando los bosques son deforestados y sustituidos por cultivos agrícolas, la vegetación se modifica drásticamente y se altera la cantidad y la calidad de los componentes orgánicos (Tischer et al., 2015), así como las características físicas y químicas del suelo, teniendo una

influencia directa en la diversidad y la actividad de la comunidad microbiana, que afecta a los ciclos biogeoquímicos de manera global (Lauber et al, 2008; Upchurch et al, 2008; Tosi et al., 2016).

No obstante, existe poca información de cómo el cambio de uso de suelo afecta las capacidades metabólicas de los microorganismos y cómo esto modifica los procesos de transformación y adquisición de nutrientes esenciales para el desarrollo y el crecimiento de los seres vivos. Un ejemplo es el fósforo (P), que es indispensable en innumerables rutas metabólicas y en la síntesis de biomoléculas como enzimas y otras proteínas, carbohidratos, fosfolípidos, ADN, ARN, y del cofactor nucleotídico más importante para la transferencia de energía y catálisis celular, el ATP (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013; Tapia-Torres et al. 2016; Nath et al., 2017).

En sistemas naturales, el suministro de P se lleva a cabo casi en su totalidad por el intemperismo del material parental que da lugar a minerales secundarios (Figura 1). Debido a esto, la principal fuente inicial de P son los minerales primarios como apatita, hidroxiapatita y oxiapatita, que suministran iones fosfato (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) a la solución del suelo (Figura 1; Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013). Posteriormente, el P es obtenido por las plantas y los microorganismos edáficos principalmente de las formas inorgánicas (Pi) más disponibles representadas por los iones fosfato (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) y generalmente expresadas como ortofosfato (PO_4^{3-}) (Figura 1). Sin embargo, debido a la alta reactividad química del P, las formas inorgánicas pueden precipitarse o fijarse al reaccionar con iones de calcio, hierro o aluminio (Ca, Fe y Al) dependiendo de las condiciones de pH del suelo (Figura 1), que aunado a la alta demanda por la biota edáfica ocasionan la disminución de la disponibilidad de P (Fernández et al. 2005; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013).

Cuando el ortofosfato no está disponible, las plantas y microorganismos necesitan adquirir el P a partir de otras formas químicas, siendo las formas orgánicas (Po) la principal fuente alternativa (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013; Alori et al., 2017), ya que representan el 30-50% del fósforo total en el suelo (Alori et al., 2017). Los microorganismos pueden utilizar formas orgánicas lábiles, como los ésteres de fosfato (estado de oxidación +5) que son fácilmente hidrolizables y se caracterizan por tener

uniones carbono-oxígeno-fósforo (C-O-P) que son fáciles de romper. Del mismo modo, se conoce que algunas bacterias y hongos son capaces de utilizar como fuente de P a compuestos organofosforados con diferente estado de oxidación como los fosfonatos (estado de oxidación de +3), que al poseer un enlace directo carbono-fósforo (C-P) requieren de una mayor energía para romperlo y dejar disponible al fósforo (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013).

El proceso por el que se hidrolizan y mineralizan los residuos orgánicos de las plantas, animales y biomasa microbiana muerta a través de la acción de enzimas extracelulares de origen tanto microbiano como vegetal, recibe el nombre de mineralización bioquímica (Neal et al., 2017a), cuyo producto final es la liberación de iones fosfato a la solución del suelo (Figura 1; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013). En este sentido, Tapia-Torres & García-Oliva (2013) señalan que en ambientes oligotróficos donde existen bajas concentraciones y poca disponibilidad del fósforo (en el que $P_o \geq P_i$), la mineralización del P_o es fundamental para que las plantas y los microorganismos puedan acceder a ese nutriente. Del mismo modo, se ha visto que en ambientes boscosos, la mineralización del P_o contribuye significativamente a la disponibilidad de dicho elemento (Vincent et al, 2010). Por lo tanto, las evidencias en distintos ambientes sugieren que el reciclado

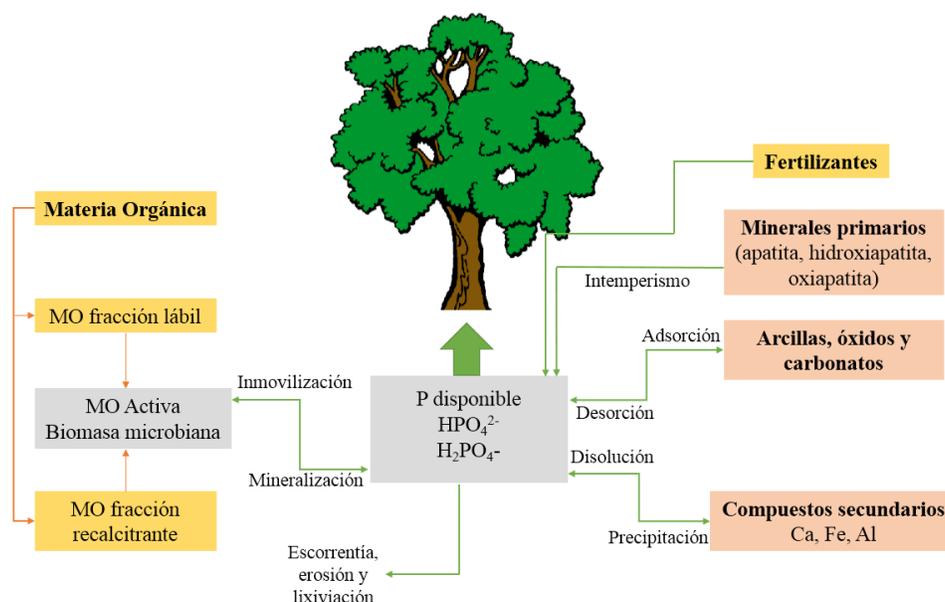


Figura 1. Esquema que representa el ciclo del fósforo en el suelo. Los cuadros amarillos son las entradas al sistema, los cuadros grises representan las fracciones disponibles, los cuadros rosas representan el almacén geoquímico. Las flechas indican los procesos y factores que tienen influencia en la disponibilidad del fósforo. MO: Materia orgánica. Modificado de Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez (2012).

biológico de Po es una fuente constante de P, esencial para el flujo de materia y energía y el funcionamiento de los ecosistemas.

Así pues, es importante resaltar que el proceso de mineralización depende de la presencia de microorganismos con la capacidad metabólica y por lo tanto, genética, para sintetizar las enzimas necesarias en la mineralización de los compuestos orgánicos de P, cuya síntesis demanda diferentes cantidades de energía (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013). Hoy en día, aquellos microorganismos que poseen genes codificantes para distintas funciones dentro de los ciclos biogeoquímicos, son conocidos como los recursos genéticos del suelo (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013).

La reducida disponibilidad de P en los ecosistemas, aunada a que éste es un elemento que no puede ser sintetizado de manera artificial, limita el crecimiento y el desarrollo de una gran variedad de organismos, como las plantas vasculares (Mohammadi, 2012; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013; Restrepo-Franco et al. 2015; Tapia-Torres et al. 2016), cuyo crecimiento depende de los niveles de nutrientes disponibles en el ambiente donde se desarrollan, de manera que una menor disponibilidad de P, conducirá a una menor tasa de crecimiento (Escutia-Lara et al., 2010).

Para el caso de los cultivos, el P es el segundo nutriente mineral más comúnmente limitante después del nitrógeno (N), puesto que sólo el 0.1% del P en el suelo se encuentra disponible para que las plantas lo usen (Alori et al., 2017). Las fuentes de P y su distribución en el suelo son muy importantes para la sostenibilidad de las prácticas agrícolas, debido a que dicho elemento es necesario para favorecer la formación de semillas, el desarrollo radicular, la fuerza de las pajas en los cereales y la maduración de los cultivos (Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012).

En muchos suelos agrícolas, la escasez de P puede ser el principal factor limitante de la producción, por ello se aplican fosfatos inorgánicos combinados en fertilizantes minerales con nitrógeno y potasio (Cordell et al, 2009; Nath et al., 2017; Neal et al., 2017a). Sin embargo, el uso constante de fertilizantes inorgánicos ocasiona cambios en el pH del suelo, así como la disminución de los recursos genéticos del mismo, modificando las funciones biogeoquímicas entre sistemas naturales y agrícolas, lo que a su vez reduce la

fertilidad del suelo (Murawska et al., 2017). Aunado a ello, una proporción importante de los fertilizantes fosfatados se ocluyen en el suelo al formar compuestos químicos estables con iones de Ca, Fe o Al y/o se lixivian hacia los cuerpos de agua, lo cual además de limitar la solubilidad y la disponibilidad de P para los cultivos, promueve la erosión química del suelo, así como los problemas de contaminación y eutrofización (Fernández et al. 2005; Alori et al., 2017).

Lo anterior toma relevancia cuando se considera que las reservas de roca fosfórica disponibles en todo el mundo pueden agotarse en los próximos 50 a 130 años, reduciendo nuestra capacidad para suministrar P en los suelos de manera artificial (Cordell et al, 2009; Heppell et al. 2014). Aunado a ello, México no cuenta con reservas importantes de roca fosfórica en comparación con otros países (Jasinski, 2012), por lo que es altamente dependiente de la importación de fertilizantes fosfatados para mantener la producción de alimentos. En nuestro país, además, no existe una regulación referente al uso del P, debido al limitado conocimiento que se tiene sobre la dinámica de este elemento en el suelo, por lo que los fertilizantes se añaden a los suelos agrícolas sin tener en cuenta sus características físicas, la cantidad de P que ya se encuentra disponible, ni la diversidad y abundancia de microorganismos que sean capaces de mineralizar o solubilizar moléculas de este nutriente (Palomo-Rodríguez et al., 2007).

Por esa razón, entender los mecanismos físicos, químicos y biológicos que permiten la disponibilidad de P en el suelo es indispensable para la seguridad alimentaria del mundo. En este sentido, es necesario explorar alternativas para incrementar y asegurar la accesibilidad del P a largo plazo, como la inoculación en parcelas agrícolas con microorganismos capaces de reciclar el P presente en el suelo, los cuales pueden liberarlo tanto de moléculas inorgánicas como de moléculas orgánicas (Alori et al., 2017; Nath et al., 2017). Esto es muy importante debido a que, después de la fertilización química, la solubilización y mineralización microbiana del P son la única vía para incrementar el P disponible para las plantas, pudiendo reducir la aplicación de fertilizantes inorgánicos y por ende, el alto impacto negativo que tiene sobre el medio ambiente (Alori et al., 2017).

Antecedentes

Formas químicas del P

En el suelo pueden encontrarse formas orgánicas e inorgánicas de P (Mohammadi, 2012; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013; Restrepo-Franco et al. 2015), cuya concentración estará determinada por los procesos de mineralización del Po e inmovilización del Pi, así como por el equilibrio entre la adsorción-desorción y precipitación-disolución del Pi (Restrepo-Franco et al. 2015).

Los compuestos de Pi comúnmente están unidos a distintas formas de Al, Fe y Ca, dependiendo del pH del suelo (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013; Restrepo-Franco et al. 2015). En suelos ácidos, el P suele ser fijado por óxidos e hidróxidos libres de Fe y Al, mientras que en los suelos alcalinos es fijado por Ca (Restrepo-Franco et al. 2015). Se ha reportado también que cuando el pH no es variable entre suelos, la solubilidad de los precipitados del P corresponde al orden siguiente: Ca-P > Al-P > Fe-P (Restrepo-Franco et al. 2015). No obstante, se sabe que la disponibilidad de los iones fosfato también está influenciada por la adición de fertilizantes, el uso del suelo y los cambios en la vegetación (Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012). En contraste, el Po se relaciona con moléculas orgánicas de distinto grado de complejidad, lo cual condiciona la velocidad de mineralización para cada tipo de molécula (Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013).

El P se localiza en dos grandes almacenes dentro del suelo: 1) el almacén biológico, formado por residuos de plantas, animales, microorganismos y Po edáfico; y 2) el almacén geoquímico, que engloba a los minerales primarios provenientes de la roca madre, el P adsorbido en el área superficial de partículas órgano-minerales y el P ocluido, correspondiente a los minerales secundarios que se forman por la precipitación de iones fosfatos con Fe, Al y Ca (Walker y Syers, 1976; Johnson et al., 2003; Whalen & Sampedro, 2010; Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013). Estos almacenes, además, son dependientes entre sí, debido a que los procesos biológicos influyen en el balance químico del suelo y viceversa (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013).

Así pues, cuando el suministro de P disponible proveniente del almacén geoquímico no es suficiente para satisfacer la demanda de la biota, los compuestos orgánicos de P son la principal fuente alternativa (Martínez-Gutiérrez, 2013; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013). Por ello, además de entender los mecanismos involucrados en la disponibilidad del P a partir de fuentes orgánicas e inorgánicas, es importante conocer el grado (lábil, moderadamente lábil u ocluido) en que el P se encuentra unido a las partículas del suelo, de manera que podamos saber si está disponible para la biota o si es inaccesible debido a la complejidad de la unión (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013).

Estrategias de Obtención de P

Estrategias a partir de Compuestos Orgánicos

Dentro de los compuestos organofosforados biogénicos, los ésteres de fosfato (estado de oxidación +5) representan entre el 30-60% del P total, siendo la fuente de P orgánico más abundante en la biósfera y por ende, los compuestos organofosforados más estudiados (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013; Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012). Poseen un enlace C-O-P (Quinn et al., 2007) y se dividen en diésteres y monoésteres (Figura 2; Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012).

Los diésteres, como los ácidos nucleicos y los fosfolípidos, son mineralizados rápidamente como consecuencia de su débil adsorción en los materiales del suelo. En contraste, los monoésteres, como los fosfatos de inositol (fitato y ácido fítico, por ejemplo), pueden acumularse en el suelo en grandes cantidades, ya que pueden estar adsorbidos a las superficies de los óxidos férricos y tener fuertes interacciones con los ácidos húmicos y fúlvicos, haciendo que estos compuestos sean más difíciles de mineralizar (Figura 2; Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012; Neal et al., 2017b).

La mineralización de los ésteres de fosfato se lleva a cabo por la acción de enzimas hidrolíticas que son secretadas fuera de la célula (Neal et al., 2017a; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013), las cuales pueden clasificarse en fosfomonoesterasas y fosfodiesterasas (Figura 2; Acosta-Martínez & Tabatabai, 2011; Eivazi & Tabatabai, 1977). Las fosfomonoesterasas son las fosfatasas más estudiadas en el suelo (Neal et al., 2017a;

Acosta-Martínez & Tabatabai, 2011) y generalmente, se hace mención de ellas en la literatura con los nombres de fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina, las cuales se clasifican de acuerdo al pH óptimo para su actividad (Acosta-Martínez & Tabatabai, 2011).

Existen tres familias de genes, *phoA*, *phoD* y *phoX* que codifican para la enzima fosfatasa alcalina, siendo el gen *phoD* el más abundante en ecosistemas terrestres (Figura 2; Fraser et al., 2017; Neal et al., 2017a). No obstante, se ha reportado que los genes *phoA* y *phoD* también codifican para algunas enzimas con actividad fosfodiesterasa (Figura 2; Neal et al., 2017b). Aparentemente estos genes son regulados por la disponibilidad de P a través del regulón *pho*, que se encuentra conformado por 30 genes (Figura 2; Abel et al., 2000), el cual sólo se expresa bajo condiciones de escasez de P (Neal et al., 2017a). Sin embargo, el gen *phoC* que codifica para una fosfatasa ácida no específica (Fraser et al., 2017; Neal et al., 2017a), no se encuentra regulado por la cantidad de P disponible que haya en el suelo (Neal et al., 2017a). Otros genes que codifican para la síntesis de fosfatasas ácidas son *NapA*, aislado de *Morganella morganii* (Fernández & Rodríguez, 2005); *napD*, y *napE*, obtenidos de *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*; y *acpA*, aislado de *Francisella tularensis* (Restrepo-Franco et al. 2015).

Asimismo, bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Nostoc*, *Caulobacter*, *Pseudomonas*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Corynebacterium*, etc., tienen la capacidad de sintetizar fosfatasas alcalinas (Figura 2; Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012). Mientras que la síntesis de fosfatasas ácidas se ha reportado en *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Lysobacter*, *Pedobacter*, *Serratia*, *Rhodobacter*, *Rhizobium*, entre otros (Figura 2; Neal et al., 2017a; Restrepo-Franco et al., 2015). Con respecto a la síntesis de fosfodiesterasas, no existen estudios que detallen a nivel de género aquellos organismos con los genes necesarios para su producción. Sin embargo, Bergkemper y colaboradores (2016) señalan que los órdenes Rhizobiales, Actinomycetales, Acidobacteriales y Burkholderiales incluyen organismos con la capacidad metabólica de mineralizar diésteres de fosfatos (Figura 2).

Del mismo modo, en el suelo existen enzimas fitasas que actúan específicamente sobre un sustrato y provocan la liberación de P proveniente de los fosfatos de inositol (Figura 2; Restrepo-Franco et al. 2015; Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012;

Eivazi & Tabatabai, 1977). Algunos de los genes relacionados con la síntesis de estas enzimas son HAPhy, CPhy y BPPhy (Figura 2; Neal et al., 2017b), siendo este último el más abundante en los suelos (Restrepo-Franco et al., 2015). *Bacillus* y *Enterobacter* son algunos géneros con la capacidad de sintetizar estas enzimas (Figura 2; Restrepo-Franco et al., 2015; Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012).

Actualmente, existen evidencias de que las bacterias también tienen la capacidad de utilizar los compuestos organofosforados más reducidos (+3) para obtener P, particularmente fosfonatos, los cuales se caracterizan por un enlace directo carbono-fósforo (C-P) (Figura 2; Kononova y Nesmeyanova, 2002). De hecho, se ha reportado que cuando estos compuestos ingresan al suelo, pueden ser degradados casi exclusivamente por medio de la actividad microbiana (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013).

Dentro de los fosfonatos, existen compuestos biogénicos y xenobióticos (Figura 2) (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013). Algunos de los fosfonatos biogénicos más importantes son metilfosfonato, etilfosfonato, fosfonoacetato, fosfonopiruvato y el 2-aminoetilfosfonato (2AEP), siendo este último el más abundante en la naturaleza (Quinn et al., 2007; Kononova y Nesmeyanova, 2002).

Las bacterias pueden utilizar los fosfonatos como fuente de P a través de dos estrategias: 1) por medio de enzimas hidrolasas con alta afinidad por el sustrato (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013) y 2) por la acción de enzimas liasas menos específicas (C-P liasa; Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012; Quinn et al., 2007). Se tiene conocimiento de tres diferentes hidrolasas que pueden romper el enlace C-P: fosfonoacetaldehído hidrolasa conocida como fosfonatasa, fosfonoacetato hidrolasa y fosfonopiruvato hidrolasa (Figura 2; Kononova y Nesmeyanova, 2002). Estas enzimas están codificadas por el conjunto genético conocido como regulón phn (Figura 2; Wackett et al., 1987; Metcalf y Wanner, 1991).

Se ha registrado que los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Erwinia* y *Actinobacteria* son capaces de utilizar fosfonatos como única fuente de P (Figura 2; Tapia-Torres et al., 2016; Morón-Cruz, 2014; Quinn et al., 2007; Kononova y Nesmeyanova,

2002). Sin embargo, pocos estudios en México han evaluado la capacidad de diversos microorganismos para obtener el P proveniente de estos compuestos.

Estrategias a partir de Compuestos Inorgánicos

Existen grupos bacterianos que no tienen la habilidad de obtener el P por medio de la mineralización de compuestos orgánicos, por ello han desarrollado diversas estrategias para adquirir el P de formas inorgánicas no disponibles, con la finalidad de satisfacer la demanda biológica de este nutriente (Tapia-Torres & García-Oliva, 2013).

El mecanismo principal por el que las bacterias transforman los fosfatos inorgánicos insolubles a formas solubles es la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Figura 2; Fernández et al. 2005; Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010). Esta solubilización se realiza principalmente debido a la disminución del pH del suelo, la formación de complejos estables con Al y Fe, o por la quelación de los cationes (Al, Fe, Ca) por los grupos hidroxilo y carboxilo de los ácidos (Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010).

Los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico son los agentes más comúnmente reportados como solubilizadores de fosfato (Figura 2; Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010). Sin embargo, el ácido oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, acético, glicónico, fumárico, indolacético, fórmico y adípico, también son capaces de solubilizar fosfatos (Figura 2; Beltrán-Pineda, 2014; Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010). Otros mecanismos de solubilización incluyen la eliminación de protones afuera de la célula para intercambiarlos con cationes unidos al P; y la producción de ácidos inorgánicos (Figura 2; Mohammadi, 2012; Fernández et al. 2005), los cuales se generan a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos de nitrógeno o azufre, liberando ácido nítrico o ácido sulfúrico respectivamente, que reaccionan con los fosfatos insolubles provocando su solubilización. Este último mecanismo ha sido registrado en bacterias del género *Thiobacillus* (Beltrán-Pineda, 2014).

Entre los géneros bacterianos que poseen la capacidad de solubilizar los fosfatos inorgánicos del suelo a partir de la producción de ácidos orgánicos se encuentran:

Pseudomonas, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Yarrowia*, *Streptosporangium*, *Rahnella*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Erwinia* (Figura 2; Alori et al., 2017; Beltrán-Pineda, 2014; Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010; Fernández et al. 2005), *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Gordonia*, *Kitasatospora*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ralstonia*, *Rhodobacter*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Sinorhizobium*, *Streptomyces* y *Thiobacillus* (Figura 2; Beltrán-Pineda, 2014). Del mismo modo, Restrepo-Franco y colaboradores (2015), reportaron que los géneros *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pantoea* y *Herbaspirillum* también pertenecen a este grupo funcional (Figura 2).

A pesar de los esfuerzos por entender la solubilización de P a escala molecular, el mecanismo que diferentes bacterias utilizan para solubilizar fosfatos continúa sin ser identificado (Muleta et al., 2013). No obstante, existen trabajos en los que se evidencia que la capacidad bacteriana para solubilizar fosfatos insolubles es resultado, principalmente, de la oxidación periplasmática de la glucosa a ácido glucónico por la vía de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (GDH; Babu-Khan et al., 1995; Liu et al., 1992), que sólo actúa en presencia del cofactor PQQ, el cual es biosintetizado por la enzima pirrolo-quinolina quinona (PQQ sintasa; Rodríguez et al., 2000). En este sentido, Goldstein y Liu (1987), identificaron y clonaron el gen HB101 de *Erwinia herbicola*, reportando que éste se encuentra involucrado en la biosíntesis del cofactor PQQ (Figura 2).

Asimismo, se ha registrado que en ciertos casos *in vitro*, la solubilización de fosfatos es inducida por la escasez de P (Beltrán-Pineda, 2014; Mohammadi, 2012; Goldstein y Liu, 1987), ya que la limitación de P conduce a una mayor actividad de la glucosa deshidrogenasa (GDH; Muleta et al., 2013).

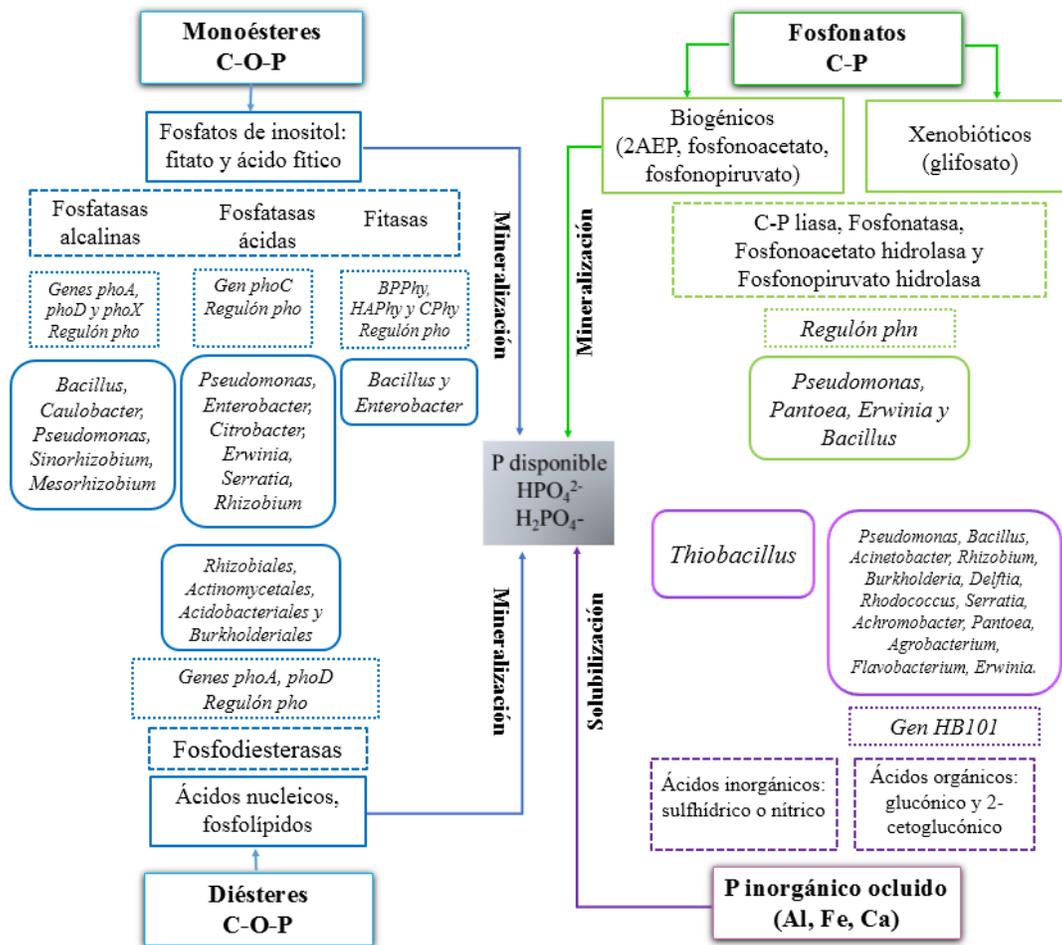


Figura 2. Esquema que representa las distintas formas orgánicas e inorgánicas de fósforo. Contorno azul: Representa a los ésteres de fosfato, divididos en monoésteres y diésteres. Contorno verde: Representa a los fosfonatos. Contorno morado: Representa al P inorgánico ocluido. Contorno con línea continua: Clasificación de compuestos y ejemplos. Contornos con línea punteada representa a: enzimas o ácidos (orgánicos e inorgánicos) que los microorganismos expulsan para dejar disponible al P de moléculas indicadas de acuerdo al color. Contorno con puntos indica los genes que codifican para la síntesis de enzimas y ácidos (orgánicos e inorgánicos). Cuadro redondeado con línea continua indica los géneros bacterianos con la capacidad de mineralizar o solubilizar los compuestos que el color de su contorno representa. La información para realizar este diagrama hipotético se obtuvo de los artículos citados en la sección de los antecedentes de esta tesis.

Consecuencias del cambio de uso de suelo sobre las comunidades microbianas edáficas y sus capacidades metabólicas

La conversión de bosques naturales en pastizales o en campos de cultivo, se ha vuelto común en muchos paisajes, teniendo fuertes repercusiones sobre la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres (Lauber et al., 2008; Guo et al., 2016). Se sabe

que al rededor del 38% de todos los paisajes naturales a nivel mundial han sido transformados a sistemas de manejo agrícola (Cao et al., 2017). Sin embargo, los efectos de esta conversión sobre la biomasa y la composición de las comunidades microbianas del suelo han sido pobremente caracterizadas (Tischer et al., 2015). Asimismo, existen pocos estudios en los que se evalúe cómo el cambio de uso de suelo modifica la capacidad metabólica de los microorganismos edáficos para adquirir nutrientes como el P, cuya fracción disponible en los ecosistemas suele ser muy limitada (Upchurch et al, 2008) y por lo tanto fundamental para el funcionamiento de los ecosistemas.

A pesar de la elevada diversidad microbiana que existe en el suelo, hay una gran cantidad de microorganismos edáficos equivalentes, los cuales poseen la misma capacidad genética para llevar a cabo los procesos que permiten la disponibilidad de P en el suelo (Rodríguez-Loinaz et al., 2008). Por ello, se ha sugerido que la mayoría de las especies microbianas dentro de un ecosistema específico, son funcionalmente redundantes (Rodríguez-Loinaz et al., 2008; Tischer et al., 2015), de modo que las mediciones de la diversidad funcional en las comunidades bacterianas pueden proporcionar información más relevante para el funcionamiento del suelo que la diversidad de especies (Rodríguez-Loinaz et al., 2008; Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012)

En trabajos anteriores, se han empleado diversas técnicas para estimar la actividad microbiana, tales como: tasas de mineralización, respiración, actividad enzimática, recuentos microbianos en placa, etcétera. Sin embargo, la información que proporcionan es limitada y no permite conocer en su totalidad la diversidad funcional de las comunidades microbianas ni su diversidad genética (Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012).

Wang y colaboradores (2017), por ejemplo, midieron la actividad enzimática y la cantidad de ácidos grasos producidos por bacterias, para describir los efectos que el cambio de uso de suelo tiene sobre la composición de la comunidad bacteriana y su capacidad metabólica para adquirir P después de convertir el bosque lluvioso en una plantación agroforestal de cauchos en China. A partir de ello, determinaron que dicha transformación produce efectos negativos en los microorganismos del suelo y su actividad, ya que la cantidad de ácidos grasos fue menor en las plantaciones de caucho, al igual que los niveles

de la actividad de la fosfatasa ácida en el suelo, esto en comparación con el bosque natural (Wang et al., 2017).

Del mismo modo, Moreira et al. (2013) también utilizaron la medición de la actividad enzimática para describir los efectos de la reforestación sobre la capacidad metabólica microbiana asociada al ciclo del P en áreas de la Amazonía tropical húmeda. En ese trabajo, se reportó que después de la plantación de árboles de caucho en zonas que habían sido despejadas para implementar agricultura de subsistencia, la cantidad de P disponible en el suelo se redujo, mientras que la actividad de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina incrementó.

Por otro lado, Tosi et al. (2016) utilizaron el carbono en biomasa microbiana y la actividad de la fosfomonoesterasa para determinar las diferencias estructurales y funcionales entre las comunidades microbianas de suelos agrícolas y de suelos prístinos de las selvas montañas en Sudamérica, donde ambas variables obtuvieron un menor valor en suelos cultivados cuando se comparan con sitios adyacentes no cultivados. Asimismo, indicaron que las comunidades microbianas de los suelos agrícolas mostraron una estructura genética modificada y una disminución de la diversidad beta filogenética en comparación con los suelos forestales (Tosi et al., 2016).

Sin embargo, ninguno de estos trabajos evalúa a través de un enfoque experimental cómo cambia tanto la diversidad biológica de la comunidad microbiana del suelo, como la diversidad de las capacidades metabólicas para utilizar el P. Del mismo modo, tampoco proveen información suficientemente detallada de lo que ocurre con la composición de la comunidad bacteriana, ya que la medición de ácidos grasos, por ejemplo, proporciona una idea de lo que ocurre con grandes grupos microbianos (Gram positivas y Gram negativas; microorganismos aerobios y anaerobios; Guo et al., 2016), pero no es posible saber cuáles son los efectos del cambio de uso de suelo a nivel de género o familia. Por su parte, los análisis de actividades enzimáticas no suelen considerar una gran variedad de enzimas y tampoco permiten conocer cuáles son los microorganismos que llevan a cabo la síntesis de cada una de las enzimas que se miden, frenando la aplicación biotecnológica de las mismas (Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012).

No obstante, existen pocos trabajos en los que además de cuantificar la actividad enzimática relacionada con el reciclado de P en suelos y sedimentos de zonas áridas, también se evaluó la capacidad de 1,163 aislados bacterianos para utilizar distintas fuentes de P (fosfato de potasio, fosfato de calcio, fosfito, 2-fosfonoacetaldehído, ácido (2-aminoetil) fosfónico y ADN) a través de su crecimiento en placa (Tapia-Torres et al. 2016). Los resultados indicaron que tanto las bacterias del suelo, como las bacterias de los sedimentos, fueron capaces de romper y utilizar formas de P en diferentes estados de oxidación.

Morón-Cruz (2014), por su parte, evaluó la capacidad de 45 aislados provenientes de un ecosistema árido del norte de México para degradar fosfonatos biogénicos (2AEP) y xenobióticos (glifosato), reportando que los géneros *Pseudomona*, *Pantoea*, *Erwinia* y *Bacillus* tienen la habilidad de utilizar este tipo de compuestos como única fuente de P, siendo *Bacillus* el género con mayor capacidad de mineralizar fosfonatos en dicho sitio.

Así pues, sabiendo la importancia del P para los ecosistemas y el papel fundamental que tienen los microorganismos en los procesos de transformación y adquisición de nutrientes, este trabajo se dedicó a evaluar la capacidad metabólica de la comunidad bacteriana proveniente del suelo y mantillo de un bosque de pino-encino del centro de México, una parcela agrícola y una parcela abandonada, para utilizar diferentes fuentes de P y determinar si había variaciones de acuerdo al uso de suelo. Los resultados de este trabajo permitirán una mayor comprensión de la diversidad funcional bacteriana asociada al ciclo del fósforo en Andosoles de México de acuerdo al uso del suelo actual, así como el papel que los microorganismos edáficos desempeñan en la fertilidad del suelo. Además, posibilitará la identificación de cepas bacterianas con potencial para ser utilizadas en el desarrollo de biofertilizantes, los cuales son una alternativa para una agricultura más sustentable y para restaurar suelos con diferente grado de degradación.

Pregunta de investigación

¿Cómo el cambio de uso de suelo modifica la capacidad metabólica de la comunidad bacteriana edáfica para obtener el fósforo en bosques templados del centro de México?

Objetivo General

Analizar cómo cambia la capacidad metabólica de la comunidad bacteriana edáfica para obtener el fósforo en ecosistemas templados de México como consecuencia del cambio de uso de suelo.

Objetivos Específicos

- Obtener aislados bacterianos del suelo de tres sitios con diferente uso de suelo (parcela agrícola, parcela abandonada y bosque mixto pino-encino, el cual a lo largo del documento se denominará como “encinar”).
- Evaluar mediante un enfoque experimental, la capacidad de los aislados bacterianos para utilizar diferentes formas químicas de fósforo.
- Identificar todos los aislados bacterianos obtenidos utilizando marcadores moleculares, específicamente el gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal.
- Seleccionar los aislados bacterianos con potencial biotecnológico asociado al ciclo del fósforo (aislados que hayan podido utilizar el mayor número de fuentes de P).

Hipótesis

Los cambios en las características físicas y químicas del suelo, ocasionadas por un cambio en su uso, influyen en la capacidad metabólica de la comunidad bacteriana para obtener el fósforo.

Materiales y Métodos

Sitio de Estudio

La localidad de Avándaro, se ubica al poniente de la ciudad de Toluca y pertenece al municipio de Valle de Bravo en el Estado de México (Figura 3), teniendo una extensión de 421.2 km² (Secretaría de Turismo, 2015; H. Ayuntamiento de Valle de Bravo & SEDUR, 2006). Este valle se encuentra dentro del sistema montañoso del Nevado de Toluca, por lo que sus características orográficas corresponden a una morfología montañosa con tres formas de relieve principales: zonas accidentadas con grandes pendientes, que presentan un alto riesgo de erosión cuando la cobertura vegetal se pierde; zonas semiplanas o lomeríos, ubicados en la región suroriente del municipio; y algunas zonas planas (H. Ayuntamiento de Valle de Bravo & SEDUR, 2006).

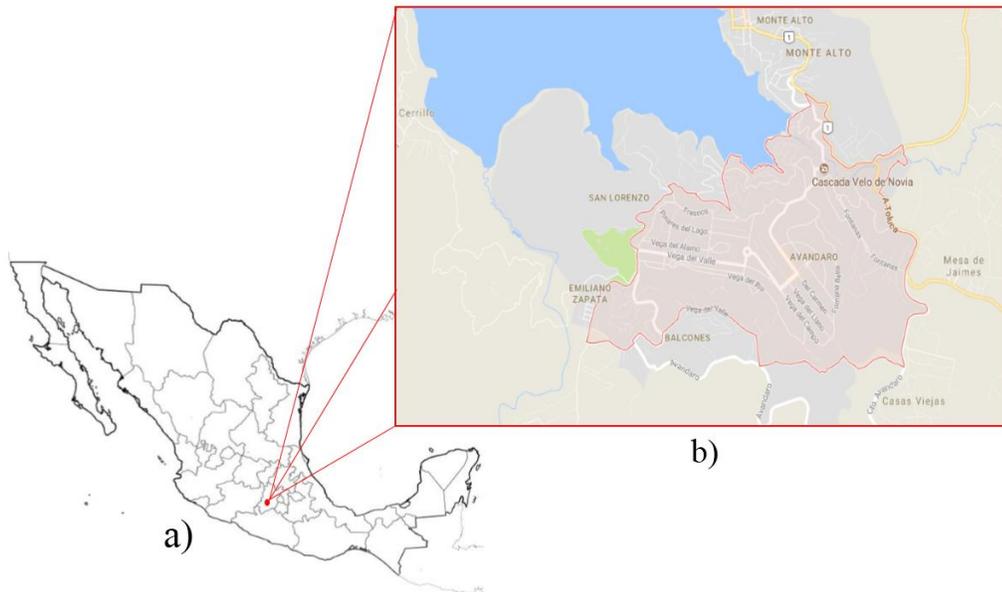


Figura 3. a) Ubicación de la localidad de Avándaro, perteneciente al municipio de Valle de Bravo, Estado de México, México; b) Avándaro, Estado de México (Imagen capturada en Google Maps, 2017).

El clima predominante en la región es templado subhúmedo C (w). La temporada de lluvias se presenta de mayo a octubre y los meses secos de noviembre a abril, con una precipitación anual de 1,001 mm. La temperatura promedio anual es de 20° C, pero se registran temperaturas máximas de 32° C en el mes más cálido (mayo) y temperaturas mínimas de 13° C en el mes más frío (enero; López-Pérez et al., 2011; H. Ayuntamiento de Valle de Bravo & SEDUR, 2006).

En esta región predominan los siguientes tipos de suelo: *Andosol*, *Regosol* y *Acrisol órtico* (López-Pérez et al., 2011). Los *Andosoles* son suelos oscuros de origen volcánico que contienen una gran cantidad de alófono; su distribución abarca toda la zona montañosa del país y pueden encontrarse dos subtipos: húmico y ócrito (López-Pérez et al., 2011). Este tipo de suelo no es considerado apto para el desarrollo de actividades agrícolas debido a que es susceptible a la erosión eólica, por lo que el uso más recomendado para su conservación es el forestal (INEGI, 2004). Los *Regosoles* en cambio, pueden encontrarse en diferentes tipos de clima, vegetación y relieve; son suelos de color claro, poco desarrollados y pobres en materia orgánica, cuya fertilidad depende de la profundidad y la pedregosidad del suelo (INEGI, 2004). Por su parte, los *Acrisoles órticos* se localizan principalmente en las partes bajas y planas de zonas con clima tropical o templado lluvioso, son suelos ácidos muy susceptibles a la erosión que no presentan un alto rendimiento agrícola, por lo que el uso forestal se considera el más adecuado para este tipo de suelo (López-Pérez et al., 2011; INEGI, 2004).

En 1980 la cobertura forestal cubría el 62% del territorio municipal, sin embargo, en menos de 20 años dicha cobertura se redujo en un 30% debido a la expansión de la frontera agrícola y a la apropiación de grandes extensiones de bosque por parte de algunos pobladores de Avándaro (Torres-Pulido & Rosas-Ferrusca, 2010; H. Ayuntamiento de Valle de Bravo & SEDUR, 2006). Sin embargo, en los últimos años se ha fomentado un cambio en el uso de propiedades ejidales y comunales a causa de la degradación del suelo y su baja productividad agrícola, por lo que se han ido integrando al área urbana del municipio promoviendo la expansión de desarrollos inmobiliarios (Torres-Pulido & Rosas-Ferrusca, 2010).

Dentro de la localidad de Avándaro, el proyecto tomó lugar en el rancho “La Paz” (Figura 4), donde se cultivan plantas medicinales que después son procesadas para generar productos medicinales que se ofertan en el mercado. Todo el proceso de producción agrícola está basado en una técnica conocida como “agricultura biodinámica”, cuyo principal objetivo es restaurar el suelo considerándolo como un organismo complejo, a través de su enriquecimiento con preparados vegetales y minerales elaborados con materia prima del bosque, con el fin de evitar el uso de fertilizantes, pesticidas y herbicidas industriales. De este modo, se ha logrado disminuir en cierto grado la degradación que el suelo presentaba en años anteriores (Sanandi, 2017).



Figura 4. Imagen panorámica del rancho “La Paz”. Foto. Emily S. García.

Diseño de muestreo

El muestreo se realizó en el mes de enero de 2017 y consistió en coleccionar suelo en un gradiente de manejo agrícola conformado por tres sitios contrastantes: 1) conservado, representado por un bosque de pino-encino en donde adicionalmente se coleccionó mantillo (de aquí en adelante se mencionará “encinar” para referirnos a este sitio); 2) agrícola, que corresponde a una parcela cultivada con manzanilla; y 3) abandonado, con 17 años sin recibir ningún tipo de manejo agrícola, pero con antecedentes de un uso intensivo de agroquímicos.

En los sitios agrícola y abandonado, se trazó un cuadrante de 20 x 10 m y dentro de este cuadrante, de manera aleatoria sistematizada se trazaron seis transectos de 10 m de largo a favor de la pendiente y separados entre sí cada 3 m. Las tres muestras colectadas por transecto, se mezclaron para formar una muestra compuesta por transecto. En total se obtuvieron seis muestras compuestas por cada cuadrante (Figura 5). La colecta de muestras en el sitio agrícola fue realizada entre los 19° 06.487' latitud norte y 100° 07.640' longitud oeste, a una altitud de 2355 m; mientras que en el sitio abandonado se llevó a cabo entre los 19° 06.575' latitud norte y 100° 07.618' longitud oeste, a una altitud de 2366 m.

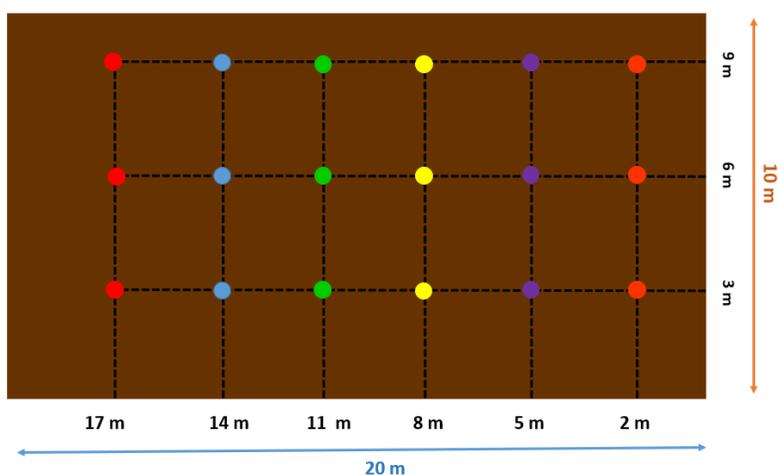


Figura 5. Diseño de muestreo utilizado para la colecta de suelo en los sitios agrícola y abandonado. Los puntos del mismo color, representan los sitios en que se colectaron las submuestras que conforman una muestra compuesta.

En el sitio conservado de bosque de pino-encino, cada punto de colecta se definió a través de la observación directa de parches de encinos. El muestreo siguió las coordenadas que se muestran en la figura 6.

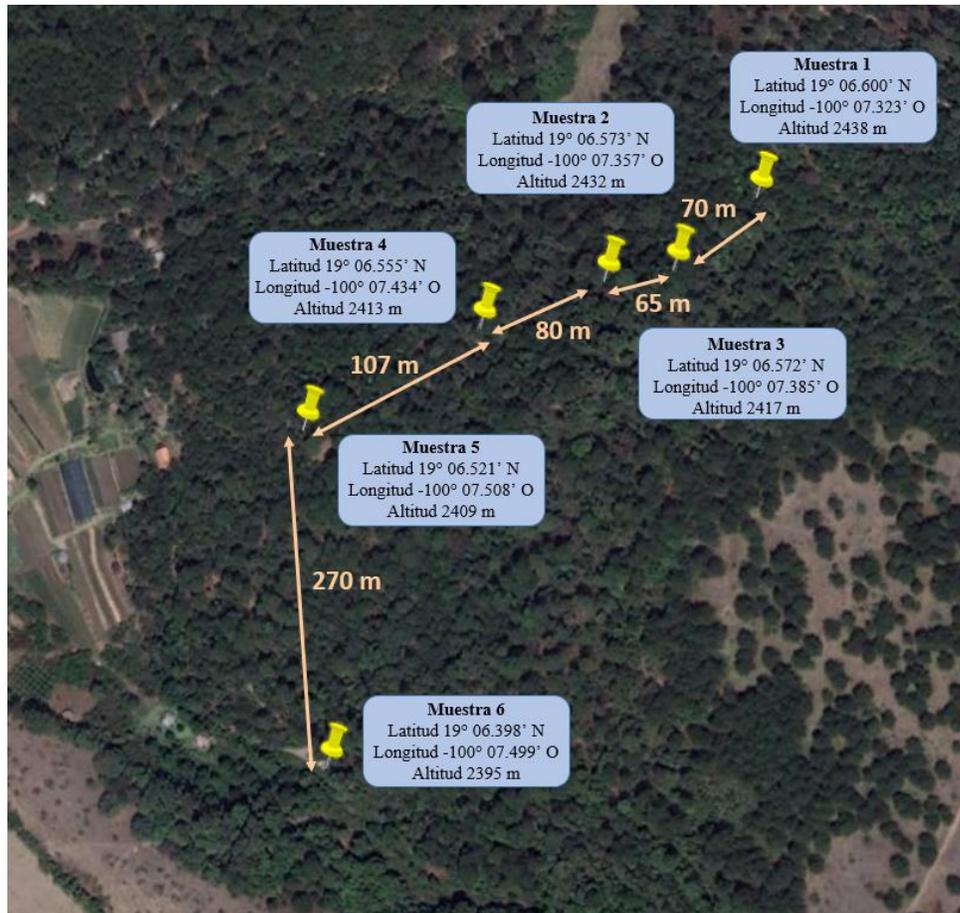


Figura 6. Ubicación de los puntos en los que se colectaron las muestras del sitio conservado, así como la distancia entre cada sitio (Imagen capturada en Google Earth, 2017).

En cada sitio, se trazó un cuadrante de 10x10 m y dentro de cada cuadrante se trazaron tres transectos en escuadra (a lo ancho y largo) cada 3, 6 y 9 m, teniendo una separación de 3 m entre ellos (figura 7). Cada muestra de suelo y de mantillo se recolectó en las intersecciones de los transectos, las cuales se representan en el inciso a) de la figura 7 como puntos rojos, siendo éste el modo en que se colectaron las muestras de los sitios 1 y 4. A continuación, se realizaron diversas combinaciones que se muestran en los incisos b) y c) de la figura 7, las cuales simbolizan la manera en que se colectó el suelo de los sitios 2 y 5, y de los sitios 3 y 6 respectivamente.

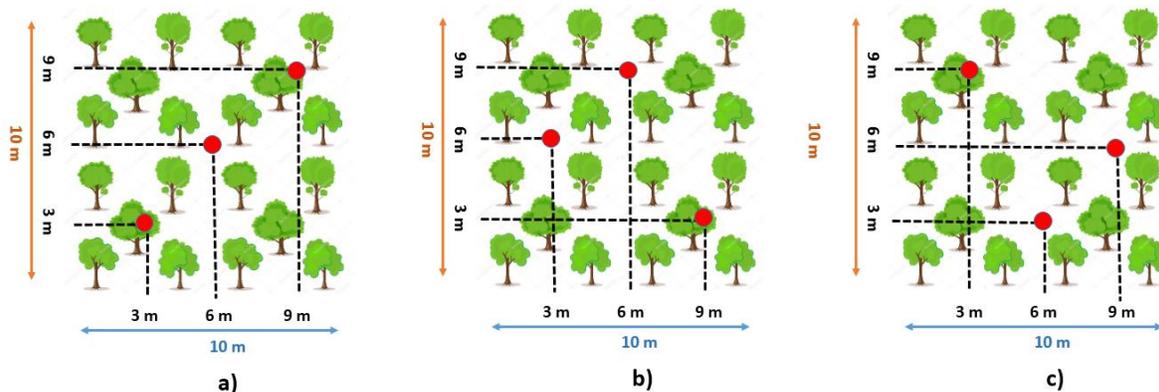


Figura 7. Diseños de muestreo utilizados para la colecta de suelo y mantillo en el sitio conservado. Los puntos rojos representan los sitios en que se tomaron las submuestras.

Las muestras de suelo fueron tamizadas con una malla del no. 10, para retirar el material grueso y poder procesarlas. Las muestras de mantillo, se molieron utilizando un molino de vegetación (marca Thomas Scientific, modelo 3383L10) para su posterior procesamiento. La obtención de aislados microbianos se realizó utilizando tres muestras compuestas por cada sitio, cada muestra se conformó por la mezcla homogénea de dos muestras (transecto 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6), teniendo un total de 12 muestras.

Análisis Biogeoquímicos

En esta sección se llevaron a cabo dos estrategias de trabajo: 1) Se realizaron análisis biogeoquímicos de nutrientes (C y P) en la biomasa microbiana, así como de la actividad enzimática en el suelo y mantillo de los sitios de muestreo; y 2) Se incorporaron datos de caracterización provenientes de investigaciones realizadas de manera simultánea en los mismos sitios. Los análisis biogeoquímicos de C y P en biomasa microbiana y de la actividad enzimática se hicieron en colaboración con el IBQ. Alberto Morón Cruz, mientras que los datos de C y P disueltos, así como los de P disponible en el suelo de los tres sitios de muestreo fueron obtenidos del trabajo de Morón-Cruz *en prep.* A continuación, se describen los métodos de las técnicas en las que se colaboró en la obtención de los datos. Todos los análisis biogeoquímicos se realizaron en el laboratorio de Biogeoquímica de Suelos del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM.

Humedad y pH

El porcentaje de humedad se obtuvo a través del método gravimétrico. Se pesaron 5 g de cada muestra y se colocaron en un horno a 80° C por 48 horas. Se registró el peso del suelo húmedo y el peso del suelo seco después de las 48 horas. Finalmente, el porcentaje de humedad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso suelo húmedo} - \text{Peso suelo seco}}{\text{Peso suelo húmedo}} \times 100$$

Para determinar el pH del suelo se utilizó una solución 1:10 p/v de suelo con agua desionizada y se determinó utilizando un potenciómetro previamente calibrado (Thermo Scientific, modelo Orion 3star Plus).

Análisis de nutrientes

El C microbiano (Cmic) se cuantificó utilizando un Analizador de Carbono Total (UIC-COULOMETRICS mod. 50120; Chicago, E.U.A.); mientras que la determinación del P contenido en la biomasa microbiana se realizó con un fotospectrómetro de UV-Visible (marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S).

❖ C y P en biomasa microbiana

Esta fracción se refiere a la concentración de C y P que está inmovilizada en la biomasa de los microorganismos del suelo o del mantillo. Para determinar estas concentraciones se utilizó el método de extracción-fumigación con cloroformo (Vance et al., 1987).

Para determinar el C microbiano, se pesaron por duplicado 20 g de suelo de cada muestra, de manera que se tuviera una muestra fumigada con cloroformo y otra no fumigada. Posteriormente, cada muestra se humedeció a capacidad de campo y se incubaron durante 24 horas a 25° C. Después se realizó una extracción con 80 ml de K₂SO₄ 0.5 N con agitación a 350 rpm por 30 minutos (Brookes et al., 1985). Las muestras se filtraron al vacío con membranas millipore de 0.45 µm. Del extracto resultante se tomó una alícuota de las muestras fumigadas y sin fumigar y se cuantificó el carbono total microbiano (CTmic).

Para obtener el P en biomasa microbiana (Pmic), se pesaron 5 g de muestra por duplicado con el fin de realizar un tratamiento de fumigación con cloroformo y otro sin fumigar (Anderson y Domsch, 1978; Cole et al., 1978). Posteriormente, las muestras se humedecieron a capacidad de campo y se incubaron durante 24 horas a 27° C. Después, se agregaron 30 ml de NaH₂CO₃ 0.5 M a pH de 8.5 para extraer la fracción de P lábil de cada muestra (Hedley et al., 1982) y se agitaron por 16 horas a 350 rpm. A continuación, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm por 25 minutos (centrifuga Thermo Scientific SL 16), se filtraron con papel filtro Whatman No. 42 y se digirieron utilizando 1.11 ml de H₂SO₄ 11 N y 0.6 ml de persulfato de amonio al 50% en una autoclave a 121° C durante una hora. Las muestras se neutralizaron en un rango de pH entre 6.5 – 7 y se aforaron a 25 ml con agua desionizada. La concentración de P microbiano se determinó a través del método de cuantificación de fósforo inorgánico por colorimetría utilizando el sistema reductor de ácido ascórbico y antimonio como catalizador (Murphy y Riley, 1962), usando una solución para desarrollo de color que contiene molibdato de amonio, tartrato de antimonio y potasio, H₂SO₄ 14 N y ácido ascórbico. Del extracto previamente digerido y neutralizado se tomaron 5 ml y se añadieron 5 ml de la solución para desarrollo de color, después se aforó a 50 ml. Cada muestra se leyó en un espectrofotómetro de UV-Visible (marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S) a una longitud de onda de 882 nm. Las concentraciones finales de C y P microbianos se calculan de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[]_{microbiano} = \frac{[]_{fumigado} - []_{sin\ fumigar}}{Coeficiente\ de\ extracción}$$

Donde [] representa la concentración de C o P.

El coeficiente de extracción es el factor de recuperación y varía de acuerdo al tipo de suelo. Se utilizó un coeficiente de extracción distinto para cada nutriente, los cuales fueron 0.45 para el Cmic (Joergensen, 1996) y 0.4 para Pmic, el cual es recomendado para suelos con pH de 6.2 a 8.2 (Hedley et al., 1982; Lajtha et al., 1999).

Análisis enzimáticos

El método para medir la actividad enzimática en el suelo y en el mantillo se basó en la determinación espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado por gramo de suelo por unidad de tiempo, cuando la enzima extraída del suelo es incubada en presencia de un sustrato unido a p-nitrofenol (pNP-sustrato) en una solución buffer (Tabatabai y Bremner, 1969; Verchot y Borelli, 2005; Fioretto *et al.*, 2009). Este proceso fue utilizado para las siguientes enzimas: fosfodiesterasa (FD), fosfomonoesterasa (FM) y beta-glucosidasa (BG). Para determinar la actividad de fosfonatasa (FN) se siguió una metodología modificada de (Baldrian, 2009) seguida de la cuatificación de Pi por colorimetría (Etechevers et al., 1983; Tapia-Torres, 2015). En la Tabla 1 se muestran las enzimas cuantificadas, así como las variables más importantes para la determinación de la actividad enzimática.

Tabla 1. Enzima, sustrato, concentración del sustrato y tiempo de incubación.

<i>Enzima</i>	<i>Sustrato</i>	<i>Concentración</i>	<i>Tiempo de incubación</i>
<i>B-Glucosidasa (BG)</i>	pNP-glucopiranoside	5 mM	2 h
<i>Fosfomonoesterasa (FM)</i>	pNP-phosphate	5 mM	2 h
<i>Fosfodiesterasa (FD)</i>	Bis(4-nytropheny) phosphate	5 mM	2 h
<i>Fosfonatasa (FN)</i>	2-AEP	5 mM	2 h

Para cuantificar las cuatro enzimas antes mencionadas, se pesaron 2 g de suelo fresco de cada muestra y se les añadió 30 ml de MUB (Modified Universal Buffer) ajustado al pH de cada muestra. El buffer MUB contiene Tris-HCl, ácido maléico, ácido cítrico, ácido bórico y agua, el pH se ajustó utilizando NaOH con un potenciómetro previamente calibrado (Thermo Scientific, modelo Orion 3star Plus). Posteriormente, para llevar a cabo la extracción de las enzimas, la mezcla de suelo y MUB se agitó durante 30 minutos. Después, se tomaron 670 µl del extracto que contiene la enzima a cuantificar, se

colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se añadieron 670 μ l del sustrato en el que la enzima actúa, el cual es específico para cada una de ellas (Tabla 1). Se colocaron controles de sustrato preparados con 670 μ l de sustrato y 670 μ l de MUB y controles de muestra que contenían 670 μ l del extracto de suelo con la enzima y 670 μ l de MUB. Posteriormente, las mezclas enzima-sustrato se incubaron a una temperatura de 30° C durante 2 horas para acelerar la reacción de formación de producto que es el p-NP en el caso de la BG, FM, FD y Pi en el caso de la FN. Luego de la incubación, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos. Los pasos siguientes fueron diferentes para cada una de las enzimas:

- Para la enzima fosfonatasa se tomó una alícuota de 750 μ l del sobrenadante obtenido del centrifugado, se le añadió 75 μ l de NaOH 1N y 1.675 ml de agua desionizada. De la solución anterior, se tomaron 2.5 ml y se le añadieron 2.5 ml de solución para desarrollo de color (Ac. Ascórbico y Molibdato de amonio), se aforó la mezcla a 25 ml y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se tomó una alícuota del sobrenadante y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 882 nm en un espectrofotómetro de UV-Visible (marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S).
- Para las enzimas β - Glucosidasa, Fosfomonoesterasa y Fosfodiesterasa, las cuales utilizan un sustrato unido a pNP, se continuó tomando un alícuota de 750 μ l del sobrenadante resultante de la centrifugación y se adicionaron 75 μ l de NaOH 1N y 3 ml de agua para después agitarse. La absorbancia se determinó con un espectrofotómetro de UV-Visible (marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S) a una longitud de onda de 410 nm.

Aislamiento de Microorganismos

Los aislados bacterianos fueron obtenidos usando un inóculo de suelo y mantillo para cada una de las tres muestras compuestas por sitio (12 en total: 3 de suelo y 3 de mantillo del encinar, 3 de la parcela agrícola y 3 de la parcela abandonada). En tubos Eppendorf de 1.5 ml, se añadieron muestras frescas hasta la marca de 0.5 ml y se agregaron 800 μ l de MUB (modified universal buffer) con un pH correspondiente al del suelo de cada sitio, la

suspensión resultante se agitó de manera continua durante 1 hora a 200 rpm y posteriormente, se realizaron diluciones (1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3}). Cada dilución fue utilizada como un inóculo para recuperar las colonias bacterianas de suelo y mantillo en cajas petri con medio de cultivo sólido.

Con el fin de obtener una mayor diversidad de aislados bacterianos para cada sitio de muestreo, se utilizaron dos medios de cultivo diferentes DM y LB. 1) DM (defined medium) con concentración de fósforo mínima (LP, low phosphorus) para formar lo que se conoce como medio LPDM, cuya base contiene (por litro): Tris base, 6.057 g ajustado a pH 7.5; NH_4NO_3 , 0.26g; MgSO_4 , 0.48 g; Citrato de sodio dihidratado, 1.99 g; ZnCl_2 , 0.000136 g o 10 μl sol 1 M; NaCl, 5 g; FeCl_3 , 0.27 g; KCl, 0.1 g; MnCl_2 , 0.2 g; CaCl, 0.4 g; glucose, 9 g; agar noble, 15 g. Los sustratos lábiles al calor (mezcla de 20 aminoácidos y vitamina Complejo B fueron esterilizados por el método de filtración y añadidos después de la esterilización en la autoclave (Ver Anexo 1). Además, contiene fosfato de potasio como fuente de P en una concentración de 0.065 mM (Tapia-Torres et al., 2016). 2) LB (Lysogeny broth), que contiene (por litro): cloruro de sodio, 5 g; extracto de levadura, 5 g; peptona de caseína, 10 g; y agar noble, 15 g (Ver Anexo 2; Sezonov et al., 2007).

Las cajas petri con medio de cultivo LPDM en las que se plaquearon las diluciones más concentradas (1×10^0 , 1×10^{-1}), se incubaron durante 3 días a $\sim 27^\circ \text{C}$, debido al rápido crecimiento de las cepas bacterianas, mientras que aquellas con las diluciones menos concentradas (1×10^{-2} , 1×10^{-3}), se incubaron 3 días a $\sim 27^\circ \text{C}$ y 3 días a $\sim 24^\circ \text{C}$. Las cajas petri con medio LB, sin importar la concentración de la solución que se usó como inóculo, se incubaron por 2 días a 28°C , ya que los aislados bacterianos crecieron rápidamente.

De cada muestra, se eligieron las colonias bacterianas con diferente forma, tamaño y color, obteniendo un total de 350 aislados seleccionados. Para asegurar que el cultivo fuera axénico, se realizaron subcultivos de cada uno de los 350 aislados en medio LPDM con el fin de purificar las colonias.

Evaluación de la capacidad de los aislados para utilizar distintas fuentes de fósforo.

Los 350 aislados (100 del encinar, 100 del mantillo del encinar, 75 del suelo de la parcela agrícola y 75 del suelo de la parcela abandonada) fueron sometidos a un experimento de capacidades metabólicas para evaluar su crecimiento en distintas fuentes de P. Para el experimento se utilizó el medio LPDM. Los sustratos elegidos para evaluar la capacidad de los aislados de mineralizar y solubilizar distintas fuentes de P fueron los siguientes: i) fosfato de potasio, ii) fosfato de aluminio, iii) fosfato de hierro, iv) fosfato de calcio, v) hidroxiapatita, vi) ácido aminometilfosfónico (AMPA), vii) 2-ácido aminoetilfosfónico (2AEP), y un control viii) sin P (medio DM sin adición de P).

Los aislados se crecieron inicialmente a ~24° C por 13 días en DM sin fósforo con el objetivo de evitar sesgos en el experimento por la bioacumulación diferencial del elemento en la biomasa bacteriana de diferentes taxa. Después, se realizó el pase de los aislados crecidos en DM a LPDM con cada una de las siete fuentes de P, además de una caja control con DM sin P, obteniendo un total de 2800 combinaciones aislado-fuente de P. Los aislados se incubaron a 26° C por 48 horas y al término de este tiempo, las 2800 combinaciones aislado-fuente de P se repitieron para confirmar el crecimiento de cada aislado en cada una de las ocho fuentes de P.

Al término del experimento, se lograron obtener un total de 332 aislados (95 de suelo de encinar, 96 de mantillo de encinar, 69 de suelo de la parcela agrícola y 72 de suelo de la parcela abandonada), con un total de 2656 combinaciones aislado-fuente de fósforo, debido a que 18 aislados no soportaron las condiciones de estrés a las que fueron sometidas durante el experimento. Los 332 aislados que sobrevivieron se almacenaron a -80° C en medio DM con una alta concentración de fosfato de potasio (1.44 mM) y con 15% (peso/volumen) de glicerol.

Extracción de ADN

Para llevar a cabo la extracción de ADN se realizó la recuperación de los aislados bacterianos que se habían almacenado a -80° C, para ello se utilizaron cajas de Petri con medio de cultivo LB sólido y se incubaron a 30° C por 48 horas. Posteriormente, se realizó

la extracción del ADN genómico de los 214 aislados que se lograron recuperar, utilizando un método modificado de Molina et al. (2006), el cual consta de tres etapas principales: la lisis celular, la extracción del ADN y la precipitación del ADN. Para ello, los aislados recuperados se crecieron en medio líquido LB con alta concentración de fósforo (1.44 mM). Posteriormente, se transfirió 1 ml del cultivo a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó por 5 min a 8,000 rpm, para eliminar el medio de cultivo y conservar el tejido celular de cada aislado.

Para el proceso de lisis celular, se optó por un método que involucra detergentes iónicos que son lo suficientemente fuertes para romper el tejido, la pared celular y las membranas celulares, sin degradar los ácidos nucleicos. Se realizaron dos lavados con solución TEN (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl), el primer lavado con 1 ml de TEN y un periodo de centrifugación de 5 minutos a 8,000 rpm y el segundo, después de tirar el sobrenadante, con 200 μ l de TEN y 2 minutos de centrifugado a 8,000 rpm. A continuación, sin haber tirado el sobrenadante, se añadieron 250 μ l de solución amortiguadora (40 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM acetato de sodio; 1 mM EDTA; 1% de SDS), 66 μ l de NaCl 5M y se mezcló por inversión. Después, cada tubo se calentó por 10 minutos a 65° C para una mejor lisis celular y se centrifugaron por 10 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml, sin llevarse el debris celular que se precipitó en el fondo.

Posteriormente, para extraer el ADN, se agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24/1 (v/v) y se mezcló durante 20 segundos usando un vortex con el fin de remover la mayor cantidad de proteínas. Después se centrifugó por 10 minutos a 12,000 rpm para separar el cloroformo de la fase acuosa que contiene el ADN, la cual se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó 0.6 volúmenes de isopropanol para iniciar con la etapa de precipitación, luego se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos.

El sobrenadante obtenido se tiró con mucho cuidado de no arrojar la pastilla de ADN que se precipitó en el fondo como consecuencia de la centrifugación. Después, se agregaron 400 μ l de etanol al 70%, frío y recién preparado, para luego utilizar el vortex y levantar la pastilla de ADN sin disolver. Posteriormente, se centrifugó por 10 minutos a

12,000 rpm, se deshechó el sobrenadante y la pastilla resultante se dejó secar. Por último, a cada tubo se le agregaron 35 µl de agua DDE (destilada, desionizada y estéril) para disolver la pastilla y finalmente, fueron almacenados a -80° C. La calidad del ADN se confirmó usando electroforesis en gel de agarosa al 1x.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del ADN extraído de los aislados bacterianos del suelo y mantillo sometidos al experimento de capacidades metabólicas, se amplificó el gen 16s rRNA de 214 aislados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron los primers universales 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, USA; Tapia-Torres et al., 2016). La reacción de PCR consistió en 15 µl que contenían 1.5 µl de ADN (10 ng/µl), 4 µl de agua ultra pura (DDE), 1 µl de cada primer (10 µM) y 7.5 µl de la mezcla Mutiplex (Marca QIAGEN, PCR Master Mix 2x). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (epENDORF nexus gradient) con el siguiente programa: un paso de desnaturalización inicial a 94° C durante 15 min; después 30 ciclos a 95° C durante 1 min, 64° C por 1 min y 72° C por 1 min 30 s; y un paso de extensión final a 72° C por 10 min. La amplificación del gen se corroboró mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. Se logró amplificar el gen 16s rRNA de 206 aislados, cuyos productos de PCR se mandaron a MacroGen USA para su secuenciación.

Identificación de organismos

Se obtuvieron las secuencias de 206 aislados, sin embargo, 16 secuencias fueron descartadas debido a su mala calidad. En total se analizaron 190 secuencias (50 del suelo de encinar, 42 de la parcela abandonada, 40 de la parcela agrícola y 58 del mantillo de encinar) haciendo una comparación manual con secuencias registradas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) por medio de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Las asignaciones se realizaron utilizando un porcentaje de similitud mayor o igual al 98% con secuencias de la base de datos NCBI. Por ende, aquellas secuencias que

obtuvieron un porcentaje de similitud menor a 98% fueron descartadas, quedando un total de 114 secuencias (29 del suelo de encinar, 24 de la parcela abandonada, 23 de la parcela agrícola y 38 del mantillo de encinar), las cuales se editaron de forma manual en el programa Bioedit.

Posteriormente, las 114 secuencias se ingresaron de nuevo al BLAST para corroborar la asignación que habían obtenido antes de ser corregidas. Sin embargo, hubo dos secuencias de bacterias aisladas de la parcela agrícola (1.75% del total), cuya asignación coincidió con más de una especie en el mismo porcentaje, siendo tomadas en cuenta en los análisis para determinar la diversidad biológica bacteriana de cada sitio.

Construcción del árbol filogenético

Las relaciones filogenéticas entre cada una de las cepas se reconstruyeron mediante un modelo Bayesiano utilizando el programa MrBayes v3.2 (Ronquist et al. 2012). El árbol filogenético resultante se realizó incluyendo 114 secuencias de 496 pb, utilizando el modelo de mutación GTR+I+G, un total de 50, 000, 000 de generaciones y un muestreo cada 1000 generaciones, con un burn-in del 10% para obtener el árbol consenso.

Análisis Estadísticos

Se utilizó el programa R versión 3.2.3 (R Core Team, 2016) para realizar los análisis estadísticos de las variables biogeoquímicas y enzimáticas. A través de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía se determinaron las diferencias significativas de cada una de las variables entre los sitios de muestreo (mantillo del encinar, suelo del encinar, de la parcela agrícola y la parcela abandonada). A las variables con diferencias significativas se les realizó una prueba *a posteriori* de comparación múltiple de Tukey. Se realizaron, además, pruebas estadísticas para determinar las diferencias significativas de las variables cuantificadas únicamente para los suelos de los tres sitios de estudio (Anexo 3).

Adicionalmente, se realizó una regresión logística multivariada utilizando el programa JMP 8.0 (SAS Institute) para determinar si el crecimiento de los aislados bacterianos observados en el experimento de capacidades metabólicas, depende de las variables biogeoquímicas y/o enzimáticas de cada sitio.

Resultados

Caracterización de los sitios: análisis biogeoquímicos y análisis enzimáticos

El porcentaje de humedad mostró diferencias significativas entre sitios. El mantillo del encinar, el suelo del encinar y el de la parcela agrícola mostraron los valores más altos, siendo diferentes al suelo de la parcela abandonada (Tabla 2). El pH tuvo diferencias significativas únicamente entre mantillo y suelo; siendo mayor en las muestras de suelo de los tres sitios y menor en el mantillo (Tabla 2).

Tabla 2. Medias y errores estándar (ee) del porcentaje de humedad y pH para el suelo del encinar, la parcela agrícola, la parcela abandonada y para el mantillo del encinar. La letra supernumérica indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

	Encinar	Parcela Agrícola	Parcela Abandonada	Mantillo Encinar	p
<i>pH</i>	6.7^A (±0.121)	6.8^A (±0.05)	6.8^A (±0.05)	6^B (±0.239)	<0.05
<i>% de humedad</i>	38^{AB} (±2.051)	39^{AB} (±0.361)	31^B (±1.024)	47^A (±6.336)	<0.05

En la Tabla 3 se muestran los promedios y errores estándar de las variables biogeoquímicas analizadas en todas las muestras de suelo y de mantillo. El mantillo del encinar en comparación con las muestras de suelo de todos los sitios, presentó mayores concentraciones de fósforo orgánico disuelto (POD), fósforo disponible (Pdisp), carbono microbiano (Cmic) y fósforo microbiano (Pmic). El carbono orgánico disuelto (COD), no presentó diferencias significativas entre sitios (Tabla 3).

Tabla 3. Medias de las variables biogeoquímicas medidas para el suelo del encinar, la parcela agrícola, la parcela abandonada y para el mantillo del encinar. La letra supernumérica indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

	Encinar	Parcela Agrícola	Parcela Abandonada	Mantillo Encinar	p
<i>COD</i> ($\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}$)	134 (± 16.85)	112 (± 16.61)	101 (± 13.83)	3509 (± 2717.27)	>0.05
<i>POD</i> ($\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}$)	1.5^B (± 0.22)	1.3^B (± 0.15)	0.9^B (± 0.15)	8.7^A (± 0.96)	<0.05
<i>Pdisp</i> ($\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}$)	0.96^B (± 0.15)	3^B (± 0.20)	2.18^B (± 0.33)	12.87^A (± 2.07)	<0.05
<i>Cmic</i> ($\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}$)	857^B (± 87.04)	407^B (± 73.81)	752^B (± 81.01)	11617^A (± 1913.99)	<0.05
<i>Pmic</i> ($\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}$)	3.9^B (± 0.75)	8.5^B (± 0.84)	8^B (± 1.55)	256.4^A (± 43.04)	<0.05

COD: carbono orgánico disuelto, *POD*: fósforo orgánico disuelto, *Pdisp*: fósforo disponible, *Cmic*: carbono microbiano, *Pmic*: fósforo microbiano, *ND*: no determinado.

Los resultados de la actividad enzimática para el suelo del encinar, la parcela agrícola, la parcela abandonada y el mantillo del encinar se muestran en la Tabla 4. Se obtuvo una mayor actividad enzimática de BG, FD, FM y FN en las muestras del mantillo del encinar en comparación con los demás sitios. En la parcela abandonada no se registró actividad de la fosfonatasa.

Tabla 4. Medias de la actividad enzimática obtenida para el suelo del encinar, la parcela agrícola, la parcela abandonada y para el mantillo del encinar. La letra supernumérica indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

	Encinar	Parcela Agrícola	Parcela Abandonada	Mantillo Encinar	p
<i>BG</i> ($\mu\text{mol pNP}$ $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{SS}$)	0.054^B (± 0.018)	0.046^B (± 0.008)	0.069^B (± 0.035)	0.991^A (± 0.263)	<0.05
<i>FM</i> ($\mu\text{mol pNP}$ $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{SS}$)	0.109^B (± 0.014)	0.097^B (± 0.008)	0.079^B (± 0.01)	2.729^A (± 0.663)	<0.05
<i>FD</i> ($\mu\text{mol pNP}$ $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{SS}$)	0.023^B (± 0.005)	0.03^B (± 0.009)	0.059^B (± 0.016)	0.286^A (± 0.097)	<0.05
<i>FN</i> ($\mu\text{mol Pi}$ h^{-1} $\text{g}^{-1} \text{SS}$)	0.507^{AB} (± 0.186)	0.326^{AB} (± 0.152)	0^B (± 0)	2.386^A (± 1.191)	<0.05

BG: β -Glucosidasa, *FM*: Fosfomonoesterasa, *FD*: fosfodiesterasa, *FN*: fosfonatasa.

Experimento de Capacidades Metabólicas

De los 332 aislados puestos a prueba, más del 90% fueron capaces de adquirir cinco de las 7 fuentes de fósforo utilizadas en el experimento (figura 6). Un mayor porcentaje de aislados, el 99% (329), fue capaz de utilizar el fosfato de potasio como fuente de fósforo; seguido del fosfato de hierro y la hidroxapatita con el mismo número de aislados (317) correspondiente al 95% (Figura 8). El 94% (311 aislados) creció utilizando fosfato de calcio para obtener fósforo, mientras que 91% (304) lo hizo usando fosfato de aluminio (Figura 8). Finalmente, un menor porcentaje de aislados fue capaz de adquirir el fósforo de las fuentes orgánicas recalcitrantes (fosfonatos), con 244 aislados (73%) con crecimiento en 2AEP y un 78% (260) con crecimiento en AMPA (Figura 8).

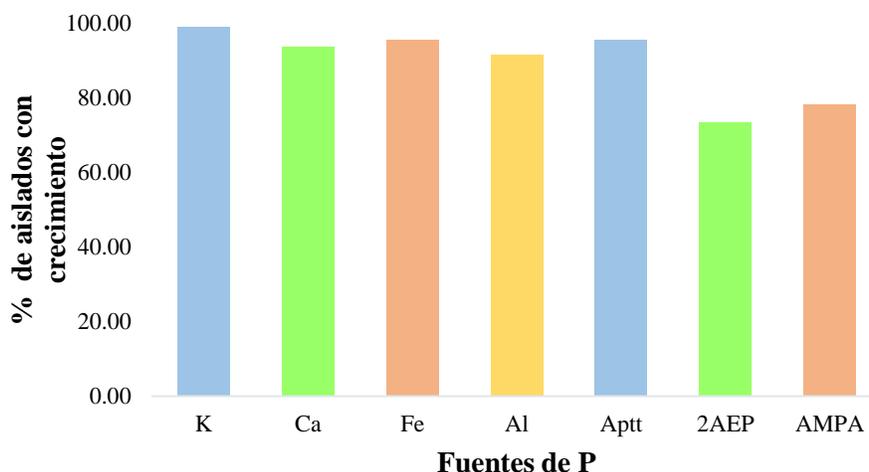
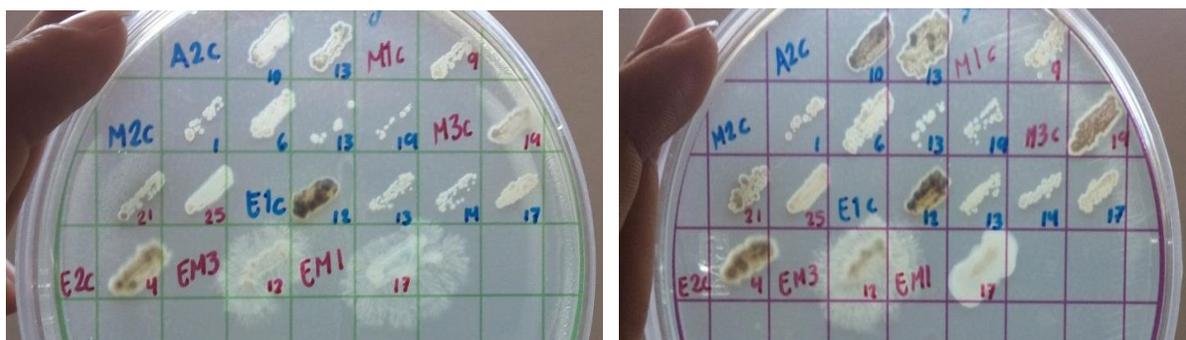


Figura 8. Porcentaje de aislados bacterianos que crecieron en cada una de las siete diferentes fuentes de fósforo. Fosfato de potasio (K), fosfato de calcio (Ca), fosfato de hierro (Fe), fosfato de aluminio (Al), hidroxapatita (Aptt), 2-ácido aminoetilfosfónico (2AEP) y ácido aminometilfosfónico (AMPA).

Otro resultado interesante fue el cambio de morfología (tamaño, color, forma) que presentaron algunos aislados dependiendo de la fuente de P presente en el medio de cultivo. En la Figura 9 se puede observar que el aislado con el número 17 de la muestra EM1 cambió su morfología cuando creció utilizando fosfato de hierro como fuente de fósforo en comparación a su crecimiento en fosfato de potasio. Del mismo modo, el aislado 10 de la muestra A2c y el 14 de la muestra M3c cambian su color de acuerdo al sustrato que utiliza como fuente de P.



1) Fosfato de hierro

2) Fosfato de potasio

Figura 9. Morfología de los aislados bacterianos. Se observa cambio de tamaño, forma o color, dependiendo de la fuente de P presente en el medio de cultivo.

La figura 10 muestra la distribución de las capacidades metabólicas para obtener fósforo de los 332 aislados de acuerdo al sitio de muestreo del que fueron obtenidos. El 100% de los aislados pertenecientes al suelo del encinar y la parcela agrícola, así como el 97% de los aislados de la parcela abandonada y el 99% de los aislados del mantillo del encinar, fueron capaces de crecer utilizando el fosfato de potasio como fuente de P (Figura 10).

Al suministrar fosfato de calcio, el 97% de los aislados del suelo de encinar y la parcela abandonada, así como el 91% de los aislados de la parcela agrícola y el 88% del mantillo del encinar, pudieron crecer (Figura 10). Los aislados provenientes de la parcela agrícola mostraron el mayor porcentaje de crecimiento utilizando el fosfato de hierro como fuente de P con un 97%, seguidos de los aislados de la parcela abandonada con un 96%, los del suelo de encinar con 96% y finalmente, los del mantillo del encinar con 94% (Figura 10).

La capacidad de utilizar el fosfato de aluminio para adquirir fósforo fue predominante en los aislados de la parcela agrícola con un 94%, mientras que el 92% de los aislados de la parcela abandonada y poco más del 90% de los aislados del suelo y mantillo del encinar pudieron utilizar esta fuente de P (Figura 10). Más del 90% de los aislados provenientes del suelo y mantillo del encinar, así como de la parcela agrícola, fueron capaces de crecer utilizando la hidroxiapatita como fuente de fósforo, mientras que el 82% de los aislados de la parcela abandonada crecieron en dicho sustrato (Figura 10).

Menos del 80% de los aislados del suelo del encinar, la parcela agrícola y la parcela abandonada, crecieron utilizando AMPA como fuente de fósforo, mientras que los aislados del mantillo del encinar mostraron el mayor porcentaje de crecimiento en este sustrato con 82% (Figura 10). Finalmente, se observaron diferencias entre los 4 sitios cuando se utilizó 2AEP como única fuente de P, donde menos del 70% de los aislados del suelo del encinar y de la parcela agrícola pudieron crecer, la mayor proporción de crecimiento se observó en los aislado del mantillo del encinar (82%), seguido de los aislados de la parcela abandonada con un 79% (Figura 10).

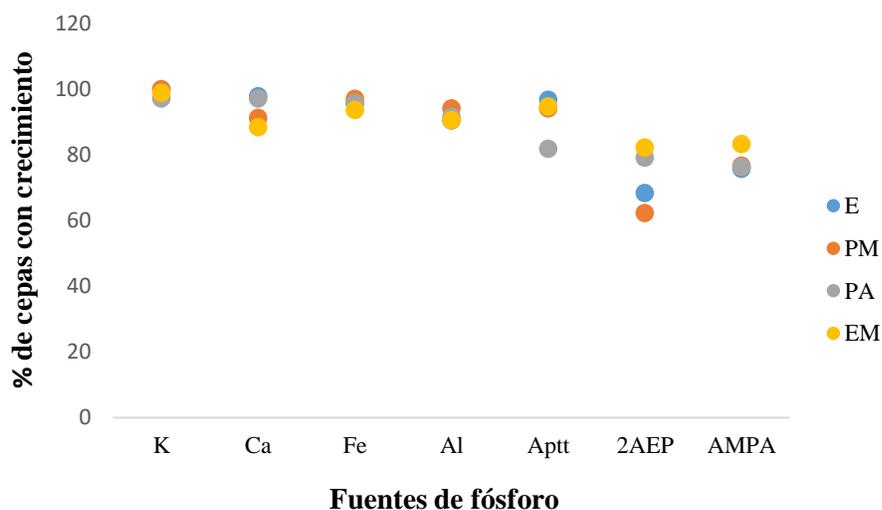


Figura 10. Crecimiento de los aislados bacterianos en distintas fuentes de fósforo de acuerdo al sitio del que se aislaron, donde E: encinar, PM: parcela agrícola, PA: parcela abandonada y EM: mantillo del encinar.

Cuando se comparó la capacidad de los aislados bacterianos para utilizar las distintas fuentes de P tomando en cuenta el medio de cultivo que se utilizó para aislar a los microorganismos (DM o LB), se observaron diferencias entre medios. Los aislados del suelo del encinar que se recuperaron en DM en comparación con aquellos recuperados en medio LB, tuvieron una mayor capacidad metabólica para utilizar las siguientes fuentes de fósforo: fosfato de calcio, fosfato de aluminio, hidroxapatita, 2AEP y AMPA (Figura 11). Mientras que los aislados recuperados en medio LB, crecieron ligeramente más que los de DM teniendo al fosfato de hierro como fuente de P, mientras que en fosfato de potasio no hubo diferencias (Figura 11).

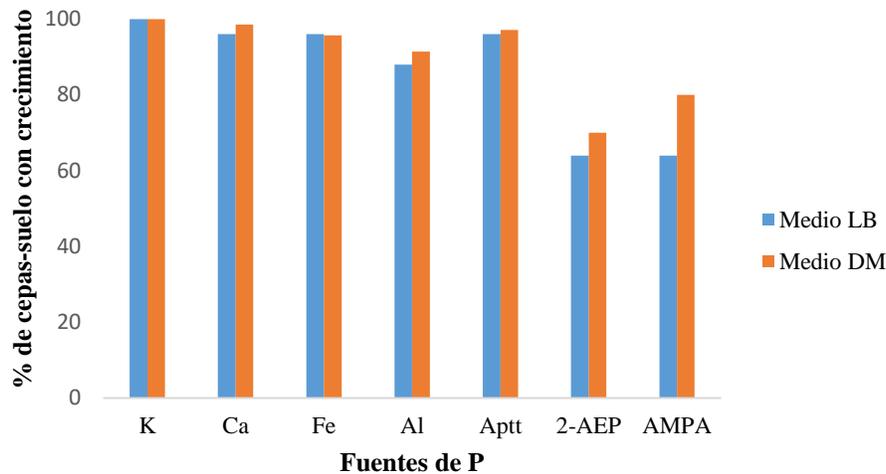


Figura 11. Porcentaje de aislados bacterianos del suelo de encinar que crecieron en cada una de las siete diferentes fuentes de fósforo. Fosfato de potasio (K), fosfato de calcio (Ca), fosfato de hierro (Fe), fosfato de aluminio (Al), hidroxiapatita (Aptt), 2-ácido aminoetilfosfónico (2-AEP) y ácido aminometilfosfónico (AMPA).

Los aislados de mantillo de encinar que se recuperaron en DM tuvieron mayor capacidad para utilizar 6 de las siete fuentes de P utilizadas en el experimento: fosfato de potasio, fosfato de hierro, fosfato de aluminio, hidroxiapatita, 2AEP y AMPA; lo anterior en comparación con los aislados recuperados en medio LB. Únicamente en fosfato de calcio, éstos últimos presentaron un porcentaje de crecimiento mayor (Figura 12).

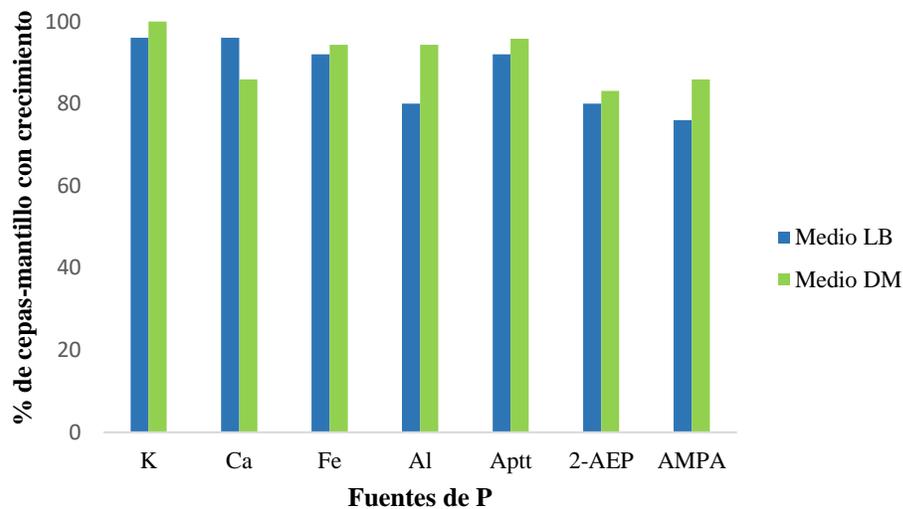


Figura 12. Porcentaje de aislados bacterianos del mantillo de encinar que crecieron en cada una de las siete diferentes fuentes de fósforo. Fosfato de potasio (K), fosfato de calcio (Ca), fosfato de hierro (Fe), fosfato de aluminio (Al), hidroxiapatita (Aptt), 2-ácido aminoetilfosfónico (2-AEP) y ácido aminometilfosfónico (AMPA).

Los resultados estadísticamente significativos de la regresión logística multivariada, que permiten observar si el crecimiento de los aislados en las distintas fuentes de P dependió de las características biogeoquímicas de los sitios, se muestran en la Tabla 5.

Los resultados indican que la frecuencia con la que crecieron los microorganismos aislados del suelo del encinar, es significativamente diferente a la frecuencia de crecimiento de aquellos aislados que fueron obtenidos del mantillo del encinar y del suelo de la parcela abandonada (Tabla 5). Del mismo modo, el crecimiento de los aislados del mantillo del encinar fue significativamente diferente al de los aislados de la parcela abandonada (Tabla 5).

Tabla 5. Crecimiento de los aislados bacterianos en las diferentes fuentes de P en función de las variables biogeoquímicas y/o enzimáticas de cada sitio

<i>Variable</i>	p
Sitio{Encinar-Mantillo&Abandonado}	<0.05
Sitio{Mantillo-Abandonado}	<0.05
Fuente de P {Sin P-2AEP&A&Al&Ca&Fe&Aptt&K}	<0.05
Fuente de P{2AEP&A-Al&Ca&Fe&Aptt&K}	<0.05
Fuente de P{Al&Ca&Fe&Aptt-K}	<0.05
FD	<0.05
%Humedad	<0.05
pH	<0.05

Cuando se considera cada una de las fuentes de P como variable independiente, los resultados señalan que la frecuencia con la que los aislados crecieron en el medio de cultivo sin P es significativamente diferente a la frecuencia de crecimiento de los aislados en el resto de las fuentes de P (Tabla 5). Asimismo, la frecuencia con la que los aislados bacterianos crecieron en las fuentes orgánicas de P (2AEP y AMPA) fue significativamente

diferente a la frecuencia de crecimiento en las fuentes inorgánicas (Tabla 5). No obstante, la frecuencia de crecimiento en el medio de cultivo con fosfato de potasio difiere de manera significativa a la frecuencia con la que los aislados crecieron en las demás fuentes inorgánicas de P (Tabla 5).

Finalmente, la presencia o ausencia de crecimiento de todos los aislados bacterianos provenientes de los tres sitios, independientemente de la fuente de P en la que hayan crecido, tuvo una correlación significativa con la actividad de la enzima fosfodiesterasa, con el porcentaje de humedad y con el pH reportado para cada sitio (Tabla 5).

Clasificación taxonómica de los aislados

Los 114 aislados secuenciados se clasificaron utilizando un valor de similitud en el BLAST del 98% a nivel de phylum, género y especie. El phylum dominante en todos los sitios fue Proteobacteria, el cual se representa en los gráficos dividido en dos clases: Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria (Figura 13).

Así pues, la clase Gammaproteobacteria abarcó el 69% en el encinar, el 89% en el mantillo del encinar, el 52% en la parcela agrícola y el 96% en la parcela abandonada, mientras que la clase Alphaproteobacteria únicamente se presentó en la parcela agrícola, abarcando el 16% del total de los aislados obtenidos de dicho sitio (Figura 13).

Por otro lado, Firmicutes fue el segundo phylum con mayor porcentaje en todos los sitios, con un 24% en el suelo del encinar, 24% en la parcela agrícola, 11% en el mantillo del encinar y 4% en la parcela abandonada, siendo este último el sitio con menor diversidad (Figura 13). Dentro de los aislados obtenidos del suelo del encinar también se encontraron Actinobacterias (3%) y cepas cuyo phylum no se identificó (3%) (Figura 13).

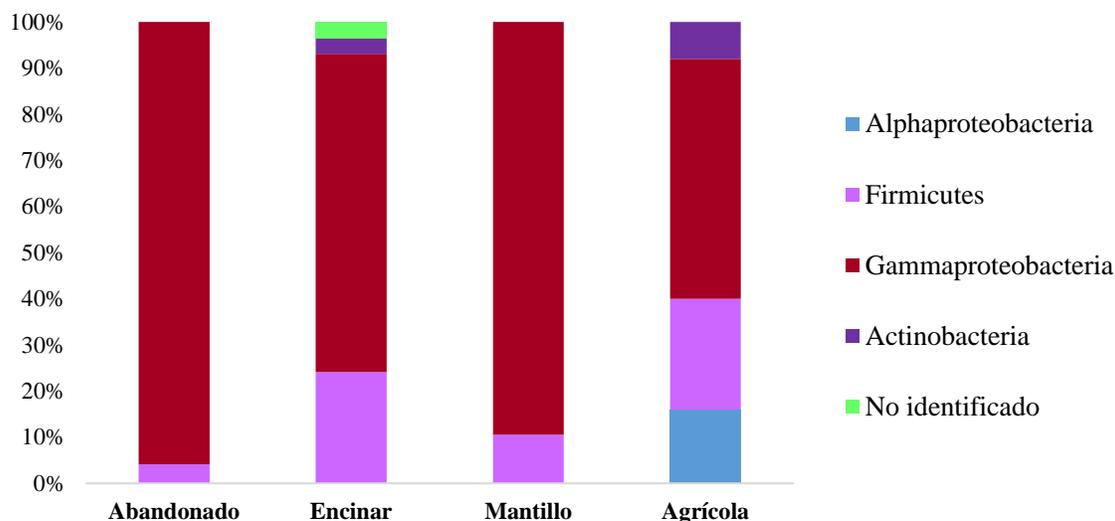


Figura 13. Diversidad de aislados bacterianos a nivel de phylum. El phylum Proteobacteria se presenta dividido en las clases Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria.

Con respecto al nivel de género, el suelo del encinar y la parcela agrícola tuvieron una mayor diversidad con respecto a los demás sitios de muestreo (Figura 14). Las *Pseudomonas* fueron el género dominante en todos los sitios, teniendo una mayor presencia en la parcela abandonada con un 58% (Figura 14).

En el suelo del encinar, *Pseudomonas* fue el género más abundante (41%), seguido de *Bacillus* y *Acinetobacter* con un 14% cada uno. Además, en este sitio exclusivamente se encontraron los géneros *Staphylococcus* (7%) y *Arthrobacter* (3%; Figura 14). Por otro lado, en el mantillo del encinar los géneros dominantes fueron *Pseudomonas* (42%), *Serratia* (16%), *Erwinia* (13%) y *Ewingella* (11%), mientras que el género *Paenibacillus* (3%) se aisló exclusivamente en este sitio (Figura 14).

Por otro lado, en la parcela agrícola el género *Bacillus* abarcó un 24%, siendo el más abundante después de *Pseudomonas* (28%; Figura 14). También se encontró que los géneros *Rhizobium* (8%), *Rhodococcus* (8%) y *Agrobacterium* (8%) sólo estuvieron presentes en esta parcela (Figura 14).

Nuevamente, la parcela abandonada fue el sitio con menor diversidad a nivel de género. Los géneros más abundantes fueron *Pseudomonas* (60%), *Serratia* y *Acinetobacter* (13% cada uno; Figura 14). Además, en este sitio no se encontraron géneros exclusivos.

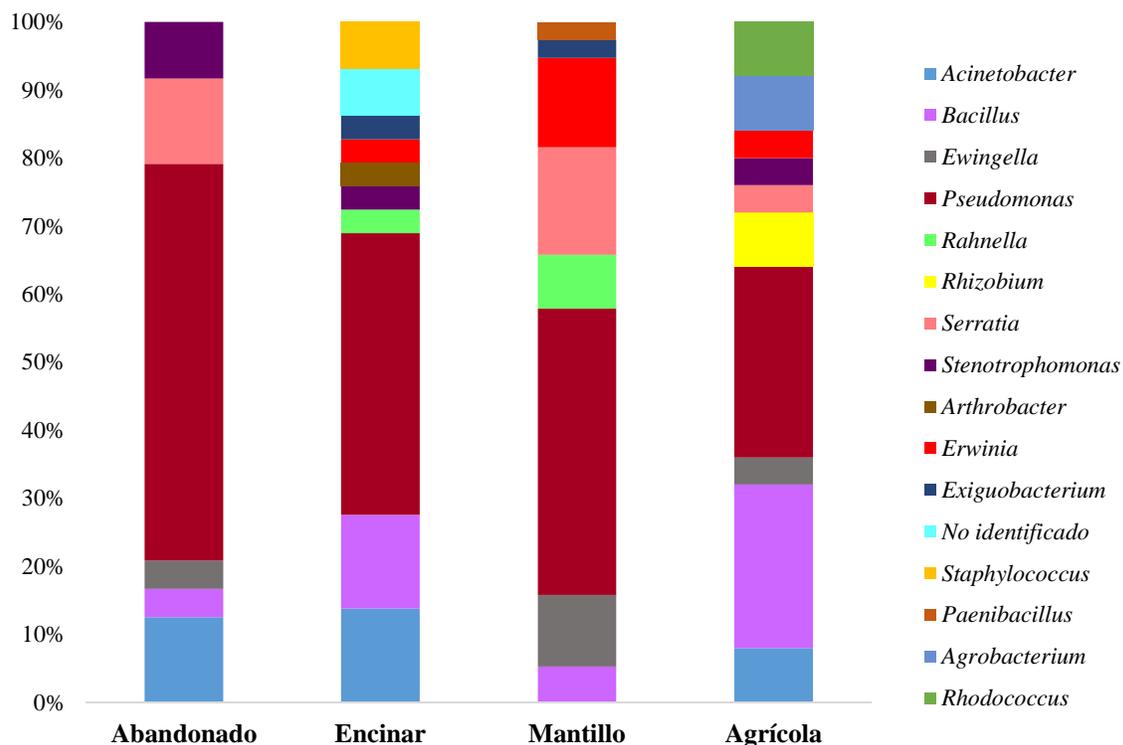


Figura 14. Diversidad de aislados bacterianos a nivel de género.

En cuanto a la clasificación a nivel especie, la parcela agrícola fue el sitio con mayor diversidad, seguido del suelo y el mantillo del encinar (Figura 15). *Pseudomonas* sp fue la especie dominante en todos los sitios, abarcando el 46% del total de los aislados en la parcela abandonada, 31% en el suelo del encinar, 29% en el mantillo del encinar y 20% en la parcela agrícola. *Pseudomona poae* y *Bacillus* sp fueron especies que también se encontraron en todos los sitios de muestreo en diferente proporción, siendo esta última la segunda más abundante en la parcela agrícola con un 12% (Figura 15).

Por otro lado, *Serratia* sp fue la segunda especie más numerosa en la parcela abandonada y en el mantillo del encinar, con 13% y 16% respectivamente. En cambio,

Acinetobacter sp abarcó un 10% en el suelo del encinar, siendo la segunda especie más abundante en dicho sitio (Figura 15).

En el sitio agrícola se encontraron 10 especies que no estuvieron presentes en ningún otro sitio, las cuales pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus*; mientras que en el suelo y el mantillo del encinar, el número de especies únicas fue de 6 en ambos sitios. Destaca *Staphylococcus sp* con 7% en el suelo del encinar, y *Pseudomonas lurida* en el mantillo del sitio conservado con un 5%. En cambio, en la parcela abandonada sólo hubo 2 especies (*Stenotrophomonas rhizophila* y *Pseudomonas koreensis*) exclusivas del sitio.

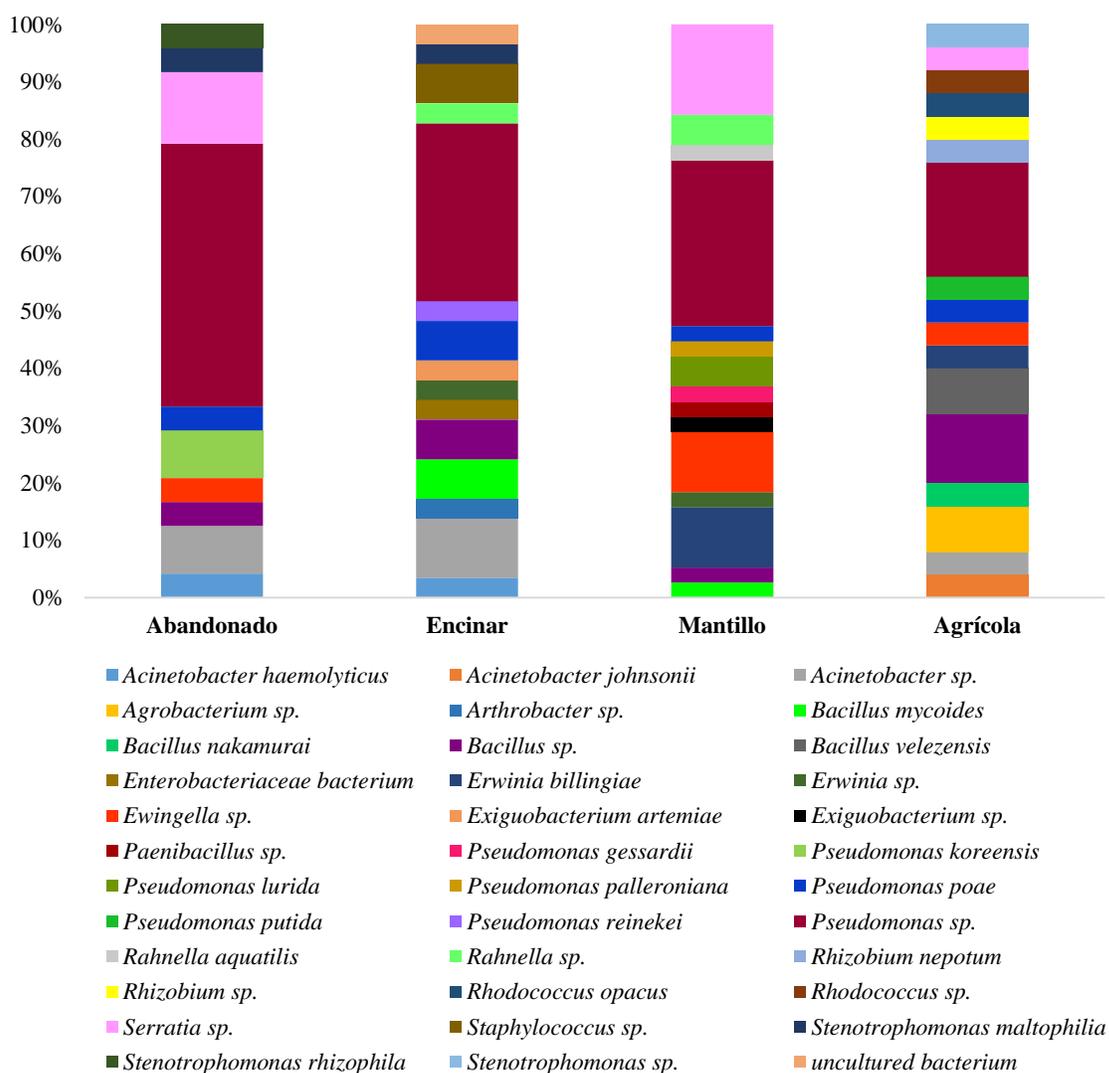


Figura 15. Diversidad de aislados bacterianos a nivel de especies potenciales.

Al evaluar la relación filogenética de los aislados bacterianos, se obtuvieron dos grandes grupos: el primero conformado por todos aquellos microorganismos pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria, mientras que el segundo incluyó a los aislados clasificados como Actinobacterias, Firmicutes y Alphaproteobacterias (Figura 16).

Dentro del clado de las Gammaproteobacterias, se definieron dos ramas para diferenciar a las *Stenotrophomonas* de los demás géneros incluidos dentro de este linaje. En la segunda rama hubo también dos divisiones: 1) Una en la que se agruparon especies de los géneros *Erwinia*, *Erwingella*, *Rahnella* y *Serratia*; y 2) otra en la que se incluyeron los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, siendo estas últimas los microorganismos más abundantes en todos los sitios de muestreo (Figura 16). Además, *Pseudomonas* no se agrupó de acuerdo al lugar del que fueron aisladas. No obstante, hubo algunos microorganismos pertenecientes a este género que se agruparon en linajes correspondientes a especies potenciales con una clasificación taxonómica diferente (Figura 16).

El segundo grupo principal también se dividió en dos ramas: la primera incluyó los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium*, pertenecientes al phylum alphaproteobacteria, mientras que la segunda agrupó dos linajes distintos: firmicutes y actinobacterias (Figura 16). Dentro de la rama de las actinobacterias se encontraron los géneros *Rhodococcus* y *Arthrobacter*. Por su parte, en el linaje de los firmicutes, *Bacillus* fue el género más representado, dentro del cual se encontró una asociación entre los linajes y el sitio del que fueron aislados, lo que sugiere que los *Bacillus* aislados del encinar son genéticamente distintos de aquellos *Bacillus* aislados de la parcela agrícola y de la parcela abandonada. Del mismo modo, en este clado se incluyeron los géneros *Staphylococcus*, *Paenibacillus* y *Exiguobacterium* (Figura 16).

La distribución de capacidades metabólicas para obtener el P de distintos compuestos no estuvo asociada con grupos taxonómicos particulares (Figura 16). De hecho, en todos los clados hubo miembros que podían usar fosfato de potasio, fosfato de calcio, fosfato de aluminio, fosfato de hierro y/o hidroxiapatita. Sin embargo, el grupo de los *Staphylococcus* no presentó ningún miembro con la capacidad de crecer utilizando los fosfonatos (2AEP y AMPA) como fuente de P.

Discusión

En este trabajo, se evaluó si el cambio de uso de suelo modifica la capacidad metabólica de la comunidad bacteriana edáfica para adquirir el P en encinares templados del centro de México. Para dar una respuesta a dicha interrogante, se realizó un experimento con aislados bacterianos provenientes de un gradiente de uso de suelo compuesto por tres sitios (uno abandonado con historial de manejo intensivo con agroquímicos, uno agrícola en el que se siembra manzanilla, y uno conservado representado por un bosque de encinos) con el fin de analizar la capacidad de esos aislados para utilizar diferentes fuentes de P.

Entre los resultados más relevantes, se destaca que los aislados bacterianos de todos los sitios no presentaron diferencias en su capacidad metabólica para utilizar el P presente en las fuentes inorgánicas puestas a prueba en el experimento (fosfato de potasio, fosfato de calcio, fosfato de hierro, fosfato de aluminio e hidroxapatita). Mientras que sí se observaron diferencias en la utilización de fuentes orgánicas, específicamente fosfonatos (2AEP y AMPA), donde la capacidad de utilización fue notoria en las cepas aisladas del mantillo del encinar. Asimismo, la presencia o ausencia del crecimiento en las diferentes fuentes de P de todos los aislados obtenidos, tuvo una correlación significativa con la actividad de la enzima fosfodiesterasa en el suelo, con el porcentaje de humedad y con el pH reportado para cada sitio.

Adicionalmente, se observó que la capacidad metabólica para obtener el P de distintos compuestos estuvo distribuida en todos los grupos taxonómicos analizados. No obstante, lo anterior sólo es válido para las 114 cepas identificadas, ya que sólo las bacterias del género *Staphylococcus* no pudieron crecer utilizando como fuente de P a ninguno de los dos fosfonatos probados en ese experimento (2AEP y AMPA). Sin embargo, hubo muchos otros aislados que no pudieron ser identificados mediante técnicas moleculares, los cuales no presentaron la capacidad de mineralizar fosfonatos o de solubilizar uno o dos de los compuestos inorgánicos probados en el experimento (fosfato de hierro, fosfato de aluminio o fosfato de calcio, principalmente).

Por otro lado, sí se encontraron diferencias en la diversidad de géneros y especies bacterias cultivables, lo cual sugiere que el cambio de uso de suelo modifica la

composición de la comunidad bacteriana cultivable y que la comunidad bacteriana no cultivable también puede verse afectada. No obstante, es posible que exista una redundancia funcional en las comunidades bacterianas, por lo que la diversidad de capacidades metabólicas no varía entre sitios. Del mismo modo, al construir el árbol filogenético se observaron grupos formados por géneros aislados de acuerdo al sitio, indicando que el cambio de uso de suelo también tiene implicaciones en la diversidad genética de las comunidades.

Se sabe que la diversidad y la estructura de la comunidad microbiana del suelo responden rápidamente a las conversiones del uso de la tierra (Cao et al., 2017; Hermans et al., 2016), ya que los cambios en la vegetación y las diferentes prácticas de manejo pueden modificar desfavorablemente las variables ambientales que determinan la composición bacteriana edáfica (Cao et al., 2017), por ejemplo: las propiedades abióticas del suelo como la textura, el pH, la relación carbono-nitrógeno, la concentración de P, el contenido de humedad, la temperatura, y la cantidad y calidad de MO que ingresa al suelo (Delgado-Baquerizo et al., 2018; Hermans et al., 2016; Thomson et al., 2015).

De acuerdo a Delgado-Baquerizo et al. (2018), el pH del suelo, los factores climáticos relacionados con la humedad y la cantidad de materia vegetal producida (producción primaria neta), son los principales predictores de la abundancia y la diversidad microbiana en el suelo. Esto coincide con las variables que afectan la capacidad metabólica de los aislados utilizados en nuestro experimento, ya que su crecimiento en las diferentes fuentes de P tuvo una relación significativa con el pH, el porcentaje de humedad y la enzima fosfodiesterasa.

De manera general, los resultados de este experimento señalan que en todos los sitios de muestreo existen los recursos genéticos para solubilizar el P inorgánico proveniente de diversos compuestos (fosfato de calcio, fosfato de hierro, fosfato de aluminio, fosfato de potasio e hidroxiapatita), mientras que un menor número de microorganismos posee los genes necesarios para mineralizar las fuentes de P orgánicas (fosfonatos: 2AEP y AMPA). Como se mencionó anteriormente, los aislados provenientes del mantillo del encinar tuvieron una mayor capacidad metabólica para obtener el P de compuestos orgánicos (fosfonatos), mientras que los aislados de la parcela agrícola tuvieron

un menor crecimiento en este tipo de fuentes, principalmente en el medio con 2AEP, que es el fosfonato más abundante en la naturaleza (Quinn et al., 2007; Kononova y Nesmeyanova, 2002). Estos resultados coinciden con lo reportado en el trabajo de Tapia-Torres et al. (2016), en el que un menor porcentaje de cepas bacterianas (~20%) fue capaz de utilizar el compuesto 2AEP como fuente de P, en comparación con los ésteres de fosfato o fuentes de P inorgánicas.

El mantillo del encinar, además, se caracterizó por ser el más húmedo y por presentar el pH más bajo en comparación con el suelo de los otros sitios. La actividad de las enzimas β -glucosidasa, fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa también fue significativamente mayor, lo cual coincide con otros estudios en los que se ha reportado que la actividad enzimática se correlaciona positivamente con la cantidad de MO presente en el mantillo (Rodríguez-Loinaz et al., 2008), puesto que casi el 70% de la productividad primaria neta de los bosques (cantidad de materia vegetal producida) llega al suelo en forma de mantillo (Martínez-Yrizar, 1995). Estos resultados indican que en el mantillo del encinar existe una mayor actividad de microorganismos heterótrofos (bacterias y hongos) que realizan la despolimerización del C orgánico y que por ende, favorecen la mineralización de las formas orgánicas de fósforo (Montaño & Sánchez-Yañez, 2014) en comparación con lo que ocurre en el suelo.

Por otro lado, en la caracterización enzimática de los sitios no se detectó actividad de la enzima fosfonatasa en la parcela abandonada, a pesar de que en el experimento las cepas aisladas de dicho sitio sí pudieron utilizar a los fosfonatos como fuente de P. Esto posiblemente es resultado de tres razones diferentes: 1) existen muy pocos microorganismos en dicho lugar con la capacidad de adquirir el P de estos compuestos, por lo que su actividad es tan reducida que no puede ser cuantificada a través de los métodos utilizados en este trabajo, en donde se evaluó la actividad de las enzimas sintetizadas por la comunidad microbiana y no por aislados independientes; 2) hay una baja cantidad de fosfonatos en el suelo, por lo que la necesidad de adquirir el P proveniente de estos compuestos es mínima y se prioriza la síntesis de enzimas fosfatasa, por ejemplo, que permiten la mineralización de los ésteres de fosfato, los cuales aparentemente son los compuestos organofosforados dominantes en estos sitios (Tapia-Torres et al., 2016); y 3)

que la ruta por la que los microorganismos de este sitio mineralizan dichos compuestos sea distinta a la ruta de la fosfonatasa que estamos cuantificando en este trabajo; pudiendo ser que la degradación sea a través de la ruta de la C-P liasa (Konova y Nesmeyanova, 2009).

Así pues, en este trabajo se propone que el cambio de uso de suelo sí afecta la capacidad metabólica bacteriana para adquirir el P de fuentes orgánicas, ya que al modificar la vegetación drásticamente, la cantidad de MO que ingresa al suelo se reduce y la calidad de la misma se modifica, lo cual ocasiona que el carbono orgánico disponible en el sistema se reduzca y con ello, que la actividad de la comunidad microbiana heterótrofa y la síntesis de enzimas sea disminuida (Rodríguez-Loinaz et al., 2008; Montaña & Sánchez-Yañez, 2014). Del mismo modo, los valores de pH pueden ser alterados como consecuencia del manejo agrícola, que en muchos cultivos incluye el uso de fertilizantes inorgánicos fosfatados (Murawska et al., 2017).

El proceso de solubilización, por su parte, aparentemente domina en el suelo del encinar, la parcela agrícola y la parcela abandonada, a pesar de esto, la mineralización no deja de ser un proceso fundamental en el reciclado de P, puesto que las formas orgánicas de P representan del 30-50% del fósforo total en el suelo (Alori et al., 2017).

De manera conjunta, algunas cepas bacterianas cambiaron su morfología y color dependiendo de la fuente de P en la que crecían, lo cual coincide con lo reportado por Prescott et al. (2002), quienes mencionan que la morfología de ciertas bacterias se modifica como consecuencia de la disponibilidad de nutrientes y al estrés al que son sometidas.

Por otro lado, el análisis taxonómico de la comunidad bacteriana de la parcela agrícola, la parcela abandonada y el sitio conservado, indicó que los phyla presentes en el gradiente de uso de suelo analizado (Proteobacteria, Firmicutes y Acidobacteria), corresponden a grupos bacterianos típicos del suelo (Nadal-Rocamora, 2015; Delgado-Baquerizo et al., 2018). El phylum dominante en todos los sitios fue Proteobacteria, el cual ha sido reportado como el más predominante en el suelo, englobando una amplia variedad de géneros bacterianos con diversas capacidades metabólicas que son esenciales en la dinámica de nutrientes (Zehr et al., 2003; Roesch et al., 2007; Gaby & Buckley, 2011).

En los cuatro sitios de muestreo se encontró una mayor abundancia de organismos pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria, que se encuentra relacionada a suelos con un alto contenido de nutrientes disponibles (Hermans et al., 2016; Smith et al., 2001), mientras que en la parcela agrícola también se encontraron bacterias de la clase Alphaproteobacterias, que además de ser las proteobacterias más abundantes en el suelo, incluyen a microorganismos con la capacidad de fijar N₂ (Saharan & Nehra, 2011; Delgado-Baquerizo et al., 2018).

El segundo phylum dominante en todos los sitios fue Firmicutes, con una mayor abundancia en la parcela agrícola, probablemente debido a que éste tiene preferencia por sitios en los que existe una baja productividad vegetal (Delgado-Baquerizo et al., 2018). Mientras que las Acidobacterias, cuya presencia se relaciona con suelos donde existe un alto contenido de sustratos recalcitrantes, sólo se encontraron en las muestras del suelo del encinar y en la parcela agrícola, asimismo, se sugiere que este phylum incrementa cuando existe un bajo porcentaje de nutrientes en el suelo, por lo que su baja abundancia indica que estos suelos poseen un buen estado nutricional (Smith et al., 2001; Hermans et al., 2016). Además, trabajos previos han reportado que la mayor abundancia de este grupo de bacterias ocurre en ambientes con pH ácido (Jones et al., 2009; Yin et al., 2010).

El género *Pseudomonas* predominó en todos los sitios analizados, teniendo una mayor abundancia en la parcela abandonada (60%). Este género se encuentra asociado a la rizósfera y se ha reportado que puede ejercer un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las plantas, ya que permite la disponibilidad de nutrientes como el P y el N (Saharan & Nehra, 2011). De acuerdo a los análisis filogenéticos, en donde este género no se agrupó por sitio, se infiere que todos los organismos pertenecientes a este género presentan similitudes genéticas entre sitios. Lo anterior sugiere que el cambio de uso de suelo no ha repercutido en la diversidad genética del género *Pseudomonas*. Sin embargo, se necesitan estudios con diferentes marcadores moleculares que nos permitan corroborar esta hipótesis.

La dominancia del género *Pseudomonas* en todos los sitios, señala que este género pertenece a un grupo de microorganismos cuyas preferencias de hábitat no están bien identificadas, los cuales pueden encontrarse en todos los suelos del mundo con abundancias

relativamente invariantes, siendo resistentes a las diferentes condiciones físico-químicas del suelo (Delgado-Baquerizo et al., 2018).

Del mismo modo, los géneros *Acinetobacter*, *Ewingella*, *Serratia* y *Erwinia* tuvieron una abundancia importante en los cuatro sitios, además de *Bacillus*, que es considerado como el género más abundante en la rizósfera (Saharan & Nehra, 2011). Se ha reportado que todos estos géneros permiten la disponibilidad de P en el suelo, ya que son capaces de solubilizar y mineralizar dicho nutriente (Quinn et al., 2007; Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010; Saharan & Nehra, 2011; Cerón-Rincón & Aristizábal-Gutiérrez, 2012; Tapia-Torres & García-Oliva, 2013; Ahemad & Kibret, 2013; Morón-Cruz, 2014; Tapia-Torres et al., 2016; Alori et al., 2017). El género *Staphylococcus*, por su parte, únicamente se encontró en las muestras de suelo del sitio conservado y no fue capaz de utilizar los compuestos orgánicos como fuente de P en el experimento, lo cual advierte que cuando el único modo de adquirir P en el ecosistema es a través de la mineralización de fosfonatos, estas bacterias aprovechan los iones fosfatos que otros microorganismos dejan disponibles (Tapia-Torres et al., 2016).

A pesar de reconocer que los microorganismos cultivables representan el 1% del total de microorganismos presentes en el suelo, y que por consecuencia en este trabajo no se puede hablar de diversidad total utilizando estos resultados; en el esfuerzo por identificar la diversidad y las capacidades de la comunidad microbiana cultivable se obtuvo que la parcela abandonada fue el sitio con menor diversidad, lo cual sugiere que en estos suelos existe una comunidad bacteriana bien adaptada, resiliente a los cambios drásticos de vegetación, clima y otros aspectos abióticos del suelo que pudieron variar como consecuencia del manejo intensivo al que fue sometido años atrás (Upchurch et al., 2008).

En la investigación realizada por Upchurch et al. (2008), se menciona que permitir la sucesión de la vegetación nativa no restauró completamente la comunidad bacteriana del suelo a su estructura original después de 30 años, ya que después de este periodo de tiempo la diversidad bacteriana del bosque de sucesión aún se parecía más a la de las parcelas agrícolas que a la del bosque original. Por lo que ellos concluyen que las comunidades bacterianas del suelo pueden tardar décadas en recuperarse.

Por otro lado, el sitio con mayor diversidad fue la parcela agrícola, posiblemente como resultado de la alteración que ocasiona el manejo agrícola en el suelo, que si bien afecta en gran medida a las especies con requerimientos de hábitat muy específicos, puede beneficiar el crecimiento y el desarrollo de aquellas especies con requerimientos menos exigentes (Tellería, 2013). Resultados similares fueron reportados en el trabajo de Upchurch et al. (2008), en el que se menciona que la variación de la comunidad vegetal de los cultivos, aunado al tipo de manejo al que es sometido el suelo, puede crear una comunidad bacteriana más dinámica y por ende, más diversa. Además, señalan que en los suelos forestales, las perturbaciones pueden ser relativamente raras, lo cual permite el desarrollo de grandes poblaciones bacterianas que se han adaptado a las condiciones de dicho ambiente.

Sin embargo, otra razón por la que la diversidad de organismos fue mayor en la parcela agrícola que en el encinar, puede ser la inoculación del suelo con organismos promotores del crecimiento, tales como *Rhodococcus* y *Rhizobium* (Saharan & Nehra, 2011; Ahemad & Kibret, 2013), los cuales únicamente se encontraron en esta parcela. El manejo agrícola que realizan en el sitio de estudio incluye el uso de biofertilizantes, en los que incorporan microorganismos que ayudan al crecimiento y desarrollo de las plantas (Sanandi, 2017), sin embargo, los agricultores desconocen con exactitud cuáles son las cepas que conforman dichos productos.

Microorganismos promotores del crecimiento

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PCV), son aquellos que están involucrados directa o indirectamente en promover el crecimiento y el desarrollo de las plantas, sin provocar un efecto patógeno sobre ellas (González & Fuentes, 2017; Ahemad & Kibret, 2013; Compant et al., 2010). De acuerdo a Kloepper et al. (1989), los microorganismos PCV pueden clasificarse en: 1) bioprotectores, los cuales suprimen las enfermedades de las plantas; 2) bioestimulantes, caracterizados por la producción de fitohormonas que desencadenan respuestas y reacciones claves en el crecimiento de las plantas; y 3) biofertilizantes, que incrementan la capacidad de adquisición de nutrientes, principalmente de nitrógeno y fósforo.

Éstos últimos, también conocidos como abonos biológicos o biofertilizantes, representan una alternativa viable a los fertilizantes inorgánicos, los cuales además de ser menos rentables económicamente, tienen un efecto negativo sobre el ambiente (Fernández & Rodríguez, 2005). Los biofertilizantes, en cambio, promueven el desarrollo de una agricultura ecológicamente sostenible, manteniendo la fertilidad del suelo y siendo de gran utilidad en la recuperación de terrenos marginales para su aprovechamiento agrícola y forestal (Fernández & Rodríguez, 2005; Terry-Alfonso et al, 2005).

En México, el uso de biofertilizantes comenzó en la década de los 70's, cuando la utilización de inoculantes comerciales a base de *Rhizobium* logró sustituir la fertilización inorgánica de nitrógeno en la mayoría de los campos agrícolas del norte de país (Armenta-Bojórquez et al., 2010). En la actualidad, el uso de biofertilizantes sigue en aumento tanto en la agricultura orgánica como convencional, además de que las empresas encargadas de la elaboración de estos productos se han incrementado (Armenta-Bojórquez et al., 2010).

Sin embargo, uno de los principales problemas con el uso y el manejo de estos abonos biológicos en la agricultura, es la falta de conocimiento acerca de los microorganismos nativos presentes en los ecosistemas que pueden fungir como promotores del crecimiento vegetal (Terry-Alfonso et al, 2005), los cuales deben poseer una elevada capacidad poblacional para colonizar principalmente la rizósfera, debido a que un declive rápido en la población disminuye su capacidad competitiva con la comunidad microbiana nativa del suelo, que se encuentra mejor adaptada a las condiciones del mismo (Ahemad & Kibret, 2013; Fernández & Rodríguez, 2005).

Por ende, de acuerdo a las características de los microorganismos utilizados en la elaboración de biofertilizantes, éstos pueden fungir como una especie invasora que compite por los recursos del suelo con la microbiota nativa, pudiendo ocasionar la disminución de su abundancia en el suelo o su total desaparición (Fernández & Rodríguez, 2005).

Lo anterior se ve reflejado en los resultados de esta tesis, ya que la filogenia del género *Bacillus*, que es muy utilizado en la elaboración de biofertilizantes (Saharan & Nehra, 2011; Ahemad & Kibret, 2013), indica que las especies de este género presentes en la parcela agrícola, son genéticamente diferentes a las especies de *Bacillus* que forman parte

de la comunidad microbiana nativa del bosque de pino-encino. Esto sugiere que, si bien el uso de estos productos beneficia la productividad de la parcela agrícola, también modifica la composición de la comunidad microbiana nativa, ocasionando la pérdida de aquellas especies o géneros que no puedan competir en contra de aquellos microorganismos que fueron introducidos. Asimismo, hubo géneros que únicamente se encontraron en las muestras provenientes del encinar, lo cual indica que pudieron ser desplazados por otros microorganismos o que no pudieron adaptarse a las condiciones ambientales de los campos agrícolas (Upchurch et al., 2008).

Sin embargo, los efectos producidos por los biofertilizantes en la comunidad microbiana nativa del suelo no han sido bien estudiados. Por ello, además de la realización de investigaciones centradas en este tema, se propone la elaboración de probióticos bacterianos elaborados con la microbiota nativa de cada ecosistema, de manera que no entren microorganismos externos que puedan perjudicar a la comunidad microbiana nativa del suelo y por ende, a la dinámica de nutrientes en dicho sitio.

Así pues, partiendo de la necesidad de buscar alternativas que minimicen el efecto de los fertilizantes inorgánicos fosfatados hacia el ambiente, este trabajo provee información acerca de la capacidad metabólica de diversas especies bacterianas para solubilizar y mineralizar distintas fuentes de P, las cuales tienen el potencial de ser utilizadas como microorganismos promotores del crecimiento vegetal, ya que permiten la disponibilidad de P en el suelo. Por ende, dichas cepas también pueden ser consideradas en la elaboración de un biofertilizante diseñado para satisfacer la demanda de P que existe en los suelos, principalmente en cultivos agrícolas.

Lo anterior es posible gracias al uso de técnicas de microbiología clásica, debido a que permiten observar de manera tangible a las cepas bacterianas aisladas del suelo, así como el desarrollo de experimentos en los que se evalúe su capacidad para adquirir nutrientes; el antagonismo que pudieran tener con otras cepas bacterianas; y su respuesta frente a diversas condiciones ambientales, tales como: falta de humedad, alta salinidad, pH extremos, etc., los cuales son necesarios para definir la viabilidad de su uso como biofertilizantes de acuerdo a su capacidad de colonización y supervivencia.

A continuación, se presenta un listado de los microorganismos que se proponen como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, las cuales se sugiere investigar para evaluar su uso potencial como biofertilizantes (Tabla 6).

Tabla 6. Aislados bacterianos propuestos para investigar su uso como biofertilizantes en cultivos agrícolas.

Clave	<i>Nombre</i>
E1-17	<i>Pseudomonas reinekei</i>
E1-23	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
E1-8	<i>Erwinia</i> sp
E3-1	<i>Acinetobacter</i> sp
E4-4	<i>Exiguobacterium artemiae</i>
E4-5	<i>Bacillus mycoides</i>

Estos aislados se proponen por dos razones principales: 1) son cepas aisladas del suelo del encinar, por lo que pertenecen a la comunidad bacteriana nativa del bosque, evitando de ese modo la introducción de especies exóticas; y 2) porque pudieron crecer utilizando como fuente de P a todos los compuestos probados en el experimento, incluyendo a los fosfonatos.

No obstante, además de las pruebas en el laboratorio, es imprescindible realizar ensayos en campo, ya que algunos microorganismos que solubilizan y/o mineralizan fósforo en condiciones de laboratorio, no son capaces de hacerlo en el suelo donde se necesita implementarlos, por lo que sólo los experimentos en campo establecerán si la capacidad de solubilizar y/o mineralizar P de los microorganismos seleccionados *in vitro* realmente tiene un efecto sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Fernández et al., 2005).

Conclusión

Este trabajo es uno de los primeros en evaluar conjuntamente mediante un enfoque experimental, los efectos del cambio de uso de suelo sobre la capacidad metabólica y la composición de la comunidad microbiana edáfica asociada al ciclo del P, en encinares templados del centro de México.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que:

- ✓ El cambio de uso de suelo modifica la capacidad metabólica de la comunidad bacteriana del suelo para mineralizar fuentes orgánicas de P, principalmente, debido a los cambios de pH, humedad y suministro de MO entre cada sitio.
- ✓ El proceso principal por el cual los microorganismos del suelo del sitio de estudio obtienen el P, tanto en el encinar como en la parcela agrícola y la parcela abandonada, es la solubilización. Mientras que, en el mantillo del encinar, el proceso de mineralización representa un rol más importante.
- ✓ La capacidad genética para solubilizar P se encuentra ampliamente distribuida entre sitios. Mientras que la capacidad genética para mineralizar fosfonatos está más restringida a sitios, dominando en el mantillo.
- ✓ Las prácticas agrícolas que se realizan en el sitio de estudio, como el uso de biofertilizantes a base de microorganismos, modifica la composición de la comunidad microbiana edáfica nativa y altera la dinámica natural de los ciclos biogeoquímicos.

Si bien los microorganismos solubilizadores y mineralizadores de P tienen un alto potencial como biofertilizantes, promoviendo la agricultura sostenible, la fertilidad del suelo y la productividad de los cultivos, es necesario desarrollar productos específicos para cada región, que puedan servir como una alternativa o complemento a los fertilizantes inorgánicos. Del mismo modo, es importante comunicar la información a los agricultores de cada sitio de estudio, puesto que ellos son quienes decidirán usar o no este tipo de biotecnologías.

Referencias

- Abel S, Nürnberger T, Ahnert V, Krauss GJ, Glund K (2000). *Induction of an Extracellular Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase as an Accessory Ribonucleolytic Activity during Phosphate Starvation of Cultured Tomato Cells*. *Plant Physiology* 122: 543–552.
- Acosta-Martínez V & Tabatabai MA (2011). Phosphorus Cycle Enzymes. En *Methods of Soil Enzymology* (págs. 161-183). Richard P. Dick, editor. SSSA Book Series, no. 9.
- Ahemad M & Kibret M (2013). *Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective*. *Journal of King Saud University – Science*, 26: 1–20.
- Alori ET, Glick BR & Babalola OO (2017). *Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture*. *Frontiers in Microbiology* 8:971.
- Anderson, J. P. E., Domsch, K. H. (1978). Mineralization of bacteria and fungi in chloroform-fumigated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 10(3): 207-213.
- Arizaga S, Martínez-Cruz J, Salcedo-Cabrales M, Bello-González M (2009). *Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos*. Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología.
- Armenta-Bojórquez A, García-Gutiérrez C, Camacho-Báez J, Apodaca-Sánchez M, Gerardo-Montoya L, Nava-Pérez E (2010). *Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México*. *Ra Ximhai: revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable*, 6 (1): 51-56.
- Babu-Khan S, Chia Yeo T, Martin W, Duron R, Goldstein, A (1995). *Cloning a mineral phosphate-solubilizing gene from Pseudomonas cepacia*. *Applied and environmental microbiology* 61(3): 972-978.
- Baldrian, P. (2009). *Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis*. *Plant Soil Environ*, 55(9): 370-378.
- Beltrán-Pineda ME (2014). *La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal*. *Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 15 (1): 101-113.
- Bergkemper F, Schöler A, Engel M, Lang F, Krüger J, Schloter M, Schulz S (2016). *Phosphorus depletion in forest soils shapes bacterial communities towards phosphorus recycling systems*. *Environmental Microbiology* 18(6): 1988–2000.
- Brookes P., Landman A., Pruden G., Jenkinson D. (1985). *Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil*. *Soil Biology and Biochemistry* 17:837-842

- Cao C, Zhang Y, Qian W, Liang C, Wang C, Tao S (2017). *Land-use changes influence soil bacterial communities in a meadow grassland in Northeast China*. *Solid Earth* 8: 1119–1129.
- Cerón-Rincón L. & Aristizábal-Gutiérrez A. (2012). *Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14 (1): 285-295.
- Challenger A. y Soberón J. (2008). *Los ecosistemas terrestres*, en *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México: 87-108.
- Chávez-Vergara B. (2015). *Efecto de la calidad de la materia orgánica asociada a dos especies de Quercus sobre la descomposición del mantillo en un bosque templado deceduo*. (Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cole CV, Elliott ET, Hunt HW, Coleman DC (1978). *Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics. V. Phosphorus transformations*. *Microbial Ecology* 4: 381-387.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2009). *Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization*. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 669-678.
- Cordell D, Drangert JO, White S (2009). *The story of phosphorus: Global food security and food for thought*. *Global Environmental Change* 19: 292–305.
- Delgado-Baquerizo M, Oliverio A, Brewer T, Benavent-González A, Eldridge D, Bardgett R, Maestre F, Singh B, Fierer N (2018). *A global atlas of the dominant bacteria found in soil*. *Science*, 359: 320–325.
- DOF (2013). *Programa Sectorial de Desarrollo Agropecuario, Pesquero y Alimentario 2013-2018*. Secretaría de Gobernación, Diario Oficial de la Federación. México.
- Eivazi F & Tabatabai MA (1977). *Phosphatases in soils*. *Soil Biol. Biochem.* 9: 167-172.
- Escutia-Lara Y., De la Barrera E., Martínez-De la Cruz Y., Lindig-Cisneros R. (2010). *Respuesta a la adición de nitrógeno y fósforo en el crecimiento de Typha domingensis y Schoenoplectus americanus*. *Bol.Soc.Bot.Méx.* 87: 83-87
- Etchevers, J. (1983). *Prospección nutricional en viñedos de la zona de la costa de la VIII Región I*. *Agricultura Técnica*, 43(91).
- FAO (2011) *The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) – Managing systems at risk*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London.

- Fernández L, Zalba P, Gómez M, Sagardoy M (2005). *Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera*. CI. Suelo (Argentina) 23 (1): 31-37.
- Fernández M & Rodríguez H (2005). *El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos*. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XXXIX (3): 27-34.
- Fioretto, A., Papa, S., Pellegrino, A., Ferrigno, A. (2009). *Microbial activities in soils of a Mediterranean ecosystem in different successional stages*. Soil Biology and Biochemistry, 41(10): 2061-2068.
- Fraser TD, Lynch DH, Gaiero J, Khosla K, Dunfield KE (2017). *Quantification of bacterial non-specific acid (phoC) and alkaline (phoD) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields*. Applied Soil Ecology 111: 48–56.
- Gaby JC & Buckley DH (2011). *A global census of nitrogenase diversity*. Environmental Microbiology, 13 (7): 1790–9.
- Goldstein A, Liu S. 1987. *Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from Erwinia herbicola*. Biotechnology 5:72-74.
- González H & Fuentes N (2017). *Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal*. Revista de Ciencias Agrícolas, 34(1): 17-31.
- Guo X, Chen YH, Meng M, Biswas SR, Ye L, Zhang J (2016). *Effects of land use change on the composition of soil microbial communities in a managed subtropical forest*. Forest Ecology and Management 373: 93–99.
- H. Ayuntamiento de Valle de Bravo & Secretaría de Desarrollo Urbano y Metropolitano (2006). *Plan Municipal de Desarrollo Urbano de Valle de Bravo*.
- Hedley, M. J., Stewart, J. W. B., Chauhan, B. S. (1982). *Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations*. Soil Science Society of America Journal, 46: 970–976.
- Heppell J, Talboys P, Payvandi S, Zygalkis KC, Fliegue J, Withers PJA, Jones DL, Roose T (2014). *How changing root system architecture can help tackle a reduction in soil phosphate (P) levels for better plant P acquisition*. John Wiley & Sons Ltd, Plant, Cell and Environment: 1-11.
- Hermans SM, Buckley HL, Case BS, Curran-Cournane F, Taylor M, Lear G (2016). *Bacteria as emerging indicators of soil condition*. Appl Environ Microbiol, 83 (1): 1-13.

- INEGI. (2004). *Unidades y subunidades del suelo*. En INEGI, Guía para la Interpretación de Cartografía Edafología. México: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Págs. 12-24.
- Jasinski SM (2012). Phosphate rock, mineral commodity summaries; US Geological Survey: Reston, VA, USA.
- Johnson AH, Frizano J, Vann DR (2003). *Biogeochemical implications of labile phosphorus in forest soils determined by the Hedley fractionation procedure*. *Oecologia* 135: 487-499.
- Jones, D. L., & Willett, V. B. (2006). *Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil*. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5): 991-999.
- Jones RT, Robeson MS, Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N (2009). *A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses*. *The ISME journal*, 3(4): 442-53.
- Kloepper J, Lifshitz R, Zablotowitz R (1989). *Free living bacteria inocula for enhancing crop productivity*. *Trends in Biotechnology*, 7: 39-43.
- Kononova SV & Nesmeyanova MA (2002). *Phosphonates and their degradation by microorganisms*. *Biochemistry (Moscow)* 67(2): 184-195.
- Lajtha, K., Driscoll, C. T., Jarrell, W. M., Elliott, E. T. (1999). *Soil phosphorus: characterization and total element analysis. Standard soil methods for long-term ecological research*. Oxford University Press, New York: 115-142.
- Lauber C, Strickland M, Bradford M, Fierer N (2008). *The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types*. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 2407-2415.
- López-Hernández J., González-Rodríguez H., Ramírez-Lozano R., Cantú-Silva I., Gómez-Meza M., Pando-Moreno M., Estrada-Castillón A. (2013). *Producción de hojarasca y retorno potencial de nutrientes en tres sitios del estado de Nuevo León, México*. *Polibotánica* 35: 41-64
- López-Pérez, Y., Tejero-Díez, J. D., Torres-Díaz, A. N., & Luna-Vega, I. (2011). *Flora del Bosque Mesófilo de Montaña y vegetación adyacente en Avándaro, Valle de Bravo, Estado de México, México*. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 88: 35-53.
- Liu TS, Lee LY, Tai CY, Hung CH, Chang YS, Wolfram JH, Rogers R, A. H. Goldstein (1992). *Cloning of an Erwinia herbicola gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in Escherichia coli HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone*. *J. Bacteriol.* 174: 5814-5819.

- Martínez-Gutiérrez (2013). *Yacimientos de fosfatos: origen, ubicaciones, aplicaciones de los derivados de fosfatos y diseño de una planta de tratamiento*. (Tesis de Grado en Ingeniería de los Recursos Mineros). Universidad de Cantabria.
- Martínez-Yrizar A (1995). *Biomass distribution and primary productivity of tropical dry forest*. En: Bullock SH, Mooney HA, Medina E (eds.), *Seasonally dry tropical forest*, pp. 327-345, Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.
- Metcalf WW & Wanner BL (1991). *Involvement of the Escherichia coli phn (psiD) gene cluster in assimilation of phosphorus in the form of phosphonates, phosphite, Pi esters, and Pi*. J. Bacteriol. 173: 587-600.
- Mohammadi K (2012). *Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and Their Role in Crop Production*. Resources and Environment 2(1): 80-85.
- Molina N, Polverino D, Minvielle M, Apezteguía M, Aguilar M & Basualdo J (2006). *Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de Giardia lamblia*. Parasitología latinoamericana, 61(3-4), 133-137.
- Montaño NM & Sánchez-Yañez JM (2014). *Nitrificación en suelos tropicales, asunto de competencia microbiana: un modelo basado en la teoría de Lotka-Volterra*. Ecosistemas 23(3): 98-104.
- Moreira, A., Moraes, L.A.C., Zaninetti, R.A., Canizella, B.T. (2013). *Phosphorus dynamics in the conversion of a secondary forest into a rubber tree plantation in the Amazon rainforest*. Soil Sci. 178, 618–625.
- Morón-Cruz JA (2014). *Degradación de N-fosfonometil glicina (glifosato) por bacterias edáficas de Cuatro Ciénegas, Coahuila*. (Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica). Instituto Tecnológico de Morelia.
- Muleta D, Assefa F, Börjesson E, Granhall U (2013). *Phosphate solubilising rhizobacteria associated with Coffea arabica L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia*. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences (12): 73–84.
- Murawska, B., Kondratowicz-Maciejewska, K., Sychajfabisiak, E., Rózański, S., Knapowski, T., Rutkowska, B. (2017). *The impact of long-term application of inorganic nitrogen fertilizers and manure on changes of selected properties of organic matter in sandy loam soil*. Journal of Central European Agriculture 18(3): 542-553.
- Murphy, J. A. M. E. S., Riley, J. P. (1962). *A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters*. Analytica chimica acta, 27: 31-36.
- Nadal-Rocamora I (2015). *Alteraciones fisiológicas, metabólicas y de la composición de las poblaciones bacterianas de la microbiota de un suelo agrícola tras la*

aplicación de residuos orgánicos urbanos (Tesis de Doctorado en Microbiología y Parasitología). Universidad Complutense de Madrid.

- Nath D, Maurya B, Meena V (2017). *Documentation of five potassium- and phosphorus-solubilizing bacteria for their K and P-solubilization ability from various minerals*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 10: 174–181.
- Neal A, Blackwell M, Akkari E, Guyomar C, Clark I, Hirsch PR (2017a). *Phylogenetic distribution, biogeography and the effects of land management upon bacterial non-specific Acid phosphatase Gene diversity and abundance*. Plant Soil: 1-15.
- Neal A, Rossmann M, Brearley C, Akkari E, Guyomar C, Clark I, Allen E, Hirsch P (2017b). *Land-use influences phosphatase gene microdiversity in soils*. Environmental Microbiology 19(7): 2740–2753.
- Palomo-Rodríguez M, Martínez-Rodríguez JG, Figueroa-Viramontes U (2007). *Desarrollo Sustentable de los Recursos Naturales al Disminuir Riesgos de Contaminación en Actividades Agropecuarias*. CULCyT//Sustentabilidad, Año 4, No 20: 4-14.
- Paredes-Mendoza M & Espinosa-Victoria D (2010). *Ácidos Orgánicos Producidos por Rizobacterias que Solubilizan Fosfato: Una Revisión Crítica*. Terra Latinoamericana 28 (1): 61-70.
- Quinn JP, Kulakova AN, Cooley NA, McGrath J W (2007). *New ways to break an old bond: the bacterial carbon–phosphorus hydrolases and their role in biogeochemical phosphorus cycling*. Environmental microbiology 9(10): 2392-2400.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Restrepo-Franco G, Marulanda-Moreno S, De la Fe-Pérez Y, Díaz-de la Osa A, Lucia-Baldani V, Hernández-Rodríguez A (2014). *Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica*. Revista CENIC Ciencias Biológicas 46 (1): 63-76.
- Rodríguez H, González T, Selman G (2000). *Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from Erwinia herbicola in two rhizobacterial strains*. Journal of Biotechnology 84: 155-161.
- Rodríguez-Loinaz G, Onaindia M, Amezaga I, Mijangos I, Garbisu C (2008). *Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests*. Soil Biology & Biochemistry 40: 49–60.
- Roesch LF, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AK, Kent AD, Daroub SH, Camargo FA, Farmerie WG, Triplett EW (2007). *Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity*. The ISME Journal 1: 283-290.

- Saharan BS & Nehra V (2011). *Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review*. Life Sciences and Medicine Research, Volume 2011: LSMR-21.
- Sanandi. (22 de Agosto de 2017). *Our Farm*. Obtenido de Sanandi: <https://www.sanandi.com/product-category/personal-care/>
- Secretaría de Turismo (8 de Septiembre de 2015). *Programa de Desarrollo Turístico del Municipio de Valle de Bravo*. Gaceta del Gobierno. Periódico Oficial del Gobierno del Estado Libre y Soberano de México.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit D., & D'Ari Richard (2007). *Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth*. Journal of Bacteriology 189 (23): 8746–8749.
- Smit E, Leeflang P, Gommans S, van den Broek J, van Mil S, Wernars K (2001). *Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods*. Applied and environmental microbiology, 67(5):2284-91.
- Stark C, Condronb L, O'Callaghanc M, Stewartd A, Dib H (2008). *Differences in soil enzyme activities, microbial community structure and short-term nitrogen mineralisation resulting from farm management history and organic matter amendments*. Soil Biology & Biochemistry 40: 1352–1363
- Tabatabai, M. A., Bremner, J. M. (1969). *Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity*. Soil Biology and Biochemistry 1(4): 301-307.
- Tapia Torres Y (2015). *Oligotrofia al extremo: Implicaciones de las estrategias bacterianas para promover el reciclaje de nutrientes en el suelo*. (Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Tapia Torres Y, García-Oliva F (2013). *La disponibilidad del fósforo es producto de la actividad bacteriana en el suelo en ecosistemas oligotróficos: una revisión crítica*. Terra Latinoamericana 31 (3): 231-242.
- Tapia-Torres Y, Rodríguez-Torres MD, Elser JJ, Islas A, Souza V, García-Oliva F, Olmedo-Álvarez G (2016). *How to live with phosphorus scarcity in soil and sediment: lessons from bacteria*. Appl Environ Microbiol 82:4652–4662.
- Tellería JL (2013). *Pérdida de biodiversidad. Causas y consecuencias de la desaparición de las especies*. Memorias R. Soc. Esp. Hist. Nat 10 (2): 13-25
- Terry-Alfonso E, Leyva A, Hernández A (2005). *Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (Lycopersicon esculentum, Mill)*. Rev. colomb. biotecnol. 7(2): 47-54.

- Thomson B, Tisserant E, Plassart P, Uroz S, Griffiths R, Hannula S, Buee M, Mougel C, Ranjard L, Van Veen J, Martin F, Bailey M, Lemanceau P (2015). *Soil conditions and land use intensification effects on soil microbial communities across a range of European field sites*. *Soil Biol. Biochem.*, 88: 403–413.
- Tischer A, Blagodatskaya E, Hamer U (2015). *Microbial community structure and resource availability drive the catalytic efficiency of soil enzymes under land-use change conditions*. *Soil Biology & Biochemistry* 89: 226-237.
- Tischer A, Potthast K, Hamer U (2014). *Land-use and soil depth affect resource and microbial stoichiometry in a tropical mountain rainforest region of southern Ecuador*. *Oecologia* 175: 375-393.
- Torres-Pulido, A. Z., & Rosas-Ferrusca, F. J. (2010). *El valor del suelo habitacional y la intervención de agentes externos Valle de Bravo, Estado de México*. *Urbano* 13(21): 56-62.
- Tosi M, Correa O, Soria M, Vogrig J, Sydorenko O, Montecchia M (2016). *Land-use change affects the functionality of soil microbial communities: A chronosequence approach in the Argentinian Yungas*. *Applied Soil Ecology* 108: 118–127.
- Upchurch R, Chiu C, Everett K, Dyszynski G, Coleman D, Whitman W (2008). *Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils*. *Soil Biology & Biochemistry* 40:1294–1305.
- Vance, E., Brookes, P., & Jenkinson, D. (1987). *An extraction method for measuring soil microbial biomass C*. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(703–707).
- Verchot, L. V., Borelli, T. (2005). *Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme assays in degraded tropical soils*. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(4): 625-633.
- Vincent AG, Turner BL, Tanner EV (2010). *Soil organic phosphorus dynamics following perturbation of litter cycling in a tropical moist forest*. *European Journal of Soil Science* 61: 48–57.
- Wackett LP, Shames SL, Venditti CP, Walsh CT (1987). *Bacterial carbon–phosphorus lyase: products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism*. *J. Bacteriol*, 169: 710-717. Walbridge.
- Walker TW & Syers JK (1976). *The fate of phosphorus during pedogenesis*. *Geoderma* 15: 1-19.
- Wang J, Ren C, Cheng H, Zou Y, Ahmed Bughio M, Li Q (2017). *Conversion of rainforest into agroforestry and monoculture plantation in China: Consequences for soil phosphorus forms and microbial community*. *Science of the Total Environment* 595: 769–778.

- Whalen JK & Sampedro L (2010). *Soil ecology and management*. Cambridge University Press. UK.
- Yin C, Jones KL, Peterson DE, Garrett KA, Hulbert SH, Paulitz TC (2010). *Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12): 2111–2118.
- Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF (2003). *Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison*. *Environmental Microbiology*, 5 (7): 539–54.

Anexos

ANEXO 1. PROCEDIMIENTO PARA MEDIO MÍNIMO DEFINIDO (LPDM)

Tabla 7. Reactivos utilizados para elaborar el Medio Mínimo Definido.

Reactivo	Concentración	g/ L	g/2 L
Tris base	50 mM	6.057 g	12.114 g
Ajustar pH a 7.5 con HCl concentrado			
NH ₄ NO ₃	3.3 mM	0.26 g	0.52 g
K ₂ HPO ₄ *	0.065 mM	0.0113	0.0226
MgSO ₄	40 mM	0.48 g	0.96 g
Citrato de sodio dihidratado	6.8 mM	1.99 g	3.98 g
ZnCl ₂	0.01 mM	0.000136 g (10 ul sol 1 M)	0.000272 g (20 ul sol 1 M)
NaCl	0.17 mM	5 g	10 g
FeCl ₃	49.9 µM	0.27 g	0.54 g
KCl	0.67 mM	0.1 g	0.2 g
MnCl ₂		0.2 g	0.4 g
CaCl		0.4 g	0.8 g
Glucosa (Dextrosa)		9 g	18 g
ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE			
Mezcla de 20 aa**			
Complejo B***		100 µl	200 µl

* Fuente alternativa de P. Para preparar LPDM (baja concentración de P) se requiere a 0.065 mM, HPDM (alta concentración) requiere 1.44 mM (0.19 g/L).

**Ver concentraciones por litro en la tabla siguiente.

*** Se debe de agregar al medio después de haber esterilizado en autoclave. La adición de estos reactivos se realiza en campana y se esterilizan por filtración utilizando filtros (poner marca y características).

Tabla 8. Fuentes de fósforo utilizadas.

Reactivo	Concentración	g/L	Observaciones
K ₂ HPO ₄	0.065 mM	0.0113	
Hidroxiapatita Ca ₅ (OH)(PO ₄) ₃	0.065 mM	0.32	Se disuelve lentamente. Aproximadamente en 2 horas
FeO ₄ P 2H ₂ O	0.065 mM	0.12	Ajustar pH a 7.5 Se disuelve lentamente. Aproximadamente en 2 horas. Esterilizar en autoclave de manera independiente a la mezcla de todos los reactivos.
AlPO ₄	0.065 mM	0.008	Ajustar pH a 7.5 Esterilizar en autoclave de manera independiente a la mezcla de todos los reactivos.
Ca ₃ (H ₂ PO ₄) ₂ H ₂ O	0.065 mM	0.0163	
2AEP	0.065 mM	0.008	
AMPA	0.065 mM	0.0072	

Preparación del medio DM

Colocar 700 ml de agua desionizada en un vaso de precipitados de 1 L.

Adicionar el Tris-base y ajustar pH a 7.5 con HCl concentrado.

Una vez ajustado el pH se pueden adicionar los reactivos faltantes.

Agregar agua desionizada hasta 950 ml.

En caso de requerir medio sólido, añadir 15 g por litro de agar noble con agente solidificante. Agitar.

Esterilizar en autoclave.

Adicionar la mezcla de 20 aminoácidos de acuerdo a los stocks correspondientes (esterilizar por filtración).

Agregar complejo B en la campana de flujo laminar (esterilizar por filtración).

Tabla 9. Stocks de aminoácidos a 0.1 M

Aminoácido	Cantidad (g)	Volumen (ml)	Agua estéril	pH	ml/L DM
D- alanina	0.2227	25	Si		4.88
L-arginina	0.4355	25	Si		5.62
L-asparagina	0.3753	25	Si		2.29
L-Ác. Aspártico	0.3327	25	Si	10.6	2.29
L-cisteína-HCl	0.3029	25	Si		0.87
L-Ác. Glutamínico	0.3678	25	Si	12.8	2.5
L-Glutamina	0.3653	25	Si		2.5
Glicina	0.1876	25	Si		5.82
L-Histidina	0.3878	25	Si		0.9
L-iso-leucina	0.3279	25	Si		2.76
L-Leucina	0.3279	25	Si		4.28
L-Lisina	0.3654	25	Si		3.26
L-Metionina	0.373	25	Si		1.46
L Fenilalanina	0.4129	25	Si		1.76
L-Prolina	0.2878	25	Si		2.1
L-Serina	0.2627	25	Si		2.05
L-Treonina	0.29	25	Si		2.41
L-Tirosina	0.4529	25	Si	12.9	1.31
L-Valina	0.2928	25	Si		4.02
L-Triptófano	0.5105	25	Si	10.8	0.54

Observaciones para la preparación de stocks

La mayoría de los aminoácidos se disuelven fácilmente en agua al agitarlos. Sin embargo, algunos aminoácidos deben estar a cierto pH para disolverse (Ácido Aspártico, Ácido Glutámico, Tirosina y Triptófano).

Para aquellos aminoácidos cuyo pH debe ajustarse:

- Pesar g de aminoácido y añadir 5 ml de agua estéril.
- Ajustar pH con NaOH 5 N.
- Agregar agua estéril hasta los 25 ml.

También es posible disolverlos si se agitan los stocks durante toda la noche.

Observaciones para la mezcla de 20 aa de 50 ml.

Utilizar una pipeta de 5 ml.

Ajustar la pipeta para cada aminoácido y vaciar la cantidad en ml especificada en la Tabla 9 en un tubo falcon de 50 ml.

Al final se obtiene una mezcla de 53 ml aproximadamente.

Adicionar mezcla de 20 aa al medio de cultivo ya estéril.

Limpia la campana con alcohol y esterilizar con rayos UV.

Llevar medio de cultivo caliente y estéril a la campana de flujo.

Para esterilizar mezcla de 20 aa utilizar método de filtración. Usar jeringa de 10 ml (la más grande que se encuentre) y poner un filtro (Thermo Scientific Nalgene Syringe Filter 0.2 µm SFCA). Se debe usar un filtro para cada mezcla.

- Quitar aguja a la jeringa
- Succionar de la mezcla de aa.
- Colocar el filtro
- Vaciar al medio de cultivo
- Quitar filtro
- Repetir procedimiento varias veces hasta que se termine la mezcla

Realizar procedimiento lo más rápido posible, antes de que el medio se enfríe.

Agitar **lentamente** el medio para evitar la formación de burbujas.

ANEXO 2. MEDIO DE CULTIVO LB (Lysogeny broth)

Tabla 10. Componentes del medio de cultivo LB (Lysogeny broth)

Medio de cultivo LB (Lysogeny broth): fórmula en gramos por litro de agua destilada	
Cloruro de Sodio	5 g
Extracto de levadura	5 g
Peptona de caseína	10 g
Agar*	15 g (al 1.5%)

* Añadir en caso de requerir medio sólido.

ANEXO 3. ANOVA DE MUESTRAS DE SUELO.

Tabla 11. Medias de las variables cuantificadas en esta tesis (biogeoquímicas y enzimáticas) para el suelo del encinar, la parcela agrícola y la parcela abandonada. La letra supernumérica indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

	Encinar	Parcela Agrícola	Parcela Abandonada	p	Mantillo Encinar
<i>pH</i>	6.7 (±0.121)	6.8 (±0.05)	6.8 (±0.05)	>0.05	6 (±0.239)
<i>% de humedad</i>	38^A (±2.051)	39^A (±0.361)	31^B (±1.024)	<0.05	47 (±6.336)
<i>COD</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	134 (±16.85)	112 (±16.61)	101 (±13.83)	>0.05	3509 (±2717.27)
<i>POD</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	1.5 (±0.22)	1.3 (±0.15)	0.9 (±0.15)	>0.05	8.7 (±0.96)
<i>Pdisp</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0.96^B (±0.15)	3^A (±0.20)	2.18^A (±0.33)	<0.05	12.87 (±2.07)
<i>Cmic</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	857^A (±87.04)	407^B (±73.81)	752^A (±81.01)	<0.05	11617 (±1913.99)
<i>Pmic</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	3.9^B (±0.75)	8.5^A (±0.84)	8^A (±1.55)	<0.05	256.4 (±43.04)

BG ($\mu\text{mol PNP}$ $\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$)	0.054 (± 0.018)	0.046 (± 0.008)	0.069 (± 0.035)	>0.05	0.991 (± 0.263)
FM ($\mu\text{mol PNP}$ $\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$)	0.109 (± 0.014)	0.097 (± 0.008)	0.079 (± 0.01)	>0.05	2.729 (± 0.663)
FD ($\mu\text{mol PNP}$ $\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$)	0.023 (± 0.005)	0.03 (± 0.009)	0.059 (± 0.016)	>0.05	0.286 (± 0.097)
FN ($\mu\text{mol Pi}$ h^{-1} g^{-1})	0.507 (± 0.186)	0.326 (± 0.152)	0 (± 0)	>0.05	2.386 (± 1.191)

COD: carbono orgánico disuelto, POD: fósforo orgánico disuelto, Pdisp: fósforo dispobible, Cmic: carbono microbiano, Pmic: fósforo microbiano, ND: no determinado, BG: β -Glucosidasa, FM: Fosfomonoesterasa, FD: fosfodiesterasa, FN: fosfonatasa.