



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

IMPACTO DEL CAMBIO DE CLIMA EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL SUELO EN ECOSISTEMAS DEL MONTE TLÁLLOC

ABIGAIL MONTALVO MARTÍNEZ

TESIS

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

La presente tesis titulada: **Impacto del cambio de clima en las comunidades bacterianas del suelo en ecosistemas del monte Tiáloc** realizada por la alumna: ABIGAIL MONTALVO MARTÍNEZ, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Juan José Almaraz Suarez

ASESOR



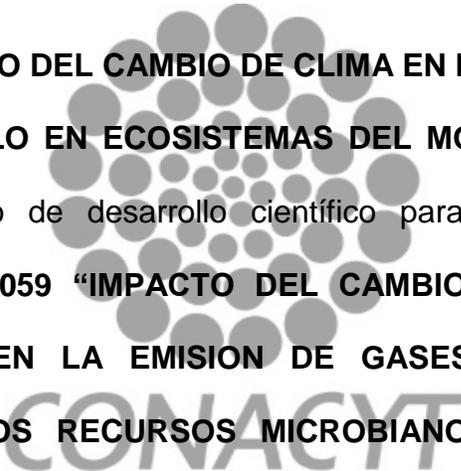
Dr. Ramón Ignacio Arteaga Garibay

ASESOR



Dr. Armando Gómez Guerrero

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2015



La presente tesis: **“IMPACTO DEL CAMBIO DE CLIMA EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL SUELO EN ECOSISTEMAS DEL MONTE TLÁLOC”**, fue financiada por el proyecto de desarrollo científico para atender problemas nacionales **CONACYT 213059 “IMPACTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO Y LA ACTIVIDAD AGRÍCOLA EN LA EMISION DE GASES DE EFECTO DE INVERNADERO Y EN LOS RECURSOS MICROBIANOS DE LA SIERRA NEVADA, MÉXICO.**

IMPACTO DEL CAMBIO DE CLIMA EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL SUELO EN ECOSISTEMAS DEL MONTE TLÁLOC

ABIGAIL MONTALVO MARTÍNEZ, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

Resumen

El cambio climático está afectando a los ecosistemas terrestres, particularmente los localizados en regiones montañosas de mayor altitud son muy sensibles a cambio climático. Los microorganismos del suelo tienen un papel fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas, aunque representan menos del 1 % del carbono del suelo, participan en los ciclos biogeoquímicos y promueven el crecimiento de las plantas. El aumento de temperatura puede impactar la estructura y función de las comunidades microbianas y en consecuencia a los ecosistemas. En este trabajo bloques de suelo se hicieron en sitios de dos altitudes, uno en bosque de oyamel (3489 m snm) y el otro en bosque de encino (2989 m snm), y se movieron a una altitud más baja (3088 m snm para oyamel y 2735 m snm para encino, respectivamente). Esto se llevó a cabo con el objetivo de evaluar el efecto de un calentamiento simulado del suelo en la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas en los bosques de oyamel y encino en el Monte Tláloc. El incremento de la temperatura de los bloques de suelo desplazados a menor altitud fue de alrededor de 2 °C. Se tomaron muestras de los bloques de suelo cada dos meses (julio, agosto y noviembre) y se extrajo el DNA. A partir del cual se construyeron bibliotecas metagenómicas del gen 16S rDNA mediante la estrategia de Fusion primer con química de 200pb para la plataforma de secuenciación masiva Ion Torrent®. Se evaluó la calidad de secuencias, se realizó la asignación de identidad, y se determinó la diversidad alfa de las unidades taxonómicas operacionales (operational taxonomic units, OTU's).

En el ecosistema de encino el número máximo de phyla durante el experimento fue siete en los bloques de suelo no desplazados y seis en los bloques desplazados, esto sucedió a los 60 días de instalado el experimento. Los phyla más abundantes a lo largo del experimento fueron Proteobacteria y Actinobacteria. En los bloques sin movimiento se encontraron 26 familias y en los bloques desplazados se presentaron 30 familias. Los bloques de suelo sin movimiento y bloques desplazados compartieron 21 familias. De estas familias, *Thermoleophilaceae* (18 %), *Pseudonocardiaceae* (12 %), *Micrococcaceae* (7 %) *Nocardioideaceae* (3 %),

Solibacteraceae (3 %) fueron más prevalentes en bloques no desplazados, mientras que *Paenibacillaceae* (9 %), *Sphingobacteriaceae* (9 %), y *Nocardiaceae* (4 %) fueron prevalentes en bloques desplazados. Las familias más abundantes observadas sólo en sitios sin movimiento fueron *Bradyrhizobiaceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Chloroflexaceae* y *Thermoleophilaceae*; las familias más abundantes encontradas sólo en sitios desplazados fueron *Nitrosomonadaceae*, *Prevotellaceae* y *Propionibacteriaceae*.

En oyamel el número máximo de phyla durante el experimento fue seis, el cual se encontró al inicio del experimento. Los phyla más abundantes durante el experimento fueron: proteobacteria, actinobacteria y bacteroidetes. En total se detectaron 21 familias, de las cuales doce solo se encontraron en los bloques de suelo sin movimiento y seis en bloques de suelos desplazados, y ambos bloques compartieron tres familias. Las familias más abundantes en bloques sin movimiento fueron *Thermomonosporaceae* con 20 %, *Bradyrhizobiaceae* con 14 %, *Pseudonocardiaceae* con 8 %, *Nocardiaceae* con 8 %, y *Nitrosomonadaceae* con 6 %. En bloques desplazados las familias más prevalentes fueron *Bradyrhizobiaceae* con 16 %, *Nitrospiraceae* con 8 %, *Nocardioidaceae* con 7 %. Los bloques de suelo sin movimiento y los bloques desplazados compartieron tres familias *Bradyrhizobiaceae*, *Nitrospiraceae* y *Solibacteraceae*, las cuales presentaron mayor prevalencia en bloques desplazados. En ambos bosques la mayor diversidad alfa se presentó al inicio del experimento y después se redujo, pero en el caso de encino la reducción fue más acentuada en los bloques desplazados, mientras que en oyamel la reducción en la diversidad alfa fue similar en bloques desplazados y no desplazados. Los resultados son evidencia de que temperatura causó cambios en la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas donde los microorganismos con mayor capacidad de adaptación prevalecieron, y la sucesión también fue una de sus estrategias de respuesta.

Palabras claves: diversidad bacteriana, metagenómica, encino, oyamel, proteobacteria, actinobacteria, bacteroidetes.

IMPACT OF CLIMATE CHANGE IN SOIL BACTERIAL COMMUNITIES IN ECOSYSTEM MOUNT TLALOC

ABIGAIL MONTALVO MARTÍNEZ, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

Summary

Climate change is affecting terrestrial ecosystems, particularly, those located in high altitude mountain are very sensitive to climate change. Soil microorganisms play a fundamental role in the ecosystems, although they represent less than 1% of soil carbon participate in biogeochemical cycles and promote plant growth. The temperature rise may impact the structure and function of microbial communities and consequently the ecosystems. In this work soil cores were hammered in two altitude sites, one at fir forest (3489 m asl) and the other at oak forest (2989 m asl), and moved down to lower altitude (3088 and 2735 m asl for fir and oak forest, respectively). This was carried out in order to evaluate the effect of simulated soil warming on the structure and diversity of microbial communities in fir and oak forests of Mount Tlaloc. The warming of soil cores moved down to lower altitudes was about 2 ° C. Samples of soil every two months (July, August and November) were taken in order to extract the DNA. The Metagenomic 16S rDNA gene libraries were constructed by the Fusion primer strategy with 200bp chemistry for Ion Torrent® massive sequencing platform. The sequence quality was evaluated, the identity assignment performed, and alpha diversity of operational taxonomic units (operational taxonomic units, OTU's) was determined.

In oak ecosystem the maximum number of phyla during the experiment was seven on no-moved soil cores and six on moved soil cores, this was at 60 days after experiment was installed. The most abundant phyla along the experiment were Proteobacteria and Actinobacteria. At the no-moved soil cores 26 families were found and in displaced cores 30 families were present. The moved and no-moved soil cores shared 21 families. From this families, Thermoleophilaceae (18%), Pseudonocardiaceae (12%), Micrococcaceae (7%) Nocardiodiaceae (3%) and Solibacteraceae (3%) were prevalent in no-moved cores, while Paenibacillaceae (9%), Sphingobacteriaceae (9%) and Nocardiaceae (4%) were prevalent in

moved soil cores. The families Bradyrhizobiaceae, Nitrosomonadaceae, Chloroflexaceae and Thermoleophilaceae were present only at the no-moved soil cores; Nitrosomonadaceae, Prevotellaceae and Propionibacteriaceae were found only in the moved cores.

In fir forest the maximum number of phyla during the experiment was six, which was found at the beginning of the experiment. The most abundant phyla during the experiment were: proteobacteria, actinobacteria and bacteroidetes. A total of 21 families were detected, of which twelve were found only on no-moved soil cores and six on moved cores, and three families were shared by both cores. Thermomonosporaceae (20%), Bradyrhizobiaceae (14%), Pseudonocardiaceae (8%), Nocardiaceae (8%) and Nitrosomonadaceae (6%) were prevalent in no-moved soil cores. Bradyrhizobiaceae (16%), Nitrospiraceae (8%), Nocardioidaceae (7%) were prevalent in moved cores. The soil cores share the families Bradyrhizobiaceae, Nitrospiraceae and Solibacteraceae, which had a higher prevalence in moved soil cores than in the no-moved cores. In both forests alpha diversity was higher at the beginning of the experiment and then decreased, but in the case of oak the reduction of alpha diversity was higher in the moved soil cores, while in fir forest the reduction of alpha diversity was similar in both soil cores. These results showed evidences that temperature caused changes in the structure and diversity of bacterial communities where microorganisms with greater adaptability prevailed, and the succession was also one of their response strategies.

Keywords: bacterial diversity, metagenomics, oak, fir, proteobacteria, actinobacteria, bacteroidetes.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, por permitirme desarrollar mis estudios de Maestría en Ciencia.

Al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por la beca proporcionada durante el periodo de Maestría.

Al Dr. Juan José Almáraz Suárez, por la formación, y orientación académica. Pero sobre todo por su disposición y dedicación a este proyecto.

Al Dr. Ramón Ignacio Arteaga Garibay, por su orientación en la investigación y por su gran aportación en la investigación realizada en el Laboratorio de Recursos Microbianos del CNRG que dirige.

Al Dr. Armando Gómez Guerrero, por su aportación a la investigación y realización de la tesis, gracias por sus valiosas observaciones.

A los investigadores del Área de Microbiología Dr. Ronald Ferrera-Cerrato, Dr. Alejandro Alarcón, Dr. Jesús Pérez Moreno, M.C. María Encarnación Lara Hernández, por los conocimientos y experiencias brindados.

A la Sra. Rosario por su amistad y apoyo en los trámites realizados durante mi estancia en el área de Microbiología.

Al personal del Área de Microbiología por su apoyo en el laboratorio.

A la Sra. Remedios por su apoyo en los trámites realizados en mi periodo en edafología.

Al MC. Marcos Daniel del CNRG por su apoyo a la investigación en la parte bioinformática.

Al personal y tesistas del Laboratorio de Recursos Microbianos, del Centro Nacional de Recursos Genéticos y Microbianos que me apoyaron en mi estancia y me brindaron su amistad, haciendo más amenas las largas horas de laboratorio, siempre me acordare de ustedes y espero seguir contando con ustedes: MC. Daniel, Juan, Hugo, Jorge, Sergio Alejandro, Ramón, Alejandra, Mica, Marychy, Josué, Ernesto.

A mis compañeros de generación José, Uziel, Reyna, Zeferino, Roberto

A cada una de las personas que estuvieron cerca y siempre me brindaron su apoyo: Rubi, Conchis, Magda, Belem, Carmen, Mary Chuy, Santos.

A mis amigas y amigos que se volvieron parte de mi familia: Rebeca, Quetzaly, Laura, Paulina, Geraldí, Paola, Misael, Karla, Isaí, Carlos, Amsi, Toño, Alam, Conchis. Lidia Sandoval, Toña, Juan y Karina.

DEDICATORIA

Al Único que merece el reconocimiento, que es mi vida completa y el amor de mi vida a ti mi Amado Salvador Jesucristo, me enseñaste que el lugar más grande y más alto que El ser humano puede alcanzar es Estar postrado a tus pies.

A mis Papas Joel y Elena Montalvo son los instrumentos que Dios puso para mi formación espiritual he disfrutado de su amor.

A mis hermanas Elizabeth, Merit, Miriam y mi hermano Gamadiel gracias por formar parte de mi vida, por el tiempo compartido.

A mis sobrinos Rafita, Dany, Itzel y una que viene en camino.

A mis cuñados Florencio, Rafael y Julio.

A mis amados Pastores Jorge y Juanita González por su dirección en el proyecto que Dios puso en mi corazón, terminamos una etapa y faltan muchas. Dios siempre nos sorprende, en definitiva nadie ha imaginado lo que Dios tiene preparado para quienes lo amamos.

A cada uno de mis hermanos y hermanas que nos une algo más fuerte que la sangre su respaldo siempre presente.

A mis tíos y tías, a mis primos y a toda mi demás familia.

CONTENIDO.....	ix
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	3
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS	3
HIPÓTESIS	3
CAPÍTULO III	4
REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Cambio climático.....	4
3.1.1 Efecto invernadero y calentamiento global.....	4
3.1.2 Cambio climático y su efecto en la vida del planeta.....	7
3.3 Comunidades microbianas y cambio climático	11
3.4 Métodos de extracción e identificación de poblaciones microbianas del suelo.....	13
3.5 Literatura Citada	19
CAPÍTULO IV	28
RESPUESTA DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS AL CAMBIO DE TEMPERATURA EN EL MONTE TLALOC	28
4.1 Introducción	28
4.2 Materiales y métodos	30
4.2.1 Área de estudio.....	30
4.2.2 Sitios de estudio y establecimiento del experimento	30
4.2.3 Establecimiento del experimento de bloques de suelo.....	31
4.2.4 Toma de muestras.....	32
4.2.5 Medición de Temperatura	32
4.2.6 Análisis físicos y químicos de suelo.	33
4.2.7 Análisis de diversidad microbiana.	33
4.2.7.1 Extracción de DNA metagenómico.....	33
4.2.7.2 Construcción de bibliotecas del gen 16S rDNA.	34
4.2.7.3 Construcción de templado.....	37
4.2.7.4 Control de calidad del enriquecimiento	40
4.3 RESULTADOS	49
4.3.1 Extracción de ADN.....	49

4.3.2 Análisis de la diversidad bacteriana.....	49
4.3. 2. 1 Análisis primario.....	49
4. 3. 2. 2 Análisis secundario	51
4.3.3 Temperaturas del suelo	69
4.3.4 Análisis físicos y químicos de suelo.....	72
2.10 DISCUSIÓN.....	73
4.11 CONCLUSIÓN	80
2.12 Literatura Citada.....	81
ANEXOS	86

LISTA DE CUADROS	xi
Cuadro 1. Altitudes y coordenadas geográficas de los diferentes sitios.....	31
Cuadro 2. Mezcla de reactivos para amplificación en PCR.	35
Cuadro 3. Programa de temperaturas para amplificación de la región V3 del gen 16S r DNA.	35
Cuadro 4. Mezcla de reactivos para la PCR clonal en emulsión.....	39
Cuadro 5. Mezcla de componentes de la solución Melt-Off.....	41
Cuadro 6. Distribución de reactivos en la placa para el enriquecimiento del templado.....	42
Cuadro 7. Información general de los diferentes muestreos durante el experimento.....	49
Cuadro 8. Diversidad bacteriana de los suelos forestales del ecosistema de encino.....	56
Cuadro 9. Tabla de diversidad bacteriana de los suelos forestales del ecosistema de oyamel.	65
Cuadro 10. Propiedades físicas y químicas de los sitios de estudio.	73
Cuadro 11. Abundancia relativa a nivel familia del ecosistema de encino.	87
Cuadro 12. Abundancia relativa a nivel familia del ecosistema de oyamel.	88

LISTA DE FIGURAS.....	xii
Figura 1. Ubicación geográfica del monte Tláloc y los sitios de estudios a diferentes altitudes.	30
Figura 2. Establecimiento del experimento; a) Delimitación de los bloques en cada sitio, b) Extracción del bloque, c) Traslado del bloque, d) Inserción del bloque a su nuevo	32
Figura 3. Imagen del High Sensitivity DNA Chip. Diferentes pozos para muestras, Ladder, gel Dye Mix y el pozo de talla molecular. Agilent Technologies, 2013	40
Figura 4. Inclinación de la pipeta aproximadamente a 45 grados para el cargado del chip.	47
Figura 5. Análisis de calidad de la secuenciación de muestras de ecosistemas forestales. Chip1: A, B y C. Chip 2: D, E y F. A y D imágenes del área cargada del chip que muestra buena calidad de cargado de acuerdo a la escala colorimétrica de azul (área vacía) a roja (zona de llenado total). B y E es el resultado del número de secuencias obtenidas en la corrida del número de secuencias totales hasta el total de secuencias útiles para análisis secundario. C y F: representación gráfica de la longitud en pares de bases de las secuencias obtenidas.	50
Figura 6. Composición de las comunidades bacterianas de encino, muestreo inicial (E1). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phyla Proteobacteria Actinobacteria y Bacteroidetes, y en color café las familias presentes, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.....	51
Figura 7. Composición de las comunidades bacterianas de encino del bloque de suelo sin movimiento, del segundo muestreo (E2a). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia y en color rojo las familias presentes, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST	52
Figura 8. Composición de las comunidades bacterianas de encino de los bloques del suelo desplazado, del segundo muestreo (E2b). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y en color café las familias incluidas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.....	53
Figura 9. Composición de las comunidades bacterianas de encino del bloque de suelo sin movimiento, del tercer muestreo (E3a). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phyla Actinobacteria y Proteobacteria y de color café las familias detectadas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.	54
Figura 10. Composición de las comunidades bacterianas de encino del bloque de suelo con desplazamiento, del tercer muestreo (E3b). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phyla Bacteroidetes y Firmicutes y de color café las familias encontradas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.	54

Figura 11. Diversidad a nivel de Phylum en el ecosistema de encino. E1: Muestreo inicial; E2a: Segundo muestreo de bloques de suelo sin movimiento; E2b: Segundo muestreo de bloques de suelo desplazados; E3a: Tercer muestreo de bloques de suelo sin movimiento; E3b: Tercer muestreo de los bloques de suelo desplazados.	56
Figura 12. Tendencia de los phyla en bloques sin movimiento y bloques desplazados en el ecosistema de encino.	57
Figura 13. Diversidad a nivel de familia en el ecosistema de encino. Escala de color representa la abundancia relativa de familias. E1a: Muestreo inicial; E2a: Segundo muestreo de bloques de suelo sin movimiento; E2b: Segundo muestreo de bloques de suelo desplazados; E3a: Tercer muestreo de bloques de suelo sin movimiento; E3b: Tercer muestreo de los bloques de suelo desplazados.	58
Figura 14. Curva de rarefacción (a) e índice de diversidad alfa (b) de diversidad bacteriana de la rizósfera del ecosistema de Encino. El índice de diversidad alfa fue estimado en MG-RAST con el índice de Shannon considerando el número de especies anotadas en las bases de datos (Ponce- Soto y De Anda, 2013).	59
Figura 15. Composición de las comunidades bacterianas de oyamel del primer muestreo (O1). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phylum Actinobacteria y Proteobacteria y de color café las familias detectadas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.60	
Figura 16. Composición de las comunidades bacterianas de oyamel de los bloques de suelo sin movimiento, del segundo muestreo (O2a). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phylum Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes y Verrucromicrobia y de color café las familias detectadas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST	61
Figura 17. Composición de las comunidades bacterianas de oyamel de los bloques de suelo desplazados, del segundo muestreo (O2b). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phylum Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria y de color café las familias detectadas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.....	61
Figura 18. Composición de las comunidades bacterianas de oyamel de los bloques de suelo sin movimiento, del tercer muestreo (O3a). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phylum Proteobacteria y Actinobacteria, y de color café las familias encontradas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.....	62
Figura 19. Composición de las comunidades bacteriana de oyamel de los bloques de suelo con desplazamiento, del tercer muestreo (O3b). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phylum Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Nitrospirae, y de color café las familias encontradas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.	63

Figura 20. Tendencia de los phyla en bloques sin movimiento y bloques desplazados en el ecosistema de oyamel.	65
Figura 21. Diversidad a nivel de Phylum en el ecosistema de oyamel. O1: Muestreo inicial; O2a: Segundo muestreo de bloques de suelo sin movimiento; O2b: Segundo muestreo de bloques de suelo desplazados; O3a: Tercer muestreo de bloques de suelo sin movimiento; O3b: Tercer muestreo de los bloques de suelo desplazados.	66
Figura 22. Diversidad a nivel de familia en el ecosistema de oyamel. Escala de color representa la abundancia relativa de familias; O1: Muestreo inicial; O2a: Segundo muestreo bloques de suelo sin movimiento; O2b: Segundo muestreo de bloques de suelo desplazados; O3a: Tercer muestreo de bloques de suelo sin movimiento; O3b: Tercer muestreo de los bloques de suelo desplazados.	67
Figura 23. Curva de rarefacción (a) e índice de diversidad alfa (b) de diversidad bacteriana de la rizósfera del ecosistema de Oyamel. El índice de diversidad alfa fue estimado en MGR-RAST con el índice de Shannon considerando el número de especies anotadas en las bases de datos (Ponce- Soto y De Anda, 2013).	68
Figura 24. Temperaturas mínimas por día en los bloques sin desplazamiento (Sitio a) y en los bloques de suelo desplazados (Sitio b) del ecosistema de encino.	69
Figura 25. Temperaturas mínimas por día en los bloques de sitios sin desplazamiento (Sitio a) y bloques de suelo de sitios desplazados (Sitio b) del ecosistema de Encino.	70
Figura 26. Temperaturas mínimas por día en los bloques de suelo sin desplazamiento (Sitio a) y bloques de suelo desplazados (Sitio b) del ecosistema de Oyamel.	71
Figura 27. Temperaturas máximas por día en los bloques de suelo sin desplazamiento (Sitio a) y en los bloques de suelo desplazados (Sitio b) del ecosistema de Oyamel.	71

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Aunque los gases de efecto invernadero (GEI) son esenciales para la vida en la Tierra al mantener una temperatura media global de 15°C en lugar de -18 °C (Caballero *et al.*, 2007; IPCC, 2007), el desbalance en la concentración de estos gases tienen profundas implicaciones en el balance de energía global. Los GEI retienen momentáneamente la energía infrarroja emitida por la superficie terrestre, los océanos y los hielos cuando son calentados por el Sol, pero al aumentar la concentración de gases hacen que la capacidad de la atmósfera de retener parte de la energía reflejada por la Tierra aumente, y ese desbalance en energía se manifiesta como un incremento de la temperatura media global (Perczyk *et al.*, 2004).

Los gases que tienen la propiedad de retener momentáneamente la energía infrarroja se denominan gases de efecto invernadero y su fuente principal de emisión son las actividades antropogénicas como el uso de combustibles fósiles, la agricultura, la ganadería, la deforestación, algunos procesos industriales y los depósitos de residuos urbanos (Caballero *et al.*, 2007; CONAFOR, 2012) y en segundo lugar las fuentes naturales como las erupciones volcánicas. Los principales gases de efecto invernadero son: vapor de agua (H₂O), bióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido de nitrógeno (N₂O) y los clorofluorocarbonos (CFCs), el aumento de la concentración de GEI es una de las principales causas del cambio climático (IPCC, 2007).

El cambio climático es un proceso complejo que resulta en alteraciones del clima global que es identificable cuando persiste durante un período prolongado (IPCC, 2007), lo que provoca alteraciones en los regímenes de precipitación, incremento en la desertificación, alteraciones en los ciclos de crecimiento de la vegetación natural y el derretimiento de los hielos, lo que incrementaría el nivel del mar causando inundaciones en las zonas costeras (Perczyk *et al.*, 2004). Los principales ecosistemas terrestres afectados son la tundra, bosques boreales y regiones montañosas por su sensibilidad al incremento de temperatura (IPCC, 2007; Drigo *et al.*, 2008).

En los ecosistemas los microorganismos juegan un papel fundamental al determinar su funcionamiento mediante las siguientes acciones: hacen disponibles los nutrientes que las plantas no pueden absorber de manera directa (Andresen *et al.*, 2014), participan en la descomposición y la transformación de materiales orgánicos, regulan el abastecimiento de

agua, controlan plagas y enfermedades (Hartmann *et al.*, 2012) y son el componente integral de los procesos biogeoquímicos al reciclar diferentes formas de los bioelementos (Cueva-Rodríguez *et al.*, 2012; Andresen *et al.*, 2014).

Las proyecciones del cambio de clima indican un aumento de temperatura de 1.5-2.4°C lo cual aumentará en 20 a 30% el riesgo de extinción de especies (Drigo *et al.*, 2008). En los microorganismos del suelo los extremos y variabilidad del clima pueden tener un impacto dramático en su composición y función lo que inducirá cambios en la fisiología y crecimiento de algunos grupos de microorganismos, que repercuten en las funciones en las que están involucrados (Drigo *et al.*, 2008; Djukic *et al.*, 2013). Sin embargo, algunas comunidades microbianas del suelo pueden adaptarse a los cambios en la disponibilidad y calidad del sustrato mediante cambios en su estructura, función y alimentación, lo cual dependerá del tipo suelo, de la composición de la comunidad microbiana y de la vegetación (Karhu *et al.*, 2014; Kratz, 2014).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto temperatura y humedad del suelo en las comunidades microbianas de ecosistemas forestales, con un modelo que utiliza a las comunidades microbianas del suelo como indicador del impacto del cambio climático en un gradiente altitudinal en el monte Tláloc en la Sierra Nevada del Estado de México.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de cambio de temperatura, humedad y altitud del suelo en las comunidades microbianas de ecosistemas forestales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de cambio de clima en la diversidad de microorganismos en ecosistemas del monte Tláloc.
- Analizar la respuesta de las comunidades microbianas a cambios en la temperatura y humedad del suelo en ecosistemas del cerro Tláloc.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

- La composición y función metabólica de la comunidad microbiana del suelo se alteran cuando los microorganismos están expuestos a cambios de temperatura.

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- Al cambiar las condiciones de humedad y temperatura del suelo habrá una disminución de la diversidad microbiana.
- La actividad metabólica de los microorganismos se afecta por el cambio de humedad y temperatura en el suelo.

CAPÍTULO III

REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Cambio climático

3.1.1 Efecto invernadero y calentamiento global

La composición química de la atmósfera incluye mayormente a dos gases, nitrógeno (N) en 79% y oxígeno (O₂) en 20%. El 1% restante está formado por diversos gases entre los que están: Argón (Ar) en 0.9% y el dióxido de carbono (CO₂) en aproximadamente un 0.03% (Caballero *et al.*, 2007). Los gases de efecto invernadero son esenciales para la vida en la Tierra al mantener una temperatura media global de 15° C en lugar de -18 °C (Caballero *et al.*, 2007; CONAFOR, 2012), estos gases retienen momentáneamente la energía infrarroja emitida por la superficie terrestre, los océanos y los hielos cuando son calentados por el Sol, pero al aumentar la concentración de gases se incrementa el periodo de retención de la energía infrarroja lo que eleva la temperatura (Perczyk *et al.*, 2004), a lo anterior se le denomina efecto invernadero el cual es un fenómeno natural que se presenta en cualquier planeta que tiene atmósfera, no obstante, si se incrementa la concentración de estos gases se incrementa la temperatura global (Caballero *et al.*, 2007; CONAFOR, 2012)

Se prevé que el aumento en la concentración de estos gases provocará cambios en la temperatura y en el clima mundial, inducirá alteraciones en los regímenes de precipitaciones, incrementara la desertificación, originará alteraciones en los ciclos agrícolas y el derretimiento de los hielos, lo que incrementara el nivel del mar causando inundaciones en las zonas costeras (Perczyk *et al.*, 2004).

A los gases que tiene la capacidad de retención de la energía infrarroja se denominan gases de efecto invernadero (GEI). La fuente principal de los gases de efecto invernadero son las actividades antropogénicas como la quema de combustibles fósiles, la agricultura, la ganadería, la deforestación, algunos procesos industriales y los depósitos de residuos urbanos (Caballero *et al.*, 2007; CONAFOR, 2012). Las fuentes naturales como las erupciones volcánicas ocupan el segundo lugar como fuente de GEI; el aumento de la concentración de GEI es una de las principales causas del cambio de climático (IPCC, 2007) y por ende el calentamiento global, los principales gases de efecto invernadero son:

1. Bióxido de carbono (CO₂):

El carbono (C) es uno de los elementos más comunes en el universo, todas las formas de vida en este planeta poseen carbono. Los reservorios de C en la tierra son como materia inorgánica (carbonatos) y como materia orgánica (principalmente fitomasa viva y muerta) (SEMARNAT, 2009; CONAFOR, 2012). Por su tiempo medio de residencia (12 años) el dióxido de carbono (CO₂) de origen orgánico es uno de los gases de efecto invernadero más importantes (GEI), en combinación con el CO₂ de origen fósil, su emisión ha ido aumentando de manera constante durante más de un siglo (Hussain *et al.*, 2015).

Este gas ha contribuido a mantener una temperatura constante dentro de la tierra, sin embargo en la actualidad, es responsable de casi el 76 % del calentamiento global y su disminución se considera un desafío clave en el mundo (Drigo *et al.*, 2008; Hoyos, 2009; Hussain *et al.*, 2015). Actualmente el CO₂ excede los valores naturales existentes en los últimos 650.000 años, con una concentración equivalente a 380 ppm y que aumenta a un ritmo de alrededor de 0.5 % por año (IPCC 2007). El calentamiento tiende a reducir la incorporación de CO₂ atmosférico a los ecosistemas terrestres y a los océanos, que incrementan así la fracción de emisiones antropogénicas que permanecen en la atmósfera (IPCC, 2007), debido a ello existe un marcado interés por conocer las respuestas de los ecosistemas al aumento de los niveles de CO₂ en la atmósfera e indirectamente en la temperatura (Bardgett *et al.*, 2008). Además el CO₂ elevado conduce también a la reducción de las aberturas de los estomas y las tasas de transpiración (Owensby *et al.*, 1999).

2. Metano (CH₄):

El metano es el segundo gas de efecto invernadero más importante en la atmósfera después de dióxido de carbono, y la mitigación de las emisiones de metano se ha convertido en una preocupación mundial por su tasa de incremento es mayor a la del CO₂ (Bao *et al.*, 2014). El metano es componente principal del gas natural, y está asociado a todos los hidrocarburos utilizados como combustibles, más de la mitad de la producción de CH₄ antropogénico es por actividades agrícolas (Aulakh *et al.*, 2000) y de ganadería por la digestión anaerobia de los rumiantes que corresponde al 25% del metano producido a nivel mundial. En la agricultura por ejemplo; el cultivo que más emite CH₄ es el arroz como resultado de la descomposición anaeróbica de las hojas, tallos y raíces en suelos inundados, difundiéndose a la atmósfera a través del agua en el arrozal o a través del parénquima de los tallos de las

plantas (Sass *et al.*, 1999). El metano (CH_4) también se produce en los pozos de petróleo, rellenos sanitarios, minas de carbón al aire libre y en las filtraciones de gas natural de los oleoductos (Hoyos, 2009). La importancia del metano en la atmósfera radica en que una molécula atrapa 24 veces más calor que una molécula de CO_2 , contribuyendo en 20% al calentamiento global, aun cuando su permanencia en la atmósfera es corta respecto al CO_2 . El CH_4 presente en la actualidad excede los valores naturales existentes en los últimos 650.000 años (IPCC, 2007).

3. Óxido nitroso (N_2O):

Su fuente principal es la agricultura, el tratamiento de aguas residuales, la quema de combustibles fósiles y los procesos industriales químicos (Hoyos, 2009).

Los óxidos de nitrógeno (N_2O) son gases que reaccionan con el agua, el oxígeno y otras sustancias para formar soluciones diluidas de ácido nítrico y sulfúrico. Los N_2O conducen a lluvia ácida y saturación de N en ecosistemas forestales. El óxido nitroso es también producido por diversas fuentes biológicas presentes en el suelo y en el agua y particularmente por la acción microbiana en los bosques tropicales lluviosos (Kroeze *et al.*, 1999; Hoyos, 2009), el aumento relativo de la fijación de N_2 aumenta el N disponible que puede perderse como N_2O cuando la humedad aumenta (Yu *et al.*, 2012).

El N_2O se produce naturalmente en el suelo por dos procesos biológicos:

1.- Desnitrificación. Es la principal fuente de N_2O asociado con la producción de cultivos, donde los microorganismos del suelo utilizan al nitrato por la falta de oxígeno al estar inundados los suelos, así la respiración continua por la microflora y fauna del suelo reduciendo el O_2 disponible a niveles muy bajos. El nitrato es reducido y uno de los productos intermedios del proceso que puede ser liberado a la atmósfera es el N_2O . Muchas de las prácticas de manejo de suelos comúnmente utilizadas en la agricultura contribuyen a las emisiones de N_2O , por ejemplo la aplicación de fertilizantes nitrogenados que se pierden por la desnitrificación en períodos de tiempo cortos (Azam *et al.*, 2002).

2.- Nitrificación. Una cantidad más pequeña de la producción de N_2O agrícola se asocia con la nitrificación, el proceso por el cual el amonio (NH_4^+) es oxidado a nitrato (NO_3^+) (Azam *et al.*, 2002).

4. Vapor de agua (H₂O):

Contribuye al calentamiento global debido a la evaporación, la ebullición del agua líquida o por sublimación del hielo. Las moléculas de agua funcionan distribuyendo el calor en la atmósfera ya que atrapan el calor proveniente del sol, lo distribuyen en la tierra y posteriormente lo expulsan al espacio (Domínguez, 2008; Singh *et al.*, 2010).

5. Clorofluorocarbonos (CFCs):

Son los únicos gases de efecto invernadero que no se producen de forma natural, sino que han sido desarrollados por el hombre con fines industriales y se incluyen como gases de efecto de invernadero debido a que destruyen la capa de ozono lo que altera la entrada de energía solar y la salida de energía infrarroja. Los CFCs (clorofluorocarbonos) se sintetizan por primera vez en Bélgica en 1892 y son los mayores destructores de la capa de ozono. Estos compuestos contienen átomos de cloro, flúor y carbón, desde hace más de 60 años han sido utilizados como agentes refrigerantes, propelentes de aerosol, agentes espumantes, desengrasantes de electrónicos, etc., (Caballero *et al.*, 2007). Durante muchos años fueron considerados como productos ideales de la industria química debido a que son muy estables, no son inflamables, no son tóxicos y además son muy baratos, con una vida molecular promedio de 75-100 años razón por la cual pueden alcanzar alturas más allá de los 25 km., por encima de la máxima concentración de ozono, y son fuertemente afectados por la radiación UV. Los fotones ultravioleta tienen la energía suficiente para romper moléculas normalmente estables como son los CFC, su ruptura puede liberar átomos de cloro capaces de destruir catalíticamente grandes cantidades de ozono (Perczyk *et al.*, 2004), por lo anterior el protocolo de Montreal prohibió su uso (Hoyos, 2009).

3. 1.2 Cambio climático y su efecto en la vida del planeta

El clima terrestre es producto de la compleja interacción entre la atmósfera, océanos, capas de hielo, los continentes y la vida en el planeta (CONAFOR, 2012), el cual ha cambiado muchas veces a lo largo de su historia debido a cambios naturales que se han producido en el equilibrio energético entre la energía solar entrante y la energía reemitida por la Tierra (Perczyk *et al.*, 2004). Se conoce como cambio climático a las alteraciones en el estado del clima global que es identificable cuando persiste durante un período prolongado (IPCC, 2007), el cual traerá graves efectos en los ecosistemas terrestres (IPCC, 2007; Drigo *et al.*,

2008). Los cambios en el clima afectaran de manera directa o indirecta a diferentes sectores dentro de los cuales se encuentran los siguientes:

1. Agricultura: La productividad de los cultivos aumentará ligeramente en latitudes medias y altas en función del tipo de cultivo. En latitudes bajas la productividad disminuirá aun cuando los incrementos de la temperatura local sean de 1 a 2°C (Smith y Almaraz, 2004; Colque-Pinelo y Sánchez-Campos, 2007) lo anterior, tendrá impactos negativos complejos y localizados sobre pequeños propietarios, agricultores y pescadores de subsistencia, los países localizados en latitudes más altas serán los más afectados porque su temperatura se incrementará más rápido, en ellos la estación de crecimiento se alargará (Amthor, 1997), las temperaturas nocturnas serán más altas que las diurnas aumentando la respiración de las plantas (Amthor 1997; Almaraz *et al.*, 2008).

2. Biodiversidad:

La biodiversidad de los diferentes ecosistemas será afectada por el incremento promedio de temperatura global de 0.74 °C (SEMARNAT, 2009), la extinción se presentara en aquellas especies que no sean capaces de adaptarse, ni desplazarse (Colque-Pinelo y Sánchez-Campos, 2007), algunas especies enfrentaran el cambio climático mediante estrategias ecológicas como plasticidad fenotípica, modificaciones en su comportamiento o la migración a lugares más favorables (Lau y Lennon, 2012), por el contrario, si el cambio climático rebasará la capacidad de adaptación de los ecosistemas éstos tendrán que desaparecer (Yu *et al.*, 2012).

3. Recursos hídricos:

El cambio climático alterará los regímenes de precipitaciones, habrá mayor disponibilidad de agua en los trópicos húmedos y en latitudes altas, menor disponibilidad de agua y aumento de las sequías en latitudes medias y bajas y centenares de millones de personas tendrán limitaciones en el uso del agua (Perczyk *et al.*, 2004).

4. Zonas bajas y regiones costeras:

El derretimiento de los hielos incrementara el nivel del mar causando inundaciones en las zonas costeras (IPCC, 2008), también se aumentaran los daños por crecidas de cuerpos agua y tempestades debido al incremento en frecuencia e intensidad de los fenómenos meteorológicos extremos (Colque-Pinelo y Sánchez-Campos, 2007).

3. Salud:

El sector salud será afectado por el aumento de enfermedades diarreicas e infecciosas debido al desplazamiento de algunos vectores transmisores de enfermedades (Colque y Sánchez, 2007; IPCC, 2007), se presentara mayor frecuencia de enfermedades cardiorrespiratorias por el aumento de concentraciones del ozono, óxidos de nitrógeno y de azufre lo que exacerbará con olas de calor, crecidas de cuerpos de agua y sequías (Valdivia, 2006).

3.2 Papel de los bosques en el ciclo del carbono

México es uno de los diez países con mayor área de bosques primarios cuya superficie forestal abarca alrededor de 139 millones de ha de las cuales 36.6 millones de ha son de bosques (CONAFOR, 2015). Los bosques templados son el segundo bioma más extenso del país y uno de los más diversos a nivel mundial (Guzmán-Mendoza *et al.*, 2014) presentan una gran diversidad de árboles dominado principalmente por:

a).- Bosque de pino (*Pinus spp.*) registra más de 50 especies en el territorio nacional de las cuales 50 son endémicas, presenta una amplia diversidad florística y ecológica, está presente desde el nivel del mar hasta el límite de la vegetación arbórea, representan el 37 % del total de especies a nivel mundial (INECC, 2012).

b).- Bosque de oyamel (*Abies spp.*) posee características florísticas y ecológicas especiales asociadas con factores climáticos y edáficos. Aproximadamente 82 % de la superficie donde se desarrollan corresponde a zonas montañosas en altitudes entre 2,400 y 3,500 msnm, en general los bosques de oyamel ocupan 0.16% de la superficie de México (Sánchez *et al.*, 2006).

c).- Bosque de encino (*Quercus spp.*) cubren aproximadamente 5.5% de la superficie total del país en altitudes de 1,200 a 2,800 msnm, en México se registra 161 especies de las cuales 109 son endémicas (Encina *et al.*, 2007).

Los ecosistemas terrestres son grandes almacenes de carbono, donde el CO₂ de la atmósfera es fijado vía fotosíntesis y secuestrado en la biomasa vegetal y en el suelo (Karhu *et al.*, 2014). Los ecosistemas forestales constituyen un importante sumidero de carbono (Hartmann *et al.*, 2012), en ellos el flujo de carbono oscila entre el 40-80% de la emisión total de CO₂ y las fluctuaciones en la composición microbiana afectan de manera significativa tanto las emisiones netas de CO₂ (Lin *et al.*, 2012; Skouw *et al.*, 2014) como el flujo de nutrientes (Landesman y Dighton, 2011; Skouw *et al.*, 2014) en los bosques, por lo anterior, un cambio

en la composición microbiana puede transformar un sumidero de carbono en una fuente de carbono (Luo *et al.*, 2014). La biomasa de los bosques tropicales de baja latitud representan un 62% de eficiencia como sumidero de carbono, en el caso de los bosques templados de México se han realizado estudios donde se ha encontrado que las diferentes especies forestales presentan diferente contenido de carbono en biomasa aérea (fuste, ramas, hojas y raíces) (Galeana-Pizana, *et al.*, 2013; Carrillo-Anzúres *et al.*, 2014).

Los suelos forestales con mayor cantidad de carbono se localizan en bosques de alta latitud (boreal), en bosques tropicales los sumideros de carbono en el suelo varían entre 60 y 115 toneladas C ha⁻¹. En los trópicos, el carbono que está en sumideros superficiales varía entre 60 y 230 toneladas C ha⁻¹ en bosques primarios, y entre 25 y 190 toneladas C ha⁻¹ en bosques secundarios. Dependiendo de la edad de los bosques y las condiciones ambientales, la cantidad de carbono almacenado en el suelo es mucho mayor que en la vegetación (Skouw *et al.*, 2014). Se ha documentado que en el suelo se acumula dos veces más carbono que en la atmósfera y se encuentra regulado por la actividad de las comunidades microbianas, las cuales pueden determinar la trayectoria del cambio climático (Bardgett *et al.*, 2008). En el centro de México

se estimó el contenido de carbono orgánico del suelo en áreas agrícolas, áreas de bosques y áreas reforestadas pertenecientes a la Sierra de las Cruces, Sierra de Guadalupe, los volcanes Pelado, Cuautzin y Tláloc, se encontró el mayor contenido de carbono orgánico del suelo en sitios reforestados con *Abies religiosa*, *Pinus spp.* y *Pinus cupressus* y los suelos agrícolas presentaron menos de la mitad de carbono orgánico del suelo que los suelos forestales. (Vela-Correa *et al.*, 2012).

Los bosques y los suelos forestales son un importante sumidero de carbono pero también representa una fuente de emisión de CO₂, debido a que por respiración el suelo libera 60 petagramos (Pg. 10¹⁵g) de carbono por año a la atmósfera (Karhu *et al.*, 2014) por lo que representa la segunda mayor vía de intercambio de CO₂ de la superficie terrestre, después de la fotosíntesis (Cueva-Rodríguez *et al.*, 2012; Andresen *et al.*, 2014). A lo anterior, se le suma la emisión de CO₂ emitida por las actividades del ser humano a la atmósfera que representan 7,5 Pg de C al año mientras que las fuentes naturales aportan 100 Pg al año (Perczyk *et al.*, 2004; Caballero *et al.*, 2007). Además la emisión de CO₂ combinada con la

respiración de la raíz, la respiración heterotrófica y micorrízica exceden 10 veces la emisión CO₂ antropogénico (Wang *et al.*, 2013).

Se provee las concentraciones elevadas de CO₂ puedan alterar el intemperismo químico por mayor disolución de CO₂ en el agua (Ley de Henry), el pH del agua y la superficie de impacto lo que provocara que los procesos físicos y químicos modifiquen las propiedades del suelo (Österreicher-Cunha *et al.*, 2015).

También el incremento de CO₂ podría aumentar la producción de biomasa de la planta que induce una mayor acumulación de metales y aumenta las poblaciones microbianas asociadas a las raíz (Formánek *et al.*, 2014). Estos cambios en el ambiente del suelo pueden alterar las comunidades microbianas nativas al alterar su metabolismo y en consecuencia los procesos biogeoquímicos de los ecosistemas (Österreicher-Cunha *et al.*, 2015).

El CO₂ atmosférico que es consumido por la vegetación de los bosques es reemplazado por aquel CO₂ que viene de la respiración heterotrófica, incluyendo los microorganismos descomponedores de la materia orgánica. Esta última es la principal fuente de nutrientes que entran al suelo (Bothwell *et al.*, 2014). Durante la descomposición de la materia orgánica se presenta la competencia trófica entre hongos y bacterias por carbono, nitrógeno e hierro (Frey-Klett *et al.*, 2011). Al respecto, se ha observado que si existe suficiente materia orgánica no hay competencia entre los microorganismos pero cuando se agota el sustrato los microorganismos empiezan a competir (Djukic, 2013).

3.3 Comunidades microbianas y cambio climático

Las comunidades microbianas determinan el funcionamiento de los ecosistemas al desempeñar las siguientes funciones: hacen disponibles los nutrientes que las plantas no pueden absorber de manera directa (Andresen *et al.*, 2014), participan en la descomposición y la transformación de materiales orgánicos, regulan el abastecimiento de agua, controlan plagas y enfermedades (Hartmann *et al.*, 2012) y son el componente integral de los procesos biogeoquímicos al reciclar diferentes formas de los bioelementos (Gray *et al.*, 2011; Cueva-Rodríguez *et al.*, 2012; Andresen *et al.*, 2014).

La mayor actividad microbiana del suelo se presenta en los primeros 30 cm de profundidad, particularmente en el área de influencia de la raíz conocida como rizósfera, donde se producen procesos biológicos y ecológicos complejos por las interacciones entre las raíces y los microorganismos del suelo tanto benéficos como patógenos (Bais *et al.*, 2006). Los

microorganismos son atraídos por los exudados de la raíz, se alimentan de estos y a cambio los microorganismos protegen a las plantas de patógenos, estimulan su crecimiento y aseguran la estabilidad de ecosistemas y agroecosistemas (Hernández-Montiel y Escalona-Aguilar, 2003; Pedraza *et al.*, 2010). Las interacciones que se presentan entre plantas y microorganismos afecta la química local de la rizósfera por la exudación de carbono, la excreción y absorción de iones (Drigo *et al.*, 2008; Kadowaki *et al.*, 2013), estos cambios afectan la abundancia de microorganismos por lo que se usan como indicador de la “salud” de los ecosistemas (Yuan *et al.*, 2013).

Los modelos sobre cambio climático pronostican una disminución de la precipitación en algunos lugares y aumento en otros provocando inundaciones (Landesman y Dighton, 2011). Las bajas precipitaciones aumentaran la temperatura en los diferentes ecosistemas, al respecto se conoce que un incremento de 1.5-2.4°C aumentará de 20 a 30% el riesgo de extinción de las especies (Drigo *et al.*, 2008).

La temperatura del suelo es uno de los factores determinantes en la diversidad y metabolismo de los microorganismos (Drigo *et al.*, 2008), los extremos y variabilidad del clima proyectados por el cambio climático pueden tener un impacto dramático en la composición y función de la comunidad microbiana del suelo que inducen cambios en la fisiología y el crecimiento de algunos grupos de microorganismos (Djukic *et al.*, 2013), sin embargo, se conoce que algunas comunidades microbianas del suelo pueden adaptarse a los cambios en la disponibilidad y calidad del sustrato mediante cambios en su estructura, función y alimentación (Djukic *et al.*, 2013), lo cual dependerá de las diferentes interacciones que se establezcan entre plantas y microorganismos (Lau y Lennon, 2012). Al respecto Xiong, et al. (2014) realizaron un estudio en un pastizal alpino donde incrementaron la temperatura de 1-2°C durante 15 meses y se observó un cambio significativo en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo, en otro estudio se sometió a un incremento de temperatura de 2 °C durante 10 años a las comunidades del suelo y se observó que las comunidades cambiaron su composición (Luo *et al.*, 2014). Pero el efecto del incremento de temperatura en los microorganismos depende de diferentes factores entre los que se encuentra el tipo de suelo; suelos con alto contenido de carbono como los presentes en ecosistemas boreales, ártico y de montaña son más sensibles al cambio de temperatura comparado con un suelo mediterráneo (Kratz, 2014). En el caso de suelos de humedales y turberas el aumento de temperatura crea

condiciones más favorables para la actividad microbiana ya que favorece la disponibilidad de O₂ que resulta en mayor descomposición de materia orgánica, aumento de liberación de CO₂ y reducción de las emisiones de metano (Djukic, 2013; Karhu *et al.*, 2014). En suelos ácidos un aumento de temperatura y periodos prolongados de sequía disminuyen la actividad microbiana pero los periodos cortos de sequía permiten la adaptación de los microorganismos al estrés de agua (Skouw *et al.*, 2014); en algunos suelos los aumentos de temperatura triplican la tasa de respiración, pero al pasar el tiempo la respiración regresa a su tasa original (Kratz, 2014).

Otro factor que determina el impacto del cambio de temperatura en los microorganismos es el tipo de vegetación por las relaciones que se establecen entre planta-microorganismos, se ha observado que bajo vegetación arbórea los microorganismos son más sensibles al aumento de temperaturas y cambios en la humedad que en praderas abiertas (Cueva-Rodríguez *et al.*, 2012; Krashevskaya *et al.*, 2012; Karhu *et al.*, 2014).

La humedad es otro factor que afecta las comunidades microbianas del suelo, un incremento de humedad en un rango de 50 a 75% intensifica la actividad microbiana debido a óptimas condiciones físicas y químicas que permiten el desarrollo de los procesos metabólicos de bacterias, hongos, algas y actinomicetos lo que aumenta la biomasa microbiana (Hartmann *et al.*, 2012). No obstante, un exceso de humedad incrementa la desnitrificación y la emisión de N₂O mientras que las condiciones más secas reducen la actividad de este proceso microbiano debido a que alteran las enzimas microbianas sensibles a la temperatura repercutiendo en su abundancia y composición (Smith y Almaraz, 2004).

Otro factor importante que afecta la diversidad microbiana del suelo es el pH, la mayoría de las bacterias se desarrolla óptimamente en un pH cercano a la neutralidad pero un pH ácido o alcalino afecta la estructura y crecimiento de la comunidad microbiana al promover o inhibir su crecimiento (O'May *et al.*, 2005), cambios en factores que afectan a las comunidades microbianas tendrán repercusión en la descomposición de la materia orgánica (O'May *et al.*, 2005).

3.4 Métodos de extracción e identificación de poblaciones microbianas del suelo

El suelo es un entorno complejo y heterogéneo, donde por cada gramo existen 10⁹ células, el suelo constituye el depósito más grande de la diversidad microbiana en el planeta (Stefanis

et al., 2013). La diversidad microbiana es la variabilidad de especies bacterianas y fúngicas en todas sus formas, niveles e interacciones (Ansari y Malik, 2013; Stefanis *et al.*, 2013).

Para el estudio de la diversidad microbiana se utilizan diferentes métodos de extracción e identificación de microorganismos del suelo, a continuación se enlistan los más importantes:

Microscopía y técnicas colorimétricas

Microscopía de epifluorescencia: las células microbianas presentes en la muestra son marcadas con un fluorocromo. Un filtro específico adaptado a un microscopio de epifluorescencia identifica a las células marcadas con el color apropiado (Stefanis *et al.*, 2013).

Microscopía electrónica: microscopía electrónica de barrido (SEM) que puede determinar el aspecto de la superficie de las células microbianas y microscopía electrónica de transmisión (TEM) es más apropiado para la identificación de virus (Stefanis *et al.*, 2013).

Métodos bioquímicos

Recuentos de placas: Es un método microbiológico tradicional dependiente de cultivo, que proporciona información de los microorganismos que se cultivan en un medio líquido o sólido (Stefanis *et al.*, 2013), de la diversidad de procariotas del suelo sólo el 1% de la población bacteriana se puede cultivar por métodos dependientes de cultivo, representan una pequeña parte con respecto a la totalidad de comunidad microbiana (Ansari y Malik, 2013).

Perfil a escala filogenética de la comunidad y la utilización de fuente de carbono: Las concentraciones y utilización de diferentes fuentes de carbono puede describir la diversidad filogenética y la actividad potencial de las comunidades microbianas (Chen *et al.*, 2013).

Ésteres metílicos de ácidos grasos y análisis de fosfolípidos: La composición y la cantidad de ácidos grasos en las membranas de las moléculas microbianas expresan diferentes taxones microbianos. Se han utilizado los perfiles de ácidos grasos para cuantificar los hongos micorrízicos arbusculares en suelos forestales (Sharmaa y Buyer, 2015).

Técnicas moleculares

Las técnicas basadas en métodos moleculares tienen la ventaja de identificar directamente un microorganismo de acuerdo a sus características genéticas como el tamaño de las secuencias de los ácidos nucleicos; entre estas técnicas se encuentran:

- 1.- Hibridación de ácidos nucleicos utiliza una cadena sencilla de DNA que se marca ya sea con un método físico-químico ó con radiactividad o un fluorocromo. Esta cadena tiene una secuencia de nucleótidos conocida y se utiliza como sonda (Stefanis *et al.*, 2013).
- 2.- Fluorescencia de hibridación *in situ* mediante marcadores fluorescentes unidos a secuencias específicas que se utilizan para rastrear y confirmar la presencia de algunos microorganismos de interés del DNA extraído del suelo, esta técnica se ha aplicado a la detección de bacterias intracelulares de yemas y raíces de plantas, bacterias fijadoras de nitrógeno en caña de azúcar y *Paenibacillus spp.* en nódulos de *Lupinus* (Rodríguez-Martínez y Suescún-Oter, 2013).
- 3.- Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) es un método de rastreo molecular que proporciona un perfil de la diversidad basado en la separación física de secuencias únicas de ácidos nucleicos con un análisis simultáneo de diferentes muestras (De la Fuente *et al.*, 2014). La separación de los fragmentos de DNA se basa en la movilidad electroforética de la molécula de DNA parcialmente unida y de doble cadena en los geles de poliacrilamida que contienen un gradiente lineal desnaturalizante (una mezcla de urea y formamida) (Eguiarte *et al.*, 2007; Gaona-Lozano *et al.*, 2012). Esta técnica se utilizó para conocer el impacto de la temperatura en un suelo de bosque boreal donde se observó que un incremento de temperatura induce que las poblaciones de Archaea contribuyan al ciclo del metano (Bomberg *et al.*, 2011).
- 4.- Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) es una técnica similar a DGGE pero en este caso la temperatura del gel se incrementa gradualmente y no requiere gradiente químico y sólo separa fragmento pequeños (Gaona-Lozano *et al.*, 2012; Stefanis *et al.*, 2013).
- 5.- Polimorfismo de fragmentos de restricción con terminales (RFLP) fue el primer marcador de DNA utilizado por biólogos poblacionales y actualmente es uno de los métodos más importantes en la ecología microbiana para comparar rápidamente la diversidad de secuencias de DNA bacteriano amplificado por PCR de muestras ambientales (Eguiarte *et al.*, 2007). Se basa en la variación en la posición de sitios de restricción entre las secuencias y en la determinación de la longitud de fragmentos terminales de restricción (TRFs) marcados con fluorescencia por medio de electroforesis (Gaona-Lozano *et al.*, 2012). Esta técnica se ha utilizado en suelos forestales donde se ha observado que los grupos más abundantes fueron Acidobacteria y Proteobacteria (Yuan *et al.*, 2013).

6.- Análisis de secuencia de las bandas de DNA (RISA) separa los productos de PCR que abarcan el extremo 5' de los 16S gen rRNA, a través del espaciador y en el extremo 3' del gen 23S rRNA. La técnica RISA ofrece aumento de la resolución lo que permite una comparación rápida y reproducible de las comunidades bacterianas de múltiples muestras (Ansari y Malik, 2013). Se utilizó RISA para conocer los efectos de las perturbaciones de los incendios forestales y de la cosecha en las comunidades bacterianas del suelo forestal y se encontró que las Gamma y Alphaproteobacteria eran más representativas en los tratamientos no quemados, mientras que Betaproteobacteria y los miembros del género *Bacillus* eran más abundantes en los tratamientos del área quemada (Smith *et al.*, 2008).

7.- PCR en tiempo real permite la detección y cuantificación de los amplicones de PCR durante la fase exponencial temprana de la reacción, el enfoque de la PCR tiene una mayor capacidad de cuantificar números presentes en una muestra de copias de genes, utiliza marcadores fluorescentes para cuantificar el producto al final de cada ciclo de amplificación, donde la cantidad de fluorescencia está directamente relacionada con la cantidad de producto en el final de cada ciclo de reacción de PCR (Stefanis *et al.*, 2013). Esta técnica se utilizó para conocer el efecto del almacenamiento en las comunidades microbianas de un suelo forestal y encontraron que el almacenamiento a corto plazo, incluso a temperatura ambiente, no afectó la composición microbiana de la comunidad, la abundancia y la actividad (Brandt *et al.*, 2014).

Técnicas de secuenciación

La secuenciación de los ácidos nucleicos del suelo implican la extracción del DNA del gen 16S RNA a partir del cual se generan bibliotecas de clones o bibliotecas metagenómicas, se basa en técnicas de huellas dactilares y al finalizar la secuencia se asocia a información filogenética que pueden estar directamente relacionada con otras muestras (Stefanis *et al.*, 2013). Las bibliotecas de clones se generan con la secuenciación de productos de PCR que contienen fragmentos del gen 16S rDNA, ofrecen información tanto para la identidad filogenética como para la abundancia relativa de la comunidad (OTUs), las secuencias de datos pueden ser almacenados fácilmente en bases de datos y ser comparados (Stefanis *et al.*, 2013).

Cada organismo en un entorno tiene un conjunto único de genes en su genoma; los genomas combinados de todos los miembros de la comunidad constituyen el "metagenoma". La

metagenómica permite obtener una visión global de la composición y función de la comunidad microbiana (Stefanis *et al.*, 2013), por lo que representa una técnica valiosa para realizar un análisis funcional y de secuencias de los genomas microbianos colectivos en una muestra ambiental, basada en secuenciación (Bonilla-Rosso *et al.*, 2008; Hernández-León *et al.*, 2010). En una muestra de DNA metagenómica obtenida del suelo se pueden encontrar entre 6.000 y 10.000 genomas microbianos diferentes, por lo que se pueden estudiar sus funciones y conocer su ecología (Montaña *et al.*, 2012). La estrategia general de un estudio metagenómico consiste en los pasos siguientes:

- 1.- Colecta de la muestra de interés.
- 2.- Aislamiento del DNA metagenómico.
- 3.- El metagenoma puede tomar tres vías:
 - a) Aislamiento por PCR del gen 16S para conocer la diversidad del metagenoma.
 - b) Digestión y clonación en vectores de expresión.
 - c) Secuenciación directa de la muestra.
- 4.- Finalmente se realiza la búsqueda de funciones o actividades enzimáticas. (Hernández-León *et al.*, 2010).

El análisis del gen 16S rRNA y 16S DNAr) proporciona una valiosa información filogenética para la comparación de la diversidad microbiana en muestras ambientales, se han diseñado diversas técnicas basadas en el uso de gen 16S rDNA para la investigación de las estructuras de las comunidades microbianas (Takahashi *et al.*, 2014). En suelos forestales se ha utilizado el análisis del 16S rDNA en los cuales se ha encontrado que los filos más representativos son: proteobacteria, actinobacteria, acidobacteria, firmicutes, lanctomycetes, verrumicrobia y bacteroidetes (Zhou *et al.*, 2009).

Plataformas y métodos de secuenciación de nueva generación

La secuenciación de DNA convencional se basa en el principio de la técnica de terminación de cadena didesoxi desarrollado por Sanger en 1977. Las nuevas técnicas de secuenciación de DNA proporcionan alta velocidad y rendimiento, su limitación es el costo y el número de muestras que se pueden realizar (Stefanis *et al.*, 2013). La evolución reciente de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) han puesto a disposición una serie de métodos y plataformas que pueden ser utilizados para la secuenciación con diferentes costos y capacidades (De la Fuente *et al.*, 2014). Todas las plataformas de secuenciación de

nueva generación realizan una secuenciación masiva en paralelo de las moléculas individuales del DNA amplificado por clonación, lo que genera cientos de mega bases (De la Fuente *et al.*, 2014,) a continuación se describen las principales:

1.- Illumina (Solexa). Proporciona emparejado de los fragmentos del DNA, tiene la capacidad de multiplexación y genera grandes cantidades de datos de secuencias largas, permite la detección y el análisis de especies subdominantes de microorganismos o de grupos. (Takahashi *et al.*, 2014). Esta plataforma se utilizó en un estudio para determinar la diversidad en los diferentes horizontes de suelo de un bosque templado, los resultados mostraron que el horizonte de suelo orgánico tenía abundancia de secuencias relacionadas con bacterias, chordata, arthropoda y ascomycota, por el contrario el horizonte mineral fue significativamente más abundante en secuencias relacionadas con Archaea (Uroz *et al.*, 2013).

2.- El Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) es una herramienta confiable y rentable para estudiar la diversidad microbiana en los ecosistemas complejos, representa una alternativa a las técnicas de huellas dactilares (De la Fuente *et al.*, 2014). El Ion PGM se utiliza principalmente en los pequeños genomas dada la capacidad de salida del instrumento (Nikolaki y Tsiamis, 2013) con una tasa de error de 1,78 % (Milani *et al.*, 2013). El Ion Torrent PGM "utiliza la tecnología de semiconductores" es decir, detecta los protones liberados como nucleótidos que incorpora durante la síntesis. Los fragmentos de DNA con secuencias adaptadoras específicas se vinculan y amplifican en clones por PCR en emulsión en las partículas de perlas del Ion sphere. Las perlas se cargan en los pocillos de detección de protones que se fabrican en una lámina de silicio y la secuenciación se cebe desde una ubicación específica en la secuencia de adaptador. Como producto de secuenciación cada una de las cuatro bases se introduce secuencialmente, si se incorporan bases de ese tipo los protones son liberados y se detecta una señal proporcional al número de bases incorporadas (Quail *et al.*, 2012).

3.- Biosciences Pacífico (PacBio) RS, su rendimiento es limitado y el costo por base es alto (Quail *et al.*, 2012). PacBio ha desarrollado un proceso que permite secuenciar en un tiempo real las moléculas de DNA, utiliza la guía de onda de "modo cero" (ZMW), el ZMW permite la detección de la fluorescencia de los nucleótidos individuales que se incorporan por la polimerasa en una sola cadena de DNA complementaria durante el proceso de síntesis. Cada

tipo de dNTP tiene un marcador fluorescente único que se desprende durante la síntesis de ADN. Los ZMWs son considerados como nano-cámaras densamente dispuestos en una película metálica en la parte superior de una superficie de vidrio, lo que permite la paralelización del proceso de secuenciación de 150.000 ZMW's. Los ZMWs se analizan en busca de señales fluorescentes por un sistema de imagen con focal para documentan la incorporación sucesiva de nucleótidos, a partir del cual se deduce la secuencia. (Quail *et al.*, 2012; Knief, 2014).

3.5 Literatura Citada

- Almáraz, JJ., Mabood, F., Zhou, X., Gregorich, EG. y Smith, DL. 2008. Climate change, weather variability and corn yield at a higher latitude locale: Southwestern Quebec. *Climatic Change*.88:187-197.
- Amthor, JS. 1997. Plant respiratory responses to elevated carbon dioxide partial pressure. *Advances in Carbon Dioxide Effects Research. Proceedings of a Symposium*. Edited by L.H. Allen and M.K. Viney. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. 35-77.
- Andresen, LC., Dungait, JAJ., Bol, R., Selsted, MB., Ambus, P. y Michelsen, A. 2014. Bacteria and Fungi Respond Differently to Multifactorial Climate Change in a Temperate Heathland, Traced with C-13-Glycine and Face CO₂. *Plos One*. 9:19.
- Ansari MA. y Malik, A. 2013. Recent Development in the Methods of Studying Microbial Diversity. *Management of Microbial Resources in the Environment*. Springer, Dordrecht. 17-50.
- Aulakh, MS., Bodenbender, J., Wassmann, R. y Rennenberg, H. 2000. Methane transport capacity of rice plants. I. Influence of methane concentration and growth stage analyzed with an automated measuring system. *Nutrient cycling in agroecosystems*. 58: 357-366.
- Azam, F., Müller, D., Weiske, A., Benckiser, G. y Ottow, JCG. 2002. Nitrification and denitrification as sources of atmospheric nitrous oxide-role of oxidizable carbon and applied nitrogen. *Biol. Fertil. Soils*. 35:54-61.
- Bais, HP., Weir, TL., Perry, LG., Gilroy, S. y Vivanco, JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 233-266
- Bardgett, RD., Freeman, C. y Ostle, NJ. 2008. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *ISME Journal*. 2: Páginas: 805-814.
- Bomberg, M., Münster, U., Pumpanen, J. Ilvesniemi, H. y Heinonsalo, J. 2011. Archaeal Communities in Boreal Forest Tree Rhizospheres Respond to Changing Soil Temperatures. *Microbiology Ecology*. 62:205-217.
- Bonilla-Rosso, G., Souza, V. y Eguiarte, LE. 2008. Metagenómica, genómica y ecología molecular: La nueva ecología en bicentenario de Darwin. *Revista especializada en ciencias Químico-Biológicas.UNAM*.11:41-51.

- Bothwell, LD., Selmants, PC., Giardina, CP y Litton, CM. 2014. Leaf litter decomposition rates increase with rising mean annual temperature in Hawaiian tropical montane wet forests. *PEERJ*. 2:345-358.
- Brandt, F.B., Breidenbach, B., Brenzinger, K. y Conrad, R. 2014. Impact of short-term storage temperature on determination of microbial community composition and abundance in aerated forest soil and anoxic pond sediment samples. *Systematic and Applied Microbiology*. 37:570-577.
- Caballero, M., Lozano S. y Ortega. B. 2007. Efecto invernadero, calentamiento global y cambio climático: Una perspectiva desde las ciencias de la tierra. *Revista digital universitaria*. Instituto de Geofísica, Instituto de Geología. UNAM. 8:10.
- Carrillo-Anzúres, F., Acosta-Mireles, M., Flores-Ayala, E., Juárez-Bravo, JE. y Bonilla-Padilla, E. 2014. Estimación de biomasa y carbono en dos especies arbóreas en la Sierra Nevada, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 5: 5.
- Chen, F., Zheng, H., Zhang, Kai, Ouyang, Z., Lan, J., Li, H. y Shi, Q. 2013. Changes in soil microbial community structure and metabolic activity following conversion from native *Pinus massoniana* plantations to exotic *Eucalyptus* plantations. *Forest Ecology and Management*. 291:65-72.
- Colque-Pinelo, MT. y Sánchez-Campos, VE. 2007. Los Gases de Efecto Invernadero?, ¿Por qué se produce el Calentamiento Global? Asociación Civil Labor. Amigos de la Tierra. Perú.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 2012. Bosques, cambio climático y REDD+ en México. Guía básica. 1era.edición.
- Cueva-Rodríguez, A., Yépez, AY., Garatuza-Payán, J., Watts, CJ. y Rodríguez, JC. 2012. Design and Use of a Portable System for Measuring Soil Respiration in Ecosystems. *Terra Latinoamericana*. 30:327-336.
- De la Fuente, G., Belanche, A., Girwood, SE., Pinloche, E. y Wilkinson, T. 2014. Pros and Cons of Ion-Torrent Next Generation Sequencing versus Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism T-RFLP for Studying the Rumen Bacterial Community. *PLoS ONE* 9:7.

- Djukic, I., Zehetner, F., Watzinger, A., Horacek, M. y Gerzabek, MH. 2013. In situ carbon turnover dynamics and the role of soil microorganisms therein: A climate warming study in an Alpine ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*. 83:112-124.
- Domínguez-Taylor, P. 2008. Gases atmosféricos naturales con efecto Invernadero. Universidad Anáhuac. México Sur.
- Drigo, B., Kowalchuk, GA. y Veen, JAV. 2008. Climate change goes underground: effects of elevated atmospheric CO₂ on microbial community structure and activities in the rhizosphere. *Biol. Fertility Soils*. 44:667-679.
- Eguiarte, LE., Souza, V. y Aguirre X. 2007. Ecología molecular Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad Instituto Nacional de Ecología, Semarnat.
- Encina, DJA., Zárate, LA., Valdés, RJ. y Villarreal, QJA. 2007. Caracterización ecológica y diversidad de los bosques de encino de la sierra de Zapalinamé, Coahuila, México *Boletín de la Sociedad Botánica de México*.
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., y Sarniguet A. 2011. Microbiology and molecular biology reviews. *Microbiology*. 75:583-609.
- Formánek, P., Rejšek, K y Vranová, V. 2014. Effect of elevated CO₂, O₃ and UV radiation on soils. *The Scientific World Journal*.
- Galeana-Pizana, JM., Ordonez-Díaz, JAB. y Corona-Romero, N. 2013. Estimation of carbon content in the Magdalena River basin, Mexico. *Madera y Bosques*. 19: 53-69.
- Gaona-Lozano, JG., Garza-García, Y. y Rodríguez-Martínez, J. 2012. Análisis de la diversidad bacteriana por métodos moleculares no dependientes del cultivo microbiano. *Cienciaviva No.29*. Universidad Autónoma de Coahuila.
- Gray, BS., Classen, AM., Kardol, P., Yermakov, Z. y Miller, M. 2011. Multiple Climate Change Factors Interact to Alter Soil Microbial Community Structure in an Old-Field Ecosystem. *Soil Science Society Am. J.* 75:2217-2226.
- Guzmán-Mendoza, R., Zavala-Hurtado, JA., Castaño-Meneses, G. y León-Córtés, J. 2014. Comparación de la mirmecofauna en un gradiente de reforestación en bosques templados del centro occidente de México. *Madera y Bosques*. 20:71-83.

- Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC). Climate Change 2007. Synthesis Report. Summary for Policy-makers. Disponible en: www.ipcc.ch.
- Hartmann, M., Howes, CG., VanInsberghe, D., Yu, H., Bachar, D., Christen, R., Nilsson, RH., Hallam, SJ., William, W. y Mohn, WW. 2012. Significant and persistent impact of timber harvesting on soil microbial communities in Northern coniferous forests. *International Society for Microbial Ecology*. 6: 2199-2218.
- Hernández- Montiel, LG. y Escalona-Aguilar, A. 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. . *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. Ciencia y hombre*. 16.
- Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, MC. y Santoyo, N. 2010. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 79: 133-139.
- Hoyos, JB. 2009. Cambio Climático II. Gases de Efecto Invernadero.
- Hussain, M., Akhter, P., Russo, N. y Saracco, G. 2015. New optimized mesoporous silica incorporated isolated Ti materials towards improved photocatalytic reduction of carbon dioxide to renewable fuels. *Chemical Engineering Journal*. 278:279-292.
- INECC, 2012. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). 2012.
- Kadowaki, K., Sato, H., Yamamoto, S., Tanabe, AS., Hidaka. A. y Toju, H. 2014. Detection of the horizontal spatial structure of soil fungal communities in a natural forest. *Popul Ecology*. 56: 301-310.
- Karhu, K., Auffret, MD., Dungait, JA., Hopkins, DW., Prosser, JI., Singh, BJ., Subke, JA., Wookey, PA., Ågren, GI., Sebastià, MT., Gouriveau, F., Bergkvist, G., Meir, P., Nottingham, AT., Salinas, N. y Hartley, IP. 2014. Temperature sensitivity of soil respiration rates enhanced by microbial community. *Nature*. 513:81-84.
- Knief, C. 2014. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. *Frontiers in Plant Science*. 5:216.
- Kratz, CJ. 2014. Impacts of climate change on soil microorganisms in northern hardwood forests. Michigan Technological University.
- Krashevskaya, V., Sandmon, D., Maraun, M y Scheu, S. 2012. Consequences of exclusion of precipitation on microorganisms and microbial consumers in montane tropical rainforests. *Oecologia*. 170: 1067-1076.

- Kroeze, C., Mozier, A. y Bouwman, L. 1999. Closing the N₂O budget: a retrospective analysis. *Global Biogeochemistry Cycles*. 13: 1-8.
- Landesman, WJY. y Dighton, J. 2011. Shifts in Microbial Biomass and the Bacteria: Fungi Ratio Occur Under Field Conditions Within 3 h After Rainfall. *Microbiology Ecology*. 62: 228-236.
- Lau, JA y Lennon, JT. 2012. Rapid responses of soil microorganisms improve plant fitness in novel environments. *PNAS*. 109:35.
- Lin, YT., Whitman, WB., Coleman, DC y Chiu, CY. 2012. Comparison of soil bacterial communities between coastal and inland forests in a subtropical area. *Applied Soil Ecology*. 60:49-55.
- Luo, C., Rodriguez, R., Johnston, E., Wu, L., Cheng, L., Xue, Kai., Tu, Q., Deng, Y., He, Z., Shi, JZ., Yuan, MM., Sherry, RA., Li, D., Luo, Y., Schuur, EAG., Chain, P., Tiedje, MM., Zhou, J. y Konstantinidis, KT. 2014. Soil Microbial Community Responses to a Decade of Warming as Revealed by Comparative Metagenomics. *Applied and Environmental Microbiology*. 80:1777-1786.
- Milani, C., Hevia, A., Foroni, E., Duranti, S. y Turrone, F. 2013. Assessing the Fecal Microbiota: An Optimized Ion Torrent 16S rRNA Gene-Based Analysis Protocol. *PLoS ONE* 8:7.
- Montaña, JS., Jiménez, DJ., Hernández, M., Ángel, T y Baena, S. 2012. Taxonomic and functional assignment of cloned sequences from high Andean forest soil metagenome. 101:205-215.
- Nikolaki, S. y Tsiamis, G. 2013. *Microbial Diversity in the Era of Omic Technologies*. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. 15.
- O'May GA., Reynolds, N. y Macfarlane GT. 2005. Effect of pH on an in vitro model of gastric microbiota in enteral nutrition patients. *Appl. Environmental Microbiology*. 71: 4777-4783.
- Österreicher-Cunha, P., Molinaro, B., Feijó, IVA., Vargas, EA y Guimarães, JRD. 2015. Experimental evaluation of CO₂ percolation effects on subsurface soil microbiota. *International Journal of Greenhouse Gas Control*. 32: 135-146.

- Owensby, CE., Ham, JM., Knapp, AK. Y Auen, LM. 1999. Biomass production and species composition change in a tall grass prairie ecosystem after long-term exposure to elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biol.* 5: 497-506.
- Pedraza, OP, Teixeira, KRS, Fernández-Scavino, A., García- De Salamone, I., Baca, BE, Azcón, R., Vera-Baldani, LD., y Bonilla, R. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* Volumen 11:155-164.
- Perczyk, D., Bormioli, M., Carlino, H y González, MP. 2004. Manual de Cambio Climático. Unidad de Cambio Climático de la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable del Ministerio de Salud y Ambiente de la República Argentina, en el marco del Proyecto de Ciudadanía Ambiental Global.
- Quail, M., Smith, M., Coupland, P., Otto, T., Harris, SR., Connor, TR., Bertoni, A., Swerdlow H.P. y Yong Gu, Y. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* 13: 341-352.
- Ramos, E y Zúñiga, D.2008. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada.* 7:123-130.
- Rodríguez-Martínez, R y Suescún-Oter, G. 2011. Aplicaciones e inconvenientes de la técnica Hibridación in situ Fluorescente (FISH) en la identificación de microorganismos. *Revista Salud Uninorte.* 29:2.
- Sánchez, GA., López, ML. y Vibrans, H. 2006. Composición y patrones de distribución geográfica de la flora del bosque de oyamel del Cerro Tláloc, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 79:67-78.
- Sass, RL., Fisher, FM., Ding, A. y Huang, Y. 1999. Exchange of methane from rice fields: National, regional, and global budgets. *Journal of geophysical research-atmospheres.* 104: 26943-26951.
- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2009.
- Sharma, MP. y Buyer, JS. 2015. Comparison of biochemical and microscopic methods for quantification of arbuscular mycorrhizal fungi in soil and roots. *Applied Soil Ecology.* 95:86-89.

- Singh, BK., Bardgett, RD., Smith, P. y Reay, DS. 2010. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nature Review Microbiology* 8:779-790.
- Skouw, HM., Bergmark, L., Priemé, A., Christensen, S., Claus Beier, C. y Michelsen, A. 2014. Soil microorganisms respond to five years of climate change manipulations and elevated atmospheric CO₂ in a temperate heath ecosystem. *Plant Soil*. 374: 211-222.
- Smith, DL. y Almaraz, JJ. 2004. Climate change and crop production: contributions, impacts, and adaptations. *Canadian Journal Plant Pathological*. 26: 253-266.
- Smith, NR., Kishchuk, BE. y Mohn, WW. 2008. Effects of wildfire and harvest disturbances on forest soil bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 216-224.
- Stefanis, C., Alexopoulos, A., Voidarou, C., Vavias, S. y Bezirtzoglo, E. 2013. Principal methods for isolation and identification of soil microbial communities. *Folia Microbiology*. 58: 61-68.
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka K, Hisada, T. y Nishijima, M. 2014. Development of a Prokaryotic Universal Primer for Simultaneous Analysis of Bacteria and Archaea Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One*. 9:8.
- Uroz, S., Loannidis, P., Lengelle, J., Cebon, A. y Morin, E. 2013. Functional Assays and Metagenomic Analyses Reveals Differences between the Microbial Communities Inhabiting the Soil Horizons of a Norway Spruce Plantation. *PLoS ONE* 8:2.
- Valdivia, K. 2006. La importancia del cambio climático II. *Revista Nuestro Mar*. Departamento de Física y Meteorología, Universidad de Valparaíso.
- Vela-Correa, G., López-Blanco, J. y Rodríguez- Gamiño, M. L. 2012. Niveles de carbono orgánico total en el Suelo. 18-30.
- Wang, XH., Benucci, GMN., Xie, XD., Bonito, G., Leisola, M., Liu, PG y Shamekh, S. 2013. Morphological, mycorrhizal and molecular characterization of Finnish truffles belonging to the *Tuber anniae* species-complex. *Fungal Ecology*. 6: 269-280.
- Xiong, JB, Sun, HB, Peng, F., Zhang, HY., Xue, X., Gibbons, SM., Gilbert, JA. y Chu, HY. 2014. Characterizing changes in soil bacterial community structure in response to short-term warming. *FEMS Microbiology Ecology*. 89:281-292.

- Yu, P., Sogn, TA., Wang, J., Mulder, KH., Feger, J. y Jianhua, Z. 2012. Simulated effects of climate change and acid deposition on soil chemical conditions in a Masson Pine forest of SW China. *J. Plant Nutrition Soil Science*. 175: 860-870.
- Yuan, Y., Si, G., Wang, J., Luo, T y Zhang, G. 2013. Bacterial community in alpine grasslands along an altitudinal gradient on the Tibetan Plateau. *Federation of European Microbiological Societies*. 87: 121-132.
- Zhou, J., Huang, Y. y Mo, M. 2009. Phylogenetic analysis on the soil bacteria distributed in karst forest. *Braz J Microbiology* 40: 827-883.

CAPÍTULO IV

RESPUESTA DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS AL CAMBIO DE TEMPERATURA EN EL MONTE TLALOC

4.1 Introducción

Los gases de efecto invernadero (GEI) son esenciales para la vida, estos retienen momentáneamente la energía infrarroja y así mantienen una temperatura media global de 15°C en lugar de -18 °C (Caballero *et al.*, 2007; IPCC, 2007), cuando la concentración de los (GEI) aumentan hacen que la capacidad de la atmósfera de retener parte de la energía reflejada por la Tierra aumente, lo que eleva la temperatura a nivel global (Perczyk *et al.*, 2004). El aumento de la concentración de GEI es una de las principales causas del cambio de climático (IPCC, 2007). El cambio climático tiene diversos efectos en los ecosistemas del planeta, principalmente en la tundra, bosques boreales y regiones montañosas por su sensibilidad al incremento de temperatura (IPCC, 2007; Drigo *et al.*, 2008). Los microorganismos del suelo juegan un papel fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas ya que estos participan en la descomposición de la materia orgánica, en el ciclo de nutrientes como el nitrógeno y fósforo (Andresen *et al.*, 2014), establecen simbiosis benéficas con plantas, liberan fitohormonas que afectan el desarrollo de la raíz y pueden proteger contra el ataque de patógenos (Gray *et al.*, 2011; Hartmann *et al.*, 2012; Andresen *et al.*, 2014).

Las proyecciones del cambio de clima indican un incremento de temperatura de 1.5-2.4°C lo cual aumentará en un rango de 20 a 30% el riesgo de extinción de especies (Drigo *et al.*, 2008). La temperatura es determinante en la diversidad y metabolismo de los microorganismos, los extremos y la variabilidad de clima afecta la composición microbiana y su metabolismo que induce cambios en la fisiología y el crecimiento, lo que repercute en las funciones que éstos realizan en los ecosistemas (Drigo *et al.*, 2008; Djukic *et al.*, 2013). Para el estudio de la influencia de las variaciones del clima en las comunidades microbianas del suelo se han usado diversos enfoques, por ejemplo a través de estudios de movimiento de suelo en un gradiente altitudinal se puede conocer el efecto del cambio de condiciones ambientales en la composición y metabolismo de las comunidades microbianas a corto plazo (Zimmermann *et al.*, 2009; Djukic *et al.*, 2013). En este trabajo se siguió este modelo, se movieron bloques de suelo a diferentes altitudes para evaluar el incremento de temperatura

en la estructura y diversidad de las comunidades microbianas del suelo de dos ecosistemas en el monte Tláloc, Sierra Nevada, Estado de México.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Área de estudio

El experimento se estableció en el monte Tláloc, el cual se ubica en la parte norte de la Sierra Nevada en las coordenadas geográficas de 19° 23' 43'' y 19° 28' 37'' latitud Norte y 98° 42' 45'' longitud Oeste, es un volcán extinto y con una altitud de 4120 msnm. Figura 1.

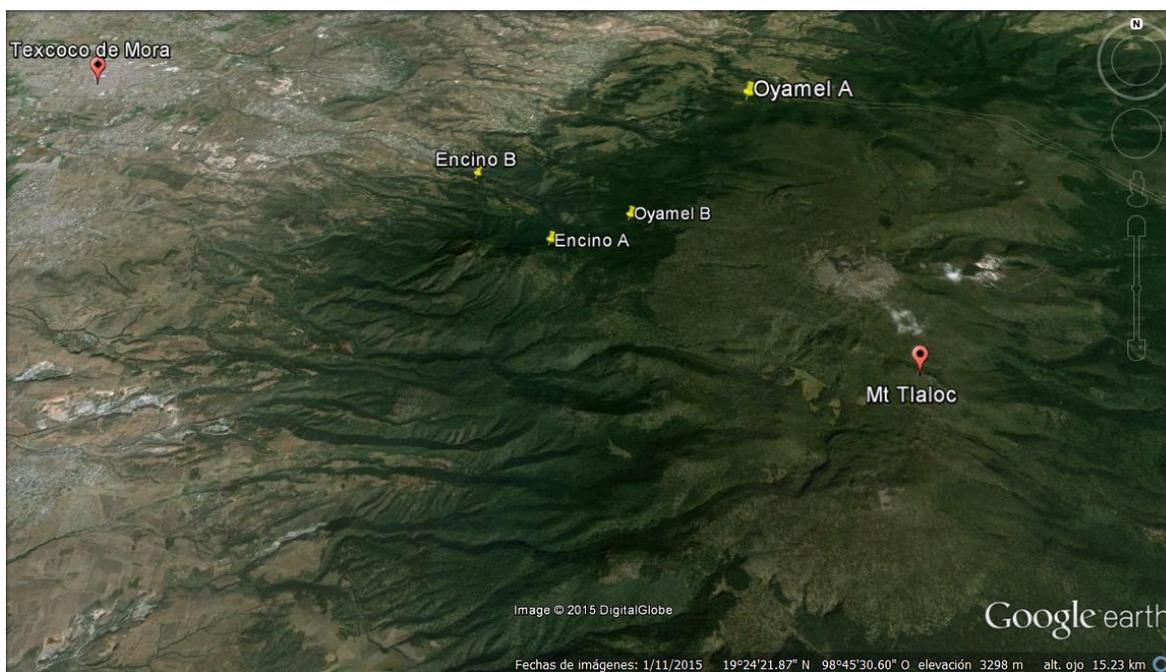


Figura 1. Ubicación geográfica del monte Tláloc y los sitios de estudios a diferentes altitudes. El clima en el área de estudio es templado subhúmedo con una precipitación media anual de hasta 1200 mm, con mayor precipitación en junio, julio y agosto, con una temperatura media anual de 12-18 °C con heladas frecuentes entre los meses de octubre a marzo. Respecto a su vegetación natural dominante presenta seis tipos: encinar arbustivo, bosque de encino, bosque mixto (pino-oyamel), bosque de oyamel, bosque de pino y zacatonal alpino. Los suelos son negros y profundos, ricos en materia orgánica de una textura media y un pH de 5.5-7.1 (Sánchez-González y López-Mata, 2003).

4.2.2 Sitios de estudio y establecimiento del experimento

El experimento se estableció en un gradiente altitudinal de 2732-3489 msnm en el monte Tláloc, el cual corresponde a dos tipos de ecosistemas: Bosque de oyamel y bosque de encino. En cada ecosistema se establecieron dos sitios uno en la parte alta y otro en la baja (Cuadro 1).

Cuadro 1. Altitudes y coordenadas geográficas de los diferentes sitios.

Ecosistema	Altitud inicial (msnm)	Altitud final (msnm)	Coordenadas geográficas finales
Oyamel (a)	3489	3489	N19 25.609 W98 44.785
Oyamel (b)	3489	3088	N19 26.305 W98 45.610
Encino (a)	2989	2989	N19 26.700 W98 46.133
Encino (b)	2989	2732	N19 27.386 W98 47.039

4.2.3 Establecimiento del experimento de bloques de suelo

El experimento se estableció en dos ecosistemas: bosque de oyamel y bosque de encino. En cada ecosistema se seleccionaron dos sitios de 30 m², uno ubicado en la parte baja y otro en la parte alta. En los sitios de la parte alta de cada ecosistema se insertaron 20 tubos de PVC de 10 cm de altura y 15 cm de diámetro, los tubos de PVC fueron enterrados suavemente con la ayuda de un martillo de goma. Previamente, los puntos donde fueron insertados los tubos de PVC fueron limpiados dejándolos libres hojarasca. Alrededor de los tubos de PVC se removió el suelo para poder sacar intactos los bloques de suelo. Diez bloques se movieron a la parte baja de cada ecosistema y 10 bloques se movieron dentro del mismo sitio (Zimmermann *et al.*, 2009; Djukic *et al.*, 2013). Los bloques se enterraron en los sitios a donde se movieron haciendo pozos de las mismas dimensiones que las del bloque. En la figura 2 se muestra el proceso de establecimiento de los bloques.



Figura 2. Establecimiento del experimento; a) Delimitación de los bloques en cada sitio, b) Extracción del bloque, c) Traslado del bloque, d) Inserción del bloque a su nuevo

4.2.4 Toma de muestras

Una vez establecidos los bloques en sus respectivos sitios se tomó una muestra con un tubo muestreador de metal de 3 cm de diámetro y 15 cm de largo; el tubo se insertó en el bloque profundidad de 10 cm para obtener la muestra de suelo; se sacó la muestra del tubo y se eliminaron los extremos del cilindro de suelo obtenido; la muestra fue colocada cuidadosamente en un bolsa de plástico, etiquetada y guardada en un hielera para su traslado. Las muestras obtenidas fueron mezcladas para obtener una muestra compuesta por sitio. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de -80°C hasta el análisis de diversidad. Durante el experimento se realizaron tres muestreos de suelo en cada uno de los dos diferentes tipos de bosque; el primero se realizó a inicio de lluvias (Julio de 2014), el segundo al final de la lluvia (Septiembre de 2014) y el tercer muestreo se realizó a principio del periodo de seca (Noviembre de 2014).

4.2.5 Medición de Temperatura

Se instalaron en cada sitio Datalogers WatchDog Serie 1000 en el suelo a 10 cm de profundidad para registrar la temperatura cada dos horas. Los sensores se colectaron cada seis meses para descargar los datos en la computadora y nuevamente se programaron y colocaron en sus respectivos sitios.

4.2.6 Análisis físicos y químicos de suelo.

Se colectaron muestras de suelo de cada sitio y se colocaron en bolsas de plástico previamente etiquetadas. Las muestras colectadas se secaron bajo sombra a temperatura ambiente, una vez secas se tamizaron y se enviaron al laboratorio de análisis de suelo de la Universidad Autónoma de Chapingo. El pH se determinó usando una relación suelo-agua 1:2, la materia orgánica (MO) se determinó por el método propuesto por Walkley y Black, el nitrógeno total (N) se determinó por arrastre de vapor con el método Kjeldahl, el fósforo (P) se determinó por el método Bray P-1, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) se obtuvo con acetato de amonio 1.0 N pH 7.0 y determinado por arrastre de vapor y la textura por hidrómetro de Bouyoucos.

4.2.6 Análisis de diversidad microbiana.

El análisis de diversidad se realizó en el Laboratorio de Recursos Microbianos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán, Jalisco, mediante el método de Fusion primer para la plataforma de secuenciación masiva Ion Torrent™ Personal Genome Machine® System (PGM) (Thermo Fisher Sci. Inc., USA) que se fundamenta en obtener secuencias en paralelo de forma masiva con base a la tecnología de semiconducción (Hernández-León *et al.*, 2010; Stefanis *et al.*, 2013).

4.2.6.1 Extracción de DNA metagenómico

Se extrajo DNA metagenómico a partir de muestras de suelo rizosférico con el uso del sistema comercial EZ-10 SPIN COLUMN SOIL DNA MINI-PREPS (BIOBASIC INC., Germany) con base a las indicaciones del fabricante, como se describe:

- 1.- Se precalentó la solución SCL del kit a 65 °C en baño de agua durante 10 min.
- 2.- Se pesaron 0.2g de las muestras de suelo, se colocó en un tubo para microcentrifuga de 1.5mL y se le adicionó un volumen 0.5 mL de la solución SCL, se agitó durante 5 min en un baño de agua.
- 3.- Se centrifugó el tubo con la muestra a 13 000 Xg y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y estéril para microcentrifuga, se adicionó un volumen igual al contenido del tubo de la solución SP y se mezcló por inmersión, las muestras se mantuvieron en hielo por 10 min.
- 4.- Se centrifugó el tubo a 13 000 Xg a temperatura ambiente y se transfirió el contenido del tubo colector a un tubo nuevo y estéril.

5. Se le adicionaron 0.2 mL de cloroformo y se homogenizó en vórtex por 5 s.
6. Se centrifugó el tubo a 13 000 Xg a temperatura ambiente, se transfirió el contenido del tubo colector a otro tubo nuevo y estéril.
- 7.- Se adicionaron 1.5mL de la solución de unión (SB) al tubo con la muestra y se mezcló por inversión del tubo.
8. Se transfirió la mezcla del tubo al interior de una columna EZ-10 SPIN, se centrifugó el tubo colector con la columna por 30 s la cual se centrifugo por 30s 12000 Xg.
- 9.-Se adicionaron 700 µL de la solución de lavado (WASH) al interior de la columna, se incubó ésta durante 1 min a 25 °C y se centrifugó por 30 s a 12 000 Xg, y se descartó el contenido del tubo colector.
- 10.- Se adicionaron 300 µL de la solución de lavado (WASH) a la columna y se centrifugó por 30 s a 12 000 Xg y se descartó el contenido del tubo colector.
- 11.- Se transfirió la columna al interior de un tubo de 1.5 ml nuevo y se adicionaron 50 µl de la solución de elución al interior de la columna, se incubó la columna a temperatura ambiente durante 2 min. Se descartó la columna y se etiqueto el tubo con el DNA, se almacenó el tubo con el DNA a -20 °C hasta su uso.

Se verificó la calidad de DNA obtenido mediante un corrimiento electroforético en gel agarosa al 0.8% a 100v durante 1 h, se tiñó el DNA con 1µL del sustituto de bromuro de etidio Gree-DNA Dye (BIOBASIC INC., Canadá) y 5µL del DNA, se visualizó la integridad del DNA en un fotodocumentador (Transiluminador Bio-imging systems), se almacenaron las imágenes en formato digital.

4.2.6.2 Construcción de bibliotecas del gen 16S rDNA.

Se realizó una mezcla de iniciadores a una concentración de 10 pM para la amplificación de la región hipervariable V3 del gen ribosomal 16S rDNA, como se detalla a continuación:

- 1.-Se descongelaron los iniciadores de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y Platinum[®] PCR SuperMix High Fidelity (InvitrogenTM, Carlsbad, California, EUA).
- 2.- Se mezclaron para cada par de iniciadores volúmenes iguales de los iniciadores Forward y Reverse para obtener una mezcla de 10 µM y se transfirieron las mezclas a tubos nuevos por mezcla, se adicionaron 190µl de agua bidestilada estéril. Se transfirieron 50 µl de cada solución de los iniciadores a un tubo nuevo y estéril, se homogenizó la alícuota de iniciadores en un vórtex por 30 s y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.- Se preparó la mezcla de reacción de PCR para la amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA, los volúmenes de cada reactivo se observan en el cuadro 2 y el programa de temperaturas para el termociclador se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 2. Mezcla de reactivos para amplificación en PCR.

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final
Agua			30.7 μ L
Buffer	10x	1x	5 μ L
dNTPs (Invitrogen™, Carlsbad, California, EUA)	5 μ M	0.2 μ L	5 μ L
MgCl ₂ (Invitrogen™, Carlsbad, California, EUA)	2 μ M	0.08 μ M	2 μ L
Primer mix	5 μ M	0.5 μ M	5 μ L
Taq-Polimerasa Platinum® PCR Súper Mix High Fidelity (Invitrogen™, Carlsbad, California, EUA).	0.5 U	0.03 μ L	0.3 μ L
ADN			2 μ L
Total			50 μ L

Cuadro 3. Programa de temperaturas para amplificación de la región V3 del gen 16S r DNA.

Ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95 °C	5 min
30	Desnaturalización	95 °C	30 s
	Alineación	59 °C	30 s
	Extensión	72 °C	30 s
1	Extensión final	72 °C	30 s

Se verificó la amplificación de la biblioteca mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 120 V durante 20 min, se tiñó 1 μ L del producto de amplificación con 5 μ L del sustituto de etidio Green-DNA Dye (BIO BASIC INC., Canadá), se usaron 4 μ L del marcador de talla molecular 100 pb Ladder (Invitrogen, USA). Se visualizó el amplicon en un fotodocumentador (Transiluminador Bio-imaging systems) y se documentaron las imágenes en formato digital.

B) Purificación de las bibliotecas amplificadas.

Se utilizó el sistema de purificación de DNA a base de perlas magnéticas Agencourt[®] AMPure[®] XP (Beckman Coulter, USA). Se siguieron las instrucciones del fabricante.

- 1.- Se tempero el frasco del Agencourt[®] AMPure[®] XP a temperatura ambiente, durante 30 min.
2. Se preparó una solución de etanol al 70% de 10 mL.
- 3.- Se adicionó un volumen del reactivo Agencourt[®] AMPure[®] XP a un tubo con 1 μ L de DNA, se mantuvo una proporción de 1.8 μ L (v/v), se homogenizó la mezcla con ayuda de una micropipeta y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min.
- 4.- Se colocó el tubo con las muestras en el soporte magnético DynaMag[™] -2 durante 2 min, hasta que se aclaró la solución por la formación de un botón, se descartó el contenido del tubo sin tocar el botón, no se retira el tubo del magneto.
- 5.- Se adicionaron al tubo 30 μ L de la solución de etanol al 70%, se incubó el tubo a temperatura ambiente durante 30 s, se giró el tubo sin retirar el tubo del magneto 180 s y se dejó otros 30 s, se descartó el contenido del tubo, no resuspender el botón.
- 6.- Se repitió el paso 5.
- 7.- Se secó el botón a temperatura ambiente durante 5 min, no se retiró el tubo del magneto.
8. Se retiró el tubo del magneto, se adicionaron 20 μ l de una solución de TE (10 mM Tris Cl (pH 7.4):10.6g/L; 1mM EDTA (pH 8.0): 3.94 g/L) al tubo del botón con ayuda de una micropipeta.
9. Se colocó el tubo en el magneto por 2 min hasta la formación de un botón, se transfirió el contenido del tubo a un tubo nuevo y estéril.

C) Cuantificación de la biblioteca

Se determinó la concentración molar (nmol/L) de la biblioteca amplificada con el sistema comercial de cuantificación Agilent[®] High Sensitivity DNA 2100 Bioanalyzer[™] 2100 (Thermo Scientific, Inc, USA) como se describe a continuación:

1. Se temperaron los reactivos durante 30 min antes de su uso. Se encendió el equipo y se lavó con un chip exclusivamente para lavado con 350 μ L de agua Tipo I, se colocó el chip de lavado dentro del equipo Agilent[®] 2100 Bioanalyzer, se cerró la tapa y se corrió por 10s, se quitó el chip y se dejó secar por 10s al aire.
2. Se usó un chip nuevo y se colocó en la estación de procesamiento.

3. Se transfirieron 9 μ l de la solución Gel-Dye mix en el pozo marcado con la letra (G) de color blanco (Figura 3).
4. Se colocó la jeringa de carga en la posición para 1 m, se cerró la estación y se oprimió el émbolo hasta escuchar un “click”, se presurizó durante 60 s.
5. Se liberó la presión al quitar el seguro, se verificó que el émbolo se moviera hasta la marca 0.3m. Se dejó el chip por 5 s antes de llevar el émbolo a la marca de 1mL.
6. Se adicionaron 9 μ l de la solución Gel-Dye mix en los tres pozos marcados con la letra (G) de color negro.
7. Se adicionaron 5 μ l de reactivo High Sensitivity DNA Marker (tapa verde) en los pozos restantes y el pozo para el marcador de talla molecular.
8. Se colocaron 5 μ l de High Sensitivity DNA Ladder (tapa amarilla) en el pozo para el marcador.
9. Se adicionó 1 μ l de la biblioteca en un pozo para muestra, se homogenizó el contenido del chip con ayuda de un vórtex a 2 400 rpm durante 60 s.
10. Se cargó en el software el orden de las bibliotecas en el chip se inició la corrida, el programa generó geles hipotéticos y se consideran un corrimiento óptimos al detectar las bandas de referencia y las bandas de baja y alta talla molecular en cada uno de los carriles. Se removió el chip del equipo y se lavó el equipo con el chip de lavado y con 350 μ l de agua Tipo I como se describe en el paso 1.



Figura 3. Imagen del High Sensitivity DNA Chip. Diferentes pozos para muestras, Ladder, gel Dye Mix y el pozo de talla molecular. Agilent Technologies, 2013

4.2.6.3 Construcción de templado

Se preparó el templado mediante una PCR clonal en emulsión con el sistema OneTouch™ 2 (OT2) (Thermo Scientific, Inc, USA) y el equipo OneTouch™ 200 Template (Thermo Scientific, Inc, USA), como se describe a continuación:

- 1.- Se colocó una placa de amplificación Ion OneTouch™ Amplification Plate (Thermo Scientific, Inc, USA) en la placa térmica del equipo OT2.
- 2.- Se colocó la manguera a través del Tubing Catch OT2 para posicionar la manguera del inyector desechable, también se colocó el inyector desechable en el puerto inyector Hub del OT2.
- 3.- Se adicionaron los volúmenes indicados de reactivos en el tubo de aceite y el tubo de solución de reacción se colocaron los tubos zippers en el OT2 y se montaron los tubos con las posiciones adecuadas en el OT2, se procuró no tocar los zippers con las manos, se colocó un filtro nuevo para lavar el equipo con el programa de lavado.
4. Se determinó el factor de dilución de la mezcla de bibliotecas para ajustar la concentración a una concentración 20pM mediante la siguiente formula:

$$\text{Factor de dilución (TDF)} = \frac{\text{Concentración de la biblioteca en pM}}{20\text{pM}}$$

- 5.- Se preparó la mezcla de reacción para PCR clonal en emulsión cada reactivo se sometido al siguiente proceso:

Mezcla de reactivos para Templado Ion PGM™ OT2 200 (tubo morado):

- 1.-Se dejaron a temperatura ambiente.
- 2.- Se homogenizaron los reactivos con ayuda de un vórtex durante 30 s y se centrifugo durante 2 min, se manejaron los reactivos a temperatura ambiente.

Reactivo B para Templado Ion PGM™ OT2 200 PCR (tubo azul):

- 1.-Se homogenizó el tubo con el reactivo con ayuda de un vórtex durante 1 min y se centrifugó durante 2 s.
- 2.- Se utilizó el reactivo hasta que se observará una apariencia transparente de la solución de amplificación. Se calentó la solución en los casos que no se eliminó la turbidez en un baño de agua 75°C. Se homogenizó el reactivo aclarado durante 1 min y se centrifugó el tubo con el reactivo durante 2 s.

Mezcla de enzimas para Templado Ion PGM™ OT2 200 (tubo café):

- 1.-Se centrifugó el tubo con la enzima por 2 s y se colocó el tubo en un baño en hielo.

Esferas para Templado Ion PGM™ OT2 200 Ion Sphere™ (tubo negro).

- 1.-Se colocó la solución reacción a temperatura ambiente.

2.- Se adicionaron 1.5 mL de los volumenes indicados en el cuadro 4 se añadieron los siguientes reactivos para la PCR en emulsión (Cuadro 4) en el siguiente orden:

Cuadro 4. Mezcla de reactivos para la PCR clonal en emulsión.

Orden	Reactivo	Volumen (µL)
1	Agua Tipo I libre de nucleasas	25
2	Mezcla de reactivos para Templado Ion PGM™ OT V2 200 (tubo morado)	500
3	Reactivo B para Templado Ion PGM™ OT V2 200 PCR (tubo azul)	300
4	Mezcla de enzimas Ion PGM™ OT V2 200 (tubo café)	50
5	Mezcla de bibliotecas (20 pM)	25
6	Esferas para Templado Ion PGM™ OT V2 200 Ion Sphere™ (tubo negro)	100
-	Total	1000

3.- Se transfirió la mezcla de reactivos del cuadro 5 a un filtro para OT V2 con ayuda de una micropipeta, se llenó el filtro a través del orificio de la canula y se adicionaron 1500 µL.

4.- Se encendió el OT2 V2 y se siguieron las indicaciones mostradas en la pantalla del equipo.

5.- Se colocó el filtro en la posición correcta del OT V2 y se inicio la PCR por 6 h.

6.- Se centrifugó el contenido de los tubos de templado durante 3 min en el OT V2 y se retiró la manguera, la cánula de conexión y los tubos de recolección.

7.- Se descartó un 1 mL de la emulsión, se cuidó el no resuspender el botón del templado.

8.- Se resuspendió el botón del templado en 50 µL de la suspensión con ayuda de un vórtex durante 3 s.

9.- Se transfirió el templado a un tubo nuevo Lowbind de 1.5 mL.

10.- Se repitieron los paso 11 y 12 para el segundo tubo colector del OT V2 y se mezclaron los volumenes de los dos tubos colectores , se adicionaron 200 µL de la solución de lavado por cada uno de los tubos.

11.- Se adicionaron al tubo con el templado 500 µL de solución de One Touch Wash al tubo con el templado y se centrifugó durante 3 min a 15 500 Xg. Se reservaron 100 µL del sobrenadante y se descartó el resto.

12.- Se homogenizó el templado mediante un vórtex y se transfirieron 2 µL del templado a un tubo nuevo para PCR, el volumen restante del templado se almaceno a 4°C.

13.- Se lavó el equipo al finalizar la corrida del OT V2 se colocaron los tubos de recolección y la cánula de conexión de la ultima corrida, se cambio el filtro de la ultima corrida por uno usado para el lavado y se desecharon la placa y la aguja.

4.2.6.4 Control de calidad del enriquecimiento

Se realizó un control de calidad del templado para estimar la cantidad de policlonales mediante el sistema Ion Sphere™ Quality Control (Thermo Scientific, Inc, USA).

4.2.6.4.1 Calibración del equipo

La calibración del Qubit® y la cuantificación de policlonales se describe a continuación:

a) Se descongelaron las soluciones de los estándares para la calibración del sistema de control de calidad Ion Sphere™ Quality Control (Thermo Scientific, Inc, USA): Alexa Fluor® 488 y Alexa Fluor® 647 (Thermo Scientific, Inc, USA), se evitó la exposición a la luz. Se homogenizaron en un vórtex y se transfirieron 200 µL de los estándares a tubos Qubit® diferentes.

b) Se seleccionó el programa Ion del Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, Inc, USA) en la opción AF 488 y se insertó el tubo con el estándar Alexa Fluor® 488, se cerró la tapa y se registró el valor.

c) Se repitió el paso b) pero ahora con el estándar Alexa Fluor® 647.

4.2.6.4.2 Preparación de las muestras

La preparación de las muestras para determinar la cantidad de policlonales se realizó como se describe a continuación:

1) Se descongelaron los tubos con las soluciones Ion Probes Master Mix, Annealing Buffer y Quality Control Wash (Thermo Scientific, Inc, USA)

2) Se transfirieron 2 µL del templado a un tubo LowBind de 1.5 mL y se ajustó el volumen a 100 µL con la solución de lavado del sistema OT V2, la mezcla se transfirió a un tubo para PCR de 0.2 mL nuevo y estéril.

3) Se realizó la mezcla Ion Probes Master Mix mediante la siguiente ecuación:

$$[(21 \mu\text{L Annealing Buffer}) * (\text{Número de muestras}) + (1 \mu\text{L de Ion Probes})$$

$$* (\text{Número de muestras})] = \text{Volumen total requerido}$$

Se adicionaron 20 µL de la mezcla del Ion Probes Master al tubo para PCR de 0.2 mL con el templado, se mezcló por inversión.

4) Se colocó el tubo de la muestra en el termociclador con el programa de temperaturas de un ciclo a 95°C durante 2 min y un ciclo de 37°C durante 2 min. Se colocó el tubo para PCR en un termociclador y se corrió el siguiente programa para la unión a las esferas estreptavidina: un ciclo a 95 °C durante 2 min y un ciclo a 37 °C durante 2 min.

5) Se colocó el tubo en el DynaMag™ -2 y se realizaron tres lavados que se describen a continuación:

a.- Se adicionaron 200 µL de la solución Quality Control Wash al tubo para PCR de 0.2 mL, se mezcló en vórtex y se centrifugó a 15 500 Xg durante 1.5 min.

b.-Se separó el sobrenadante del templado sin tocar el botón y se dejó aproximadamente 10 µL y se repitió dos veces los puntos anteriores.

6) Después del lavado final se adicionaron 190 µL de la Quality Control Wash Buffer (Thermo Scientific, Inc, USA) para ajustar a un volumen de 200 µL, se mezcló con ayuda de una micropipeta y se transfirió toda la muestra a un tubo Qubit® nuevo y estéril de 200 µL.

7) El control negativo se hizo con 200 µL de la solución Quality Control Wash Buffer en un tubo Qubit® nuevo y estéril de 200 µL.

8) Una vez obtenidas las muestras se registraron en la calculadora de excel Qubit® Calibration Factor Calculation para estimar el porcentaje de ADN templado.

4.2.6.5 Enriquecimiento

Se realizó el enriquecimiento del templado para favorecer la obtención de un mayor número de monoclonales con el sistema EZ Bead™ Enricher (Thermo Scientific, Inc, USA) y el sistema Ion PGM™ Enrichment Beads (Thermo Scientific, Inc, USA).

1.- Se preparó una solución Melt-Off como se muestra en el cuadro 5:

Cuadro 5. Mezcla de componentes de la solución Melt-Off

Componente	Volumen
Agua Tipo I, libre de nucleasas	865 µL
NaOH 1N(Sigma-Aldrich, Alemania)	125 µL
Tween solución 0.1%® (Sigma-Aldrich, Alemania)	10.0 µL
Total	1.0 mL

- 2.- Se transfirieron a un tubo LowdBind 130 μ L del reactivo Wash Solution y 50 μ L del templado y se homogenizó la mezcla con ayuda de un vórtex.
- 3.- Se adicionaron a la mezcla 13 μ L del reactivo Enrichment Beads y se homogenizó la mezcla por inversion lenta del tubo.
- 4.-Se colocó el tubo con el templado al soporte magnético DynaMagTM-2 por 2 min y se eliminó el sobrenadante.
- 5.- Se adicionaron 130 μ L del templado y se retiró el tubo del soporte magnético y se homogenizó suavemente por inversion del tubo.
- 6.- Se eliminó el sobrenadante y se dejaron 100 μ L de templado, se homogenizó el contenido del tubo y se centrifugó a 15 500 Xg durante 2 min y se descartó el sobrenadante.
7. Se adicionó la cantidad necesaria de la solución de lavado para obtener un volumen de 100 μ L.
- 8.- Se llenaron los pozos de la placa para enriquecimiento con base al orden de llenado de pozos que se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Distribución de reactivos en la placa para el enriquecimiento del templado.

Número de pozo	Reactivo
Pozo 1	100 μ L del templado
Pozo 2	30 μ L Enrichment Beads en solución de lavado
Pozo 3	300 μ L de solución de lavado
Pozo 4	300 μ L de solución de lavado
Pozo 5	300 μ L de solución de lavado
Pozo 6	Vacío.
Pozo 7	300 μ L de solución Melf-Off.
Pozo 8	Vacío.

- 9.- Se colocó una punta nueva de 200 μ L en la posición del equipo.
- 11.-Se colocó un tubo para PCR nuevo y estéril de 0.2 μ L con 10 μ L de solución de neutralización.
- 11.- Se colocó la placa de enriquecimiento en el canal del equipo y se inició el enriquecimiento.

4.2.6.6 Secuenciación

La secuenciación se realizó en el Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2 (Life Technologies, USA) con el Ion Personal Genome Machine® (PGM™) System (Life Technologies, USA) y Ion 316™ (Life Technologies, USA), para la plataforma Ion Torrent con químicas de 200 pb mediante la estrategia de Fusión primer. Se realizó un lavado del equipo, como se describe a continuación:

✓ Programa de limpieza

El Ion PGM™ Sequencing se lavó con agua 18 mΩ y una solución de hipoclorito de sodio, como se describe a continuación.

1.- Limpieza con solución clorhídrica

- a).- Se vació la solución restante de la botella de limpieza (dos botellas de 250 ml y una botella de 2 L) y enjuagó cada botella tres veces con ~100 ml de agua 18 MΩ.
- b).- Se llenó una botella de vidrio con 1 L de agua 18 MΩ y se le adicionó una Tablet™ Limpieza PGM (clorito comprimido) y se dejó que la pastilla se disolviera completamente (~10 minutos), una vez disuelto se le agregó 1 ml de NaOH 1M y se filtró la solución con un filtro de 0,22 micras. La solución de clorito se utilizó máximo dentro de 2-3 horas después de su preparación y se desechó la solución sobrante después de este tiempo.
- c).- Se oprimió Clean en la pantalla táctil y se seleccionó la casilla de verificación de limpieza con clorito.
- d). A continuación se le adicionó 250 ml de solución de clorito filtrada en una botella limpia de 250 ml.
- e).- Se enjuagó el exterior del tubo para absorber W1 y se colocó la botella en la posición W1.
- f).- Se siguieron las instrucciones de la pantalla táctil, por lo que se colocó la botella de 2L en la posición de limpieza y se vació la botella de 250 ml W2 y se colocó la botella W3 en la posición correcta y se colocaron las bandejas de depósito por debajo de los tubos zipper en las posiciones de dNTP y se pulsó Siguiente para comenzar la limpieza.
- g).- Cuando la pantalla lo solicitó se retiró la botella de limpieza W1 con la solución de clorito, se limpió el exterior de la superficie de la botella con un atomizador que contenía agua 18 MΩ, a continuación se colocó una botella de limpieza de 250 ml con 250 ml de agua 18 MΩ en la posición W1.

h).- Cuando finalizó la limpieza se retiraron todas las botellas y tubos zipper de las posiciones W1, W2, y W3. Se pulso Siguiente para volver al menú principal y se siguieron los pasos de la inicialización.

2.- Procedimiento de limpieza con agua de 18 MΩ

a).- Se eliminó la solución residual de las botellas de limpieza (2 botellas de 250 mL y 1 botella de 2 L) y se enjuagaron las botellas tres veces con aproximadamente 100 mL de agua de 18 MΩ.

b).- Se presionó en la pantalla táctil la opción Clean en el menú de lavado ION PGM™ y se seleccionó la opción de verificación de limpieza de agua de 18 MΩ.

c).- Se adicionaron 250 mL de agua de 18 MΩ a una botella de limpieza de 250 mL.

d).- Se enjuagó el exterior del zipper W1 con agua 18 MΩ.

e).- Se siguieron las instrucciones de la pantalla táctil, se colocó la botella de 2 L en la posición de limpieza y se vació la botella de 250 ml W2, se colocó la botella vacía con capacidad de 250mL en la posición W3. Se colocaron las bandejas de depósito de residuos por debajo de los tubos zipper en posiciones de dNTP, se pulso la opción siguiente para comenzar la limpieza.

f).- Se retiraron todas las botellas y zipper de las posiciones W1, W2, y W3 y se pulso siguiente para volver al menú principal y se siguieron los pasos de la inicialización.

3.- Inicializar el sistema Ion PGM™

Se realizó la inicialización del equipo PGM™ System para ajustar el pH con las soluciones W1, W2, W3 incluidas en el Ion PGM™ Sequencing 200 v2 (Life Technologies, USA), pero antes de la inicialización se retiraron las soluciones stock de dNTP del congelador y se comprobó la presión del tanque de gas de nitrógeno.

A) Preparación de la botella “Wash” 2

a).-Se enjuagó la botella de lavado 2 tres veces con 200 ml de agua 18 MΩ.

b). Se llenó la botella hasta la línea de molde, cuyo volumen es de 2 litros.

c). Se añadió toda la botella de Ion PGM™ Sequencing 200 v2 Solution W2 a la botella de lavado 2.

d). Posteriormente se agregaron 70 μL de la solución de NaOH 100 mM recién preparado (NaOH 1 M) a la botella de lavado 2.

e).- Se tapó la botella y se mezcló por inversión y se continuó con el procedimiento de inicialización.

B) Preparación las botellas “Wash” 1 y 3

a).- Se enjuagaron las botellas Wash 1 y Wash 3 tres veces con 50 ml de agua 18 MΩ.

b).- Botella de “Wash” 1: Se añadió 350 µL de solución NaOH 100 mM a la botella de lavado 1 y se tapó.

c).- Botella “Wash” 3: Se añadió 50 µL de solución Ion PGM™ Sequencing 200 v2 en la botella “Wash” 3 y se tapó la botella.

4.- Comenzar la inicialización

1. Se verificó que el chip utilizado para la limpieza del sistema de Ion PGM™ estuviera colocado correctamente y se pulso Inicializar en el menú principal.

2. Se escaneo el código de barras de la botella Solución W2 Ion PGM™ Sequencing 200 v2.

3. Se pulso Siguiente y se verificó que el chip de la limpieza, los tubos zipper, la botella de reactivo y las bandejas de depósito estuvieran en su lugar y se presionó de nuevo Siguiente.

4. El sistema verificó la presión del gas y se pulsó Siguiente.

5. Se utilizaron guantes limpios y se colocó un tubo nuevo (largo y gris) en la tapa de la posición W2.

6. Se colocó inmediatamente la botella “Wash” 2 preparada y apretó el tapón y se pulse Siguiente.

7. Se cambió los guantes y se instalaron nuevos tubos zipper (gris corto) en los casquillos de las posiciones W1 y W3.

8. Se colocaron inmediatamente las botellas preparadas de “Wash” 1 y 3 y se apretaron las tapas. A continuación se oprimió Siguiente para comenzar la inicialización que dura (~ 30 minutos).

5.- Preparación de los tubos de 50 ml de reactivos con soluciones dNTP

1. Una vez descongelados los dNTP se agitaron para mezclar, se centrifugaron y se mantuvieron en hielo.

2. Se utilizaron las etiquetas suministradas por el kit para etiquetar los cuatro nuevos tubos como dGTP, dCTP, dATP y dTTP.

3. Se utilizaron puntas y guantes nuevos y se transfirió cuidadosamente 20 µL de cada dNTP en su respectivo tubo.

6.- Conectar los tubos zipper en el lugar correspondiente

1. Al concluir el lavado se retiraron los tubos zipper usados y las bandejas de depósito de los puertos de dNTP.
2. Con el uso de guantes nuevos, se colocó un nuevo tubo (azul) para cada puerto dNTP.
3. Se fijó cada tubo de reactivo al puerto dNTP correspondiente y se ajustaron.
4. Se siguieron las indicaciones de la pantalla táctil para completar la inicialización.
5. Al final de la inicialización, el sistema Ion PGM™ midió el pH de los reactivos.
6. Se pulso Siguiente para terminar la inicialización y volver al menú principal.

7.- Verificar Chip

1. Se etiquetó un chip nuevo y se guardó el empaque de chip para escanear el código de barras.
2. Se colocó el chip en la placa de conexión a tierra del Secuenciador Ion PGM™.
3. Se oprimió ejecutar en el menú principal y se siguieron las instrucciones de la pantalla táctil.

8.- Cargar el chip 316™

Se realizó el Chip Check del chip 316™, es decir, se colocó un chip Ion 316™ en la posición del chip de PGM, se escaneó el código de barras del chip y en la pantalla se seleccionó la opción de Chip Check, una vez terminado se procedió al cargado de chip. El proceso se detalla a continuación:

a).- Remover el líquido del chip

1. Se inclinó el chip 45 grados de manera que el puerto de carga quede hacia abajo.
2. Se insertó la punta de la pipeta firmemente en el puerto de carga y se eliminó la mayor cantidad de líquido posible.
3. Se colocó el chip al revés en el adaptador de centrífuga y se transfirió a la Mini centrífuga con la pestaña del chip hacia el centro de la mini centrífuga.
4. Se centrifugó durante 5 segundos para vaciar completamente el chip, se retiró el chip de la base y se limpió cualquier líquido en la base.

b).- Cargar la muestra en el chip.

1. Se colocó el chip nuevo en la base sobre una superficie plana y estable.

2. Después de la incubación de la polimerasa, se tomó la muestra aproximadamente 30 μL con la micropipeta Rainin[®] SR-L200F y se insertó firmemente la punta en el puerto de carga de chip.
3. Posteriormente se colocó hacia abajo para agregar con la pipeta suavemente y poco a poco la solución ISP a una velocidad de $\sim 1 \mu\text{L}$ por segundo para evitar la formación de burbujas.
4. Se retiró y desechó los líquidos.
5. Se transfirió el chip a la base de la Mini centrifuga.
6. Se centrifugó durante 30 segundos y mezcló la muestra en el chip para lo cual se ajustó el volumen de la pipeta a 30 μL , se inclinó el chip a 45 grados para que el puerto de carga quede hacia abajo e insertó la punta de la pipeta en el puerto de carga y sin retirar la punta se pipeteo la muestra lentamente dentro y fuera del chip tres veces. Figura 4.

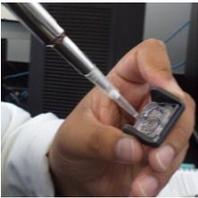


Figura 4. Inclinación de la pipeta aproximadamente a 45 grados para el cargado del chip.

7. Se centrifugó el chip durante 30 segundos con la pestaña de chip hacia el centro de la mini centrifuga.
8. Se repitió el paso 7 una vez más y se giró durante 30 segundos con la pestaña del chip hacia afuera.
9. Se inclinó el chip a un ángulo de 45 grados y se quitó lentamente el líquido posible.
10. Se eliminó el líquido sobrante mediante centrifugación durante 5 segundos.
12. Inmediatamente se procedió a planificar la corrida y se ejecutó.

9.- Seleccionar la Planificación de la corrida y llevar a cabo la ejecución

La secuenciación de las bibliotecas de amplificación se realizaron en el Ion Torrent[™] Personal Genome Machine[®] (PGM) (Life Technologies, Invitrogen[™]) con el sistema Ion PGM[™] Sequencing 200 v2 (Life Technologies, Invitrogen[™]) con la química de 200pb.

1. Se pulso el botón Examinar situado junto al campo de ejecutar planeación y se seleccionó el nombre del plan creado y se pulso Siguiente.

2. Los parámetros para la serie se rellenaron automáticamente en función de la planificación de la ejecución.

10.- Comenzar la secuenciación

1. Después de realizar la Planificación de la corrida se pulsó Siguiente para verificar la configuración experimental.

2. Se colocó el chip y se pulso Siguiente.

3. Cuando se completó la calibración (~ 1 minuto), la pantalla táctil indico si la calibración se había realizado correctamente.

4. Después de 90 segundos, la corrida se inició automáticamente.

5. Cuando la corrida se completó, la pantalla táctil volvió a la del menú principal. Una vez termina la corrida de secuenciación y se procedió al lavado del ION PGM™.

11.- Análisis secundario de datos en el Ion Torrent Reporter.

Al concluir el proceso de secuenciación se realizó el análisis primario generado por Ion Browser Server para conocer el rendimiento del proceso de secuenciación. Con los datos generados en el Ion Torrent, se exportaron los archivos *.bam para su análisis mediante herramientas bioinformáticas para determinar la diversidad alfa mediante los programas el programa Galaxy, MG-RAST y EstimateS.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Extracción de ADN

Se realizaron tres colectas de muestras de suelo rizosférico de los ecosistemas de encino, oyamel y pino en los meses de julio, septiembre y noviembre (Cuadro 7), los dos primeros meses corresponden al periodo de lluvia y el último a la temporada seca.

Cuadro 7. Información general de los diferentes muestreos durante el experimento.

Fecha de colecta	Método de extracción	Etiqueta	Cantidad de suelo (g)
14 de Julio		E1a	0.2
14 de Julio		E1b	0.2
14 de Julio		O1a	0.2
14 de Julio		O1b	0.2
14 de Septiembre	DNA mini-preps kit	E2b	0.2
14 de Septiembre	Spin® Column soil	O2a	0.2
14 de Septiembre	BIOBASIC INC.)	O2b	0.2
21 de Noviembre		E3a	0.2
21 de Noviembre		E3b	0.2
21 de Noviembre		O3a	0.2
21 de Noviembre		O3b	0.2

O: Oyamel; E: Encino; 1, 2,3: número de muestreo; a (Sitio sin desplazamiento); b (Sitio desplazado).

El DNA metagenómico se utilizó para la construcción de las bibliotecas metagenómicas de la estrategia de “Fusión primer” para la plataforma de secuenciación masiva en paralelo Ion Torrent®. Se construyeron dos templados con una mezcla de las muestras que fueron marcadas con códigos de barras y se realizó el proceso de secuenciación y se obtuvieron los resultados del análisis primario y secundario para los dos chips 316™.

4.3.2 Análisis de la diversidad bacteriana

4.3.2.1 Análisis primario

El análisis primario indicó que la carga del chip (1) 316™ fue del 82% de los pozos, se obtuvieron 5 165 671 lecturas (secuencias) con una longitud entre los 180 pb y 200 pb, del total de secuencias se hizo un filtro de calidad de secuencias y quedaron 3 220 687 lecturas que cumplieron con los criterios de calidad establecidos para el llamado de bases y FastQC (figura 6; A, B y C). En el caso de la carga del chip (2) 316™ fue del 84% de los pozos, se

obtuvieron 5 333 613 lecturas (secuencias) con una longitud entre los 100 pb y 230 pb, del total de secuencias se hizo un filtro de calidad de secuencias y quedaron 2 285 303 lecturas que cumplieron con los criterios de calidad establecidos para el llamado de bases y FastQC (Figura 5; D, E y F).

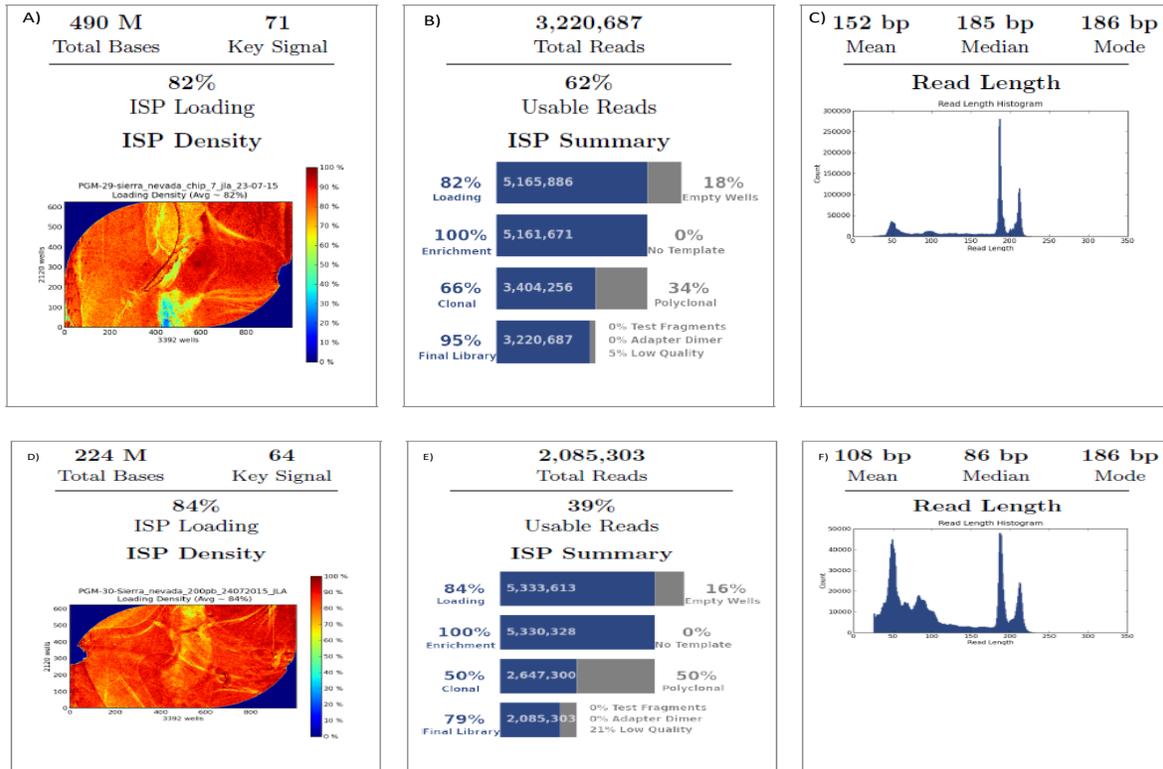


Figura 5. Análisis de calidad de la secuenciación de muestras de ecosistemas forestales. Chip1: A, B y C. Chip 2: D, E y F. A y D imágenes del área cargada del chip que muestra buena calidad de cargado de acuerdo a la escala colorimétrica de azul (área vacía) a roja (zona de llenado total). B y E es el resultado del número de secuencias obtenidas en la corrida del número de secuencias totales hasta el total de secuencias útiles para análisis secundario. C y F: representación gráfica de la longitud en pares de bases de las secuencias obtenidas.

Se descargaron los archivos *.bam generados por el Ion Browser Server con base a los parámetros establecidos por el fabricante. Los archivos *.bam fueron transformados a archivos *.fastaq con el programa Galaxy (Giarde *et al.*, 2005; Blankenberg *et al.*, 2010; Goecks *et al.*, 2010) que se emplearon para realizar los análisis de diversidad en la plataforma MG-RAST (Wilke *et al.*, 2015), con las muestras ingresadas en la plataforma se realizaron los análisis con las herramientas bioinformáticas para determinar diversidad alfa; se analizaron 10 muestras. Los parámetros utilizados para hacer las comparaciones y asignación

de identidades fueron con el banco de secuencias del Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov>) con un valor de E máximo de $1e^{-5}$ y un mínimo de porcentaje de identidad del 60 % con 45 nucleótidos de cobertura mínima.

4.3.2.2 Análisis secundario

Los resultados del análisis de diversidad con las herramientas de la plataforma Ion Reporter™ permitieron obtener lecturas confiables de los 2 chips utilizados. Los resultados se muestran a continuación:

A) ENCINO

En el muestreo inicial (E1) se observaron seis phyla donde los más representativos fueron Actinobacteria con 45 %, Proteobacteria con 31 % y Bacteroidetes con 10 %, y se encontraron 17 familias las más prevalentes fueron Bradyrhizobiaceae con 10 %, Thermomonosporaceae con 6 % y Pseudonocardiaceae con 3 % y *Bdellovibrionaceae*, *Cytophagaceae*, *Micromonosporaceae* y *Nitrospiraceae* con menos del 1 % fueron específicas para esta muestra (Figura 6).

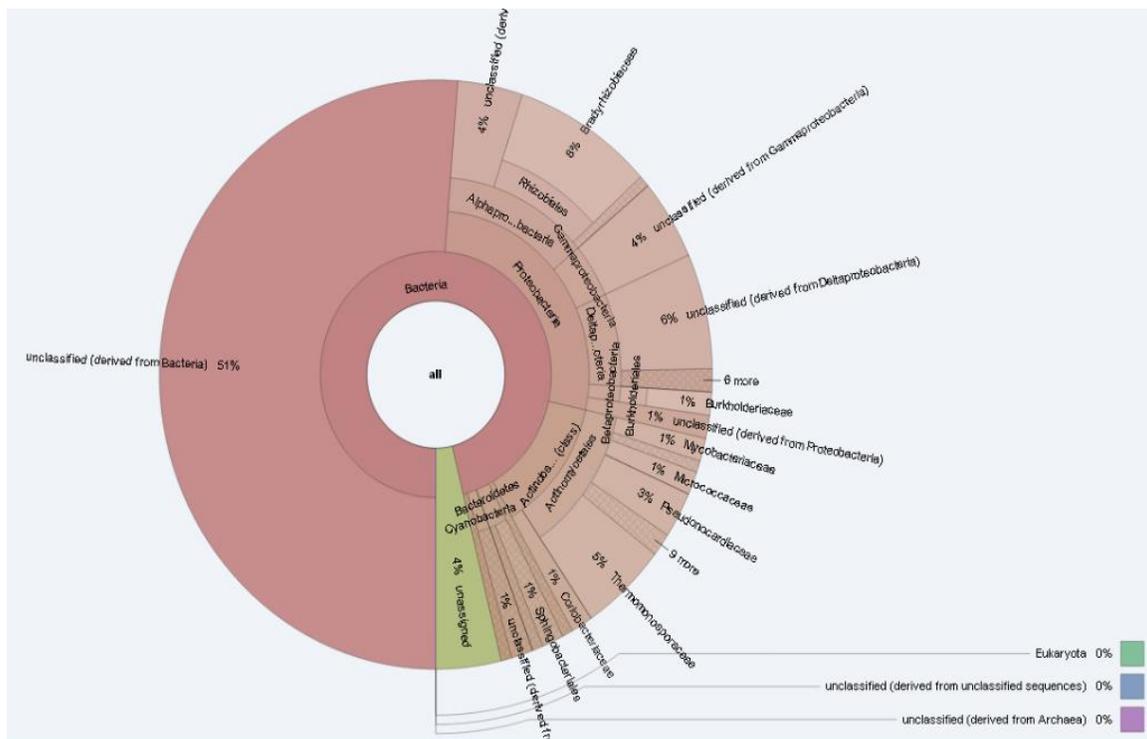


Figura 6. Composición de las comunidades bacterianas de encino, muestreo inicial (E1). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phyla Proteobacteria Actinobacteria y Bacteroidetes, y en color café las familias presentes, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.

En la muestra de los bloques de suelo sin movimiento del segundo muestreo (E2a) se encontraron siete phyla de los cuales los más representativos fueron Actinobacteria con 50 %, Proteobacteria con 30 %, Bacteroidetes con 4 % y Verrucomicrobia con 4% y se encontraron 18 familias de las cuales la más prevalentes fueron *Thermoleophilaceae* con 10 % *Pseudonocardiaceae* 7 % y *Bradyrhizobiaceae* con 6 % y la familia *Rhizobiaceae* con 0.5% fue específica de esta muestra (Figura 7).

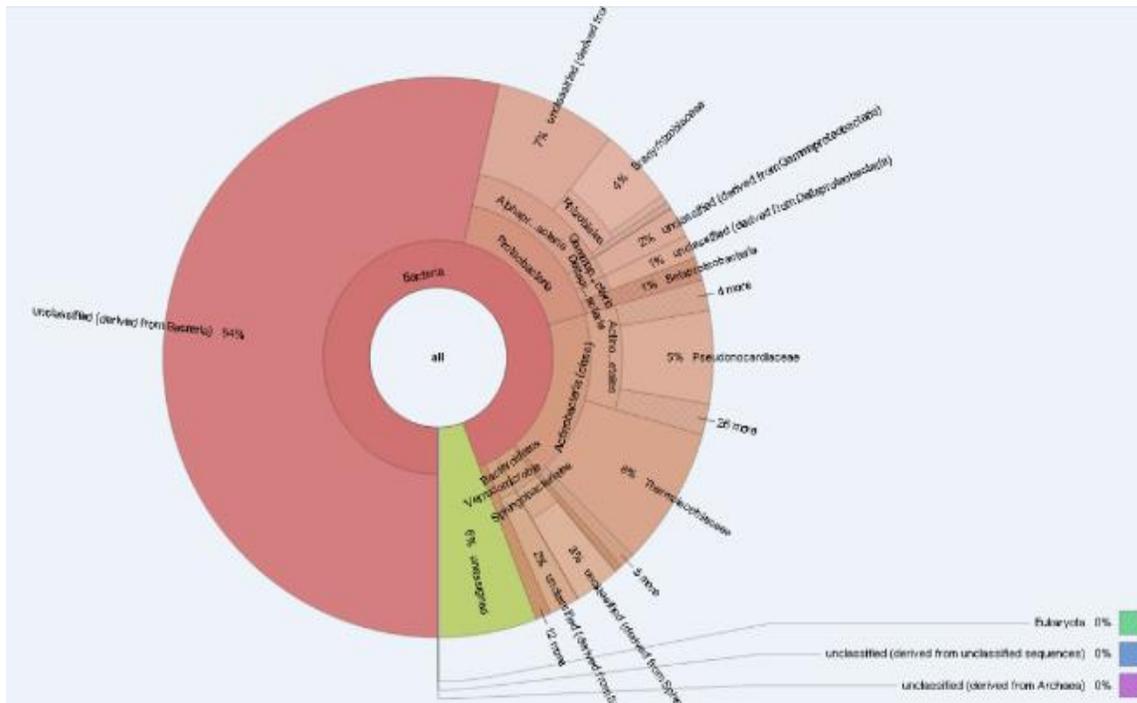


Figura 7. Composición de las comunidades bacterianas de encino del bloque de suelo sin movimiento, del segundo muestreo (E2a). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia y en color rojo las familias presentes, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.

En la muestra de los bloques de suelo desplazado, del segundo muestreo (E2b) se observaron siete phyla los más representativos fueron Actinobacteria con 40 %, Proteobacteria con 27 %, Bacteroidetes con 12 %. Se detectaron 24 familias las más prevalentes fueron Nocardiaceae con 3 %, *Nocardioideae* con 2 %, y las familias *Propionibacteriaceae* y *Tsukamurellaceae* ambas con 1.3 % fueron exclusivas de esta muestra (Figura 8).

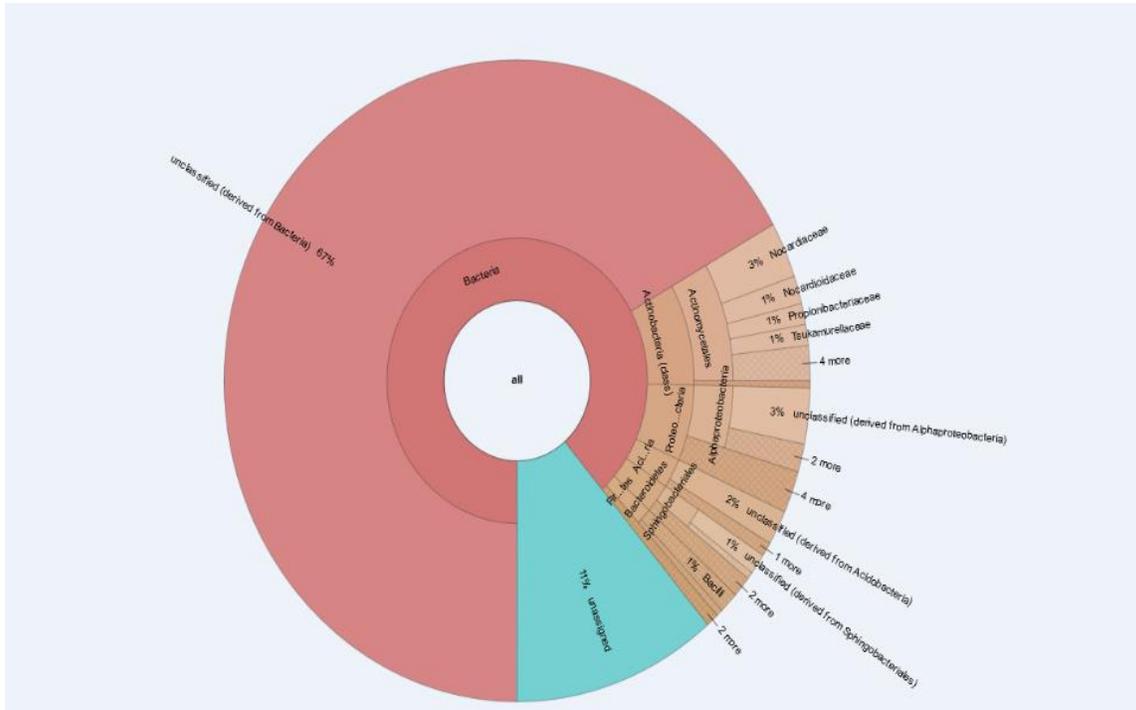


Figura 8. Composición de las comunidades bacterianas de encino de los bloques del suelo desplazado, del segundo muestreo (E2b). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y en color café las familias incluidas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.

En la muestra de los bloques de suelo sin movimiento, del tercer muestreo (E3a) se detectaron seis phyla de los cuales Proteobacteria con 38 % y Actinobacteria con 31 % fueron los más abundantes. Se encontraron diez familias donde las más prevalentes fueron *Thermoleophilaceae* con 8 % y *Bradyrhizobiaceae* con 5 %, y la familia *Holosporaceae* con 3 % fue específica de esta muestra (Figura 9).

En la muestra E3b de los bloques de suelo desplazados se encontraron dos phyla (Bacteroidetes con 67 % y Firmicutes con 33 %); se detectaron tres las familias: *Paenibacillaceae*, *Prevotellaceae* y *Sphingobacteriaceae* con 8 % de prevalencia cada una (Figura 10).

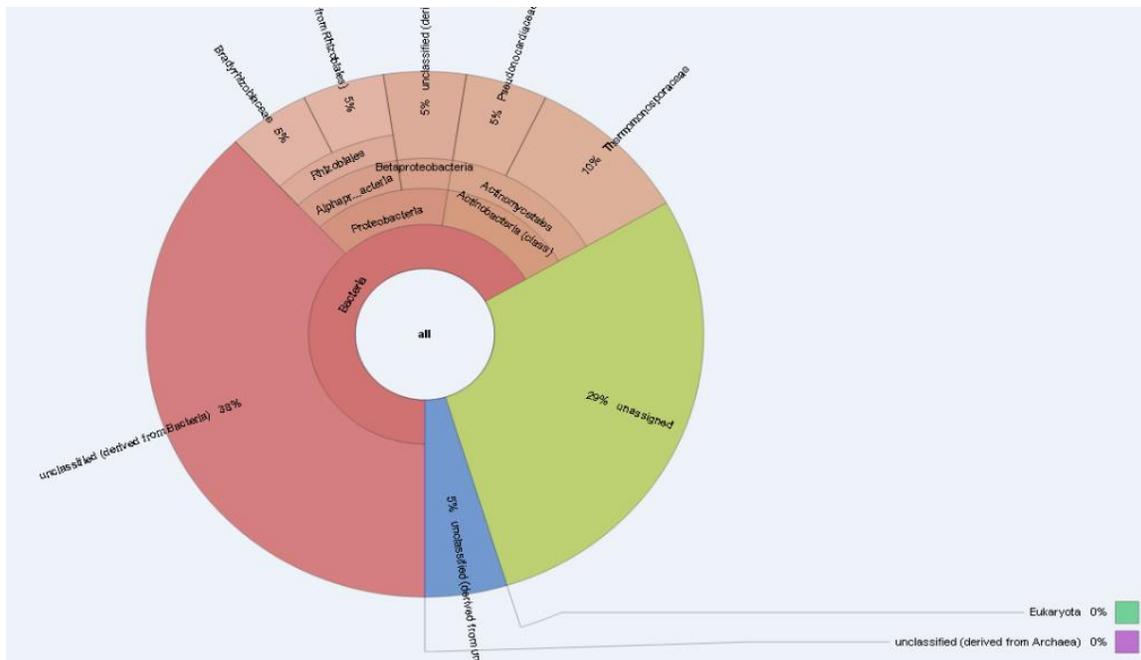


Figura 9. Composición de las comunidades bacterianas de encino del bloque de suelo sin movimiento, del tercer muestreo (E3a). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phyla Actinobacteria y Proteobacteria y de color café las familias detectadas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.

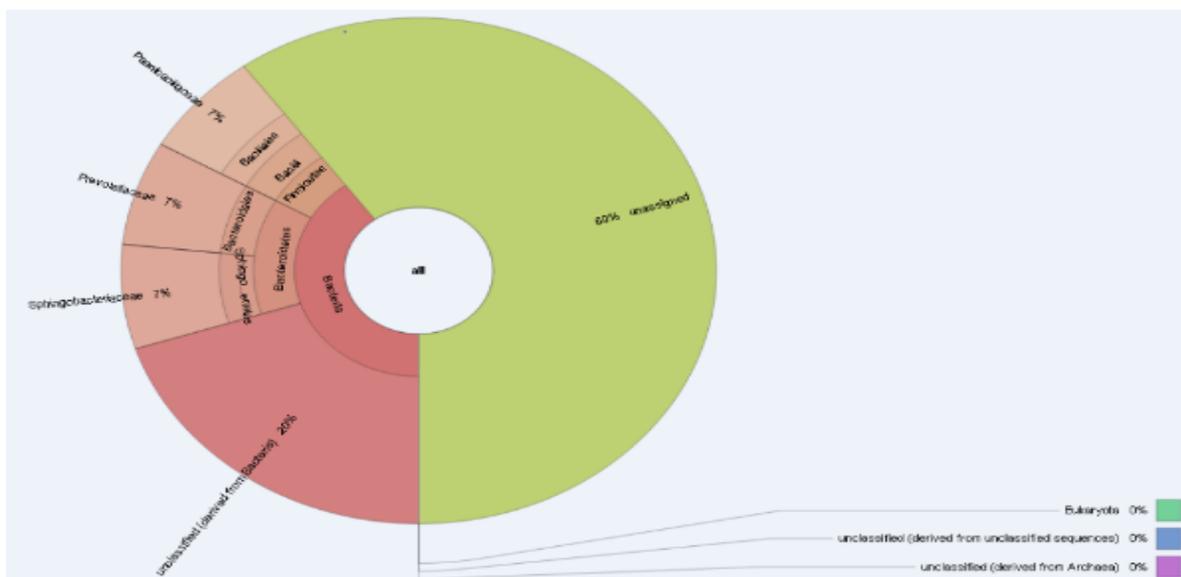


Figura 10. Composición de las comunidades bacterianas de encino del bloque de suelo con desplazamiento, del tercer muestreo (E3b). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phyla Bacteroidetes y Firmicutes y de color café las familias encontradas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.

El número máximo de phyla durante el experimento fue siete, esto sucedió en el segundo muestreo, y al final del experimento el número de phyla se redujo a dos en bloques desplazados y se mantuvo en seis en los bloques sin movimiento. Los phyla más abundantes a lo largo del experimento fueron Actinobacteria, Proteobacteria y bacteroidetes que son los indicadores de cambio a lo largo del experimento (Figura 12). Al inicio del experimento (primer muestreo) actinobacteria presentó una prevalencia de 45 %, el cual se incrementó en el segundo muestreo en bloques sin movimiento a 50 % y en bloques desplazados disminuyó a 40 %; En el tercer muestreo en bloques sin movimiento actinobacteria disminuyó a 31 % y en bloques desplazados no se detectó. En el caso de proteobacteria, en el muestreo inicial, este phylum estuvo representado con un 31 % de los OTUs identificados y en el segundo muestreo se mantuvo en 30 % en los bloques sin movimiento y en 27 % en los bloques desplazados. En el tercer muestreo en bloques sin movimiento proteobacteria aumentó a 38 %, pero en bloques desplazados no se detectó (Cuadro 8 y figura 11).

Respecto a familias en el muestreo inicial se observaron 17 familias; en el segundo muestreo en bloques sin movimiento fue similar respecto al primero con 18 familias, pero en bloques desplazados aumento a 24 familias sin embargo, en el tercer muestreo disminuyeron tanto en bloques sin movimiento y bloques desplazados en 10 y 3 familias respectivamente (Cuadro 8 y figura 13).

Cuadro 8. Diversidad bacteriana de los suelos forestales del ecosistema de encino.

Muestra	Dominio	Phyla	Familia	Género
E1	Bacteria	6	17	23
E2a	Bacteria	7	18	21
E2b	Bacteria	7	24	27
E3a	Bacteria	6	10	9
E3b	Bacteria	2	3	3

E1a: Muestreo inicial; E2a: Segundo muestreo bloques de suelo sin movimiento; E2b: Segundo muestreo de bloques de suelo desplazados; E3a: Tercer muestreo de bloques de suelo sin movimiento; E3b: Tercer muestreo de los bloques de suelo desplazados.

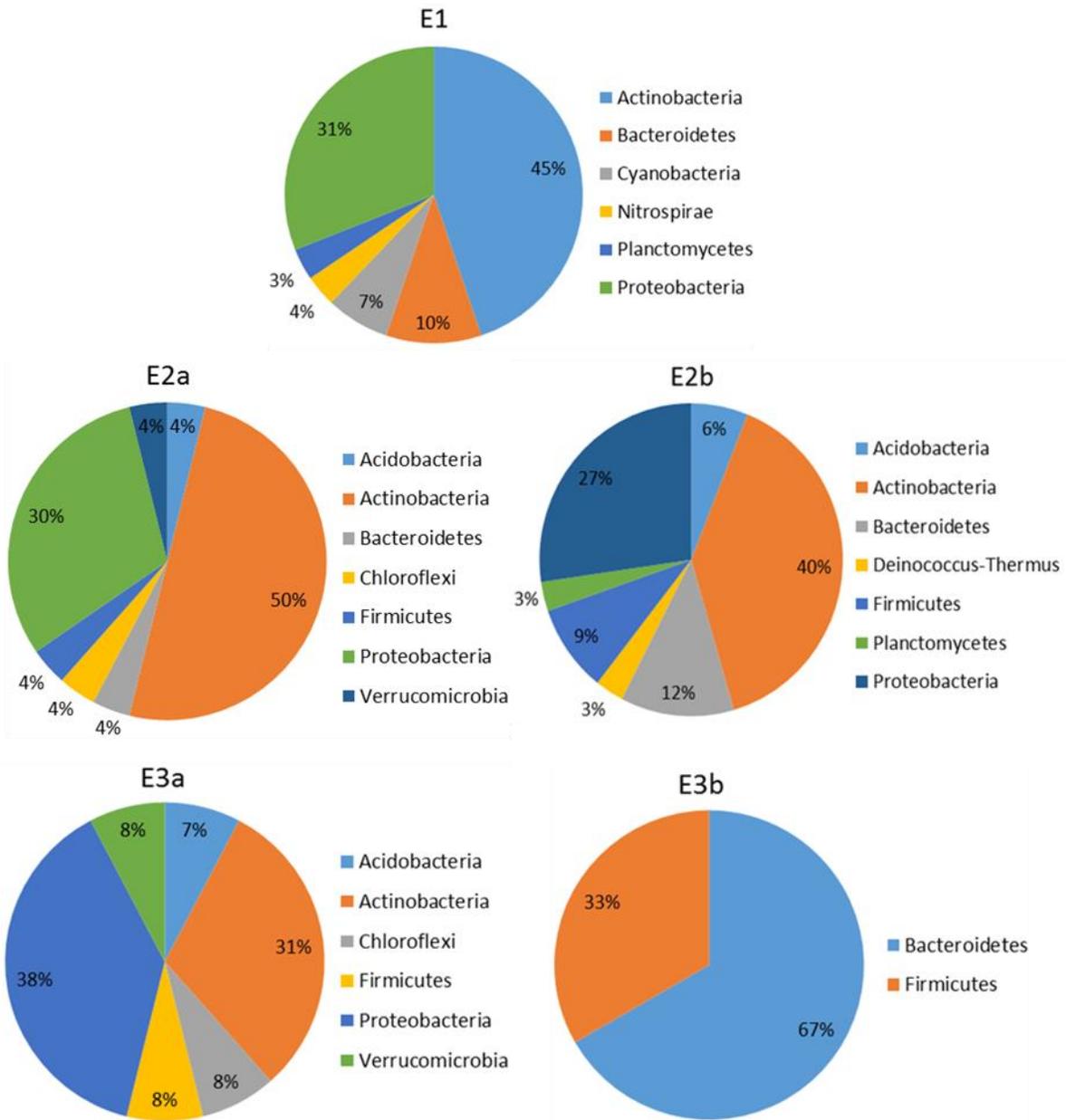


Figura 11. Diversidad a nivel de Phylum en el ecosistema de encino. E1: Muestreo inicial; E2a: Segundo muestreo de bloques de suelo sin movimiento; E2b: Segundo muestreo de bloques de suelo desplazados; E3a: Tercer muestreo de bloques de suelo sin movimiento; E3b: Tercer muestreo de los bloques de suelo desplazados.

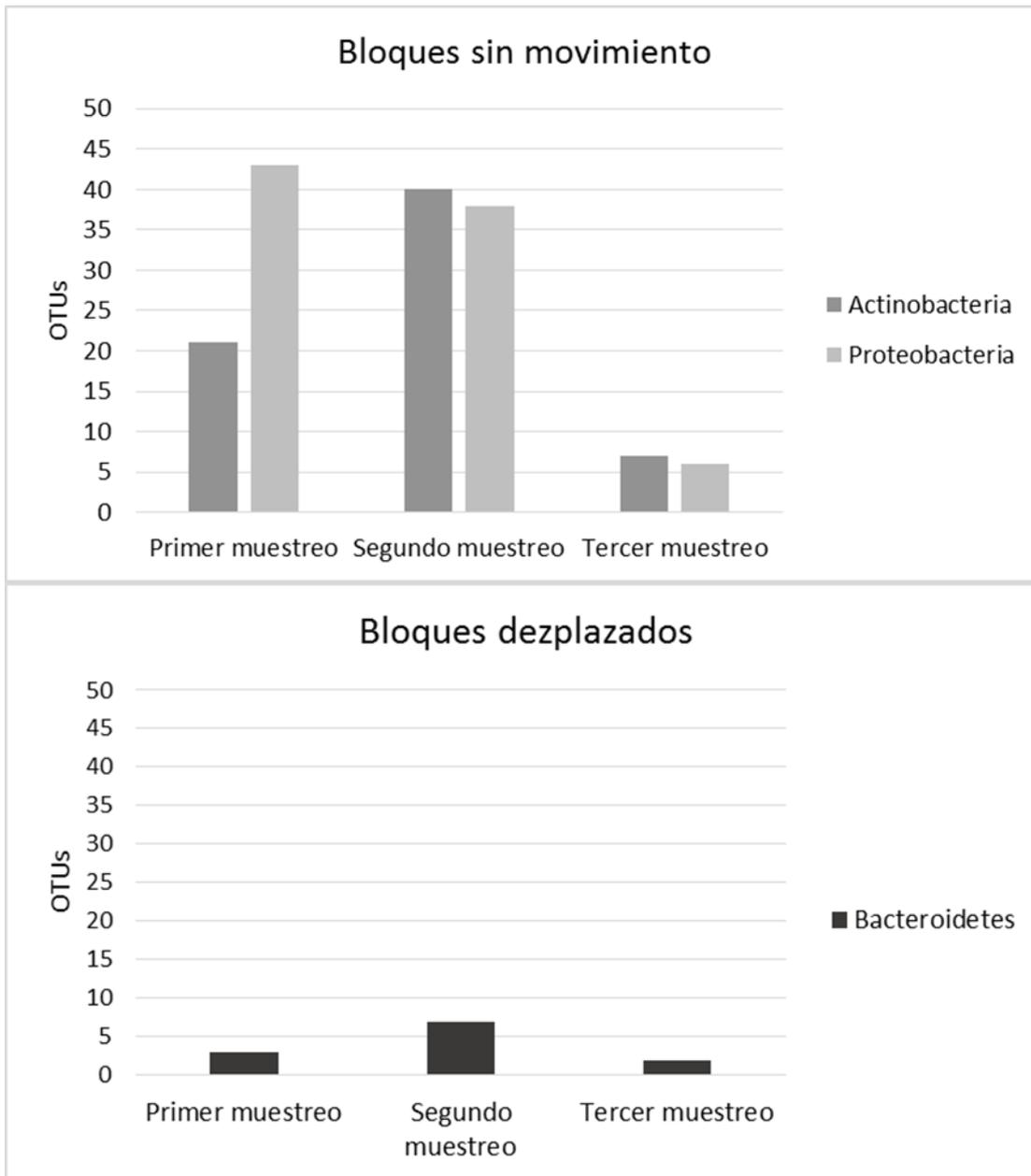


Figura 12. Tendencia de los phyla en bloques sin movimiento y bloques desplazados en el ecosistema de encino.

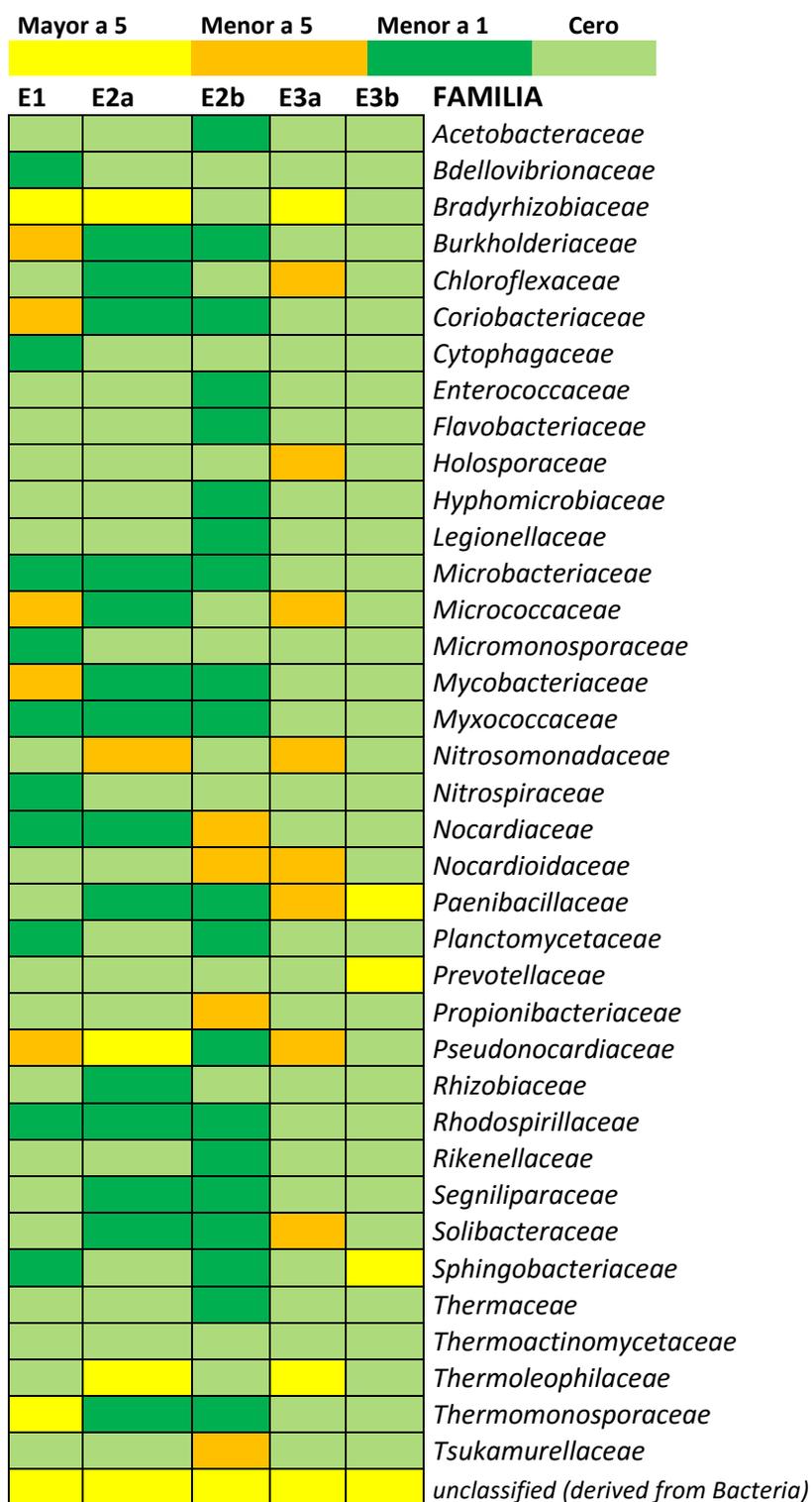


Figura 13. Diversidad a nivel de familia en el ecosistema de encino. Escala de color representa la abundancia relativa de familias. E1a: Muestreo inicial; E2a: Segundo muestreo de bloques de suelo sin movimiento; E2b: Segundo muestreo de bloques de suelo desplazados; E3a: Tercer muestreo de bloques de suelo sin movimiento; E3b: Tercer muestreo de los bloques de suelo desplazados.

Se construyó una curva de rarefacción con las cinco muestras obtenidas del ecosistema de encino, se observa que las muestras E1a y E2b presentaron una pendiente mayor (Figura 14-1) y la muestra que presentó mayor diversidad fue E1 con 9.6 que corresponde al primer muestreo. En las muestras de los bloques no desplazados la diversidad alfa disminuye con respecto al número de muestreo, donde la menor diversidad se obtuvo en el último muestreo, esta tendencia fue similar en los bloques desplazados. Los bloques de suelo sin desplazamiento con respecto a los bloques de suelo desplazados del 2do muestreo fueron similares, sin embargo en el caso del tercer muestreo se observa una disminución de la diversidad de bloque desplazado se redujo casi a la mitad respecto al bloque sin desplazamiento (Figura 14-b).

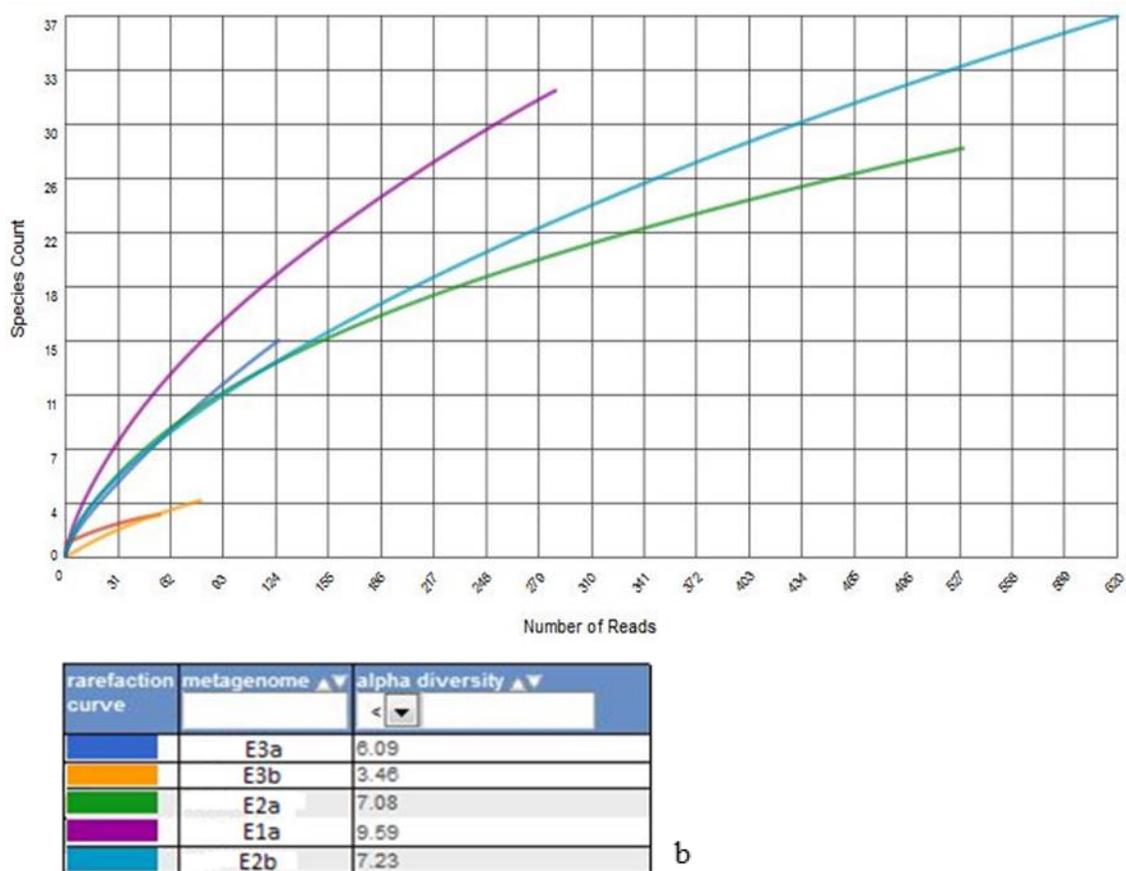


Figura 14. Curva de rarefacción (a) e índice de diversidad alfa (b) de diversidad bacteriana de la rizósfera del ecosistema de Encino. El índice de diversidad alfa fue estimado en MG-RAST con el índice de Shannon considerando el número de especies anotadas en las bases de datos (Ponce- Soto y De Anda, 2013).

B) OYAMEL

De acuerdo a los resultados del Ion Reporter™, en el muestreo inicial O1 se detectaron seis phyla y los más abundantes fueron Proteobacteria con 26 % y Actinobacteria con 13 %. Se detectaron 9 familias y las más prevalentes *Bradyrhizobiaceae* con 9 %, *Nitrosomonadaceae* con 9 % y *Nocardiaceae* con 8 %, y las familias *Frankiaceae*, *Gordoniaceae*, *Lactobacillaceae* y *Rhodocyclaceae* con baja prevalencia fueron específicas para esta muestra. (Figura 15).

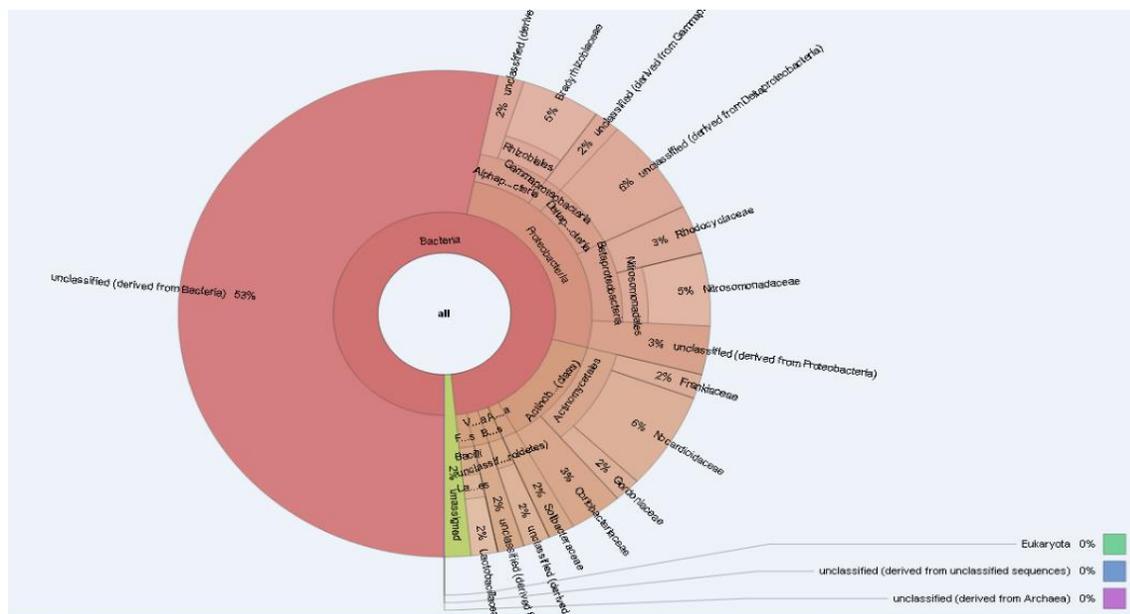


Figura 15. Composición de las comunidades bacterianas de oyamel del primer muestreo (O1). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phylum Actinobacteria y Proteobacteria y de color café las familias detectadas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.

En el caso de la muestra O2a se encontraron cinco grupos los más abundantes fueron Actinobacteria con 8 %, Proteobacteria con 6 % y Bacteroidetes con 6 %. Se detectaron cinco familias *Geobacteraceae*, *Nitrospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Sphingobacteriaceae* y *Thermomonosporaceae* cada una con 3 % de prevalencia, de las cuales *Geobacteraceae*, *Prevotellaceae* y *Sphingobacteriaceae* fueron específicas para esta muestra (Figura 16). En la muestra O2b se encontraron cuatro phyla los más abundantes fueron Proteobacteria con 11 %, Actinobacteria con 11 % y Bacteroidetes con 4 %. Se observaron cinco familias y las prevalentes fueron *Nocardioidaceae* con 7 % y *Segniliparaceae* con 5 % las cuales fueron específicas para esta muestra (Figura 17).

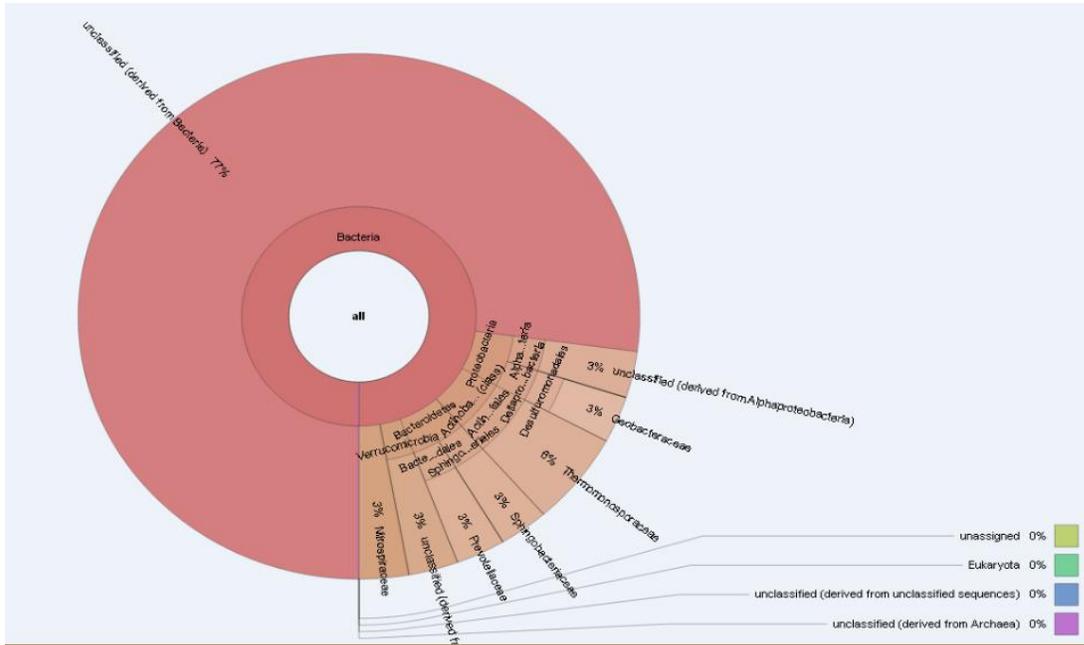


Figura 16. Composición de las comunidades bacterianas de oyamel de los bloques de suelo sin movimiento, del segundo muestreo (O2a). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phylum Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes y Verrucromicrobia y de color café las familias detectadas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.

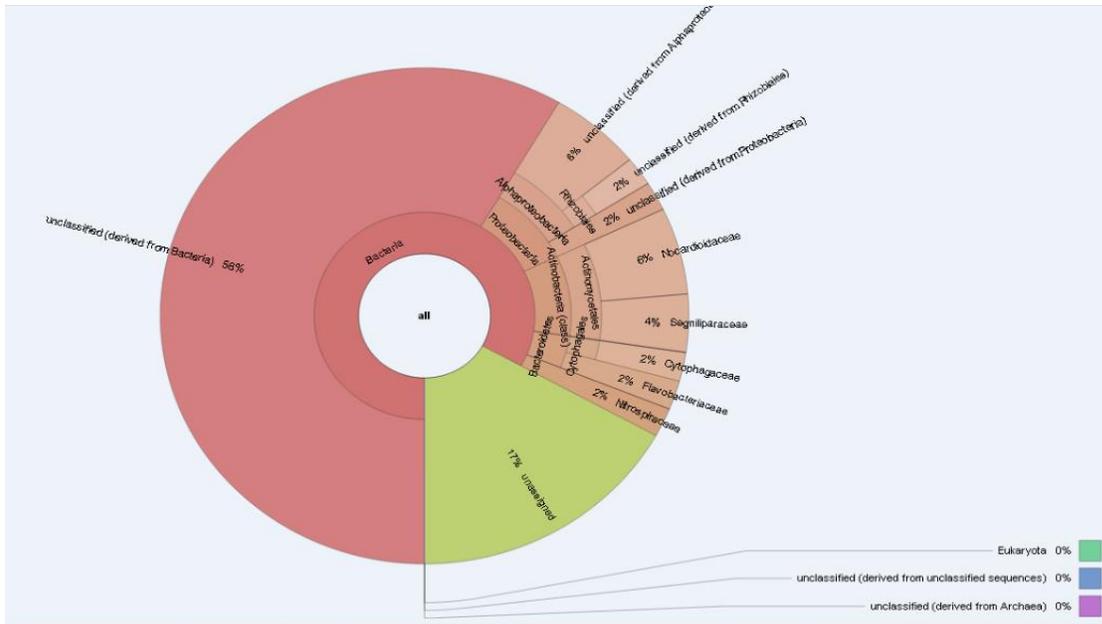


Figura 17. Composición de las comunidades bacterianas de oyamel de los bloques de suelo desplazados, del segundo muestreo (O2b). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phylum Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria y de color café las familias detectadas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.

En la muestra O3a se encontraron dos phylum Actinobacteria con 22 % y Proteobacteria con 21 %, se encontraron tres familias *Thermomonosporaceae* con 16 %, *Bradyrhizobiaceae* con 8 % y *Pseudonocardiaceae* con 8 %, la familia *Pseudonocardiaceae* sólo se encontró en esta muestra (Figura 18).

En la muestra O3b se observaron seis phylum, los más abundantes fueron Proteobacteria con 26 % y Bacteroidetes con 4 %. En O3b se detectaron siete familias donde las más abundantes fueron *Bradyrhizobiaceae* con 16 % y *Nitrospiraceae* con 6 %, sólo en esta muestra se detectó la familia *Rikenellaceae* con 2 % (Figura 19).

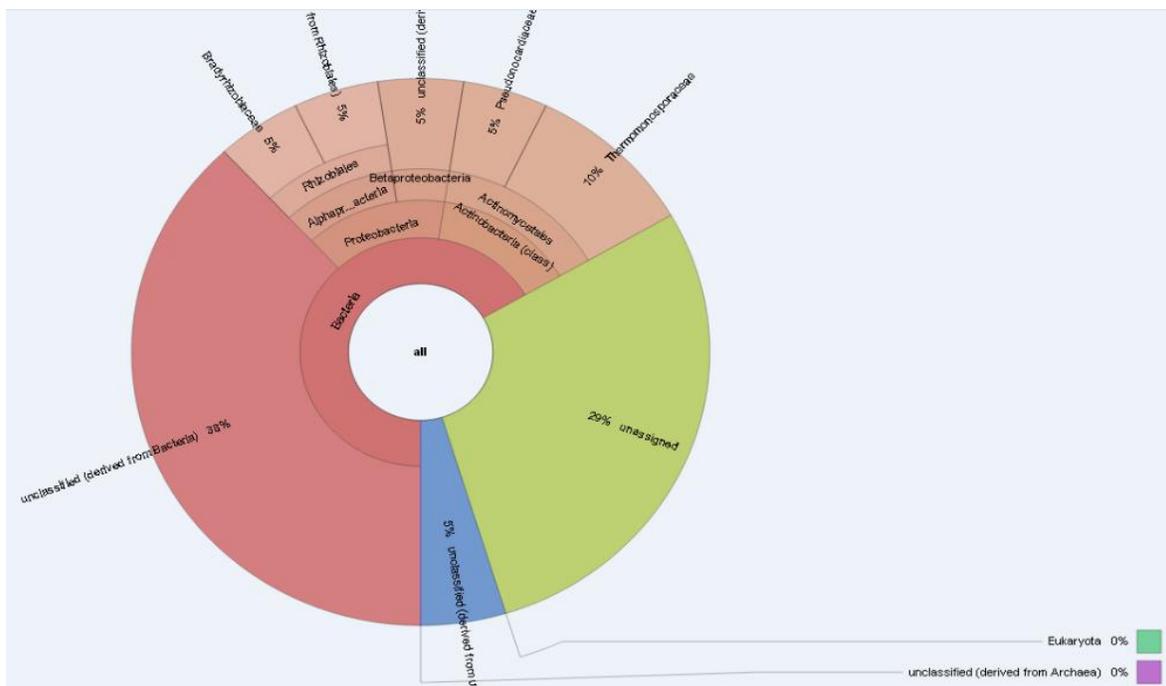


Figura 18. Composición de las comunidades bacterianas de oyamel de los bloques de suelo sin movimiento, del tercer muestreo (O3a). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phylum Proteobacteria y Actinobacteria, y de color café las familias encontradas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.

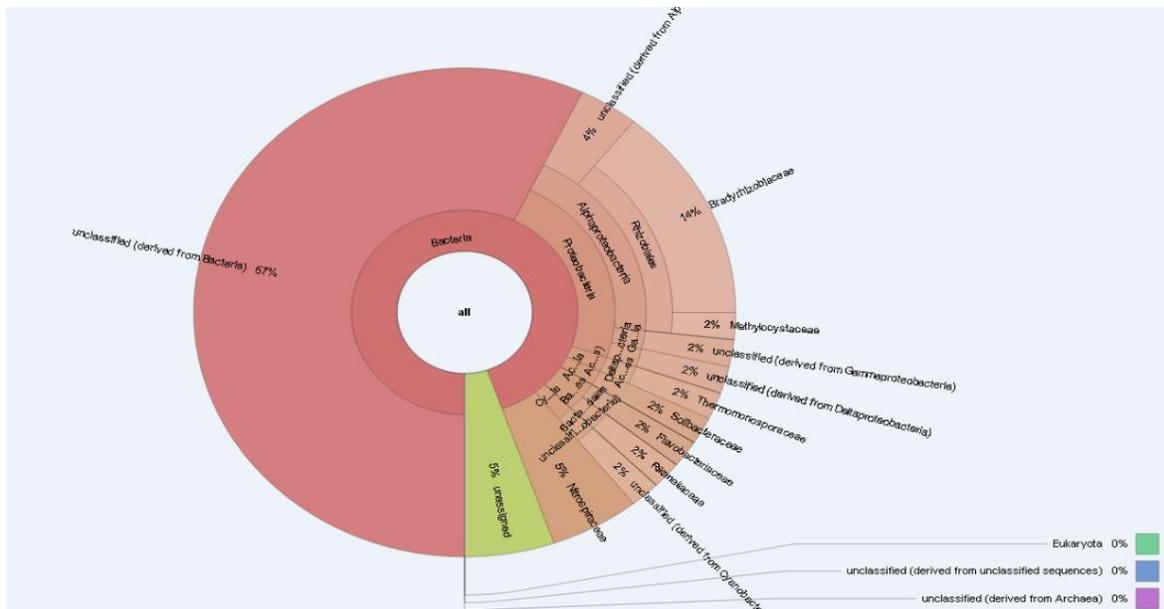


Figura 19. Composición de las comunidades bacteriana de oyamel de los bloques de suelo con desplazamiento, del tercer muestreo (O3b). En color rojo se observa el dominio Bacteria y en color rosa los phylum Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Nitrospirae, y de color café las familias encontradas, se obtuvieron por la identidad taxonómica vinculada al contenido del gen funcional mediante un análisis de MG-RAST.

En el ecosistema de oyamel los phyla más abundantes tanto en bloques de suelo sin movimiento como bloques desplazados fueron proteobacteria, actinobacteria y bacteroidetes; en bloques sin movimiento proteobacteria estuvo presente durante todo el experimento y en bloques desplazados los phyla proteobacteria y bacteroidetes estuvo presente en los tres muestres (Cuadro 9 y figura 20).

El número de phyla en los sitios no desplazados del primer al segundo muestreo fue similar con 6 y 5 respectivamente, sólo se diferencian por la presencia de Firmicutes en el segundo muestreo, y en el tercer muestreo hubo una disminución a más de la mitad. En los sitios con movimiento se observó una disminución del primer al segundo muestreo, pero en el tercero hubo un incremento, además sólo en el segundo muestreo de suelo desplazado se observó el phylum Nitrospirae. En las muestras de los sitios desplazados y en los sitios sin movimiento los phylum más abundantes fueron proteobacteria con 16 %, bacteroidetes con 14 %, actinobacteria con 12 % (Cuadro 9 y figura 21). Respecto a familias en sitios sin movimiento se observó una disminución del primer al segundo muestreo en una proporción 9 y 5 respectivamente, y en el tercer muestreo disminuyó casi a la mitad respecto al segundo. Los

sitios desplazados mostraron una disminución del primer al segundo muestreo pero aumento en el tercero (Cuadro 9 y figura 22).

Cuadro 9. Tabla de diversidad bacteriana de los suelos forestales del ecosistema de oyamel.

Muestra	Dominio	Phylum	Familia	Género
O1	Bacteria	6	9	10
O2a	Bacteria	5	5	6
O2b	Bacteria	4	5	5
O3a	Bacteria	2	3	3
O3b	Bacteria	6	7	6

O1: Muestreo inicial; O2a: Segundo muestreo bloques de suelo sin movimiento; O2b: Segundo muestreo de bloques de suelo desplazados; O3a: Tercer muestreo de bloques de suelo sin movimiento; O3b: Tercer muestreo de los bloques de suelo desplazados.

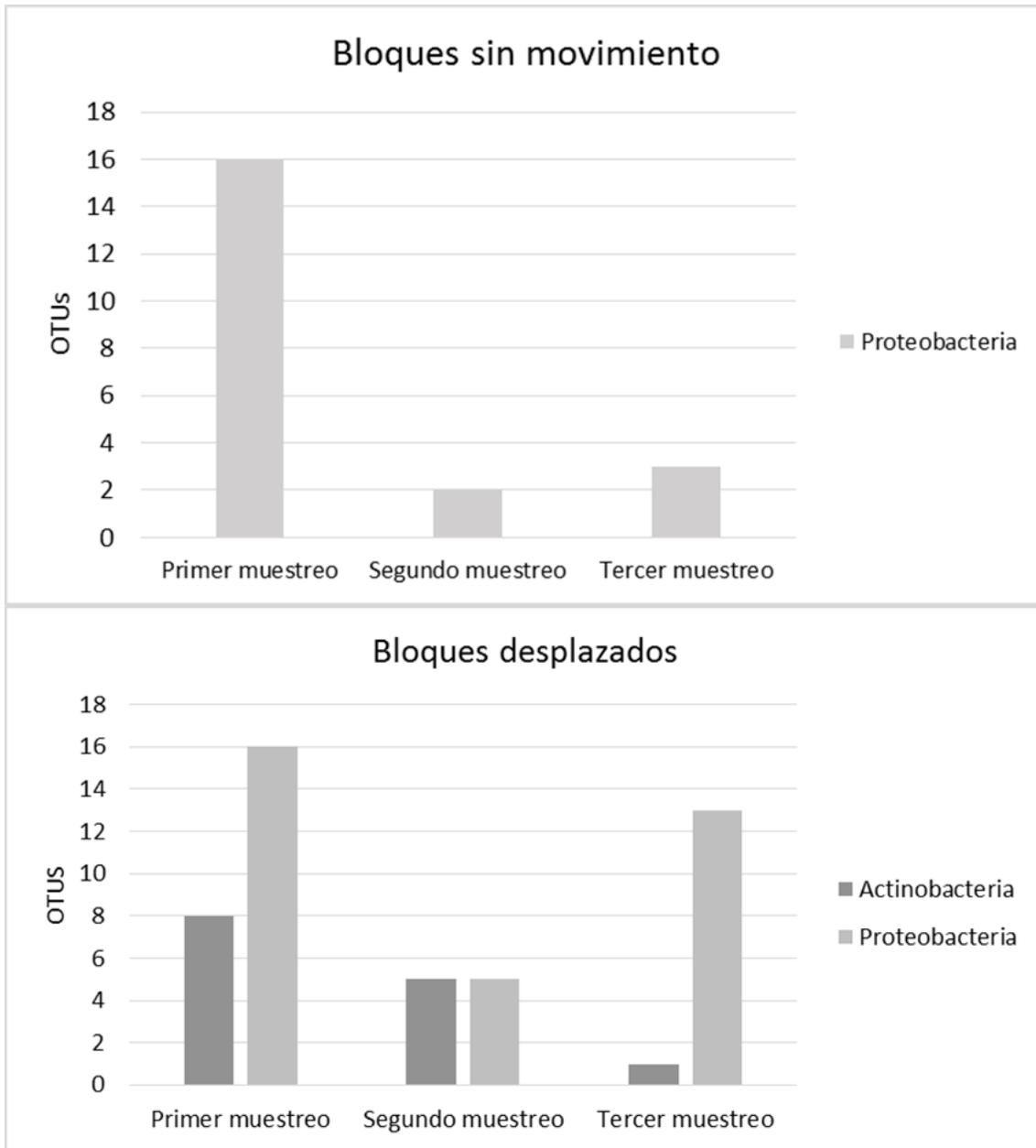


Figura 20. Tendencia de los phyla en bloques sin movimiento y bloques desplazados en el ecosistema de oyamel.

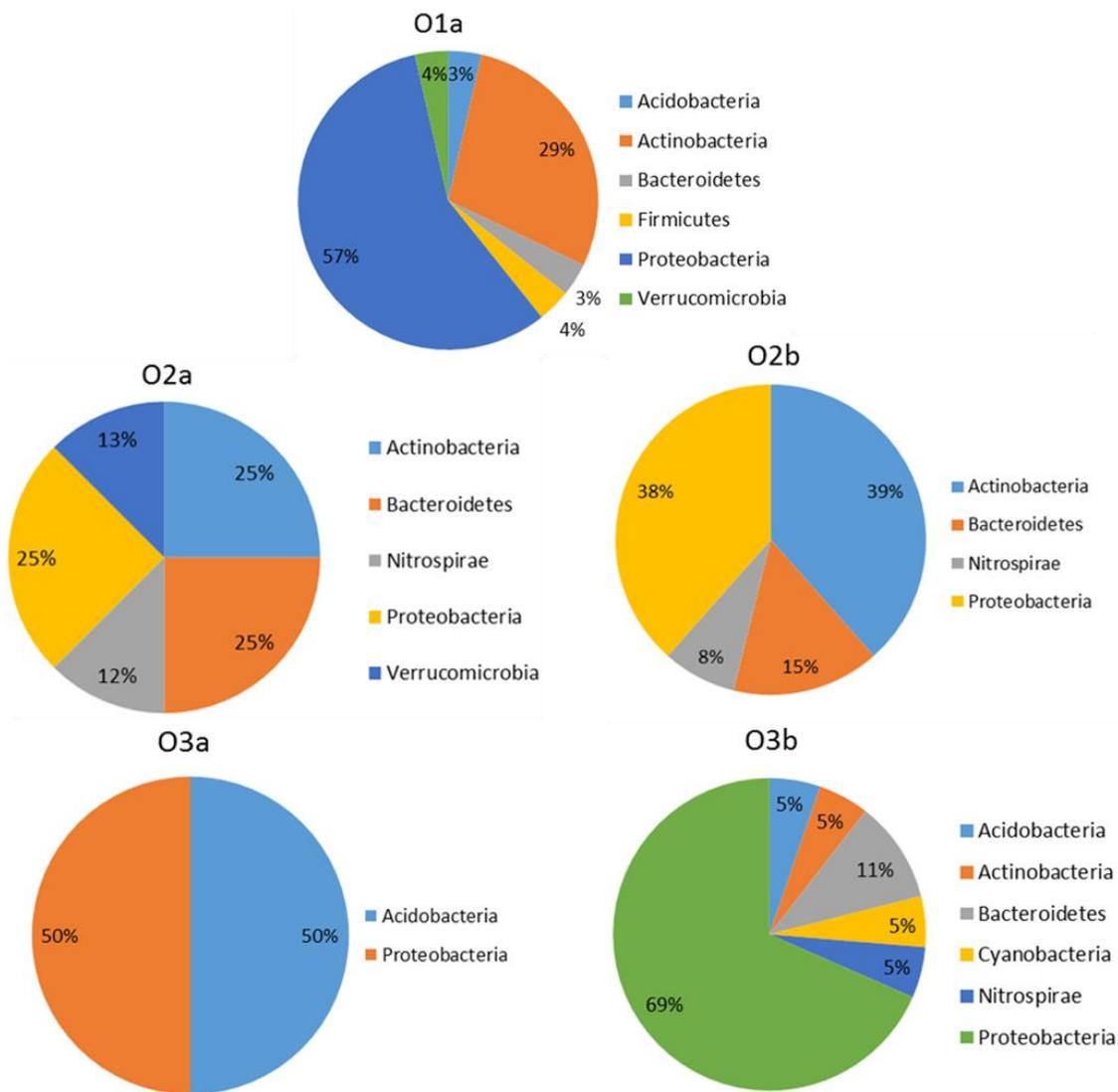


Figura 21. Diversidad a nivel de Phylum en el ecosistema de oyamel. O1: Muestreo inicial; O2a: Segundo muestreo de bloques de suelo sin movimiento; O2b: Segundo muestreo de bloques de suelo desplazados; O3a: Tercer muestreo de bloques de suelo sin movimiento; O3b: Tercer muestreo de los bloques de suelo desplazados.

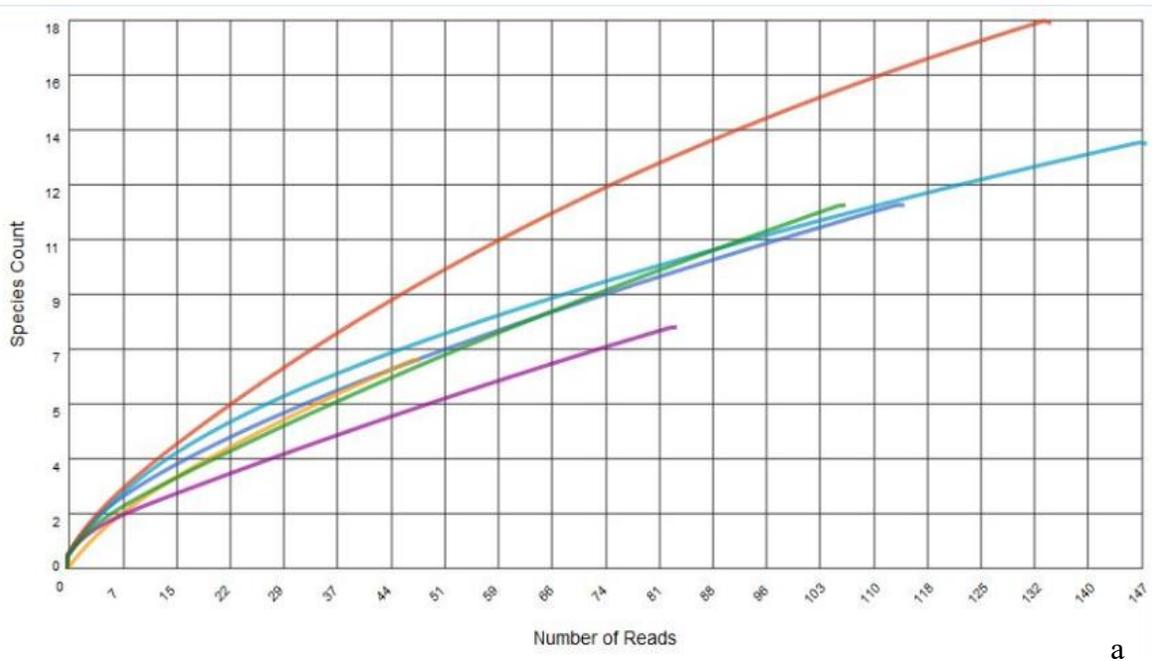


O1a	O2a	O2b	O3a	O3b	FAMILIA
Menor a 8	Cero	Cero	Mayor a 8	Mayor a 8	<i>Bradyrhizobiaceae</i>
Menor a 8	Cero	Cero	Cero	Cero	<i>Coriobacteriaceae</i>
Cero	Cero	Menor a 3	Cero	Cero	<i>Cytophagaceae</i>
Cero	Cero	Menor a 3	Cero	Menor a 3	<i>Flavobacteriaceae</i>
Menor a 3	Cero	Cero	Cero	Cero	<i>Frankiaceae</i>
Cero	Menor a 8	Cero	Cero	Cero	<i>Geobacteraceae</i>
Menor a 3	Cero	Cero	Cero	Cero	<i>Gordoniaceae</i>
Menor a 3	Cero	Cero	Cero	Cero	<i>Lactobacillaceae</i>
Cero	Cero	Cero	Cero	Menor a 3	<i>Methylocystaceae</i>
Menor a 8	Cero	Cero	Cero	Cero	<i>Nitrosomonadaceae</i>
Cero	Menor a 8	Menor a 3	Cero	Menor a 8	<i>Nitrospiraceae</i>
Menor a 8	Cero	Cero	Cero	Cero	<i>Nocardiaceae</i>
Cero	Cero	Menor a 8	Cero	Cero	<i>Nocardioideaceae</i>
Cero	Menor a 8	Cero	Cero	Cero	<i>Prevotellaceae</i>
Cero	Cero	Cero	Mayor a 8	Cero	<i>Pseudonocardiaceae</i>
Menor a 8	Cero	Cero	Cero	Cero	<i>Rhodocyclaceae</i>
Cero	Cero	Cero	Cero	Menor a 3	<i>Rikenellaceae</i>
Cero	Cero	Menor a 8	Cero	Cero	<i>Segniliparaceae</i>
Menor a 3	Cero	Cero	Cero	Menor a 3	<i>Solibacteraceae</i>
Cero	Menor a 8	Cero	Cero	Cero	<i>Sphingobacteriaceae</i>
Cero	Cero	Cero	Cero	Cero	<i>Sphingomonadaceae</i>
Cero	Menor a 8	Cero	Mayor a 8	Menor a 3	<i>Thermomonosporaceae</i>
Cero	Cero	Cero	Cero	Cero	<i>Tsukamurellaceae</i>
Mayor a 8	<i>unclassified (derived from Bacteria)</i>				

Figura 22. Diversidad a nivel de familia en el ecosistema de oyamel. Escala de color representa la abundancia relativa de familias; O1: Muestreo inicial; O2a: Segundo muestreo bloques de suelo sin movimiento; O2b: Segundo muestreo de bloques de suelo desplazados; O3a: Tercer muestreo de bloques de suelo sin movimiento; O3b: Tercer muestreo de los bloques de suelo desplazados.

A partir de las muestras del suelo del ecosistema de Oyamel se generó una curva de rarefacción (Figura 23-a), se observa que las muestras O1a y O1b presentan una pendiente mayor y la muestra O1a que corresponde al primer muestreo fue la que presentó mayor diversidad alfa con 6.9.

Tanto en las muestras de suelo sin movimiento y suelo desplazado el índice de diversidad alfa disminuyó del primer al segundo muestreo pero se incrementó en el tercero (Figura 23-b).



rarefaction curve	metagenome	alpha diversity
	O3b	4.37
	O1a	6.89
	O3a	4.51
	O2b	3.89
	O2a	2.65

b

Figura 23. Curva de rarefacción (a) e índice de diversidad alfa (b) de diversidad bacteriana de la rizósfera del ecosistema de Oyamel. El índice de diversidad alfa fue estimado en MG-RAST con el índice de Shannon considerando el número de especies anotadas en las bases de datos (Ponce- Soto y De Anda, 2013).

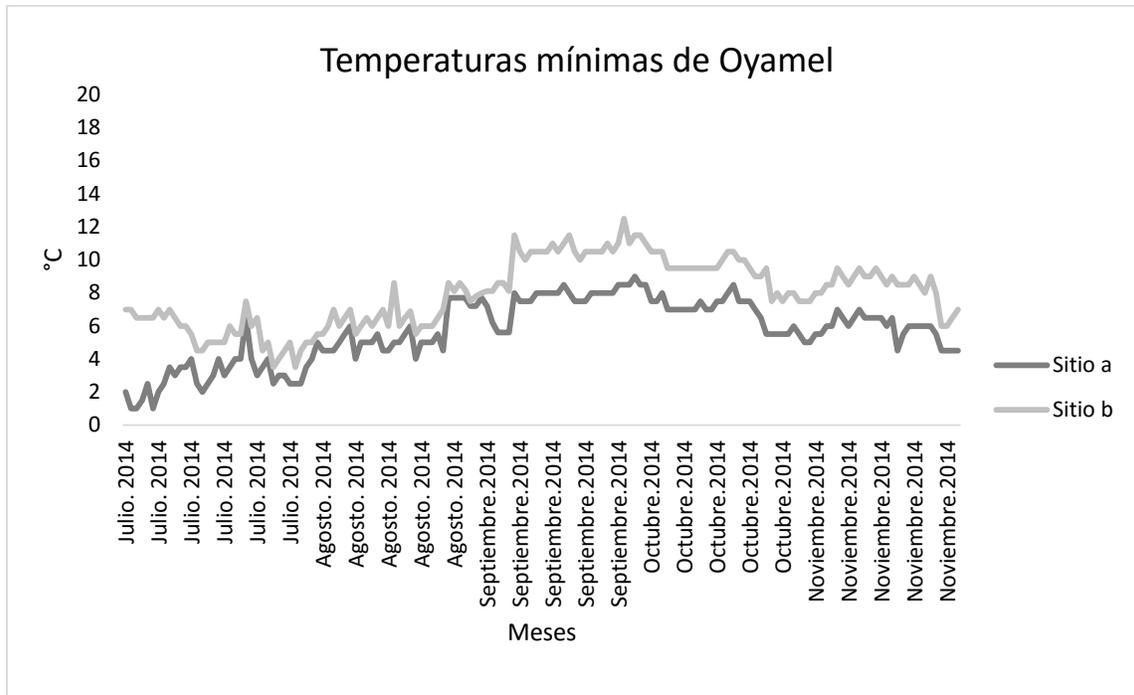


Figura 28. Temperaturas mínimas por día en los bloques de suelo sin desplazamiento (Sitio a) y bloques de suelo desplazados (Sitio b) del ecosistema de Oyamel.

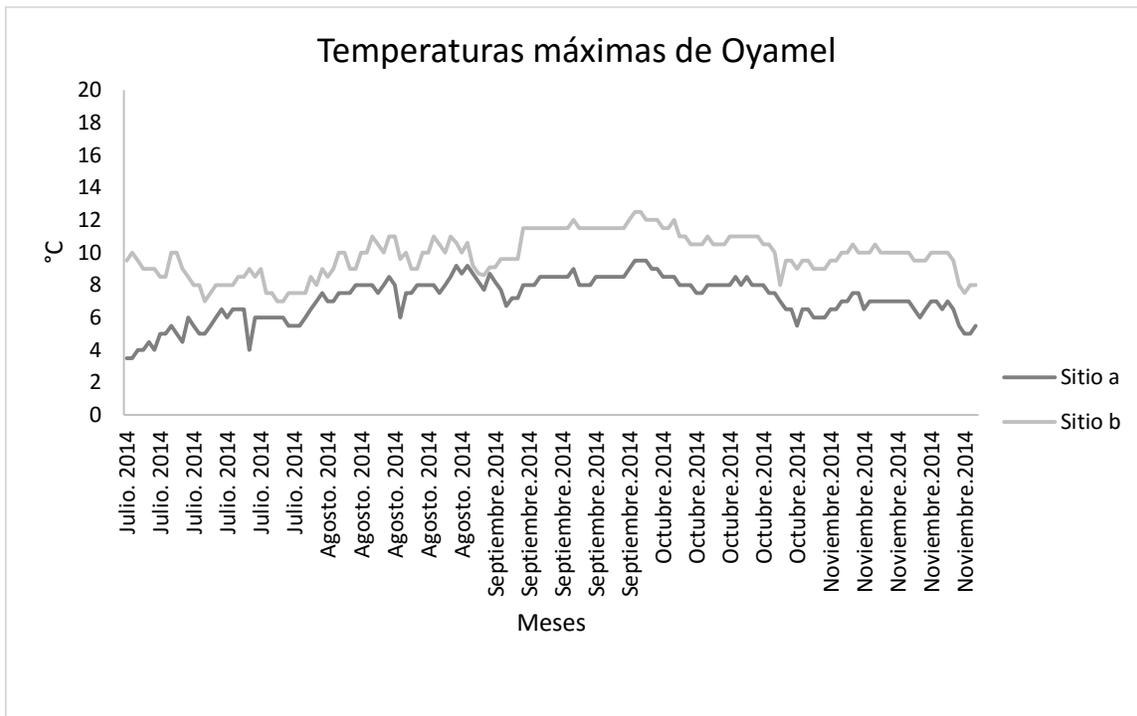


Figura 29. Temperaturas máximas por día en los bloques de suelo sin desplazamiento (Sitio a) y en los bloques de suelo desplazados (Sitio b) del ecosistema de Oyamel.

4.3.4 Análisis físicos y químicos de suelo.

En los resultados de los análisis físicos y químicos del suelo se observó que en el ecosistema de oyamel el pH más alto, el mayor porcentaje de N y P se observó en sitios desplazados; en los sitios sin movimiento se observó la mayor cantidad de materia orgánica y mayor CIC; el ecosistema de encino el pH fue similar en ambos sitios, la materia orgánica (MO), CIC y la concentración de nitrógeno (N) fueron mayores en suelos sin movimiento mientras la mayor concentración de fósforo (P) se localizó en sitios desplazados.

Cuadro 10. Propiedades físicas y químicas de los sitios de estudio.

Ecosistema	pH	CIC CmolKg ⁻¹	MO %	N mgKg ⁻¹	P mgKg ⁻¹	Textura	Arena	Limo	Arcilla
Oyamel (a) Sitio original	4.9	33.39	14.625	18.82	6.18	Franco	44.66	43.54	11.8
Oyamel (b) Sitio desplazado	5.57	26.5	8.5725	30.51	17.38	Franco	39.48	42.54	17.98
Encino (a) Sitio original	5.22	21.73	5.5125	29.21	13.56	Franco	50.48	33.36	16.16
Encino (b) Sitio desplazado	5	19.4	4.97	18.83	15.63	Franco- Arenoso	52.1	30.1	17.8

Capacidad de intercambio catiónico (CIC), materia orgánica (MO), nitrógeno (N) y fósforo (P).

4.4 DISCUSIÓN

Diversidad bacteriana en ecosistema de encino

El número máximo de phyla durante el experimento fue siete, esto sucedió en el segundo muestreo, y al final del experimento el número de phyla se redujo a dos en bloques desplazados. Los phyla más abundantes a lo largo del experimento fueron Actinobacteria y Proteobacteria (Cuadro 10). Al inicio del experimento actinobacteria en el primer muestreo de los bloques sin movimiento presento una prevalencia de 45 %, el cual se incrementó en el segundo muestreo en bloques sin movimiento a 50 % y en bloques desplazados disminuyo a 40 % En el caso de proteobacteria estuvo representado con un 31 % de los OTUs identificados y en el segundo muestreo se redujo a 30 % en los bloques sin movimiento y a 27 % en los bloques desplazados. En el tercer muestreo en bloques sin movimiento actinobateria aumento a 31 % y proteobacteria a 38 %, pero en bloques desplazados no se observaron (Figura 11). La variación en la composición de la comunidades microbianas es debido a diversos factores uno de ellos es la época del año (lluvia, seca) en que fue tomado el muestreo (Cuadro 7) pues la variación estacional influyen en la temperatura y humedad. Nuestros resultados coinciden con un estudio realizado en un bosque húmedo caducifolio (*Quercus petraea*) en la Republica Checa donde se analizaron los microorganismos que participaban en la descomposición de la materia orgánica y se observó que la diversidad fue afectada por la variación en las estaciones siendo más diversas en meses de lluvia que en seca (López-Moldejar *et al.*, 2015). La temperatura se incrementó por el movimiento de bloques en un promedio de 2 °C y se observó que un aumento de temperatura disminuye la diversidad bacteriana (OTUs) (Figura 24, 25 y 26), lo que cambio la estructura de la comunidades bacterianas, es decir, su distribución proporcional y abundancia relativa (Ver cuadro 11 en anexos) (Moreno, 2001); está variación fue reflejada también por el análisis de diversidad alfa (Figura 14), donde la muestra E1 que corresponde al muestro inicial presentó el mayor índice de diversidad alfa de todo el experimento, lo que coincide con un estudio realizado en un gradiente altitudinal en la meseta Tibetana donde la temperatura modificó la composición de las comunidades microbianas (Wu *et al.*, 2015).

Los phyla más abundantes en nuestros resultados coinciden con los encontrado en muestras de suelo de un bosque tropical húmedo y de una área semiárida en Brasil donde se hallaron Proteobacteria y Actinobacteria como los phyla dominantes, muchas de las bacterias

pertenecientes a estos dos phyla estuvieron asociadas a la degradación de la materia orgánica y al estrés (Pacchioni *et al.*, 2014).

En los sitios sin movimiento se encontraron 26 familias y en los sitios desplazados se presentaron 30 familias. Los bloques de suelo sin movimiento y bloques desplazados comparten 21 familias. Del total de 21 familias que se observaron en ambos bloques (desplazados y no desplazados), doce presentaban mayor abundancia en bloques sin movimiento que en los desplazados, de las cuales las más prevalentes fueron: *Pseudonocardiaceae* con 12 %, *Micrococcaceae* con 7 %, *Nocardioideaceae* con 3 % y *Solibacteraceae* con 3 %; los miembros de *Pseudonocardiaceae* son Gram-positivos, aerobios, inmóviles, se han aislado en muestras de suelos forestales en el suroeste de China (Nies *et al.*, 2012) y en lodos industriales donde se les ha relacionado con la fijación de nitrógeno molecular (Mahendra y Álvarez-Cohen, 2005); *Micrococcaceae* con 7 %, son patógenos oportunistas (Lorenzo *et al.*, 2012), también se han encontrado en un microcosmos del suelo de un oasis en el desierto, en la cuenca de Cuatro Ciénegas, México (López-Lozano *et al.*, 2013); *Nocardioideaceae* con 3 %, los miembros de esta familia están adaptados a diversos ambientes, incluye géneros saprofitos, varios géneros han sido aislados de suelos de ecosistemas templados de diferentes regiones en Ispahán, Iran, donde se les relacionó con enfermedades en pacientes inmunodepresivos (Kachuei *et al.*, 2012); y *Solibacteraceae* con 3 %, viven en ambientes bajos en nutrientes, participan en la reducción de nitrato y nitrito pero no tienen la capacidad de fijar N₂ (Ward *et al.*, 2009).

En bloques sin movimiento y desplazados las familias *Coriobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Myxococcaceae*, *Nocardiaceae*, *Rhodospirillaceae* y *Thermomonosporaceae* estuvieron presentes en el primer muestreo en baja prevalencia, disminuyeron en el segundo pero en el tercero ya no se detectaron. Estas familias incluyen géneros causantes de enfermedades en humanos y animales (Evtushenko y Takeuchi, 2006; Singh *et al.*, 2013) y géneros con usos biotecnológicos como los miembros de la familia *Microbacteriaceae* (Seifried *et al.*, 2015); otros géneros pertenecientes a las familias *Thermomonosporaceae* y *Nocardiaceae* se han encontrado en suelos ricos en materia orgánica, en estiércol y compostaje y poseen la habilidad de degradar células vegetales (Singh *et al.*, 2013).

De las 21 familias que se observaron en ambos bloques (desplazados y no desplazados), cinco presentaban mayor abundancia en bloques desplazados que en bloques sin movimiento dentro de las cuales se encuentra *Paenibacillaceae* con 9 %, *Sphingobacteriaceae* con 9 %, y *Nocardiaceae* con 4 %; la familia *Paenibacillaceae* se reconoce por su capacidad de adaptación a diferentes medios, de ahí su abundancia en bloques desplazados, los géneros de esta familia son promotores de crecimiento vegetal, además estimulan la inmunidad innata de las plantas, por lo que tienen gran importancia biotecnológica (Zeigler, 2013). *Sphingobacteriaceae* se han encontrado en diferentes ambientes, se considera una familia de rápida respuesta a cambios en su ambiente debido a la transición entre sus estados metabólicos activos e inactivos; en un estudio realizado en diferentes zonas que incluyeron bosque de coníferas, bosque caducifolios, zonas agrícolas y pastizales, en el sureste de Michigan en Estados Unidos de Norteamérica, usando isótopos de ^{18}O , se encontró que *Sphingobacteriaceae* fue una familia abundante en respuesta al cambio en su ambiente (Aanderud *et al.*, 2015); los miembros de la familia *Nocardiaceae* son productores de una amplia gama de antibióticos, sin embargo, algunos son también conocidos por ser oportunistas patógenos para humanos y animales (Everest *et al.*, 2011).

Las familias más abundantes observadas sólo en sitios sin movimiento fueron *Bradyrhizobiaceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Chloroflexaceae* y *Thermoleophilaceae*; las familias más abundantes encontradas sólo en sitios desplazados fueron *Nitrosomonadaceae*, *Prevotellaceae* y *Propionibacteriaceae*. El número de familias es mayor en sitios desplazados (Figuras; 6, 7, 8, 9 y 10), posiblemente a que hay cambios en la estructura de la comunidad bacteriana debido a la sucesión e invasión de familias que no están presentes en los bloques sin movimiento, además hay reducción en la prevalencia de familias que están presentes en los bloques sin movimiento, lo cual puede ser una respuesta al incremento de temperatura de más de 2 ° C (Figura 24 y 25), cuando los bloques de suelo se movieron de una altitud de 2989 msnm a otra de 2732 msnm (Cuadro 6). Nuestros resultados coinciden con un estudio realizado en un bosque alpino de un gradiente altitudinal en los Alpes de Austria donde la estructura de la comunidad microbiana fue modificada cuando se expuso a un incremento de su temperatura de 1.5 a 2.7 ° C (Djukic *et al.*, 2013). Además, en otro estudio en un prado alpino en la meseta tibetana en el cual se sometió a las comunidades microbianas del suelo a un incremento de temperatura de 1-2 °C durante quince meses, se

observó un cambio significativo en la estructura de la comunidad microbiana (Xiong *et al.*, 2014).

Diversidad bacteriana en ecosistema de Oyamel

El número máximo de phyla durante el experimento fueron seis, el cual se encontró en el muestreo inicial en los bloques de suelo sin movimiento. Los phyla más abundantes durante el experimento fueron tres: proteobacteria, actinobacteria y bacteroidetes, pero solo proteobacteria estuvo presente en todo el experimento (Cuadro 9 y figura 20). Cuando se inició el experimento, proteobacteria presentó una abundancia de 57 % del total de phyla detectados y en el segundo muestreo este se redujo a 29 % en bloques sin movimiento y a 38 % en bloques de suelo con movimiento, y en el tercero aumento a 50 % en bloques sin movimiento y a 69 % en bloques con movimiento. En el caso de actinobacteria, a inicio del experimento su prevalencia fue de 29 %, en el segundo muestreo disminuyó a 28 % en bloques sin movimiento y aumentó a 39 % en bloques desplazados; en el tercer muestreo en bloques sin movimiento actinobacteria no se detectó y en bloques desplazados su prevalencia fue muy baja, sólo 5 %. Con respecto a bacteroidetes al inicio su abundancia en bloques sin movimiento fue de 3 %, en el segundo muestreo, en bloques sin movimiento se incrementó a 29 % y en bloques desplazados su prevalencia fue de 15 %; en tercer muestreo en bloques sin movimiento no se detectó bacteroidetes, mientras que en bloques desplazados su prevalencia fue de 11 % (Figura 21). Se estima que por cada 1°C se aumenta 0.001 las funciones microbianas (Wu, *et al.*, 2015), en nuestros resultados se observó una disminución de OTUs al aumentar la temperatura (2do. muestreo) pero al final del experimento aunque bajo la temperatura los OTUs se mantuvieron (Figura 28, 29 y 30), esta disminución de OTUs es quizá por la adaptación térmica de los microorganismos para lo que requieren gasto de recursos debido a la disminución del acceso a nutrientes, lo anterior podría cambiar su función como respuesta a su adaptación (Castaldini *et al.*, 2002; Deangelis *et al.*, 2015). Lo anterior coincide con un estudio realizado en un bosque húmedo de california donde se trasladaron bloques de suelo del dosel del árbol a pastizales abiertos y se observaron cambios en su composición microbiana (Waldrop y Firestone, 2006).

En total se detectaron 21 familias, doce en los bloques de suelo sin movimiento, seis en bloques de suelos desplazados y ambos comparte tres familias. Las familias más abundantes en bloques sin movimiento fueron *Thermomonosporaceae* con 20 %, *Bradyrhizobiaceae*

con 14 %, *Pseudonocardiaceae* con 8 %, *Nocardiaceae* con 8 %, y *Nitrosomonadaceae* con 6 %. La familia *thermomonosporaceae* se ha encontrado en suelos ricos en materia orgánica, en estiércol y compost, poseen la habilidad para degradar células vegetales (Singh *et al.*, 2013); la familia *Bradyrhizobiaceae* es fijadora de nitrógeno del atmosférico (Gopalakrishnan *et al.*, 2015); en el caso de los miembros de la familia *Pseudonocardiaceae*, se les han relacionado con la fijación de nitrógeno, catabolismo de diversos gases traza y la asimilación de amoníaco y nitrato (Lynch *et al.*, 2014), además ésta familia se ha aislado de suelos agrícolas en China, donde es abundante, y se a encontró que tiene potencial como nematocida contra *Panagrellus redivivus*, una plaga de cultivos agrícolas y *Bursaphelenchus xylophilus*, un nematodo plaga de pinos (Kun *et al.*, 2011); los géneros de la familia *Nocardiaceae* son parcialmente acidorresistentes, se encuentran en todos los ambientes, se alimentan de residuos procedentes de otros organismos como hojas, cadáveres o excrementos, algunos géneros se utilizan como nematocidas (Kun *et al.*, 2011); pero otros son causantes de enfermedades en humanos provocando nocardiosis en el tracto respiratorio, cerebro, riñones, articulaciones y ojos (Park *et al.*, 2014) y en el caso de la familia *Nitrosomonadaceae*, sus miembros se han utilizado en el tratamiento de aguas contaminadas con petroquímicos (Yang *et al.*, 2015) y se han probado con éxito en la restauración de suelos salinos y alcalinos (Schmalenberger *et al.*, 2013).

En los bloques sin movimiento, siete familias estuvieron presentes en el primer muestreo y ausentes en el segundo y tercer muestreo, dentro de las cuales se encuentran *Nitrosomonadaceae* (6 % de prevalencia), *Coriobacteriaceae* (4 % de prevalencia), *Nocardiaceae* (8 % de prevalencia), *Rhodocyclaceae* (4 % de prevalencia), y *Frankiaceae*, *Gordoniaceae*, *Lactobacillaceae* con baja prevalencia (2 %) (Ver anexos cuadro 12), lo anterior, quizá está ligado a factores ambientales como humedad y temperatura. Sobre todo porque el número de secuencias de estas familias es bajo, por lo que cambios en el ambiente puede conducir a la no presencia de los OTUs de estas familias tanto en bloques de suelo sin movimiento y desplazados. En ecosistemas de pino se ha observado que la disminución de la humedad tiene un efecto negativo en la biomasa microbiana y condiciones favorables conducen al aumento de biomasa microbiana (Landesman y Dighton, 2011).

En bloques desplazados las familias más prevalentes fueron *Bradyrhizobiaceae* con 16 %, *Nitrospiraceae* con 8 %, *Nocardoidaceae* con 7 % (Ver anexos cuadro 12). Los géneros de

la familia Bradyrhizobiaceae son bacterias asociadas a plantas, la fijación biológica de nitrógeno es una de sus propiedades ecológicas más importantes con gran potencial de aplicación en la agricultura, además, esta familia se encontró en muestras de suelo de bosques caducifolios templados en el este de Estados Unidos (Landesman *et al.*, 2014); La mayoría de los miembros de *Nitrospiraceae* son nitrito-oxidantes y son los nitrificantes más diversos de los ecosistemas naturales, y se han utilizado en el tratamiento biológico de aguas residuales (Lücker *et al.*, 2010); Los géneros de la familia *Nocardioideaceae* se relacionan con la degradación de tejidos vegetales (Singh *et al.*, 2013) y la descomposición de la materia orgánica (Golinska *et al.*, 2013). La diversidad encontrada en bloques de suelo desplazados es debido al incremento de temperatura de más de 2 ° C (Figura 28 y 29) lo que coincide con un estudio realizado en una zona forestal de la Universidad de Harvard donde se calentó el suelo a 5 °C por encima de su temperatura ambiente y se observaron cambios en la diversidad y estructura de las comunidades microbianas (DeAngelis *et al.*, 2015).

En el caso de Bradyrhizobiaceae se observó en el primer muestreo en baja prevalencia (5.9 %), se ausentaron en el segundo y aumentó en el tercer muestreo a más del doble (16.6 %) respecto al primero; Solibacteraceae tuvo baja prevalencia en el primer muestreo (1.9 %), no se observó en el segundo muestreo, y aumento ligeramente (2.1 %) en el tercer muestreo; en el caso de Cytophagaceae y Nocardioideaceae, estas sólo se observaron en el segundo muestreo. Los bloques sin movimiento y bloques desplazados compartieron tres familias las cuales fueron *Bradyrhizobiaceae*, *Nitrospiraceae* y *Solibacteraceae* las cuales fueron más prevalentes en los bloques desplazados. Esta diversidad en las comunidades microbianas es debido al incremento de temperatura (Figura 28 y 29), pues el incremento de temperatura aumenta la velocidad de descomposición y la actividad microbiana, esto coincide con un estudio realizado en el Tibet donde se observó que la comunidades microbianas aumentan proporcionalmente con incremento de temperatura en un rango no mayor a 40 °C (Wu *et al.*, 2015). Además el movimiento de bloques de suelo a diferente altitud, en este caso de 3489 msnm a 3088 msnm (Cuadro 1), influyó en el índice de la diversidad alfa (Figura 18), pues se ha observado que la biomasa microbiana disminuye a mayores altitudes y aumenta a menores altitudes, esto se observó en un estudio realizado en un gradiente altitudinal en la meseta Tibetana. Del mismo modo, la variación de las propiedades físicas y químicas de suelo influyen en los cambios en la estructura de la comunidad microbianas, lo cual se

observó en un estudio realizado en el sureste del Amazonas, Brasil donde se tomaron muestras de cuatro suelos distintos (bosque nativo, área deforestada, campos agrícolas y de pastoreo) y se observó que las comunidades microbianas fueron diferentes en los cuatro tipos de suelo (Mendes *et al.*, 2015).

4.5 CONCLUSIÓN

El uso de bloques de suelo desplazados a diferentes altitudes es útil para simular el efecto del cambio clima en comunidades bacterianas.

En nuestro estudio la estructura y la diversidad de las comunidades bacterianas cambiaron en los bloques cuando estos se movieron a diferentes altitud en comparación a los bloques que no se movieron.

La estructura de las comunidades bacterianas (distribución proporcional) es influenciada por el ambiente y posiblemente por las comunidades bacterianas ya existentes en los sitios a donde se mueven los bloques de suelo.

Los cambios que se dan en la diversidad bacteriana son una respuesta al cambio en el ambiente, pero al transcurrir el tiempo hay una adaptación a la nueva condición.

La mayor diversidad microbiana en ecosistemas de encino se observó en bloques desplazados y en oyamel se observó en los bloques sin movimiento. Este hallazgo advierte que los cambios en las comunidades microbianas del suelo como respuesta al incremento en temperatura son diferente entre ecosistemas.

Aparentemente los ecosistemas de mayor elevación serán más vulnerables ya que en ellos la diversidad microbiana se reduce por el incremento en temperatura. Esta respuesta diferencial también se observa en el tiempo de acuerdo a las fechas de muestreo.

En presente trabajo es el primero en México y de los pocos en el mundo la cual se estudia el efecto del cambio climático en las comunidades microbianas usando bloques de suelo que se mueven a diferente altitud y uso de tecnología metagenómicas de nueva de generación.

El método usado puede mejorarse con el uso de kits de 400pb en lugar de 200pb y con el aumento de número de muestras de campo y aumentando el periodo de mediciones.

4.6 Literatura Citada

- Aanderud, ZT., Jones, S.E., Fierer, N. y Lennon, JT. 2015. Resuscitation of the rare biosphere contributes to pulses of ecosystem activity. *Frontiers in Microbiology*. 6:24.
- Andresen, LC., Dungait, JAJ., Bol, R., Selsted, MB., Ambus, P., Michelsen, A. 2014. Bacteria and Fungi Respond Differently to Multifactorial Climate Change in a Temperate Heathland, Traced with C-13-Glycine and Face CO₂. *Plos One*. 9:1.
- Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J. y Nekrutenko, A. 2010. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *BIOINFORMATICS*. 26(14): 1783-1785
- Caballero, M., Lozano, S y Ortega. B. 2007. Efecto invernadero, calentamiento global y cambio climático: Una perspectiva desde las ciencias de la tierra. *Revista digital universitaria. Instituto de Geofísica, Instituto de Geología. UNAM*. 8: 10.
- Castaldini, A., Cavalcoli, D., Cavallini, A., Jones, D., Palermo, V. Susi, E. 2002. Surface modifications in Si after rapid thermal annealing. *JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY*. 149: G633-G637.
- DeAngelis, KM., Pold, G., Topcuoglu, BD., Van Diepen, LTA., Varney, RM., Blanchard, JL., Melillo, J., y Frey, SD. 2015. Long-term forest soil warming alters microbial communities in temperate forest soils. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1-12.
- Djukic, I., Zehetner, F., Watzinger, A., Horacek, M., Gerzabek, MH. 2013. In situ carbon turnover dynamics and the role of soil microorganisms therein: a climate warming study in an Alpine ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*. 83: 112–124.
- Drigo, B., Kowalchuk, GA. y Veen, JAV. 2008. Climate change goes underground: effects of elevated atmospheric CO₂ on microbial community structure and activities in the rhizosphere. *Biological Fertility Soils*. 44: 667-679.
- Everest, GJ. y Meyers, PR. 2013. *Micromonospora equina* sp. nov., isolated from soil from a racecourse. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63: 879–885.
- Evtushenko, LI. y Takeuchi, M. 2006. The family Microbacteriaceae. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*. 3:1020–1098). Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer.

- Gray, BS., Classen, AM., Kardol, P., Yermakov, Z. y Miller, M. 2001. Múltiple Climate Change Factors Interact to Alter Soil Microbial Community Structure in an Old-Field Ecosystem. *Soil Science Society Am.* 75: 2217–2226.
- Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J. 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *GENOME BIOLOGY.* 11 (8):R86.
- Golinska, P., Wang, D. y Goodfellow, M. 2013. *Nocardia aciditolerans* sp nov., isolated from a spruce forest soil. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology.* 103: 1079-1088.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, RK., Gowda, CLL. y Krishnamurthy, L. 2015. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech.* 5: 355-377.
- Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC). Climate Change 2008. Synthesis Report. Summary for Policy-makers. Disponible en: www.ipcc.ch.
- Hartmann, M., Howes, CG., VanInsberghe, D., Yu, H., Bachar, D., Christen, R., Nilsson, RH., Hallam, SJ., William, W. y Mohn, WW. 2010. Significant and persistent impact of timber harvesting on soil microbial communities in Northern coniferous forests. *International Society for Microbial Ecology.* 6: 2199–2218.
- Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, MC. y Santoyo, N. 2010. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Revista Internacional de Botánica Experimental.* 79: 133-139.
- Kachuei R, Emami M, Mirnejad R. y Khoobdel M. 2012. Diversity and frequency of *Nocardia* spp. in the soil of Isfahan province, Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2:474-478.
- Kun, XC., Jun, LX., Qin, XJ., Lei, G., Qun, DC., He, MM., Qin, ZK., Xiang, YF. y Huang, FD. 2011. Phylogenetic analysis of the nematicidal actinobacteria from agricultural soil of China. *African Journal of Microbiology Research.* 5: 2316-2324.
- Landesman, WJ. y Dighton, J. 2011. Shifts in Microbial Biomass and the Bacteria: Fungi Ratio Occur Under Field Conditions Within 3 h After Rainfall. *Microbiology Ecology.* 62: 228–236.

- Landesman, WJ., Nelson, DM. y Fitzpatrick, MC. 2014. Soil properties and tree species drive beta-diversity of soil bacterial communities. *Soil biology y Biochemistry*. 76: 201-209.
- López-Lozano, NE., Heidelberg, KB., Nelson, WC., García-Oliva, F., Eguiarte, LE., y Souza, V. 2013. Microbial secondary succession in soil microcosms of a desert oasis in the Cuatro Ciénegas Basin, Mexico. *PeerJ*, 1:47.
- López-Mondejar, R., Voriskova, J., Vetrovsky, T. y Baldrian, P. 2015. The bacterial community inhabiting temperate deciduous forests is vertically stratified and undergoes seasonal dynamics. *Soil biology y Biochemistry*. 87: 43-50.
- Lorenzo, JM., García-Fontán, MC., Gómez, MM. y Fonseca, S. 2012. Study of the Micrococcaceae and Staphylococcaceae throughout the Manufacture of Dry-Cured Lacón (a Spanish Traditional Meat Product) Made without or with Additives. *Journal of Food Research*. 1:1.
- Lücker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Kocha, H., Vacherie, B., Ratteie, T., Damsté, JSS., Spieckg, E., Paslier, D. y Daims, H. 2010. Nitrospira metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 107: 13479-13484.
- Lynch, R., Darcy, JL., Kane, NC., Nemergut, DR. y Schmidt, SK. 2014. Metagenomic evidence for metabolism of trace atmospheric gases by high-elevation desert Actinobacteria. *Frontiers in microbiology*. 5: 698.
- Mahendra S. y Álvarez-Cohen, L. 2005. *Pseudonocardia dioxanivorans* sp. nov., a novel actinomycete that grows on 1, 4-dioxane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55:593-8.
- Mendes, LW., Brossi, MJD., Kuramae, EE. y Tsai, SM. 2014. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. *Applied Soil Ecology*. 95: 151-160.
- Moreno, C. E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T–Manuales y Tesis SEA, vol.1. Zaragoza, 84 pp.
- Nies, GX., Ming, H., Wei, DQ., Zhou, EM., Tang, X., Cheng, J., Tang, SK. y Li, WJ. 2012. *Pseudonocardia yuanmoensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from soil in Yunnan, south-west China. *Antonie van Leeuwenhoek*. 101: 753-760.

- Pacchioni, RG., Carvalho, FM., Thompson, CE., Faustino, ALF., Nicolini, F., Pereira, T., Silva, RCB., Mauricio E. Cantao, M., Gerber, G., Vasconcelos, ATR. y Agnez-Lima, LF. 2014. Taxonomic and functional profiles of soil samples from Atlantic forest and Caatinga biomes in northeastern Brazil. *Microbiology Open*. 3: 299–315.
- Park, SD., Kim, HJ., Jang, IH., Uh, Y., Kim, J., Yoon, KJ. y Oh, JR. 2014. First Report of *Nocardia farcinica* Bursitis in a Patient with Diabetes Mellitus. *Annals of Laboratory Medicine*. 34: 252-255.
- Perczyk, D., Bormioli, M., Carlino, H y González, MP. 2004. Manual de Cambio Climático. Unidad de Cambio Climático de la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable del Ministerio de Salud y Ambiente de la República Argentina, en el marco del Proyecto de Ciudadanía Ambiental Global.
- Ponce-Soto, GY. y De Anda-Torres, VY. 2013. Práctica MG-RAST. Ecología. UNAM.
- Sánchez-González, A. y López-Mata, L. 2003. Clasificación y ordenación de la vegetación del norte de la Sierra Nevada, a lo largo de un gradiente altitudinal. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica Volumen: 74*: 47-71.
- Schellenberger, S., Drake, HL. y Kolb, S. 2011. Functionally Redundant Cellobiose-Degrading Soil Bacteria Respond Differentially to Oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 6043-6048.
- Schmalenberger, A., O'Sullivan, O., Gahan, J., Cotter, PD. y Courtney, R. 2013. Bacterial Communities Established in Bauxite Residues with Different Restoration Histories. *Environmental Science y Technology*. 47: 7110-7119.
- Singh, BK., Bardgett, RD., Smith, P. y Reay, DS. 2010. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nature Review Microbiology* 8:779-790.
- Stefanis, C., Alexopoulos, A., Voidarou, C., Vavias, S. y Bezirtzoglo, E. 2013. Principal methods for isolation and identification of soil microbial communities. *Folia Microbiol.* 61–68.
- Waldrop, MP y Firestone, MK. 2006. Response of Microbial Community Composition and Function to Soil Climate Change. *Microbial Ecology*. Department of Environmental Science, Policy, and Management, University of California, USA. 716-724.

- Ward, N.L., Challacombe, J.F., Janssen, P.H., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Wu, M., Gary, X., Haft, D., Sait, M., Badger, J., Barabote, R., Bradley, B., Bettin, T., Brinkac, L.M., Bruce, D., Creasy, T., Daugherty, S., Davidsen, T.M., Deboy R.T., Detter, J.C., Dodson, R.J., Durking, S.A., Ganapathy, A., Kuske, C.R. 2009. Three Genomes from the Phylum Acidobacteria Provide Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 2046–2056.
- Wu, J., Xiong, J., Huan, C., Shi, Y., Wang, K. y Zhang, D. 2015. Temperature sensitivity of soil bacterial community along contrasting warming gradient. *Applied Soil Ecology*. 94: 40-48.
- Xiong, J.B., Sun, H.B., Peng, F., Zhang, H.Y., Xue, X., Gibbons, S.M., Gilbert, J.A. y Chu, H.Y. 2014. Characterizing changes in soil bacterial community structure in response to short-term warming. *FEMS Microbiology Ecology*. 89: Páginas: 281-292.
- Yang, Q., Xiong, P.P., Ding, P.Y., Chu, L.B. y Wang, J.L. 2015. Treatment of petrochemical wastewater by microaerobic hydrolysis and anoxic/oxic processes and analysis of bacterial diversity. *Bioresource Technology*. 196: 169-175.
- Zeigler, D.R. 2013. The Family Paenibacillaceae. *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains the National Sciences Foundation*.
- Zimmermann, M., Meir, P., Bird, M., Malhi, Y. y Cahuana, A.J.Q. 2009. Climate dependence of heterotrophic soil respiration from a soil-translocation experiment along a 3000 m tropical forest altitudinal gradient. *European Journal of Soil Science*. 60: 895-906.

ANEXOS

Cuadro 11. Abundancia relativa a nivel familia del ecosistema de encino.

FAMILIA	ENCINO				
	E1	E2a	E2b	E3a	E3b
<i>Acetobacteraceae</i>	0	0	0.429	0	0
<i>Bdellovibrionaceae</i>	0.806	0	0	0	0
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	10.484	5.682	0	5.263	0
<i>Burkholderiaceae</i>	1.613	0.568	0.429	0	0
<i>Chloroflexaceae</i>	0	0.568	0	2.632	0
<i>Coriobacteriaceae</i>	1.613	0.568	0.429	0	0
<i>Cytophagaceae</i>	0.806	0	0	0	0
<i>Enterococcaceae</i>	0	0	0.858	0	0
<i>Flavobacteriaceae</i>	0	0	0.429	0	0
<i>Holosporaceae</i>	0	0	0	2.632	0
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	0	0	0.858	0	0
<i>Legionellaceae</i>	0	0	0.429	0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	0.806	0.568	0.429	0	0
<i>Micrococcaceae</i>	1.613	0.568	0	5.263	0
<i>Micromonosporaceae</i>	0.806	0	0	0	0
<i>Mycobacteriaceae</i>	1.613	0.568	0.858	0	0
<i>Myxococcaceae</i>	0.806	0.568	0.429	0	0
<i>Nitrosomonadaceae</i>	0	1.136	0	2.632	0
<i>Nitrospiraceae</i>	0.806	0	0	0	0
<i>Nocardiaceae</i>	0.806	0.568	3.433	0	0
<i>Nocardioideaceae</i>	0	0	1.717	2.632	0
<i>Paenibacillaceae</i>	0	0.568	0.429	2.632	8.333
<i>Planctomycetaceae</i>	0.806	0	0.429	0	0
<i>Prevotellaceae</i>	0	0	0	0	8.333
<i>Propionibacteriaceae</i>	0	0	1.288	0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	3.226	6.818	0.429	2.632	0
<i>Rhizobiaceae</i>	0	0.568	0	0	0
<i>Rhodospirillaceae</i>	0.806	0.568	0.429	0	0
<i>Rikenellaceae</i>	0	0	0.858	0	0
<i>Segniliparaceae</i>	0	0.568	0.429	0	0
<i>Solibacteraceae</i>	0	0.568	0.858	2.632	0
<i>Sphingobacteriaceae</i>	0.806	0	0.429	0	8.333
<i>Thermaceae</i>	0	0	0.429	0	0
<i>Thermoactinomycetaceae</i>	0	0	0	0	0
<i>Thermoleophilaceae</i>	0	10.227	0	7.895	0
<i>Thermomonosporaceae</i>	6.452	0.568	0.429	0	0
<i>Tsukamurellaceae</i>	0	0	1.288	0	0
<i>unclassified (derived from Bacteria)</i>	65.323	68.182	81.545	63.158	75

E1: Muestreo inicial; E2a: Segundo muestreo bloques de suelo sin movimiento; E2b: Segundo muestreo de bloques de suelo desplazados; E3a: Tercer muestreo de bloques de suelo sin movimiento; E3b: Tercer muestreo de los bloques de suelo desplazados.

Cuadro 12. Abundancia relativa a nivel familia del ecosistema de oyamel.

FAMILIA	OYAMEL				
	O1a	O2a	O2b	O3a	O3b
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	5.882	0	0	8.333	16.667
<i>Coriobacteriaceae</i>	3.922	0	0	0	0
<i>Cytophagaceae</i>	0	0	2.564	0	0
<i>Flavobacteriaceae</i>	0	0	2.564	0	2.083
<i>Frankiaceae</i>	1.961	0	0	0	0
<i>Geobacteraceae</i>	0	3.125	0	0	0
<i>Gordoniaceae</i>	1.961	0	0	0	0
<i>Lactobacillaceae</i>	1.961	0	0	0	0
<i>Methylocystaceae</i>	0	0	0	0	2.083
<i>Nitrosomonadaceae</i>	5.882	0	0	0	0
<i>Nitrospiraceae</i>	0	3.125	2.564	0	6.25
<i>Nocardiaceae</i>	7.843	0	0	0	0
<i>Nocardioideaceae</i>	0	0	7.692	0	0
<i>Prevotellaceae</i>	0	3.125	0	0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	0	0	0	8.333	0
<i>Rhodocyclaceae</i>	3.922	0	0	0	0
<i>Rikenellaceae</i>	0	0	0	0	2.083
<i>Segniliparaceae</i>	0	0	5.128	0	0
<i>Solibacteraceae</i>	1.961	0	0	0	2.083
<i>Sphingobacteriaceae</i>	0	3.125	0	0	0
<i>Sphingomonadaceae</i>	0	0	0	0	0
<i>Thermomonosporaceae</i>	0	3.125	0	16.667	2.083
<i>Tsukamurellaceae</i>	0	0	0	0	0
<i>unclassified (derived from Bacteria)</i>	64.706	84.375	79.487	66.667	66.667

O1a: Muestreo inicial; O2a: Segundo muestreo bloques de suelo sin movimiento; O2b: Segundo muestreo de bloques de suelo desplazados; O3a: Tercer muestreo de bloques de suelo sin movimiento; O3b: Tercer muestreo de los bloques de suelo desplazados.