



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA**

**MICROORGANISMOS DEL SUELO Y CINÉTICA DE
CARBONO EN ECOSISTEMAS DEL MONTE TLÁLOC**

VIRGINIA MARTÍNEZ ROJAS

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe M. C. VIRGINIA MARTÍNEZ ROJAS, Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUAREZ, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis MICROORGANISMOS DEL SUELO Y CINÉTICA DE CARBONO EN

ECOSISTEMAS DEL MONTE TLÁLOC

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 21 de OCTUBRE de 2015



Firma



DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUAREZ

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **MICROORGANISMOS DEL SUELO Y CINÉTICA DE CARBONO EN ECOSISTEMAS DEL MONTE TLÁLOC** realizada por la alumna: **VIRGINIA MARTÍNEZ ROJAS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



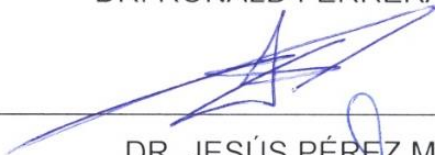
DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUAREZ

ASESOR:



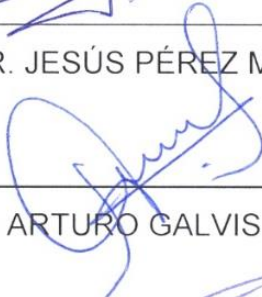
DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR:



DR. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESOR:



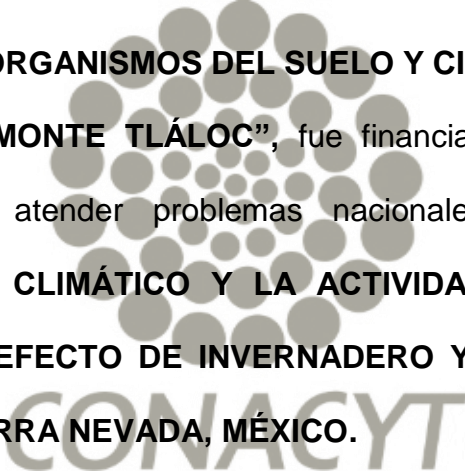
DR. ARTURO GALVIS SPINOLA

ASESOR:



DRA. FRANCISCA OFELIA PLASCENCIA ESCALANTE

Montecillo, Texcoco, México, 10 de noviembre de 2015



La presente tesis: **“MICROORGANISMOS DEL SUELO Y CINÉTICA DE CARBONO 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.**

MICROORGANISMOS DEL SUELO Y CINÉTICA DE CARBONO EN ECOSISTEMAS DEL MONTE TLÁLOC

Virginia Martínez Rojas, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015

Los ecosistemas forestales juegan un papel importante en la fijación de carbono, a través de ellos se da el intercambio de dióxido de carbono (CO_2) entre la atmósfera y la superficie terrestre. Parte del carbono fijado por las plantas entra al suelo y parte regresa a la atmósfera a través de la descomposición del material vegetal muerto. Varios factores bióticos y abióticos determinan la cantidad de carbono que entra al suelo. En el presente estudio se evaluaron algunos de esos factores que influyen en la caída de hojarasca, la descomposición y en los flujos de CO_2 del suelo en el bosque de oyamel del monte Tláloc. Además se determinó con tecnologías metagenómicas de última generación la diversidad de las comunidades bacterianas del suelo en los ecosistemas de encino, oyamel, pino y pradera alpina. De la hojarasca caída durante el año, 67% correspondió a acículas y 23% a ramas. La descomposición, medida como pérdida de peso fue de 44% para acículas y de 32% para ramas a los 475 días; las constantes de descomposición (k) fueron de 0.439 año^{-1} para acículas y de 0.294 año^{-1} para ramas. Los flujos de CO_2 asociadas a la respiración del suelo fueron mayores en época de lluvia. La tasa de mineralización bajo condiciones controladas de temperatura y humedad en los suelos de oyamel fue afectada por la calidad de la hojarasca; en suelos colectados a menor altitud la tasa de mineralización fue de $36 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ y en suelos de mayor altitud fue de $21 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$. Los filos identificados en las muestras de suelo de los diferentes ecosistemas fueron:

Actinobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria, Firmicutes y Tenericutes, los cuales cambiaron de acuerdo al tipo de ecosistema y al gradiente altitudinal; el filo más abundante fue Actinobacteria, en particular en bosque de encino y oyamel; Tenericutes se encontró solo en encino y pradera alpina. La diversidad alfa fue mayor en encino que en los otros ecosistemas. El suelo de bosque de encino albergó 14 géneros de bacterias, siendo el más abundante *Arthrobacter* con 7.5% del total de secuencias, le siguió *Burkholderia* con 3.5% del total.

Palabras clave: hojarasca, tasa de descomposición, flujos de CO₂, mineralización de C, diversidad bacteriana.

SOIL MICROORGANISMS AND CARBON KINETICS OF MOUNT TLALOC ECOSYSTEMS

Virginia Martínez Rojas, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015

Forest ecosystems play an important role in carbon sequestration, through them exchange of carbon dioxide (CO₂) between the atmosphere and land surface occurs. Part of the carbon fixed by plants enters into the soil and other part returns to the atmosphere through litter decomposition. Various biotic and abiotic factors determine the amount of carbon entering the soil. In this study some factors that influence litter fall, decomposition and CO₂ fluxes on soils of fir forest at mount Tlaloc were evaluated. It was also determined the diversity of soil bacterial communities in ecosystems of oak, fir, pine and alpine grass land using technologies of metagenomics. Litter fall during the year, was 67% needles and 23% branches. The decomposition, measured as weight loss was 44% for needles and 32% for branches at 475 days after the establishment of the experiment; decomposition constants (k) were 0.439 year⁻¹ for needles and 0.294 year⁻¹ for branches. The CO₂ fluxes associated with soil respiration were higher in the rainy season. The mineralization rate under controlled conditions of temperature and moisture on fir soils was affected by the litter quality; mineralization rate was 36 mg C kg⁻¹ day⁻¹ in soil samples collected at lower altitude and 21 mg C kg⁻¹ day⁻¹ in soils at higher altitude. The phyla identified in soil samples from the different ecosystems were: Actinobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria, Firmicutes and Tenericutes, which changed according to the type of ecosystem and the altitudinal gradient; phylum Actinobacteria was the most abundant, particularly in oak and fir forest; Tenericutes

was found only in oak and alpine grassland. Alpha diversity was higher in oak than in the other ecosystems. The oak forest floor housed 14 genus of bacteria, the most abundant was *Arthrobacter* with 7.5% of sequences and *Burkholderia* with 3.5%.

Key words: litter, decomposition rate, CO₂ fluxes, C mineralization, bacterial diversity.

A mis padres Javier Guillermo y Tomasa por su amor
y apoyo en todo momento, los amo.

A mis dos tesoros que son el amor de
mi vida Vanessa y Alexandra

Al papá de mis tesoritos Alejandro Pérez Rosales

A mis hermanos Noemí, Javier Iván y Daniel

A mis sobrinos Dana Nicol, Emiliano, Ricardo y Alison
que son un pedacito de cielo

A mis amigos

A la memoria de mis amados abuelos

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por toda la fortaleza que me ha dado para salir adelante.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca recibida y por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación.

Al Colegio de Postgraduados, por haberme permitido realizar mis estudios de Doctorado en Edafología.

A mis padres, Javier Guillermo Martínez Gálvez y Tomasa Rojas Constantino, porque siempre puedo contar con ustedes.

Al Dr. Juan José Almaraz Suárez, por su asesoría y consejos en la elaboración de la presente tesis.

Al Dr. Arturo Galvis Spinola, por su asesoría y su apoyo para concluir el capítulo de mineralización.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato, Jesús Pérez Moreno y Francisca Ofelia Plascencia Escalante por su asesoría durante la elaboración de la tesis.

Al M. C. Alejandro Pérez Rosales, por su apoyo en campo y asesoría estadísticas.

A mi hermana Noemí Martínez Rojas, por su apoyo y cuidar a mis niñitas.

A la Dra. Irma Díaz Aguilar, por su asesoría y consejos.

Al M. C. Jorge Alvarado López, por la revisión de redacción de esta tesis.

A la Sra. Rosario, por su apoyo en la elaboración de oficios y demás cosas. A los señores del laboratorio y compañeros del Área de Microbiología de suelos por su apoyo en el laboratorio y en muestreos de campo.

A los Srs. Genaro y Margarito, por su apoyo en muestreos de campo. Al Ejido de San Pablo Ixayoc, por facilitarme la realización de los muestreos de campo.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE CUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. OBJETIVOS.....	4
1.1 Objetivo general.....	4
1.2 Objetivos particulares.....	4
2. HIPÓTESIS.....	5
2.1 Hipótesis general	5
2.2 Hipótesis particulares.....	5
CAPÍTULO I	6
1. Revisión de literatura	6
1.1 El cambio climático	6
1.2 Ecosistemas forestales	8
1.3 Fijación de carbono.....	10
1.4 Producción de hojarasca.....	12
1.5 Materia orgánica del suelo (MOS)	14
1.6 Tasa de descomposición	16
1.7 Microorganismos del suelo	17
1.7.1 Microorganismos del suelo y cambio climático.....	18
1.8 Mineralización de C en ecosistemas forestales	20

1.9 Metagenómica	22
1.10 Área de estudio en el monte Tláloc.....	23
CAPÍTULO II	25
2. Producción y tasa de descomposición de hojarasca en un bosque de <i>Abies religiosa</i> del monte Tláloc.....	25
2.1 Resumen.....	25
2.2 Abstract.....	26
2.3 Introducción	27
2.4 Materiales y Métodos	29
2.5 Resultados	34
2.6 Discusión	39
2.7 Conclusiones	44
CAPÍTULO III	45
3. Mineralización de carbono del suelo procedente del piso forestal de <i>Abies religiosa</i>	45
3.1 Resumen.....	45
3.2 Abstract.....	46
3.3 Introducción	47
3.4 Materiales y Métodos	49
3.5 Resultados	52
3.6 Discusión	58
3.7 Conclusiones	62

CAPÍTULO IV	63
4. Análisis metagenómico de la diversidad bacteriana en ecosistemas forestales del monte Tláloc.....	63
4.1 Resumen.....	63
4.2 Abstract.....	64
4.3 Introducción	65
4.4 Materiales y Métodos	67
4.5 Resultados y Discusión.....	70
4.6 Conclusiones	88
CONCLUSIONES GENERALES.....	89
LITERATURA CITADA	91
ANEXOS	100
Anexo I.....	100
Anexo II.....	101

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1. Calidad de la hojarasca (acículas y ramas) de <i>Abies religiosa</i>	35
Cuadro 2.2. Características del suelo, producción anual de hojarasca y descomposición de acículas y ramas en cinco sitios a lo largo de un gradiente altitudinal en el bosque de <i>Abies religiosa</i> del monte Tláloc.....	38
Cuadro 2.3. Variables climáticas y flujos de CO ₂ del suelo de cinco sitios en el bosque de <i>Abies religiosa</i> del monte Tláloc.	39
Cuadro 3.1. Características de los suelos de cinco sitios de estudio del bosque de <i>Abies religiosa</i> utilizados en la incubación de 28 días.....	49
Cuadro 3.2. Ecuaciones de regresión lineal de la acumulación de CO ₂ en función del tiempo en un suelo de <i>Abies religiosa</i> con diferentes concentraciones de lignina.	53
Cuadro 3.3. Ecuaciones de regresión lineal de la acumulación de CO ₂ , después de 28 días de incubación, para obtener las tasas de mineralización de los suelos de cinco sitios de estudio de <i>Abies religiosa</i>	56
Cuadro 4.1. Metagenomas analizados y técnicas de secuenciación.	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Muestreo de hojarasca en una malla colocada en <i>Abies religiosa</i> para estimar la producción de hojarasca.....	30
Figura 2.2. Fracciones de hojarasca de <i>Abies religiosa</i> obtenidas de la producción de hojarasca en las mallas.....	30
Figura 2.3. Bolsas de descomposición de acículas y ramas colocadas en <i>Abies religiosa</i>	31
Figura 2.4. Cámaras de PVC para determinación de CO ₂ en <i>Abies religiosa</i> : (a) frasco con cal sodada del testigo, (b) cámara sellada del testigo, (c) frasco con cal sodada de la muestra y (d) cámara sellada de la muestra.	33
Figura 2.5. Producción total de hojarasca (t ha ⁻¹ año ⁻¹) en <i>Abies religiosa</i> del monte Tláloc.....	34
Figura 2.6. Producción mensual de hojarasca (acículas, ramas y otros) en cinco sitios de <i>Abies religiosa</i> a lo largo de un gradiente altitudinal, en el monte Tláloc.	36
Figura 2.7. Efecto de la temperatura en el porcentaje de pérdida de peso de acículas y ramas en las bolsas de descomposición de <i>Abies religiosa</i> del monte Tláloc. Los puntos representan los valores promedios correspondientes a los cinco sitios de estudio.....	37
Figura 3.1. Determinación de CO ₂ : (a) frascos sin suelo (blanco) y con suelo, (b) matraces con disolución de NaOH con indicador.....	50

Figura 3.2. Comparación del CO ₂ acumulado en suelo sin adición de lignina y suelo con incorporación de lignina, después de 17 días de incubación en laboratorio.	53
Figura 3.3. Tasa de mineralización obtenida en un suelo de <i>Abies religiosa</i> con concentraciones crecientes de lignina, después de 17 días de incubación.	54
Figura 3.4. Comparación del CO ₂ acumulado (mg C kg ⁻¹) en suelo sin adición de lignina con suelo con incorporación de lignina, después de 28 días de incubación en laboratorio.	55
Figura 3.5. Comparación de la tasa de mineralización de cada sitio con respecto al tiempo, se graficaron las pendientes sin intercepto de cada sitio, considerando la concentración de lignina de un sitio en la incubación de 28 días.	57
Figura 4.1. Análisis primario de la secuenciación de muestras de ecosistemas forestales. A) imagen del área cargada del chip en color rojo. B) resultado del número de secuencias obtenidas y el total de secuencias útiles para análisis secundario. C) representación gráfica de la longitud en pares de bases de las secuencias obtenidas.	70
Figura 4.2. Distribución taxonómica a nivel de dominio, fila, clase, orden, familia y género de las secuencias analizadas de DNA ribosomal obtenidas de suelo de pradera alpina (4060 – 4120 m de altitud) en el monte Tláloc.	72

Figura 4.3. Distribución taxonómica a nivel de dominio, fila, clase, orden, familia y género de las secuencias analizadas de DNA ribosomal obtenidas de suelo de bosque de pino área alta (3845 – 3945 m de altitud) en el monte Tláloc.	74
Figura 4.4. Distribución taxonómica a nivel de dominio, fila, clase, orden, familia y género de las secuencias analizadas de DNA ribosomal obtenidas de suelo de bosque de oyamel área alta (3370 – 3489 m de altitud) en el monte Tláloc.	76
Figura 4.5. Distribución taxonómica a nivel de dominio, fila, clase, orden, familia y género de las secuencias analizadas de DNA ribosomal obtenidas de suelo de bosque de oyamel área baja (3088 – 3196 m de altitud) en el monte Tláloc.....	78
Figura 4.6. Distribución taxonómica a nivel de dominio, fila, clase, orden, familia y género de las secuencias analizadas de DNA ribosomal obtenidas de suelo de bosque de encino área baja (2732 – 2829 m de altitud) en el monte Tláloc.	80
Figura 4.7. Comparación entre metagenomas analizados de ecosistemas forestales del monte Tláloc a nivel de dominio y filo. La escala es de 0 a 1 relativa al valor máximo encontrado de secuencias.	82
Figura 4.8. Curvas de rarefacción y diversidad alfa determinadas a partir del análisis metagenómico de los suelos de diferentes ecosistemas del monte Tláloc.	85

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los ecosistemas forestales son un importante reservorio de carbono, ya que contienen 80% de todo el C almacenado en la vegetación de la tierra y 40% del C que reside en los suelos (UNEP, 2005). Durante el último siglo, la concentración de dióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera se ha incrementado, de 280 a 380 partes por millón de 1800 a 2004, debido a las emisiones originadas por las actividades antropogénicas. Se pronostica que la concentración de CO₂ y de otros gases de efecto de invernadero de origen antropogénico, como metano y óxido nitroso, continuarán aumentando en las próximas décadas, lo que provocará incrementos de la temperatura global entre 1.9 y 4.6 °C y, en consecuencia, cambios severos en el clima (IPCC, 2007).

El ciclo del carbono es un ciclo biogeoquímico de gran importancia para la regulación del clima de la tierra y en él se ven implicadas actividades básicas para el sostenimiento de la vida (Seoáñez, 2000). Los ecosistemas forestales asimilan el CO₂ de la atmósfera mediante la fotosíntesis y, a través de la muerte y posterior depósito de la biomasa vegetal como hojas, ramas, troncos o raíces, el C se incorpora al suelo y, por medio de la respiración, se devuelve a la atmósfera (Paustian, 2005). Los microorganismos del suelo son la fuerza impulsora en el proceso de descomposición de la materia orgánica y, por lo tanto, juegan un papel clave en el ciclo de nutrientes de los ecosistemas (Porta *et al.*, 2008).

Los servicios ambientales que proporcionan los ecosistemas forestales son: control de erosión, conservación de suelos, conservación de biodiversidad, regulación climática, recarga de mantos acuíferos, regulación de la escorrentía, fijación de C,

generación de oxígeno y belleza escénica (IPCC, 2007). La acumulación de carbono orgánico en el suelo (COS) es un proceso importante para mitigar los efectos del cambio climático, debido a que el suelo, además de ser un sumidero, también es un reservorio de carbono estabilizado (Etchevers *et al.*, 2006).

Las perturbaciones en el ambiente pueden alterar los cambios de la comunidad y actividad metabólica en los microorganismos implicados en los ciclos de los nutrimentos; además, el incremento en la concentración de CO₂ y la temperatura pueden afectar la respiración del suelo, la dinámica de carbono del suelo y la estructura de la comunidad microbiana (French *et al.*, 2009).

Los ecosistemas de sistemas montañosos son muy sensibles a la deforestación y al cambio climático por lo que sus almacenes de carbono están en riesgo de perderse (IPCC, 2007). Ejemplo de ello es la Sierra Nevada, área cercana a la zona metropolitana de la Ciudad de México, donde la tasa de crecimiento poblacional de algunos de sus municipios es de hasta 12% anual (Plan Estatal de Desarrollo del Estado de México, 2008); este incremento de la población puede afectar los servicios ambientales que dichos ecosistemas proporcionan.

La Sierra Nevada es un importante almacén de carbono; a pesar de ello, hay poca información sobre sus ecosistemas y tipos de suelo, particularmente en la parte norte, donde se encuentra el monte Tláloc; sería valioso conocer como son los flujos de carbono en los suelos, las entradas y salidas de CO₂ y como este es afectado por los factores bióticos y abióticos. Dada la importancia biológica, económica y la presión a que está sometida esta zona ecológica templada subhúmeda de México, es urgente

conocer estos sistemas, desde el punto de vista ecológico, florístico y biogeográfico. Los microorganismos, el tipo de vegetación y el gradiente de temperatura contribuyen en la regulación de la acumulación del C en el suelo y la emisión del mismo. En un estudio realizado en esta área (Martínez-Rojas, 2010) se observó que la cantidad de C almacenado en el suelo y la vegetación varía con el gradiente altitudinal y el tipo de ecosistema, donde el de mayor acumulación de C es el bosque de oyamel; no obstante, por efecto del gradiente altitudinal se encontró que los suelos de pradera alpina tienen mayor acumulación de C.

Dada la importancia de esta región es necesario generar conocimiento básico para la conservación de sus ecosistemas, su diversidad biológica y hacer uso sustentable de sus recursos a largo plazo. Por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar los factores bióticos y abióticos que afectan la cinética de carbono, en las entradas (hojarasca) y las salidas (descomposición, mineralización y flujos de CO₂) y los grupos de microorganismos del suelo que intervienen en estos procesos de los ecosistemas del monte Tláloc.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Determinar los factores bióticos y abióticos que afectan la acumulación de carbono en el suelo y la diversidad de las comunidades bacterianas del suelo en ecosistemas del monte Tláloc.

1.2 Objetivos particulares

- 1.2.1. Estimar la producción anual de hojarasca (acículas y ramas) y sus tasas de descomposición en un bosque de oyamel (*Abies religiosa*).
- 1.2.2. Evaluar el efecto de la temperatura y humedad en la respiración microbiana.
- 1.2.3. Estimar la tasa de mineralización del carbono en muestras de suelo provenientes de cinco sitios de *Abies religiosa* mediante incubaciones en laboratorio con concentraciones crecientes de hojarasca (lignina).
- 1.2.4. Determinar la diversidad de comunidades bacterianas en el suelo de los ecosistemas de encino, oyamel, pino y pradera alpina del monte Tláloc.

2. HIPÓTESIS

2.1 Hipótesis general

Una mayor altitud conduce a bajas temperaturas, alta humedad y mayor producción de hojarasca que resulta en menor descomposición y mayor acumulación de carbono en el suelo de oyamel del monte Tláloc.

2.2 Hipótesis particulares

2.2.1. La producción de hojarasca aumenta con la altitud, mientras que la descomposición disminuye.

2.2.2. La disminución de la temperatura reduce la respiración microbiana.

2.2.3. La tasa de mineralización de carbono en condiciones constantes de temperatura y humedad tiende a disminuir en suelos provenientes de mayor altitud del bosque de *Abies religiosa*.

2.2.4. La diversidad de microorganismos en ecosistemas del monte Tláloc disminuye con el incremento de altitud.

CAPÍTULO I

1. Revisión de literatura

1.1 El cambio climático

Los gases de efecto invernadero (GEI), principalmente CO₂, CH₄, N₂O y vapor de agua, en la atmósfera atrapan el calor (radiación infrarroja); éste efecto juega un papel primordial en la vida, ya que permite que la tierra sea habitable, manteniendo la temperatura constante, más cálida de lo que podría ser si no existiera la atmósfera (IPCC, 2007). El incremento en el volumen de los gases invernadero en la atmósfera provoca una mayor temperatura y, en consecuencia, el clima se modifica provocando el denominado Cambio Climático Global (CCG), el cual afecta a todas las regiones del planeta en mayor o menor medida, ya sea con inundaciones, sequías, cambios en rutas de migración y comportamiento de especies, o en la productividad de los ecosistemas, el derretimiento de los polos, el aumento del nivel de los océanos y los cambios en el clima del planeta (González, 2007; IPCC, 2007).

El CCG es uno de los principales problemas que enfrenta el mundo. La temperatura se incrementó en 0.74 °C durante el último siglo, el nivel del mar ha aumentado a una tasa de 1.8 mm año⁻¹, en el periodo 1901-2003; la cubierta promedio de hielo en el Ártico, disminuye a una tasa de 2.7% por década; y los cambios en los regímenes hídricos son notorios a diferentes latitudes (IPCC, 2007).

Se estima que el aumento de la concentración de los GEI en la atmósfera, por su continua emisión, provocará incrementos de la temperatura global, entre 1.9 y 4.6

°C y cambios severos en el clima, lo que traerá serias consecuencias sobre los sistemas biológicos, sociales y económicos (IPCC, 2007).

Pan *et al.* (2011) mencionan que los bosques tropicales son dominantes, en términos de intercambio de CO₂ entre el suelo y la atmósfera. Una gran cantidad de CO₂ atmosférico ha sido secuestrada por el sistema natural de los suelos forestales (4.0 Pg C año⁻¹), pero el beneficio es significativamente compensado por las pérdidas de C por la deforestación tropical (2.9 Pg C año⁻¹). Este resultado pone de manifiesto el potencial para la iniciativa “Reducción de Emisiones por Deforestación y Degradación” (REDD), para disminuir el riesgo del cambio climático. Sin embargo, una advertencia importante es que la adición de C geológico de los combustibles fósiles en el ciclo del C actual y el secuestro por parte de la biosfera no está exenta de riesgo, ya que el secuestro de C es reversible.

La conversión de bosques con dosel cerrado a usos agrícolas causa una pérdida de aproximadamente 85% de la densidad de la biomasa vegetal. Casi 20% del C total secuestrado en la biomasa de la región de ocho estados tropicales del sureste de México, en 1977, se perdió hacia la atmósfera en 1992. Así, con base en estimaciones, los bosques tropicales de México, que representan 24% del territorio nacional, contribuyeron con 36% de las emisiones anuales por cambio de uso de suelo y cubierta vegetal. Esto demuestra que el sureste de México experimentó un proceso de rápida deforestación y cambio de uso de suelo durante los 15 años, en relación con el resto de México. Estos resultados ilustran los dramáticos impactos antropogénicos del cambio de uso de suelo y cubierta vegetal en la pérdida de la transformación de la biomasa terrestre y el ciclo de C en la región tropical de México (Cairns, 2000).

Algunos estudios sostienen que el cambio climático está causando la migración de plantas y animales, y cambios en los componentes de las comunidades (Walther *et al.*, 2002). Malezas, enfermedades de plantas e insectos podrían propagarse de áreas más calientes a frías. Los inviernos más calientes permitirán la supervivencia de algunas larvas en donde antes no era posible (Bate *et al.*, 2002).

Con fines de estudiar cual podría ser la respuesta de diferentes poblaciones de pinos mexicanos (*Pinus devoniana*, *P. leiophylla* y *P. pseudostrobus*) al cambio climático, se analizó el efecto de diferentes intervalos altitudinales, sobre la supervivencia y el crecimiento de las poblaciones. Doce poblaciones de *Pinus* se recolectaron a través de un gradiente altitudinal (1650-2520 m) en una zona montañosa en la región centro-oeste del Cinturón Volcánico Trans-Mexicano, y se plantaron en tres sitios forestales de diferentes alturas (baja: 2110, medio: 2422 y superior: 2746 msnm). En general, *P. devoniana* y *P. pseudostrobus* reducen el crecimiento cuando se mueven a una mayor altitud (sitios más fríos), mientras que *P. leiophylla* exhibe un crecimiento similar en todas las transferencias altitudinales probadas, sugiriendo una mayor plasticidad fenotípica de esta especie (Castellanos-Acuña *et al.*, 2015).

1.2 Ecosistemas forestales

En el proceso de la fotosíntesis, las plantas verdes toman el CO₂ de la atmósfera y lo utilizan para elaborar azúcares y otros compuestos orgánicos necesarios para su crecimiento y metabolismo. Los árboles almacenan el C en la madera y otros tejidos, hasta su muerte, cuando al descomponerse, por acción de los microorganismos del

suelo, lo liberan a la atmósfera, en forma de CO₂, monóxido de carbono (CO) o metano (CH₄); parte del C puede integrarse al suelo como materia orgánica (Bishop y Landell-Mills, 2006).

Los bosques juegan un papel importante en la regulación del clima mundial. Sin embargo, su función y la importancia de los bosques como fuentes o sumideros de C tienden a variar, según el tipo de bosque (Kim, 2009). Geográficamente, los bosques tropicales almacenan 471 ± 93 Pg C (55%), los bosques boreales 272 ± 23 Pg C (32%) y los bosques templados 119 ± 6 Pg C (13%) (Pan *et al.*, 2011).

El C total almacenado en los bosques tropicales, boreales y templados de todo el mundo se ha estimado en 861 ± 66 Pg C, con 383 ± 30 Pg C (44%) en el suelo (a 1 m de profundidad), 363 ± 28 Pg C (42%) en la biomasa viva (sobre y bajo la superficie terrestre), 73 ± 6 Pg C (8%) en la madera muerta y 43 ± 3 Pg C (5%) en la hojarasca (Pan *et al.*, 2011). Por lo tanto, una forma de mitigar los efectos que genera el CO₂, además de reducir las emisiones, es fijarlo y mantenerlo el mayor tiempo posible en los reservorios de la biomasa (árboles, raíz, arbustos y hierbas) y el suelo. Para este efecto, el manejo de la biomasa viva, la materia orgánica muerta y la materia orgánica del suelo son componentes clave en la dinámica y conformación de reservorios estables de carbono (De Jong *et al.*, 2004).

Los bosques se encuentran gravemente amenazados en numerosas partes del mundo. Durante la década de los noventa se perdieron, en promedio, casi 15 millones de hectáreas de bosque por año, sobre todo en las zonas tropicales (FAO, 2001); esta

pérdida disminuyó a 13 millones de hectáreas por año, en el período 2000-2005, pero sigue siendo alta (FAO, 2006).

1.3 Fijación de carbono

El carbono es esencial para construir las moléculas orgánicas que caracterizan a los organismos vivos. La principal fuente de carbono para los productores es el CO₂ del aire atmosférico, que también se encuentra disuelto en lagos y océanos. Además, hay carbono en las rocas calizas y en los combustibles fósiles (carbón mineral y petróleo) (Seoáñez, 2000).

La respiración es uno de los principales componentes de los ecosistemas, donde pequeños cambios en la respiración pueden afectar el secuestro de carbono en el suelo. La respiración del suelo es la suma de un componente autótrofo por parte de las raíces, y un componente heterótrofo, por parte de los microorganismos del suelo que descomponen la materia orgánica, tanto de la hojarasca sobre el suelo, como bajo el suelo. Además, presenta una alta variabilidad espacial y temporal. La heterogeneidad espacial de la respiración del suelo se ha relacionado con la biomasa de raíz, la biomasa microbiana, la cantidad de hojarasca, el carbono orgánico del suelo, el nitrógeno del suelo, la capacidad de intercambio catiónico, la densidad aparente del suelo, la porosidad del suelo, el pH del suelo y la topografía del sitio. Por ejemplo, en un suelo forestal, mientras mayor aporte de hojarasca se tenga en el suelo mayor será la respiración. Además, la caída de hojarasca es clave en la medición de almacenes de C y significativo en la producción primaria neta. Las variaciones estacionales de la

respiración del suelo, a menudo, se han asociado con cualquiera de los cambios en el suelo, debidos a la temperatura y al contenido de agua en el suelo (Epron *et al.*, 2004).

La fijación de C por la cubierta forestal se basa principalmente en dos enfoques: absorberlo y evitar su emisión. La primera incluye reforestación, agrosilvicultura y aumento de la cubierta forestal existente (como mejores prácticas de silvicultura), así como la sustitución de los combustibles fósiles por biomasa producida de manera sostenible, como biocombustibles o bioenergía. La segunda considera la prevención o reducción de la deforestación y el cambio de uso de suelo o la reducción del daño a los bosques existentes. Ésta puede incluir el aumentar la eficiencia productiva de los sistemas de agricultura de corte y quema o mejorar la eficiencia en el uso final de los recursos, como la leña; ambos reducirían la presión sobre los bosques existentes (Bishop y Landell-Mills, 2006).

Las emisiones de gases de efecto invernadero han alterado significativamente el clima global y seguirán haciéndolo en el futuro. Un aumento en la frecuencia, duración y severidad de la sequía, y el estrés por calor, asociado con el cambio climático, por incremento de la temperatura podría alterar la composición, estructura y biogeografía de los bosques en muchas regiones. De particular preocupación son los posibles incrementos en la mortandad de árboles asociados con el estrés fisiológico, inducido por el clima y la interacción con otros procesos climáticos, incendios forestales (Allen *et al.* 2010). Otros autores señalan que un aumento en el CO₂ incrementa el crecimiento de la planta y, en consecuencia, la cantidad de ectomicorrizas en el suelo puede incrementarse. Por lo que se espera que la

fotosíntesis aumente dada la mayor temperatura y concentración de CO₂, pero solo si el suministro de agua, no está limitado (Heinemeyer *et al.*, 2006).

El efecto de la respiración del suelo en el manejo forestal es otro resultado de cambios de flujos de CO₂, más que de la temperatura del suelo y la humedad. Se ha encontrado que las prácticas silvícolas, como aclareos y quemas, pueden afectar los flujos de CO₂ y alterar la retención del carbono del suelo (Guo *et al.*, 2010).

1.4 Producción de hojarasca

La producción de hojarasca es de gran importancia en la productividad primaria neta de los ecosistemas forestales, se define como el total de materia orgánica producida durante un tiempo específico en un ecosistema y aunque no constituye una estimación completa de la producción de fitomasa, representa el componente de la vegetación de crecimiento más intenso. Las fuentes orgánicas acumuladas en la superficie del suelo que dan origen a la materia orgánica, en bosques templados son partículas de hojarasca (acículas, trozos de madera, ramas, conos, corteza, raíces) y organismos del suelo (Quinto *et al.*, 2007).

La hojarasca es una fuente importante de fácil mineralización de C, N y P para el metabolismo microbiano en los ecosistemas forestales; sin embargo, su descomposición depende de una variedad de factores bióticos y abióticos, incluyendo composición química de la hojarasca, especie de planta, propiedades del suelo y el clima. Debido al efecto de la temperatura, la humedad y la acción de la biomasa microbiana, los elementos químicos contenidos en la hojarasca pueden liberarse y ser

absorbidos por las raíces de la plantas, dando lugar a un nuevo ciclo de nutrimentos y carbono (Edmonds, 1990; Claudino *et al.*, 2008).

La producción anual de hojarasca es mayor durante el desarrollo del rodal hasta el cierre del dosel, y luego se mantiene constante durante un largo período y disminuye en rodales maduros. Los factores que influyen en el aporte de hojarasca en los bosques naturales son altitud, latitud, estación del año, densidad arbórea, área basal, edad arbórea y tipos de vegetación. La hojarasca es la principal entrada de MOS y constituye una parte importante en el reservorio de C de los bosques tropicales, boreales y templados de todo el mundo, el cual se estima en 43 ± 3 Pg C (Pan *et al.*, 2011).

En un estudio realizado en los bosques monoespecíficos dominados por *Salix humboldtiana* y *Tessaria integrifolia* se encontraron valores de producción aérea similares, entre sí 6.8 ± 1.2 y 6.5 ± 1.3 Mg materia seca ha^{-1} año^{-1} , respectivamente, y se diferenciaron de bosques mixtos de *Albizia inundata* y *Nectandra angustifolia* con un aporte menor, 3.3 ± 0.5 y 9.6 ± 1.1 Mg materia seca ha^{-1} año^{-1} , respectivamente (Aceñolaza *et al.*, 2009).

En plantaciones forestales de *P. greggii* y *P. cembroides*, el aporte de hojarasca total fue de 1.072 y 0.976 Mg ha^{-1} año^{-1} , respectivamente, y las hojas representaron $92.3 \pm 8.1\%$ de la hojarasca total en *P. greggii* y $94.3 \pm 3.8\%$ en *P. cembroides*. Los resultados indican que la caída de hojarasca es dependiente de la especie, así como de factores climáticos, en especial del viento y la temperatura (Gutiérrez *et al.*, 2012). En bosques de Chiapas, se cuantificó la producción de hojarasca en comunidades

sucesionales del bosque de pino-encino; después de un año, la máxima acumulación de hojarasca se registró en el bosque de pino-encino ($7.59 \pm 0.29 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$), seguido por el bosque de encino ($6.58 \pm 0.27 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$), el bosque de pino-encino-liquidámbar ($5.33 \pm 0.18 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$), el bosque de pino ($5.18 \pm 0.19 \text{ Mg} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$) y el menor aporte fue en parcelas bajo restauración forestal ($2.43 \pm 0.13 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$). Se observó que el incremento en la acumulación de hojarasca con la etapa sucesional de un sitio se atribuye a la mayor producción de biomasa viva y al incremento en la caída de biomasa foliar (Rocha-Loredo y Ramírez-Marcial, 2009).

1.5 Materia orgánica del suelo (MOS)

La masa total de células vivas de un lugar determinado se denomina biomasa, mientras que la masa de células muertas, incluso aunque estén todavía unidas a un organismo vivo, se denomina necromasa. A un árbol se le considera como biomasa, a pesar de que la mayor parte de sus células estén ya muertas. La materia orgánica contribuye al crecimiento de la vegetación y determina las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Magdoff y Weil, 2004).

La MOS se define como la fracción de suelo enriquecida con C que se forma de una combinación homogénea de residuos de plantas, animales y microorganismos. Las fracciones de MOS pueden dividirse en fracciones lábiles y estables. Las fracciones lábiles se descomponen en semanas o meses, mientras que las estables pueden tardar años o décadas. Las fracciones lábiles incluyen residuos de raíces, residuos de partes aéreas de plantas, macro y microorganismos, desechos animales y vegetales, sustancias no-húmicas enriquecidas de C como ligninas, celulosa y

polifenoles. La fracción estable incluye sustancias húmicas, las cuales se subdividen en ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas; también incluye ácidos orgánicos y pigmentos que están asociados con minerales del suelo, junto con algunos polímeros que se liberan de ácidos libres de aminas (Payán, 2010).

La materia orgánica condiciona las propiedades físicas del suelo (tamaño de poro, estabilidad de la estructura, densidad aparente, mejor aireación, infiltración del agua, menor erosión) e incide sobre la disponibilidad de nutrimentos y la actividad biológica del suelo. Por todo ello, la materia orgánica constituye uno de los indicadores de la calidad de los suelos (Porta *et al.*, 2008).

La fracción coloidal de la MOS tiene carácter anfótero. Esta propiedad química le permite el almacenamiento temporal de nutrimentos, en una forma fácilmente disponible para las plantas, y amortiguar los cambios de pH en el suelo. Algunas propiedades biológicas de la MOS constituyen una fuente de energía metabólica para los microorganismos y la fauna del suelo. Al mineralizarse, se liberan macroelementos y microelementos para las plantas; además al biodegradarse puede liberar vitaminas y aminoácidos. También se ha señalado que contiene reguladores del crecimiento y puede tener efectos antibióticos (Porta *et al.*, 2008).

Los microorganismos del suelo son la fuerza impulsora en el proceso de descomposición de la materia orgánica y, por lo tanto, juegan un papel clave en el ciclo de nutrimentos de los ecosistemas (Djukic *et al.*, 2010). Los suelos tienen capacidad para almacenar C, al poderlo mantener en forma de materia orgánica que puede permanecer estable durante largo tiempo, lo que supone un efecto favorable, al

contribuir a disminuir el calentamiento global (Porta *et al.*, 2008). La descomposición de la MOS representa uno de los mayores flujos en el ciclo global del C terrestre, el cual se estima en 60 Pg C año⁻¹ (Djukic *et al.*, 2010).

1.6 Tasa de descomposición

Los niveles de carbono en el suelo son regulados por el balance entre las entradas de C por residuos de la biomasa aérea y radical, y las pérdidas, por emisiones de CO₂ de la materia orgánica en descomposición. El ambiente, la calidad del mantillo y la composición de las comunidades microbianas son los principales factores que controlan este proceso; la alteración de cada uno de estos factores puede conducir a cambios en las tasas de descomposición y en la cantidad de C que puede almacenarse en el suelo. En particular la actividad microbiana es afectada por la temperatura, el contenido de agua, los nutrientes, la disponibilidad de oxígeno, el pH, el C y el nitrógeno del sustrato, así como por factores biológicos (Hattenschwiler *et al.*, 2005). Cambios en estos factores resultan en alteración de los flujos de CO₂ a la atmósfera y en el balance de carbono del suelo (Kueppers y Harte, 2005).

La tasa de descomposición de la hojarasca varía entre especies, debido a diferencias en los contenidos de nitrógeno y lignina; los materiales vegetales ricos en lignina son resistentes a la degradación microbiana, mientras que los materiales con alto contenido de nitrógeno se descomponen con mayor rapidez que aquellos con bajo nitrógeno (Cornelissen, 1996). La relación lignina:N es un indicador de recalcitrancia, dado que los residuos vegetales con una relación lignina:N alta son más resistentes a la descomposición que aquellos con una relación lignina:N baja (Rasse *et al.*, 2005).

En los bosques templados, la hojarasca de latifoliadas se descompone más rápidamente que la hojarasca de acículas, lo cual está relacionado con la cantidad de lignina y nitrógeno presente en los tejidos. En condiciones controladas, las especies caducifolias se descomponen el doble de rápido que las perenifolias (Prescott *et al.*, 2004).

1.7 Microorganismos del suelo

Los microorganismos del suelo son capaces de sintetizar moléculas orgánicas complejas a partir de compuestos inorgánicos sencillos, como el CO₂, minerales y agua. En la tierra, los organismos fotosintéticos son capaces de fabricar moléculas orgánicas complejas a partir de compuestos inorgánicos sencillos, utilizando la energía de la luz solar. Estos organismos incluyen plantas, algas verdes, algunos protistas (como el fitoplancton) y algunas bacterias (como las cianobacterias); además, existen organismos en los respiraderos hidrotermales, en las profundidades del mar, que están bien adaptados para fijar el CO₂ en un intervalo inusual de temperatura, presión, pH y toxicidad por metales (Minic y Thongbam, 2011).

El C se agrega a los suelos, principalmente a través de la muerte y posterior depósito de la biomasa, hojas, tallos y raíces de las plantas superiores, las cuales asimilan el CO₂ de la atmósfera mediante la fotosíntesis. Los compuestos orgánicos que forman los tejidos vegetales; es decir, celulosa, hemicelulosa, azúcares, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, ceras y otros compuestos, son la fuente de alimento para una amplia gama de organismos heterótrofos que residen en el suelo. Estos organismos incluyen bacterias, hongos y otros microorganismos, como descomponedores primarios de materiales vegetales, y una colección diversa de

micro-, meso- y macrofauna (Paustian, 2005). Algunas de las bacterias que participan en este proceso degradando la celulosa son: *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, algunos hongos son *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, y entre los actinomicetos que también toman parte están *Nocardia*, *Streptomyces* (Sánchez *et al.*, 2005).

1.7.1 Microorganismos del suelo y cambio climático

Una de las contribuciones más discutidas de los microorganismos del suelo al cambio climático es su papel en la descomposición de la MOS y la noción de que el calentamiento global acelerará la tasa de actividad microbiana heterotrófica, lo que aumentará el flujo de salida de CO₂ a la atmósfera y las exportaciones de disolución de C orgánico por lixiviación hidrológica (Davidson y Janssens, 2006). Debido a que la tasa de respiración del suelo se piensa que son más sensibles a la temperatura, se prevé que el calentamiento climático aumentará la transferencia neta de C del suelo a la atmósfera, creando una retroalimentación positiva sobre el cambio climático (Bardgett *et al.*, 2008).

Las perturbaciones en el ambiente del suelo pueden alterar los cambios de la comunidad y actividad metabólica en los microorganismos implicados en los ciclos de los nutrientes del suelo, y dar lugar a que la supervivencia y la virulencia, cada vez sea mayor. Las alteraciones en la concentración de CO₂ y la temperatura pueden alterar la respiración del suelo, la dinámica del carbono del suelo y la estructura microbiana de la comunidad (French *et al.*, 2009).

Es importante destacar que el cambio climático tiene efectos directos e indirectos sobre las actividades de los microorganismos del suelo. Los primeros incluyen influencia de los microorganismos del suelo en la producción de GEI, cambios en la temperatura, la precipitación y fenómenos climáticos extremos. En los segundos están la productividad y la diversidad de plantas que alteran las condiciones físico-químicas del suelo, el suministro de C al suelo, la estructura y la actividad de las comunidades microbianas que participan en los procesos de descomposición y liberación de C del suelo (Bardgett *et al.*, 2008).

La humedad y la temperatura son factores importantes que influyen en la respiración del suelo. En condiciones secas, la actividad de los microorganismos en las raíces suele ser baja, generando bajos flujos de salida de CO₂ en el suelo; a temperaturas por debajo de 5 °C la actividad microbiana disminuye y aumenta conforme la temperatura se incrementa, siendo 30 °C el punto óptimo (Sanci *et al.*, 2009). Un aumento en la humedad del suelo favorece la actividad biológica del suelo, pero con humedad del suelo alta los flujos de salida total de CO₂ en el suelo se reducen, debido a la limitada difusión de oxígeno y la represión posterior de las emisiones de CO₂. La condición de humedad adecuada para la descomposición es de 50% a 60% del espacio de los poros llenos de agua (Uhlírová *et al.*, 2005; Sanci *et al.*, 2009).

Los microorganismos obtienen su energía al descomponer los sustratos orgánicos; en este proceso se libera dióxido de carbono (CO₂) por medio de la respiración microbiana y es el principal causante de la liberación de carbono en ecosistemas terrestres y de pequeños cambios en la respiración que pueden afectar

el almacén de carbono en el suelo. Esto conduce a altas concentraciones de CO₂ en el aire del suelo, donde el almacenamiento total puede igualar o superar el almacenamiento de CO₂ atmosférico en los bosques (Janssens *et al.* 2001).

En un estudio en donde se determinó la respiración del suelo en cuatro sitios de plantaciones de coníferas se encontró que la actividad fisiológica de las plantas de zonas templadas es generalmente máxima en primavera y otoño; como resultado, la respiración del suelo se ve estimulada por la actividad de la planta en la temporada de crecimiento. La humedad del suelo en las estaciones de crecimiento activan la respiración del suelo, debido al aumento de la actividad microbiana y los procesos fisiológicos de la raíz. La tasa de respiración del suelo alcanzó valores más altos en los meses de otoño, lo cual coincidió con el periodo de lluvias en el área de investigación. Por lo tanto, es probable que la respiración del suelo se haya estimulado no sólo por la óptima temperatura y humedad del suelo, sino también por el aumento de poblaciones microbianas y la actividad de la raíz en esos momentos (Akburak y Makineci, 2013).

1.8 Mineralización de C en ecosistemas forestales

La diversificación de especies de plantas puede afectar el ambiente del suelo de diferentes maneras, debido a las variaciones en la cantidad y la calidad del material vegetal, lo cual modifica el contenido de materia orgánica del suelo (MOS), la actividad microbiana y los ciclos de nutrientes. Estos cambios alteran el potencial del suelo para suministrar o almacenar nutrientes, debido a cambios en la mineralización e inmovilización (Liborio *et al.*, 2010), dado que estas reacciones son catalizadas por

bacterias y hongos que sintetizan y liberan enzimas extracelulares como ureasas, proteasas, esterases, fosfatasas (Rivas *et al.*, 2009).

Las bacterias y los hongos son los principales organismos mineralizadores en los bosques de coníferas, donde los azúcares simples son completamente transformados a CO₂ y agua; sin embargo, la descomposición de sustratos orgánicos complejos en ecosistemas forestales no es completa. Los compuestos orgánicos recalcitrantes tienden a acumularse en el suelo en forma de humus (Edmonds, 1990).

La composición química de la hojarasca como lignina, polifenoles, celulosa, y hemicelulosa, y la relación C:N determinan su velocidad de mineralización. Se ha reportado que la relación lignina:N puede utilizarse como indicador de la mineralización de la MO y liberación de N; es decir, hojarasca con una alta concentración de N usualmente presenta una alta producción de CO₂ y pierde peso rápidamente con respecto a materiales con una baja concentración de N (Silveira *et al.*, 2011). La descomposición de la hojarasca es más rápida con materiales vegetales de mayor calidad, es decir, material vegetal menos lignificado y con mayor contenido nutrimental (Prescott *et al.*, 1992).

En un estudio realizado por Silveira *et al.* (2011) en hojarasca de pino, encino y una mezcla de pino–encino, con una relación lignina:N de 27, 15 y 13 respectivamente, se encontró que la tasa de mineralización (C-CO₂) para pino oscilo entre 7.6% a 8.6% para encino de 9.2% a 10.1% y para la mezcla pino-encino de 9.9% a 10.4%; por lo que, mayor concentración de lignina y alta relación lignina:N aumenta el tiempo de mineralización de la hojarasca.

La lenta mineralización de la hojarasca de coníferas se debe a la presencia de ceras y resinas. La mayoría de los subproductos se transforman en sustancias húmicas en el suelo. En andisoles, la cantidad de arcillas amorfas, óxidos, hidróxidos de aluminio o hierro, y los complejos organominerales (sustancias húmicas, particularmente la fracción recalcitrante) contribuyen a la estabilización y descomposición del carbono. Se ha encontrado una relación positiva entre el carbono del suelo y las reservas de complejos húmicos extraídos con pirofosfato de sodio (Cp), donde en suelos con presencia de alofano, de 28% al 40%, el C se encuentra como Cp. Se ha mencionado que existe una interacción entre la materia orgánica del suelo y los iones metálicos, en donde los complejos húmicos pueden saturar fácilmente los sitios de intercambio en suelos de origen volcánico. La interacción de los compuestos húmicos con los óxidos de Al y Fe proporcionan protección física y estabilización en andisoles (Panichini *et al.*, 2012; Galvan-Tejada *et al.*, 2014).

1.9 Metagenómica

El suelo es un sistema complejo que contiene una gran cantidad y diversidad de microorganismos. Actualmente, con la metagenómica se ha logrado conocer y estudiar en más detalle todo ese material genómico desconocido. La metagenómica es una nueva aplicación de la biología molecular, la cual permite aislar, identificar y caracterizar el material genético total proveniente directamente de muestras ambientales; además, es una ciencia relativamente nueva que está ayudando a entender cómo los microorganismos, cultivables o desconocidos, se adaptan e interactúan con factores bióticos y abióticos en el suelo y promete revelar nuevas moléculas, las cuales pueden mejorar diversas aplicaciones biotecnológicas

(Hernández-León *et al.*, 2010). El aislamiento del DNA genómico inicia con la extracción de DNA, la cual se realiza con métodos convencionales o con “kits” producidos por compañías privadas para un rango específico de material biológico. Sin embargo, el costo de estos productos puede ser una limitante cuando se trata de una gran cantidad de muestras (Park, 2007).

Los métodos convencionales para aislamiento de DNA de material biológico incluyen tres pasos. El primero es lisis de la pared celular y membranas; el segundo eliminación de contaminantes como proteínas, polisacáridos u otros compuestos celulares, y por último recuperación de DNA puro (Sambrook *et al.*, 1989).

1.10 Área de estudio en el monte Tláloc

El área de estudio se encuentra dentro de la cordillera Sierra Nevada, en el Estado de México, está ubicada en la parte oeste del monte Tláloc, es un estratovolcán de 4125 m de altura de la Faja Volcánica Transmexicana, entre los paralelos 19° 23'43” y 19° 28'37” latitud norte y entre los meridianos 98° 42'51” y 98° 48'12” longitud oeste. La última actividad volcánica del monte Tláloc fue hace aproximadamente $30\,460 \pm 390$ años atrás (García, 2009). Los ecosistemas que presenta el monte Tláloc a lo largo del gradiente altitudinal son: bosque de encino (*Quercus rugosa* Née y *Q. laurina* Humb et Bonpl.), bosque de oyamel (*A. religiosa* (H. B. K.) Schl. et. Cham), bosque de pino (*Pinus hartwegii* Lindl.) y pastizal alpino (*Agrostis tolucensis* Kunth, *Alchemilla procumbens* Rose y *Calamagrostis intermedia* (J. Presl) Steud (Sánchez y López, 2003).

El clima es semifrío y presenta una temperatura media anual entre 10 y 18 °C, la temperatura disminuye a mayor altitud (Sánchez y López, 2003). La precipitación total anual varía a lo largo del gradiente altitudinal de 800 mm, en la parte baja área agrícola, a 1200 mm en la parte más alta, donde se encuentra el bosque de pino y pradera alpina (INEGI, 2001).

En monte Tlálloc se ha clasificado como Mollic-silandic Andosols, con las siguientes características: edad de formación, 6200 años; densidad aparente, 0.44 g cm⁻³; pH, 5.65; CO, 8.72%; Al, 18.3 mg kg⁻¹ y Fe, 9.16 mg kg⁻¹, extraídos con oxalato de amonio; Al, 9.29 mg kg⁻¹ y Fe, 13.01 mg kg⁻¹ extraídos con pirofosfato de sodio; Al, 5.81 mg kg⁻¹, y Fe, 1.67 mg kg⁻¹, extraídos con bicarbonato de ditionito; fósforo, 3 mg kg⁻¹, determinado con la metodología de Bray y Kurtz; y fósforo total, 2494.51 mg kg⁻¹, cuantificado con espectroscopia de fluorescencia de rayos X (Galván-Tejada *et al.*, 2014).

CAPÍTULO II

2. Producción y tasa de descomposición de hojarasca en un bosque de *Abies religiosa* del monte Tláloc

2.1 Resumen

Los depósitos de carbono en suelos forestales son controlados por el equilibrio entre la entrada de carbono por la hojarasca y la salida de carbono asociada a la respiración heterotrófica. El objetivo de este trabajo fue evaluar algunos de los factores que afectan la acumulación de carbono en los suelos en un bosque de oyamel (*Abies religiosa*) a lo largo de un gradiente altitudinal en el monte Tláloc. Se establecieron cinco sitios de estudio, distribuidos en un intervalo de 3093 a 3489 m de altitud. Se cuantificó caída de hojarasca, contenido de lignina y N del material vegetal, tasa de descomposición de la hojarasca, flujos de CO₂, humedad y temperatura del suelo. La caída de hojarasca fue más alta en los sitios de mayor altitud que en los localizados a menor altitud, lo cual se atribuye a que los primeros tuvieron mayor densidad arbórea. La descomposición de la hojarasca fue afectada por la temperatura, donde los sitios de menor altitud tendieron a presentar las mayores constantes de descomposición. El sitio de mayor altitud tuvo el más alto contenido de carbono orgánico y soluble, posiblemente por efecto de alta caída de hojarasca y baja descomposición en comparación con los dos sitios de menor altitud. Sitios con alta densidad arbórea casi siempre tuvieron los más altos niveles de humedad. Los resultados obtenidos, particularmente de la parte baja y alta del bosque de oyamel, sugieren que la temperatura y la densidad arbórea podrían ser dos factores críticos para mantener los reservorios de carbono en este ecosistema. Es probable que el aumento de la

temperatura y disminución de la cubierta arbórea podrían resultar en la disminución del carbono del suelo en el bosque de oyamel.

Palabras clave: carbono, relación lignina:N, emisiones de CO₂, constante k.

CHAPTER II

Production and decomposition rate of litter in the fir forest of mount Tlaloc

2.2 Abstract

Carbon stocks in forest soils are controlled by the balance between carbon inputs from litterfall and carbon output associated to heterotrophic respiration. The aim of this study was to evaluate some of the factors affecting the accumulation of carbon in soil of fir forest (*Abies religiosa*) along an altitudinal gradient on mount Tlaloc. Five study sites distributed in a range of 3093-3489 m altitude were settled. Litterfall, lignin and N contents, decomposition rate, CO₂ efluxes, soil moisture and temperature were quantified. The litterfall was higher at sites of high altitude than in those located at low altitude, which was attributed that the first ones had higher tree density. The litter decomposition was affected by temperature, where sites located at lower altitude tended to have lower constant of litter decomposition. The higher altitude site had the highest content of soluble organic carbon and total carbon, possibly due to higher litter production and lower decomposition compared to the two sites located at lower altitude. Sites with high tree density almost always had the highest levels of moisture. The results, particularly those from the upper and lower sites of fir forest, suggest that temperature and tree density could be two critical factors in maintaining soil carbon

stocks in this ecosystem and that any change in these factors could result in reduction of soil carbon in the fir forest.

Key words: carbon, lignin:N ratio, CO₂ efluxes, constant k.

2.3 Introducción

Los suelos de los ecosistemas terrestres son grandes reservorios de carbono; se estima que contienen dos veces más C que la vegetación o la atmósfera (IPCC, 2007). Los depósitos de C en suelos forestales son determinados por el equilibrio entre las entradas (hojarasca) y salidas (tasa de descomposición y emisiones de CO₂) de C (Wang y D'Odorico, 2008); este proceso, a su vez, es regulado por el clima y la calidad de la hojarasca (Kenneth *et al.*, 1998). La hojarasca es la principal entrada de materia orgánica al suelo y constituye una parte importante en los reservorios de carbono de los bosques tropicales, boreales y templados de todo el mundo, la cual se ha estimado en 43 ± 3 Pg C (Pan *et al.*, 2011).

Los microorganismos del suelo son la fuerza impulsora en el proceso de descomposición de la materia orgánica. La humedad y la temperatura son factores importantes que influyen en la descomposición; en condiciones secas, la actividad de los microorganismos es baja, resultando en bajos flujos de CO₂ en el suelo, a temperaturas por debajo de 5 °C la actividad microbiana disminuye y aumenta conforme la temperatura se incrementa, siendo 30 °C el punto óptimo (Sanci *et al.*, 2009). Un aumento en la humedad del suelo normalmente incrementa la actividad

biológica, pero niveles muy altos de humedad reducen la respiración, debido a la limitada difusión de oxígeno; la condición de humedad óptima para la descomposición es de 50 a 60% del espacio poroso (Uhlírová *et al.*, 2005). Se ha estimado que la descomposición de la materia orgánica representa uno de los mayores flujos en el ciclo global del C terrestre, 60 Pg C año⁻¹ (Djukic *et al.*, 2010)

Los flujos de C por la respiración también se han atribuido a las diferencias en la calidad de la hojarasca (Borken *et al.*, 2002). La lignina es un factor trascendental en el control de la pérdida de hojarasca y la relación lignina:N es un indicador de recalcitrancia, dado que los residuos vegetales con una relación lignina:N alta son más resistentes a la descomposición que aquellos con una relación lignina:N baja. Además, se ha determinado, en diferentes especies de árboles, una correlación negativa entre la relación lignina:N y la pérdida de peso (Prescott, 2005).

En el mundo hay alrededor de 50 especies de *Abies*, de las cuales ocho ocurren en México y de estas seis son endémicas (Aguirre-Planter *et al.*, 2000; Aguirre-Planter *et al.*, 2012), localizadas en altitudes entre 2400 y 3500 m, ocupando una superficie de alrededor de 144 144 ha (CONAFOR, 2012); esta superficie es afectada por desmontes, talas inmoderadas, incendios forestales, pastoreo, contaminación ambiental, plagas y enfermedades. Las mayores extensiones de estos bosques se encuentran en los sistemas montañosos que circundan al Valle de México; son ecosistemas de gran diversidad florística (Sánchez-González *et al.*, 2006) y son grandes almacenes de C en comparación con otras especies de los géneros *Quercus* y *Pinus* (Ordóñez, 2008; Martínez-Rojas, 2010; Vela *et al.*, 2012) por lo que, es importante conocer que factores contribuyen a la acumulación de C en este

ecosistema. El objetivo de este trabajo fue determinar la producción, la tasa de descomposición de hojarasca (ramas y acículas) y los flujos de CO₂ del suelo en el bosque de *A. religiosa* del monte Tláloc.

2.4 Materiales y Métodos

El estudio se realizó en un bosque de oyamel [*Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. *et*. Cham] localizado entre las coordenadas geográficas de 19° 25.609' latitud norte y 98° 45.785' latitud oeste, a una altitud entre 3093 y 3489 m, en el monte Tláloc, zona que corresponde a la parte norte de la Sierra Nevada, en el oriente del estado de México. El suelo es Andosol (Galván-Tejada *et al.*, 2014); el clima es templado semifrío, caracterizado por tener una temperatura media anual entre 10 a 12 °C y la precipitación anual varía entre 900 y 1000 mm (Sánchez *et al.*, 2006). En el bosque de *A. religiosa* se establecieron cinco sitios experimentales de 1000 m² nombrados como O1, O2, O3, O4 y O5 distribuidos en un gradiente altitudinal de 3093 a 3489 m. Para el muestreo de suelo, se tomaron al azar cuatro muestras en cada sitio a una profundidad de 0 a 30 cm; se determinó pH, carbono orgánico soluble y carbono total.

Producción de hojarasca. En cada uno de los cinco sitios de 1000 m² se colocaron, al azar, seis mallas de nailon de 1 x 1.5 m (Figura 2.1). La colecta de hojarasca se realizó cada mes, durante 1 año, del 7 de enero de 2013 al 7 de enero de 2014. El material colectado se secó en un horno marca Shel Lab modelo CE5F, a 70 °C hasta peso constante. En la Figura 2.2 se observa cómo se separaron las fracciones de hojarasca que se clasificaron en acículas, ramas y otros (ramas con acículas, semillas, fragmentos de conos, musgos y líquenes, fragmentos de corteza y herbáceas). Cada componente se pesó por separado, en una balanza analítica marca Santorius modelo

210S (0.0001 g de precisión). Se determinó el peso de cada fracción de hojarasca en $\text{kg ha}^{-1} \text{mes}^{-1}$ y la producción de hojarasca acumulada al año.



Figura 2.1. Muestreo de hojarasca en una malla colocada en *Abies religiosa* para estimar la producción de hojarasca.



Figura 2.2. Fracciones de hojarasca de *Abies religiosa* obtenidas de la producción de hojarasca en las mallas.

Tasa de descomposición. Se colectaron ramas con acículas maduras de árboles de *A. religiosa* y se secaron a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante; después, se separaron las acículas de las ramas. Se tomó una muestra de cada material y se determinó lignina, celulosa y hemicelulosa, por el método de Van Soest *et al.* (1991) y nitrógeno total, por el método de micro-Kjeldahl (Alcántar y Sandoval, 1999).

Se pesaron acículas y ramas, 2 g de cada uno, en una balanza analítica marca Santorius modelo 210S y se colocaron por separado en bolsas de nailon con dimensiones de 12 x 15 cm y una apertura de malla de 25.7 x 187 μm . En cada sitio se colocaron 30 bolsas con acículas y 30 bolsas con ramas, las cuales se distribuyeron alrededor de dos árboles; para esto, se removi6 la capa superficial de musgo, se colocaron las bolsas sobre la superficie del suelo y se cubrieron con el mismo musgo (Figura 2.3).



Figura 2.3. Bolsas de descomposici6n de ac6culas y ramas colocadas en *Abies religiosa*.

En cada sitio para medir la temperatura del suelo cada 2 h se program6 y se enterr6 a 5 cm de profundidad un microsens6r de temperatura Watch Dog, modelo 100-Temp 2k. Seis bolsas de ramas y seis de ac6culas se colectaron en cada sitio, despu6s, a los 123, 213, 304, 395 y 475 d6as de haberlas colocado, en total se muestrearon 300 bolsas de descomposici6n. En cada muestreo, antes de levantar las bolsas se cort6 con tijeras la vegetaci6n que creci6 y atraves6 alguna bolsa (Luo *et al.*, 2010). Las bolsas se limpiaron del exceso de suelo y ra6ces que pudieron penetrar al interior y se secaron a 60 $^{\circ}\text{C}$, hasta peso constante, para determinar p6rdida de peso.

Las tasas de descomposición de acículas y ramas se determinaron con ecuaciones de regresión obtenidas con los datos de campo, para lo cual se usó el modelo exponencial:

$$X_t = X_0 e^{-kt}$$

Donde X_t = peso seco de acículas/ramas (g) en el tiempo t (futuro), X_0 = peso seco inicial de acículas/ramas (g) en la bolsa, e = base del logaritmo natural, k = tasa de descomposición y t = tiempo de permanencia de acículas/ramas en la bolsa.

Flujos de CO₂ en el suelo. Las mediciones de CO₂ se realizaron usando el método de cal sodada descrito por Ponder (2005). Frascos de 50 mL se llenaron con 30 g de cal sodada, después se colocaron en un horno marca Shel Lab modelo CE5F a 105 °C durante 24 h, para evaporar el agua de los gránulos de la cal. Al día siguiente se retiraron los frascos del horno, se colocaron en un desecador para dejar enfriar y se pesaron en una balanza analítica, marca Sartorius modelo 210S, y se taparon inmediatamente. Esto corresponde a la masa de pre-incubación en seco, que incluye la cal sodada y el frasco.

En cada uno de los cinco sitios de muestreo, sobre el suelo se colocaron al azar 10 aros de PVC de 20 cm de diámetro x 10 cm de alto, los cuales se enterraron a 5 cm de profundidad, en posición vertical, dos semanas antes de iniciar las mediciones de respiración del suelo. En el momento de la medición, se colocó un frasco destapado con cal sodada en cada aro y se cubrió con una cámara de PVC de 19.3 cm de diámetro x 10 cm de alto, que se ajustó en el aro, sellando herméticamente (Figura 2.4). En cada sitio se usaron dos testigos, que estuvieron aislados del suelo con un plástico (Figura 2.4 a, b). Todas las cámaras con la cal sodada se incubaron durante

24 h; después de este periodo de tiempo los frascos con cal se retiraron y se sellaron de inmediato. Además, se midió la temperatura del suelo, con un termómetro, modelo HI-145 marca Hanna Instruments RI, y la humedad, con un medidor portátil modelo Fieldscout TDR-300 marca Spectrum Technologies.



Figura 2.4. Cámaras de PVC para determinación de CO₂ en *Abies religiosa*: (a) frasco con cal sodada del testigo, (b) cámara sellada del testigo, (c) frasco con cal sodada de la muestra y (d) cámara sellada de la muestra.

Los frascos con cal sodada después del muestreo se llevaron al laboratorio, donde se destaparon y se volvieron a secar en el horno, a 105 °C durante 24 h, para evaporar el agua. Posteriormente, se pasaron a un desecador y se pesaron. Esto correspondió a la masa después de la incubación en seco. La absorción de CO₂ en la cal sodada se determinó por la diferencia en peso de las muestras y se multiplicó por el factor 1.69 g; para dar cuenta de la pérdida de agua durante el proceso de secado, se obtienen los siguientes datos (Grogan, 1998):

- a) Masa inicial en seco de cal sodada (g) = M_i
- b) Masa final en seco de cal sodada (g) = M_f
- c) Cambio de masa del blanco (g) = $M_b = M_f(\text{blanco}) - M_i(\text{blanco})$
- d) Cambio de masa de la muestra (mg) = $dM = (M_f - M_i - M_b) \times 1000$
- e) CO₂ absorbido por la cal sodada (mg de CO₂) = $dM \times 1.69$

f) Respiración del suelo ($\text{mg de CO}_2 \text{ m}_2 \text{ día}^{-1}$) = CO_2 absorbido $\text{área}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de incubación. El aumento de la masa de la cal sodada es atribuible a las emisiones de CO_2 .

2.5 Resultados

Producción de hojarasca. En el bosque de *A. religiosa* la producción de hojarasca acumulada durante el año de muestreo fue $3.26 \pm 0.36 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$. En la Figura 2.5 se observa que la fracción que más aporta hojarasca al suelo son acículas, con 68% del total y en segundo lugar las ramas con 23%, considerando ramas pequeñas menores de 1 cm de diámetro. Las fracciones de hojarasca integradas por ramas con acículas, fragmentos de conos, semillas, musgos y líquenes, fragmentos de corteza y herbáceas solo aportaron 9%, por lo que se sumaron juntos y se nombraron como otros.

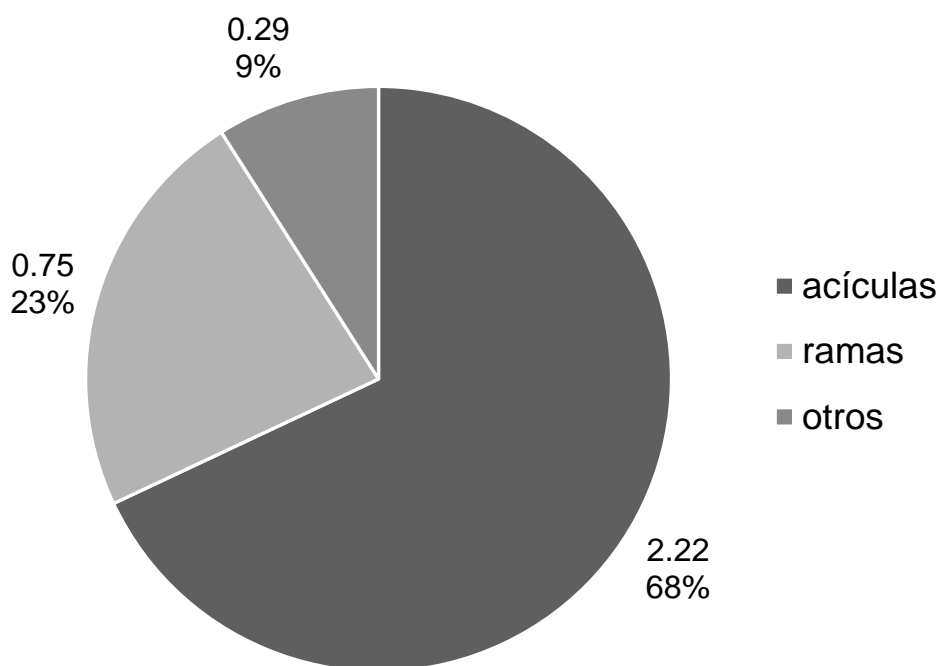


Figura 2.5. Producción total de hojarasca ($\text{t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) en *Abies religiosa* del monte Tláloc.

La producción de hojarasca de acículas varió entre los meses del año, en todos los sitios, pero el aporte fue mayor entre los meses de agosto a noviembre, abarcando la parte final del verano y toda la estación de otoño. El sitio con mayor producción de acículas fue el O2 y el de menor fue el O5, localizados a altitudes de 3489 y 3093 m respectivamente; para el sitio O2 el mes con mayor producción de acículas fue septiembre, con 533.23 kg ha⁻¹. En ramas, la producción se incrementa en los meses de marzo a mayo, en la mayoría de los sitios; después decrece la caída, durante los meses de junio a noviembre, y vuelve a incrementarse en el último mes de la estación de otoño, de tal forma que en diciembre la producción de ramas fue entre 132.5 a 210.5 kg ha⁻¹, los cuales fueron los valores más altos. En el caso de los otros materiales que cayeron en las mallas, estos se mantuvieron bajos durante todo el año, generalmente; los valores más altos los presentó el sitio O5 y los más bajos el sitio O3 (Figura 2.6).

Tasa de descomposición. Las características del material vegetal colocado en las bolsas de descomposición se muestran en el Cuadro 2.1. El material vegetal de acículas presentó menor contenido de lignina, con 11.6% y menor relación lignina:N de 9.8 en comparación con las ramas, con 21.9% de lignina y una relación lignina:N de 28.2.

Cuadro 2.1. Calidad de la hojarasca (acículas y ramas) de *Abies religiosa*.

Material	Materia seca	Cenizas	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Nitrógeno total	Lignina:N
	%						
Acículas	97.3 ± 0.08	5.1 ± 0.29	21.8 ± 0.35	14.5 ± 0.32	11.6 ± 0.28	1.2 ± 0.02	9.8 ± 0.35
Ramas	96.1 ± 0.11	4.4 ± 0.32	28.9 ± 0.62	13.1 ± 0.48	21.9 ± 0.61	0.8 ± 0.13	28.2 ± 3.7

± Error estándar.

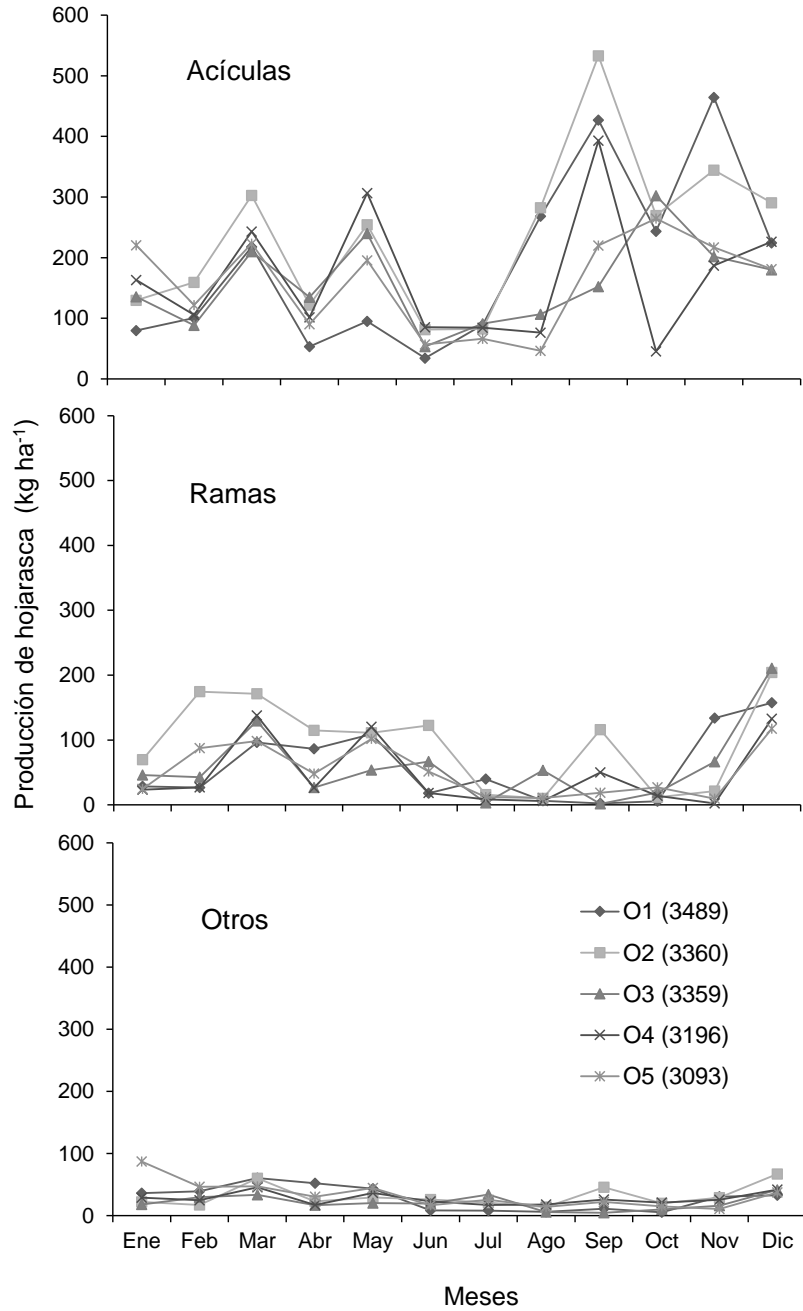


Figura 2.6. Producción mensual de hojarasca (acículas, ramas y otros) en cinco sitios de *Abies religiosa* a lo largo de un gradiente altitudinal, en el monte Tláloc.

En el bosque de *A. religiosa* del monte Tláloc, la pérdida promedio de peso seco en las bolsas de descomposición después de 475 días de colocarlas fue 44% para acículas y 32% en ramas. No obstante, al analizar la relación entre las pérdidas de

peso y las temperaturas anuales de los sitios, a lo largo del gradiente altitudinal, se encontró que la pérdida de peso de acículas depende de la temperatura en 29% y la de ramas en 73% (Figura 2.7).

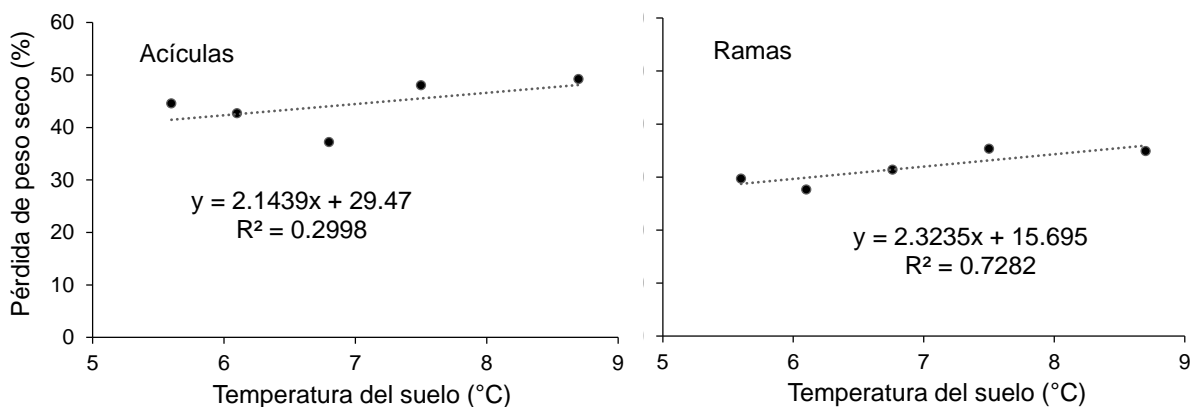


Figura 2.7. Efecto de la temperatura en el porcentaje de pérdida de peso de acículas y ramas en las bolsas de descomposición de *Abies religiosa* del monte Tláloc. Los puntos representan los valores promedios correspondientes a los cinco sitios de estudio.

Las características de los sitios de estudio en el bosque de *A. religiosa* se muestran en el Cuadro 2. Las pendientes fueron pronunciadas de 22% a 45%. El pH de los sitios se encontró dentro de los valores de 5.8 a 6.4, ligeramente ácidos. El contenido de carbono total y carbono orgánico soluble fueron más altos en el sitio O1 ubicado a mayor altitud; también este sitio fue el segundo con mayor densidad arbórea y el segundo con mayor producción de hojarasca (acículas y ramas); su constante de descomposición para acículas es la segunda más alta en comparación con los otros sitios, y para el caso de ramas su constante de descomposición es menor, en comparación con los otros sitios (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Características del suelo, producción anual de hojarasca y descomposición de acículas y ramas en cinco sitios a lo largo de un gradiente altitudinal en el bosque de *Abies religiosa* del monte Tláloc.

Sitios	Elevación (m)	Pendiente (%)	Densidad arbórea (árboles ha ⁻¹)	pH	Cos [†]	C _T [¶]	Producción de hojarasca		k ^p	
							acículas	ramas	acículas	ramas
O1	3489	32	720	5.8	4.2 ± 0.03	7.4 ± 0.8	2.3	0.7	0.44	0.26
O2	3360	42	690	6.1	3.0 ± 0.04	4.6 ± 0.6	2.8	1.1	0.43	0.27
O3	3359	40	760	6.4	2.0 ± 0.07	3.1 ± 0.9	1.8	0.7	0.36	0.28
O4	3196	45	460	6.2	2.5 ± 0.06	4.4 ± 0.7	2.0	0.6	0.49	0.34
O5	3093	22	250	6.2	2.3 ± 0.02	5.5 ± 0.3	1.9	0.6	0.49	0.32

† Carbono orgánico soluble ¶ Carbono orgánico total § Valores del total acumulado ^p Tasa de descomposición.

El sitio con mayor producción de hojarasca de acículas y ramas fue O2, también es uno de los sitios con mayor contenido de carbono orgánico soluble y, además, es el tercer sitio con mayor densidad arbórea. El sitio O3 fue el que presentó valores más bajos en contenido de C, producción de hojarasca y constantes de descomposición. Los sitios O4 y O5, de menor altitud, son los que presentaron menor producción de hojarasca y menor contenido de carbono orgánico soluble en comparación con los sitios de mayor altitud y son los que tienen mayores constantes de descomposición de acículas y ramas (Cuadro 2.2).

Flujos de CO₂ en el suelo. En el Cuadro 2.3 se presentan los valores de flujos de CO₂ en el suelo, obtenido en tres fechas durante el año 2013. En este Cuadro se observa que el mes con menores emisiones fue marzo, donde se tiene también menor contenido de humedad. Los flujos fueron mayores en agosto y octubre, y también en estos meses se tuvo mayor contenido de humedad en el suelo. El sitio O3 presentó mayores flujos de CO₂ en el suelo y menor contenido de humedad en las tres

mediciones, lo que indica que fue el sitio más seco. El sitio O2, en promedio, fue el segundo en tener mayores flujos de CO₂; este sitio también fue uno de los más altos en contenido de humedad y uno de los más bajos en temperatura del suelo.

Cuadro 2.3. Variables climáticas y flujos de CO₂ del suelo de cinco sitios en el bosque de *Abies religiosa* del monte Tláloc.

Sitios	Temperatura (°C)			Humedad (%)			Flujos en el suelo (g CO ₂ m ² día ⁻¹)			
	Mar	Ago	Oct	Mar	Ago	Oct	Marzo	Agosto	Octubre	Promedio
O1	7.7	8.4	7.9	18.6	29.5	27.3	5.2 ± 0.5	11.8 ± 1.7	10.5 ± 1.2	9.2 ± 2.0
O2	7.4	9.4	8.8	12.1	26.4	25.9	2.1 ± 0.4	14.8 ± 1.3	13.6 ± 0.9	10.2 ± 4.1
O3	10.2	9.9	9.8	7.5	22.1	20.0	3.6 ± 0.8	19.4 ± 2.1	14.9 ± 1.2	12.6 ± 4.7
O4	9.8	9.0	11.4	9.4	20.1	21.3	2.7 ± 0.2	12.8 ± 0.7	9.4 ± 0.6	8.3 ± 3.0
O5	12.3	11.3	12.0	8.8	23.1	23.9	3.0 ± 0.2	14.6 ± 0.8	9.2 ± 0.9	8.9 ± 3.4

n = 10

2.6 Discusión

La hojarasca es un conjunto de hojas que han caído de los árboles y es un componente importante en la acumulación de C en el suelo de ecosistemas forestales (Pan *et al.*, 2011). La producción de hojarasca en *A. religiosa* es 3.26 ± 0.36 t ha⁻¹ año⁻¹ y está dentro de los intervalos de caída de hojarasca, determinados en rodales de plantaciones forestales de 50 años de edad (*Picea abies*, *P. sitchensis*, *Pseudotsuga menziesii*, *Fagus sylvatica* y *Quercus robur*), con un intervalo de 3.2 a 3.7 t ha⁻¹ año⁻¹ (Hansen *et al.*, 2009) y los obtenidos en un bosque de *Cunninghamia lanceolata*, de 14 años de edad, con 3.1 t ha⁻¹ año⁻¹ (Xiangqing *et al.*, 2007) pero es menor a los valores obtenidos en arboles maduros de *Picea abies* en bosques templados de Europa, con 3.8 t ha⁻¹ año⁻¹ (Augusto *et al.*, 2002).

El material de acículas de *A. religiosa* es el componente que aporta la mayor producción de hojarasca al suelo y el segundo corresponde a ramas; ambos representan 90% del total de caída (Figuras 2.5); esto se ha observado en otros estudios donde las hojas proporcionan mayor porcentaje de hojarasca al suelo y, en segundo lugar, las ramas (Di Stefano y Fournier, 2005; Zhou *et al.*, 2015). Además, se encontró que aun cuando no hay un patrón marcado del efecto de estacionalidad en la producción de acículas y ramas, se observa una tendencia a presentarse la mayor aportación en los meses de septiembre a marzo (Figura 2.6).

Los sitios O1 y O2 fueron los que tuvieron la mayor producción de hojarasca (acículas y ramas), con un valor de 3 y 3.9 t ha⁻¹ año⁻¹, respectivamente; estos sitios también presentan mayor densidad arbórea y están localizados a mayor altitud; en cambio, los sitios O4 y O5, que son los de menor densidad arbórea, tienen menor producción de hojarasca, con valores de 2.6 y 2.5 t ha⁻¹ año⁻¹, respectivamente, y se encuentran a menor altitud. Esto nos indica que hay una relación entre densidad arbórea y producción de hojarasca. Sin embargo, el sitio que no coincide con este comportamiento es el sitio O3, ya que tiene alta densidad arbórea (760 árboles ha⁻¹) y baja producción de hojarasca, con 1.8 t ha⁻¹ año⁻¹ (Cuadro 2.2); además, es un sitio que presenta menor humedad del suelo, en comparación con los otros sitios (Cuadro 2.3).

La descomposición de la hojarasca es un proceso biológico regulado por el clima y la calidad de la hojarasca. Esta última es de extrema importancia, ya que la hojarasca con una alta relación lignina:N es más resistente a la descomposición que aquella con una baja relación (Tripathi *et al.*, 2006); esto se observó en los resultados de este

trabajo, donde las ramas con una mayor relación lignina:N (Cuadro 2.1) presentan menor constante de descomposición (k) que las acículas (Cuadro 2.2). Los valores de k de este estudio son parecidos a los obtenidos por Pérez *et al.* (2010) en *Nothofagus nítida* con una $k = 0.47$ y en *Drimys winteri* y *Podocarpus nubigena* con una $k = 0.29$, aunque sus contenidos de lignina son más altos que los aquí reportados.

Los sitios de estudio se localizan en un gradiente altitudinal que va de 3093 a 3489 m, asociado a este también se encuentra un gradiente de temperatura, donde la diferencia entre el sitio localizado en la parte más alta (O1) y el localizado en la parte baja (O5) es de 3.1 °C. Al relacionar los datos de temperatura media anual y el porcentaje de pérdida de peso de los cinco sitios se encontró que la temperatura influye en la pérdida de peso de acículas, en 29%, y de ramas, en 72% (Figura 2.7). Esto significa que la descomposición de la hojarasca es mucho más acentuada en la parte baja (3093 m de altitud) que en la parte alta (3489 m de altitud); de hecho, la constante de descomposición del sitio más alto es 5% menor que la obtenida en el sitio localizado a menor altitud y este último tiene también menor contenido de carbono orgánico total y carbono soluble (Cuadro 2.2).

La temperatura es uno de los factores que posiblemente regule la acumulación de carbono en este ecosistema. Esto se ha observado en otros estudios, en los cuales los mayores depósitos de C del suelo, por unidad de superficie, están situados a mayores altitudes y las tasas de descomposición de hojarasca son bajas por la disminución de la temperatura (Ahmad y Somaiah, 2015), aunque hay otros factores como la humedad que también contribuyen a la acumulación de carbono en el suelo de ecosistemas forestales (Kenneth *et al.*, 1998).

Los flujos de CO₂ en el suelo fueron mayores en los meses de agosto y octubre, posiblemente por el aumento estacional de humedad en el suelo, ya que se ha observado que la respiración del suelo se correlaciona positivamente con la humedad (Akburak y Makineci, 2013; Yohannes *et al.*, 2011). La temperatura no influyó mucho en los resultados obtenidos ya que su variación estacional no fue marcada (Cuadro 2.3). El único sitio que presenta las temperaturas más altas, en comparación con los otros sitios, es el O5, aunque este sitio no presenta altos flujos de CO₂, tal vez porque su densidad arbórea no es de las más altas. Lo contrario se observó en el sitio O3, el cual presenta mayor flujo de CO₂ en promedio y tiene mayor densidad arbórea, con 760 árboles ha⁻¹. La respiración de raíces pudo haber influido en estos resultados (Cuadro 2.2). En este estudio la humedad estacional del suelo tuvo mayor influencia en los flujos de CO₂.

En México, los bosques de *Abies* contienen una gran diversidad florística; además, tienen diversas funciones como conservación de suelo, captura de carbono, captación de agua para mantos freáticos y regulación de la escorrentía, por lo que su estudio y conservación es de gran importancia (Sánchez *et al.*, 2006). Dentro de las funciones de captura de carbono se encuentran los flujos de bióxido de carbono asociados a la velocidad de descomposición en la hojarasca, la cual está limitada, más por los sustratos de carbono que por el contenido de nutrientes (Kenneth *et al.*, 1998). Por lo que el aporte de hojarasca al piso forestal y su descomposición, puede indicar si un sistema es un sumidero o una fuente de bióxido de carbono. En este estudio se pudo observar que sitios de mayor altitud con mayor densidad arbórea, menor temperatura y mayor humedad, pueden presentar alto contenido de carbono en

el suelo. Pero sitios de menor altitud y temperatura más alta, presentan menor contenido de carbono en el suelo y tienden a tener mayor emisión de bióxido de carbono y menor densidad arbórea; también son propensos a mayor perturbación, por ser más accesibles.

Considerando que hay un efecto del gradiente altitudinal, tanto en el contenido de carbono como en los flujos de CO₂, donde diversos factores están involucrados, como la temperatura, la humedad y la densidad arbórea, y que resulta en diferencias en el contenido de carbono en el suelo, podría ser que bajo un escenario de aumento de la temperatura global conduciría a un aumento en las tasas de descomposición de la hojarasca y, por lo tanto, aumento en los flujos de CO₂ del suelo que disminuirían los reservorios de C en los suelos del bosques de *A. religiosa*. Las proyecciones de cambio climático sugieren que las áreas ocupadas por bosque de *A. religiosa* podrían reducirse en el curso de este siglo (Sáenz-Romero *et al.*, 2012). No obstante, poco se sabe del impacto que podría tener el cambio climático en los reservorios de carbono de los bosque de *Abies* en México, los cuales se ha estimado que contienen de 93 a 146 Mg C ha⁻¹ (Ordóñez, 2008; Martínez-Rojas, 2010; Vela *et al.*, 2012).

2.7 Conclusiones

El componente que más aporta hojarasca al suelo, en el bosque de *A. religiosa* son las acículas, con 67%, y en segundo lugar las ramas, con 23%. En la estación de otoño es donde se presenta mayor producción de hojarasca en acículas en todos los sitios. El porcentaje de pérdida de peso de acículas fue de 44% y el de ramas 32% después de 475 días. Los valores promedio de tasas de descomposición para acículas es $k = 0.439 \text{ año}^{-1}$ y para ramas de $k = 0.294 \text{ año}^{-1}$. Los flujos de CO_2 debidos a la respiración del suelo fueron mayores en época de lluvia.

CAPÍTULO III

3. Mineralización de carbono del suelo procedente del piso forestal de *Abies religiosa*

3.1 Resumen

La hojarasca constituida de acículas y ramas forma parte del piso forestal de *Abies religiosa* y es la principal entrada de carbono y nutrimentos al suelo, esta se puede relacionar con la tasa de liberación de CO₂. El objetivo fue estimar la tasa de mineralización del carbono en el suelo y hojarasca proveniente de un gradiente altitudinal mediante incubaciones en laboratorio con concentraciones crecientes de lignina. Se realizaron dos experimentos de incubación en el laboratorio de 17 y 28 días con suelo de cinco sitios del bosque de *A. religiosa* (O1, O2, O3, O4 y O5) bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (35 °C y 60%), se incorporó hojarasca al suelo con diferentes concentraciones de lignina. Los resultados mostraron que la tasa de mineralización es afectada principalmente por la calidad de la hojarasca pero se observó que los suelos de los sitios O3, O4 y O5 de menor altitud, presentan tasas mayores de mineralización que los suelos de los sitios O1 y O2, de mayor altitud, bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura. Esto puede deberse a que el contenido de N y P de los sitios de baja elevación es mayor que el de los sitios de alta elevación; además, estos sitios presentan menor contenido de carbono orgánico en el suelo, en comparación con los sitios de mayor altitud.

Palabras clave: hojarasca, incubación, lignina, tasa de mineralización.

CHAPTER III

Soil carbon mineralization from the forest floor of *Abies religiosa*

3.2 Abstract

The litter consisting of needles and branches is part of the *Abies religiosa* forest floor and is the main source of carbon and nutrients that is incorporated in to soil by decomposition; the process is related to the rate of release of CO₂. The objective of this research was to estimate the carbon mineralization rate in soil and litter samples from *A. religiosa* forest by laboratory incubations with increasing concentrations of lignin. Two incubation experiments were performed in the laboratory for 17 and 28 days with soil samples collected from five sites of *A. religiosa* forest (O1, O2, O3, O4 and O5) under temperature and humidity controlled conditions (35 °C and 60%) and at different concentrations of lignin. The results showed that the mineralization rate is mainly affected by the litter quality where soil samples from the lower altitude sites (O3, O4 and O5) have higher mineralization rates than the samples from the higher altitude sites (O1 and O2) under the same temperature and humidity; this may be because the content of N and P in soil from low elevation sites is greater than in the soil from high elevation sites, these sites also have a lower content of organic carbon in the soil compared to the higher altitude sites.

Key words: litter, incubation, lignin, mineralization rate.

3.3 Introducción

La mineralización del carbono orgánico es la conversión de la forma orgánica a compuestos inorgánicos como resultado de reacciones de descomposición llevadas a cabo por organismos descomponedores, la gran mayoría de los cuales son bacterias y hongos (Gregorich *et al.*, 2001). La biomasa microbiana del suelo es el componente activo de los almacenes orgánicos del suelo y es responsable de la descomposición de la materia orgánica, lo cual afecta el contenido de nutrientes del suelo y, en consecuencia, la productividad primaria (Vásquez-Murrieta *et al.*, 2007). La diversificación de especies de plantas puede afectar el ambiente del suelo de diferentes maneras, debido a las variaciones en la cantidad y calidad del material vegetal, lo que afecta el contenido de materia orgánica del suelo, la actividad microbiana y los ciclos de nutrientes. Estos cambios alteran el potencial del suelo para suministrar o almacenar nutrientes debido a cambios en la mineralización e inmovilización (Liborio *et al.*, 2010).

La mineralización de C se puede determinar por medio de la tasa de liberación de CO₂. Inicia con una etapa muy activa de la materia orgánica fresca, lo cual corresponde a la liberación de materiales orgánicos lábiles (azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos), seguida de una segunda etapa en la que la actividad biológica disminuye, debido principalmente a materiales recalcitrantes. (Guerrero-Ortiz *et al.*, 2012).

La medición de mineralización de C se utiliza comúnmente en las investigaciones de los suelos y sus datos tienen una amplia gama de aplicaciones en

la agricultura, la silvicultura, la ecología y las ciencias ambientales. La tasa de mineralización de C se puede medir en el laboratorio, en períodos de unos pocos días o semanas y proporciona un estimador de la actividad biológica del suelo (Gregorich y Beare, 2007).

La descomposición de la hojarasca es más rápida con materiales vegetales de mayor calidad, es decir, material vegetal menos lignificado y mayor contenido nutrimental (Prescott *et al.*, 1992). La humedad y la temperatura del suelo catalizan la acción de la biomasa microbiana; la cantidad que se mineralice también será función de las propiedades del suelo (tipo de suelo, densidad aparente, pH) y condiciones climáticas del ecosistema (Bonan y Van-Cleve, 1992; Avilés, 2002; Girisha *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2008).

Los ecosistemas forestales son elementales en el ciclo de carbono, y los suelos son importantes almacenes de C. Es de gran interés no solo conocer la cantidad de materia orgánica que se acumula en suelos procedentes de especies arbóreas, sino también los procesos de mineralización que tienen lugar; todo ello va a determinar el posible almacén de carbono en el suelo el cual será mayor con el incremento en la altitud. El objetivo de este trabajo es estimar la tasa de mineralización del carbono en el suelo con hojarasca, proveniente de un gradiente altitudinal de *Abies religiosa*, mediante incubaciones en laboratorio con concentraciones crecientes de lignina. Por lo que la hipótesis de este estudio es que la tasa de mineralización de carbono en el suelo proveniente de *Abies religiosa* tiende a disminuir a medida que se incrementa la altitud.

3.4 Materiales y Métodos

Muestreo de suelo y hojarasca. El suelo y hojarasca (ramas y acículas) usados en el experimento de incubación se colectaron en cinco sitios, nombrados como O1, O2, O3, O4 y O5, del bosque de *A. religiosa* del monte Tláloc, localizados en un gradiente altitudinal de 3093 a 3489 m, en el estado de México. El suelo es andosol (Galván-Tejada *et al.*, 2014); el clima es templado semifrío, caracterizado por tener una temperatura media anual entre 10 a 12 °C y la precipitación anual varía entre 900 y 1000 mm (Sánchez-González *et al.*, 2006).

Las muestras de suelo se colectaron de 0 a 10 cm de profundidad. En estas se determinaron pH, densidad, carbono orgánico soluble (COS), carbono orgánico total (C_T), nitrógeno total (N_T) y fósforo (P). El nitrógeno total se determinó por extracción con cloruro de potasio (KCl 2 N) y se determinó por arrastre de vapor; el fósforo asimilable por las plantas se determinó utilizando el método Bray y Kurtz 1 (Norma Oficial Mexicana, 2002). Las características del suelo de los cinco sitios de *A. religiosa* se muestran en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Características de los suelos de cinco sitios de estudio del bosque de *Abies religiosa* utilizados en la incubación de 28 días.

Suelo	Altitud (m)	Densidad (g cm ⁻³)	pH	COS [†]	C _T [‡]	N _T [§]	P [‡]
				%		mg kg ⁻¹	
O1	3489	0.66	5.8	4.2	7.4	18.8	6.2
O2	3360	0.89	6.1	3.0	4.6	19.5	6.4
O3	3359	0.92	6.4	2.0	3.1	21.2	13.0
O4	3196	0.90	6.2	2.5	4.4	23.4	21.8
O5	3093	0.90	6.2	2.3	5.5	30.5	17.4

† Carbono orgánico soluble ‡ Carbono orgánico total § Nitrógeno total ‡ Fósforo extraíble.

Incubación de suelo. En frascos de 200 mL, con cierre hermético, se colocaron 25 g de suelo (secado a la sombra y tamizado a 2 mm) húmedo a 60% de su capacidad de retención hídrica (García *et al.*, 2003) (Figura 3.1a). La hojarasca incorporada al suelo consistió de acículas, ramas y acículas con ramas, las cuales se molieron en un molino Wiley, con malla 40. Para obtener diferentes concentraciones de lignina, se utilizó una media ponderada, utilizando los valores del análisis con fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) de las muestras de hojarasca, por el método de Van Soest *et al.* (1991). La cantidad de hojarasca incorporada al suelo en cada frasco se estimó tomando en cuenta la hojarasca que cae al año en el bosque de *A. religiosa*, con datos obtenidos en 2013, donde se utilizaron mallas de 1.5 m² y se obtuvieron los siguientes valores: para acículas, 2178.2 kg ha⁻¹ año, y para ramas, 747.5 kg ha⁻¹ año.

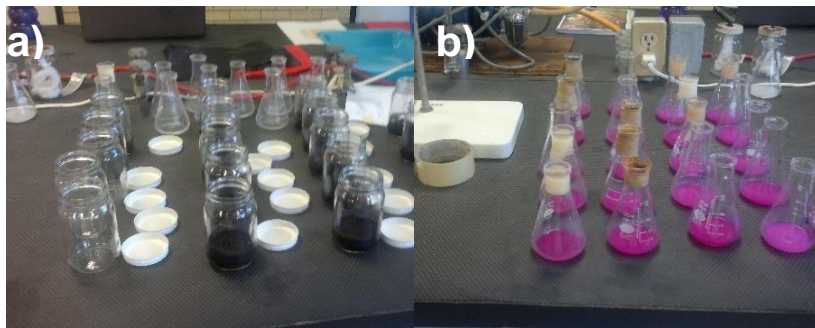


Figura 3.1. Determinación de CO₂: (a) frascos sin suelo (blanco) y con suelo, (b) matraces con disolución de NaOH con indicador.

Las concentraciones utilizadas de lignina fueron 0, 11.6, 13.1, 14.2, 15.8 y 21.9% con tres repeticiones cada una para un primer ensayo de 17 días de incubación en un solo tipo de suelo, el O1, y así elegir las concentraciones que permitieron observar una mejor tendencia en la acumulación de CO₂. Para después establecer el

experimento con los suelos de los cinco sitios de estudio de *A. religiosa* y con un tiempo de incubación de 28 días. En cada uno de los cinco suelos se utilizaron cuatro concentraciones de lignina y tres repeticiones.

La determinación de CO₂ se realizó en frascos sin suelo (blanco) y con suelo (muestra); en donde se introdujo un tubo de ensayo con 5 mL de NaOH 0.5 N, cerrándose herméticamente los frascos y se incubaron a 35 °C. En cada medición, los tubos de ensayo con NaOH se retiraron y se sustituyeron por otros. Antes de colocar el nuevo tubo de ensayo con disolución de NaOH, se destaparon los frascos durante media hora, a fin de renovar la atmósfera de aire contenida en el frasco; después de esto se introdujo el nuevo tubo de ensayo, se cerraron de nuevo los frascos y se volvieron a incubar, hasta la determinación siguiente (García *et al.*, 2003). Esto se realizó, diariamente, los primeros cuatro días y cada dos días las siguientes semanas de incubación, hasta el día 17. En el caso de la incubación de 28 días, las mediciones fueron cada 24 h, durante 4 días; después cada 2 días, durante 8 días; cada 3 días, durante 6 días, y antes del último muestreo se dejó la muestra 4 días.

Estimación del CO₂. A los matraces Erlenmeyer se adicionó la disolución de NaOH y 2.5 mL de la disolución de cloruro de bario 0.5 N, a fin de precipitar todo el CO₂ adsorbido y dos gotas de fenolftaleína (Figura 3.1b), se valora con la disolución de H₂SO₄ 0.5 N, lentamente y con agitación, hasta que la disolución vire de violeta a blanco. Los cálculos se realizaron con la siguiente fórmula:

$$\text{Mg C} = (\text{B} - \text{V}) \times \text{N E}$$

Donde: B = blanco o testigo (12 mL), V = muestras (mL), N =Normalidad del H₂SO₄ y E = Peso equivalente del carbono (PE = 6).

Análisis de resultados. El efecto de la concentración de lignina en el suelo se analizó mediante análisis de regresión cuyo modelo estadístico es el siguiente (Montgomery y Runger, 2008):

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon$$

Dónde: y = variable dependiente, β_0 = ordenada al origen, β_1 = pendiente o tasa, x= variable independiente y ε = termino de error aleatorio.

3.5 Resultados

Incubación de 17 días. En esta incubación el tiempo fue suficiente para observar una tendencia sobre el comportamiento de la tasa de mineralización de C en el suelo de *A. religiosa*. En las seis concentraciones de lignina incorporadas al suelo, se obtuvo que las muestras de suelo con menor concentración de lignina (11.6% a 15.8%) la actividad microbiana aumentó debido a que presentó mayor acumulación de CO₂, de hasta 700 mg C kg⁻¹ suelo, y en las muestras de suelo con mayor concentración de lignina (21.9%) se observó una disminución en la acumulación de CO₂, con 549 mg C kg⁻¹ suelo, siendo parecidas o menores que la del testigo, sin adición de lignina (Figura 3.2).

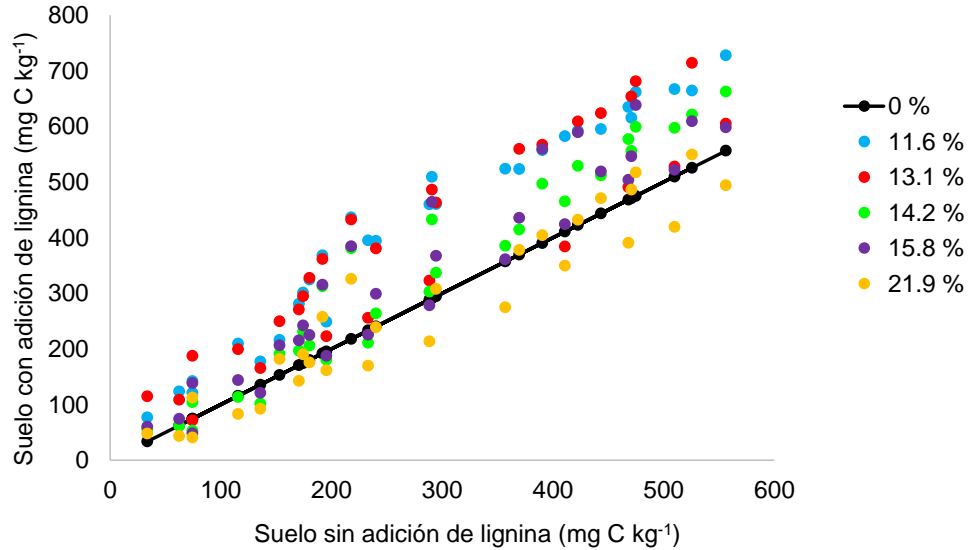


Figura 3.2. Comparación del CO₂ acumulado en suelo sin adición de lignina y suelo con incorporación de lignina, después de 17 días de incubación en laboratorio.

En el Cuadro 3.2 se muestra las ecuaciones de regresión lineal, con y sin intercepto, para obtener las tasas de mineralización por medio de las pendientes, considerando la acumulación de CO₂ en función del tiempo para cada concentración de lignina. Los datos para obtener las pendientes se muestran en el Anexo I.

Cuadro 3.2. Ecuaciones de regresión lineal de la acumulación de CO₂ en función del tiempo en un suelo de *Abies religiosa* con diferentes concentraciones de lignina.

Lignina (%)	Ecuación de regresión			
	Con intercepto	r ²	Sin intercepto	r ²
0	y = 25.96x + 58.34	0.92	y = 30.66x	0.88
11.6	y = 32.55x + 136.53	0.94	y = 43.55x	0.79
13.1	y = 30.90 + 122.26	0.93	y = 40.66x	0.79
14.2	y = 32.81x + 52.98	0.97	y = 37.08x	0.95
15.8	y = 31.23x + 71.76	0.97	y = 37.01x	0.93
21.9	y = 26.51x + 47.52	0.96	y = 30.35x	0.94

En la Figura 3.3 se observa que a menor concentración de lignina incorporada al suelo la tasa de mineralización es más rápida y conforme la concentración de lignina aumenta la tasa de mineralización disminuye.

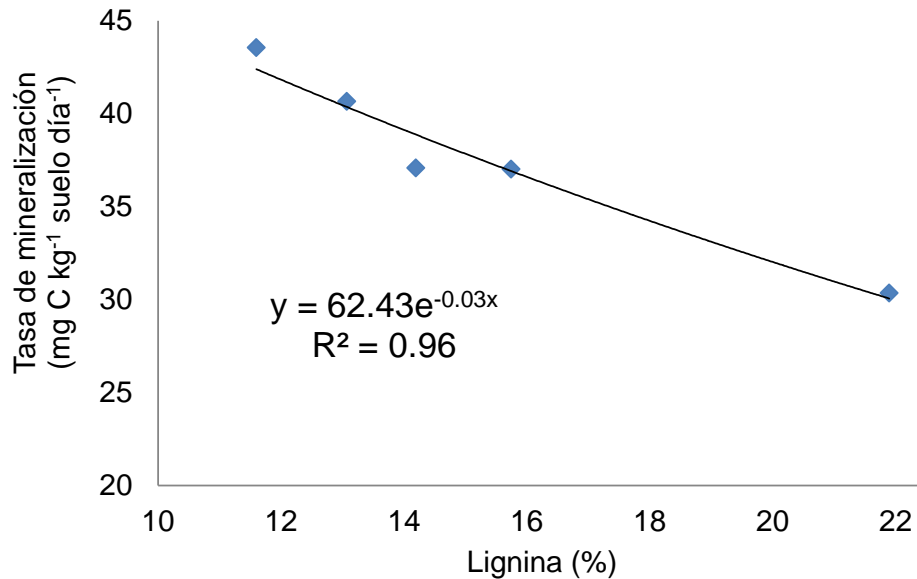


Figura 3.3. Tasa de mineralización obtenida en un suelo de *Abies religiosa* con concentraciones crecientes de lignina, después de 17 días de incubación.

Incubación de 28 días. La acumulación de CO₂ (mg C kg⁻¹ suelo) fue diferente entre los cinco suelos de los sitios de estudio de *A. religiosa* bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (35 °C y 60%); se observó que los suelos provenientes de los sitios O3, O4 y O5, de menor altitud y con mayor diversidad de sotobosque, fueron los que tuvieron mayor acumulación de CO₂ y los suelos de los sitios O1 y O2, que se encuentran a mayor altitud y con menor diversidad de sotobosque presentaron menor acumulación de CO₂ (Figura 3.4).

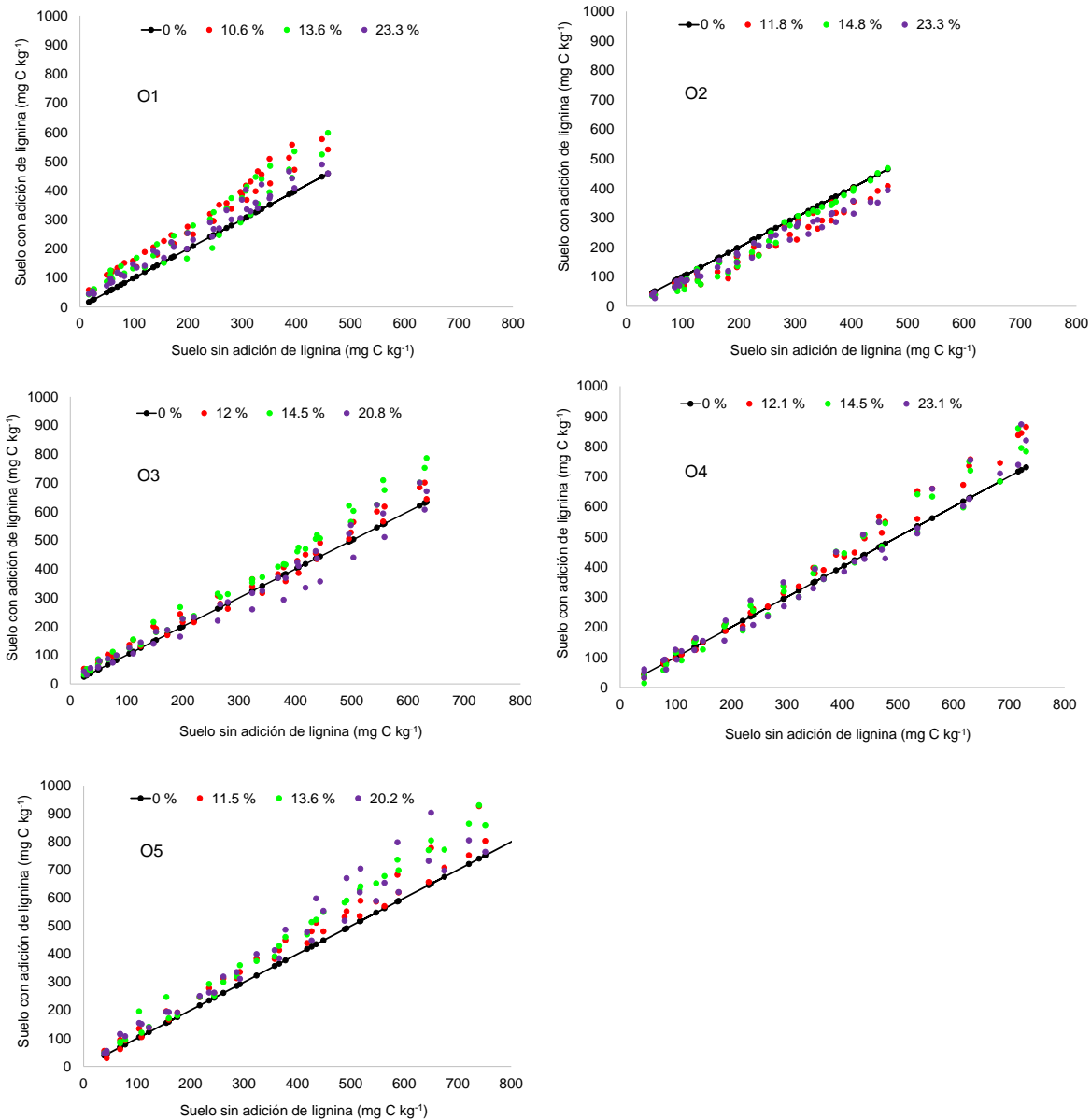


Figura 3.4. Comparación del CO₂ acumulado (mg C kg⁻¹) en suelo sin adición de lignina con suelo con incorporación de lignina, después de 28 días de incubación en laboratorio.

En el Cuadro 3.3 se muestran las ecuaciones de regresión lineal, con y sin intercepto, para obtener las tasas de mineralización por medio de las pendientes considerando la acumulación de CO₂ en función del tiempo para cada concentración de lignina. Los datos para obtener las pendientes se muestran en el Anexo II.

Cuadro 3.3. Ecuaciones de regresión lineal de la acumulación de CO₂, después de 28 días de incubación, para obtener las tasas de mineralización de los suelos de cinco sitios de estudio de *Abies religiosa*.

%	Ecuación de regresión				
	Lignina	Con intercepto	r ²	Sin intercepto	r ²
Suelo O1					
0		$y = 14.94x + 37.39$	0.97	$y = 17.06x$	0.94
10.6		$y = 18.10x + 74.93$	0.98	$y = 22.33x$	0.90
13.6		$y = 16.99x + 67.85$	0.90	$y = 20.83x$	0.83
23.3		$y = 15.17x + 68.46$	0.95	$y = 19.05x$	0.85
Suelo O2					
0		$y = 14.38x + 64.78$	0.96	$y = 18.05x$	0.86
11.8		$y = 13.51x + 36.08$	0.99	$y = 15.55x$	0.95
14.8		$y = 15.55x + 27.15$	0.97	$y = 17.08x$	0.95
22.2		$y = 12.06x + 54.02$	0.95	$y = 15.11x$	0.86
Suelo O3					
0		$y = 22.71x + 24.48$	0.99	$y = 24.10x$	0.98
12		$y = 23.35x + 40.16$	0.99	$y = 25.63x$	0.97
14.5		$y = 26.56x + 31.12$	0.99	$y = 28.32x$	0.98
20.8		$y = 22.72x + 25.50$	0.97	$y = 24.16x$	0.96
Suelo O4					
0		$y = 25.30x + 38.08$	0.99	$y = 27.46x$	0.98
12.1		$y = 30.10x + 19.93$	0.99	$y = 31.22x$	0.99
14.5		$y = 28.77x + 23.13$	0.99	$y = 30.08x$	0.98
23.1		$y = 27.62x + 25.28$	0.97	$y = 29.05x$	0.97
Suelo O5					
0		$y = 28.15x + 45.02$	0.98	$y = 30.70x$	0.97
11.5		$y = 31.02x + 51.65$	0.99	$y = 33.94x$	0.97
13.6		$y = 33.68x + 53.43$	0.99	$y = 36.70x$	0.98
20.2		$y = 32.96x + 57.95$	0.98	$y = 36.24x$	0.96

En la Figura 3.5 se realizó la comparación de la tasa de mineralización de cada sitio, con respecto a la tasa de mineralización del suelo testigo; se graficaron las

pendientes sin intercepto de cada sitio, considerando solo tres concentraciones para comparar los suelos, donde se observa que los sitios O3, O4 y O5, tienen altas tasas de mineralización y presentan mayor contenido de N (21.2, 23.4 y 30.5 mg kg⁻¹) y P (13, 21.8 y 17.4 mg kg⁻¹) respectivamente en comparación con los sitios O1 y O2, que presentan baja tasa de mineralización (Figura 3.5) y menor contenido de N (18.8 y 19.5 mg kg⁻¹) y P (6.2 y 6.4 mg kg⁻¹) respectivamente (Cuadro 3.1). El suelo del sitio O2 es el único que presenta una tendencia distinta de los demás, obteniendo tasas menores de mineralización que el suelo testigo sin adición de lignina (Figura 3.5).

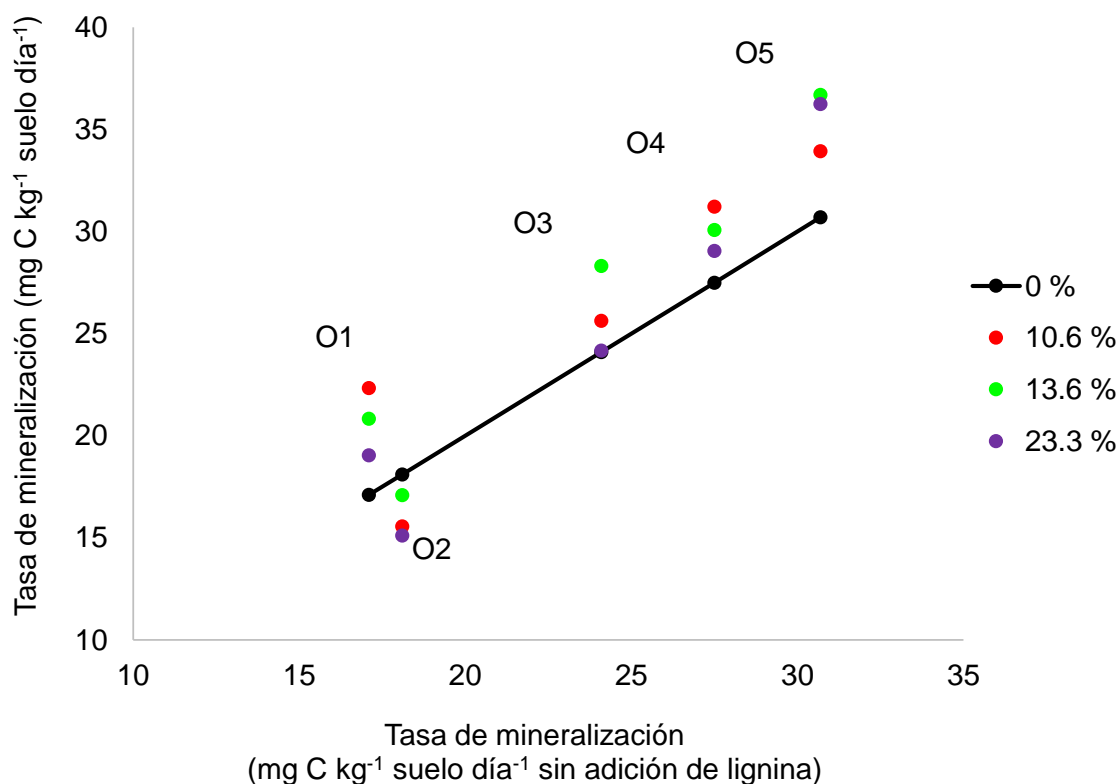


Figura 3.5. Comparación de la tasa de mineralización de cada sitio con respecto al tiempo, se graficaron las pendientes sin intercepto de cada sitio, considerando la concentración de lignina de un sitio en la incubación de 28 días.

En el suelo de cada uno de los cinco sitios se observa que la lignina de menor concentración presenta altas tasas de mineralización en comparación con los suelos de mayor concentración de lignina, por lo que la calidad de la hojarasca afecta la tasa de mineralización en cada sitio bajo condiciones controladas de temperatura y humedad.

3.6 Discusión

Incubación de 17 días. La mineralización de las reservas orgánicas está determinada por la actividad de la biomasa microbiana que se relaciona con las condiciones edafoclimáticas, por lo que a medida que estas sean favorables su actividad de mineralización será más eficiente (Avilés, 2002). En este experimento se observó que bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (35 °C y 60%) la eficiencia de la biomasa microbiana en la mineralización depende exclusivamente de la calidad de la hojarasca (% lignina) adicionada al suelo, ya que la tasa de mineralización disminuye de 43.6 a 30.3 mg C kg⁻¹ suelo día⁻¹ conforme se incrementa la concentración de lignina de 11.6% a 21.9% (Figura 3.3).

Algunos estudios mencionan que la descomposición de la hojarasca es más rápida con materiales vegetales de mayor calidad, es decir, material vegetal menos lignificado y mayor contenido nutrimental (Prescott *et al.*, 1992). Además la relación lignina:N es de suma importancia en la tasa de mineralización y esta varía dependiendo del material vegetal del cual se esté hablando, por ejemplo Silveira *et al.* (2011) determinaron en pino, encino y la mezcla de pino–encino con una relación lignina:N de 27, 15 y 13, y encontraron que la tasa de mineralización (C-CO₂) es más

rápida con menor concentración de lignina y baja relación lignina:N y la tasa de mineralización disminuye con incorporación de hojarasca con una relación lignina:N más alta.

En otro estudio realizado por Salah y Scholes (2011) evaluaron el efecto de la temperatura, la calidad de la hojarasca y cómo influye la aplicación de fertilizantes en la tasa de descomposición de acículas de *Pinus patula* y observaron que la cantidad de CO₂ producido fue generalmente más alta a temperaturas de 24 y 30 °C, comparadas con 15 y 18 °C, por lo que, la temperatura fue el principal factor que influyó en la tasa de descomposición. La calidad de la hojarasca no fue un estimador de la tasa de descomposición de acículas y el efecto de la fertilización no fue uniforme a través de las 16 semanas de incubación.

Incubación de 28 días. En el caso de la incubación de los suelos provenientes de los cinco sitios de estudios de *A. religiosa*, la calidad de la hojarasca no fue la que determinó la tasa de mineralización, lo que indica que otros factores la afectan. Los suelos de los sitios O3, O4 y O5, que presentan mayor densidad, pH, N_T y P (Cuadro 3.1) y alta acumulación de CO₂ (Figura 3.4), en general, contienen menor carbono orgánico en el suelo; tal vez, debido a la mayor tasa de mineralización estimada en estos suelos. Además, estos suelos fueron colectados de sitios con árboles de mayor apertura de dosel y diversidad de sotobosque; algunos autores mencionan que la descomposición es más rápida en bosques con claros que en aquellos cerrados, esto se ha atribuido a una mayor actividad microbiana resultante de las condiciones más cálidas húmedas en zonas taladas o con mayor apertura del dosel (Prescott *et al.*, 2004). Esto puede ser una causa de la diferencia entre los cinco sitios en la

acumulación de CO₂ (mg C kg⁻¹ suelo), ya que la actividad de la biomasa microbiana es la responsable de la mineralización de la materia orgánica y mientras mayor actividad se tenga se tendrá un mayor retorno de nutrimentos al suelo (León-Nájera *et al.*, 2006; Gregorich y Beare, 2007; Vásquez-Murrieta *et al.*, 2007).

Los suelos de los sitios O1 y O2, localizados a mayor altitud, tienen valores menores de densidad, pH, N_T y P (Cuadro 3.1) y menor acumulación de CO₂ (Figura 3.4), pero son los que contienen mayor acumulación de C en el suelo. Keeler *et al.*, (2009) mencionan que en sistemas templados la fertilización con N puede estimular la descomposición de más C lábil y disminuye la degradación de la lignina. Lui *et al.* (2013) probaron, en un bosque tropical maduro, el efecto de la adición de P y N en las comunidades microbianas y actividad en el suelo y como esto afecta los almacenes de carbono, encontraron que la respiración del suelo se incrementó significativamente después de adición P, a largo plazo, lo que sugiere que la actividad microbiana es mayor con adición de P, lo que permite una rápida transformación de la materia orgánica del suelo. Posiblemente esto sea una explicación de encontrar menor tasa de mineralización en los sitios O1 y O2, ya que contienen menor contenido de N y P en el suelo, que los sitios O3, O4 y O5.

El P extraído en este trabajo se determinó por el método Bray-Kurtz, el cual no corresponde con el estado nutricional de P en los árboles, y por lo tanto no es una determinación fiable de la disponibilidad de P en suelos forestales. En México, en ecosistemas forestales y Andosoles localizados en la Faja Volcánica Transmexicana se determinó el contenido de P por el método de Bray obteniendo 8.5 mg P kg⁻¹ suelo, en Guespalapa; 3 mg P kg⁻¹ suelo, en Tlálóc; 5.1 mg P kg⁻¹ suelo, en Pelado; 0.9 mg

P kg⁻¹ suelo, en Quinto Barrio; y 4.3 mg P kg⁻¹ suelo, en Las Trojes (Galván-Tejada *et al.* 2014). En Colombia en otro Andosol se determinó 2 mg P kg⁻¹ suelo (Medina *et al.* 2012). Teklay *et al.* (2009) mencionan que en suelos forestales de origen volcánico la concentración de P asimilable determinado con la metodología de Bray-II es de 4 mg kg⁻¹. Estos valores son menores que los determinados en este estudio, a diferencia del obtenido en Guespalapa, que es mayor que el de los sitios O1 (6.2 mg P kg⁻¹ suelo) y O2 (6.4 mg P kg⁻¹ suelo) de este estudio.

La diferencia en la composición química del suelo, por efecto de gradiente altitudinal y por la diversificación en el sotobosque de cada sitio (Liborio *et al.*, 2010), puede ser otra causa de la variación en la acumulación de CO₂. Algunos estudios han determinado que el C del suelo se incrementa con la altitud (Martínez-Rojas, 2010; Campos *et al.*, 2014; Ahmad y Somaiah, 2015). En este estudio se observó que los sitios de menor altitud tienen mayor tasa de mineralización y los de mayor altitud presentan menor tasa de mineralización; esto puede explicar la mayor acumulación de carbono en altas elevaciones (Figura 3.5).

Chatterjee y Jenerette (2015) mencionan que el contenido de MOS se puede predecir a través del gradiente altitudinal, con una relación lineal simple. Sin embargo, la predicción de la actividad metabólica del suelo no se puede predecir solo por el gradiente de elevación debido a que puede ser afectada por una serie de factores, como la calidad de la materia orgánica, la cantidad y la disponibilidad de la humedad del suelo.

El tiempo de incubación de 17 días es suficiente para observar las tendencias de tasa de mineralización con las cinco diferentes concentraciones de lignina y una acumulación de CO₂ que permitió estimar la actividad microbiana en el suelo de *A. religiosa*. Sin embargo, el tiempo de 28 días permite tener mayor acumulación de CO₂; en este solo se utilizaron tres concentraciones de lignina. Estas no permitieron observar una tendencia de la tasa de mineralización, por lo que es recomendable utilizar cinco o más concentraciones, para observar bien las tendencias.

3.7 Conclusiones

La tasa de mineralización bajo condiciones controladas de temperatura y humedad en un mismo tipo de suelo es afectada, principalmente, por la calidad de la hojarasca, ya que disminuye de 43.6 a 30.3 21 mg C kg⁻¹ suelo día⁻¹ conforme se incrementa la concentración de lignina de 11.6% a 21.9%.

La tasa de mineralización bajo condiciones controladas de temperatura y humedad en suelos de diferentes sitios de *A. religiosa* es afectada por la calidad de la hojarasca pero aumenta en suelos provenientes de menor altitud con 36 mg C kg⁻¹ suelo día⁻¹ y disminuye en suelos de mayor altitud a 21 mg C kg⁻¹ suelo día⁻¹.

CAPÍTULO IV

4. Análisis metagenómico de la diversidad bacteriana en ecosistemas forestales del monte Tláloc

4.1 Resumen

Se estudió la diversidad de comunidades bacterianas del suelo en diferentes ecosistemas del monte Tláloc, a lo largo de un gradiente altitudinal, usando la secuenciación masiva del gen 16S rARN en la plataforma Ion Torrent Personal Genome Machine System (PGM), con la química de 200 pb. Los ecosistemas estudiados fueron: encino, oyamel, pino y pradera alpina. El análisis de las secuencias reveló que la diversidad alfa de las comunidades bacterianas es más alta en el bosque de encino que en los otros ecosistemas localizados a mayores altitudes; posiblemente esto se deba al efecto de la temperatura y la calidad de la hojarasca. La estructura de las comunidades bacterianas cambia con el tipo de ecosistema; el bosque de pino solo tuvo tres filos bacterianos, mientras que el de encino tuvo cinco filos. El mayor número de géneros se presentó en encino, de los cuales ocho no se encontraron en los otros ecosistemas. Los resultados sugieren que la vegetación y la altitud juegan un papel importante en la regulación de la diversidad y la estructura de las comunidades bacterianas.

Palabras clave: microorganismos del suelo, comunidades microbianas, rizosfera, metagenoma, carbono.

CHAPTER IV

Metagenomic analysis of bacterial diversity in forest ecosystems of mount Tlaloc

4.2 Abstract

The soil bacterial diversity communities were studied in different ecosystems of mount Tlaloc along an elevational gradient using massive sequencing of 16S rRNA on Ion Torrent Personal Genome Machine System (PGM) with the chemistry of 200 bp. The ecosystems studied were: oak, fir, pine and alpine grassland. The sequencing analysis revealed that alpha diversity of bacterial communities is higher in oak forest than in the other ecosystems located at higher altitudes, possibly this is due to the effect of temperature and litter quality. The structure of bacterial communities change with the type of ecosystem, the pine forest had only three bacterial phyla, while oak had five. The highest number of bacterial genera occurs in oak where eight of these were not found in the other ecosystems. The results suggest that the vegetation and altitude play an important role in regulating the structure and diversity of bacterial communities.

Key words: soil microorganisms, microbial communities, rhizosphere, metagenome, carbon.

4.3 Introducción

El suelo es un sistema complejo que contiene una gran cantidad y diversidad de microorganismos; por sus atributos químicos, físicos y biológicos, así como por su interacción con las raíces de las plantas, este es uno de los hábitats microbianos más diversos (Quince *et al.*, 2008; Vos *et al.*, 2013). Aun cuando las comunidades microbianas del área de influencia de la raíz, conocida como rizosfera, juegan un papel importante en la nutrición y el desarrollo de las plantas (Bulgarelli *et al.*, 2013), se desconoce la función de la mayoría de las especies microbianas debido a que no son cultivables (Mendes *et al.*, 2013). Estos habitantes del suelo son un recurso microbiano valioso para el descubrimiento de nuevos productos útiles en diferentes sectores, como la medicina, la industria y la agricultura (Escalante-Lozada *et al.*, 2004; Ansari y Malik, 2013). En la actualidad, con modernas herramientas como la metagenómica, se ha logrado conocer y estudiar en más detalle todo ese material genético microbiano desconocido.

La metagenómica es una nueva aplicación de la biología molecular, la cual permite aislar, identificar y caracterizar el material genético total proveniente directamente de muestras ambientales; además, es una ciencia nueva que está ayudando a entender cómo los microorganismos, cultivables o desconocidos, se adaptan e interactúan con factores bióticos y abióticos en el suelo, y promete revelar nuevas moléculas, las cuales pueden tener diversas aplicaciones biotecnológicas (Escalante-Lozada *et al.*, 2004; Miao y Davies, 2009; Cecchini *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2013). El aislamiento del DNA genómico inicia con la extracción de DNA, la cual se realiza con métodos convencionales o con “kit” producidos por compañías privadas,

para un rango específico de material biológico. Sin embargo, el costo de estos productos puede ser una limitante cuando se trata de una gran cantidad de muestras (Ansari y Malik, 2013).

Los métodos convencionales para aislamiento de DNA de material biológico incluyen tres pasos. El primero es lisis de la pared celular y membranas; el segundo eliminación de contaminantes, como proteínas, polisacáridos u otros desechos celulares; y el tercero recuperación de DNA puro (Escalante-Lozada *et al.*, 2004).

En ecosistemas forestales, el estudio de la estructura y diversidad microbiana es de interés por el papel clave que juegan los microorganismos en su funcionamiento y equilibrio. Estos participan en procesos como la mineralización de la materia orgánica y el ciclo del nitrógeno y el fósforo, y se asocian con las raíces de las plantas, facilitando la absorción de nutrientes que no están disponibles. Otros grupos microbianos producen hormonas vegetales o funcionan como barreras protectoras contra la invasión de patógenos (Calvaruso *et al.*, 2007; Gamalero y Glick, 2011; Bever *et al.*, 2012).

Las modernas técnicas de metagenómica podrían facilitar el entendimiento de como está estructurada la comunidad microbiana en los ecosistemas, cuál es su función y qué factores la afectan. Mucho de lo que se ha hecho ha sido con base en el uso de medios de cultivo, análisis de fosfolípidos y de actividad metabólica asociada a diferentes fuentes de carbono (Tate y Rogers, 2002; Evgrafova *et al.*, 2008; Ansari y Malik, 2013). Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis de diversidad de comunidades bacterianas en el suelo del bosque de encino (*Q. laurina*,

Q. rugosa), bosque de oyamel (*A. religiosa*), bosque de pino (*P. harwegii*) y pradera alpina usando la plataforma de secuenciación masiva de Ion Torrent.

4.4 Materiales y Métodos

Muestreo de suelo. Se colectaron muestras compuestas de suelo en cinco sitios de cada ecosistema, cada muestra compuesta se preparó con la mezcla de 10 submuestras colectadas en cada sitio a una profundidad de 0 a 10 cm. Se colocaron en bolsas de plástico muestras de 20 g de suelo para su traslado en hieleras al laboratorio de metagenómica, donde se almacenaron a -20 °C hasta su análisis (Cuadro 4.1).

Secuenciación masiva por el método de Fusión primer (Ion torrent® Applied biosystem). La extracción de DNA metagenómico se realizó con el sistema comercial “EZ-10 Spin® Column soil DNA mini-presps kit” (BIOBASIC Inc.). Una vez obtenido el ADN de cada una de las muestras de suelo y antes de continuar se verificó la presencia y calidad del ADN, mediante una electroforesis y un gel de agarosa al 0.8%, a 100 v durante 1 h; para el cargado de muestras se utilizó 1 µL de Green-DNA Dye (sustituto de bromuro de etidio) (BIOBASIC Inc., Canadá) y 5 µL del DNA. El gel se visualizó en un fotodocumentador (Transiluminador Bio-imging Systems).

Las bibliotecas se construyeron mediante una PCR (reacción en cadena de la polimerasa, *Polymerase Chain Reaction*) punto final para las regiones hipervariables V3 y V6 del gen 16S rDNA. Se hizo una selección por tamaño molecular y se purificaron con el “kit” Agencourt® AMPure XP® (Beckman Coulter). El control de la purificación y la determinación de tamaños de los fragmentos se hizo con el equipo

Agilent Bioanalyzer Instrument (~35 min) (Life Technologies, Invitrogen™) y se estimó la concentración de amplicones de la biblioteca con el equipo Qubit 2.0 Fluorometer, utilizando los “kits” Qubits dsDNA HS Assay (Life Technologies, Invitrogen™, Darmstadt, Alemania). Se determinó la concentración molar (nmol L^{-1}) de cada biblioteca, utilizando el Bioanalyzer™ 2100 (Life Technologies, Agilent). Se generó el templado por medio de una PCR en emulsión con el equipo Ion OneTouch™ 2 (OT2) y “kit” Ion OneTouch™ 200 (Life Technologies, Invitrogen™). Se determinó el factor de dilución para la preparación del templado y obtener una concentración de la biblioteca de $\approx 26 \text{ pM}$ ($\approx 15.5 \times 10^6$ moléculas μL^{-1}) y se verificó la calidad y cantidad de monoclonales (templado).

El enriquecimiento se realizó con el Bead™ Enricher, esperando un valor de monoclonales antes del proceso de 10-30% y después de este fue $\geq 50 \%$. Se empleó el Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 para el control de calidad de la secuenciación. Para la iniciación del Ion Torrent™ PGM® System se realizó un lavado del equipo con hipoclorito y agua del 18 M Ω , después se utilizó el “kit” de Ion PGM Sequencing 200 v2. Se realizó el Chip Check (Ion 316™ Chip) y el llenado de los chips Ion 316™. La secuenciación de las bibliotecas de amplificación se llevó a cabo en el Ion Torrent™ PGM®, utilizando el “kit” Ion PGM Sequencing 200v2 para química de 200 bp (Cuadro 4.1). Los resultados se revisaron en el Ion Torrent browser. Se realizó un análisis de los datos de secuenciación masiva con diferentes programas bioinformáticos, para determinar las unidades taxonómicas operacionales (OTU); se calcularon las curvas de rarefacción y la riqueza de especies, mediante el programa estadístico R, seleccionando la referencia más cercana (s) y asignando la taxonomía

basada en el ancestro común. Conjuntamente, se estimó la diversidad alfa de la muestra.

Cuadro 4.1. Metagenomas analizados y técnicas de secuenciación.

Muestras de los ecosistemas forestales	Altitud (m)	Química Ion PGM™	Técnica de secuenciación
Pradera alpina (PA)	4060 - 4120	200 bp	<i>Fusion Primer</i>
Pino área alta (P _{1, 2, 3})	3845 - 3945	200 bp	<i>Fusion Primer</i>
Pino área baja (P _{4, 5, 6})	3607 - 3683	200 bp	<i>Fusion Primer</i>
Oyamel área alta (O _{1, 2, 3})	3370 - 3489	200 bp	<i>Fusion Primer</i>
Oyamel área baja (O _{4, 5})	3088 - 3196	200 bp	<i>Fusion Primer</i>
Encino área baja (E _{3, 4})	2732 - 2829	200 bp	<i>Fusion Primer</i>

Se crearon gráficos circulares, para ilustrar la distribución taxonómica de las secuencias del dominio, fila, clase, orden, familia y género. Cada porción indica el porcentaje de lecturas agrupadas en un nivel taxonómico específico. Se incluye la imagen de un gráfico dinámico (Krona) con la taxonomía completa del dominio Bacteria. Además, se realizó un diagrama de barras para comparar la distribución de todos los metagenomas de 200 bp. Se compararon con la base de datos de RNA M5RNA de MG-RAST, el valor de corte de identidad fue de 80%; se normalizaron los datos para obtener los gráficos de secuencias por dominio y la distribución de fila de cada muestra para el dominio Bacteria.

4.5 Resultados y Discusión

Calidad del análisis primario

El análisis primario indicó que la carga del chip fue de 82% de los pozos; se obtuvieron 5 165 671 lecturas (secuencias) con una longitud entre 18 pb y 200 pb; del total de secuencias se hizo el filtro de calidad y quedaron al final 3 220 687 lecturas que cumplieron los criterios de calidad establecidos para el llamado de bases y FastQC (Figura 4.1).

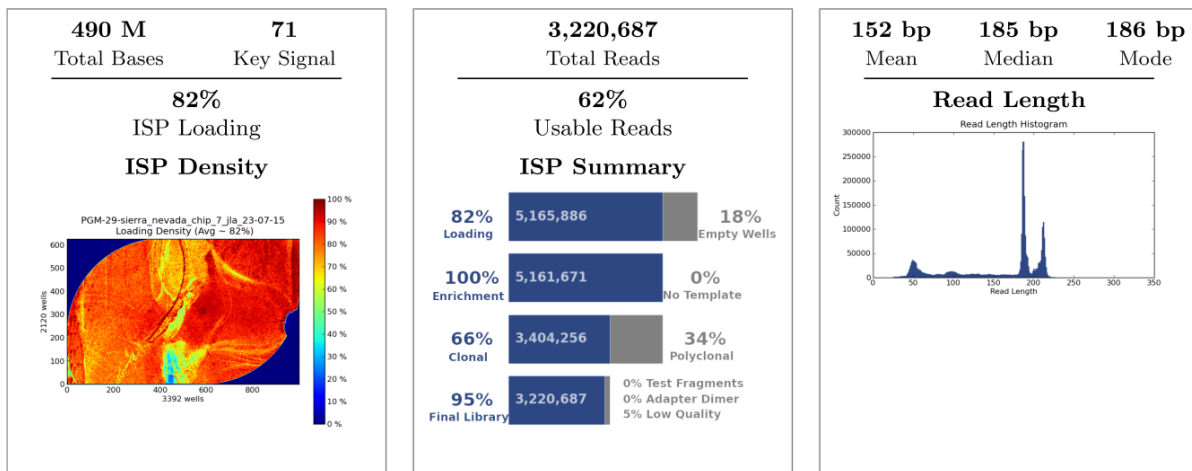


Figura 4.1. Análisis primario de la secuenciación de muestras de ecosistemas forestales. A) imagen del área cargada del chip en color rojo. B) resultado del número de secuencias obtenidas y el total de secuencias útiles para análisis secundario. C) representación gráfica de la longitud en pares de bases de las secuencias obtenidas.

Pradera alpina (4060 – 4120 m de altitud)

Análisis de calidad de las secuencias y distribución taxonómica. De un total de 240 secuencias que superaron el primer filtro de calidad que permitió el análisis bioinformático, 40 son de DNA ribosomal, y representó 13.8% de las secuencias. Los siguientes gráficos circulares ilustran la distribución taxonómica de las secuencias del dominio, filo, clase, orden, familia y género (Figura 4.2). Cada porción indica el porcentaje de lecturas agrupadas en un nivel taxonómico específico del dominio Bacteria.

En el ecosistema de pradera alpina (4060 – 4120 m de altitud), 53.8% del ADN ribosomal provino del dominio Bacteria; se encontraron tres filos bacterianos (Actinobacteria, Firmicutes y Tenericutes) y el filo Streptophyta (agrupa plantas terrestres y algas verdes) que representaron 61.5% del ADN ribosomal, el resto no se pudo clasificar. El filo más abundante fue Streptophyta con 46.2%. A nivel de clase tres grupos bacterianos estuvieron presentes: Actinobacteria (7.7%), Clostridia (3.6%) y Mollicutes (4%); un alto número de secuencias de ADN bacteriano no se pudo clasificar a nivel de clase (46.2%), posiblemente porque la información que presentaron las secuencias no fue suficiente para identificar a que clase pertenecían (Figura 4.2). Las familias bacterianas que estuvieron presentes fueron cuatro, representadas por Clostridiales, Microbacteriaceae, Micrococcaceae y Mycoplasmataceae, cada una con cerca del 4% del total de secuencias. Los géneros bacterianos encontrados en pradera alpina fueron: *Anaerococcus*, *Arthobacter*, *Clavibacter* y *Mycoplasma*.



Figura 4.2. Distribución taxonómica a nivel de dominio, fila, clase, orden, familia y género de las secuencias analizadas de DNA ribosomal obtenidas de suelo de pradera alpina (4060 – 4120 m de altitud) en el monte Tláloc.

Pino área alta (3845 – 3945 m de altitud)

Análisis de calidad de las secuencias y distribución taxonómica. De un total de 199 secuencias que superaron el primer filtro de calidad que permitió el análisis bioinformático, 45 son de DNA ribosomal; esto representó 22.6% de las secuencias. Los siguientes gráficos circulares ilustran la distribución taxonómica de las secuencias del dominio, filo, clase, orden, familia y género. Cada porción indica el porcentaje de lecturas agrupadas en un nivel taxonómico específico del dominio Bacteria (Figura 4.3).

En el bosque de pino área alta (3845 – 3945 m de altitud) 87.1% de las secuencias analizadas son del dominio Bacteria, el restante pertenece al dominio Eucariota. Se encontraron dos filos bacterianos: Acidobacteria y Proteobacteria, que correspondieron a 6.5% y 16.1% de las secuencias de ADN metagenómico. Los otros dos filos fueron Ascomycota (hongos) y Streptophyta (plantas terrestres y algas verdes) que representaron 9.7% y 3.2% de las secuencias, el restante 64.5% fue de secuencias que no se pudieron clasificar. A nivel de clase se tuvieron cuatro grupos (Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Solibacteres), los más abundantes fueron Gammaproteobacteria (9.7%) y Solibacteres (6.5%). El análisis metagenómico mostró que cuatro familias de bacterias están presentes en el bosque de pino de la parte alta: Burkholderiaceae, Desulfomicrobiaceae, Moraxellaceae y Solibacteraceae. Cada una de estas familias tuvo un género; en total, los géneros bacterianos presentes en este ecosistema fueron: *Burkholderia*, *Desulfomicrobium*, *Acinetobacter* y *Candidatus*, el más abundante fue *Acinetobacter*, con 9.7% de las secuencias (Figura 4.3).



Figura 4.3. Distribución taxonómica a nivel de dominio, fila, clase, orden, familia y género de las secuencias analizadas de DNA ribosomal obtenidas de suelo de bosque de pino área alta (3845 – 3945 m de altitud) en el monte Tlálloc.

Pino área baja (3607 – 3683 m de altitud)

Análisis de calidad de las secuencias (análisis fallido). De un total de 164 secuencias que superaron el primer filtro de calidad y permitió el análisis bioinformático, tres son de DNA ribosomal. No se presentan los resultados porque solo se obtuvo DNA de bacterias sin clasificación taxonómica.

Oyamel área alta (3370 – 3489 m de altitud)

Análisis de calidad de las secuencias y distribución taxonómica. De un total de 323 secuencias que superaron el primer filtro de calidad que permitió el análisis bioinformático, 93 son de DNA ribosomal, que correspondió a 28.8% de las secuencias. Los siguientes gráficos circulares ilustran la distribución taxonómica de las secuencias del dominio, fila, clase, orden, familia y género. Cada porción indica el porcentaje de lecturas agrupadas en un nivel taxonómico específico del dominio Bacteria (Figura 4.4).

Del total de secuencias analizadas, 97% correspondió al dominio Bacteria; se encontraron cuatro filos bacterianos: Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria, de los cuales el de mayor presencia fue Actinobacteria, con 13.6%. El análisis mostró que 63.6% de las secuencias derivadas de bacterias no se pudieron clasificar a nivel de filo (Figura 4.4).

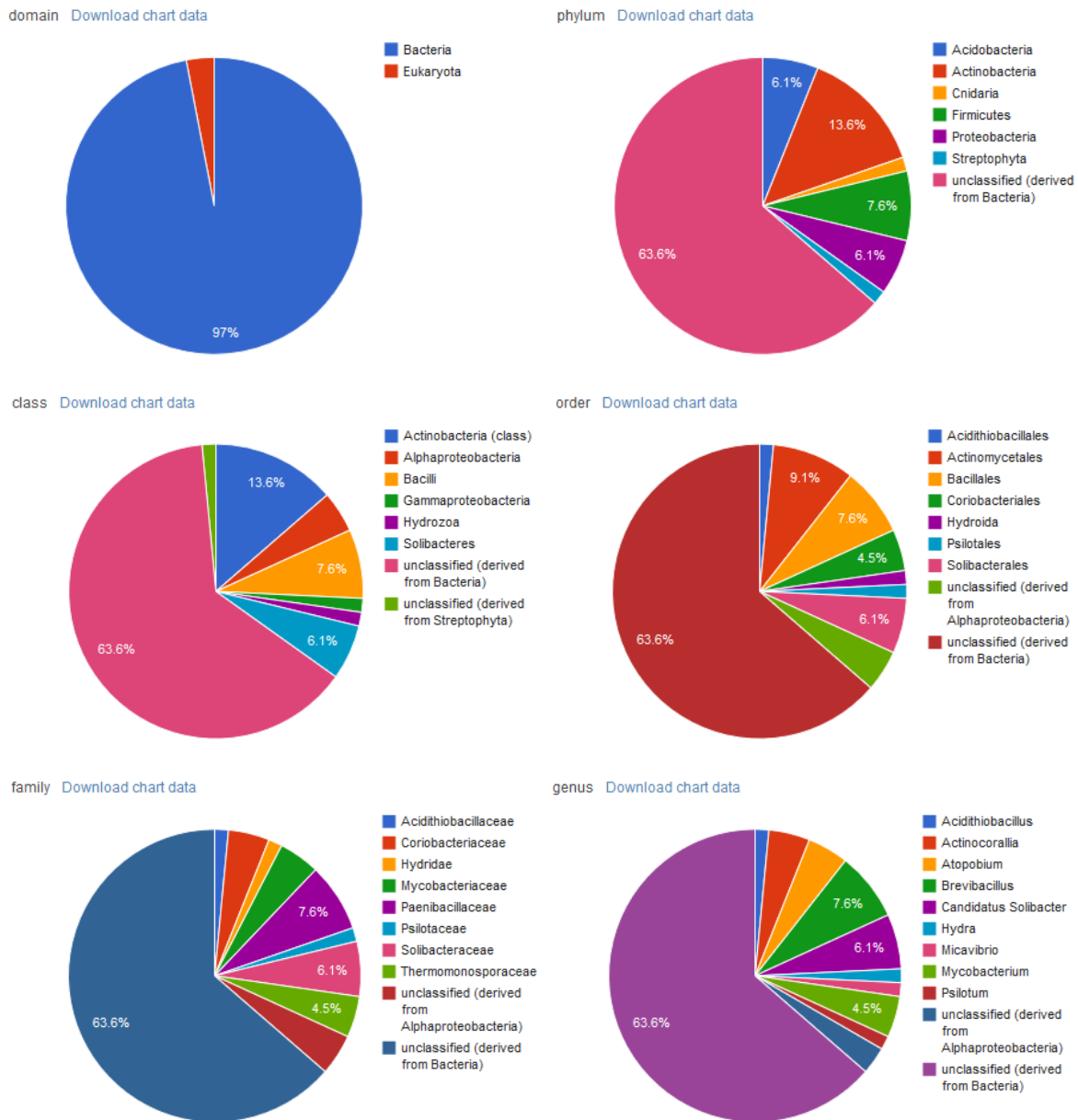


Figura 4.4. Distribución taxonómica a nivel de dominio, fila, clase, orden, familia y género de las secuencias analizadas de DNA ribosomal obtenidas de suelo de bosque de oyamel área alta (3370 – 3489 m de altitud) en el monte Tláloc.

A nivel de clase, los grupos presentes fueron: Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacilli y Solibacteres. La más abundante fue Actinobacteria, con 13.6% de las secuencias analizadas. Las familias de bacterias presentes en bosque de oyamel, de la parte alta, fueron seis: Acidithiobacillaceae,

Coriobacteriaceae, Mycobacteriaceae, Paenibacillaceae, Solibacteraceae y Termomonosporaceae; las dos familias que presentaron mayor número de secuencias fueron Paenibacillaceae, con 7.6% y Solibacteraceae, con 6.1%. Los géneros con mayor representación fueron *Brevibacillus*, con 7.6%, y *Candidatus solibacter*, con 6.1%, de las secuencias analizadas (Figura 4.4).

Oyamel área baja (3088 – 3196 m de altitud)

Análisis de calidad de las secuencias y distribución taxonómica. De un total de 199 secuencias que superaron el primer filtro de calidad que permitió el análisis bioinformático, 37 fueron de DNA ribosomal, que representaron 18.6% de las secuencias. Los siguientes gráficos circulares ilustran la distribución taxonómica de las secuencias del dominio, filo, clase, orden, familia y género. Cada porción indica el porcentaje de lecturas agrupadas en un nivel taxonómico específico del dominio Bacteria (Figura 4.5).

Del total de secuencias analizadas, 100% fue del dominio Bacteria. Se encontraron cuatro filos bacterianos (Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria) que representaron 63.6%; el resto de secuencias no se pudo clasificar. Estos filos, los que tuvieron mayor número de secuencias fueron Actinobacteria, con 27.3%, y Acidobacteria, con 18.2% (Figura 4.5). Cada uno de estos filos tuvo una clase, por lo que la proporción de secuencias en las clases fue igual que en el filo: Actinobacteria (27.3%), Alphaproteobacteria (9.1%), Bacili (9.1%) y Solibacteres (18.2%). De igual forma, se mantuvo la proporción a nivel de familia, ya que a cada

clase le correspondió una sola familia, las cuales fueron cuatro: Mycobacteriaceae, Methylocystaceae, Paenibacillaceae y Solibacteraceae.



Figura 4.5. Distribución taxonómica a nivel de dominio, fila, clase, orden, familia y género de las secuencias analizadas de DNA ribosomal obtenidas de suelo de bosque de oyamel área baja (3088 – 3196 m de altitud) en el monte Tláloc.

Los géneros que estuvieron presentes en el bosque de oyamel parte baja fueron cuatro: *Mycobacterium*, *Brevibacillus*, *Candidatus Solibacter* y uno desconocido, derivado de la familia Methylocystaceae (Figura 4.5).

Encino área baja (2732 – 2829 m de altitud)

Análisis de calidad de las secuencias y distribución taxonómica. La muestra de suelo del ecosistema de encino de la parte baja (2732 – 2829 m de altitud) se secuenció con el método de *Fusion Primer* y química de 200 bp de Ion Torrent™. De un total de 392 secuencias que superaron el primer filtro de calidad y permitió el análisis bioinformático, 103 son de DNA ribosomal, correspondientes a 26.3% del total. Los siguientes gráficos circulares ilustran la distribución taxonómica de las secuencias del dominio, filo, clase, orden, familia y género. Cada porción indica el porcentaje de lecturas agrupadas en un nivel taxonómico específico. Se incluye la imagen de un gráfico dinámico (Krona), con la taxonomía completa del dominio Bacteria (Figura 4.6).

Del total de secuencias analizadas, 71.3% corresponde al dominio Bacteria, el cual estuvo constituido por cuatro filos: Actinobacteria (13.8%), Proteobacteria (10%), Firmicutes (2.4%) y Tenericutes (2.4%); el resto de secuencias bacterianas, correspondiente a 42.5%, no se clasificaron. Además, hubo dos filos que no pertenecen al dominio Bacteria (Figura 4.6).

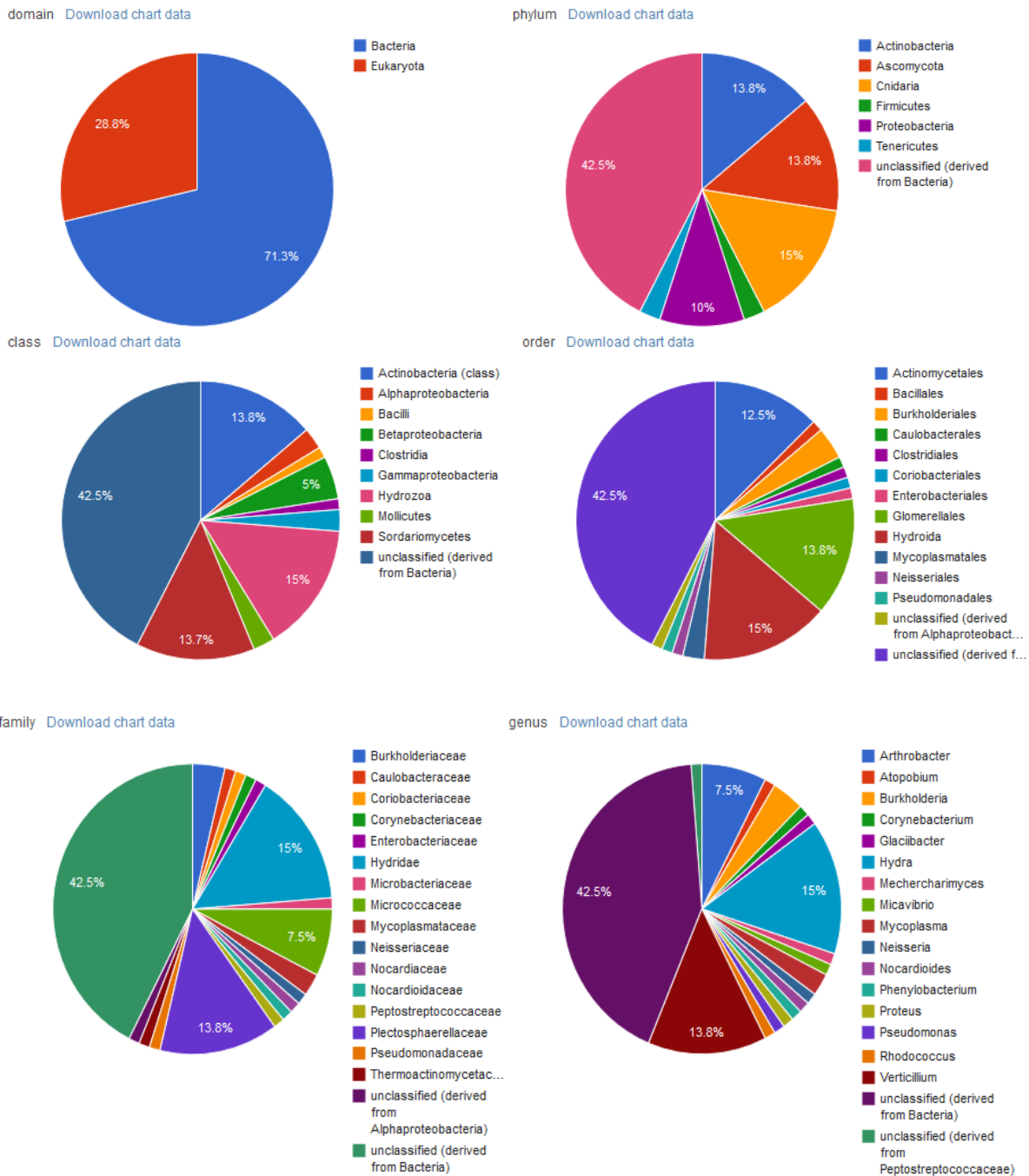


Figura 4.6. Distribución taxonómica a nivel de dominio, fila, clase, orden, familia y género de las secuencias analizadas de DNA ribosomal obtenidas de suelo de bosque de encino área baja (2732 – 2829 m de altitud) en el monte Tláloc.

A nivel de clase se tuvieron siete grupos: Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gamaproteobacteria, Bacilli, Clostridia y Mollicutes, de los cuales Actinobacteria fue la que estuvo representada en mayor proporción con 13.8%. En relación con las familias bacterianas, se encontraron 13 familias, de las cuales Micrococcaceae y Burkholderiaceae fueron las que tuvieron mayor número de secuencias, con 7.5% y 3.5%, respectivamente. Los géneros encontrados fueron 14, de los cuales el que tuvo mayor número de secuencias fue *Arthrobacter*, con 7.5% del total, le siguió *Burkholderia*, con 3.5% (Figura 4.6).

Comparación entre todos los metagenomas analizados (química 200 bp). El diagrama de barras para comparar la distribución de todos los metagenomas de 200 bp comparados con la base de datos de RNA M5RNA de MG-RAST, para el total de secuencias por dominio y la distribución de filo del dominio Bacteria, se muestran en los siguientes gráficos. Se encontró un gran porcentaje de bacterias no clasificadas y solo cinco filos se encontraron en la mayoría de los suelos, en los diferentes ecosistemas muestreados (Figura 4.7).

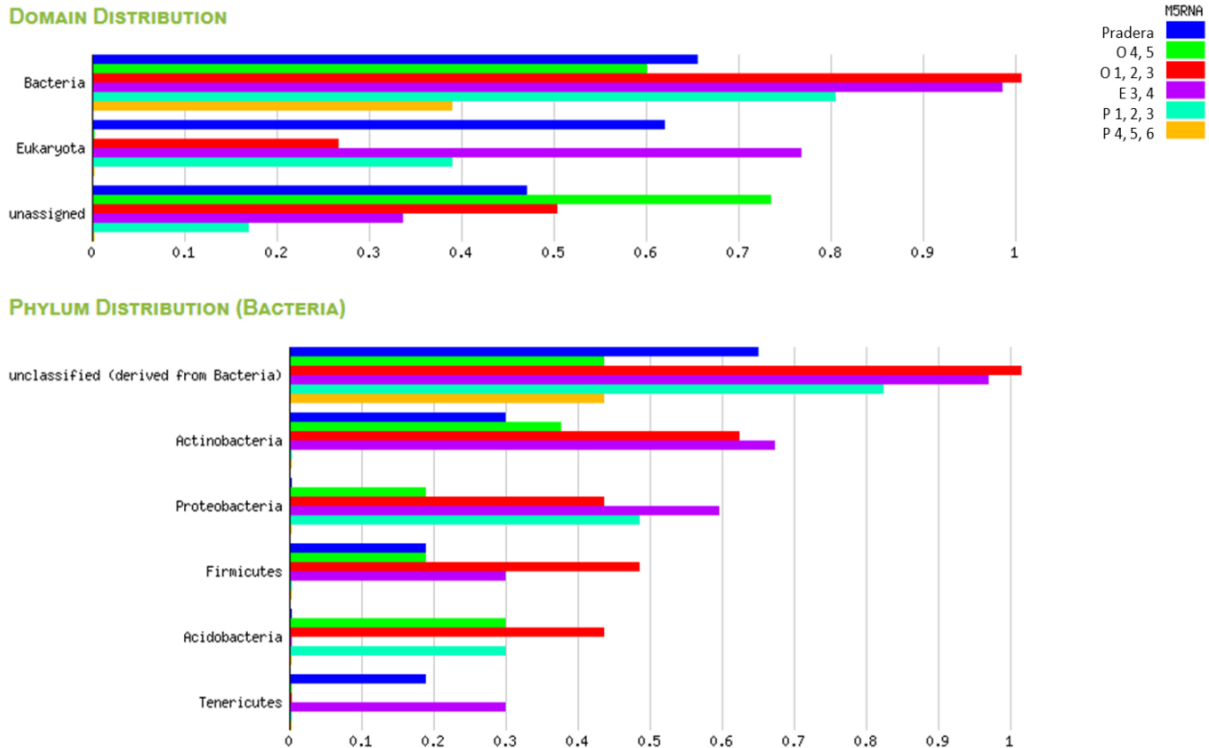


Figura 4.7. Comparación entre metagenomas analizados de ecosistemas forestales del monte Tláloc a nivel de dominio y filo. La escala es de 0 a 1 relativa al valor máximo encontrado de secuencias.

E_{3,4} – encino área baja (2732 – 2829 m de altitud), O_{4,5} – oyamel área baja (3088 – 3196 m de altitud), O_{1,2,3} – oyamel área alta (3370 – 3489 m de altitud), P_{4,5,6} – pino área baja (3607 – 3683 m de altitud), P_{1,2,3} – pino área alta (3845 – 3945 m de altitud), Pradera – pradera alpina (4060 – 4120 m de altitud).

El filo encontrado en mayor porcentaje en los diferentes ecosistemas determinados fue Actinobacteria, son un grupo importante de bacterias saprófitas y de crecimiento filamentoso capaces de producir una amplia variedad de enzimas extracelulares y metabolitos secundarios de interés comercial e industrial. Su abundancia en el suelo de los ecosistemas decrece en el siguiente orden: encino área baja (E_{3,4}), oyamel área alta (O_{1,2,3}), oyamel área baja (O_{4,5}) y pradera;

de pino área alta (P_{1, 2, 3}) no se encontró, la muestra de suelo pino área baja (P_{4, 5, 6}) no se consideró, por ser un análisis fallido (Figura 4.7).

El segundo filo encontrado en mayor porcentaje fue Proteobacteria, grupo de bacterias que incluyen patógenos, como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter* y *Neisseria gonorrhoea*, entre otros. Algunas son bacterias de vida libre e incluyen bacterias fijadoras de nitrógeno, por ejemplo, Rizobios. Su abundancia en orden decreciente en los ecosistemas es el siguiente: encino área baja (E_{3, 4}), pino área alta (P_{1, 2, 3}), oyamel área alta (O_{1, 2, 3}), oyamel área baja (O_{4, 5}) y en pradera alpina no se encontró (Figura 4.7).

El tercer filo con mayor porcentaje encontrado fue Firmicutes (del latín *firmus* = fuerte y *cutis* = piel, en referencia a su gruesa pared celular) o endobacteria (por la presencia de endosporas), son gram positivas, tiene forma de bacilo y a veces de coco. Las endosporas las hacen resistentes a la desecación y pueden sobrevivir en condiciones extremas. Se encuentran en diversos hábitats e incluyen algunos patógenos. Firmicutes se encontró en el siguiente orden decreciente: oyamel área baja (O_{4, 5}), oyamel área alta (O_{1, 2, 3}) y encino área baja (E_{3, 4}), en pradera alpina, y en pino área alta (P_{1, 2, 3}) no se encontró (Figura 4.7).

El cuarto filo encontrado en mayor porcentaje, en la mayoría de los ecosistemas, fue Acidobacteria, el cual se encuentra en la rizosfera de las plantas y pueden interactuar con las propias plantas o con las comunidades asociadas con las plantas (Nunes *et al.*, 2013); se encontró en mayor porcentaje en el siguiente orden

decreciente: oyamel área alta ($O_{1, 2, 3}$), oyamel área baja ($O_{4, 5}$) y pino área alta ($P_{1, 2, 3}$); en pradera y encino área baja ($E_{3, 4}$) no se encontró (Figura 4.7).

El quinto filo encontrado en mayor porcentaje, pero solo en dos ecosistemas fue Tenericutes o Mollicutes, el cual carece de pared celular y comúnmente, son llamados micoplasmas. Son parásitos primarios de varios animales y plantas que viven dentro de las células huésped. Se encontró en el siguiente orden decreciente: encino área baja ($E_{3, 4}$) y pradera alpina.

Se calculó la curva de rarefacción para todos los metagenomas, con los mismos parámetros para la identidad de secuencias en la base de datos M5RNA. El número de secuencias más alto correspondió a encino área baja ($E_{3, 4}$), el cual presentó también un mayor número de especies. El ecosistema de pino área baja ($P_{4, 5, 6}$) tuvo bajo número de secuencias y especies, ya que el análisis fue fallido. Las curvas de rarefacción en los demás ecosistemas muestran que a medida que crece el número de secuencias también crece el número de especies. Excluyendo el análisis fallido de pino ($P_{4, 5, 6}$), la diversidad alfa fue de mayor a menor en el siguiente orden: encino, oyamel, pino y pradera alpina. Fueron muy similares oyamel área alta y baja, así como pino y pradera (Figura 4.8). Esto sugiere que a medida que aumenta la altitud la diversidad disminuye.

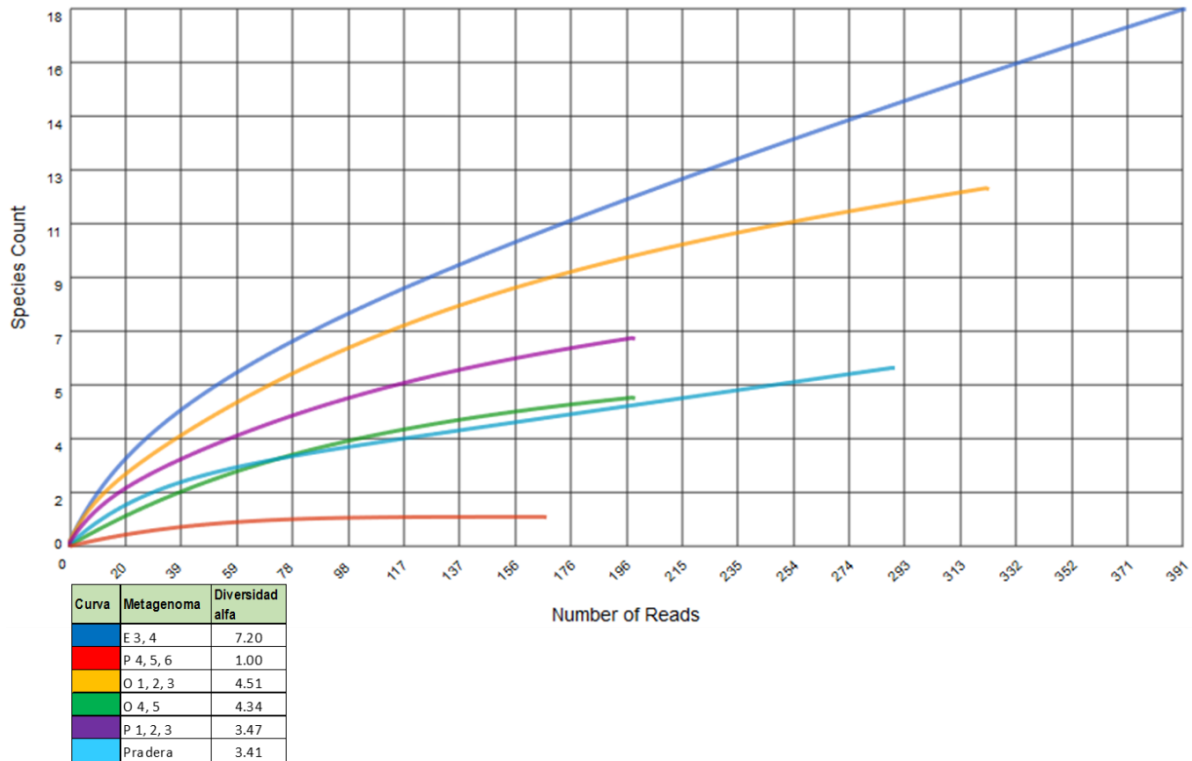


Figura 4.8. Curvas de rarefacción y diversidad alfa determinadas a partir del análisis metagenómico de los suelos de diferentes ecosistemas del monte Tláloc.

E_{3, 4} – encino área baja (2732 – 2829 m de altitud), O_{4, 5} – oyamel área baja (3088 – 3196 m de altitud), O_{1, 2, 3} – oyamel área alta (3370 – 3489 m de altitud), P_{4, 5, 6} – pino área baja (3607 – 3683 m de altitud), P_{1, 2, 3} – pino área alta (3845 – 3945 m de altitud), Pradera – pradera alpina (4060 – 4120 m de altitud).

Este es el primer trabajo que se realiza en este ecosistema forestal de México para estudiar la diversidad bacteriana usando herramientas de metagenómica de última generación. El análisis informático indica que entre 36.4% – 64.5% de las secuencias provienen de bacterias desconocidas o que la longitud de la secuencia no fue suficiente como para compararla con las bases de datos existentes, de tal forma que no fue posible su clasificación (Figuras 4.2 a 4.7). Sin considerar el análisis fallido de la muestra de pino área alta, el número de lecturas bacterianas (secuencias) en las muestras de suelo analizadas varió de 196 a 391; el ecosistema de encino fue el que

presentó el mayor número de secuencias, lo cual sugiere una mayor riqueza de especies en este ecosistema, tal como lo muestra la curva de rarefacción (Figura 4.8).

El fuerte contraste del número de especies encontradas en encino, con respecto a lo encontrado en oyamel o pino (Figuras 4.3, 4.4 y 4.5), indica que la estructura de la comunidad bacteriana del bosque de encino es distinta de la presentada por las coníferas (pino y oyamel). Al respecto, estudios en ecosistemas forestales que usaron el análisis de fosfolípidos para evaluar diversidad, muestran que las estructuras de las comunidades bacterianas entre coníferas y caducifolias son distintas, lo que puede estar dado por la calidad de la hojarasca y las condiciones microclimáticas creadas (Swallow *et al.*, 2009; Thoms *et al.*, 2010; Bever *et al.*, 2012).

La estructura de las comunidades microbianas puede modificarse por el cambio de uso del suelo, el cual altera las propiedades físico-químicas en el suelo y las condiciones microambientales que tienen una influencia directa en los microorganismos que viven ahí (Macdonald *et al.*, 2009). Un aumento en la diversidad alfa se ha observado asociada a la deforestación en áreas tropicales, debido a que se reduce la materia orgánica y se alteran las propiedades químicas del suelo que tienen un fuerte influencia en las comunidades microbianas (Navarrete *et al.*, 2015).

En el presente estudio, el índice de diversidad alfa muestra que hay una asociación entre la diversidad y el tipo de ecosistema, además indica que hay un efecto de gradiente altitudinal, ya que los ecosistemas de pino área alta (3845 – 3945 m de altitud) y pradera alpina (4060 – 4120 m de altitud) fueron los que presentaron la menor diversidad (Figura 4.8). Esto tiene similitud a lo reportado por Castaldini *et al.* (2002),

quienes observaron que miembros de los subgrupos alfa y gamma de Proteobacteria estuvieron mejor representados a altitudes de 940 m que a mayores altitudes. En este caso, posiblemente tres factores fueron los responsables de esa menor diversidad: temperatura baja, pH ácido y recalcitrancia del material vegetal. En pino y pradera alpina del monte Tláloc, la temperatura promedio del suelo en el año es de alrededor de 5 °C, el pH es entre 4.5 y 4.7; además, algunos autores han determinado intervalos de lignina de 15% a 22.6% en cinco especies de encino (Honorato y Hernández, 1998) y de 24% a 28.5% de lignina en diferentes especies de pino (Bernabé-Santiago *et al.*, 2013).

Las plantas hospedan pocos filos de microorganismos, entre los que se encuentran Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria, siendo más abundantes en la rizosfera (Bulgarelli *et al.*, 2013); los ecosistemas forestales del monte Tláloc no fueron la excepción, donde se encontraron cinco filos, de los cuales Actinobacteria fue de los más abundantes, en particular en encino área baja y oyamel área alta. Firmicutes solo estuvo presente en encino y pradera alpina (Figuras 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6).

En relación con el número de géneros encontrados, encino área baja fue el que tuvo el mayor número, y también fue el que tuvo la mayor diversidad alfa (Figura 4.6 y 4.8). Estudios sobre el efecto del uso del suelo en la diversidad microbiana de áreas tropicales muestran que los ecosistemas más diversos son las áreas agrícolas y las praderas; sin embargo, en los ecosistemas tropicales el equilibrio se sustenta en poca diversidad y mayor abundancia de microorganismos (Mendes *et al.*, 2015).

4.6 Conclusiones

El ecosistema forestal de monte Tláloc con mayor diversidad alfa fue el bosque de encino, con 7.2; en general, en ecosistemas de mayor altitud la diversidad bacteriana disminuye: en oyamel se tuvo 4.34 y 4.51, en pino 1 y 3.47, y en pradera alpina 3.41.

CONCLUSIONES GENERALES

- La producción de hojarasca en el ecosistema de *Abies religiosa* es mayor en acículas con 67% y en segundo lugar ramas con 23%.
- En la estación de otoño es donde se presenta mayor producción de hojarasca en acículas.
- El porcentaje de pérdida de peso de acículas fue 44% y de ramas 32% después de 475 días.
- Los valores promedio de tasa de descomposición para acículas es $k = 0.439 \text{ año}^{-1}$ y para ramas es $k = 0.294 \text{ año}^{-1}$.
- Los flujos de CO_2 , debidas a la respiración del suelo fueron mayores en época de lluvia.
- En *A. religiosa* la producción de hojarasca fue mayor en sitios de mayor altitud (O1 y O2) pero su tasa de descomposición fue menor en comparación con los sitios de menor altitud (O4 y O5), exceptuando el sitio O3.
- La tasa de mineralización bajo condiciones controladas de temperatura y humedad en el suelo de los 5 sitios de estudio de *A. religiosa* es afectada por la calidad de la hojarasca.
- La tasa de mineralización en muestras de suelo provenientes de menor altitud fue de $36 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ y en muestras de suelo de mayor altitud fue de $21 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$.
- Los filos bacterianos encontrados en los ecosistemas del monte Tláloc fueron Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteria y Tenericutes.

- La estructura de la comunidad bacteriana del bosque de encino es distinta a la presentada por las coníferas (oyamel y pino).
- El índice de diversidad alfa varió en el siguiente orden decreciente: encino (7.2), oyamel (4.34 - 4.51), pino (3.47) y pradera alpina (3.41); esto muestra que hay una asociación entre la diversidad y el tipo de ecosistema, además indica que hay un efecto de gradiente altitudinal.

LITERATURA CITADA

- Aceñolaza, P. G., L. P. Zamboni, y J. F. Gallardo L. 2009. Aporte de hojarasca en bosques del predelta del río Paraná (Argentina). *Bosque* 30(3): 135-145.
- Aguirre-Planter, E., G. R. Furnier, and L. E. Eguiarte. 2000. Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern México and Guatemala. *American Journal of Botany* 87(3): 362-371.
- Aguirre-Planter, E., J. P. Jaramillo-Correa, S. Gómez-Acevedo, D. P. Khasa, J. Bousquet, and L. E. Eguiarte. 2012. Phylogeny, diversification rates and species boundaries of Mesoamerican firs (*Abies*, *Pinaceae*) in a genus-wide context. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 263-274.
- Ahmad, D. J. and S. Somaiah. 2015. Altitudinal variation of soil organic carbon stocks in temperate forests of Kashmir Himalayas, India. *Environmental Monitoring and Assessment* 187(11): 1-15.
- Akburak, S. and E. Makineci. 2013. Temporal changes of soil respiration under different tree species. *Environmental Monitoring and Assessment* 185: 3349-3358.
- Alcántar G., G. y M. V. Sandoval. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación especial No 10. Sociedad Mexicana del Suelo. Chapingo, México. 156 p.
- Allen, C. D., A. K. Macalady, H. Chenchouni, D. Bachelet, N. McDowell, M. Venetier, T. Kitzberger, A. Rigling, D. D. Breshears, E.H. (Ted.) Hogg, P. Gonzalez, R. Fensham, Z. Zhang, J. Castro, N. Demidova, J.-H. Lim, G. Allard, S. W. Running, A. Semerci, and N. Cobb. 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* 259: 660-684.
- Ansari, M. I. and A. Malik. 2013. Recent Development in the Methods of Studying Microbial Diversity. *In*: Malik A., E. Grohmann and M. Alves (eds.). *Management of Microbial Resources in the Environment*. Springer, London. pp 17-50.
- Augusto L., J. Ranger, D. Binkley, and A. Rothe. 2002. Impact of several common tree species of European temperate forests on soil fertility. *Annals of Forest Science* 59: 233-253.
- Avilés M., S. M. 2002. La respiración del suelo como indicador de la mineralización de las reservas orgánicas edáficas activas en suelos calcáreos. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México.
- Bardgett, R. D., C. Freeman, and N. J. Ostle. 2008. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *International Society for Microbial Ecology* 2: 805-814.
- Bate, J. S., G. J. Masters, I. D. Hodkinson, C. Awmack, T. M. Bezemer, V. K. Brown, J. Butterfield, A. Buse, J. C. Coulson, J. Farrar, J. E. Good, R. Harrington, S. Hartley, T. H. Jones, R. L. Lindroth, M. C. Press, I. Symrnioudis, A. D. Watt, and J. B. Whittaker. 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology* 8: 1-16.

- Bernabé-Santiago R., L. E. A. Ávila-Calderón y J. G. Rutiaga-Quiñones. 2013. Componentes químicos de la madera de cinco especies de pino del municipio de Morelia, Michoacán. *Madera y Bosques* 19(2): 21-35.
- Bever, J. D., T. G. Platt and E. R. Morton. 2012. Morton. Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annual Review of Microbiology* 66: 265-283.
- Bishop, J. y N. Landell-Mills. 2006. Los servicios ambientales de los bosques. *In: La Venta de Servicios Ambientales Forestales*. Pagiola S., J. Bishop y N. Landell-Mills. (comps). México, D. F. 2ª (ed.) Instituto Nacional de Ecología. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. pp: 47-74.
- Bonan, G. B. and K. Van-Cleve. 1992. Soil temperature, nitrogen mineralization, and carbon source-sink relationships in boreal forests. *Canadian Journal of Forest Research* 22(5): 629-639.
- Borken, W., Y.-J. Xu, E. A. Davidson, and F. Beese. 2002. Site and temporal variation of soil respiration in European beech, Norway spruce, and Scots pine forests. *Global Change Biology* 8: 1205-1216.
- Bulgarelli, D., K. Schlaeppi, S. Spaepen, E. Ver Loren van Themaat, and P. Schulze-Lefert. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Reviews of Plant Biology* 64: 807-38.
- Cairns, M. A., P. K. Haggerty, R. Alvarez, B. H. J. De Jong and I. Olmsted. 2000. Tropical Mexico's recent land-use change: A region's contribution to the global carbon cycle. *Ecological Applications* 10(5): 1426-1441.
- Calvaruso, C., M. - P. Turpault, E. Leclerc and P. Frey - Klett. 2007. Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. *Microbial Ecology* 54: 567-577.
- Castaldini M., A. Mirabella, G. Sartori, A. Fabiani, F. Santomassimo and N. Miclaus. 2002. Soil development and microbial community along an altitudinal transect in trentino mountains. *Developments in Soil Science* 28: 217-228.
- Castellanos-Acuña D., Lindig-Cisneros R. and Sáenz-Romero C. 2015. Altitudinal assisted migration of Mexican pines as an adaptation to climate change. *Ecosphere* 6(1): 2.
- Cecchini D. A., E. Laville, S. Laguerre, P. Robe, M. Leclerc, J. Doré, B. Henrissat, M. Remaud-Siméon, P. Monsan and G. Potocki-Véronese. 2013. Functional metagenomics reveals novel pathways of prebiotic breakdown by human gut bacteria. *PLoS ONE* 8(9): e72766.
- Chatterjee A. and G. D Jenerette. 2015. Variation in soil organic matter accumulation and metabolic activity along an elevation gradient in the Santa Rosa Mountains of Southern California, USA. *Journal of Arid Land* 7(6): 814-819.
- Claudino, G. T., L. C. Assis, and E. Nahas. 2008. Decomposition of the rubber tree *Hevea brasiliensis* litter at two depths. *Chilean Journal of Agricultural Research* 68: 128-135.
- Coakley, S. M., H. Scherm, and S. Chakraborty. 1999. Climate change and plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* 37: 399-426.

- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2012. Inventario Nacional Forestal y de Suelos. Informe 2004-2009. México, D. F. 175 p.
- Cornelissen, J. H. C. 1996. An experimental comparison of leaf decomposition rates in wide range of temperate plant species and types. *Journal of Ecology* 84: 573-582.
- Davidson, E. A. and I. A. Janssens. 2006. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature* 440: 165-173.
- De Jong B., O. Masera, y T. Hernández – Tejeda. 2004. Opciones de fijación de carbono en el sector forestal. *In: Cambio Climático: Una visión desde México*. Martínez J., A. Fernández B. y P. Osnaya (comps). México. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. pp: 369-380.
- Di Stefano J. F. y L. A. Fournier. 2005. Caída de hojarasca y tasas de descomposición de las hojas de *Vochysia guatemalensis* en una plantación de 10 años, Tabarcia de Mora, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 29(1): 9-16.
- Djukic I, F Zehetner, A. Mentler, and M. H. Gerzabek. 2010. Microbial community composition and activity in different alpine vegetation zones. *Soil Biology and Biochemistry* 42:155-161.
- Edmonds, R. L. 1990. Organic Matter Decomposition *In: Western United States Forests. Symposium on Management and Productivity of Western-Montane Forest Soils*. Boise, ID. pp: 10-12.
- Epron D., Nouvellon Y., Roupsard O., Mouvondy W., Mabiála A, Saint-André L., Joffre R., Jourdan C., Bonnefond J-M., Berbigier P. and Hamel O. 2004. Spatial and temporal variations of soil respiration in a Eucalyptus plantation in Congo. *Forest Ecology and Management* 202: 149-160.
- Escalante-Lozada A., G. Gosset-Lagarda, A. Martínez-Jiménez y F. Bolívar-Zapata. 2004. Diversidad bacteriana del suelo: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia* 28: 583-592.
- Etchevers, B. J. D., C. Prat, C. Balbontín, M. Bravo, and M. Martínez. 2006. Influence of land use on carbon sequestration and erosion in Mexico, a review. *Agronomie* 26: 1-9.
- Evgrafova, Y. S., H. Santruckova, O. B. Shibistova, D. Elhottova, B. Cerna, G. K. Zrazhevskaya and D. Lloyd. 2008. Phospholipid fatty acid composition of microorganisms in pine forest soils of Central Siberia. *Microbiology* 35(5): 452-458.
- FAO, 2001. El Cambio Climático y los Bosques. *In: Situación de los Bosques del Mundo 2001*. México. pp: 60-73.
- FAO, 2006. Global Forest Resources Assessment 2005, Progress Towards Sustainable Forest Management. FAO Forestry Paper No. 147. Rome, Italy. 320 p.
- French S., D. Levy-Booth, A. Samarajeewa, K. E. Shannon, J. Smith, and J. T. Trevors. 2009. Elevated temperatures and carbon dioxide concentrations: effects on selected microbial activities in temperate agricultural soils. *World Journal Microbiology Biotechnology* 25: 1887-1900.
- Galván-Tejada N. C., V. Peña-Ramírez, L. Mora-Palomino and C. Siebe. 2014. Soil P fractions in a volcanic soil chronosequence of Central Mexico and their relationship to foliar P in pine trees. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 177: 792-802.

- Gamalero, E. and B. R. Glick. 2011. Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. *In*: Maheshwari DK. (ed.). Bacteria in agrobiología: Plant nutrient management, Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin. pp. 17-46.
- García I. C., F. Gil S., T. Hernández F. y C. Trasar C. 2003. Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos: Medida de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana. Mundi-Prensa. Madrid. 371 p.
- Girisha, G. K., L. M. Condon, P. W. Clinton and M. R. Davis. 2003. Decomposition and nutrient dynamics of green and freshly fallen radiata pine (*Pinus radiata*) needles. *Forest Ecology and Management* 179: 169–181.
- González A., M. E. 2007. La frontera norte de México ante el cambio climático global y los mercados de carbono. *Frontera norte*, 19(38): 219-226.
- Gregorich, E. G., and M. H. Beare. 2007. Physically uncomplexed organic matter. *In*: Carter M. R. and E.G. Gregorich (eds.) Soil sampling and methods of analysis. 2nd (ed.) CRC Press, Boca Raton, F. L. pp: 607-616.
- Gregorich, E. G., C. F. Drury and J. A. Baldock. 2001. Changes in soil carbon under long-term maize in monoculture and legume-based rotation. *Canadian Journal of Soil Science* 81: 21-31.
- Grogan, P. 1998. CO₂ flux measurement using soda lime: correction for water formed during CO₂ adsorption. *Ecology* 79(4): 1467-1468.
- Guerrero-Ortiz P. L., R. Quintero-Lizaola, V. Espinoza-Hernández, G. S. Benedicto-Valdés y M. de J. Sánchez-Colín. 2012. Respiración de CO₂ como indicador de la actividad microbiana en abonos orgánicos de *Lupinus*. *Terra latinoamericana* 30(4): 355-362.
- Guo, J., Y. Yang, G. Chen, J. Xie, R. Gao and W. Qian 2010. Effects of clear-cutting and slash burning on soil respiration in Chinese fir and evergreen broadleaved forests in mid-subtropical China. *Plant Soil* 333: 249-261.
- Gutiérrez V., M., H., J. Méndez G., C. Flores L., J. A. Ramírez D. y B. N. Gutiérrez V. 2012. Caída de hojarasca en plantaciones de *Pinus greggii* Engelm. y *Pinus cembroides* Zucc., en Coahuila, México. *Revista Fitotecnia México* 35(2): 123-133.
- Hansen, K., L. Vesterdal, I. K. Schmidt, P. Gundersen, L. Sevel, A. Bastrup-Birk, L. B. Pedersen and J. Bille-Hansen. 2009. Litterfall and nutrient return in five tree species in a common garden experiment. *Forest Ecology and Management* 257: 2133-2144.
- Hattenschwiler, S., A. V. Tiunov, and S. Scheu. 2005. Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 191-218.
- Hernández-León R., I. Velázquez-Sepúlveda, M.C. Orozco-Mosqueda y G. Santoyo. 2010. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton* (B. Aires) 79: 133-139.
- Honorato S. J. A. y J. Hernández P. 1998. Determinación de componentes químicos de la madera de cinco especies de encino del estado de Puebla. *Madera y Bosque* 4(2): 79-93.

- IPCC Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *In*: Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor, and H. L. Miller (eds.). Cambridge University Press, Cambridge. 996 p.
- Janssens I. A., A. S. Kowalski and R. Ceulemans. 2001. Forest floor CO₂ fluxes estimated by eddy covariance and chamber-based model. *Agricultural and Forest Meteorology* 106: 61-69.
- Keeler, B. L., S. E. Hobbie, and L. E. Kellogg. 2009. Effects of long-term nitrogen addition on microbial enzyme activity in eight forested and grassland sites: Implications for litter and soil organic matter decomposition. *Ecosystems* 12: 1-15.
- Kenneth L. M., J. M. Klopatek, and C. C. Klopatek. 1998. The effects of litter quality and climate on decomposition along an elevational gradient. *Ecological Applications* 8: 1061-1071.
- Kim, C., Y. Son, W. K. Lee, J. Jeong, and N. J. Noh. 2009. Influences of forest tending works on carbon distribution and cycling in a *Pinus densiflora* S. et. Z. stand in Korea. *Forest Ecology and Management* 257: 1420-1426.
- Kueppers, L. M., and J. Harte. 2005. Subalpine forest carbon cycling: short- and long-term influence of climate and species. *Ecological Applications* 15(6): 1984-1999.
- León-Nájera, J. A., R. Gómez-Álvarez., S. Hernández-Daumás, J. D. Álvarez-Solís y D. J. Palma-López. 2006. Mineralización en suelos con incorporación de residuos orgánicos en los altos de Chiapas, México. *Universidad y Ciencia* 22(2): 163-174.
- Liborio B., E. and J. C. Dias C. 2010. Enzymatic activity and mineralization of carbon and nitrogen in soil cultivated with coffee and green manures. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 34(5): 1573-1583.
- Liu, L., T. Zhang, F. S. Gilliam, P. Gundersen, W. Zhang, H. Chen, and J. Mo. 2013. Interactive Effects of Nitrogen and Phosphorus on Soil Microbial Communities in a Tropical Forest. *PLoS ONE* 8(4): e61188.
- Luo, C, G. Xu, Z. Chao, S. Wang, X. Lin, Y. Hu, Z. Zhang, J. Duan, X. Chang, A. Su, Y. Li, X. Zhao, M. Du, Y. Tang and B. Kimball. 2010. Effect of warming and grazing on litter mass loss and temperature sensitivity of litter and dung mass loss on the Tibetan plateau. *Global Change Biology* 16: 1606-1617.
- Macdonald C. A., N. Thomas, L. Robinson, K. R. Tate, D. J. Ross, J. Dando and B. K. Singh. 2009. Physiological, biochemical and molecular responses of the soil microbial community after afforestation of pastures with *Pinus radiata*. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 1642-1651.
- Magdoff, F. and R. R. Weil. 2004. *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*. Advances in Agroecology. CRC Press. N. Y, USA. 398 p.
- Martínez-Rojas, V. 2010. Almacenamiento de carbono en los sistemas forestales y agrícolas de la falda oeste del cerro Tláloc. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. México. 68 p.

- Medina S. M., J. O. Velásquez R. and L. M. Pinzón S. 2012. Alder in dual symbiosis with Frankia and Endomycorrhizae and response at boron in an Andisol. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 65(1): 6467-6476.
- Mendes, R., P. Garbeva, and J. M. Raaijmakers. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Review* 37: 634–663.
- Miao V. and J. Davies. 2009. Metagenomics and antibiotic discovery from uncultivated bacteria. *In: Slava S. Epstein (ed.). Uncultivated Microorganisms*. Springer Berlin Heidelberg, Canada. Microbiology. Monographs. pp: 161-180.
- Minic, Z. and P. D. Thongbam. 2011. The biological deep sea hydrothermal vent as a model to study carbon dioxide capturing enzymes. *Marine Drugs* 9: 719-738.
- Montgomery, D. C., y G. C. Runger. 2008. Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. 2ª ed. Limusa. México. 948 p.
- Navarrete A. A., S. M. Tsai, L. W. Mendes, K. Faust, M. De Hollander, N. A. Cassman, J. Raes, J. A. Van Veen and E. E. Kuramae. 2015. Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. *Molecular Ecology* 24: 2433-2448.
- Norma Oficial Mexicana. 2002. NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 85 pp.
- Nunes da Rocha U, C. M. Plugge, I. George, J. D. Van Elsas and L. S. Van Overbeek. 2013. The rhizosphere selects for particular groups of acidobacteria and verrucomicrobia. *PLoS ONE* 8(12): e82443.
- Ordóñez, B., H. J. De Jong y O. Maser. 2001. Almacenamiento de carbono en un bosque de *Pinus pseudostrobus* en Nuevo San Juan, Michoacán. *Madera y Bosques* 7(2): 27-47.
- Ordóñez, J., A. B., B. H. J. De Jong, F. García-Oliva, F. L. Aviña, J. V. Pérez, G. Guerrero, R. Martínez, and O. Maser. 2008. Carbon content in vegetation, litter, and soil under 10 different land-use and land-cover classes in the Central Highlands of Michoacan, Mexico. *Forest Ecology and Management* 255: 2074-2085.
- Pan, Y., R. A. Birdsey, J. Fang, R. Houghton, P. E. Kauppi, W. A. Kurz, O. L. Phillips, A. Shvidenko, S. L. Lewis, J. G. Canadell, P. Ciais, R. B. Jackson, S. W. Pacala, A. D. McGuire, S. Piao, A. Rautiainen, S. Sitch and D. Hayes. 2011. A large and persistent carbon sink in the world's forests. *Science* 333(6045): 988-993.
- Panichini, M., F. Matus, M. L. Mora, R. Godoy, N. S. Bolan, C. Rumpe and F. Borie. 2012. Carbon distribution in top- and subsoil horizons of two contrasting Andisols under pasture or forest. *European Journal of Soil Science* 63: 616-624.
- Park D. 2007. Genomic DNA Isolation from Different Biological Materials. *In: Hilario, E. and J. Mackay (eds.) Protocols Methods in Molecular Biology: for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*. Second Edition. Humana Press Totowa, N. J. *Methods Molecular Biology* 353: 3–13.

- Paustian, K. 2005. Carbon emissions and sequestration. Colorado State University, Fort Collins, CO, USA. pp: 175-180.
- Payán Z., F. 2010. La material orgánica del suelo en sistemas agroforestales. No 97. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 86 p.
- Pérez C. A., M. R. Carmona, and J. J. Armesto. 2010. Non-symbiotic nitrogen fixation during leaf litter decomposition in an old-growth temperate rain forest of Chiloé Island, southern Chile: Effects of single versus mixed species litter. *Austral Ecology* 35: 148-156.
- Plan Estatal de Desarrollo Urbano. 2008. Gobierno del Estado de México. Toluca, México.
- Ponder Jr. F. 2005. Effect of soil compaction and biomass removal on soil CO₂ efflux in a Missouri forest. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 36: 1301-1311.
- Porta, J., M. Lopez-Acevedo y R. M. Poch. 2008. Introducción a la Edafología uso y protección del suelo. Mundi-Prensa. Madrid. 455 p.
- Prescott, C. E. 2005. Do rates of litter decomposition tell us anything we really need to know? *Forest Ecology and Management* 220: 66-74.
- Prescott, C. E., J. P. Corbin, and D. Parkinson. 1992. Immobilization and availability of N and P in the forest floors of fertilized Rocky Mountain coniferous forests. *Plant and Soil* 143: 1-10.
- Prescott, C. E., L. L. Blevins, and C. Staley. 2004. Litter decomposition in British Columbia forests: Controlling factors and influences of forestry activities. *BC Journal of Ecosystems and Management* 5(2): 44-57.
- Quince, C., T. P. Curtis, and W. T. Sloan. 2008. The rational exploration of microbial diversity. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 2: 997-1006.
- Quinto, M. H., Y. A. Ramos P. y D. Abadía B. 2007. Cuantificación de caída de hojarasca como medida de la productividad primaria neta en un bosque pluvial tropical en Salero, Chocó Colombia. *Biodiversidad Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó D. L. C.*, 26: 28-41.
- Rasse, D. P., C. Rumpel, and M. F. Dignac. 2005. Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilization. *Plant Soil* 269: 341-356.
- Rey, A., E. Pegoraro, and P. G. Jarvis. 2008. Carbon mineralization rates at different soil depths across a network of European forest sites (FORCAST). *European Journal of Soil Science* 59: 1049-1062.
- Rivas, Y., C. Oyarzún, R. Godoy y E. Valenzuela. 2009. Mineralización del nitrógeno, carbono y actividad enzimática del suelo en un bosque de *Nothofagus obliqua* (Mirb) Oerst y una plantación de *Pinus radiata* D. Don. del centro-sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 119-134.
- Rocha-Loredo A. G. y N. Ramírez-Marcial. 2009. Producción y descomposición de hojarasca en diferentes condiciones sucesionales del bosque de pino-encino en Chiapas, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 84: 1-12.
- Sáenz-Romero C, G. E. Rehfeldt, P. Duval and R. A. Lindig-Cisneros. 2012. *Abies religiosa* habitat prediction in climatic change scenarios and implications for monarch butterfly conservation in Mexico. *Forest Ecology and Management* 275: 98-106.

- Salah Y. M. S and M. C. Scholes. 2011. Earth system science 2010: Global change, climate and people. Effect of temperature and litter quality on decomposition rate of *Pinus patula* needle litter. *Procedia Environmental Sciences* 64: 180–193.
- Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N. Y. USA.
- Sánchez, F. H., F. Guerrero S., y M. A. Castellanos V. 2005. *Ecología*. 1ª edición. Editorial Umbral. México. 112 p.
- Sánchez-González A, L. López-Mata y H. Vibrans. 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*. pp: 67-78.
- Sánchez-González A. y L. López-Mata. 2003. Clasificación y ordenación de la vegetación del norte de la Sierra Nevada, a lo largo de un gradiente altitudinal. *Serie Botánica* 74(1): 47-71.
- Sanci, R., H. O. Panarello and H. A. Osters. 2009. Assessment of soil moisture influence on CO₂ flux: a laboratory experiment. *Environmental Geology* 58:491–497.
- Seoánez, C. M. 2000. *Tratado de Reciclado y Recuperación de Productos de los Residuos*. Mundi-Prensa. Madrid. 603 p.
- Silveira, M. L., K. R. Reddy, and N. B. Comerford. 2011. Litter decomposition and soluble carbon, nitrogen, and phosphorus Release in a Forest Ecosystem. *Open Journal of Soil Science* 1: 86-96.
- Swallow M., S. A. Quideau, M. D. MacKenzie and B. E. Kishchuk. 2009. Microbial community structure and function: The effect of silvicultural burning and topographic variability in northern Alberta. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 770–777.
- Tate III R. L. and B. F. Rogers. 2002. Soil ecosystem properties, microbial diversity, and ecosystem assessments. *Developments in Soil Science* 28(2): 79-93.
- Teklay, T., A. Nordgren and A. Malmer. 2006. Soil respiration characteristics of tropical soils from agricultural and forestry land-uses at Wondo Genet (Ethiopia) in response to C, N and P amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 125–133.
- Thoms C., A. Gattinger, M. Jacob, F. M. Thomas and G. Gleixner. 2010. Direct and indirect effects of tree diversity drive soil microbial diversity in temperate deciduous forest. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 1558-1565.
- Tripathi S. K., S. Uemura, A. Sumida, Y. Kodama, H. Shibata, T. Hara, and K. Ono. 2006. Leaf litterfall and decomposition of different above- and belowground parts of birch (*Betula ermanii*) trees and dwarf bamboo (*Sasa kurilensis*) shrubs in a young secondary forest in Northern Japan. *Biology and Fertility Soils* 43:237–246.
- Uhlířová, E, D. Elhottová, J. Tríska and H. Šantrůcková. 2005. Physiology and microbial community structure in soil at extreme water content. *Folia Microbiologica* 50(2):161–166.
- UNEP. 2005. Climate Change. The carbon cycle. Carbon, carbon everywhere. pp 12-13. Disponible en www.unep.org 01 de junio de 2011.

- Van Soest, P. J.; J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Vásquez-Murrieta M. S., B. Govaerts B., and L. Dendooven. 2007. Microbial biomass C measurements in soil of the central highlands of Mexico. *Applied Soil Ecology* 35: 432–440.
- Vela C., G., J. López B., y M. de L. Rodríguez G. 2012. Niveles de carbono orgánico total en el Suelo de Conservación del Distrito Federal, centro de México. *Investigaciones Geográficas* 77: 18-30.
- Vos M., A. B. Wolf, S. J. Jennings, and G. A. Kowalchuk. 2013. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiol Review* 37: 936-954.
- Walther, G.-R., E. Post, P. Convey, A. Menzel, C. Parmesan, T. J. Beebee, C., J.-M. Fromentin, O. Hoegh-Guldberg, and F. Bairlein. 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416: 389–395.
- Wang, L. and P. D'Odorico. 2008. Decomposition and Mineralization. *In: Encyclopedia of Ecology*, Elsevier, Oxford, UK. pp: 838-844.
- Xiangqing, Ma., V. H. Kate, L. Aiqin, and J. G. Paul. 2007. Nutrient cycling and distribution in different-aged plantations of Chinese fir in southern China. *Forest Ecology and Management* 243: 61-74.
- Yohannes, Y., O. Shibistova, A. Abate, M. Fetene, and G. Guggenberger. 2011. Soil CO₂ efflux in an Afromontane forest of Ethiopia as driven by seasonality and tree species. *Forest Ecology and Management* 261(6): 1090-1098.
- Zhou L, D. S. Addo-Danso, W. Pengfei, L. Shubin, J. Yayun and M. Xiangqing. 2015. Litterfall production and nutrient return in different-aged Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantations in South China. *Journal of Forest Research* 26(1): 79-89.

ANEXOS

Anexo I. Datos de CO₂ (mg C kg⁻¹ suelo) obtenidos en la incubación de 17 días de un sitio de estudio de *Abies religiosa*.

Días	Lignina (%)					
	0	11.6	13.1	14.2	15.7	21.9
1	33.5	76.6	114.9	55.7	60.0	47.7
1	62.3	123.5	108.7	61.8	74.2	43.3
1	74.4	121.0	71.7	53.2	48.3	40.9
2	74.4	142.2	187.5	104.2	138.6	112.7
2	115.6	209.4	199.4	113.4	143.8	82.8
2	135.7	177.4	165.4	101.7	120.9	92.4
3	153.0	216.1	249.6	191.0	206.6	181.9
3	170.6	281.0	270.9	196.7	215.3	142.6
3	195.4	248.9	222.8	180.3	187.7	161.6
5	174.2	301.0	294.4	231.1	242.0	190.2
5	180.0	324.6	327.5	206.1	224.7	175.6
5	233.2	395.1	255.8	211.0	225.4	169.8
7	233.2	395.1	255.8	211.0	225.4	169.8
7	240.2	394.2	380.6	263.9	299.0	239.3
7	288.6	460.0	323.0	303.0	278.5	213.5
9	217.9	436.6	432.4	380.9	384.7	325.8
9	294.4	460.2	463.1	337.0	367.4	307.6
9	357.0	523.7	s/d	385.5	361.0	274.8
13	290.6	509.3	486.2	432.4	464.5	s/d
13	369.5	523.5	559.4	414.5	435.4	378.0
13	410.8	582.2	383.9	465.3	424.3	349.9
14	390.4	557.3	567.2	496.9	559.6	404.4
14	443.4	595.0	623.9	511.9	518.8	470.8
14	468.2	634.9	490.9	576.9	504.1	390.7
16	422.7	591.9	608.8	529.1	589.5	431.9
16	470.9	615.5	653.8	556.0	546.3	486.5
16	509.9	667.1	527.8	597.4	522.2	419.4
17	474.9	661.9	681.2	599.1	638.2	517.2
17	525.6	664.2	714.3	621.2	609.2	549.4
17	556.3	727.7	604.9	662.6	598.1	494.1

Anexo II. Datos de CO₂ (mg C kg⁻¹ suelo) obtenidos en la incubación durante 28 días con concentraciones crecientes de lignina (%) en cada suelo de los cinco sitios de estudio de *Abies religiosa*.

Días	Suelo O1				Suelos O2				Suelos O3 Lignina (%)				Suelo O4			Suelo O5				
	0	10.6	13.6	23.3	0	11.8	14.8	22.2	0	12.0	14.5	20.8	0	12.1	14.5	23.1	0	11.5	13.6	20.2
1	25.9	57.8	61.3	44.8	49.5	40.1	37.7	47.2	29.1	40.9	51.5	31.4	43.2	43.2	13.8	59.7	43.2	29.1	50.3	55.0
1	23.6	57.8	56.6	54.2	46.0	40.1	34.2	37.7	24.4	52.7	31.4	43.2	43.2	31.4	45.6	50.3	43.2	48.0	52.7	49.1
1	16.5	57.8	42.5	44.8	50.7	40.1	37.7	27.1	36.2	46.8	45.6	55.0	43.2	43.2	36.2	31.4	38.5	55.0	48.0	46.8
2	56.6	100.2	125.0	82.5	89.6	63.7	59.0	84.9	49.5	70.8	86.1	56.6	77.8	80.2	56.6	89.6	68.4	61.3	82.5	115.6
2	56.6	114.4	108.5	96.7	90.8	63.7	50.7	75.5	49.5	82.5	66.0	59.0	80.2	75.5	89.6	92.0	77.8	92.0	94.3	107.3
2	49.5	109.7	87.3	73.1	86.1	77.8	66.0	64.9	51.9	76.7	77.8	80.2	82.5	89.6	75.5	59.0	68.4	94.3	87.3	114.4
3	75.8	110.6	139.8	110.7	97.8	71.8	71.5	90.8	75.4	96.7	112.0	73.6	110.4	108.3	89.2	120.0	108.4	104.6	120.3	151.1
3	69.2	133.6	116.6	118.2	103.4	71.8	56.6	83.6	66.5	101.8	85.3	87.1	99.4	94.7	115.5	124.5	122.2	138.6	141.0	138.4
3	59.9	122.2	95.4	85.7	94.2	86.0	74.2	70.8	82.2	98.1	97.1	99.4	101.8	120.0	116.9	91.5	103.9	134.3	196.0	154.3
4	104.7	137.2	168.7	135.1	126.6	89.6	84.9	103.0	111.7	152.9	154.9	105.4	148.9	151.2	125.4	154.0	159.4	166.8	171.3	193.3
4	98.0	158.0	132.2	147.0	132.2	74.0	74.4	101.4	105.0	135.8	123.8	125.6	135.7	124.3	156.2	163.0	175.5	191.9	180.9	191.7
4	82.1	151.1	115.4	105.7	107.5	88.2	91.9	88.5	125.1	131.0	135.5	144.6	133.6	156.2	148.7	123.3	155.0	196.4	247.1	194.3
6	142.4	179.4	215.3	186.1	162.1	116.2	100.4	131.9	147.9	200.2	215.6	139.5	220.6	203.0	188.3	194.7	217.1	246.7	246.8	251.0
6	135.8	204.7	176.6	193.6	181.1	94.0	112.1	119.1	152.4	192.1	180.0	181.8	189.7	187.2	212.4	221.5	244.3	260.7	251.9	262.7
6	119.8	188.8	135.4	141.2	125.3	112.6	125.2	117.4	172.5	169.5	187.3	187.5	187.6	205.8	202.7	155.2	234.9	278.6	293.7	263.1
8	173.5	217.1	244.1	206.1	197.7	149.5	135.9	174.1	195.3	243.2	267.4	164.6	265.8	268.1	240.1	235.4	261.5	313.3	300.1	319.8
8	169.1	246.8	218.7	222.5	196.6	131.8	152.1	148.0	199.7	215.0	227.3	226.9	234.8	247.9	270.9	288.8	286.5	314.0	320.8	335.9
8	155.3	226.6	150.9	168.9	165.3	150.3	147.4	155.1	219.8	214.6	236.9	232.6	239.4	259.8	254.5	206.9	292.6	336.3	360.3	311.9
10	209.0	249.3	279.6	230.5	235.4	173.9	171.4	206.3	261.9	307.5	314.0	220.1	321.3	334.7	300.0	299.8	323.7	384.3	375.6	399.7
10	199.0	275.7	254.3	253.6	223.2	170.6	183.2	164.6	266.3	279.4	302.8	276.9	293.7	312.2	337.5	348.7	357.5	382.8	391.8	413.6
10	197.5	253.2	166.4	200.0	196.3	168.1	176.3	179.5	279.8	261.3	312.4	284.8	294.9	335.3	318.9	269.1	365.8	414.0	429.1	385.2

Anexo II. Continuación de datos de CO₂ (mg C kg⁻¹ suelo) obtenidos en la incubación durante 28 días con concentraciones crecientes de lignina (%) en cada suelo de los cinco sitios de estudio de *Abies religiosa*.

Días	Suelo O1				Suelos O2				Suelos O3 Lignina (%)				Suelo O4			Suelo O5				
	0	10.6	13.6	23.3	0	11.8	14.8	22.2	0	12.0	14.5	20.8	0	12.1	14.5	23.1	0	11.5	13.6	20.2
12	247.1	295.2	325.5	267.5	265.7	204.3	215.1	241.0	323.3	364.5	364.3	259.3	366.0	389.5	359.2	359.0	377.7	449.4	460.6	487.0
12	240.5	319.3	301.2	290.6	253.6	203.2	221.3	203.8	323.3	338.6	353.1	316.1	350.6	378.1	396.7	392.4	418.2	439.0	470.2	478.8
12	244.5	295.8	202.3	241.4	226.7	200.7	214.4	214.3	341.2	316.0	371.6	324.0	347.4	396.7	378.1	328.3	426.5	481.3	514.2	448.1
14	279.9	336.9	373.9	300.3	303.0	225.9	270.2	271.6	379.2	405.8	416.8	292.9	421.9	447.6	414.0	417.0	435.0	511.2	522.5	598.0
14	271.0	356.6	338.5	332.3	290.8	242.6	274.1	225.4	369.1	382.1	407.9	369.7	388.6	440.7	450.3	449.4	448.7	480.7	549.9	554.0
14	257.2	350.9	246.3	269.7	257.2	243.5	249.4	235.9	382.5	357.4	415.1	368.7	403.3	434.7	445.1	384.2	488.3	532.0	583.8	518.8
16	308.2	367.4	413.4	335.3	340.2	263.1	319.7	293.2	417.9	450.2	470.1	334.9	470.7	513.1	467.2	456.9	492.0	552.6	590.6	670.6
16	299.3	387.1	373.5	368.4	323.6	268.7	313.6	244.8	403.4	428.7	461.1	423.0	437.4	505.1	501.3	507.1	516.9	535.5	629.2	619.9
16	296.6	394.8	290.2	304.8	281.0	268.4	285.5	264.2	405.6	386.0	475.1	410.8	439.8	494.6	507.3	426.2	547.5	586.7	652.0	589.2
18	324.6	397.2	446.5	358.4	364.4	290.7	342.8	311.8	444.0	490.7	507.3	356.5	534.7	559.3	515.6	510.9	518.1	589.8	641.3	704.5
18	306.8	416.9	398.8	402.6	347.8	290.7	336.7	267.9	436.1	454.7	505.1	462.4	465.7	566.9	548.6	548.8	563.1	570.5	677.6	653.8
18	315.3	430.2	317.8	327.8	305.2	289.3	306.4	280.6	438.4	434.4	519.0	436.8	477.0	549.7	544.6	427.7	589.3	619.5	698.2	620.9
21	351.4	424.1	484.5	380.7	386.8	318.6	376.3	325.2	503.2	563.4	602.3	440.3	617.4	672.1	597.2	601.4	587.3	682.5	736.2	798.3
21	335.8	454.9	439.0	420.5	372.4	316.4	354.6	285.8	498.7	527.4	564.3	552.9	561.8	659.6	633.5	659.4	645.7	656.5	770.4	732.0
21	328.7	465.9	354.6	339.0	332.1	316.1	324.2	287.3	495.4	504.8	620.7	522.9	535.1	651.4	640.6	528.3	675.3	707.7	771.9	696.9
24	396.5	471.3	534.1	407.9	434.0	363.7	425.9	353.5	558.3	617.4	675.2	511.1	683.7	745.1	683.6	710.1	650.3	777.9	804.7	903.7
24	386.5	512.2	471.8	465.6	404.0	354.7	399.6	314.1	544.9	600.4	623.9	623.7	630.3	757.2	719.9	754.7	721.0	751.8	864.6	805.0
24	350.3	508.8	394.1	372.9	365.9	352.2	347.0	315.6	556.1	565.5	709.3	593.6	628.2	735.6	750.5	625.8	751.6	803.1	859.4	764.3
28	458.3	541.0	598.1	458.6	464.6	407.6	468.7	393.0	629.8	701.2	752.3	607.2	730.6	864.7	783.0	819.6	740.0	926.8	930.2	1046.0
28	447.2	576.3	523.6	489.4	446.9	390.8	451.4	351.3	620.8	684.1	700.9	700.8	721.9	844.3	794.8	873.2	810.7	885.1	983.4	918.2
28	392.0	557.2	443.6	441.4	403.2	399.5	390.9	357.3	633.2	643.7	786.4	670.7	716.5	837.2	860.0	738.7	841.4	927.5	964.8	886.4