



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
ECOLOGÍA

**Influencia de perturbaciones térmicas sobre comunidades diazotróficas en  
costras biológicas de suelos áridos de México**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Teresa Pérez Carbajal**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Ana Elena Escalante Hernández.**

Instituto de Ecología, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: Dr. Luis David Alcaraz Peraza.**

Instituto de Ecología, UNAM.

**Dr. Pablo Vinuesa Fleishman.**

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, SEPTIEMBRE, 2016.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
CAMPO DE CONOCIMIENTO: ECOLOGÍA

**Influencia de perturbaciones térmicas sobre comunidades diazotróficas  
en costras biológicas de suelos áridos de México**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Teresa Pérez Carbajal**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Ana Elena Escalante Hernández.**

Instituto de Ecología, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: Dr. Luis David Alcaraz Peraza.**

Instituto de Ecología, UNAM.

**Dr. Pablo Vinuesa Fleishman.**

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX, SEPTIEMBRE, 2016.**

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 03 de junio de 2016, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, de la alumna **PÉREZ CARBAJAL TERESA** con número de cuenta **304032059** con la tesis titulada **"INFLUENCIA DE PERTURBACIONES TÉRMICAS SOBRE COMUNIDADES DIAZOTRÓFICAS EN COSTRAS BIOLÓGICAS DE SUELOS ÁRIDOS DE MÉXICO"**, bajo la dirección de la **DRA. ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ**:

Presidente:	DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA DE MARIA DE GUADALUPE SOUZA SALDIVAR
Vocal:	DR. VÍCTOR MANUEL RIVERA AGUILAR
Secretario:	DR. ELIIS DAVID ALCARAZ PEÑAZA
Suplente:	DR. ALFONSO LELUAGA
Suplente:	DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Méx., a 08 de agosto de 2016

*M del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (a) interesado (a).

## AGRADECIMIENTOS

Se reconoce con agradecimiento a los siguientes programas y proyectos que permitieron la realización y conclusión de esta tesis.

Al Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM, por aceptarme en el programa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría brindada.

Al proyecto PAPIIT IA200814 “Consecuencias funcionales de la composición de procariontes en costras biológicas de suelos áridos: de la diversidad biológica a la función ecosistémica” que financió la realización de esta tesis.

Al proyecto PAPIIT IA200814 “Consecuencias funcionales de la composición de procariontes en costras biológicas de suelos áridos: de la diversidad biológica a la función ecosistémica” por otorgarme una beca durante 6 meses para la conclusión de esta tesis.

Beca Lóreal-UNESCO-AMC 2012 otorgada a la Dra. Ana E. Escalante por el proyecto: Diversidad y funcionalidad en suelos áridos de México, de los genes a la función ecosistémica”.

También se reconoce con agradecimientos a los siguientes Investigadores que ayudaron con la realización y conclusión de la tesis.

Los miembros del comité tutor: Luis David Alcaraz Peraza, Pablo Vinuesa Fleishman y en especial a mi tutora principal Dra. Ana Elena Escalante Hernández por su dedicación, paciencia e instrucción en la realización de esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco al Dr. Alfonso Leija Salas del Instituto de Ciencias Genómicas por su apoyo imprescindible en la realización de la técnica de Cromatografía de gases, por sus consejos y ayuda en el procesamiento de los resultados y por el enorme apoyo que siempre me brindó. A la Dra. Georgina Hernández Delgado por brindarnos las instalaciones necesarias para realizar la cromatografía de gases en el instituto de Ciencias Genómicas.

A la Dra. Valeria Souza por el enorme apoyo al brindarme su laboratorio y facilitar los reactivos para la extracción de DNA. A la Dra. Christine Rooks por su ayuda y capacitación en la técnica de extracción de DNA de mis muestras.

A la Dra. Laura Espinosa por su enorme ayuda para la realizar la técnica de TFLP's y por sus consejos para que esto resultara exitoso.

Al Dr. Luc Dendooven y Q.B.P Daniel Alejandro Ramírez Villanueva del Cinvestav Zacatenco por el apoyo en brindar las instalaciones y compartir sus protocolos de extracción de DNA de suelos. Así también la ayuda al instruirme en sus técnicas de extracción.

A la M. en C. Laura Márquez Valdelamar por su apoyo en el uso de la secuenciación capilar para la obtención de los TFLP's.

Le agradezco a mi familia por todo el apoyo material y emocional que me brindaron durante el tiempo de la realización de esta tesis. A mis padres principalmente y a mis hermanos así también a Jess, Juieta y Bruno. También agradezco a mis tíos, Jose y Beatriz, por brindarme un hogar.

Agradezco a la Dra. Ana Escalante por todo su apoyo al brindarme para poder terminar este trabajo. A mis compañeros de laboratorio, Marcelo, Ale, Alberto, Horacio, Héctor, por sus consejos y ayuda. Especialmente a Juan por su apoyo al momento de redactar la tesis y las ideas que compartió y a Morena por su ayuda en los protocolos de las técnicas de biología molecular.

Le agradezco a Octavio por la ayuda (y algunos problemas que me causó) que en conjunto me ayudaron a no darme por vencida completamente. Te agradezco por tus palabras de ánimo que siempre me diste, por la compañía en casi todo momento mientras realizaba mis experimentos, por exigirme más de lo que siempre decía que podía dar pero sobre todo por preocuparte por mí, por quererme y ser un apoyo.

Les agradezco a mis amigos que siempre me dieron ánimos principalmente Mónica y Miguel que siempre escucharon mis quejas y frustraciones, que cuando todo parecía ir mal simplemente me escucharon. A Dan y Yesell que a pesar de estar separados estuvieron ahí brindándome su amistad y compartiendo experiencias. También quiero incluir a Cesar Linares por ser mi amigo y compartir su amistad conmigo. También quiero agradecerle a Alejandro Cristín que fue el primero en brindarme su apoyo al inicio de mi carrera académica.

Y a todas aquellas personas que hicieron posible esto... gracias.

# Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
I. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1. La diversidad de los microorganismos, procariontes-.....	3
1.2. Resistencia, resiliencia y redundancia funcional de comunidades microbianas, implicaciones de la diversidad en la funcionalidad de los ecosistemas - .....	4
1.3. Enfoques experimentales para evaluar el valor funcional de la diversidad microbiana-6	
1.3.1. Aproximaciones experimentales para la evaluación de la diversidad microbiana- .....	8
1.3.2. Aproximaciones experimentales para la evaluación de las tasas funcionales de comunidades microbianas -.....	12
II. ANTECEDENTES .....	1
2.1. Ecosistemas áridos .....	1
2.2. Costras Biológicas de Suelo (CBS).....	2
2.3. Ciclo del nitrógeno en ecosistemas áridos .....	4
2.4. Justificación .....	7
2.5. Hipótesis y Objetivos. ....	7
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	10
3.1. Sitio de Estudio.....	10
3.2. Toma de muestra .....	11
3.3. Diseño experimental .....	12
3.4. Caracterización molecular de la composición de comunidades diazotróficas.....	15
3.5. Análisis de diversidad.....	17
3.6. Análisis de funcionalidad.....	18
IV. RESULTADOS .....	22
4.1. Diversidad y composición de comunidades microbianas diazotróficas.....	22
4.2. Potencial de fijación de N <sub>2</sub> .....	29
V. DISCUSIÓN.....	35
5.1. La diversidad y riqueza filogenética de microorganismos diazotróficos de CBS cambia ante la perturbación térmica y en relación a su lugar de origen.....	35
5.2. La composición de microorganismos diazotróficos en CBS es particular al desierto de origen	36
5.3. El potencial de fijación de N <sub>2</sub> está relacionado con la composición y condiciones de origen de microorganismos diazotróficos de CBS. ....	39

VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	42
APENDICE.....	44
Referencias .....	47

## Índice de tablas

Tabla 2.1 Diseño experimental.....	14
Tabla 3.1 Resultados del índice de Shannon-Weaver (H) y riqueza (S). .....	24
Tabla 3.2 Resultados de la prueba t-student para la tasa de reducción de acetileno de distintas CBS.....	31
Tabla 3.3 El efecto de composición (lugar de origen) y temperatura de incubación en la actividad de la nitrogenasa.....	33
Tabla 4.1 Comparación y potencial asignación filogenética de los TRF dominantes de las CBS de Cuatrociénegas y Valle de Guadalupe en cada tiempo que se caracterizó la comunidad diazotrófica con los TRF del trabajo de Yeager et al (2004) y Yeager et al (2012).....	39

## Índice de figuras

Figura 1.1 Resultados hipotéticos de dos comunidades A y B bajo el diseño de trasplantes recíprocos en ambientes A y B. Bajo análisis de ANOVA de dos vías .....	8
Figura 1.2 Esquema del ciclo del N en ecosistemas áridos y semiáridos.....	6
Figura 1.3. Tipos de CBS. ....	7
Figura 2.1 Sitios de muestreo.....	11
Figura 2.2 Esquema del Ensayo de reducción de acetileno (ARA). .....	19
Figura 3.1 Representación gráfica de los valores del índice de Shannon-Weaver (H) y riqueza (S)..	23
Figura 3.2 Ordenación por similitud no métrica (NMDS) en la composición de las CBS. ....	26
Figura 3.3 Heatmap de abundancia relativa de OTUs.....	29
Figura 3.4 Reducción de acetileno por las CBS. ....	30
Figura 3.5 Actividad de la nitrogenasa por cada jardín común.....	32
Figura 3.6 Media de reducción de acetileno $\pm$ E.E (Error estándar) por origen de las muestras y temperatura de incubación.....	34

## RESUMEN

Las comunidades microbianas llevan a cabo muchos procesos con impacto ecosistémico, y cambios en su tasa funcional pueden tener consecuencias globales. Sin embargo, es común suponer que cambios en la composición microbiana de las comunidades no tienen consecuencias dada la redundancia funcional en rutas metabólicas (v. g fijación N) que se encuentra en grupos microbianos que son filogenéticamente diferentes, siendo aún pocos estudios los que han puesto a prueba esto de manera explícita. En el trabajo que se presenta en esta tesis, se investigó la equivalencia funcional (ecológica) de diferentes comunidades de costras biológicas de suelos (CBS) mediante la caracterización de la estructura de la comunidad y de la actividad de fijación de N<sub>2</sub> de comunidades de dos desiertos (Cuatrociénegas Coahuila (CC) y Valle de Guadalupe, Baja California (VG)) con regímenes de precipitación y temperatura contrastantes (lluvias de verano y de invierno). La estructura de las comunidades se determinó a través de una aproximación independiente de cultivo o “fingerprinting” de la diversidad del gen nifH (TRFLPs). Para la determinación del potencial de fijación de N<sub>2</sub> se procedió con el Ensayo de Reducción de Acetileno (ARA, Acetylene Reduction Assay) en dos temperaturas contrastantes (15°C y 30°C) para ambos tipos de comunidades. Se utilizó un análisis ANOVA de dos vías para evaluar la contribución relativa del origen de la muestra (aproximación de la composición), el ambiente de incubación y su interacción en la respuesta funcional. El experimento se mantuvo por 180 días, con mediciones ARA mensuales y de estructura de comunidades se determinó al inicio del experimento (T0) y a los 10, 90 y 180 días (T1, T3, T6). Se encontraron diferencias significativas entre muestras de distinto origen en cuanto a diversidad, composición y medidas funcionales, y la composición siempre estuvo asociada con el sitio de origen, incluso después de 180 días. Los resultados de los ensayos de función indicaron que el origen de las CBS tiene un efecto significativo, así como el ambiente de incubación. Este estudio demuestra que la composición microbiana y las condiciones ambientales determinan la tasa de fijación de N<sub>2</sub> en CBS, y que adaptaciones locales tienen un impacto duradero en la respuesta funcional de las comunidades microbianas.

Palabras clave: Comunidades microbianas, equivalencia funcional, fijación de nitrógeno, desiertos de México.

## ABSTRACT

Microbial communities mediate many ecosystem processes, and changes in their function may have global impacts. However, it is commonly assumed that changes in microbial composition of communities are not relevant given the functional redundancy into the metabolic routes (i.e. N<sub>2</sub>-fixing) found in different microbial groups, but few studies have tested explicitly this assumption. In this study we investigated the functional (ecological) equivalence of different microbial communities from biological soil crusts (BSC) by the characterization of the community structure and activity of N<sub>2</sub>-fixing microorganisms from two arid ecosystems (Cuatrociénegas Coahuila (CC) and Valle de Guadalupe, Baja California (VG)) with contrasting temperature-precipitation regimes (summer and winter rain). Community structure was determined through a culture independent approach by fingerprinting the nifH gene diversity (TRFLPs). For N<sub>2</sub>-fixing potential we measured nitrogenase activity by Acetylene Reduction Assay (ARA) in two contrasting temperatures (15°C and 30°C) for both types of communities, and used a two-way ANOVA to test for the effects of sample origin (proxy for microbial composition), the incubating environment and their interaction on functional response. We conducted the experiment for 180 days. Nitrogenase activity was measured monthly and microbial composition at the beginning of the experiment (T<sub>0</sub>), and after 10, 90 and 180 days (T<sub>1</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>6</sub>). We found significant differences between communities in diversity, composition and functional measures, and composition could always be traced back to the original community, even after 180 days of the experiment. Results from the functional assay indicated that crust origin (proxy for composition) had a significant effect on nitrogenase activity as well as the incubating environment. This study demonstrates that microbial composition and the environmental conditions determine the rate of nitrogen fixation in CBS, and that local adaptations have a long lasting impact in the functional response of microbial communities.

Key words: microbial communities, functional equivalence, N<sub>2</sub>-Fixing, deserts of México.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La diversidad de los microorganismos, procariontes-

Los microorganismos tienen una gran diversidad filogenética que rebasa por varios órdenes de magnitud la diversidad de todas las plantas y animales (Torsvik 2002). En el caso de los microorganismos procariontes, el origen de esta enorme diversidad es resultado del tiempo durante el cual han evolucionado en la Tierra (al menos 3.8 mil millones de años). Esta diversidad también está relacionada con aspectos de su biología ya que algunos linajes tienen elevadas tasas de crecimiento y reproducción, adquisición por intercambio horizontal de genes y, que al ser haploides, el tiempo de fijación de mutaciones benéficas es el doble de rápido que para organismos diploides (Pontes et al. 2007), lo que en conjunto aporta a una gran diversidad genética. Es debido a estas cualidades, que los microorganismos, particularmente los procariontes, presentan gran diversidad filogenética y adaptaciones que les permiten establecerse en todos los ambientes naturales (Buscot et al. 2005).

La diversidad filogenética de microorganismos, está relacionada con la diversidad de sus capacidades metabólicas. Es la diversidad metabólica presente en los microorganismos, particularmente procariontes, la que media transformaciones de elementos en los ciclos de los nutrientes en el planeta. Un ejemplo de esto es la fijación y mineralización del carbono (C) y nitrógeno (N) que son nutrientes esenciales para la vida, y estos procesos son llevados a cabo en su mayoría por bacterias. El ciclaje de los nutrientes es una de las principales funciones realizadas dentro de los ecosistemas y al ser los procariontes protagonistas de este ciclaje, la diversidad y funcionamiento de sus comunidades son clave en el mantenimiento de la vida en la Tierra.

Dada la enorme diversidad de microorganismos en el planeta y su potencial de adaptación, por décadas, se ha supuesto que cambios en la composición filogenética de las comunidades no afectarán procesos ecosistémicos. Este supuesto sería válido únicamente si la composición de microorganismos en comunidades fuera resistente, resiliente y/o funcionalmente redundante. En esta tesis seguiremos las definiciones de resistencia, resiliencia y redundancia funcional propuestas por Allison & Martiny (2008) que se detallan a continuación. La composición de la comunidad microbiana es resistente cuando no cambia ante perturbaciones ambientales locales. En contraste, cuando las comunidades no son resistentes, es decir cambian su composición ante perturbaciones ambientales, pero regresan eventualmente a su composición original se dice que las comunidades son resilientes. Finalmente, la redundancia funcional es la capacidad de diferentes grupos filogenéticos de realizar la misma función siendo equivalentes ecológicamente independientemente de las condiciones ambientales. En

el caso de que estos supuestos de resistencia, resiliencia y redundancia funcional sean ciertos, la composición de las comunidades microbianas no cambiará ante perturbaciones ambientales, y si lo hace, estos cambios no afectarán las funciones ecosistémicas mediadas por dichas comunidades (Allison & Martiny 2008).

## 1.2. Resistencia, resiliencia y redundancia funcional de comunidades microbianas, implicaciones de la diversidad en la funcionalidad de los ecosistemas -

Las comunidades microbianas pueden cambiar su composición ante distintas perturbaciones ambientales. Por ejemplo, Johnson y colaboradores (2012) aumentaron la frecuencia de precipitación que recibían comunidades microbianas de suelos áridos de Norte América, y el efecto de esta perturbación fue un cambio en la composición de las comunidades y una disminución significativa de grupos bacterianos que fijan N (Johnson et al. 2012). De igual manera, Reed y colaboradores (2010) demostraron que comunidades microbianas heterotróficas que fijan N en suelos de bosques tropicales de Costa Rica, cambian su composición cuando el suelo es enriquecido con fósforo (P), como perturbación ambiental (Reed et al. 2010). Finalmente, otro ejemplo de cambios en la composición de las comunidades microbianas por perturbación ambiental son los resultados del trabajo de Zhou y colaboradores (2011) donde aumentaron la temperatura del suelo de pastizales, a modo de perturbación, en Norte América, teniendo consecuencias directas en la disminución de abundancia de grupos funcionales microbianos que degradan C recalcitrante (Zhou et al. 2011). Dado que las condiciones (o perturbaciones) ambientales afectan la composición de microorganismos, no se puede considerar que las comunidades son resistentes a perturbaciones ambientales.

Dada la capacidad de adaptación de las comunidades microbianas, si estas cambian ante perturbaciones ambientales, es posible que pasado un tiempo se recupere la composición original, implicando que cambios en la diversidad filogenética son sólo temporales y que las funciones asociadas no cambiarán significativamente. Sin embargo, de acuerdo con revisiones de literatura por Shade et al. (2012) y Allison & Martiny (2008), no existe evidencia suficiente que soporte esta suposición de resiliencia en comunidades microbianas naturales (Shade et al. 2012; Allison & Martiny 2008). Un ejemplo de esto, es el trabajo de Cantrell y colaboradores (2014) que determinaron el efecto que tiene la pérdida de cobertura vegetal y acumulación de materia orgánica durante 10 meses sobre comunidades microbianas de suelo, sus resultados demostraron un cambio en la composición de las comunidades microbianas, y al finalizar estos 10 meses la composición de las comunidades permanecía diferente a su composición inicial. Otro ejemplo que demuestra que las comunidades microbianas no son resilientes es el trabajo de Kuan y colaboradores (2006) que determinaron el efecto

del calentamiento y enriquecimiento de cobre en comunidades microbianas de suelos de pastizales, durante 28 días, demostrando que estas perturbaciones ambientales cambian la composición de las comunidades y éstas no recuperan su composición filogenética después de la perturbación (Kuan et al. 2006). Por lo tanto, las comunidades microbianas que cambian ante perturbaciones ambientales, no necesariamente recuperan su composición (o diversidad filogenética) original.

Como mencionamos anteriormente, dentro de grupos funcionales existe diversidad filogenética que se conoce como redundancia funcional, lo que históricamente, ha supuesto equivalencia ecológica o en tasas metabólicas, desconociendo procesos adaptativos específicos a grupos evolutivamente independientes. No obstante, existen trabajos que contradicen este supuesto como el trabajo Reed y Martiny (2013) quienes demostraron que comunidades bacterianas provenientes de dos tipos de sedimento (agua continental y salina) difieren en composición, y su tasa metabólica óptima ocurre en su hábitat de procedencia (Reed & Martiny 2013). De modo que comunidades microbianas con diferente historia evolutiva y composición filogenética, que se encuentran bajo las mismas condiciones ambientales, podrían no ser funcionalmente redundantes o equivalentes.

Dado que no existe la suficiente evidencia que soporte los supuestos de resistencia, resiliencia y equivalencia funcional de comunidades microbianas, en los últimos años se han realizado esfuerzos para esclarecer las consecuencias funcionales de cambios en la composición microbiana y de las condiciones ambientales. Un ejemplo de este tipo de estudios es el trabajo de Strickland y colaboradores (2009) quienes demostraron que comunidades microbianas con composición filogenética diferente y provenientes de distintos suelos (e.g. pastizal, pino y arbustivo) presentan una tasa de mineralización de C mayor cuando se incuban con el suelo de origen (Strickland et al 2009). Otro ejemplo que demuestra adaptación a las condiciones ambientales del sitio de origen de los microorganismos lo presentan Garcia-Pichel y colaboradores (2013) demostrando que dos cianobacterias del género *Oscillatoria* (*Microcoleus vaginatus* y *M. steenstrupii*) tienen mayores tasas de crecimiento cuando son expuestas a la temperatura de su lugar de origen (Garcia-Pichel et al. 2013). No obstante, dada la aún escasa evidencia sobre la importancia de la composición microbiana en procesos ecosistémicos, es crucial realizar estudios que investiguen explícitamente la contribución relativa de la composición de comunidades microbianas y de las condiciones ambientales locales en la respuesta funcional.

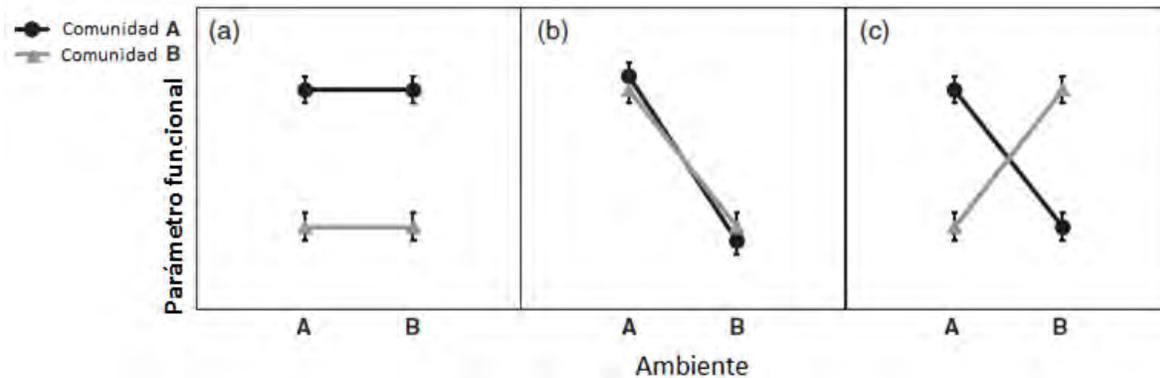
### 1.3. Enfoques experimentales para evaluar el valor funcional de la diversidad microbiana-

La relación entre la composición de las comunidades microbianas y las condiciones ambientales en procesos funcionales es relevante para entender la participación o el valor de la diversidad microbiana en los ecosistemas (Reed & Martiny 2007; Strickland et al. 2009; Angel et al. 2013). Para determinar dicha relación se han aplicado enfoques de ecología experimental denominados jardín común y trasplantes recíprocos. Ambos enfoques utilizan como unidad experimental a comunidades microbianas completas sometidas a distintas condiciones ambientales con el objetivo de evaluar la contribución relativa de la composición y del ambiente sobre procesos funcionales (Strickland et al. 2009).

El jardín común permite aislar el efecto de la composición de las comunidades microbianas (genotipo) en la funcionalidad de las mismas (fenotipo) mediante la imposición artificial de un ambiente común. Para esto se crea un ambiente común a todas las comunidades de estudio (con distinta composición) en donde se controlan y estandarizan los parámetros abióticos. Por tanto, dadas comunidades con diferente composición filogenética, cualquier diferencia funcional (tasas metabólicas) puede atribuirse o ser consecuencia directa de su composición y no de la variación ambiental (Reed & Martiny 2007). Langenheder y colaboradores utilizaron el enfoque de jardín común para analizar la composición y la tasa funcional de ocho comunidades bacterianas diferentes provenientes de ecosistemas acuáticos. Estas comunidades fueron expuestas a condiciones idénticas de laboratorio. Al finalizar, los resultados demostraron que las tasas funcionales de las comunidades microbianas originalmente distintas en composición, fueron significativamente diferentes (Langenheder et al. 2006). A pesar de la ventaja de controlar las condiciones ambientales y mantener como única variable experimental la composición de las comunidades, el enfoque de jardín común presenta retos ante la imposibilidad de controlar y estandarizar todas las variables ambientales (Reed & Martiny 2007).

Los trasplantes recíprocos plantean la posibilidad de exponer a comunidades diferentes a sus ambientes recíprocos locales, lo que elimina la necesidad de controlar artificial y puntualmente todas las variables ambientales. Con este enfoque es entonces posible evaluar la contribución de la composición microbiana, el ambiente local y la interacción entre estas variables en la respuesta metabólica de las comunidades (Reed & Martiny 2007). Existen tres probables respuestas funcionales de la comunidad bajo este enfoque experimental. En el primer escenario, si las condiciones ambientales no influyen en los procesos funcionales de las comunidades microbianas y en cambio estos procesos están ligados únicamente a su composición filogenética, no importarán las condiciones

ambientales en que se encuentren las comunidades microbianas sus tasas metabólicas siempre serán distintas (Figura 1a). En un segundo escenario, si la respuesta funcional depende directamente de las condiciones ambientales y no de la composición de las comunidades microbianas, comunidades con diferente composición filogenética en condiciones ambientales iguales tendrán las mismas tasas funcionales (Figura 1b) (Reed & Martiny 2007). Finalmente, en un tercer escenario, si los procesos funcionales son influenciados tanto por la interacción entre la composición de las comunidades y las condiciones ambientales, podemos esperar que la respuesta funcional sea diferente para cada comunidad y su efecto en la tasa metabólica dependa de la respuesta de la comunidad a las condiciones ambientales (Figura 1c). Un ejemplo en el que se ponen a prueba estos escenarios, es el estudio por Strickland y colaboradores (2009), en donde suelos provenientes de distintos ecosistemas (pastizal, matorral y bosque de pino) con comunidades microbianas diferentes (composición), fueron expuestos recíprocamente a los tres distintos tipos de materia orgánica proveniente de los distintos ecosistemas. Los resultados demostraron que existen diferencias en la tasa de mineralización de C entre tipos de inóculo y esta respuesta varía también en relación a la composición filogenética de origen (Strickland et al. 2009). En otro estudio similar Reed y Martiny (2013) utilizaron comunidades microbianas de sedimento de marisma, con composición filogenética distinta y provenientes de dos tipos de ambientes (salobre y no salobre). Estas comunidades fueron trasplantadas recíprocamente a los dos tipos de ambientes y los resultados demostraron que la composición de las comunidades permanecía diferente dependiendo del tipo de sedimento. En cuanto al aspecto funcional, los procesos de nitrificación, respiración y producción de metano realizados por las comunidades tenían una mayor tasa cuando se encontraban en su hábitat de origen (Reed & Martiny 2013). Dado el diseño experimental de trasplantes recíprocos detallados en los estudios mencionados, la respuesta funcional de las comunidades microbianas a perturbaciones ambientales es atribuible a la interacción de la composición filogenética y el ambiente local (Figura 1c).



*Figura 1.1* Resultados hipotéticos de dos comunidades A y B bajo el diseño de trasplantes recíprocos en ambientes A y B. Bajo análisis de ANOVA de dos vías (a) sólo la composición afecta el parámetro funcional, (b) sólo el ambiente afecta el parámetro funcional, c) la interacción entre la composición y el ambiente afecta el parámetro funcional. Imagen modificada de Reed & Martiny (2006).

### 1.3.1. Aproximaciones experimentales para la evaluación de la diversidad microbiana-

La determinación de la diversidad de las comunidades microbianas por varias décadas se realizó mediante técnicas de cultivo en medios nutritivos selectivos (de enriquecimiento) (Hirsch et al. 2010; Hill et al. 2000). No obstante, mediante estas técnicas de cultivo sólo se logra caracterizar alrededor del 1-10 % de la diversidad microbiana total de muestras ambientales (Douterelo et al. 2014). A pesar de que se han realizado esfuerzos por modificar los medios de cultivo en cuanto a requerimientos de nutrientes y mantenimiento de cultivos mixtos (varias cepas de microorganismos) de modo que interacciones entre especies permitan capturar una mayor diversidad de procariontes que no crecen de manera aislada, aún persiste el problema de que no todos los procariontes son cultivables y varios de ellos permanecen sin poder aislarse por estos métodos. En consecuencia, la caracterización de la diversidad microbiana por métodos de cultivo no es suficiente para el estudio de su diversidad en los ecosistemas naturales (Escalante et al. 2008; Rastogi & Sani 2011). Por ello, la Ecología Microbiana ha buscado alternativas independientes del cultivo para la caracterización de las comunidades microbianas dentro de los ecosistemas (Zimmerman et al. 2014). Técnicas basadas en la extracción de material genético de muestras ambientales son las principalmente usadas para la caracterización molecular de la diversidad microbiana. Usualmente se utiliza el material genético total obtenido a partir de muestras ambientales para la caracterización genómica de los microorganismos cultivables y no cultivables que componen las comunidades, a esto también se le conoce como metagenómica (Kakirde et al. 2010; Ludwig 2007). El enfoque de análisis metagenómico

puede seguir dos vías. La primera es el análisis completo de toda la información genética o genomas completos mediante métodos de secuenciación. La segunda es enfocarse en el análisis de regiones específicas del DNA obtenidas por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction) (Kakirde et al. 2010) que puedan aportar información taxonómica de la comunidad o información taxonómica de grupos que realizan funciones específicas. Un ejemplo de ello es el uso de marcadores filogenéticos universales como los genes que codifican para la subunidad menor del ribosoma debido a que estos marcadores tienen regiones altamente conservadas que están presentes en todos los taxones, así como regiones variables que permite distinguir cada tipo de taxón, en los procariontes se utiliza el gen 16S rRNA (Frank et al. 2008; Torsvik 2002; Torsvik et al. 1998; Zimmerman et al. 2014; Alcaraz 2014). Para caracterizar la diversidad taxonómica de organismos que realizan funciones específicas se utilizan regiones de DNA que codifican enzimas que son claves para la función (Gaby & Buckley 2012; Zimmerman et al. 2014).

#### Reacción en cadena de la polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que consiste en la síntesis de millones de copias de regiones específicas de DNA o RNA, comúnmente denominada amplificación (Pontes et al. 2007; Hirsch et al. 2010). Esto se logra mediante una reacción in vitro de síntesis enzimática de ácidos nucleicos llevada a cabo de manera automatizada (Delidow et al. 1993). Para que se lleve a cabo la amplificación del DNA, se necesita la creación de dos sondas de oligonucleótidos que hibriden con regiones de interés en el DNA molde (metagenoma o el genoma de un organismo) (Theron & Cloete 2000). La reacción se lleva a cabo mediante ciclos de temperatura que permiten la modificación física del DNA que rompa los puentes de H de la doble cadena de DNA y resulte en el molde de cadena sencilla. Cada ciclo consiste en mantener la temperatura adecuada de desnaturalización del DNA molde, posteriormente cambia la temperatura para que las sondas de oligonucleótidos hibriden en el extremo 3' de la secuencia de interés, y finalmente la temperatura cambia a la temperatura óptima para activar la enzima DNA polimerasa termoestable y comience la síntesis de las nuevas hebras del ácido nucleico que serán complementarias a las hebras moldes. La serie repetitiva de los ciclos permite que los productos (amplicones) de cada ciclo sirvan como molde para la siguiente síntesis, generando copias de manera exponencial (Delidow et al. 1993; Kirk et al. 2004; Acinas et al. 2005). La PCR es el método base para el estudio de la diversidad microbiana debido a que los productos resultantes de esta técnica son utilizados en posteriores estudios moleculares que permiten determinar la diversidad como técnicas fingerprinting o de secuenciación generalmente (Pontes et al. 2007).

## Técnicas Fingerprinting

Las técnicas fingerprinting (huella del DNA) determinan la composición de las comunidades microbianas sin proporcionar identidad filogenética. Esto lo logra mediante la separación y resolución de los fragmentos amplificados que generan distintos patrones debido a polimorfismos del DNA (longitud o secuencia). Cada técnica de fingerprinting se diferencia por el método de separación de los fragmentos y a continuación se describirán algunas brevemente.

**DGGE/TGGE.** Estas estrategias se basan en la separación de fragmentos por electroforesis en gradientes desnaturalizantes (DGGE; Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) o de temperatura (TGGE; Temperature Gradient Gel Electrophoresis). En cualquier caso, la separación de los fragmentos se realiza en geles de poliacrilamida mediante el principio de migración diferencial por longitud y secuencia. Fragmentos de distinta longitud migrarán a distinta velocidad en el gel y diferencias en las secuencias de nucleótidos también afectan su comportamiento de desnaturalización, asociado a la velocidad de migración. Idealmente cada banda del gel es considerada una población y la intensidad de la banda es un reflejo de su abundancia, no obstante esto es muy discutido (Hill et al. 2000).

**ARDRA.** Análisis de amplicones de restricción de DNA ribosomal (ARDRA, por sus siglas en inglés; Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis). Los amplicones del gen 16S rRNA generados por PCR son cortados por endonucleasas resultando en diferentes fragmentos de restricción que varían en longitud. Cada población de bacterias difiere en la secuencia nucleotídica de los sitios de restricción o en la longitud flanqueante donde reconocen las endonucleasas. Estos fragmentos son resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa. En esta estrategia, cabe notar que cada fragmento puede corresponder a distintas poblaciones que comparten un mismo sitio de restricción. (Rastogi & Sani 2011; Muyzer 1999)

**RISA/ARISA.** Análisis de espaciadores intergénicos ribosomales (RISA/ARISA, por sus siglas en inglés; Ribosomal Intergenic Spacer Analysis). RISA es una técnica de fingerprinting que se basa en la amplificación de la región intergénica ribosomal (IRS por sus siglas en inglés; Intergenic spacer region) presente entre la subunidad menor 16S y la subunidad mayor 23S del ribosoma. Los IRS son polimórficos en longitud y secuencia. De tal manera que RISA genera perfiles que son específicos de la composición de la comunidad; cada banda corresponde al menos a un organismo de la comunidad. ARISA es la versión automatizada de RISA y utiliza oligonucleótidos con marca fluorescente en la amplificación de los IRS. Así los fragmentos IRS son detectados automáticamente por un detector laser (Rastogi & Sani 2011).

**TRFLPs.** Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Terminales (TRFLP, por sus siglas en inglés, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). La técnica T-RFLP es una técnica de *fingerprinting* muy utilizada para medir los cambios temporales y espaciales de comunidades microbianas (Dunbar et al. 2000; Dunbar et al. 2001; Blackwood et al. 2003). Esta técnica se basa en el polimorfismo de los sitios de restricción terminales de la región de DNA de interés de la comunidad microbiana. Estos sitios de restricción polimórficos son el resultado de diferencias a nivel de secuencia de los genes, y que están asociados a divergencias filogenéticas. Al generar los productos de PCR (amplicones) se utilizan oligonucleótidos etiquetados con un marcador fluorescente. Así, los productos de PCR marcados fluorescentemente, en uno o ambos de sus extremos terminales (5' o 3'), son sometidos a reacciones enzimáticas de restricción con enzimas que reconocen regiones conservadas de 4 a 6 pares de bases (pb), generando los fragmentos de restricción terminales con etiqueta fluorescente (Schütte et al. 2008). Los polimorfismos de los fragmentos se caracterizan mediante electroforesis capilar asociada a un lector láser de fluorescencia (Schütte et al. 2008). De esta forma, la salida de los datos son patrones de picos que representan los distintos tamaños de los fragmentos. Estos picos tienen distintas alturas (intensidad) que se pueden correlacionar con la abundancia del fragmento. En teoría, cada fragmento corresponderá a una especie o una Unidad Operacional Taxonómica (OTU por sus siglas en inglés; Operational Taxonomic Unit) (Kirk et al. 2004; Schütte et al. 2008).

Diversos estudios han utilizado las técnicas *fingerpriting* para determinar y analizar comunidades enteras de microorganismos (Torsvik et al. 1998; Li et al. 2013), así como evaluar cambios de sucesión biológica, o bien, encontrar patrones biogeográficos a distintas escalas espaciales (Fierer et al. 2010; Lauber et al. 2009).

**Secuenciación.** Este método consiste en determinar la secuencia nucleotídica de fragmentos de DNA. Estos fragmentos pueden corresponder a amplicones, genomas o metagenomas. Para el caso de la secuenciación de amplicones de comunidades completas, es necesario separar las diferentes copias de los fragmentos de DNA. Algunas técnicas de *fingerpriting*, como DGGE y ARDRA, permiten la extracción de fragmentos individuales de geles de electroforesis para su posterior secuenciación. Otra forma de separar los amplicones es por la realización de una biblioteca de clonas. Para ello, los amplicones son ligados a un vector de clonación, plásmidos usualmente, para formar una molécula de DNA recombinante. Posteriormente, el DNA recombinante es insertado en cepas de *Escherichia coli* competentes. Cada célula bacteriana adquirirá una sola copia o molécula de la región de interés (amplicón) y de esta manera quedan separados las copias de la mezcla inicial. Una vez que los amplicones son individualizados se secuencian mediante métodos de secuenciación como el método

Sanger que permite la determinación de la secuencia nucleotídica de fragmentos con longitud de 1000 pares de bases (pb) (Escalante et al. 2014; Theron & Cloete 2000; Hill et al. 2000). No obstante el método de Sanger requiere la realización de bibliotecas de clonas implicando una elevada inversión en costo y tiempo. Como alternativas a este procedimiento, recientemente se han desarrollado técnicas de secuenciación masiva o de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés; next generation sequencing) que realizan la biblioteca de clonas de manera automatizada y está acoplada al procesos de secuenciación (Escalante et al. 2014). El resultado son secuencias de la composición de las comunidades microbianas que son comparadas contra una base de datos mediante algoritmos computacionales, esto permite dar identidad filogenética a los fragmentos de DNA de tal manera que se obtienen secuencias de la diversidad microbiana existente en los sistemas naturales.

### 1.3.2. Aproximaciones experimentales para la evaluación de las tasas funcionales de comunidades microbianas -

Entender la relación que guarda la diversidad microbiana y funcionamiento ecosistémico es uno de los objetivos de la Ecología Microbiana (Nannipieri et al. 2003). Para ello, además de caracterizar la diversidad filogenética, es necesario medir las tasas o el potencial funcional de las comunidades microbianas (Smalla et al. 1998). La caracterización funcional de los microorganismos incluye una gran variedad de aproximaciones experimentales, entre ellas PCR con retrotranscripción y medidas directas de actividad enzimática, a continuación se describen en general algunas de dichas aproximaciones (Rastogi & Sani 2011).

Dentro de los **métodos para la caracterización de potencial funcional**, asociado a caracterización de transcritos o material genético, se encuentran: PCR cuantitativa con retrotranscripción (RT-Q-PCR), DNA marcado con isótopos estables (SIP-DNA) y microarreglos (Rastogi & Sani 2011; Nannipieri et al. 2003; Zimmerman et al. 2014).

La **RT-PCR** es un método que determina cambio en la expresión de genes cuyas enzimas están involucradas en actividades metabólicas directamente relacionadas con ciclos biogeoquímicos o funciones ecosistémicas. Los fundamentos de este método experimental son semejantes a los de la PCR (ver arriba), a excepción de que el ácido nucléico que utiliza como molde es RNA, debido a que da información sobre los grupos microbianos que se encuentran metabólicamente activos en la comunidad de interés. El RNA que se ha extraído de la muestra ambiental sirve de molde para la síntesis de DNA complementario (cDNA) mediante la enzima transcriptasa reversa (Rastogi & Sani 2011). El resultado son fragmentos de cDNA que se usan para cuantificar (por PCR

cuantitativa) el número de transcritos como medida de la expresión de los genes de interés (o funcionales).

La **PCR cuantitativa** (qPCR, por sus siglas en inglés quantitative PCR) permite determinar el número de copias (abundancia) de un determinado gen o fragmento de DNA, por ello cuando se usa para cuantificar transcritos (cDNA) permite conocer la expresión de los genes de interés. Para poder cuantificar se usan fluoróforos (dNTPs) que se intercalan con el DNA en la síntesis de los fragmentos (amplicones). Mediante un sistema de detección de fluorescencia (lector láser) se mide la acumulación de amplicones en tiempo real durante cada ciclo de PCR. Un software registra el aumento de la concentración durante la fase exponencial de amplificación permitiendo la cuantificación de genes o transcritos (Rastogi & Sani 2011).

También existen técnicas moleculares que permiten ligar la diversidad microbiana con rutas metabólicas específicas como el **marcaje de material genético con isótopos estables** (SIP por sus siglas en inglés; Stable Isotope Probing). SIP ha sido aplicada generalmente al estudio de microorganismos que involucran el uso de compuesto de carbono y nitrógeno. Brevemente esta técnica se basa en etiquetar con isótopos estables ( $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ ) el sustrato de la actividad metabólica de interés, de esta forma, sólo los microorganismos que sean capaces de metabolizar el sustrato incorporarán los isótopos estables a sus células y ácidos nucleicos. Subsecuentemente el  $^{13}\text{C}$ -DNA o  $^{15}\text{N}$ -DNA puede ser aislado por centrifugación de gradientes de densidad e identificar la composición por técnicas fingerprinting o secuenciación (Rastogi & Sani 2011; Nannipieri et al. 2003).

Los **microarreglos** son aproximación ampliamente utilizada para caracterizar simultáneamente la diversidad y el potencial funcional de las comunidades microbianas. Esta estrategia consiste en el diseño de placas o “chips” con arreglos de oligonucleótidos o sondas fluorescentes que corresponden con genes funcionales conocidos, y al someter la muestra de interés (DNA total) a hibridación con esta placa se puede identificar la presencia de grupos taxonómicos y funcionales (Zimmerman et al. 2014).

La **secuenciación de RNA** es una técnica que permite caracterizar la actividad funcional de los organismos. Esta técnica es aplicada para evaluar la expresión ambiental de los genes de una población o comunidad, comúnmente llamada **metatranscriptómica**. Los principios de la metatranscriptómica son similares a los de secuenciación (ver arriba) con la diferencia de que utiliza RNA-mensajero (mRNA) como molde y la enzima transcriptasa reversa para crear cDNA, posterior a esto se utilizan diferentes plataformas de secuenciación masiva para crear un mapa de los genes expresados (Alcaraz & Peimbert 2016; Sorek & Cossart 2010).

Dentro de los **métodos utilizados para medir directamente la actividad enzimática** se encuentran los perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (CLPP, por sus siglas en inglés; Community Level Physiological profiles) que son técnicas que caracterizan la diversidad taxonómica de las comunidades microbianas mediante su capacidad catabólica al usar distintos sustratos. Las placas BIOLOG® son la opción comercial más ampliamente usada. BIOLOG® tiene la ventaja de combinar análisis de diversidad y tasas de degradación de carbono ya que mediante el uso de los sustratos de carbono se puede determinar la diversidad metabólica en función de sustratos de carbono utilizables de las comunidades bacterianas. Esta técnica utiliza una placa que contiene 95 sustratos de carbono diferentes. La degradación de cada sustrato por grupos microbianos es detectada por la reducción de un colorante de tetrazolio inmerso en el sustrato, el cual resulta en un cambio de color generando un patrón de sustratos oxidados que pueden ser cuantificados por espectrofotómetro (Smalla et al. 1998). La aproximación de medida de tasas metabólicas consiste en la estimación de la actividad de enzimas específicas. Una de estas técnicas es el Ensayo de Reducción de Acetileno (ARA, por sus siglas en inglés, Acetylene Reduction Assay) que mide la actividad de la enzima nitrogenasa responsable de fijar nitrógeno atmosférico a los ecosistemas. La nitrogenasa es una proteína ancestral altamente conservada sólo presente en organismos procariontes. Esta enzima produce la fijación de nitrógeno atmosférico mediante la ruptura del triple enlace del di-nitrógeno y su posterior reducción a nitrógeno orgánico como el amoníaco (NH<sub>3</sub>) (Hardy et al. 1973; Leigh 2000; Vitousek et al. 2002). Debido a que la nitrogenasa es inespecífica puede reducir diferentes sustratos que presenten las características del di-nitrógeno como el acetileno que también es un gas y tiene un triple enlace. El acetileno es comúnmente utilizado para determinar la actividad de la enzima nitrogenasa, ya que esta enzima rompe el triple enlace reduciendo el acetileno a etileno, y en algunas ocasiones a etano (Hu et al. 2012; Rehder 2000; Betancourt et al. 2008) Esta técnica, ha sido muy utilizada como una medida indirecta para estimar la tasa de fijación de nitrógeno, no obstante el etileno generado no es directamente comparable al potencial producto de fijación de nitrógeno, por lo que se ha establecido cada 3 moles de acetileno reducido a etileno corresponden a una mol de nitrógeno fijado (Su et al. 2011). Finalmente, cabe mencionar que para establecer la relación acetileno:nitrógeno es necesario recurrir a otro tipo de análisis como espectrofotometría de masa de <sup>15</sup>N para cada tipo de sustrato y organismo de estudio de modo que permita medir la proporción de metabolitos que tienen <sup>15</sup>N como resultado de la actividad biológica y de esta manera establecer la relación número de moles de acetileno reducidas al número de moles de nitrógeno reducido (David et al. 1980)(Millineaux et al. 1981; David et al. 1980; Hartley et al. 2007; Herridge et al. 2008).

Por lo tanto, los resultados de ARA sólo muestran la actividad de la nitrogenasa, y no la tasa de fijación de nitrógeno.

Otro método utilizado para medir la capacidad funcional de las comunidades microbianas es la tasa de mineralización de C. Medir la tasa de mineralización de carbono implica determinar la tasa de degradación de materia orgánica que realizan muchos tipos de microorganismos, todos heterótrofos, a través de la producción de una gran variedad de enzimas, por lo que es una medida global de la actividad de un gremio funcional no filogenéticamente restringido. Un ejemplo de la aplicación de este tipo de técnicas es el trabajo de Fierer et al. (2007) en donde se utilizó como sustrato de carbono sacarosa a diferentes concentraciones para distintas comunidades microbianas y se midió la tasa de mineralización (emisión de CO<sub>2</sub>) de cada comunidad. Con base en las diferentes tasas de mineralización que tenían los grupos de microorganismos se realizó una clasificación que distinguía entre aquellos con estrategia copiotrófica, capaces de degradar compuestos de C lábiles, y los organismos con estrategia oligotrófica, que degradan compuestos de C recalcitrantes (Fierer et al. 2007). De modo que cuantificar la tasa metabólica de las comunidades microbianas aporta información sobre las funciones que realizan los miembros de dichas comunidades.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Ecosistemas áridos

Los ecosistemas áridos representan el 40 % del territorio global (Makhalanyane et al. 2013) y sostienen a más del 38 % de la población total (Delgado-Baquerizo et al. 2013). Estos ecosistemas contribuyen a secuestrar una tercera parte del C terrestre global que favorece la mitigación de la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera (Makhalanyane et al. 2013; Elliott et al. 2014) que es uno de los gases de efecto invernadero. A pesar de su relevancia en la regulación del clima global y servicios que dan a la población humana estos ecosistemas han sido pobremente estudiados (Maier et al. 2014; Reynolds et al. 2009).

Los ecosistemas áridos se caracterizan por tener un déficit en la disponibilidad de agua, esto sucede porque la tasa de evapotranspiración (ET) supera a la tasa de precipitación media anual (PMA). El déficit en la disponibilidad de agua en estos ecosistemas es la principal limitante de la productividad primaria (Schwinning & Sala 2004; Johnson et al. 2012), lo que aunado a otras variables ambientales de estos ecosistemas como temperaturas extremas, altos niveles de irradiación de rayos U.V y fuertes vientos determina la escasa cobertura vegetal y extensos interespacios entre parches de vegetación (Johnson et al. 2012). Dependiendo de la relación ET/PMA, los ecosistemas áridos son clasificados en cuatro subtipos: hiper-áridos (PMA/ET <0.03), áridos (PMA/ET 0.03-0.2), y semiáridos (PMA/ET 0.2-0.5) (Hartley et al. 2007).

Los desiertos son ecosistemas áridos y reciben menos de 150 mm de PMA manteniendo temperaturas extremas a lo largo del año (Hartley et al. 2007). Estos son clasificados de acuerdo a la estación del año en la que reciben la mayor precipitación pluvial y su Temperatura Media Anual (TMA). Así, dependiendo de estos dos factores, los desiertos se denominan calientes cuando la mayor precipitación pluvial ocurre durante el verano y su TMA es mayor a 18 °C y desiertos fríos cuando la mayor precipitación pluvial ocurre durante el invierno y su TMA es menor a 18 °C (Hartley et al. 2007; Chapin III et al. 2011). Las entradas de agua dentro de los desiertos promueven una cascada de transformaciones biogeoquímicas y biológicas que resultan en cortos periodos de abundancia de nutrientes (Schwinning & Sala 2004). La liberación y obtención de nutrientes mediante actividad biológica están ligados estrechamente a la estacionalidad (temperatura) y la disponibilidad de agua (Johnson et al. 2012). No obstante, son pocos los momentos en que existe disponibilidad de nutrientes por lo que el suelo está poco desarrollado y tiene baja deposición de materia orgánica y una elevada concentración de sales (Belnap 2001; Chapin III et al. 2011). Todas estas condiciones ambientales hacen

que la distribución y proliferación de la macrofauna este limitada de modo que son los microorganismos los que sostienen los bioprocesos que se llevan a cabo en estos ecosistemas (Makhalanyane et al. 2013; Fierer et al. 2012).

## 2.2. Costras Biológicas de Suelo (CBS)

Las CBS son comunidades complejas formadas por bacterias fotosintéticas y diazotróficas, algas, hongos, musgos y líquenes que se distribuyen y abundan en los ecosistemas áridos incluyendo los desiertos (Belnap et al. 2004; Eldridge 2000; Nunes da Rocha et al. 2015; Arroyo et al. 2015). Estas comunidades de microorganismos se forman en los primeros 5 cm de la superficie del suelo desarrollándose principalmente en espacios libres de plantas vasculares (Steven et al 2013; Maier et al. 2014). En desiertos de Norte América se ha estimado que pueden llegar a ocupar hasta el 70 % de la superficie del suelo (Yeager et al. 2004; Johnson et al. 2012). Los microorganismos que forman las CBS están adaptados a los pulsos de lluvias escasos e impredecibles, elevadas tasas de evaporación, y periodos largos de exposición a rayos U.V haciéndolos componentes bióticos abundantes. Son los microorganismos que realizan en gran parte los procesos funcionales dentro de los desiertos (Nunes da Rocha et al. 2015; Morillas & Gallardo 2015).

La composición de las CBS varía dependiendo de la topografía, estacionalidad de lluvia y tipo de suelo así como también de la escala regional o local en la que se estudien (Makhalanyane et al. 2013; Steven et al 2013). Por ejemplo desiertos fríos y calientes de Norte América difieren en composición de las CBS, abundando líquenes en los desiertos fríos y cianobacterias en los desiertos calientes (Belnap 2001). En el trabajo de García-Pichel y colaboradores (2013) demostraron que había un recambio en la especie dominante de cianobacterias, éstas variaban en función de un gradiente latitudinal de los desiertos de Norte América. Las diferentes especies dominantes se encontraron directamente ligadas a diferencias en la temperatura óptima de crecimiento. En particular, en los desiertos fríos es dominante la cianobacteria *Microcoleus vaginatus*, y en los desiertos calientes es dominante la cianobacteria *Microcoleus steenstrupii* (García-Pichel et al. 2013). Por otro lado, el trabajo de Dvorak y colaboradores (2012), demuestra que comunidades de cianobacterias de CBS del género *Microcoleus* de distinto origen geográfico (y evolutivo) tienen una composición filogenética diferente, abonando a evidencia de posibles adaptaciones locales y asociadas a la historia evolutiva particular. Otro trabajo por Bahl y colaboradores (2010), presenta evidencia filogenética de adaptaciones locales en cianobacterias del género *Chroococcidiopsis* con variantes únicas entre desiertos calientes y fríos (Bahl, et al. 2011). En conjunto, estos ejemplos sugieren fuertemente que la composición filogenética de las CBS es el resultado tanto de las condiciones ambientales locales como de su historia evolutiva,

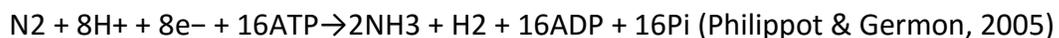
por lo que es improbable que comunidades con composición filogenética diferente respondan de la misma manera a los cambios o perturbaciones ambientales.

Dado el mosaico de diversidad biológica que albergan las CBS, éstas contienen gran diversidad metabólica que permite realizar distintas funciones que proveen de servicios al ecosistema (Belnap & Eldridge 2001). Dentro de los servicios ecosistémicos que las CBS realizan, se encuentran servicios físicos, en donde se destaca su contribución en reducir la erosión del suelo por corrientes de aire y por agua (Maier et al. 2014) gracias a la presencia de cianobacterias filamentosas como *Microcoleus vaginatus*, *Phormidium*, *Tolypothrix* que mediante sus filamentos y la secreción de exopolisacáridos junto con las hifas de los hongos permite que las partículas del suelo se compacten (Makhalanyane et al. 2013; Belnap 2001). Otra contribución física al ecosistema es la influencia de las CBS en la hidrología del suelo ya que al reducir el espacio entre los poros de las partículas del suelo logran capturar una mayor cantidad de agua y reducir la evapotranspiración manteniendo la humedad por periodos más largos (Chamizo et al. 2013). No obstante, la mayor contribución de las CBS en los desiertos es su participación dentro procesos ecosistémicos o servicios fisiológicos.

Los procesos ecosistémicos en los que participan los microorganismos de las CBS son la fijación de nutrientes esenciales, principalmente C y N (Yeager et al. 2004; Bowker et al. 2010). No obstante, las CBS sólo están activas durante los eventos de lluvia (disponibilidad agua) de modo que las funciones ecosistémicas realizadas por éstas dependen principalmente del ambiente local (Morillas & Gallardo 2015). Cuando las condiciones ambientales son adecuadas, las CBS median la entrada de C, principalmente vía fotosíntesis de comunidades fototróficas (cianobacterias, algas, musgos, líquenes) (Yeager et al. 2004). La fotosíntesis de las CBS es el mecanismo primario para la generación de materia orgánica en los parches de suelo donde la vegetación es escasa (Steven et al. 2013) contribuyendo al 7 % de la fijación de C en los desiertos (Maier et al. 2014). Por otro lado, la fijación de N realizada por las CBS es la principal entrada de este nutriente en los desiertos (Pepe-Ranney et al. 2015) mediante comunidades diazotróficas en la que destacan las cianobacterias, cianolíquenes, y bacterias heterotróficas (Steven et al. 2013; Nunes da Rocha et al. 2015; Pepe-Ranney et al. 2015). La fijación de N por las CBS contribuye con cerca del 40 % de la fijación de N en los desiertos (Maier et al. 2014). En conjunto, los servicios ecosistémicos prestados por las CBS están positivamente correlacionados con la supervivencia de las plantas vasculares, principalmente en cuanto a su contribución en la disponibilidad de N que después del agua es el segundo componente que limita la producción primaria (Pepe-Ranney et al. 2015).

### 2.3. Ciclo del nitrógeno en ecosistemas áridos

El N es uno de los cuatro nutrientes esenciales que sostienen la vida en la Tierra (Vitousek et al. 2002; Belnap 2002; Herridge et al. 2008). Este elemento es abundante debido a que el 79 % de la atmósfera está compuesta por dinitrógeno (N<sub>2</sub>), sin embargo, esta forma molecular no puede ser asimilada directamente por plantas y animales (Vitousek et al. 2002). De manera que la entrada de este elemento en los ecosistemas naturales es mediante la transformación molecular del N<sub>2</sub> a formas inorgánicas (NH<sub>3</sub>) a este proceso se le conoce como fijación de N (Vitousek et al. 2002). La fijación de N es realizada únicamente por grupos procariontes, capaces de romper el triple enlace covalente del N<sub>2</sub>, conocidos como diazotrófos (Vitousek et al. 2002; Leigh 2000; Jayne Belnap 2002). Los diazotrófos están representados por una gran diversidad filogenética de bacterias que involucra organismos fototrófos (obtienen energía de la luz) o heterotrófos (obtienen energía a partir de compuestos orgánicos) (Philippot & Germon, 2005). Los microorganismos diazotróficos poseen la enzima nitrogenasa, la única capaz de realizar la fijación de N atmosférico (Zehr et al. 2003; Leigh 2000; Yeager et al. 2004). Esta enzima se compone por dos dímeros proteicos conservados: denominados complejo MoFe dinitrogenasa que se codifica mediante los genes *nifD* y *nifK* y complejo Fe dinitrogenasa reductasa codificado por el gen *nifH*. La función que realiza la nitrogenasa involucra la asociación y disociación entre éstos dos complejos por medio de la transferencia de electrones dependiente de ATP, lo cual permite eventualmente la reducción del N<sub>2</sub> a amoníaco (NH<sub>3</sub>) que rápidamente sufre protonación a ión amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Hu et al. 2012). Esta reacción puede ser representada por la siguiente ecuación en la que a partir de un mol de N<sub>2</sub> se producen 2 moles de NH<sub>3</sub>:



La fijación de N es una reacción muy costosa en términos energéticos, se requieren 16 moléculas de ATP para reducir una molécula de N<sub>2</sub> (Vitousek et al. 2002). Las condiciones necesarias para la fijación de N es que se realice en ambientes con poca concentración de O<sub>2</sub> o anóxicos, debido que la nitrogenasa es inhibida por la presencia de O<sub>2</sub> (Hartley et al. 2007). El producto de la fijación de N (NH<sub>3</sub> o NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) generalmente es usado directamente por bacterias, hongos y plantas. Las plantas utilizan el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> para la síntesis de compuestos orgánicos nitrogenados. Después de la muerte de un organismo (planta, animal, hongo, bacteria) el N orgánico presente en las proteínas, aminoácidos, y ácidos nucleicos son degradados a amonio, este proceso se le conoce como mineralización o amonificación (Figura 2b) (Philippot & Germon, 2005). Una vez que el amoníaco entra al ecosistema gran parte regresa a la atmósfera por volatilización, y otra parte es asimilada directamente como NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por plantas o bacterias (Austin et al. 2004). No obstante, el amonio puede ser oxidado a nitrato mediante bacterias altamente

especializadas, conocidas como nitrificadoras (Philippot & Germon, 2005). Las bacterias nitrificadoras realizan esta oxidación en dos reacciones. La primera reacción el amonio es oxidado a nitrito, y en la segunda reacción los nitritos son oxidados a nitratos (Figura 2b) (Philippot & Germon, 2005). Debido a la naturaleza eléctrica del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) éste es asimilado por las raíces de las plantas, por bacterias heterotróficas o puede ser usado como aceptor terminal de electrones por microorganismos cuando el oxígeno es limitado (Philippot & Germon, 2005). Dentro de los ecosistemas el nitrato es una de las principales formas en que se pierde N mediante lixiviación o escorrentías por agua (Hartley et al. 2007; Austin et al. 2004). Por lo que el nitrato es considerado el flujo central para la pérdida de nitrógeno, principalmente en suelos.

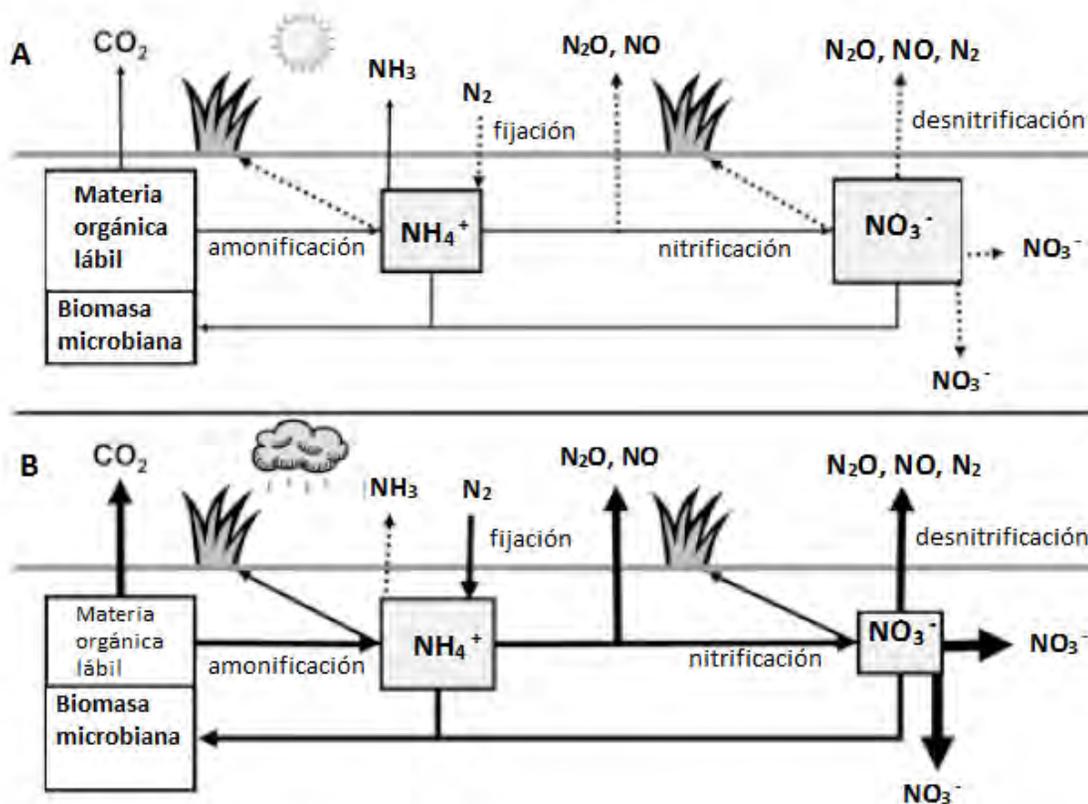
El ciclo del N, se completa con la reducción del nitrato a  $\text{N}_2$  (Philippot & Germon, 2005). A este proceso se le denomina desnitrificación, y es realizado en ambientes anaerobios (Austin et al. 2004; Cable & Huxman 2004; Schwinning & Sala 2004). La desnitrificación consta de cuatro pasos de reacción que son naturales en la respiración de algunos microorganismos, reduciendo los nitratos y nitritos a óxido nítrico, óxido nitroso y finalmente a  $\text{N}_2$  (Figura 2b), (Philippot & Germon, 2005). Todos estos compuestos son gaseosos de modo que ésta es la vía biológica principal en que el N regresa a la atmósfera.

La fijación de N y la movilidad de este nutriente está limitada por la disponibilidad de agua (Vitousek et al. 2002; Schwinning & Sala 2004; Cable & Huxman 2004), por lo que los flujos de los distintos compuestos del ciclo del N varían dependiendo de la época del año (Figura 2). La fijación de N en los desiertos se da por un corto periodo del año y gran parte del N fijado se pierde por volatilización (Figura 2b) debido a las elevadas temperaturas que alcanzan los ecosistemas áridos (Austin et al. 2004; Cable & Huxman 2004). Cuando ocurre la nitrificación se vuelve a perder otra parte del nitrógeno por volatilización de óxido nitroso (Figura 2b). De esta manera la tasa de pérdida del N supera a la tasa de fijación ocasionando que estos ecosistemas tengan baja disponibilidad de este nutriente (Austin et al. 2004; Collins et al. 2008). En desiertos se ha estimado que la mayor actividad metabólica asociada con la fijación de N resulta de los consorcios microbianos de las CBS, los que requieren menos agua para su actividad metabólica en comparación con las plantas vasculares (Belnap et al. 2004; Austin et al. 2004).

En cuanto a la contribución de distintos grupos dentro de las CBS a la fijación de N, se ha reconocido que diferencias en composición filogenética de las CBS se asocian con diferencias en tasas metabólicas. En particular, se ha observado que CBS dominadas por líquenes son aquéllas con mayor tasa de fijación de N (Figura 3B) (Belnap 2002; Pietrasiak et al. 2013). Mientras que CBS que no han desarrollado ningún tipo de

vegetación tienen menor tasa de fijación de N (Figura 3A y 3C) (Belnap 2002; Belnap et al. 2004; Li et al. 2013). No obstante estas diferencias en composición filogenética no se han enfocado de manera específica en la diversidad de procariontes del gremio de diazotrofos (Delgado-Baquerizo et al. 2013; Maestre et al. 2011; Bowker et al. 2010).

Algunos estudios han abordado de manera específica la contribución que tiene la diversidad filogenética de los diazotrofos de las CBS en la fijación de N. En particular, se ha reconocido que la mayor fijación de N por CBS es realizada por el componente de cianobacterias (Bowker et al. 2010; Makhallanyane et al. 2013). Sin embargo, estudios recientes realizados con DNA-SIP ( $^{15}\text{N}$ ) y ARA han demostrado que *Proteobacterias* y *Clostridiaceae* también tienen una contribución importante en la fijación de nitrógeno por parte de las CBS (Pepe-Ranney et al. 2015). De modo que no queda resuelta la contribución específica que tiene la diversidad microbiana, en específico del grupo diazotrófico, en la fijación de N.



**Figura 11.1** Esquema del ciclo del N en ecosistemas áridos y semiáridos. **A** condiciones de sequía y **B** condiciones de lluvia. El ancho de las flechas indica que procesos dominan para ambas condiciones. Las líneas punteadas son los procesos que se llevan a cabo a tasas muy bajas o imperceptibles. En el escenario **A** los compuestos nitrogenados son obtenidos mediante la degradación de la materia orgánica. El C y N disponible se pierden por volatilización. En el escenario **B** la disponibilidad de agua

activa la biomasa microbiana, y esto repercute de manera positiva en la fijación de N que rápidamente se protoniza a  $\text{NH}_4^+$ , nitrificación y desnitrificación. Esquema modificado de Austin et al. (2004).



Figura II.2. Tipos de CBS. (A) CBS clara o dominada por cianobacteria, (B) CBS oscura o dominada por líquen Collema, (C) CBS dominada por musgo. Imagen modificada de Büdel et al. (2009).

#### 2.4. Justificación

A pesar de que la mayor parte del territorio mexicano se considera como desértico y de la relevancia que tienen las comunidades microbianas en procesos ecosistémicos, en el país aún son escasos los estudios que se desarrollan con el propósito de investigar el impacto de la diversidad microbiana y el ambiente sobre funciones ecosistémicas. Es por esto que en este trabajo se estudiaron comunidades microbianas fijadoras de N provenientes de desiertos con patrones de temperatura y precipitación contrastantes (composición diferencial) con el objetivo de evaluar de manera explícita el efecto de la composición filogenética y de las condiciones ambientales en una función ecosistémica específica.

#### 2.5. Hipótesis y Objetivos.

En este trabajo se mantienen las tres hipótesis propuestas por Reed & Martiny (2007) (ver figura 1) y se ponen a prueba en un diseño experimental en donde dos comunidades diazotróficas con distinta composición filogenética son expuestas a dos ambientes artificiales que difieren únicamente en la temperatura.

$H_0$ : En condiciones controladas, la tasa de fijación de N en las distintas comunidades diazotróficas de CBS, no tendrá ninguna tendencia que pueda ser explicada por la diversidad taxonómica, el ambiente o la interacción entre éstos dos factores.

$HA_1$ : En condiciones experimentales controladas, distintas comunidades diazotróficas de CBS, responderán en relación con la composición de las comunidades estudiadas. La respuesta para cada comunidad será distinta, constante e independiente del ambiente en el que se encuentre. Ver figura 1a.

HA<sub>2</sub>: En condiciones experimentales controladas, distintas comunidades diazotróficas de CBS, responderán en relación con las condiciones ambientales experimentales específicas en las que se encuentren e independientemente de su composición. Ver figura 1b.

HA<sub>3</sub>: En condiciones experimentales controladas, distintas comunidades diazotróficas de CBS, responderán en relación con las condiciones ambientales experimentales específicas en las que se encuentren y con la composición específica de las comunidades estudiadas. Comunidades, originalmente distintas, responderán a condiciones ambientales de manera particular (taxonómica y funcionalmente) y en relación a sus parámetros originales. Ver figura 1c.

#### Objetivo general

- Determinar los efectos del ambiente experimental (perturbación térmica) y de la composición de las comunidades diazotróficas en la respuesta funcional (tasa de fijación N), en CBS de México de distinto origen geográfico y composición filogenética.

#### Objetivos particulares

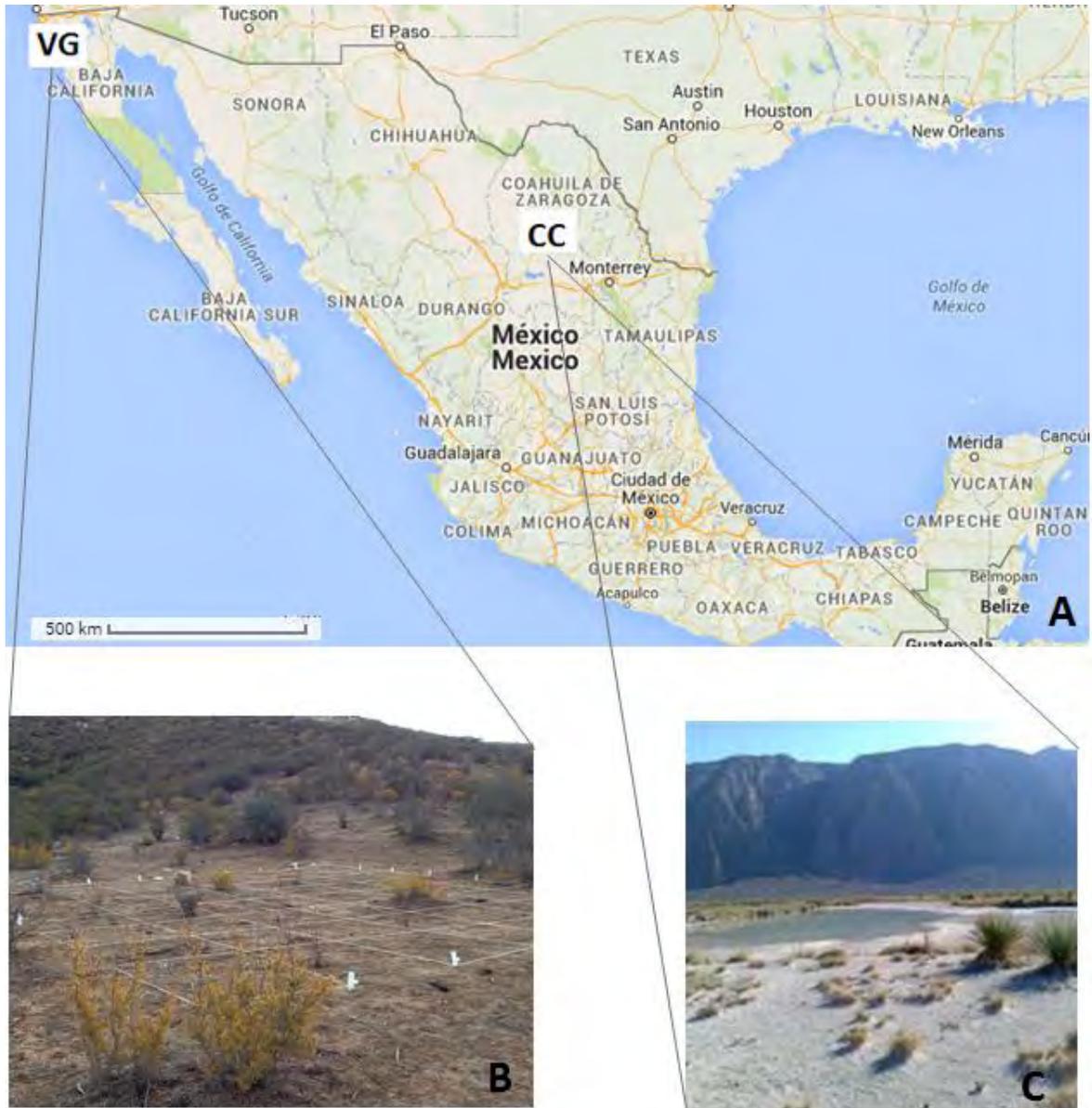
- Establecer dos experimentos de jardín común para mesocosmos de CBS (mesocosmos) de distinto origen geográfico (desierto frío y desierto caliente) y con distinta composición filogenética. En uno de los experimentos de jardín común los mesocosmos se mantendrán a 15 °C y en el otro se mantendrán a 30 °C.
- Determinar la tasa de fijación de N de todas las CBS experimentales mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA) en los siguientes tiempos: al inicio del experimento y cada 30 días hasta el día 180, en que finaliza el experimento.
- Determinar la composición de las comunidades bacterianas diazotróficas de CBS mediante TRFLP's del gen funcional *nifH* a lo largo del experimento.
- Determinar estadísticamente la contribución relativa del ambiente experimental y la composición filogenética de las CBS en la respuesta funcional de fijación de N.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Sitio de Estudio

Las costras biológicas de suelo (CBS) fueron tomadas de dos desiertos de México, con patrones de precipitación pluvial y temperatura contrastantes. El primer sitio de muestreo se encuentra en el estado de Baja California en la localidad “El Mogor” del Valle de Guadalupe (32°02'3.15"N 116° 29' 47.77"O) dentro de la ecorregión chaparral-matorral costero dentro de la sub-región mediterránea con vegetación arbustiva con especies como *Adenostoma*, *Ceanothus*, *Arctostaphylos* y *Quercus* (Abraham, 2010). Para fines de este estudio, esta localidad será catalogada como desierto frío debido a que los eventos de precipitación ocurren en invierno (Bullock 2003), presenta temperatura media anual es de 17.3 °C (SMN, 2013) y precipitación anual menor a 240 mm (Romero-Olivares et al. 2013).

El segundo sitio de muestreo se encuentra en el estado de Coahuila en la localidad de “Churince” del valle de Cuatrociénegas, (26°54'43.15"N 102°00'52.72"). Presenta vegetación tipo pastizal y matorral y consta de especies como *Prosopis laevigata*, *Sporobolus airoides*, *Nerisyrenia camporum* (Perroni et al. 2014). Para fines de este estudio, esta localidad será es catalogada como desierto caliente debido a que los eventos de precipitación ocurren en verano (López-Lozano et al. 2012), presenta temperatura media anual es 21.4 °C (SMN, 2013), y precipitación media anual menor a 150 mm (Alcaraz et al. 2008).



*Figura III.1* Sitios de muestreo. (A) Ubicación geográfica de los desiertos donde fueron tomadas las costras biológicas de suelo. VG (Valle de Guadalupe, desierto frío), CC (Cuatro Ciéngas, desierto caliente). (B) Rancho “El Mogor” (32°02’3.15’’N 116° 29’ 47.77’’O). (C) Localidad “El Churince” (26°54’43.15’’N 102°00’52.72’’).

### 3.2. Toma de muestra

En cada uno de los sitios de estudio, (Valle de Guadalupe y Cuatrociéngas) se delimitó una serie de cuadrantes anidados en un área total de 8m<sup>2</sup>, de acuerdo a lo reportado por Noguez et al. 2005 de donde se tomaron 32 muestras de CBS.

La toma de muestra se realizó con un cilindro de PVC con una altura 5 cm, y un diámetro de 11 cm. Las muestras fueron guardadas dentro de bolsas de plástico negras y transportadas al laboratorio en el Instituto de Ecología, UNAM, en la Ciudad de México. Las CBS estuvieron en condiciones de obscuridad y a temperatura de 10°C aproximadamente, hasta su utilización dentro de los jardines comunes.

### 3.3. Diseño experimental

Jardín Común-Trasplantes recíprocos. Para evaluar la influencia relativa de las condiciones ambientales y de la composición de las comunidades diazótroficas en su capacidad metabólica de fijar N<sub>2</sub>, se implementaron dos tipos de jardín común. Cada jardín común era diferente en la temperatura de incubación. En el primer jardín común se implementó una temperatura constante similar a la temperatura media de la temporada de lluvias del desierto frío (i.e. Valle de Guadalupe, 15 °C). En el segundo jardín común se implementó una temperatura constante similar a la temperatura media de la temporada de lluvias del desierto caliente (i.e. Valle de Cuatro Ciénegas, 30 °C). En conjunto, los jardines comunes con temperaturas de incubación contrastantes funcionaron como un diseño de trasplantes recíprocos, permitió evaluar la capacidad metabólica de cada comunidad a una temperatura diferente a su ambiente nativo.

Implementación de condiciones experimentales. Para crear las condiciones del jardín común, el Instituto de Ecología de la UNAM proporcionó dos cámaras de incubación ambiental (Convicon, modelo G30) a las cuales se instalaron lámparas Lux con una capacidad lumínica de 500 μmol de fotones x m<sup>2</sup> -s, que está dentro del rango que promueve la fotosíntesis, y de esta manera permite la actividad de la nitrogenasa (Millineaux et al. 1981; Su et al. 2011). La intensidad luminosa de las lámparas fue corroborada con un luxómetro (Scheidler, YK-10LX). En cada una de las cámaras se mantuvo un régimen automatizado de luz/obscuridad de 12 h. En una de las cámaras ambientales se mantuvo la temperatura en 15 °C. En la segunda cámara ambiental se mantuvo la temperatura a 30 °C. Finalmente, previo al inicio del experimento, se verificó que la temperatura de las cámaras ambientales se mantuviera estable.

En cada jardín común se siguió un diseño de bloques al azar. Se colocaron 15 CBS de CC y 15 CBS de VG. Para cada tipo de CBS (i.e. de VG o CC) 11 muestras se mantuvieron en humedad (punto de saturación) con agua purificada y estéril, mientras que cuatro muestras se mantuvieron como controles secos. Una vez colocadas las muestras dentro de cada jardín común se dieron 3 días para su aclimatación; posterior a este tiempo, se contó el primer día del experimento.

El periodo experimental duró 180 días. La toma de muestras para determinar la composición diazotrófica siguió un esquema de muestreo destructivo de las CBS. Este

muestreo se realizó en cuatro tiempos del periodo experimental con tubos Falcon estériles. En cada tiempo se destruían 3 CBS húmedas y 1 control seco, excepto al inicio del experimento, que fueron 2 CBS húmedas y 1 control seco (Tabla 2.1). Las muestras se guardaron a una temperatura de -80 °C para posteriormente realizar los análisis moleculares. Por otra parte, la actividad de la nitrogenasa se determinó con ARA (en todas las CBS), por jardín común y por localidad. Para esto se establecieron siete eventos de toma de lecturas (T0-T6; Tabla 2.1)

Tabla III.1 Diseño experimental. Número de muestras por tratamiento y por evento de muestreo para la caracterización del potencial de fijación de N<sub>2</sub> (ensayo ARA) y composición de las comunidades diazotróficas de las CBS (ensayo DNA).

Periodo experimental		T0 (0 días)	T1 (10 días)	T2 (60 días)	T3 (90 días)	T4 (120 días)	T5 (150 días)	T6 (180 días)	N (total de muestras)
		TA	TB		TC		TD		
Ensayos <sup>+</sup>		ARA, DNA	ARA, DNA	ARA	ARA, DNA	ARA	ARA	ARA, DNA	
Temp. Incubación	Origen*								
15 °C	CC	2	3	-	3	-	-	3	11
	Control seco CC	1	1	-	1	-	-	1	4
	VG	2	3	-	3	-	-	3	11
	Control seco VG	1	1	-	1	-	-	1	4
30 °C	CC	2	3	-	3	-	-	3	11
	Control seco CC	1	1	-	1	-	-	1	4
	VG	2	3	-	3	-	-	3	11
	Control seco VG	1	1	-	1	-	-	1	4
									60

\*CC= Cuatro Ciénegas; VG= Valle de Guadalupe, control = CBS sin agua

<sup>+</sup> Ensayos realizados con las muestras: ARA (ensayo de reducción de acetileno para determinar el potencial de fijación de N<sub>2</sub>. Se realizó en todas las muestras en cada tiempo); DNA (extracción del DNA total de suelo para caracterización de comunidad diazotrófica).

### 3.4. Caracterización molecular de la composición de comunidades diazotróficas

Extracción de DNA. La extracción de DNA se realizó de acuerdo al protocolo publicado por Purdy et al 2005 (ver apéndice 1). En breve, se extrajo DNA de 0.5g de muestra. Este procedimiento de extracción involucra lisis de las células con perlas de vidrio (0.1mm) a 50 000 rpm. La limpieza y elución del DNA es por medio de columnas de HTP (Hidroxiapatita, No. catálogo 130-0420, BioRad) y Sephadex G-50 (No. catálogo G75120, Sigma). El DNA extraído de las muestras se almacenó a -20 °C hasta realizar los siguientes métodos moleculares.

Amplificación del gen nifH. Se realizó una PCR anidada para la obtención del gen nifH, parte del operón de la nitrogenasa. Para tal fin se utilizaron oligonucleóticos (*primers*) degenerados que, de acuerdo con Yeager et al. 2004, abarcan la mayor diversidad filogenética de diazótrofos. Para cada muestra de DNA se realizaron 3 réplicas de PCR anidado con la intención de disminuir los sesgos de la deriva del PCR (Polz & Cavanaugh 1998).

El protocolo para la PCR anidada es similar al de Yeager et al (2004). La primera reacción está constituida por los *primers* nifH19F (5'-GCIWTYTAYGGIAARGGIGG-3'), y nifH3R (5'-ATRTTRTTNGCNGCRTA-3'), el volumen de reacción del PCR fue de 25 µl, las concentraciones utilizadas de los reactivos fueron las siguientes; 1X de buffer de taq polimerasa, 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 2mM de dNTPS, 2µM de primers, 2.5 U de Taq DNA polimerasa *Platinum* (marca *Thermo Scientific*, No. catálogo 11304-011), 0.5 µl de BSA, 0.5 µl de DMSO, y aproximadamente 40 ng de DNA. El producto de esta primera reacción se utiliza como templado para la segunda reacción. Para la segunda reacción se utilizaron los *primers* nifH 11F-FAM (marcado fluorescente en el carbono 5', color azul; 5'-GAYCCNAARGCNGACTC-3') y nifH 22R (5'-ADWGCCATCATYTCRCC-3'). El volumen de reacción fue de 50 µl, las concentraciones utilizadas de los reactivos fueron las siguientes; 1X de buffer de taq polimerasa, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2mM de dNTPS, 2µM de primers, 0.1 U de Taq DNA polimerasa *Platinum* y 2 µl de la primera reacción de PCR. El programa del termociclador para la primera reacción fue desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 20 ciclos de a 94°C por 45 segundos, temperatura de alineación de 48°C por 1 minuto, temperatura de extensión de 72°C durante un minuto y la extensión final fue a 72°C durante 10 minutos. Para la segunda reacción de PCR el programa fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 32 ciclos a 94°C por 45 segundos, temperatura de alineación de 55 °C durante 1

minuto, temperatura de extensión a 72 °C por 1 minuto, y extensión final fue a 72 °C durante 10 minutos (Yeager et al. 2004).

Limpieza de amplicones de *nifH*. Cada una de las reacciones de PCR se mezcló con sus respectivas réplicas. Para purificarlas se corrieron en un gel al 1.7 % de agarosa con bromuro de etidio en 0.5 x de buffer TAE. El gel se visualizó con luz UV para cortar la banda de gel con un peso de 358 pb (amplicon de *nifH*). Posteriormente la limpieza de la banda de gel se realizó con el kit QIAquick (*Qiagen*, No. catálogo 28704). Los amplicones de *nifH* limpios se corrieron en un gel al 1.7 % de agarosa con bromuro de etidio en 0.5X de buffer TAE para cuantificar la concentración con MassRuler DNA (*Thermo Scientific*, No. catálogo SM0403).

TRFLPs de amplicones de *nifH*. Para obtener los fragmentos de restricción, los amplicones de *nifH* limpios se sometieron a una digestión enzimática con la enzima Mae III (Roche, No. catálogo 108222), que reconoce cinco pares de bases (GTNAC). Brevemente, se tomó el volumen necesario de amplicones para tener una concentración de 80 ng del gen *nifH*, la concentración del buffer de digestión fue 1X y 1 Unidad de enzima de restricción, el volumen de la reacción fue establecido para 25 µl. El programa para la digestión enzimática en el termociclador fue a 55 °C durante 12 horas. Posteriormente se limpiaron y precipitaron los fragmentos de restricción.

La limpieza y precipitación de los fragmentos de restricción se realizó de la siguiente manera: al producto de la reacción de digestión se le agregó 0.1 volumen de EDTA [125mM], 0.1 volumen de Acetato de Sodio [3M] pH 5.1, y 2.5 volúmenes de etanol frío al 100 %. Esta mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm durante 25 minutos, se decantó el sobrenadante, y se añadieron 100 µl de etanol frío al 70 %. Esta mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 25 minutos y por aspiración se desechó el sobrenadante. Por último la muestra se dejó secar dentro de una campana de flujo laminar durante 15 minutos.

Los fragmentos de restricción precipitados fueron resuspendidos en 9.5 µl de formamida (HiDi Applied Biosystems) y 0.25 µl del marcador de peso molecular GS500 LIZ. Esta mezcla fue cargada en una placa de secuenciación, que siguió el siguiente programa: desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, y puestos en hielo 5 minutos. Posteriormente se cargó la placa en el secuenciador de electroforesis capilar (ABI 3500xL *Genetic analyzer*), los parámetros de corrida fueron temperatura de electroforesis 60 °C, voltaje 10kV, tiempo de inyección 35 segundos y tiempo de corrida 10,000 segundos.

Para cada una de las muestras se realizaron tres réplicas en electroforesis capilar para identificar artefactos en los resultados. Los perfiles de TRFLPs fueron generados mediante el software GeneMapper versión 3.1 (Applied Biosystems), y para su posterior análisis se utilizó el software GeneMarker (Softgenetics).

Procesamiento de datos de TRFLPs. Los perfiles obtenidos de la electroforesis capilar fueron descargados para crear una tabla con la información de tamaño del fragmento (pb), altura (intensidad de fluorescencia), y área del fragmento. Los parámetros para considerar fragmentos reales fueron los siguientes. El fragmento debía tener un tamaño mínimo de 20 pb, una altura mínima de 50 unidades de fluorescencia, y debía estar presente en al menos dos de las réplicas de corrida de los TRFLP (Blackwood et al. 2003). El tamaño de los fragmentos fue redondeado al entero más cercano, y aquellos fragmentos que diferían en 2 pb en longitud eran agrupados como un mismo fragmento. La altura de los fragmentos fue estandarizada dividiendo la altura de cada pico entre la altura total de los picos. Los picos que representaban < 0.5 % de la altura total fueron eliminados. Finalmente se calculó la abundancia relativa de los fragmentos que cumplían las características ya mencionadas. Cada uno de los fragmentos distintos se considera una Unidad Taxonómica Operativa u OTU por sus siglas en inglés (*Operational Taxonomic Unit*).

Con los datos de abundancia relativa para cada fragmento presente en las muestras, se generó una matriz por cada tiempo (T0, T1, T3 y T6, Tabla 3.1) en donde las filas corresponden a las muestras y las columnas contienen los atributos medidos, en este caso la abundancia relativa de cada uno de los fragmentos identificados u OTUs.

### 3.5. Análisis de diversidad.

Índice de Shannon-Weaver. El índice de Shannon-Weaver se calculó mediante una matriz de los datos de abundancia relativa de los OTUs de *nifH*, y fue calculado con el paquete Vegan en el programa R versión 3.0.2 (Flynn et al. 2008; Rossi 2011) El valor del índice se estimó para cada grupo de los jardines comunes (CC 30 °C y 15 °C, VG 30 °C y 15 °C), así mismo se calculó la riqueza específica (S) de cada OTU, utilizando el mismo programa.

Heatmap con dendrogramas de similitud. Se realizaron gráficos de Heatmap con la matriz de abundancia relativa de los OTUs de *nifH*. Esto se realizó para cada tiempo en que se caracterizó la comunidad diazotrófica. Con la finalidad de comparar la abundancia relativa de OTUs entre las muestras. Para realizar los heatmaps se utilizó el paquete ggplot2 en el programa R, versión 3.0.2. También se añadieron a los heatmaps

dendogramas que agrupan las muestras (filas) por disimilitud para ello la matriz de abundancia relativa es transformada a una matriz de distancia utilizando Bray-Curtis mediante el paquete Vegan (Flynn et al. 2008). Las asociaciones se realizaron mediante el método de UPGMA.

Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, Non metric multidimensional scaling siglas en inglés). El escalamiento multidimensional no métrico es un método de ordenación de datos (objetos) que se distribuyen originalmente en n-dimensiones (atributos), su objetivo es escalar los objetos en menos dimensiones que las originales. El resultado gráfico de este análisis representa a objetos disímiles en sus atributos como más alejados que aquellos más similares entre ellos. De manera que los objetos más disímiles en sus atributos estarán alejados unos de otros, mientras aquellos que sean más similares se encontraran más cercanos. Este método es ampliamente utilizado en datos de ecología ya que no se limita a distancias euclidianas como medidas de disimilitud, sino que incorpora otro tipo de métricas, usualmente Bray-Curtis. El coeficiente de Bray-Curtis se utiliza como un coeficiente no métrico para calcular la disimilitud entre objetos. Se define de la siguiente manera:

$$b_{ii'} = \frac{\sum_{j=1}^J |n_{ij} - n_{i'j}|}{n_{i+} + n_{i'+}}$$

Donde:

J= número de sitios

$n_{ij}$  = número de especies en el sitio i

$n_{i'j}$  = número de especies en el sitio i'

$n_{i+}$  = total de especies del sitio i

$n_{i'+}$  = total de especies del sitio i'

Para aplicar el método NMDS se utilizaron las matrices de abundancia relativa de cada tiempo, y como métrica de disimilitud (Bray-Curtis). Se establecieron coordenadas de ordenación en dos dimensiones, y al menos 100 iteraciones. Todo esto se realizó en el programa R versión 3.0.2 (Oksanen 2008).

### 3.6. Análisis de funcionalidad.

El ensayo de reducción de acetileno (ARA). Se llevó a cabo para todas las unidades experimentales como se detalla a continuación. Cada una de las muestras colocadas en los platos de PVC fue sellado con tapa de acrílico con un tapón de silicón y macilla o plastilina (Figura 3.2). Una vez sellados los platos, se extrajo con jeringa un volumen del 10 % de la cabeza de aire, que se sustituyó con gas acetileno. Cada una de las CBS así

tratadas se incubaron durante 72 horas en el jardín común correspondiente. Concluído el periodo de incubación se tomó, con jeringa, una muestra de 4ml de la cabeza de aire que fue a su vez inyectada en “vacutainers” de 10 ml. Éstos se trasladaron al Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, para ser analizados con un cromatógrafo de gases (Varian 3300, columna empacadora: Poropak mallas 2m x 1/8 de pulgada, detector de ionización de flama). Las condiciones del cromatógrafo para la lectura de las muestras fueron las siguientes: 1 ml de muestra inyectada, gases acarreadores (nitrógeno 80 psi, aire 60 psi, e hidrógeno 40 psi), atenuación de 0.2, velocidad de papel de 0.5. El tiempo de retención para etano fue 1.32, para etileno 1.57, y para acetileno 1.8.



*Figura III.2* Esquema del Ensayo de reducción de acetileno (ARA). (A) Inyección de 10 % de acetileno en las muestras selladas, (B) Muestras selladas e incubadas durante 72 horas en las condiciones de jardín común. (C) Muestra de gas extraído de las muestras selladas e incubadas es

colocado en vacuteiners de 10 ml, (D) Cromatógrafo utilizado para la lectura de gases etano:etileno:acetileno.

Procesamiento de datos de lecturas de cromatografía. Los datos crudos del cromatógrafo se transformaron a concentración en  $\mu$ moles para cada uno de los gases detectados. Para ello, se construyeron curvas patrón para etileno y etano. Las curvas patrón se construyeron inyectando volúmenes y concentraciones conocidos de gases puros (etileno y etano). Siguiendo el volumen molar de un gas ( $22.4 \text{ L} = 1 \text{ mol}$ ) en un ml hay  $44.6 \mu$ moles, con lo cual se obtuvo la pendiente de la curva estándar (etileno  $m=0.0003703$ , etano  $m=0.0000784$ ) que fue utilizada como el factor de conversión de unidades de área del cromatógrafo a  $\mu$ moles de gas.

Para convertir los resultados de la cromatografía (área de los gases) a concentración en  $\mu$ moles se realizaron los siguientes cálculos:

$$\frac{\mu \text{ moles de etileno o etano}}{A} = \frac{(A * m)}{(FD * V)}$$

Donde:

A = área del pico del gas.

m = pendiente de la curva estándar.

FD = factor de dilución.

V = volumen de la cabeza de aire.

Posteriormente la concentración de  $\mu$ moles fue ajustada a  $1 \text{ m}^2/\text{-hora}$  de la siguiente manera:

$$\text{m}^2/\text{-h} = \frac{(\mu \text{ moles de etileno o etano} * 10000 \text{ cm}^2) / SA}{H.I}$$

Donde:

SA: área del cilindro de PVC.

H.I = horas de incubación.

Análisis estadísticos de la actividad de la nitrogenasa. Una vez obtenidos los datos de  $\mu\text{mol de C}_2\text{H}_x/\text{m}^2/\text{h}^{-1}$ , para cada muestra, estos datos fueron agrupados para su análisis por lugar de origen y temperatura, formando cuatro grupos: CC-30°C (Cuatro Ciénegas del jardín común de 30°C), VG-30°C (Valle de Guadalupe del jardín común de 30°C), CC-15°C (Cuatro Ciénegas del jardín común de 15°C) y VG-15°C (Valle de Guadalupe del jardín común de 15°C). Los datos de los controles secos se analizaron de manera independiente a las muestras húmedas. Para cada grupo se realizó un diagrama de caja

("box-plot") (*R*, versión 3.0.2) con el fin de visualizar el conjunto de datos e identificar valores atípicos ("outliers"), los cuales fueron eliminados para realizar los análisis estadísticos. Nunca se eliminaron más de dos valores atípicos por muestra, y en la mayoría de los grupos sólo se presentó uno.

Por simplicidad analítica y para tener más réplicas, al realizar los análisis estadísticos los resultados de las lecturas de ARA se organizaron en tres grupos. Cada grupo incluye dos eventos de medición de ARA. Específicamente los tres grupos corresponden con: TA=T0, TB=T1+T2, TC=T3+T4, TD=T5+T6 (ver Tabla 3.1) La distribución normal de los datos de  $\mu\text{mol de C}_2\text{H}_x/\text{m}^2/\text{h}^{-1}$  se corroboró mediante un gráfico cuantil-cuantil con programa *R* versión 3.0.2.

Para inferir si existían diferencias significativas en la reducción de acetileno para las CBS de la misma localidad entre los jardines comunes (30°C y 15°C respectivamente) se realizó una prueba t-student para dos muestras por cada tiempo, estableciendo p-valor  $\leq 0.05$ , para diferencias significativas.

*Análisis estadístico de la contribución relativa de la composición y las condiciones de incubación (temperatura) y la funcionalidad de las CBS.* Para determinar si el efecto del lugar de origen (como una aproximación de la composición), y la temperatura influyen la actividad de la nitrogenasa en las CBS a lo largo del tiempo se realizó una prueba de ANOVA de dos factores (o dos vías). Cada punto de medición de la función (ARA) (Tabla 2.1) en el tiempo se consideró independiente para el análisis estadístico. La prueba de ANOVA de dos vías, puede generar tres resultados diferentes que corresponden a los escenarios planteados por Reed & Martiny (H. E. Reed and Martiny 2007c); i) uno de los factores explica significativamente la varianza encontrada entre tratamientos, en este caso lugar de origen o temperatura, influye de manera significativa en la actividad de la nitrogenasa, ii) ambos factores explican significativamente la varianza encontrada entre tratamientos, en este caso el lugar de origen y la temperatura influyen de manera significativa en la actividad de la nitrogenasa, y iii) la interacción entre los factores, el lugar de origen y temperatura, influyen de manera significativa la actividad de la nitrogenasa. Cuando el tercer supuesto es significativo, el primer y segundo supuestos no son válidos para el análisis de los resultados. Para determinar diferencias significativas se estableció un p-valor  $\leq 0.05$ .

## IV. RESULTADOS

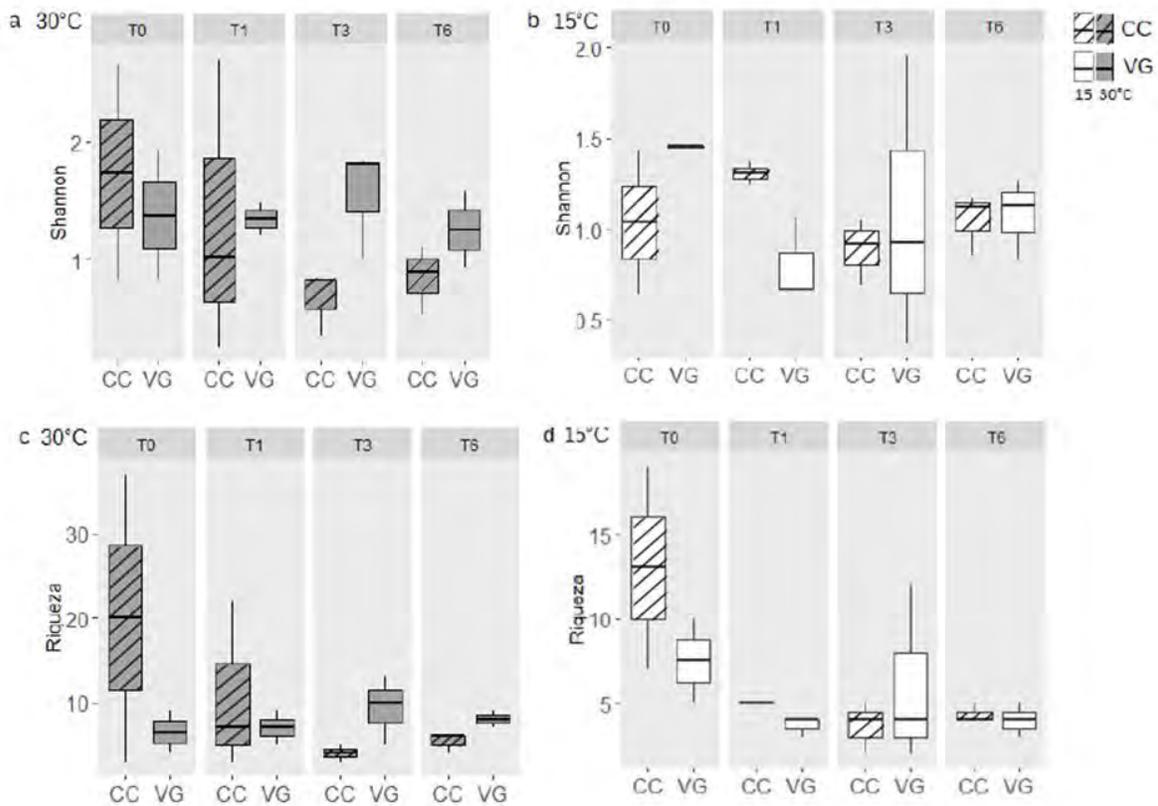
### 4.1. Diversidad y composición de comunidades microbianas diazotróficas

#### Diversidad Alfa ( $\alpha$ )

Para estimar la diversidad local (diversidad  $\alpha$ ) de los dos tipos de comunidades (CC y VG) en las distintas condiciones experimentales se calculó el índice de Shannon-Weaver (H) y la Riqueza (S) de TRFs (Terminal Restriction Fragments, por sus siglas en inglés), los cuales fueron considerados como OTUs . Cabe destacar que los análisis de diversidad para los controles, no tienen réplicas.

Los resultados de diversidad  $\alpha$  en cuanto al índice de Shannon- Weaver (H) varían en función del sitio de origen de la muestra, el tiempo y la temperatura de incubación. Por un lado, en el experimento de incubación a 30°C, las muestras de CC disminuyen en diversidad con el tiempo, en contraste con las muestras de VG cuya diversidad se mantiene constante a lo largo del experimento. Por otro lado, en el experimento de incubación a 15°C, ambos tipos de muestra (CC y VG) mantienen diversidad constante a lo largo del experimento, pero son las muestras de VG las que tienen mayor diversidad. En términos generales, es de notar que las muestras que conservan mayor diversidad a lo largo del experimento corresponden a aquéllas que se encuentran en temperaturas de incubación contrastantes con el desierto de origen (Tabla 3.1).

Los resultados de riqueza (S) son similares a los resultados obtenidos para el índice de diversidad. Por una parte, en el experimento de incubación a 30°C, son las muestras de CC las que disminuyen en riqueza con el tiempo, en contraste con las muestras de VG cuya riqueza se mantiene constante a lo largo del experimento. Por otro lado, en el experimento de incubación a 15°C ambos tipos de muestra (CC y VG) disminuyen su riqueza a lo largo del experimento, ninguna muestra en particular tiene mayor valor de riqueza (Figura 3.1). De manera general, se observa que los valores de riqueza en las muestras disminuyen en el tiempo del experimento sin importar las condiciones experimentales (Tabla 3.1).



**Figura IV.1** Representación gráfica de los valores del índice de Shannon-Weaver (H) y riqueza (S). Las barras negras representan la mediana. Las cajas se extienden hacia el cuartil superior y el cuartil inferior de los datos. Los paneles representan el tiempo de la caracterización de la comunidad. El eje Y representa los valores de H o S. Las etiquetas inferiores corresponden a las muestras de Cuatrociénegas (CC) y Valle de Guadalupe (VG). Los colores de las barras indican la temperatura de incubación: blanca corresponde a 15°C y gris corresponde a 30°C. Se utilizó una N=2 en el T0, y una N = 3 para los siguientes tiempos.

Tabla IV.1 Resultados del índice de Shannon-Weaver (H) y riqueza (S). La tabla muestra la media de H y S de las muestras de CC, Cuatrociénegas y VG, Valle de Guadalupe en las dos temperaturas de incubación en los tiempos del experimento.

Periodo experimental		T0		T1		T3		T6	
		H (±E.E)	S (±E.E)	H (±E.E)	S (±E.E)	H (±E.E)	S (±E.E)	H (±E.E)	S (±E.E)
Temp. de Incubación	Origen								
15°C	CC	1.0 (0.3)	13 (6.0)	1.3 (0.0)	5.0 (0.0)	0.8 (0.1)	4.0 (0.8)	1.0 (0.9)	4.0 (0.3)
	Control seco CC	0.8 (NA)	5.0 (NA)	1.1 (NA)	5.0 (NA)	0.9 (NA)	5.0 (NA)	0.4 (NA)	2.0 (NA)
	VG	1.4 (0.0)	7.0 (2.5)	0.8 (0.1)	3.0 (0.3)	1.0 (0.4)	6.0 (3)	1.0 (0.1)	4.0 (0.5)
	Control seco VG	1.4 (NA)	6.0 (NA)	1.4 (NA)	5.0 (NA)			1.8 (NA)	11 (NA)
30°C	CC	1.7 (0.9)	20 (17)	1.3 (0.7)	10 (6.0)	0.6 (0.1)	4.0 (0.5)	0.8 (0.1)	5.0 (0.6)
	Control seco CC	2.3 (NA)	33 (NA)	0.2 (NA)	3.0 (NA)	1.0 (NA)	5.0 (NA)	1.4 (NA)	7.0 (NA)
	VG	1.3 (0.5)	6.0 (2.0)	1.3 (0.1)	7.0 (2.0)	1.5 (0.2)	9.0 (2)	1.2 (0.3)	8.0 (1.0)
	Control seco VG	1.3 (NA)	7.0 (NA)			0.7 (NA)	3.0 (NA)	1.7 (NA)	12 (NA)

Para sacar la media de los valores se utilizó una N=2 para el T0 y una N=3 para los demás tiempos. Para el caso de los controles siempre se utilizó una N = 1. En el T1 para la muestra de Control seco VG a 15°C no se obtuvieron TRFLPs. En el T3 para la muestra de Control seco VG a 15°C no se obtuvieron TRFLPs.

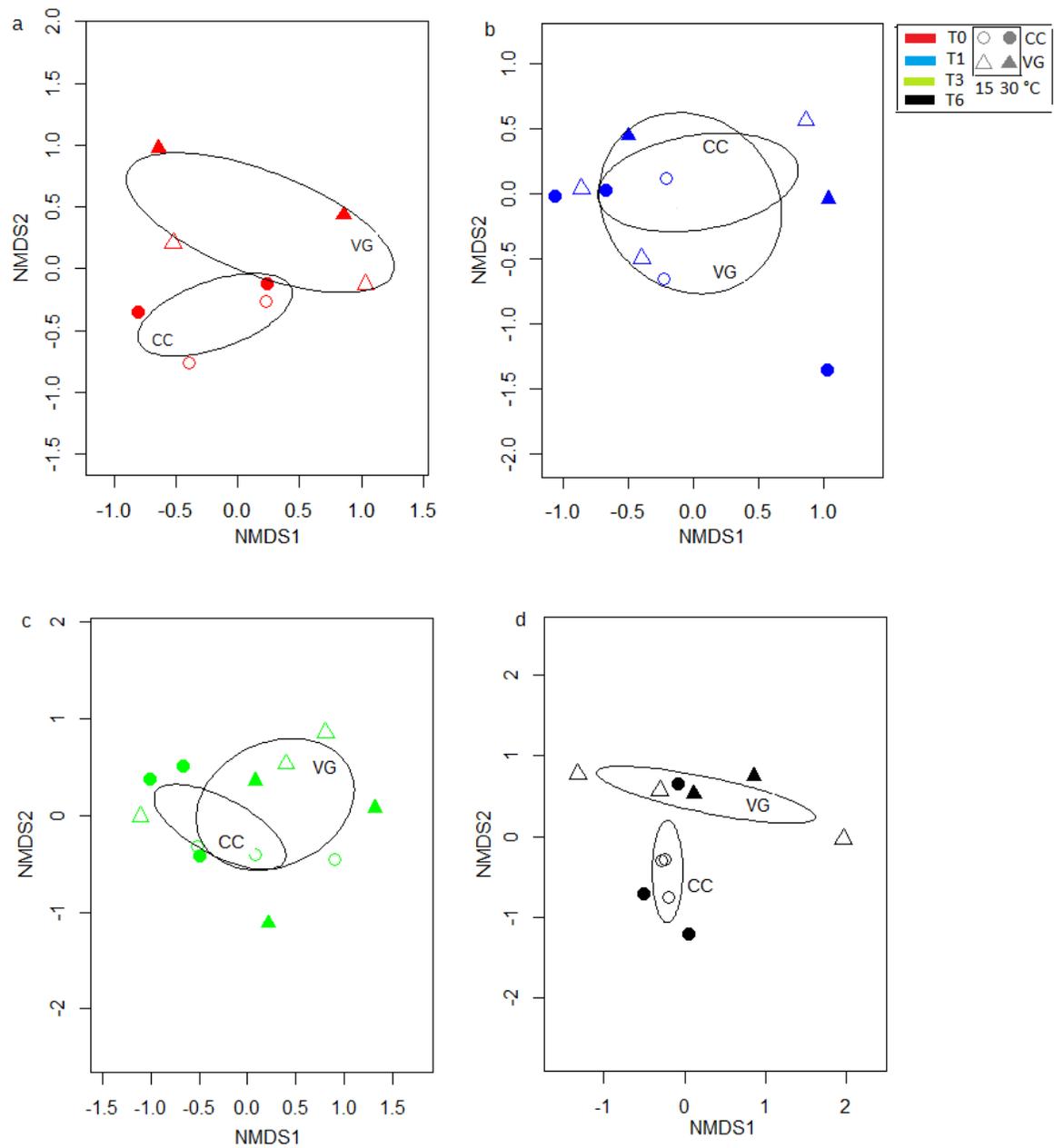
### Diversidad Beta (β)

#### Escalamiento multidimensional no métrico

Para comparar la similitud de composición en las comunidades diazotróficas incubadas en temperaturas contrastantes se utilizó un ordenamiento no métrico (NMDS) para cada uno de los tiempos en que se caracterizó la comunidad.

Los resultados muestran que la composición diazotrófica es diferente entre los tipos de desiertos y que aquellas muestras que tienen mayor similitud, en la mayoría de los tiempos, son aquellas que tienen el mismo lugar de origen. En el T0 se observa, aún con variación entre réplicas, la formación de dos agrupaciones. Estas agrupaciones corresponden a las muestras del desierto frío (VG) y de forma separada la agrupación de las muestras del

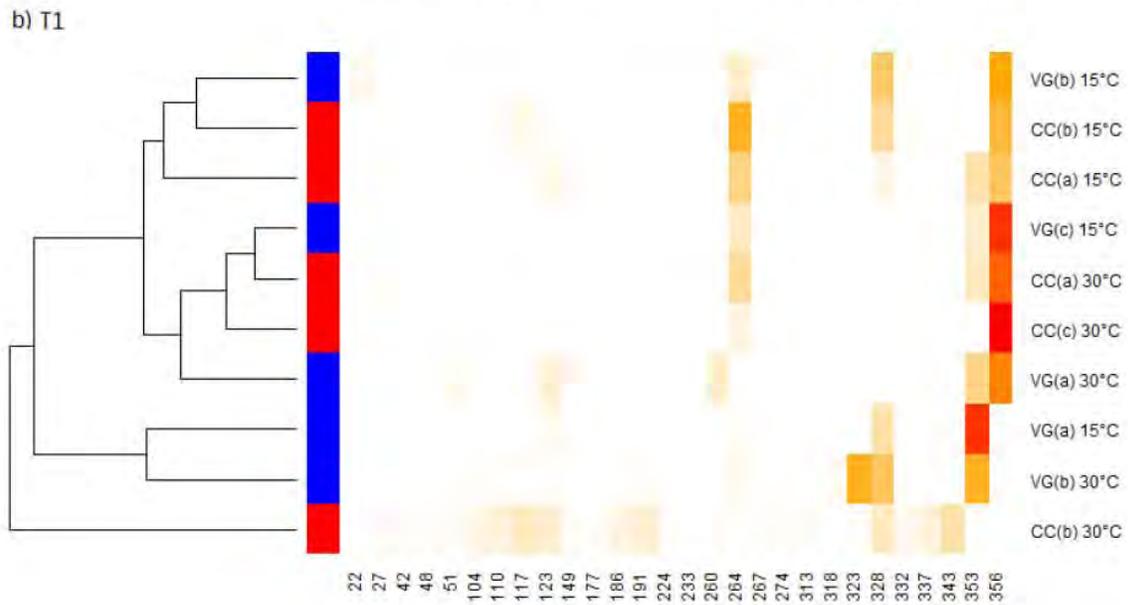
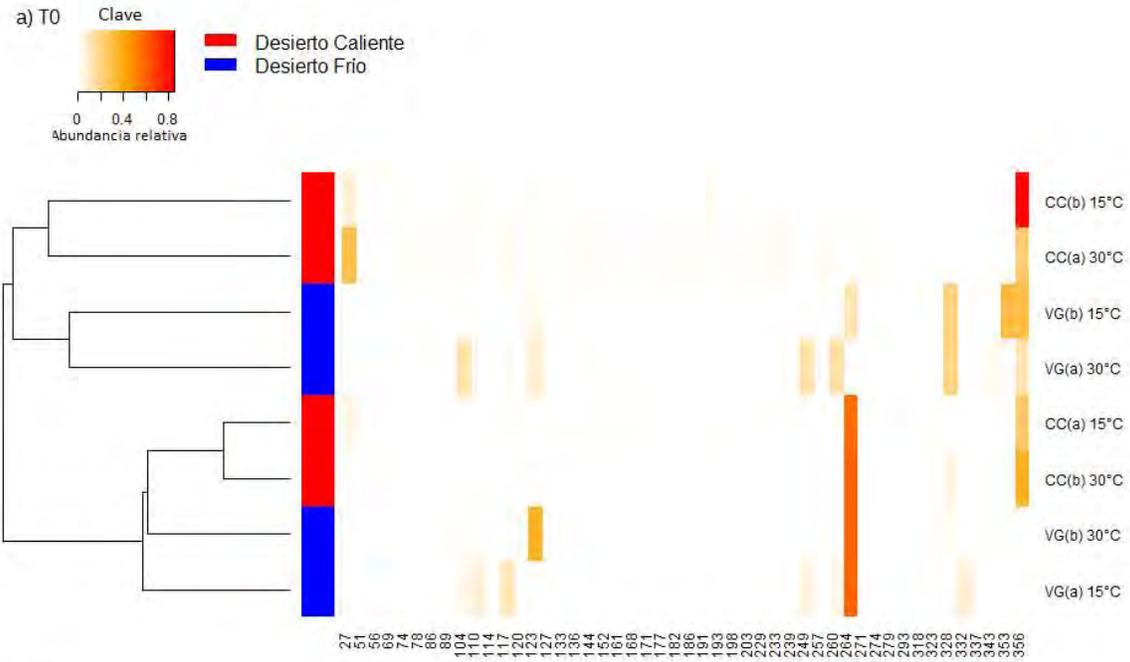
desierto caliente (CC) (Figura 3.2a). En el T1 la composición diazotrófica de las muestras cambia. En este tiempo no existe alguna agrupación por lugar de origen o temperatura de incubación (Figura 3.2b). No obstante, en los subsecuentes tiempos las muestras se vuelven agrupar por lugar de origen, siendo esto más evidente en el T6 (Figura 3.2, c-d). A pesar de que la composición de las comunidades diazotróficas es afectada por la temperatura de incubación, las muestras se agrupan principalmente por lugar de origen. De tal manera, que no se observa que diferentes comunidades diazotróficas (CC y VG) converjan en composición cuando están expuestas a un ambiente común.

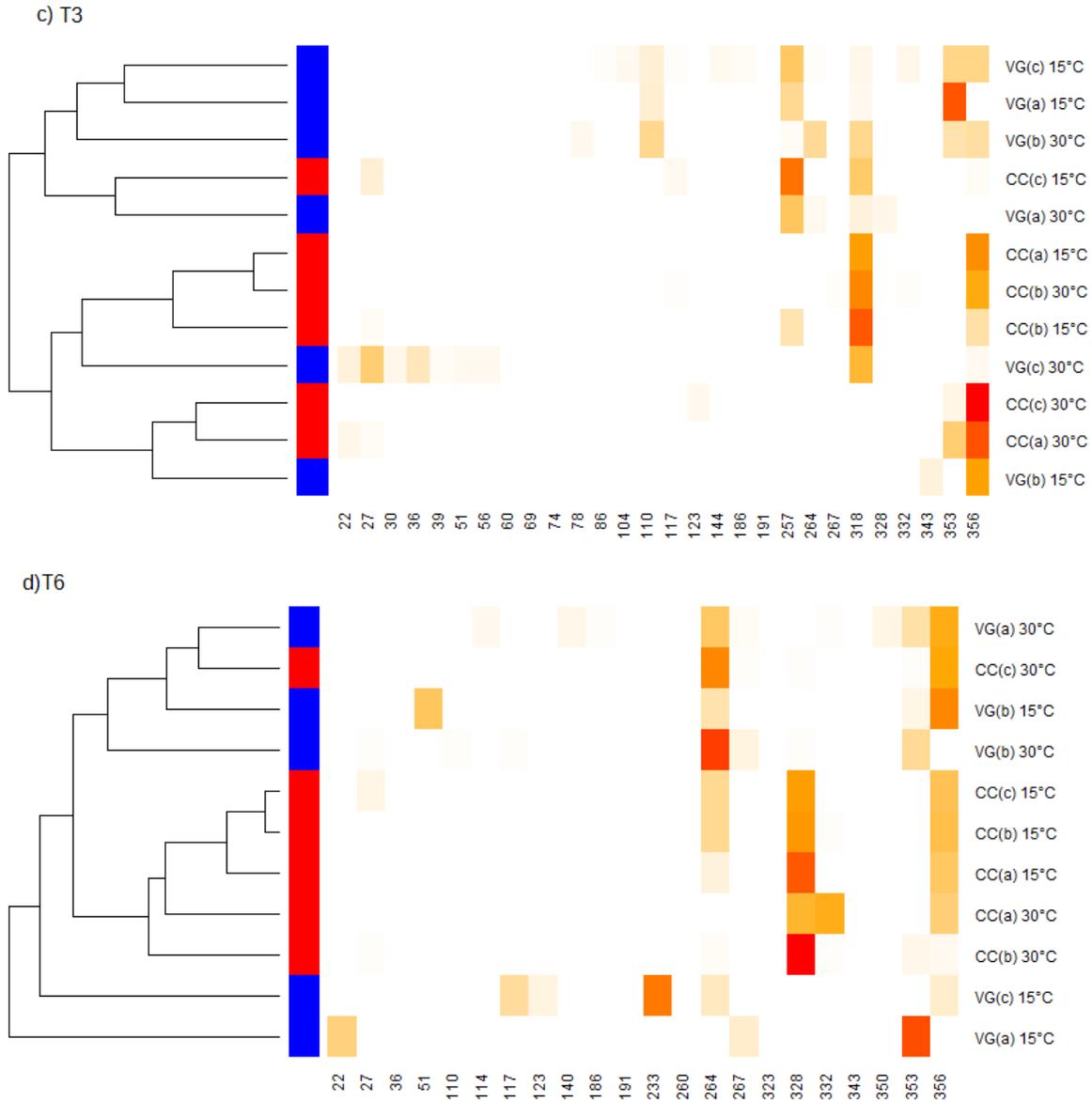


*Figura IV.2* Ordenación por similitud no métrica (NMDS) en la composición de las CBS. Las muestras que pertenecen al mismo tipo se muestran con elipses con un límite de confianza del 95 %. Los círculos representan a las muestras de Cuatrociénegas (CC), los triángulos representan a las muestras de Valle de Guadalupe (VG). El color sólido de las figuras representa la temperatura de incubación de 30°C, las figuras huecas representan la temperatura de incubación de 15°C. Los diferentes colores son los tiempos en que se caracterizó la comunidad diazotrófica. Stress 0.08.

### Composición de OTUs en comunidades diazotróficas

Se realizaron Heatmaps para visualizar la diferencia de OTUs que tienen los tipos de muestras (CC y VG). Los resultados destacan que la diferencia en la composición de las comunidades diazotróficas (CC y VG) es causado por diferencias en las abundancias relativas de determinados OTUs, así como también la presencia de OTUs únicos dentro de las muestras. El OTU de 264pb de longitud está presente en ambos tipos de muestra (CC y VG), no obstante, su abundancia no parece estar ligada ni al origen de las muestras ni a la temperatura. Por otra parte, el OTU de 356pb de longitud también está presente en todas las muestras, pero es más abundante en las muestras de VG. Los OTUs abundantes que son únicos en determinado tiempo del experimento para las muestras de CC son 27pb en el T0 (Figura 3.2a), 328pb en el T1 (Figura 3.2b), y 318 pb en el T3 (Figura 3.2c). Por otra parte, los OTUs abundantes que son únicos en determinado tiempo del experimento para las muestras de VG son 260pb, 249pb, 328pb en T0 (Figura 3.2a), 110pb y 257pb en T3 (Figura 3.2c). No se observó que la presencia y abundancia de algún OTU estuviera ligado únicamente a la temperatura. La mayoría de los OTUs abundantes estuvo ligado al tipo de muestra (CC y VG) y el tiempo en que se caracterizó la comunidad diazotrófica.



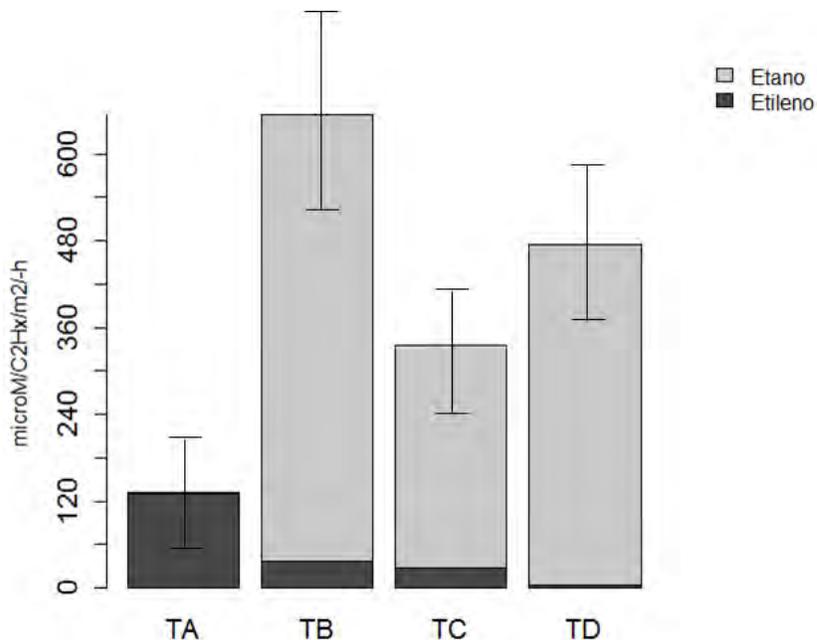


*Figura IV.3* Heatmap de abundancia relativa de OTUs. En la parte inferior se encuentra la longitud de los OTUs (TRF). Del lado izquierdo se representa el análisis de agrupamiento realizado por UPGMA con distancia de disimilitud de Bray-Curtis. Del lado derecho se encuentran las etiquetas de las muestras de Cuatrociénegas (CC) y Valle de Guadalupe (VG), las réplicas (a-c) y la temperatura de incubación en grados Centígrados (15°C y 30°C).

#### 4.2. Potencial de fijación de N<sub>2</sub>

Los resultados de ARA mostraron dos productos de la reducción de acetileno sin importar el tipo de desierto (CC y VG) ni las temperaturas de incubación. Al inicio del experimento

(TA; ver Tabla 2.1 de diseño experimental) el etileno fue el producto principal de la reducción de acetileno (Figura 3.4). En los subsecuentes tiempos (TB-TD) predominó la reducción de acetileno a etano (Figura 3.4). Para los análisis estadísticos se utilizó el producto etileno para el tiempo TA y para los tiempos TB-TD se utilizó el producto etano.



*Figura IV.4* Reducción de acetileno por las CBS. Las barras son la media  $\pm$  E.E (Error estándar) de la reducción de acetileno. Las barras oscuras representan la cantidad de etileno, y las barras claras representan la cantidad de etano. El eje Y corresponde a  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{h}^{-1}$  de reducción de acetileno. El eje X corresponde a las claves de los tiempos en que se realizó el ensayo de ARA donde TA = T0, TB= T1+T2, TC= T3 + T4, TD= T5 + T6. Para cada tiempo se utilizó una N=120.

Se realizó la prueba estadística de t-student para comparar la tasa de reducción de acetileno en las distintas temperaturas de incubación para cada tipo de muestra (CC y VG). Los resultados muestran que la tasa de reducción de acetileno se ve significativamente afectada por la temperatura de incubación. Las muestras de VG incubadas a 30°C tienen una tasa de reducción significativamente menor (excepto en TA) que las de VG incubadas a 15°C (Tabla 3.2, VG). Por otro lado, las muestras de CC incubadas a 30°C de manera general tienen una tasa de reducción mayor que las muestras de CC incubadas a 15°C, aunque las diferencias no son significativas en la mayoría de los tiempos en que se midió ARA (Tabla 3.2, CC).

*Tabla IV.2* Resultados de la prueba t-student para la tasa de reducción de acetileno de distintas CBS. La prueba se realizó en las muestras que provenían del mismo desierto (CC y VG) pero se encontraban en temperaturas contrastantes. Se utilizó un valor  $p < 0.05$  para diferencias significativas. La prueba se realizó para los productos de etileno (TA) y etano (TB-TD) se utilizó una  $N=22$ , para los controles se utilizó una  $N=1$ . La clave de los tiempos son las siguientes: TA=T0, TB=T1+ T2, TC= T3 +T4, TD= T5+T6.

Tiempo	TA Etileno (E.S)			TB Etano (E.S)			TC Etano (E.S)			TD Etano (E.S)		
	30 °C	15 °C	Valor p	30°C	15°C	Valor p	30°C	15°C	Valor p	30°C	15°C	Valor p
<i>Origen</i>												
CC	120 (21)	53 (19)	*0.0 3	399 (101)	543 (144)	0.4	354 (64)	272 (51)	0.31	443 (66)	410 (53)	0.7
<i>Control seco CC</i>	0 (102)	35 (35)	0.25	5.2 (1.5)	92 (58)	0.81	14 (7)	7 (5)	0.63	3 (1.3)	4 (0.7)	0.4
VG	216 (96)	127 (23)	*0.0 3	132 (43)	1373 (207)	*<.0 001	60 (11)	499 (103)	*0.0 001	260 (111)	768 (140)	*0.0 001
<i>Control seco VG</i>	135 (76)	108 (27)	0.6	8.6 (1.8)	2.6 (1.5)	*0.0 2	9.6 (5.8)	4 (1)	0.6	4 (0.6)	6 (0.8)	*0.0 008

\*Diferencias significativas.

Por otra parte se comparó la actividad de la nitrogenasa de los dos tipos de comunidades diazotróficas (CC y VG) incubadas a la misma temperatura. Los resultados mostraron que la tasa de reducción de acetileno fue diferente entre el TA y los demás tiempos. En el TA las muestras incubadas a 30°C tuvieron la mayor tasa de reducción de acetileno, particularmente fue mayor en las muestras de VG. En los siguientes tiempos (TB-TD) son las muestras de CC las que tienen mayor tasa de reducción en la temperatura de incubación de 30°C. Por el contrario, las muestras de VG son las que tienen la mayor tasa de reducción en la temperatura de incubación de 15°C. De esta manera, las muestras que tienen mayor tasa de reducción de acetileno son aquellas que se encuentran incubadas a la temperatura que emula la temperatura de su desierto de origen (Figura 3.5).

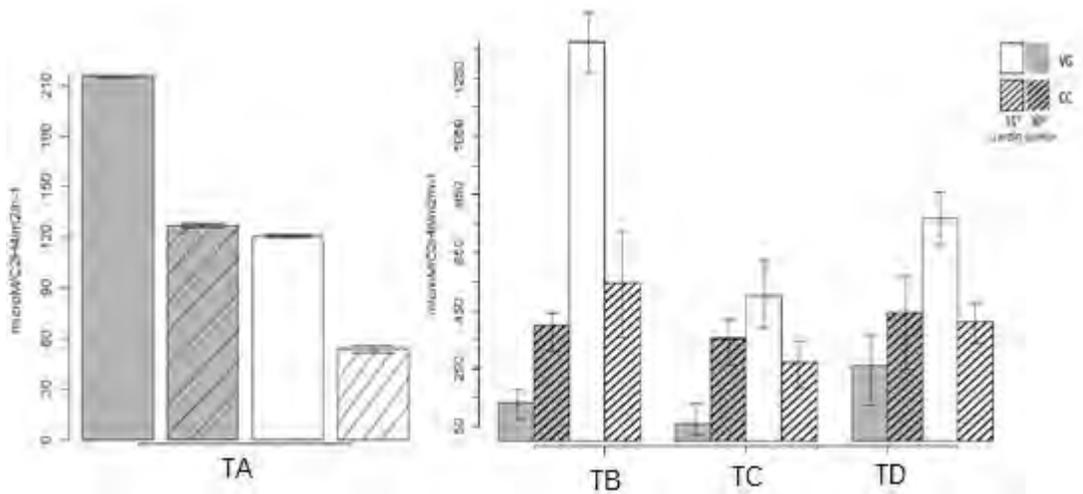


Figura IV.5 Actividad de la nitrogenasa por cada jardín común. Las barras representan la media de reducción de acetileno  $\pm$  E.E (Error estándar). En TA se graficó el producto etileno. En los siguientes tiempos TB a TD se graficó el producto etano. Las barras rayadas son las muestras provenientes de Cuatrociénegas (CC). Las barras lisas son las muestras provenientes de Valle de Guadalupe (VG). El color gris representa la temperatura de 30°C y el color blanco, la temperatura de 15°C. Se utilizó una N = 22 para cada jardín común. La clave de los tiempos son: TA=T0, TB=T1+T2, TC=T3+T4 TD=T5+T6.

Contribución relativa de la composición y las condiciones de incubación en la tasa de reducción de acetileno.

Se llevó a cabo un análisis ANOVA de dos factores (vías) para los datos de tasa de reducción de acetileno de las CBS con el fin de determinar la contribución relativa de la composición (lugar de origen) y la temperatura de incubación en el potencial de fijación de N<sub>2</sub>. Para el análisis de los primeros datos del experimento (TA) los resultados muestran que las diferencias en las tasas de reducción de acetileno entre muestras están significativamente explicadas por la composición y la temperatura de incubación pero no por su interacción. Conforme el experimento progresa, se observa que las diferencias en tasa de reducción de acetileno entre muestras está explicada principalmente por la interacción de los dos factores (origen y temperatura de incubación) (ver Tabla 3.3.). Es de notar que la capacidad que tienen las muestras para reducir el acetileno se ve afectada negativamente cuando se encuentran incubadas en la temperatura contrastante de su desierto de origen (Figura 3.6). Esta tendencia es muy marcada para las muestras que provienen del Valle de Guadalupe donde se ve afectada negativamente la actividad metabólica para las muestras incubadas a 30°C, por otro lado, las muestras incubadas a 15°C tienen mayor tasa de reducción de acetileno. En las muestras que proceden de Cuatrociénegas el efecto de la temperatura de incubación es más débil. En estas muestras a pesar de que sí son afectadas por la temperatura la diferencia en la actividad de reducción de acetileno no es tan evidente

(Figura 3.6). La tendencia gráfica que se observa en las muestras de Cuatrociénegas sustenta la hipótesis de que la actividad de la nitrogenasa para esta comunidad es influenciada principalmente por la composición más que por el ambiente.

Tabla IV.3 El efecto de composición (lugar de origen) y temperatura de incubación en la actividad de la nitrogenasa.

	<i>Tiempo</i>	<i>Origen</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Origen x Temperatura</i>
Actividad de la nitrogenasa	TA	$F_1= 14.8 p <0.001^*$	$F_1= 16.8 p <0.001^*$	$F_1= 0.75 p= 0.8$
	TB	$F_1= 4 P <0.05$	$F_1=26.1 P<0.001^*$	$F_1= 12.3 P<0.001^*$
	TC	$F_1= 0.041 p=0.8$	$F_1= 5.6 P<0.05$	$F_1= 12.6 P<0.001^*$
	TD	$F_1= 0.42 p=0.5$	$F_1= 7.4 P<0.01^*$	$F_1= 12.8 P<0.001^*$

\*Diferencias significativas  $p < 0.05$ . Se muestra el valor del estadístico F y el valor de p.

La clave de los tiempos es la siguiente: TA=T0, TB=T1+T2, TC=T3+T4, TD=T5+T6. Para realizar el análisis de ANOVA de dos factores se utilizó una N= 22.

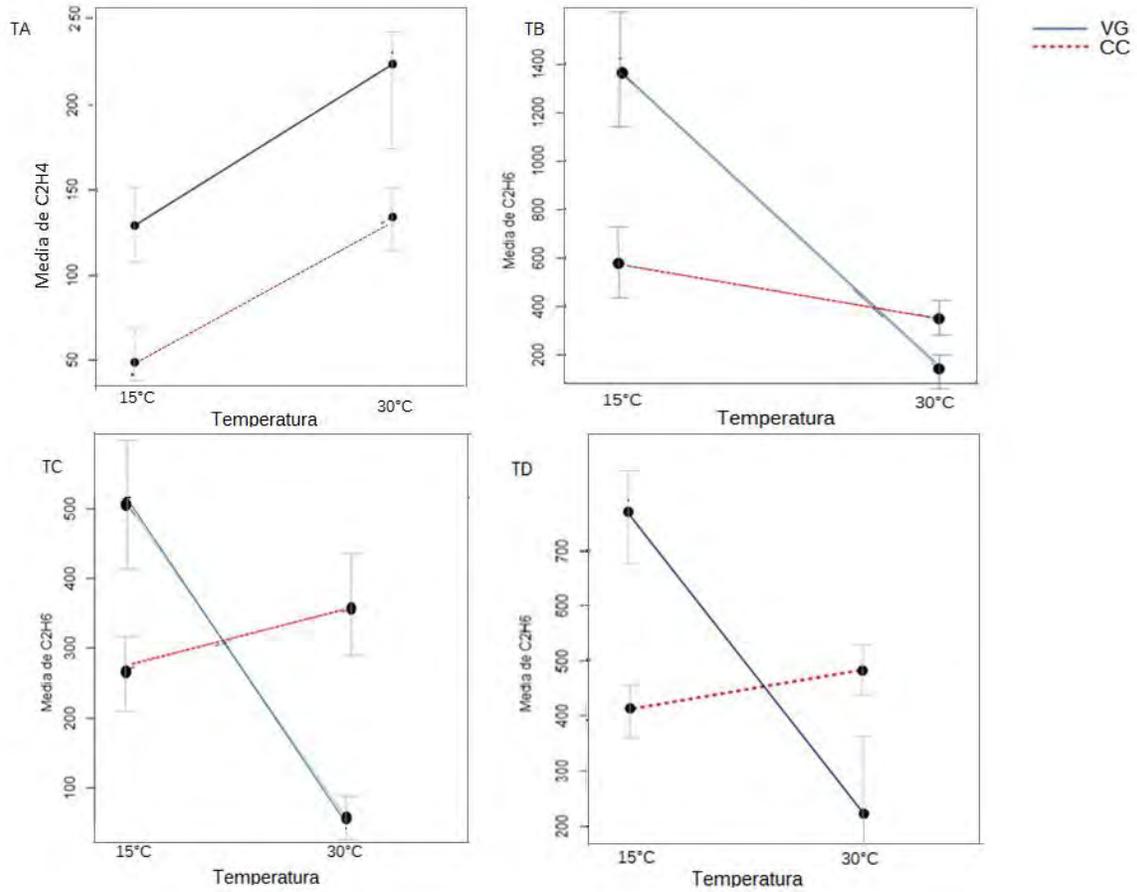


Figura IV.6 Medio de reducción de acetileno  $\pm$  E.E (Error estándar) por origen de las muestras y temperatura de incubación. CC: Cuatrociénegas, y VG: Valle de Guadalupe. Las líneas de color rojo conectan las muestras de CC en la temperatura semejante a su desierto de origen con la temperatura de 15°C. Las líneas de color azul conectan las muestras de VG en temperatura semejante a su desierto de origen con la temperatura de 30°C.

## V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos bajo el esquema de jardín común demuestran que la composición de las comunidades diazotróficas y las tasas de potencial de fijación de  $N_2$  son distintas entre CC y VG. La composición de las comunidades diazotróficas (CC y VG) se ve alterada por la perturbación térmica, pero mantiene identidad en relación con el desierto de origen. La aproximación de trasplantes recíprocos demostró que el potencial de fijación de  $N_2$  es resultado de la contribución relativa de la composición diazotrófica (relacionada con el sitio de origen) y su interacción con el ambiente (temperatura). De modo, que las comunidades diazotróficas disminuyen su tasa metabólica cuando están incubadas en la temperatura contrastante a su ambiente nativo.

### 5.1. La diversidad y riqueza filogenética de microorganismos diazotróficos de CBS cambia ante la perturbación térmica y en relación a su lugar de origen

Los resultados de diversidad y riqueza demuestran que la composición de las comunidades diazotróficas de las CBS, provenientes de dos desiertos de México, es diferente de acuerdo al tipo de desierto (caliente, CC; frío, VG), Siendo más diversas las muestras de CC que las muestras de VG incubadas a 30°C (Tabla 3.1, resultados de  $H'$  y  $S$ ). Trabajos previos realizados con comunidades de suelos de CC también han descrito una elevada diversidad ( $H'=2-7$ ) (Bonilla-Rosso et al. 2012b; López-Lozano et al. 2012). A pesar de que CC es un ambiente oligotrófico que tiene escasa disponibilidad de fósforo (P), en prácticamente todos los ambientes analizados se observa una considerable o alta diversidad filogenética de procariontes, esta diversidad ha sido adjudicada a la especialización que han tenido los microorganismos (i.e partición de nichos) debido a su limitada dispersión, plasticidad fenotípica para enfrentar las condiciones ambientales de este desierto, y la HGT (Horizontal Gene Transfer, por sus siglas en inglés) (Souza et al. 2012; Alcaraz et al. 2008; López-Lozano et al. 2012).

Independientemente de la diversidad original de las comunidades microbianas de cada uno de los desiertos estudiados, esta se ve afectada negativamente por la perturbación ambiental asociada a los cambios de temperatura. En particular, es de notar que la diversidad  $\alpha$  (medida como diversidad y riqueza) de las comunidades diazotróficas de ambos desiertos disminuye en la temperatura de incubación de 30°C, siendo particularmente susceptible la comunidad diazotrófica de CC. Mientras que en la temperatura de incubación de 15°C las comunidades diazotróficas tienden a tener más estables sus valores de diversidad, siendo más evidente en las muestras de VG. Para separar el efecto que tiene la humedad sobre las CBS del efecto de la temperatura de incubación se utilizaron controles secos (Tabla 2.1). Los valores de diversidad y riqueza de los controles también disminuyen para ambas comunidades diazotróficas (Tabla 3.1), particularmente en

la temperatura de incubación que es contrastante a la temperatura de su lugar de origen. Una probable explicación a esto es que a mayor temperatura aumenta el metabolismo, exigiendo un mayor suministro de nutrientes, que con el tiempo se agotan y con ello la tasa de crecimiento baja afectando la composición de la comunidad (Bradford 2013) y, posiblemente, disminuyendo la diversidad y haciendo más homogénea la comunidad de estudio. A pesar de que el patrón de cambios en la diversidad asociados a cambios en temperatura se observa también en los controles secos, cabe considerar que es posible que las observaciones sobre cambios en diversidad también sean influenciadas por la humedad impuesta en el experimento. Una evidencia de esto es el trabajo de Johnson y colaboradores (2012) donde observaron que la abundancia de cianobacterias de las CBS de Norte América disminuye cuando aumentan la frecuencia de precipitación sobre ellas a manera de perturbación durante 2 años (Johnson et al. 2012). Por lo tanto es posible sugerir que los cambios en diversidad observados en las CBS a humedad constante sean reflejo de la influencia simultánea de la temperatura y la humedad sobre las proporciones de microorganismos diazotróficos. El patrón obtenido de diversidad y riqueza de las comunidades diazotróficas de VG y CC, y estudios previos con otros modelos, contradice el supuesto de que las comunidades microbianas, debido a sus características biológicas, son resistentes y resilientes al enfrentar perturbaciones ambientales (Strickland 2009; Reed & Martiny 2013; Wood et al. 2015; Zelikova et al. 2012).

## 5.2. La composición de microorganismos diazotróficos en CBS es particular al desierto de origen

La Diversidad  $\beta$  (diferencia de composición entre las muestras) es considerable entre comunidades provenientes de distintos desiertos siendo particularmente evidente al inicio y al final del experimento. Que la composición de las comunidades diazotróficas de las CBS de México se agrupen por lugar de origen en el inicio del experimento (T0; Figura 3.2, Ordenación no métrica), muestra que el proceso de ensamblaje de ambas comunidades es resultado de la interacción entre factores históricos (límites de dispersión, procesos estocásticos, condiciones ambientales antiguas) y el ambiente actual (Martiny et al. 2006; Lindström & Langenheder 2012; Nemergut et al. 2013)

Adicionalmente, y en relación con el experimento de perturbación ambiental, es de notar que la diversidad  $\beta$  es elevada entre muestras provenientes de distinto origen y que se distinguen claramente por su origen al inicio y al final del experimento (Figura 3.2). No obstante, en los tiempos intermedios del experimento (T1= 10 días y T3= 90 días) no se observa un patrón claro en la agrupación de las muestras en el análisis de ordenamiento NDMS (Figura 3.2). Otros trabajos (Reed & Martiny 2013), usando trasplantes recíprocos de sedimentos (estuarino y salado), reportan que la similitud medida por NDMS en la composición microbiana es ambigua entre los sedimentos a los 7 días de iniciado el

experimento posiblemente atribuible al corto tiempo que las muestras han estado expuestas a su nuevo entorno, ya que a los 61 días del experimento, se identifican claramente las diferencias en composición entre tipo de sedimento. Así, en el caso particular del trabajo de esta tesis, la dificultad en distinguir las comunidades de distinto origen en los tiempos 1 y 2 puede ser debida a la falta de tiempo de adaptación al nuevo entorno, ya que conforme avanza el tiempo del experimento las muestras de las CBS son más similares entre sí cuando éstas provienen del mismo desierto.

A pesar de que la perturbación tiene un claro efecto sobre la estructura de la comunidad, comunidades distintas sometidas a las mismas condiciones ambientales, no convergen en composición (T6; figura 3.2), indicando un claro efecto histórico o de la composición original en el proceso de adaptación a las nuevas condiciones. Este patrón ha sido observado en otros trabajos publicados, como el de Steven y colaboradores (2015), en donde la composición microbiana de las CBS de Norte América no converge en composición ni en genes funcionales cuando son afectadas por distintas perturbaciones (físicas y ambientales) durante más de cinco años (Steven et al. 2015). Así mismo trabajos realizados con cianobacterias provenientes de distintos desiertos han demostrado que algunas cepas de cianobacterias están adaptadas a temperaturas específicas (Garcia-Pichel et al. 2013). Así como también que existen cepas de cianobacterias que podrían considerarse endémicas a determinadas regiones geográficas (Bahl et al. 2011). Por lo tanto, es probable que la estructura de las comunidades sea determinada por distintos factores no solamente ambientales o históricos. Sino que es el resultado de la interacción de distintos procesos estocásticos así como deterministas y la interacción que tienen los microorganismos con otras comunidades microbianas.

La principal diferencia entre la composición de las comunidades diazotróficas de CC y VG es la abundancia relativa de sus OTUs (Figura 3.3, Heatmap). A pesar de que ambas comunidades compartían OTUs, los OTUs dominantes eran distintos de acuerdo al origen de la comunidad diazotrófica. Patrones similares son observados en otros trabajos que comparan la composición diazotrófica de CBS que han sido expuestas a perturbación física contra aquellas que no sufrieron perturbación, en donde se demuestra que la abundancia relativa de cianobacterias formadoras de heterocitos es mayor en CBS no perturbadas (Yeager et al. 2004). Para el trabajo presentado en esta tesis, una de las posibles razones de no haber encontrado OTUs únicos en las comunidades diazotróficas puede ser estar asociada con limitaciones técnicas de la estrategia de T-RFLPs, en donde un fragmento (OTU) puede representar a varios filotipos (Dunbar et al. 2001; Dunbar et al. 2000; Blackwood et al. 2003). Otra razón, que no es independiente de la primera, es que algunos de los cambios en la composición de una comunidad sólo son notables en niveles taxónomicos más profundos (i.e especies) (Martiny 2015; Graham et al. 2016; Graham et

al. 2014). Por ejemplo, Garcia-Pichel y colaboradores (2013) encontró diferencias en la tasa de crecimiento de dos distintas cepas de cianobacterias a distintas temperaturas. Esta distinción se pudo observar a nivel de especie ya que ambas cepas de cianobacterias pertenecían al mismo género. Siendo *Microcoleus vaginatus* una cepa psicrotolerante y *Microcoleus steenstrupii*, termotolerante (Garcia-Pichel et al. 2013). No obstante, a pesar de las limitaciones intrínsecas de la técnica de TRFLP, ésta técnica permitió distinguir la composición de dos comunidades diazotróficas diferentes.

Con la finalidad de dar una aproximación de identidad filogenética a nuestros OTUs los comparamos con los OTUs obtenidos por Yeager et al (2004; 2012). Se pudo realizar esto debido a que utilizamos los mismos procedimientos metodológicos así como los mismos oligonucleótidos para la amplificación del gen *nifH* y la misma enzima de restricción. La probable identidad filogenética que se obtuvo para los TRF de las CBS de CC y VG es predecible ya que en su mayoría son del filum Cyanobacteria (Tabla 4.1) grupo taxonómico reportado como dominante en las CBS (Belnap 2004; Johnson et al. 2012; Yeager et al. 2012; Steven et al. 2015). Estos organismos considerados oligotróficos son capaces de mantener su metabolismo fotosintético en las duras condiciones climáticas de los desiertos (Makhalanyane et al. 2013). Debido a que poseen adaptaciones celulares que les permiten soportar las condiciones de estrés hídrico y de altas concentraciones de sal. Como mantener una proporción elevada de lípidos insaturados en su membrana permitiendo el movimiento activo antipor  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que permite que disminuya la concentración de sales del citosol (Makhalanyane et al. 2013). Así mismo pueden generar pigmento (sytonemina) que les permiten absorber la energía UV. Por ejemplo *Nostoc* es uno de los organismos que produce más este tipo de pigmentos en comparación de otras cianobacterias (Makhalanyane et al. 2013). Se ha determinado que las cianobacterias *Nostoc* y *Scytonema*, ambas formadoras de heterocistos, son abundantes en las CBS que son dominadas por líquenes y que tienen una tasa de fijación de  $\text{N}_2$  mayor que aquellas que solo son dominadas por la cianobacterias *Microcoleus sp* (Pietrasiak et al. 2013). No obstante, un reciente trabajo realizado por Ranney y colaboradores (2015) utilizan la técnica de DNA-SIP con  $^{15}\text{N}$  en las CBS para determinar la proporción que tienen las cianobacterias en la fijación de nitrógeno. Sus resultados muestran que otro tipo de bacterias heterotróficas como *Clostridium* tienen una relevante participación en la fijación de  $\text{N}_2$  inclusive más que las cianobacterias. Así también demuestran que los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *nifH* en el trabajo de Yeager, y éste, tienen un sesgo a amplificar más genes de cianobacterias que forman heterocistos (Pepe-Ranney et al. 2015). No obstante, para poder corroborar la identidad filogenética de los TRF de nuestras muestras es necesario utilizar métodos como secuenciación y poder determinar niveles filogenéticos más finos para observar las diferencias en composición que tienen estas dos comunidades diazotróficas (CC y VG).

Tabla 4.0.1 Comparación y potencial asignación filogenética de los TRF dominantes de las CBS de Cuatrociénegas y Valle de Guadalupe en cada tiempo que se caracterizó la comunidad diazotrófica con los TRF del trabajo de Yeager et al (2004) y Yeager et al (2012) que fueron obtenidos con una resolución filogenética de 97 % de similitud en secuencias. .

Caracterización de los diazotrófos	TRF (pb) Origen	TRF (pb) Yeager et al (2004; 2012)	Identidad filogenética
	CC		
T0	27	26	<i>Nostoc sp.</i>
T1	328	330	Cyanobacteria
T3	356	358	$\alpha$ -proteobacteria
	264	266	<i>Sytonema hyalinum</i>
T6	318	NP	Sin definir
	VG		
T0	260	NP	Sin definir
	249	250	<i>Nostoc sp.</i>
	328	330	Cyanobacteria
T3	356	358	$\alpha$ -proteobacteria
	264	266	<i>Sytonema hyalinum</i>
T6	110	NP	Sin definir

- NP = No está presente (Yeager et al. 2004; Yeager et al. 2012).
- CC; Cuatrociénegas. VG; Valle de Guadalupe.

### 5.3. El potencial de fijación de N<sub>2</sub> está relacionado con la composición y condiciones de origen de microorganismos diazotróficos de CBS.

Los resultados del potencial de fijación de N<sub>2</sub> comprueban la hipótesis que comunidades con distinta composición filogenética tienen distintas tasas de actividad funcional aun estando bajo el mismo ambiente artificial. La composición influye la tasa de potencial de fijación de N<sub>2</sub> (Figura 3.5). Durante el inicio del experimento TA (Figura 3.5) se observa que las muestras de VG tienen una mayor tasa de ARA en ambas temperaturas de incubación. Este resultado es inesperado debido a que al inicio del experimento fueron las comunidades de CC las que tuvieron mayor diversidad de OTUs diazotróficos que las muestras de VG (Figura 3.1). Una posible explicación a este resultado es que la actividad funcional de las comunidades microbianas de CC no solo se vea limitada por la disponibilidad de agua, sino que estén involucrados otro tipo de nutrientes indispensables como el C y P que son limitantes y están ligados íntimamente al ciclo del N (Vitousek et al. 2002; López-Lozano et al. 2012), y que dada la condición oligotrófica de los ambientes en CC, estas muestras estén más limitadas y su tasa metabólica sea menor. Avanzado el experimento de incubación en dos diferentes temperaturas (30°C y 15°C) tanto la composición como la tasa funcional cambian en función a la temperatura de incubación. Por ejemplo, en la temperatura de

incubación de 15°C la comunidad diazotrófica de CC mantiene bajo su potencial de fijación de N<sub>2</sub> en comparación con VG. Por el contrario, el potencial de fijación de N<sub>2</sub> de la comunidad diazotrófica de VG es menor cuando se encuentra incubada en la temperatura de 30°C en comparación con CC. Este comportamiento del parámetro funcional medido en las distintas comunidades se contrapone al supuesto que procesos metabólicos de microorganismos, sin importar su composición, responden directamente a factores ambientales. El trabajo de Langenheder et al. (2006) obtiene resultados similares a los nuestros donde comunidades microbianas obtenidas de distintos ecosistemas acuáticos mantienen diferentes tasas de respiración (Langenheder et al 2006). De modo que la composición filogenética de las comunidades microbianas tiene influencia en la tasa de actividad de la nitrogenasa. El que la composición influya sobre los procesos funcionales microbianos, también es evidencia que la estructura de estas comunidades estuvo sometida a presiones de selección de su hábitat de origen (Strickland et al 2009). De modo que los organismos que las componen pueden estar adaptados a factores ambientales específicos como la temperatura. Los resultados apoyan este supuesto (Tabla 3.2, Figura 3.6). Por ejemplo, las comunidades diazotróficas del desierto frío (VG) presentan una tasa funcional mayor a 15°C de temperatura. Por otra parte, las comunidades diazotróficas del desierto caliente (CC) presentan una tasa funcional mayor a 30°C de temperatura. Trabajos que obtuvieron resultados semejantes son los de Strickland y colaboradores (2009) y Keiser y colaboradores (2014). En ambos trabajos, se determinó la tasa de mineralización de C de comunidades microbianas expuestas a materia orgánica de su hábitat de origen y foránea, presentando siempre los mejores resultados (mayor tasa de mineralización de C) la combinación de comunidades microbianas y materia orgánica del mismo origen (Strickland 2009; Keiser et al. 2014). En conjunto nuestros resultados y evidencias de otros trabajos demuestran que comunidades microbianas distintas no son funcionalmente equivalentes y parecen existir adaptaciones locales.

Debido a que el diseño experimental en esta tesis sigue una aproximación de trasplantes recíprocos es posible probar de manera explícita la contribución relativa de la composición (origen), las condiciones ambientales y su interacción en la respuesta funcional de las comunidades microbianas de estudio. Concretamente, se ponen a prueba tres hipótesis o escenarios (Reed & Martiny 2007; Figura 1.1). El primero, la tasa potencial de fijación de N<sub>2</sub> depende únicamente de la composición de las comunidades microbianas. El segundo, la tasa potencial de fijación de N<sub>2</sub> depende únicamente de la temperatura. Tercero, la tasa potencial de fijación de N<sub>2</sub> es el resultado de la interacción entre la composición y la temperatura. Nuestros resultados apuntan hacia la tercera hipótesis, en donde el potencial de fijación de N<sub>2</sub> es resultado de la interacción de la composición (origen) así como de la temperatura. No obstante este resultado no es evidente durante los primeros días del experimento (TA) donde la tasa funcional es el resultado de la composición y la temperatura

pero no de su interacción (ver tabla 3.3; figura 3.6). De este modo parece que a mayor temperatura aumenta la tasa funcional y a menor temperatura disminuye, aunque de manera significativamente distinta entre comunidades con distinto origen (composición) (TA; Figura 3.6). Esto puede ser resultado del corto tiempo que las comunidades han estado expuestas a su nuevo ambiente y por lo tanto no han terminado de adaptarse. Así también esto puede ser reflejo de que los microorganismos pueden realizar adaptaciones fisiológicas inmediatas (mayor actividad enzimática) cuando cambian de un ambiente frío a uno cálido, principalmente (Bradford 2013). Por ejemplo, se ha reportado que la tasa de respiración de comunidades microbianas de suelo aumenta cuando la temperatura aumenta por un periodo de 7 días (Hagerty et al. 2014). De modo que el comportamiento que tiene la comunidad microbiana en los procesos metabólicos también está en función de la escala temporal. Avanzado el tiempo experimental el potencial de la tasa de fijación de  $N_2$  es afectado por la interacción entre el origen (composición) de las comunidades y la temperatura. De manera que la tasa funcional de las muestras de VG disminuye significativamente cuando se encuentran a la temperatura contrastante a su desierto de origen (TB; Figura 3.6). Entre los dos tipos de comunidades, VG es más susceptible al cambio de temperatura. Esto podría deberse a que los individuos que componen las comunidades de ésta localidad son menos resistentes a las perturbaciones. Por lo que se podría inferir que las condiciones ambientales del desierto de VG, la mayor parte del tiempo, son estables. En contraste, las comunidades procedentes del desierto de CC, a pesar de que disminuye su actividad en la temperatura de incubación que es contrastante a su hábitat este cambio no es significativo (Figura 3.6 TB, TC, TD). Esto puede tener dos posibles explicaciones. La primera es que los ambientes del desierto de CC son expuestos a constantes perturbaciones ambientales o mecánicas (Avitia et al. 2014), de modo que los individuos tienen un mayor rango de tolerancia al estrés que otro tipo de comunidades, así la composición es la que influye más en la tasa de fijación de  $N_2$  de lo que pueda influenciar el ambiente local. La segunda es que la comunidad microbiana de CC está fisiológicamente activa en temperaturas que tienen un amplio rango de 25°C hasta 40°C (Bonilla-Rosso et al. 2012), de tal manera que su rango de tolerancia a cambios en la temperatura es mayor y podría no ser afectada significativamente por la temperatura de incubación de 15°C (Tabla 3.1). No obstante, el potencial de fijación de  $N_2$  en las comunidades CC parece estar influenciado más por la composición que por la temperatura. En conclusión el potencial de fijación de nitrógeno es dependiente de la composición de las comunidades y la interacción que tienen con el ambiente. Por lo tanto es relevante reconocer que cambios en la composición de las comunidades microbianas debido a perturbaciones ambientales pueden alterar procesos con relevancia ecosistémica.

## VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

De manera general podemos concluir que las comunidades diazotróficas de dos tipos de desiertos (i.e frío (VG) y caliente (CC)) de México no son resistentes, resilientes o funcionalmente equivalentes ante perturbaciones ambientales. En específico al cambio de temperatura cuando las comunidades están metabólicamente activas. De manera particular podemos concluir que:

(i) las comunidades de CC y VG son sensibles a perturbaciones ambientales, independientemente de su diversidad.

(ii) la diversidad de las comunidades de CC y VG disminuye debido a los efectos de la perturbación térmica. No obstante, las comunidades de CC son más susceptibles.

(iii) las comunidades de CC y VG permanecen diferentes en composición filogenética siendo particular al desierto de origen y no convergen en su composición aun si están expuestas a condiciones ambientales similares por 180 días (Figura 3.2).

(iv) la potencial tasa de fijación de  $N_2$  es dependiente de la composición filogenética de las comunidades diazotróficas. Por lo tanto las comunidades de CC y VG no son funcionalmente equivalentes.

(v) la tasa potencial de fijación de nitrógeno es resultado de la contribución relativa de la composición diazotrófica y su interacción con el ambiente. Mostrando que las comunidades diazotróficas de CC y VG están adaptadas a la temperatura de su desierto nativo. Particularmente las comunidades del desierto de VG.

Por lo tanto cambios en la composición filogenética y en las condiciones ambientales pueden afectar procesos con relevancia ecosistémica. Los resultados de este trabajo se suman a la evidencia que las comunidades microbianas responden de manera diferente a las condiciones ambientales y no es del todo cierto que todas las comunidades microbianas sean resistentes, resilientes o funcionalmente equivalentes. De modo que cambios en la composición y la tasa funcional de las comunidades microbianas es resultado de la interacción entre el ambiente actual, y factores históricos. Estos datos demuestran que la composición microbiana es relevante en la tasa de fijación de  $N_2$ . No obstante, los resultados de este trabajo se deben de tomar con precaución debido a las limitaciones intrínsecas de las técnicas utilizadas y que los resultados son obtenidos bajo condiciones controladas de laboratorio.

### PERSPECTIVAS

A pesar de que los resultados obtenidos demuestran una clara relación entre la composición filogenética y la temperatura en el potencial de fijación de  $N_2$  es necesario realizar este

esquema experimental en condiciones de campo. En específico utilizar el enfoque experimental de trasplantes recíprocos que elimina el sesgo de crear un ambiente artificial. Esto permitirá obtener datos de la tasa funcional de las comunidades microbianas diazotróficas en condiciones naturales. Así también se debe emplear un esfuerzo para determinar la presencia de nutrientes esenciales como C, N y P al inicio y durante el experimento. Esto con la finalidad de encontrar factores, más allá de la disponibilidad de agua, que limiten las funciones de la comunidad. Además utilizar técnicas moleculares como DNA-SIP que permitan cuantificar la tasa de fijación de  $N_2$ , *in situ*, de las comunidades microbianas y al mismo tiempo permita reconocer filogenéticamente los microorganismos que participan en este proceso mediante técnicas de secuenciación. Esto con la finalidad de esclarecer cuales miembros de la comunidad microbiana son más influyentes en la fijación de  $N_2$  y cómo son afectados por una perturbación ambiental. Así también obtener datos sobre la parte activa de la comunidad microbiana mediante PCR-RT y PCR cuantitativa que corroborarán los resultados de DNA-SIP.

## APENDICE

### Extracción de DNA (purdy et al 2005)

#### Material necesario.

Todo el material deberá ser previamente esterilizado.

- Jeringas nuevas de 1 y 3 ml.
- Tubos Falcon con volumen de 50 ml, sus tapas respectivas deberán tener un orificio central donde entre bien el cuerpo de la jeringa.
- Fibra de vidrio.
- Pinzas de relojero y pinzas medianas.
- Puntas de micropipeta para volumen >500 µl cortadas de la parte inferior.
- Tubos para lisis de 1.5 o 2 ml.
- Tubos eppendorf de 2 ml.
- Perlas de vidrio 0.1 mm de diámetro.
- Hielo.
- Papel aluminio.

#### Soluciones químicas necesarias.

Todas las soluciones deben esterilizarse previamente por autoclave durante 1 hora.

- HTP (Hidroxiapatita, No. catálogo 130-0420, BioRad) rehidratado.
- Sephadex G-75 o G-50 (No. catálogo G75120, Sigma).
- Agua libre de DNA y RNAasa.
- Fosfato de sodio ( $\text{NaPO}_4$ ) a 120mM, pH 8 con 1 % (peso/volumen) de PVPP (Polivinilpolipirrolidona, No. catálogo 77627, Sigma), lavado previamente en ácido.
- TRIS equilibrado con Fenol, pH 8 (No. catálogo P4557, Sigma). Esta solución no se esteriliza.
- SDS al 20 % (Dodecilsulfato sódico, No. catálogo 05030, Sigma).
- Fosfato de sodio ( $\text{NaPO}_4$ ) a 120mM, pH 8
- Fosfato de sodio ( $\text{NaPO}_4$ ) a 120mM, pH 7.2
- Fosfato di-potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) a 300 mM, pH 7.2
- Acetato de Sodio a 3M.
- Etanol 100% frío, no se esteriliza.
- Etanol 70 % frío, no se esteriliza.

#### Método.

##### 1. Preparación de las columnas.

Las jeringas de 1ml serán para las columnas de HTP, y las jeringas de 3ml serán para las columnas de Sephadex. En ambos casos, se colocan las jeringas dentro de los tubos falcon con volumen de 50 ml (sin tocar los bordes del tubo) y se retira el pivote de la jeringa. Con las pinzas estériles se introducen la fibra de vidrio en las jeringas sin aguja, y se compacta con el pivote (el pivote no debe permanecer al aire libre mucho tiempo) hasta alcanzar un volumen de 0.25 ml en la jeringa (Fig. 2.3).

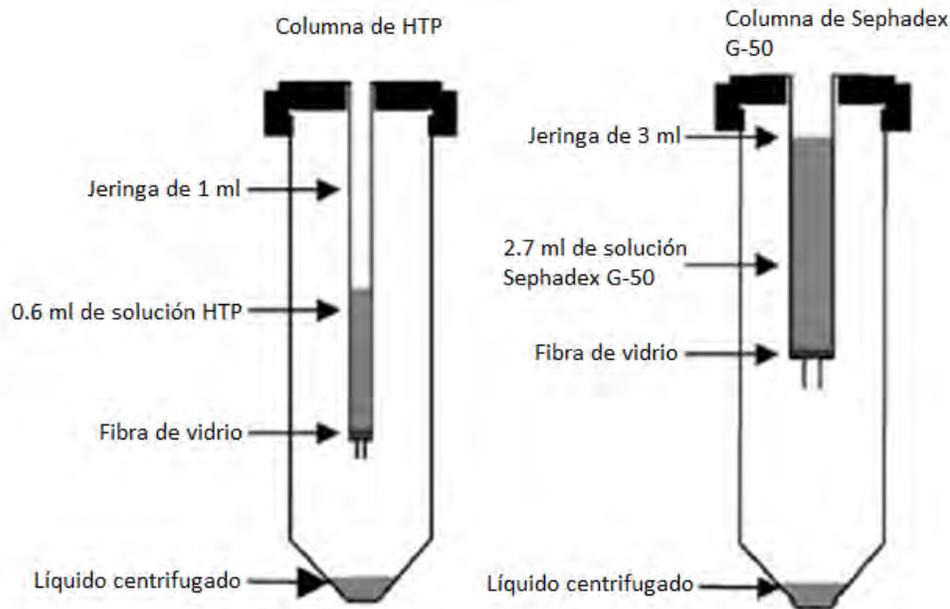


Figura 2.2.- Columnas para extracción de DNA. (1) columna de HTP; la primera flecha de arriba hacia abajo indica el volumen de la jeringa, la segunda indica el contenido de HTP y la tercera indica la fibra de vidrio compactada, la última flecha es el líquido de HTP que cae después de la centrifugación. (2) columna de Sephadex; la primera flecha de arriba hacia abajo indica el volumen de la jeringa, la segunda indica el contenido de Sephadex y la tercera indica la fibra de vidrio compactada, la última flecha es el líquido de Sephadex que cae después de la centrifugación. Imagen tomada de Purdy et al. 2005

El HTP debe ser ligeramente homogenizado pero sin agitar y con las puntas cortadas para micropipetas de  $> 500 \mu\text{l}$ , debe agregarse gota por gota dentro de la jeringa de 1 ml, evitando que se formen burbujas de aire, y si se llegan a formar estas, deben ser eliminadas. Una vez que la jeringa está llena se debe centrifugar a  $100 \text{ g}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 minuto. La solución de HTP debe ocupar un volumen de 0.6 ml en la jeringa, una vez alcanzado este volumen se tapan los tubos con papel aluminio hasta su utilización.

Las columnas de Sephadex (jeringas de 3ml) se preparan dentro de una campana de extracción para evitar la contaminación de la solución. Con puntas cortadas para las micropipetas de  $> 500 \mu\text{l}$  se vacía la solución de Sephadex (sin agitar) dentro de la jeringa hasta la máxima capacidad de la jeringa, posteriormente se centrifuga a  $1600 \text{ g}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 minutos. Se debe repetir el procedimiento hasta que la solución ocupe un volumen de 2.5 ml de la jeringa.

Posteriormente las columnas de Sephadex serán acondicionadas agregando  $400 \mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas dentro de la jeringa y centrifugar a  $1600 \text{ g}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 8 minutos, este paso se debe realizar tres veces en total. Una vez completado el acondicionamiento de las columnas de Sephadex se deben tapan con aluminio hasta su uso.

## 2. Lisis de la muestra

Se prepara un tubo de lisis eppendorf de 2ml al que se le agregara 0.5g de perlas de vidrio. Al tubo de lisis con las perlas de vidrio se agregan 0.5-1g de la muestra de suelo, y 750 µl de la solución fosfato de sodio a 120mM pH8 con PVPP al 1%, 500 µl de Tris-fenol equilibrado a pH 8 y 50 µl de SDS al 20 %. Las muestras así preparadas se someten a lisis mecánica en Tissue lysser (Qiagen, No. catálogo 85600), a 50 000 rpm por 30 segundos y posteriormente se incuban en hielo por 30s. La lisis mecánica e incubación en hielo se repite 2 veces.

Posterior a esto cada tubo de lisis se centrifuga a 20,000 g durante un minuto. La fase superior acuosa se colecta con mucho cuidado con micropipeta, no debe de tocarse la fase del fenol. De esta forma, la fase acuosa se añade a las columnas de HTP, para posteriormente centrifugar por 1 minuto a 100 g. Toda la fase acuosa debe pasar por la columna de HTP.

A la muestra sobrante del tubo de lisis se agrega 750 µl de fosfato de sodio a pH 8 y se coloca en el TissueLysser a 50 000 rpm por 30 segundos posteriormente se incuban 30 segundos en hielo. Se colecta la fase acuosa, sin tocar la fase del fenol. De esta forma la fase acuosa se añade a las columnas de HTP, para centrifugarlas nuevamente a 100 g por 1 minuto.

### 3. Purificación del DNA.

Una vez que toda la fase acuosa resultante de la lisis ha pasado por las columnas de HTP se lava esta columna con 500 µl de la solución fosfato de sodio a 120mM pH 7.2 y se centrifuga a 100 g durante 2-6 minutos (el tiempo necesario para que todo el líquido caiga) esto se realiza dos veces más. Dentro de estas columnas se coloca un tubo eppendorf de tal forma que en la siguiente centrifugación (elución de DNA) el líquido resultante caiga en su interior. Para la elución del DNA se agrega a las columnas de HTP 400 µl de la solución dipotasio de fosfato a 300 mM pH 7.2 y se centrifuga a 100g por 2-6 minutos (el tiempo necesario para que todo el líquido caiga).

El DNA eluido se agrega a las columnas de Sephadex, a las cuales se les deberá adaptar previamente un tubo eppendorf de tal forma que se reciba ahí el producto de la centrifugación. Posteriormente, se centrifugan a 1,600 g durante 8 minutos, el líquido resultante quedara dentro de los tubos eppendorf.

### 4. Precipitación del DNA.

La elución del DNA (resultado de la centrifugación de las columnas de Sephadex) está dentro del tubo eppendorf al que se le agregan 0.1 volúmenes de Acetato de Sodio a 3M y 2.5 volúmenes de etanol frío al 100 %. La mezcla se deja reposar a -20 °C toda la noche. El resultado de la incubación a -20°C se centrifuga a 13,000 g durante 10 minutos, se recupera el sobrenadante por aspiración y se coloca en un tubo eppendorf nuevo. Se agrega 1 ml de etanol frío al 70 % y se agita con ayuda de un vortex durante 10 segundos.

Finalmente, la mezcla se centrifuga a 13,000 g por 2 minutos, se quita el sobrenadante por aspiración y se deja secar el pellet en una campana aproximadamente por 30 minutos. El pellet de DNA es resuspendido con 50 µl de agua libre de nucleasa (Purdy 2005).

## Referencias

- Acinas SG, Sarma-Rupavtarm R, Polz MF, and Klepac-Ceraj V (2005) "PCR-Induced Sequence Artifacts and Bias : Insights from Comparison of Two 16S rRNA Clone Libraries Constructed from the Same Sample PCR-Induced Sequence Artifacts and Bias : Insights from Comparison of Two 16S rRNA Clone Libraries Constructed from the same sample. *Applied Environmental Microbiology* 71(12): 8966–8969"
- Alcaraz, LD (2014) "Pan-Genomics: Unmasking the Gene Diversity Hidden in the Bacteria Species." *PeerJ PrePrints*, 2014.
- Alcaraz, LD, Olmedo G, Bonilla G, Cerritos R, Hernández G, Cruz A, Ramírez E, et al (2008) "The Genome of *Bacillus Coahuilensis* Reveals Adaptations Essential for Survival in the Relic of an Ancient Marine Environment." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (15): 5803–8.
- Allison SD, and Martiny JB (2008) "Resistance , Resilience , and Redundancy in Microbial Communities" *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(Supplement 1), 11512-11519.
- Angel R, Pasternak Z, M. Soares M, Conrad R, and Gillor O (2013) "Active and Total Prokaryotic Communities in Dryland Soils." *FEMS microbiology ecology* 86 (1): 130–38.
- Arroyo P, de Miera LE, and Ansola G (2015) "Influence of Environmental Variables on the Structure and Composition of Soil Bacterial Communities in Natural and Constructed Wetlands." *Science of The Total Environment*. Elsevier B.V.: 380–90.
- Austin AT, Yahdjian L, Stark M, Belnap J, Porporato A, Norton U, Ravetta D, and Schaeffer MS (2004) "Water Pulses and Biogeochemical Cycles in Arid and Semiarid Ecosystems." *Oecologia* 141 (2): 221–35.
- Avitia M, Escalante AE, Rebollar EA, Moreno-Letelier A, Eguiarte LE, and Souza V (2014) "Population Expansions Shared among Coexisting Bacterial Lineages Are Revealed by Genetic Evidence." *PeerJ* 2, e696.
- Bahl J, Lau MCY, Smith GJ, Vijaykrishna D, Cary CS, Lacap DC, Lee CK, Papke TR, Warrenrhodes KA, et al (2011) "Ancient origins determine global biogeography Of Hot and Cold Desert Cyanobacteria." *Nature Communications* 2 (1), 163.
- Belnap J, and Eldridge D (2001) Disturbance and recovery of biological soil crusts. In *Biological soil crusts: structure, function, and management*: 363-383.
- Belnap J, Büdel B, and Lange OL (2001) *Biological soil crusts: characteristics and distribution* (pp. 3-30). Springer Berlin Heidelberg.
- Belnap J (2002) "Nitrogen Fixation in Biological Soil Crusts from Southeast Utah, USA." *Biology and Fertility of Soils* 35 (2): 128–35.
- Belnap J, Phillips SL, and Miller ME (2004) "Response of Desert Biological Soil Crusts to

- Alterations in Precipitation Frequency." *Oecologia* 141 (2): 306–16.
- Betancourt DA, Loveless TM, Brown JW, and Bishop PE (2008) "Characterization of Diazotrophs Containing Mo-Independent Nitrogenases, Isolated from Diverse Natural Environments." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (11): 3471–80.
- Blackwood CB, Marsh T, Sang-hoon K, and Paul E (2003) "Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities." *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2): 926–32.
- Bonilla-Rosso G, Peimbert M, Alcaraz LD, Hernández I, Eguiarte LE, Olmedo-Alvarez G, and Souza V (2012). "Comparative Metagenomics of Two Microbial Mats at Cuatro Ciénegas Basin II: Community Structure and Composition in Oligotrophic Environments." *Astrobiology* 12 (7): 659–73.
- Bowker MA, Maestre FT, and Escolar C (2010) "Biological Crusts as a Model System for Examining the Biodiversity–ecosystem Function Relationship in Soils." *Soil Biology and Biochemistry* 42 (3): 405–17.
- Bradford MA (2013) "Thermal Adaptation of Decomposer Communities in Warming Soils." *The Microbial Regulation of Global Biogeochemical Cycles*, 116.
- Büdel B, Darienko T, Deutschewitz K, Dojani S, Friedl T, Mohr KI, Salisch M, Reisser W, and Weber B (2009) "Southern African Biological Soil Crusts Are Ubiquitous and Highly Diverse in Drylands, Being Restricted by Rainfall Frequency." *Microbial Ecology* 57 (2): 229–47.
- Bullock SH (2003) "Seasonality, Spatial Coherence and History of Precipitation in a Desert Region of the Baja California Peninsula." *Journal of Arid Environments* 53 (2): 169–82.
- Cable JM, and Huxman TE (2004) "Precipitation Pulse Size Effects on Sonoran Desert Soil Microbial Crusts." *Oecologia* 141 (2): 317–24.
- Chamizo S, Cantón Y, Lázaro R, and Domingo F (2013) "The Role of Biological Soil Crusts in Soil Moisture Dynamics in Two Semiarid Ecosystems with Contrasting Soil Textures." *Journal of Hydrology* 489: 74–84..
- Collins SL, Sinsabaugh RL, Crenshaw C, Green L, Porrás-Alfaro A, Stursova M, and Zeglin LH (2008) "Pulse Dynamics and Microbial Processes in Aridland Ecosystems." *Journal of Ecology* 96 (3): 413–20.
- David KA, Apte SK, Banerji A, and Thomas J (1980) "Acetylene Reduction Assay for Nitrogenase Activity: Gas Chromatographic Determination of Ethylene per Sample in Less than One Minute." *Applied and Environmental Microbiology* 39 (5): 1078–80.
- Delgado-Baquerizo M, Maestre FT, and Gallardo A (2013) "Biological Soil Crusts Increase the Resistance of Soil Nitrogen Dynamics to Changes in Temperatures in a Semi-Arid

- Ecosystem." *Plant and Soil* 366 (2): 35–47.
- Delidow BC, John PL, Peluso JJ, and White BA (1993) "Polymerase Chain Reaction." *PCR protocols: current methods and applications*, 1-29.
- Douterelo I, Boxall JB, Deines P, Sekar R, Fish KE, and Biggs CA (2014) "Methodological Approaches for Studying the Microbial Ecology of Drinking Water Distribution Systems." *Water Research* (65): 134–156.
- Dunbar J, Ticknor LO, and Kuske CR (2000) "Assessment of Microbial Diversity in Four Southwestern United States Soils by 16S rRNA Gene Terminal Restriction Fragment Analysis Assessment of Microbial Diversity in Four Southwestern United States Soils by 16S rRNA Gene Terminal Restriction Fragment An." *Applied and Environmental Microbiology*, 2943–50.
- Eldridge D (2000) "Ecology and Management of Biological Soil Crusts : Recent Developments and Future Challenges. *The Bryologist*, 103(4), 742-747.
- Elliott DR, Thomas AD, Hoon SR, and Sen R (2014) "Niche Partitioning of Bacterial Communities in Biological Crusts and Soils under Grasses, Shrubs and Trees in the Kalahari." *Biodiversity and Conservation* 23 (7): 1709–33.
- Escalante AE, Eguiarte LE, Espinosa-Asuar L, Forney LJ, Noguez AM, and Souza VS (2008) "Diversity of Aquatic Prokaryotic Communities in the Cuatro Ciénegas Basin." *FEMS microbiology ecology* 65 (1): 50–60.
- Escalante AE, Barbolla LJ, Ramírez-Barahona S, and Eguiarte LE (2014) "The Study of Biodiversity in the Era of Massive Sequencing." *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85 (4): 1249–64.
- Fierer N, Bradford MA, and Jackson RB (2007) "Toward an Ecological Classification of Soil Bacteria." *Ecology* 88 (6): 1354–64.
- Fierer N, Lauber CL, Ramirez KS, Zaneveld J, Bradford MA, and Knight R (2012) "Comparative Metagenomic, Phylogenetic and Physiological Analyses of Soil Microbial Communities across Nitrogen Gradients." *The ISME Journal* 6 (5): 1007–17.
- Fierer N, Nemergut D, Knight R, and Craine JM (2010) "Changes through Time: Integrating Microorganisms into the Study of Succession." *Research in Microbiology* 161 (8): 635–42.
- Flynn D, Lin B, and Bunker D (2008) "Measuring Biological Diversity in R." *Environmental Science & Technology* 27 (1): 1–8.
- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, and Olsen GJ (2008) "Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8): 2461–70.
- Gaby JC, and Buckley DH (2012) "A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the nifH Gene of Nitrogenase." *PLoS ONE* 7 (7).

- Garcia-Pichel F, Loza V, Marusenko Y, Mateo P, and Potrafka RM (2013) "Temperature Drives the Continental-Scale Distribution of Key Microbes in Topsoil Communities." *Science*, 340 (6140): 1574–77.
- Graham EB, Knelman JE, Schindlbacher A, Siciliano S, Breulmann M, Yannarell A, Beman JM, et al (2016) "Microbes as Engines of Ecosystem Function: When Does Community Structure Enhance Predictions of Ecosystem Processes?" *Frontiers in Microbiology*: 1–10.
- Graham EB, Wieder WR, Leff JW, Weintraub SR, Townsend AR, Cleveland CC, Philippot L, and Nemergut DR (2014) "Do We Need to Understand Microbial Communities to Predict Ecosystem Function? A Comparison of Statistical Models of Nitrogen Cycling Processes." *Soil Biology and Biochemistry* 68: 279–82.
- Hagerty SB, Van Groenigen KJ, Allison SD, Hungate BA, Schwartz E, Koch GW, Kolka RK, and Dijkstra P (2014) "Accelerated Microbial Turnover but Constant Growth Efficiency with Warming in Soil." *Nature Climate Change* 4 (10): 903–6.
- Hardy RWF, Burns RC, and Holsten RD (1973) "Applications of the Acetylene-Ethylene Assay for Measurement of Nitrogen Fixation." *Soil Biology and Biochemistry* 5 (1): 47–81.
- Hartley A, Barger N, Belnap J, and Okin GS (2007) "Dryland ecosystems". In *Nutrient cycling in terrestrial ecosystems*: 271-307. Springer Berlin Heidelberg.
- Herridge DF, Peoples MB, and Boddey RM (2008) "Global Inputs of Biological Nitrogen Fixation in Agricultural Systems." *Plant and Soil* 311 (1-2): 1–18.
- Hill GT, Mitkowski NA, Aldrich-Wolfe L, Emele LR, Jurkonie DD, Ficke A, Maldonado-Ramirez S, Lynch ST, and Nelson EB (2000) "Methods for Assessing the Composition and Diversity of Soil Microbial Communities." *Applied Soil Ecology* 15 (1): 25–36.
- Hirsch PR, Mauchline TH, and Clark IA (2010) "Culture-Independent Molecular Techniques for Soil Microbial Ecology." *Soil Biology and Biochemistry* 42 (6): 878–87.
- Hu Y, Lee CC, and Ribbe MW (2012) "Vanadium Nitrogenase: A Two-Hit Wonder?" *Dalton Transactions*. 41 (4): 1118–27.
- Johnson SL, Kuske CR, Carney TD, Housman DC, Gallegos-Graves LV, and Belnap J (2012) "Increased Temperature and Altered Summer Precipitation Have Differential Effects on Biological Soil Crusts in a Dryland Ecosystem." *Global Change Biology* 18 (8): 2583–93.
- Kakirde KS, Parsley LC, and Liles MR (2010) "Size Does Matter: Application-Driven Approaches for Soil Metagenomics." *Soil Biology and Biochemistry* 42 (11): 1911–23.
- Keiser AD, Keiser DA, Strickland MS, and Bradford MA (2014) "Disentangling the Mechanisms Underlying Functional Differences among Decomposer Communities." *Journal of Ecology* 102 (3): 603–9.

- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, and Trevors JT. 2004. "Methods of Studying Soil Microbial Diversity." *Journal of Microbiological Methods* 58 (2): 169–88.
- Kuan HL, Fenwick C, Glover LA, Griffiths BS, and Ritz K (2006) "Functional Resilience of Microbial Communities from Perturbed Upland Grassland Soils to Further Persistent or Transient Stresses." *Soil Biology and Biochemistry* 38 (8): 2300–2306.
- Langenheder S, Lindström ES, and Tranvik LJ (2006) "Structure and Function of Bacterial Communities Emerging from Different Sources under Identical Conditions Structure and Function of Bacterial Communities Emerging from Different Sources under Identical Conditions." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (1): 212–20.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R, and Fierer N (2009) "Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale." *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), 5111-5120.
- Leigh JA (2000) "Nitrogen Fixation in Methanogens: The Archaeal Perspective." *Current Issues in Molecular Biology* 2 (4): 125–31.
- Li H, Colica G, Wu P, Li D, Rossi F, Philippis R, and Liu Y (2013) "Shifting Species Interaction in Soil Microbial Community and Its Influence on Ecosystem Functions Modulating." *Microbial Ecology* 65 (3): 700–708.
- indström ES., and Langenheder S (2012) "Local and Regional Factors Influencing Bacterial Community Assembly." *Environmental Microbiology Reports* 4 (1): 1–9.
- López-Lozano NE, Eguiarte LE, Bonilla-Rosso G, García-Oliva F, Martínez-Piedragil C, Rooks C, and Souza V (2012) "Bacterial Communities and the Nitrogen Cycle in the Gypsum Soils of Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila: A Mars Analogue." *Astrobiology* 12 (7): 699–709.
- Ludwig W (2007) "Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics and Identification." *International Journal of Food Microbiology* 120 (3): 225–36.
- Maestre FT, Bowker MA, Cantón Y, Castillo-Monroy AP, Cortina J, Escolar C, Escudero A, Lázaro R, and Martínez I (2011) "Ecology and Functional Roles of Biological Soil Crusts in Semi-Arid Ecosystems of Spain." *Journal of Arid Environments* 75 (12): 1282–91.
- Maier S, Thomas SB, Schmidt LZ, Peer T, Wagner V, and Grube M (2014) "Analyses of Dryland Biological Soil Crusts Highlight Lichens as an Important Regulator of Microbial Communities." *Biodiversity and Conservation* 23 (7): 1735–55.
- Makhalanyane TP, Valverde A, Gunnigle E, Frossard A, Ramond JB, and Cowan DA (2013) "Microbial Ecology of Hot Desert Edaphic Systems." *FEMS Microbiology Reviews* 39 (2): 203–21.
- Martiny JBH (2015) "Dispersal and the Microbiome." *Microbe Magazine* 10 (5): 191–96.
- Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH, Colwell RH, Fuhrman JA, Green JL, Horner-Devine

- MC, et al (2006) "Microbial Biogeography: Putting Microorganisms on the Map." *Nature Reviews Microbiology* 4 (2): 102–12.
- Strickland MS, Fierer N, and Bradford MA, Lauber C (2009) "Testing the Functional Significance of Microbial Community Composition." *Ecology* 90 (2): 441–51.
- Millineaux PM, Gallon JR, and Chaplin AE (1981) "Acetylene reduction (nitrogen fixation) by cyanobacteria grown under alternating light-dark cycles" *FEMS Microbiology Letters*,10, 245-247.
- Morillas L, and Gallardo A (2015) "Biological Soil Crusts and Wetting Events: Effects on Soil N and C Cycles." *Applied Soil Ecology* 94: 1–6.
- Muyzer G (1999) "Genetic Fingerprinting of Microbial Communities - Present Status and Future Perspectives." *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, (pp.1-10).
- Nannipieri PJ, Ascher MT, Landi CL, Pietramellara G, and Renella G (2003) "Microbial Diversity and Soil Functions." *European Journal of Soil Science* 54 (4): 655–70.
- Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T, Neill SPO, Bilinski TM, Stanish LF, Knelman JE, et al (2013) "Patterns and Processes of Microbial Community Assembly." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77 (3): 342–56.
- Noguez AM, Arita HT, Escalante AE, Forney LJ, García-oliva F, and Souza V (2005) "Microbial Macroecology : Highly Structured Prokaryotic Soil Assemblages in a Tropical Deciduous Forest," *Global Ecology and Biogeography*,14(3): 241-248.
- Rocha N, Cadillo-Quiroz UH, Rajeev UKL, Klitgord N, Dunn S, Truong V, et al (2015) "Isolation of a Significant Fraction of Non-Phototroph Diversity from a Desert Biological Soil Crust." *Frontiers in Microbiology* 6 (4): 1–14.
- Oksanen J (2008) "Vegan: An Introduction to Ordination." URL <http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vignettes/introvegan.pdf>.
- Pepe-Ranney C, Koechli C, Potrafka R, Andam C, Eggleston E, Garcia-Pichel F, and Buckley DH (2015) "Non-Cyanobacterial Diazotrophs Dominate Dinitrogen Fixation in Biological Soil Crusts during Early Crust Formation." *The ISME journal*, 10(2), 287-298
- Perroni Y, García-Oliva F, and Souza V (2014) "Plant Species Identity and Soil P Forms in an Oligotrophic Grassland–desert Scrub System." *Journal of Arid Environments* 108: 29–37.
- Pietrasiak NJ, Regus U, Johansen JR, Lam D, Sachs JL, and Santiago LS (2013) "Biological Soil Crust Community Types Differ in Key Ecological Functions." *Soil Biology and Biochemistry* 65: 168–71.
- Polz MF, and Cavanaugh CM (1998) "Bias in Template-to Product Ratios in Multitemplate PCR." *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10): 3724-3730.

- Pontes DS, Lima-Bittencourt CI, Chartone-Souza E, and Nascimento AMA (2007) "Molecular Approaches: Advantages and Artifacts in Assessing Bacterial Diversity." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34 (7): 463–73.
- Rastogi G, and Sani RK (2011) Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In *Microbes and microbial technology* (pp. 29-57). Springer New York.
- Reed HE, and Martiny JBH (2007) "Testing the Functional Significance of Microbial Composition in Natural Communities." *FEMS microbiology ecology* 62 (2): 161–70.
- Reed SC, Townsend AR, Cleveland CC, and Nemergut DR (2010) "Microbial Community Shifts Influence Patterns in Tropical Forest Nitrogen Fixation." *Oecologia* 164 (2): 521–31.
- Rehder D (2000) "Vanadium Nitrogenase." *Journal of Inorganic Biochemistry* 80 (1-2): 133–36.
- Reynolds JF, Reynolds JF, Smith DMS, Lambin EF, li BLT, Mortimore M, Batterbury SPJ, et al. 2009. "Global Desertification : Building a Science for Dryland Development" *Science*,316(5826): 847-851.
- Romero-Olivares AL, Baptista-Rosas RC, Escalante AE, Bullock SH, and Riquelme M (2013) "Distribution Patterns of Dikarya in Arid and Semiarid Soils of Baja California, Mexico." *Fungal Ecology* 6 (1): 92–101.
- Pierre RJ (2011) "Rich: An R Package to Analyse Species Richness." *Diversity* 3 (1): 112–20.
- Schütte UME, Abdo Z, Bent SJ, Shyu C, Williams CJ, Pierson JD, and Forney LJ (2008) "Advances in the Use of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analysis of 16S rRNA Genes to Characterize Microbial Communities." *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (3): 365–80.
- Schwinning S, and Sala OE (2004) "Hierarchy of Responses to Resource Pulses in Arid and Semi-Arid Ecosystems." *Oecologia* 141 (2): 211–20.
- Shade A, Peter H, Allison SD, Baho DL, Berga M, Bürgmann H, Huber DH, et al (2012) "Fundamentals of Microbial Community Resistance and Resilience." *Frontiers in Microbiology* 3 (12): 1–19.
- Smalla K, Wachtendorf U, Heuer H, Liu WT, and Forney L (1998) "Analysis of BIOLOG GN Substrate Utilization Patterns by Microbial Communities." *Applied and Environmental Microbiology* 64 (4): 1220–25.
- Souza V, Eguiarte LE, Travisano M, Elser JJ, Rooks C, and Siefert JL (2012) "Travel, Sex, and Food: What's Speciation Got to Do with It?" *Astrobiology* 12 (7): 634–40.
- Steven B, Gallegos-Graves LV, Belnap J, and Kuske CR (2013) "Dryland Soil Microbial Communities Display Spatial Biogeographic Patterns Associated with Soil Depth and Soil Parent Material." *FEMS microbiology ecology* 86 (1): 101–13.

- Steven B, Kuske CR, Gallegos-graves LV, and Reed SC (2015) "Distinct Biological Soil Crust Communities" *Applied and Environmental Microbiology* 64(4), 1220-1225.
- Su Y, Zhao X, Li A, Li X, and Huang G (2011) "Nitrogen Fixation in Biological Soil Crusts from the Tengger Desert, Northern China." *European Journal of Soil Biology* 47 (3): 182–87.
- Theron J, and Cloete TE (2000) "Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Community Structure in Natural Environments." *Critical Reviews in Microbiology* 26 (1): 37–57.
- Torsvik L, Ovreas V (2002) "Microbial Diversity and Function in Soil: From Genes to Ecosystems." *Current opinion in microbiology*, 5(3), 240-245.
- Torsvik V, Daae FL, Sandaa RA, and Øvrea L (1998) "Novel Techniques for Analysing Microbial Diversity in Natural and Perturbed Environments" *Journal of biotechnology*, 64 (1): 53–62.
- Vitousek PM, Cassman K, Cleveland C, Crews T, Field CB, Grimm NB, Howarth RW, et al (2002) "Towards an Ecological Understanding of Biological Nitrogen Fixation." *Biogeochemistry*, 57(1), 1-45.
- Wood SA, Almaraz M, Bradford MA, McGuire KL, Naeem S, Neill S, Palm CA, Tully KL, and Zhou J. 2015. "Farm Management, Not Soil Microbial Diversity, Controls Nutrient Loss from Smallholder Tropical Agriculture." *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Yeager CM, Kuske CR, Carney TD, Johnson SL, Ticknor LO, and Belnap J (2012) "Response of Biological Soil Crust Diazotrophs to Season, Altered Summer Precipitation, and Year-Round Increased Temperature in an Arid Grassland of the Colorado Plateau, USA." *Frontiers in Microbiology*, 3, 358.
- Yeager CM, Kornosky JI, Housman DC, Grote EE, Belnap J, and Kuske CR (2004) "Diazotrophic Community Structure and Function in Two Successional Stages of Biological Soil Crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2): 973–83.
- Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, and Steward GF (2003) "Minireview Nitrogenase Gene Diversity and Microbial Community Structure : A Cross-System Comparison" *Environmental microbiology*, 5(7), 539-554.
- Zelikova TJ, Housman DC, Grote EE, Neher DA, and Belnap J (2012) "Warming and Increased Precipitation Frequency on the Colorado Plateau: Implications for Biological Soil Crusts and Soil Processes." *Plant and Soil*, 355(1-2), 265-282.
- Zhou J, Xue K, Xie J, Deng Y, Wu L, Cheng X, Fei S, et al (2011) "Microbial Mediation of Carbon-Cycle Feedbacks to Climate Warming." *Nature Climate Change* 2 (2): 106–10.
- Zimmerman N, Izard J, Klatt C, Zhou J, and Aronson E (2014) "The Unseen World: Environmental Microbial Sequencing and Identification Methods for Ecologists." *Frontiers in Ecology and the Environment* 12 (4): 224–31.

