



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Maestría en Ciencias Agropecuarias

**Dinámica bacteriana del ciclo del nitrógeno en diferentes
sistemas de manejo agrícola**

T E S I S

(Idónea comunicación de resultados)
Que para obtener el grado de

Maestría en Ciencias Agropecuarias

Presenta

Eva Segundo Pedraza

Ingeniero Agrónomo

COMITÉ TUTORAL

Directora: Dra. Mariela Hada Fuentes Ponce
Codirector: Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa
Asesor: M.C. Luis Manuel Rodríguez Sánchez

Ciudad de México, D.F. 7 de junio de 2016

La Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco, pertenece al padrón de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de
Ciencia y Tecnología (Conacyt)

La presente investigación fue realizada en el:

Laboratorio de Biotecnología, Planta Piloto perteneciente al Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Laboratorio de Fisiología Vegetal perteneciente al Departamento de Producción Agrícola y Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

En el municipio de Cocotitlán localizado en la porción suroriental del Estado de México, coordenadas: 19° 12' 18" y 19° 14' 33" N y 98° 49' 46" y 98° 52' 52" O.

El autor fue Becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt)

La presente tesis fue financiada por el proyecto de Conacyt, para ciencia básica 2011, número 169056 denominado:

**“INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE SALUD DEL SUELO EN DIFERENTES
SISTEMAS DE MANEJO AGRÍCOLA”**

Y por el Programa Sierra Nevada Poniente (SNP) de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Así mismo agradecemos al Sr. José Guzmán por el préstamo de la parcela que fue utilizada como unidad experimental.

El jurado designado por la Comisión Académica de la Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco aprobó la tesis titulada:

**Dinámica bacteriana del ciclo del nitrógeno en diferentes
sistemas de manejo agrícola**

que presentó:

Eva Segundo Pedraza

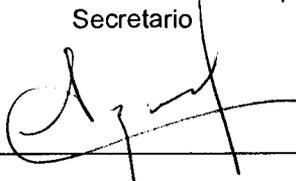
el día 7 de junio del año 2016

JURADO DE EXAMEN

Dr. Ana Laura Wegier Briuolo
Presidente



Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa
Secretario



M.C. Luis Manuel Rodríguez Sánchez
Vocal



ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIACIONES	iv
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO CONCEPTUAL	2
2.1 Ciclo biogeoquímico del N	2
2.1.1 Fuentes y formas reguladoras del N	3
2.1.2 Mineralización	4
2.1.3 Fijación biológica del N ₂ en suelo	5
2.1.4 Nitrificación	6
2.1.5 Desnitrificación	7
2.2. Microorganismos relacionados al ciclo del N	8
2.2.1 Microorganismos fijadores de N ₂	8
2.2.2 Microorganismos oxidantes de NH ₃	9
2.2.3 Microorganismos oxidantes de NO ₂ ⁻ y NO ₃ ⁻	11
2.2.4 Microorganismos desnitrificantes	12
2.3. Enzimas relacionadas al ciclo del N	12
2.3.1 Nitrogenasa	13
2.3.2 Amoníaco monooxigenasa (AMO)	14
2.3.3 Hidroxilamina oxidoreductasa (HAO)	15
2.3.4 NO ₂ ⁻ -oxidoreductasa	17
2.3.5 NO ₂ ⁻ -reductasa	17
2.3.6 NO ₃ ⁻ reductasa	18
2.3.7 NO reductasa	20
2.3.8 N ₂ O-reductasa	20
2.4 Efectos de los sistemas agrícolas sobre el ciclo del N	20
2.4.1 Labranza	20
2.4.3 Fertilización	21
2.4.4 Cultivos	22
2.4.2 Residuos orgánicos	23
2.5 Técnicas moleculares	23
2.5.1 Metagenómica	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
IV. OBJETIVOS	27
4.1 General	27
4.2 Específicos	27
V. HIPÓTESIS	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 Sitio de estudio y muestreo	28
6.2 Diseño experimental	28
6.3 Comunidad Bacteriana Asociada al Ciclo del Nitrógeno (CBN)	29
6.4 Diversidad bacteriana	29
6.5 Funcionalidad bacteriana	31
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
7.1 Composición de la comunidad bacteriana del suelo sometido a diferentes manejos agrícolas	32
7.2 CBN a nivel de especie en los diferentes sistemas de manejo agrícola	36
7.3 Estratificación de la CBN a nivel de género	36
7.3.1 CBN única	36
7.3.2 CBN común	39
7.3.3 CBN común a algunos de los sistemas de manejo agrícola estudiados	45
7.4 Clasificación de la CBN a nivel de filo	48
7.5 Categorías funcionales en el suelo de los diferentes sistemas de manejo agrícola	49
X CONCLUSIONES	57
XI LITERATURA CITADA	58
ANEXOS	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Enzimas involucradas en el proceso de desnitrificación.....	8
Cuadro 2. Clasificación de bacterias oxidantes de NH_3 y NO_2^-	11
Cuadro 3. Diferencias en la purificación de HAO entre bacterias	16
Cuadro 4. Características físico químicas del suelo del sitio de estudio para la producción de maíz nativo (<i>Zea mays</i> L.) en la zona oriente del Valle de México.....	28
Cuadro 5. Clasificación de 13 especies bacterianas con base en el tipo de metabolismo energético relacionado al ciclo del nitrógeno, identificadas a partir de gDNA de muestras de suelo con diferente manejo agrícola para la producción de maíz nativo (<i>Zea mays</i> L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014.	33
Cuadro 6. Géneros nuevos registrados después de la implementación de los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz (<i>Zea mays</i> L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México durante los ciclos 2013 y 2014.....	35
Cuadro 7. Comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno única obtenida de la secuenciación masiva y presente en los suelos de cada uno de los sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (<i>Zea mays</i> L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México, durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014.....	37
Cuadro 8. Géneros de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común con presencia continua e incrementos positivos en los suelos de cada uno de los sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (<i>Zea mays</i> L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México, durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014.....	39
Cuadro 9. Comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común a algunos de los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (<i>Zea mays</i> L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014; clasificada por categoría metabólica....	46
Cuadro 10. Relación de semejanza de la comunidad bacteriana común a algunos de los diferentes sistemas de manejo agrícola asociada al ciclo del nitrógeno en un suelo destinado para la producción de maíz nativo (<i>Zea mays</i> L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México.....	47
Cuadro 11. Miembros de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común a algunos de los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (<i>Zea mays</i> L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México con incrementos positivos en los periodos 2013-L vs 2014-L y 2013-S vs 2014-S.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del nitrógeno en suelos destinados a la agricultura.....	2
Figura 2. Ruta de la oxidación del amoníaco (NH ₃) modificado de Arp et al. 2001.....	7
Figura 3. Ruta de la transformación del nitrógeno catalizada por diferentes enzimas. Genes que codifican las enzimas nitrato reductasa (nas, euk-nr, narG, napA), nitrito reductasa (nir, nrf), óxido nítrico reductasa (norB), óxido nítrico reductasa (nosZ), nitrogenasa (nif), amonio monooxigenasa (amo), hidroxilamina óxido reductasa (hao) e hidracina hidrolasa (hh). Fuente: Canfield et al. 2010.....	13
Figura 4. Mapa de los loci de los genes para Amoníaco monooxigenasa (AMO). P= polipéptidos. Fuente: Arp et al. 2001..	15
Figura 5. Mapa de los loci de los genes para hidroxilamina óxido reductasa. P = polipéptidos. Fuente: Arp et al. 2001.	17
Figura 6. Organización comparativa de los genes entre <i>Pseudomonas</i> y <i>Paraccoccus</i> . El tamaño aproximado y la dirección transcripcional de los genes se dan por las cajas de flecha. Cuadros en blanco no tienen homólogos. Los genes estructurales de óxido nítrico reductasa nosZ: negro, nitrito reductasa nirS: gris, y óxido nítrico reductasa norCB: trama línea. Fuente: (Zumft, 1997).....	18
Figura 7. Mecanismo propuesto para la generación de fuerza motriz de protones del enlace redox por NARGHI y FndGHI. MQ: menaquinona, MQH ₂ : menaquinol, bD: grupo hemo b distal, bP: grupo hemo b proximal, FS: [Fe-S] cluster, Mo-bisMGD: cofactor de molibdeno. Fuente: Bertero 2003.	19
Figura 8. Representación esquemática de los distintos componentes celulares y las técnicas utilizadas en taxonomía bacteriana polifásico (adaptado de Vyamme et al. 1996a). Fuente: Brenner et al. 2005.	24
Figura 9. Diseño experimental para la producción de maíz nativo (<i>Zea mays</i> L.) en la zona oriente del Valle de México.	28
Figura 10. Confirmación de genes con base en el metabolismo energético del nitrógeno. Fuente: Kanehisa y Goto 2000.	30
Figura 11. Distribución de géneros de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del Nitrógeno presente en suelos de todos los diferentes sistemas de manejo agrícola con base en el metabolismo energético registrado en la base de datos KEGG y revisión de literatura.	34
Figura 12. Reclasificación de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno presente en suelo de todos los diferentes sistemas de manejo agrícola con base al metabolismo energético registrado en la base de datos KEGG y revisión de literatura.	34
Figura 13. Abundancia total de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno única de los diferentes sistemas de manejo agrícola implementados durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014 para la producción de maíz nativo (<i>Zea mays</i> L.) en el Municipio de Cocotitlán, Estado de México. ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvenses químicos, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.	39
Figura 14. Comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común comparado por época de lluvia. Abundancia relativa por género (A) y abundancia total por sistema (B). ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químicos, H= control de arvenses químicos, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.	41
Figura 15. Comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común comparado por época de seca. Abundancia relativa por género (A) y abundancia total por sistema (B). ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químicos, H= control de arvenses químicos, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.	42
Figura 16. Comunidad CBN asociada al ciclo del nitrógeno del ciclo común agrícola 2014-L vs 2014-S. Abundancia relativa por género (A) y abundancia total por sistema (B). ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químicos, H= control de arvenses químicos, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.	43
Figura 17. Comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común con incrementos positivos antes y después de la implementación de los diferentes sistemas de manejo agrícola. Abundancia relativa por género (A) y abundancia total por sistema (B). ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químicos, H= control de arvenses químicos, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.	44
Figura 18. Similitud de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común intermitente de los diferentes sistemas de manejo agrícola. ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M=	

monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena..... 45

Figura 19. Abundancia de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común a algunos de los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014. ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena..... 48

Figura 20. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema CTMO30r después de su implementación. CT= labranza convencional, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, 30r= con el 30% de residuos. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- 50

Figura 21. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema CTMQH-r después de su implementación. CT= labranza convencional, M= monocultivo, Q= fertilización química, H= control de arvense químico, -r= sin residuos. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- 50

Figura 22. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema ZTI0h+r después de su implementación. ZT= labranza mínima, I= intercalado, O= fertilización orgánica, h= control de arvenses no químico, +r= con residuos. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- 51

Figura 23. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema ZTROh+ra después de su implementación. ZT= labranza mínima, R=rotación, O= fertilización orgánica, h= control de arvenses no químico, +r= con residuos y a=avena. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- 52

Figura 24. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema ZTROh+rm después de su implementación. ZT= labranza mínima, R=rotación, O= fertilización orgánica, h= control de arvenses no químico, +r= con residuos, m= maíz. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- 53

Figura 25. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema ZTRQH+ra después de su implementación. ZT= labranza mínima, R=rotación, Q= fertilización química, H= control de arvense químico, +r= con residuos y a=avena. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- 54

Figura 26. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema ZTRQH+rm después de su implementación. ZT= labranza mínima, R=rotación, Q= fertilización química, H= control de arvense químico, +r= con residuos y m= maíz. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- 55

ABREVIACIONES

C	Carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
dS	decisiemens
kDa	kilo Dalton
HNO ₃	Ácido nítrico
mmol	mili mol
N	Nitrógeno
NI	Nitrógeno inorgánico
N _{org}	Nitrógeno orgánico
N _t	Nitrógeno total
N ₂	Nitrógeno molecular diatómico
N ₂ O	Óxido nitroso
NO	Óxido nítrico
NO _x	Óxidos de nitrógeno
NO ₂ ⁻	Nitritos
NO ₃ ⁻	Nitratos
NH ₄ ⁺	Amonio
NH ₃	Amoniaco
NH ₂ OH	Hidroxilamina
O ₂	Dioxígeno
pb	pares de bases
S	Azufre
TAE	Tris acetato EDTA
TOC	Carbono orgánico total
Tg	Teragramos
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La intensificación de la producción agrícola y el suministro de fertilizantes nitrogenados sintéticos, ha perturbado el equilibrio de diferentes ciclos biogeoquímicos, los cuales son determinados en gran medida por la acción de diferentes microorganismos. El propósito del presente trabajo fue conocer la diversidad y abundancia de bacterias asociadas al ciclo del nitrógeno en diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.). La unidad experimental se ubica en Cocotitlán, Estado de México (19°14'18.39" N y 98°52'21.42" O, 2 572 msnm). Las estrategias utilizadas para la producción de maíz nativo fueron: tipo de labranza: convencional (CT) y mínima (ZT), manejo de cultivo: rotación (R), monocultivo (M) e intercalado (I), fertilización: sintética (Q) y orgánica (O), control de malezas: sintética (H) y orgánica (h), incorporación de residuos (+r: más residuos, -r: sin residuos y 30r: 30% de residuos). En todos los sistemas se sembró maíz nativo chalqueño. Los cultivos a intercalar fueron calabaza, frijol y tomate. Los tratamientos fueron CTMO30r, CTMQH+r, ZTRQH+ra, ZTRQH+rm, ZTIOh+r, ZTROh+ra y ZTROh+rm. Antes de la implementación de los sistemas de manejo agrícola se realizó un muestreo y después del primer ciclo agrícola dos uno en época de lluvia y otro en época de seca para los años 2013 y 2014. Las muestras de suelo fueron colectadas de 0-10 cm de profundidad. Cada muestra de suelo fue lavada con una solución de pirofosfato de sodio al 0.15 M y buffer fosfato de sodio 0.15M. El DNA genómico (gDNA) fue extraído con el kit NucleoSpin® Soil. El rendimiento y pureza del gDNA se efectuó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). La calidad del gDNA se verificó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y visualizado en un iluminador de luz ultravioleta Image® Gel DocTM XR (BIO-RAD, USA). La amplificación de la región V4-V5 se realizó a partir del gDNA y los productos amplificados fueron secuenciados mediante Illumina MiSeq (Reserch and Testing Laboratory). La Comunidad Bacteriana del ciclo del Nitrógeno (CBN) de los suelos de todos los diferentes sistemas de manejo agrícola se distribuyó en 15 filos, 28 clases, 58 ordenes, 98 familias, 164 géneros y 13 especies. En los que se incluyeron fijadores de N (9%), desnitrificantes (4%) y algunos géneros con más de un tipo de metabolismo relacionado al ciclo del N (45.7%). Los sistemas con mayor diversidad fueron los sistemas con labranza mínima. La abundancia total en cada sistema disminuyó en el tiempo. En CBN común a los diferentes sistemas de manejo, el sistema ZTIOh+r fue abundante y el sistema ZTROh+ra el más diverso. En conclusión, la diversidad en los diferentes sistemas de manejo agrícola es variable, oscilante y su abundancia total disminuye en el tiempo. Los filos Proteobacteria, Actinobacteria fueron grupos predominantes en los diferentes sistemas de manejo agrícola. Los sistemas de manejo agrícola que incluyen prácticas de labranza mínima, intercalado y rotación intercalado de cultivos y aporte de residuos vegetales funcionalmente son más equilibrados que los sistemas convencionales.

I. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se han iniciado investigaciones sobre la microbiota del suelo para comprender su función, su intervención en los ciclos biogeoquímicos y como es perturbada por su ambiente y manejo en los agrosistemas. La microbiota del suelo varía estructural y funcionalmente dependiendo del tipo de suelo, el contenido de humedad, la temperatura, el pH, el oxígeno, los minerales y la vegetación. Anteriormente, hablar de su comportamiento en el contexto del suelo era complicado debido a que su estudio era posible siempre y cuando se aislaran bacterias cultivables. Con el surgimiento de las técnicas moleculares y en específico el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Polymerase Chain Reaction) se amplió la posibilidad de estudiar y con ello comprender el funcionamiento de la microbiota del suelo.

A pesar de esta ventaja, el hardware requerido para poder organizar, clasificar y comparar secuencias existentes con bases de datos que reúnen información de proteínas, genes, aminoácidos, ácidos grasos, rutas metabólicas y taxonomía de eucariontes y procariontes es costoso y aunado a ello, el personal capacitado para realizar este tipo de análisis es insuficiente.

Esto no ha impedido que áreas como la ecología, la biología, la medicina y ahora la agronomía utilicen estas herramientas para entender el comportamiento de microorganismos ya descritos o por conocer. En agronomía se han realizado estudios relacionados a los efectos de las prácticas de manejo como la labranza, la fertilización y el cultivo sobre la comunidad bacteriana. Es por ello que en esta tesis se plantea el uso de herramientas moleculares para facilitar el estudio de un ciclo biogeoquímico importante como lo es el ciclo del Nitrógeno (N).

La importancia del ciclo del N no radica únicamente en los requerimientos de los cultivos. Va más allá; de no existir, el nitrógeno fijado y transformado no pasaría a la cadena alimenticia de tal manera que ningún organismo podría existir a excepción de las bacterias, que se han adaptado a diferentes microambientes para obtener su fuente de energía.

Conocer la diversidad de bacterias del suelo asociadas al ciclo del N y su dinámica bajo diferentes sistemas de manejo, permitirá identificar si la comunidad bacteriana del suelo asociada al ciclo del N puede ser utilizada como un indicador de calidad en suelos destinados a la agricultura.

II. MARCO CONCEPTUAL

En las últimas décadas la agricultura ha recibido especial atención debido a que es una fuente de contaminación del agua subterránea ocasionada por la lixiviación de nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-), por las emisiones de gases de efecto invernadero, la degradación de suelos y con ello la pérdida de biodiversidad.

2.1 Ciclo biogeoquímico del N

El ciclo biogeoquímico del N (Figura 1) en la solución del suelo es mediado por la movilización e inmovilización de compuestos nitrogenados (Bock y Wagner 2006). Los procesos oxidativos y reductivos en el del ciclo biogeoquímico del N hacen posible las interconversiones de compuestos de N en fuente de energía metabólica (Bonete et al. 2008). Algunos de estos compuestos generados en las reacciones redox del ciclo de N son: el amoníaco (NH_3), la hidroxilamina (NH_2OH), el amonio (NH_4^+), el nitrito (NO_2^-), el nitrato (NO_3^-), el óxido nítrico (NO), el óxido nitroso (N_2O), ácido nitroso (HNO_2) y el ácido nítrico (HNO_3) entre otros.

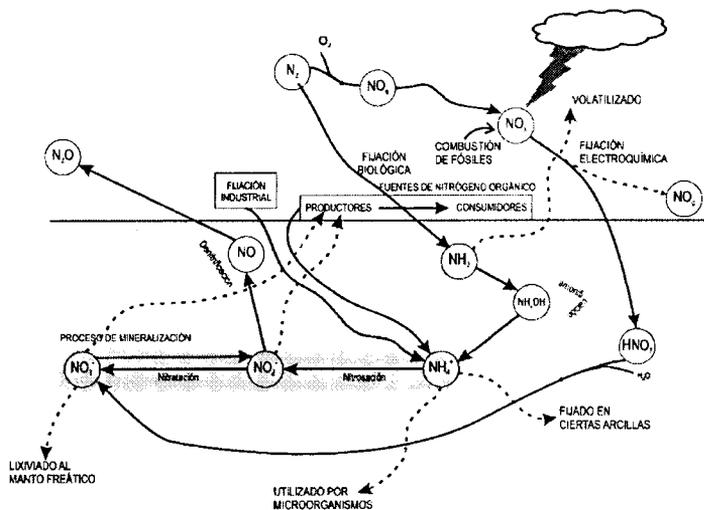


Figura 1. Ciclo del nitrógeno en suelos destinados a la agricultura.

El ciclo del N incluye tres procesos conocidos: la fijación biológica del N_2 , la nitrificación y la desnitrificación (Buresh et al. 2008, Wang et al. 2012). Cada uno de estos procesos, requiere la contribución de los numerosos microorganismos que se encuentran en el suelo (Wang et al. 2012). El ciclo del N es regulado por la mineralización, enzimas intra y extra celulares y las diferentes fuentes y formas de N.

2.1.1 Fuentes y formas reguladoras del N

Se ha empleado el concepto de "pool" (reservorio) para indicar la forma química y la localización del N en el suelo, la cual puede cambiar con el tiempo (Blackmer 2000). El tamaño de este pool depende de la dinámica del N (entradas y salidas), el cual está regido por diversos factores como: la entrada de residuos vegetales, restos de animales (Nitrógeno orgánico: N_{org}) y minerales (fertilización); las salidas, que dependen de la tasa de mineralización, el potencial de biomasa, las características edafoclimáticas y el manejo agrícola.

El Pool Húmico de N_{org} (PNH) es un material muy estable que está ligado a los elementos de los compuestos húmicos de alto peso molecular, forma uniones de alta energía, es difícil de atacar por la biomasa del suelo (tasa de mineralización $0.0003 \text{ kg} \cdot \text{año}^{-1}$) y muestra variaciones mínimas a largo plazo. Este tipo de N es el más abundante en el suelo, corresponde de un 60 a 90% del contenido de N total (N_t). El PNH se denomina pasivo, porque no aporta N directamente a la nutrición de los cultivos.

El Pool de N_{org} Lábil (PNL) puede ser utilizado totalmente por los cultivos el mismo año en el que se incorporan los residuos al suelo después del proceso de mineralización. El PNL representa menos del 1% del N_t . En los residuos aproximadamente el 30% del N es lábil. Los residuos de maíz contienen hasta $63 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$, de los cuales sólo $19 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ corresponden a un PNL. Para el caso de los residuos de trigo con menos N_t , $39 \text{ Kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$, $12 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ corresponden a un PNL.

En el Pool de N_{org} Estabilizado (PNE) es la fracción mineral (residuos vegetales aproximadamente 70% del N de los residuos de cosecha y restos de animales) que se estabiliza en el suelo. Con el tiempo esta fracción se mineraliza y sirve para la nutrición de los cultivos. El PNE representa aproximadamente el 40% del N_t (depende del manejo del agroecosistema).

El Pool de Nitrógeno Inorgánico (PNI) está constituido por NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- . De este pool las raíces extraen el N que requieren para su desarrollo. El N de este pool proviene de las fracciones del PNE y el PNL mineralizados por la biomasa y de la fertilización nitrogenada. La variación del PNI se debe al tiempo y el ritmo de absorción de N por los cultivos.

En los suelos agrícolas el amoníaco (NH_3) es derivado del N_{org} durante la desintegración y la mineralización de la biomasa. Su oxidación a NO_2^- aumenta la disponibilidad de N para las plantas (Szukics et al. 2012). Es tóxico para *Nitrosomona* y *Nitrobacter*.

El ión NH_4^+ es fijado en arcillas tipo 2:1, esto puede representar una reserva de N a mediano plazo, ya que ante cambios estructurales el elemento se libera.

El NO_2^- es tóxico para la microbiota del suelo, se encuentra en concentraciones bajas en ambientes aeróbicos y es acumulado en suelos con un alto contenido de agua (Bock y Wagner, 2006). Al hidratarse el NO_2^- forma HNO_2 y HNO_3 (compuestos que se encuentran en la lluvia ácida). Cuando las plantas o microorganismos no usan el NO_2^- o se encuentra en altas concentraciones puede lixiviarse al manto freático. De todos es conocido que consumir agua con alto contenido de NO_3^- o NO_2^- provoca problemas de salud (Bonete et al. 2008).

El NO_3^- es móvil y soluble en solución, es lixiviado hacia las aguas subterráneas antes de que los cultivos puedan utilizarlo y origina la contaminación de las mismas (Szukics et al. 2012). Es reducido a Nitrógeno atmosférico (N_2) en el proceso de desnitrificación (Arp et al. 2001) o reducido a NH_4^+ en un proceso conocido como desasimilación reductora del NO_3^- (Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium: DNRA) (Canfield et al. 2010). Además, es una fuente de N para la síntesis de compuestos orgánicos de N de las bacterias y en ausencia de oxígeno es utilizado como aceptor de electrones (Barton 2005, Canfield et al. 2010).

El Óxido nítrico (NO) es un gas incoloro y un radical soluble en agua ($1.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ a 25°C), rápidamente oxidado por Oxígeno (O) en varias reacciones químicas y biológicas (Bonete et al. 2008). Desde su descubrimiento en 1987 como mensajero vasodilatador, la comunidad biomédica ha reportado su participación en el sistema nervioso periférico y central, participa en los mecanismos de defensa en los microorganismos eucariontes y es un intermediario en el proceso de desnitrificación (Zumft 1993).

El Óxido nitroso (N_2O) es un gas de efecto invernadero (Zumft 1997; Bonete et al. 2008), que aporta alrededor del 57% del total de las emisiones mundiales anuales ($9 \text{ Tera gramos (Tg)} \cdot \text{año}^{-1}$) (Henry et al. 2006); es reactivo hacia la materia orgánica del suelo lo cual impide su transporte a la superficie del suelo eficazmente y tiene una vida corta en suelo (Yamulki y Jarvis 2002).

2.1.2 Mineralización

La mineralización es la conversión de N_{org} del suelo a NH_4^+ , se caracteriza por la descomposición anaeróbica que involucra a diferentes microorganismos y productos finales de la descomposición aeróbica.

El N regula la velocidad a la que se descompone la materia orgánica. Una alta concentración de N en el material fresco, se considera un signo de alta degradación. Sin embargo, la fuente de N genera diferentes cambios en la descomposición de la materia orgánica. Por ejemplo, el N sintético cambia la composición de la comunidad descomponedora, el amoníaco (NH_3) suprime la producción de las enzimas requeridas para la degradación de la lignina. Además, el NH_3 y los amino compuestos reaccionan con la materia orgánica para formar un material recalcitrante (Ågren et al. 2001).

Urea

Cuando la urea es adicionada al suelo es rápidamente hidrolizada formando iones de NH_4^+ y CO_2 . La ureasa es una enzima que se origina principalmente de plantas y microorganismos que se encuentran en el suelo, es la responsable de hidrolizar los fertilizantes basados en urea y se degrada rápidamente en el suelo por las enzimas proteolíticas. Esto sugiere que una fracción significativa de la actividad ureolítica en el suelo se lleva a cabo por la ureasa extracelular, que se estabiliza por inmovilización, los coloides orgánicos y minerales en el suelo (Das y Varma 2011).

La actividad de la ureasa en los suelos depende de muchos factores. Por ejemplo, el tipo de cultivo, el contenido de materia orgánica en el suelo, la profundidad del suelo, enmiendas (material para mejorar la estructura y composición) del suelo, los metales pesados y los factores ambientales como la temperatura. En general, la actividad ureasa se incrementa al aumentar la temperatura, es por ello que, se recomienda que la urea se aplique en momentos del día cuando las temperaturas son bajas (Das y Varma 2011).

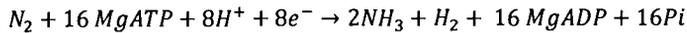
Los ácidos húmicos son macromoléculas polielectrolíticas originadas de la degradación química y biológica de residuos de plantas, animales y células microbianas. Tienen un rol importante en el ciclo del N.

2.1.3 Fijación biológica del N_2 en suelo

El N_2 no puede ser asimilado directamente por las plantas, está disponible a través del proceso de fijación biológica donde es reducido en NH_3 (Franche et al. 2009), la fijación atmosférica y la fijación industrial (Kraiser et al. 2011).

La fijación biológica promedio del nitrógeno en los ecosistemas terrestres es de 90-130 Tg \cdot año⁻¹ (Wartianen et al. 2008). En la fijación biológica, la reacción es catalizada por la enzima nitrogenasa que se encuentra sólo en ciertos procariotas (Day et al. 2001, Franche

et al. 2009). La reducción neta del N_2 a NH_3 generalmente se explica por la siguiente ecuación: (Barton 2005, Franche et al. 2009):



En la fijación endosimbiótica, las plantas hospederas producen y exudan flavonoides en la rizósfera. Estas señales pueden ser percibidas por un receptor específico (factor nod) de las bacterias formadoras de nódulos. El factor nod induce la formación de nódulos en la raíz de la planta y desencadena una serie de reacciones que conducen a una infección y la formación en un primordium (Franche et al. 2009). Las células infectadas producen bacteroides. Dentro de los nódulos, los bacteroides fijan N_2 atmosférico en NH_3 que sirve como una fuente de N para el hospedero a cambio de carbono (Day et al. 2001).

La fijación simbiótica asociativa se refiere a una amplia variedad de especies fijadoras de nitrógeno que colonizan la superficie de la raíz de las plantas no leguminosas, sin la formación de estructuras diferenciadas (Franche et al. 2009).

2.1.4 Nitrificación

En el suelo, el proceso de nitrificación incluye dos rutas: la nitrificación autotrófica y la nitrificación heterotrófica. El término nitrificación heterotrófica es utilizado para indicar la oxidación de N_{org} a NO_3^- (Zhang et al. 2015). Mientras que la nitrificación autotrófica es la oxidación de NH_3 a NO_3^- .

La oxidación del NH_3 a NO_2^- es el primer paso en el proceso de nitrificación (Fernández-Guerra y Casamayor 2012). Este proceso se lleva a cabo por las acciones secuenciales de la enzima amoniaco monooxigenasa (AMO), que oxida al NH_3 a hidroxilamina (NH_2OH) (ecuación 1) y la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO), que oxida a la NH_2OH en NO_2^- (ecuación 2) (Arp et al. 2001, Beaumont et al. 2002, Barton 2005) (Figura 2). Los electrones y protones generados durante la oxidación del NH_4^+ y NO_2^- son usados por diferentes microorganismos para fijar el C inorgánico en ausencia de luz (Canfield et al. 2010).

Existe una oxidación anaeróbica del NH_3 , la cual ha sido confirmada en condiciones *in-vitro*. El proceso es realizado por bacterias del género *Planctomyces* y en organismos no cultivados de la familia Crenarchaeota (Juniper 2010).

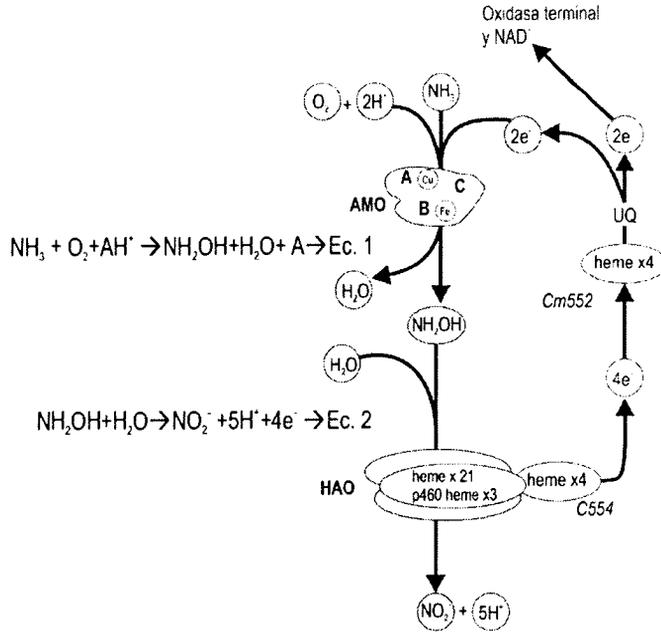
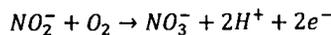


Figura 2. Ruta de la oxidación del amoníaco (NH₃) modificado de Arp et al. 2001.

La oxidación de NO₂⁻ a NO₃⁻ es generada por la siguiente reacción (Barton 2005):



La nitrificación es regulada por la concentración de NH₄⁺, la temperatura, la humedad y el oxígeno. Los compuestos inhibidores que retrasan la oxidación bacteriana de NH₄⁺ son la nitrapirina, la dicyamida (DCD) y 3,4-dimetil pirazol fosfato (DMPP). Algunos de estos compuestos pueden persistir en el suelo durante un largo tiempo, pero no son bioactivos, ya que son adsorbidos por los coloides del suelo (Subbarao et al. 2012). Por otro lado, altas concentraciones de NH₂OH son inhibitorias de la oxidación del NH₃ (Bock y Wagner 2006).

2.1.5 Desnitrificación

La desnitrificación es un proceso respiratorio que forma parte del aparato bioenergético de la célula bacteriana (Zumft 1997), donde se utiliza al NO₃⁻ como un aceptor de electrones alternativo (Rösch et al. 2002), el cual es reducido a NO₂⁻, NO, N₂O y N₂ gracias a las reacciones catalizadas por las enzimas (Cuadro 1) nitrato reductasa respiratoria, nitrito reductasa respiratoria, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa (Hollocher 1996 Rösch et al. 2002, Bonete et al. 2008).

Cuadro 1. Enzimas involucradas en el proceso de desnitrificación.

Enzima		Reacción
Nitrato reductasa	NAR	$\text{NO}_3^- + \text{UQH}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{UQ} + \text{H}_2\text{O}$
Cu-nitrito reductasa	NIR	$\text{NO}_2^- + \text{Cu}^+ + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O} + \text{Cu}_2^+$
Cd1-nitrito reductasa	NIR	$\text{NO}_2^- + \text{cyto}2^+ + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O} + \text{cyto}3^+$
Oxido nítrico reductasa	NOR	$2\text{NO} + 2\text{cyto}2^+ + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} + \text{cyto}3^+$
Oxido nitroso reductasa	NOS	$\text{N}_2\text{O} + 2\text{cyto}2^+ + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{cyto}3^+$

Fuente: (Barton 2005)

El O_2 , NO_2^- , NO_3^- y NO , actúan como señales de regulación en el proceso de desnitrificación. Las proteínas reguladoras involucradas en la detección de estas moléculas en bacterias son: i) los sensores de oxígeno (FixL y FNR), ii) sensores de NO_3^- y NO_2^- (NarXL, NarPQ y Narr), iii) sensores de NO (NNR y NOR), iv) sensores redox (Reg regulón) y v) NiR y proteínas NOSR (proteínas esenciales para la expresión y transcripción de los números y el grupo de genes nir) (Bonete et al. 2008).

2.2. Microorganismos relacionados al ciclo del N

En el suelo, el ciclo del N es mediado por microorganismos. Algunos de ellos han sido estudiados a fondo debido a la importancia que tienen. Tal es el caso del diazótrofo *Gluconacetobacter diazotrophicus* que secreta sustancias promotoras de crecimiento, produce bacteriocina que inhibe el crecimiento de *Xanthomonas albilineans*, presenta actividad antifúngica en *Fusarium* sp. y *Helminthosporium carbonum*, además de incrementar la solubilidad de fosfatos y Zinc (Bertalan et al. 2009).

O bien, porque han sido aislados, esto ha permitido conocer su funcionamiento metabólico, o extraer las enzimas relacionadas al ciclo del nitrógeno, como es el caso de *Agrobacterium tumefaciens*, *Azotobacter vinelyii*, *Nitrosomonas europea*, *Paracoccus denitrificans* y *Pseudomona* por mencionar algunas.

2.2.1 Microorganismos fijadores de N_2

La fijación de N_2 se encuentra en procaríotas y es característico de algunas especies de bacterias heterótrofas aeróbicas del suelo como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Beggiatoa* y bacterias anaerobias como *Clostridium* y *Desulfovibrio* (Barton 2005). Existe otro grupo de bacterias *Frankia* (en Actinobacteria) que se asocia a plantas de ocho familias sin formar nódulos (Franche et al. 2009).

Dentro de las bacterias endófitas se ha logrado la caracterización molecular de nueve de ellas: *Burkholderia phytofirmans* PsJN, *Enterobacter* sp. 638, *Methylobacterium populi* BJ001, *Pseudomonas putida* W619, *Serratia proteamaculans* 568, *Stenotrophomonas*

maltophilia R551-3, *Azoarcus* sp. BH72, *Klebsiella pneumoniae* 342 y *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (Bertalan et al. 2009).

Las bacterias simbiotas y fijadoras de N_2 reducen el nitrógeno atmosférico a NH_4^+ mediante un complejo enzimático altamente conservado. El complejo enzimático es conformado por dos enzimas una dinitrogenasa y una dinitrogenasa reductiva. La interacción ocurre en plantas de la familia Fabaceae y en algunas plantas del género *Parasponia* (Kraiser et al. 2011).

Las bacterias que interactúan con la familia Fabacea son bacterias Gramnegativas, pertenecen a la división Proteobacteria. En la división α -proteobacteria se encuentran los géneros *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Dentro de la división β -proteobacteria son *Burkholderia* y *Cupriavidus* (Franche et al. 2009). La interacción entre bacterias fijadoras de nitrógeno y plantas no-nodulantes se ha identificado en el género *Burkholderia* y la rizósfera de plantas de tomate (Kraiser et al. 2011).

Las bacterias del género *Rhizobium* inducen la fijación endosimbiótica en las raíces de *Phaseolus vulgaris*. A la fecha, cinco especies de *Rhizobium* han sido reconocidos como microsimbiontes de *P. vulgaris*: *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* (especie asociada con frijol cultivado y silvestre de México), *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium gallicum* y *Rhizobium giardini* (Aguilar et al. 2004).

Otro grupo importante de bacterias fijadoras de N_2 es el de las cianobacterias. Por ejemplo, *Anabaena* y *Aphanazonemon* (Barton 2005), que se encuentran en asociación con una gran variedad de plantas, hongos y algas superiores e inferiores (Franche et al. 2009).

2.2.2 Microorganismos oxidantes de NH_3

Las bacterias oxidantes de amoníaco (AOB) son litoautótrofas. Utilizan CO_2 como fuente de Carbono (C) (Barton 2005, Bock y Wagner 2006) y a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos obtienen energía con electrones (Barton 2005). Así como oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones de la cadena respiratoria y para la formación de NH_2OH (Beaumont et al. 2002). Poseen varios citocromos únicos implicados en el transporte de electrones para HAO (Arp et al. 2001).

Las AOB tienen un grado de unión superficial más fuerte que el de las bacterias heterotróficas. Están unidas dentro de una biopelícula que las hace resistentes a una variedad de tensiones ambientales. En particular, se ha demostrado que la población de *Nitrosomonas europaea* puede recuperarse más rápidamente de hambre que sus homólogos de vida libre. Además, se piensa que producen exopolisacáridos para que la unión superficial sea más fuerte. Esta característica podría ser relevante para las AOB unidas a las raíces del arroz, ya que se esperaría que las bacterias estén en un estado de hambre entre los períodos de fertilización (Briones et al. 2002).

Diferentes estudios han demostrado que las poblaciones de las AOB pueden presentar cambios en su actividad y tamaño de la población en respuesta a la aplicación de fertilizantes (Szukics et al. 2012). Las AOB son más sensibles al suministro de urea y es reflejado en un incremento y composición de la comunidad (Shen et al. 2011).

Actualmente se sabe que la oxidación de NH_3 también puede ocurrir en ambientes ácidos. Y esto se debe a que diferentes grupos pueden dominar en suelos con pH entre 4.5 y 7.5. Por ejemplo, *Nitrospira* cluster 3 predomina en suelos agrícolas con pH neutro. Mientras que *Nitrospira* cluster 2 lo hace en suelos ácidos (Junier et al. 2010).

Durante largo tiempo se pensó que la oxidación de NH_3 era realizada exclusivamente por un grupo monofilético de las bacterias, sin embargo, análisis metagenómicos recientes revelaron que miembros del filo Crenarchaeota (Szukics et al. 2012) y Thaumarchaeota (Fernández-Guerra y Casamayor 2012) dentro del dominio Archaea, también poseen homólogos *amoA* (Subbarao et al. 2012). Algunos miembros de Thaumarchaeota utilizan NH_3 producido durante la mineralización, Thaumarchaeal del grupo 1.1b posee homólogos *amo* y Thaumarchaeal grupo 1.1c se encuentra predominantemente en suelos ácidos (Stopnisek et al. 2010).

Las arqueas amoníaco oxidante (AOA) predominan en la mayoría de los tipos de suelo y constituyen hasta un 5% de todos los procariontes (Schleper 2010). Toleran altas concentraciones de NH_3 , presentan pocos efectos por la adición de fertilizantes, son sensibles a los exudados de las raíces (Stopnisek 2010) y tienen afinidad por el NH_4^+ (Shen et al. 2011).

Aún no se sabe si las AOA son realmente equivalentes en función de sus homólogos bacterianos las AOB, si son diferentes sus requerimientos de crecimiento y en su fisiología y en consecuencia, responden de manera diferente a las condiciones ambientales y de

manejo agrícola (Szukics et al. 2012). Se ha propuesto que las AOA podrían desempeñar un papel importante en el ciclo del N en entornos con sulfuro y bajo contenido de nutrientes y pH de 6.8 (Weng et al. 2013).

2.2.3 Microorganismos oxidantes de NO_2^- y NO_3^-

La oxidación biológica de formas reducidas de nitrógeno inorgánico a NO_2^- y NO_3^- , es catalizada por dos grupos fisiológicos de bacterias (Bock y Wagner 2006) las bacterias que oxidan el NH_3 a NO_2^- , que son miembros de los géneros que tienen el prefijo "-nitroso" y las bacterias que oxidan el nitrito a nitrato y pertenecen a los géneros con el prefijo de "nitro" (Barton 2005).

Las bacterias nitrificantes están presentes en ambientes oxigenados e incluso anóxicos; ampliamente distribuidas en agua dulce, en agua de mar, en suelos, en las rocas y en sistemas de tratamiento de aguas residuales, hábitats extremos como los sistemas de calefacción con temperaturas de hasta 47 °C y en suelos de permafrost hasta una profundidad de 60 m, a una temperatura de -12 °C (Bock y Wagner 2006).

El pH óptimo para el crecimiento celular de los nitrificantes es 7.6 a 7.8 sin embargo, se han identificado en suelos ácidos con valores de pH por debajo de 4 y en lagos con sosa y un pH entre 9.7 a 10.5. En muchos entornos, los nitrificantes son sensibles a la luz solar cercana a la luz UV (Bock y Wagner 2006).

Filogenéticamente los oxidantes de NH_3 litoautótrofos y los oxidantes de NO_2^- , no están estrechamente relacionados (Cuadro 2). El rRNA del gen 16S muestra que todos los oxidantes de NH_3 identificados son miembros de las Proteobacterias de la subclase β o γ . Los oxidantes de NO_2^- pertenecen a las Proteobacterias de la subclase α o γ (Bock y Wagner 2006, Junier et al. 2010).

Cuadro 2. Clasificación de bacterias oxidantes de NH_3 y NO_2^-

Género	Tipo de proteobacteria		
	α	β	γ
Oxidantes de NH_3			
<i>Nitrosomonas</i>		+	
<i>Nitrospira</i>		+	
<i>Nitrosomonas</i>		+	
<i>Nitrosovibrio</i>		+	
<i>Nitrosococcus</i>			+
Oxidantes de NO_2^-			
<i>Nitrobacter</i>	+		
<i>Nitrococcus</i>			+
<i>Nitrospina</i>			+

2.2.4 Microorganismos desnitrificantes

Los microorganismos desnitrificantes se distribuyen en los dominios: Archaea, Bacterias y Eukarya (Bonete et al. 2008), la mayoría son aerobios facultativos y en ausencia de O_2 tienden a utilizar formas oxidadas de N como NO_2^- y NO_3^- antes de utilizar N_2O (Hollocher 1996, Bonete et al. 2008). Sin embargo, presentan alta afinidad a NO (Yamulki y Jarvis 2002).

La desnitrificación es por lo tanto un estilo alternativo de la respiración de estos microorganismos (Hollocher 1996). Diferentes estudios revelan que las bacterias desnitrificantes se encuentran en la capa superior del suelo (profundidad de 5 cm) y su abundancia decrece con la profundidad del suelo (Rösch et al. 2002). Aunque la mayoría de las bacterias desnitrificantes producen N_2 como producto final, algunos terminan en N_2O (Hollocher 1996) y no todos poseen la enzima óxido nítrico reductasa (Rösch et al. 2002).

Diez familias diferentes de eubacterias, están representadas entre los verdaderos desnitrificadores: Rhodospirillaceae, Cytophagaceae; en las bacterias, Spirillaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Halobacteriaceae, Neisseriaceae, Nitrobacteraceae y Bacillaceae (Hollocher 1996). Dentro del género *Rhodanobacter* se ha identificado a *Rhodanobacter denitrificans* y *Rhodanobacter thiooxydans* especies con la capacidad de llevar a cabo el proceso de desnitrificación (Kostka et al. 2012).

La capacidad de utilizar NO_3^- como aceptor terminal de electrones en el metabolismo energético se encuentra en varias Arqueas halófilas e hipertermofílicas (Zumft 1997, Bonete et al. 2008). Este proceso ha sido sólo parcialmente descrito en *Halobacterium* sp., *Hfx mediterranei*, *Hfx denitrificans* y *Hal marismortui* (Bonete et al. 2008).

Ciertas especies de *Propionibacterium* y *Chromobacterium* pueden reducir el NO_2^- a N_2O , pero en reacciones lentas que no están vinculadas a energía y algunos organismos litotrofos oxidan NH_3 , NO_2^- , H_2 , o compuestos de S reducido para apoyar la reducción de óxidos de nitrógeno (NO_x) (Hollocher 1996).

2.3. Enzimas relacionadas al ciclo del N

Las enzimas del ciclo del N son proteínas que catalizan las reacciones químicas de diferentes procesos de transformación del N, actúan sobre sustratos específicos transformándolos en productos necesarios. La velocidad de la reacción catalizada por la enzima depende del pH, la fuerza iónica, la temperatura y de la presencia y ausencia de inhibidores. Las enzimas relacionadas al ciclo del N son 13: nitrogenasa, amonio mono-

oxigenasa, hidroxilamina oxido reductasa, nitrito oxido reductasa, hidracina hidrolasa, nitrato reductasa, nitrito reductasa, oxido nítrico reductasa y oxido nitroso reductasa (Canfield et al. 2010).

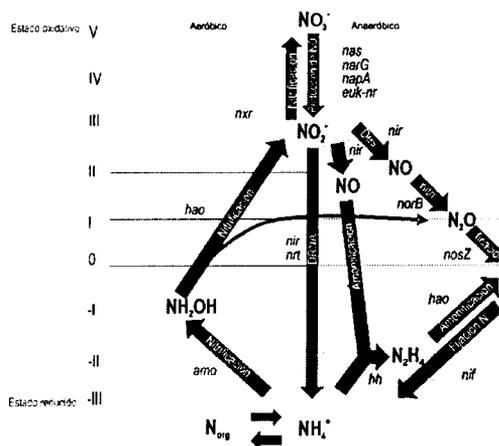


Figura 3. Ruta de la transformación del nitrógeno catalizada por diferentes enzimas. Genes que codifican las enzimas nitrato reductasa (*nas*, *euk-nr*, *narG*, *napA*), nitrito reductasa (*nir*, *nrf*), oxido nítrico reductasa (*norB*), oxido nitroso reductasa (*nosZ*), nitrogenasa (*nif*), amonio monooxigenasa (*amo*), hidroxilamina oxido reductasa (*hao*) e hidracina hidrolasa (*hh*). Fuente: Canfield et al. 2010.

2.3.1 Nitrogenasa

La nitrogenasa o dinitrogenasa (E.C.1.18.6.1) es un complejo enzimático altamente conservado en diazótrofos de vida libre, microorganismos fijadores de N_2 simbióticos (Franche et al. 2009) y muchas especies de cianobacterias (Staal et al. 2001).

Está conformada por dos metaloproteínas: componente 1, la proteína MoFe que es un tetrámero de 22 kDa compuesto por dos subunidades no idénticas α y β , mientras que el componente 2, la proteína de Fe así asignada, es un dímero de 68 kDa, formada por subunidades idénticas. Algunas bacterias, tales como *Azotobacter* y varios fijadores de N_2 fotosintéticos presentan formas adicionales de nitrogenasa cuyo cofactor contiene vanadio (V-nitrogenasa) o sólo hierro (Fe) (Franche et al. 2009).

La nitrogenasa o dinitrogenasa cataliza la reducción del N_2 y una variedad de sustratos, muchos de los cuales se caracterizan por tener un enlace triple, por ejemplo, el acetileno (Staal et al. 2001). La enzima es inhibida por la presencia y concentración de NH_4^+ y NO_3^- (Poly et al. 2001b).

El gen que codifica la subunidad *nifH* de la proteína Fe de la nitrogenasa está altamente conservado entre todos los diazótrofos. La filogenia basada en los genes *nifH* ha mostrado

en gran parte parecerse a la obtenida a partir del gen 16S ribosomal del ácido ribonucleico (rRNA: ribosomic Ribonuclieic acid, por sus siglas en ingles). (Wartiainen et al. 2008).

Los tres genes estructurales que codifican los polipéptidos Mo nitrogenasa y la proteína Fe son *nifD* y *nifK* y *nifH* respectivamente. La nitrogenasa requiere productos de otros genes *nif* implicados en la síntesis de FeMoCo (*nifB*, *nifE*, *nifH*, *nifN*, *nifQ*, *nifS*, *nifU*, *nifV*, *nifX*, *nifY*) y en el montaje de los clusters de Fe-azufre (S) (*nifS* e *nifU*) y la maduración de los componentes de nitrogenasa (*nifW* y *nifZ*) (Franche et al. 2009).

2.3.2 Amoniaco monooxigenasa (AMO)

La AMO (E.C.1.14.99.39) es una enzima unida a membrana y sólo se libera mediante tratamiento con detergentes y es similar a la enzima metano monooxigenasa en los metanótrofos. La AMO consta como mínimo de dos polipéptidos; el polipéptido AmoA (sitio activo de AMO) de 27 kDa y el polipéptido AmoB de 40 kDa. La enzima aún no ha sido purificada hasta la homogeneidad con actividad, por lo tanto, las propiedades detalladas de esta enzima no están disponibles. La AMO no posee alta especificidad por NH_3 también puede oxidar varios compuestos apolares como metano, monóxido de carbono (Bock y Wagner), alcanos, alquenos, compuestos aromáticos, éteres, tioéteres y aminas primarias (Arp et al. 2001). Estos compuestos pueden actuar como inhibidores competitivos de la oxidación del NH_3 (Bock y Wagner 2006).

En la reacción catalizada por la AMO, un átomo del O_2 se inserta en NH_3 mientras que el segundo O se reduce a H_2O . Esta reacción requiere dos electrones adicionales, debido a que el NH_3 es la única fuente reductora en las bacterias que la tienen, los electrones necesarios para la formación de H_2O , deben proceder de la posterior oxidación de NH_2OH (Figura 2) (Arp et al. 2001).

Los polipéptidos de la AMO son codificados por los genes contiguos *amoC*, *amoA* y *amoB* (Figura 4). Los genes *amoA* y *amoB* son 99% idénticos entre sí (Arp et al. 2001). Entre las diferentes AOB, el grupo de genes *amoCAB* está presente en múltiples copias en las β -AOB, mientras que en las γ -AOB hay una sola copia (Junier et al. 2010). Sólo una porción del gen *amoA* ha sido utilizado generalmente como marcador molecular para el estudio de la diversidad de las AOB. Se ha argumentado que esta región es relativamente corta (alrededor de 450 pb) y altamente conservada (Junier et al. 2010).

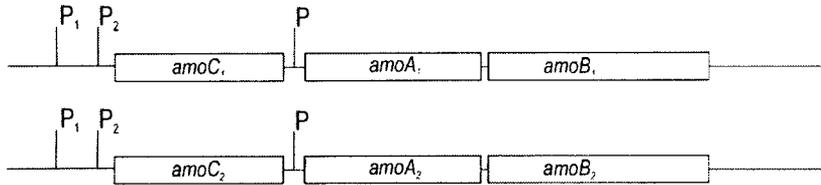


Figura 4. Mapa de los loci de los genes para Amoniaco monooxigenasa (AMO). P= polipéptidos. Fuente: Arp et al. 2001.

Por ejemplo, tres transcripciones de la AMO se detectan en las células de *N. europaea*: una correspondiente a *amoC*, otra correspondiente a *amoAB* y otra correspondiente a *amoCAB*, la razón de tres mRNA para AMO es desconocido, ya que pueden originarse en el procesamiento del mRNA *amoCAB* o de la transcripción a partir *amoC* y *amoA* (Arp et al. 2001). Los posibles sitios de inicio de transcripción se han identificado en 166 y 103 pares de bases (pb) arriba del codón de inicio de *amoC* y 114 pb del codón de inicio *amoA* en la región intergénica entre *amoC* y *amoA*. Los tres sitios de inicio de transcripción $\sigma 70$ tienen secuencias promotoras asociadas con ellos. Ambas copias de *amoCAB* parecen tener promotores idénticos (Arp et al. 2001).

En *N. europaea*, el NH_3 parece inducir una respuesta global de la transcripción. La transcripción de los genes para *amoCAB* y *amoAB* sólo se induce en presencia de NH_4^+ e incluso en la presencia de inhibidores de la AMO que impiden que el NH_3 sea utilizado como una fuente de energía. Estos resultados sugieren que el NH_3 , puede ser una señal para la expresión génica y/o una señal para la fuente de energía (Arp et al. 2001).

Bajo condiciones controladas, el gen *amoC*, es estable y se puede encontrar por lo menos 72 horas después de retirar NH_3 . El análisis de los dos sitios de inicio de transcripción identificados para *amoC*, revelan que responden de manera diferente a la adición de NH_4^+ (Arp et al. 2001).

Los genomas de *N. europaea*, *Nitrosomonas eutropha* y *Nitrosospira multiformis* han revelado la existencia de dos genes conservados, ORF4 y ORF5, inmediatamente después del operón *amoCAB*. Ambos genes, se han designado *amoR* y *amoD* respectivamente (Junier et al. 2010).

2.3.3 Hidroxilamina oxidoreductasa (HAO)

La enzima HAO es la responsable de la oxidación de NH_2OH a NO_2^- (Barton 2005, Junier et al. 2010). La enzima fue purificada hasta la homogeneidad hace más de 20 años a partir de *N. europea* (Kathleen y Hooper 1981) y es altamente soluble (Junier et al. 2010). Está

situada en el periplasma y es un homotrímero de subunidades de 64 kDa, cada subunidad contiene ocho grupos hemo de tipo c. Siete de los grupos hemo están unidos por un enlace covalente a la proteína mediante dos enlaces tioéter típicos del grupo hemo tipo c. El octavo grupo hemo designado P460, tiene un enlace covalente adicional a la proteína a través de un residuo de tirosina y es el sitio activo de la oxidación de NH_2OH (Arp et al. 2001, Fernández et al. 2008), su tamaño difiere entre microorganismos (Cuadro 3) (Arp et al. 2001).

Cuadro 3. Diferencias en la purificación de HAO entre bacterias

Microorganismo	Strain	Peso molecular [kDa]
<i>Methylococcus capsulatus</i>	hemo P-460	39
		16.4
<i>Thiosphaera pantotropha</i>		20
<i>Nitrosomonas europea</i>	hemo P-460	63
	hemo tipo c en el sitio activo	
<i>Pseudomonas</i>	PB16	68

La desproporción catalítica de NH_2OH se sabe que está mediado por la hemoglobina, la formación de cantidades iguales de NH_3 y N_2O , por mioglobina, y también por los complejos de transición no hemo, donde la distribución de los productos de nitrógeno depende del metal, los ligandos, el pH, y el medio de reacción (Fernández et al. 2008). El receptor directo de electrones para la HAO es citocromo c554 (Arp et al. 2001).

El gen que codifica para HAO (*hao*) es de 1710 pb de longitud y se expresa como un transcrito monocistrónico. El gen *hao*, también codifica una secuencia de 18 a 24 aminoácidos líder, típica de las proteínas periplásmicas, que se elimina durante la translocación y la maduración de la HAO (Arp et al. 2001).

Hasta la fecha, la secuencia de aminoácidos de la HAO parece ser única para los microorganismos nitrificantes. Las secuencias de nucleótidos de *hao1* y *hao2*, son casi idénticos para 160 pb, mientras que la secuencia de la tercera copia, *hao3*, difiere en 15 pb de las otras dos en el codón de inicio (Figura 5). El mRNA de la HAO es inducido por la adición de NH_4^+ , aunque en menor medida (Arp et al. 2001).

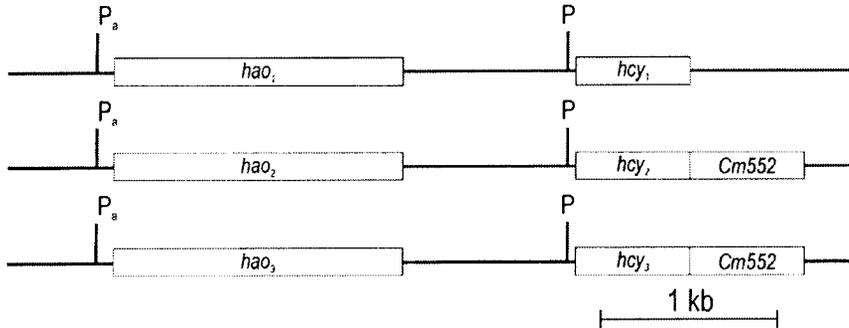


Figura 5. Mapa de los loci de los genes para hidroxilamina oxidoreductasa. P = polipéptidos. Fuente: Arp et al. 2001.

Análisis filogenéticos de las secuencias *hao* de cultivos de AOB's son congruentes con los obtenidos para el gen 16S rRNA y el gen *amoA*; esto sugiere que el gen *hao* puede ser un marcador molecular alternativo de las AOB. Sin embargo, el gen *hao* también está presente en bacterias no oxidantes incluyendo a las bacterias metano oxidantes y otros microorganismos (Junier et al. 2010).

2.3.4 NO_2^- -oxidoreductasa

La enzima NO_2^- oxidoreductasa cataliza la oxidación de $NO_2^- \rightarrow NO_3^-$ y la reducción de $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$ (Bock y Wang 2006). La enzima está unida a membrana y está conformada por dos o tres unidades dependiendo de la bacteria. Una subunidad α asociada a membrana NorA (de 115 a 130 kDa) y una subunidad NorB (65 kDa).

2.3.5 NO_2^- -reductasa

La enzima Nitrito reductasa es soluble, cataliza la conversión de NO_2^- a NO. Existen dos enzimas nitrito reductasa diferentes: una enzima homotrimérica que contiene cobre y una enzima homodimérica citocromo.

La enzima NO_2^- reductasa (NirS) es un homodímero con una subunidad de 60 kDa y dos grupos prostéticos (hemo-C y hemo-D) (Zumft 1997). Esta enzima es común en los procariontes y se ha descrito a partir de diferentes bacterias, como muchas especies de *Pseudomonas* y *Paracoccus*.

En las bacterias desnitrificantes el lugar y la dirección de los genes *nos*, *nir* son homólogos, en el caso del gen *nir*, este puede variar el sentido de la transcripción (Figura 6). Asimismo, se observan diferencias entre genes homólogos de los diferentes genes que codifican otras enzimas requeridas para el proceso de desnitrificación o la ausencia de otros (Zumft 1997).

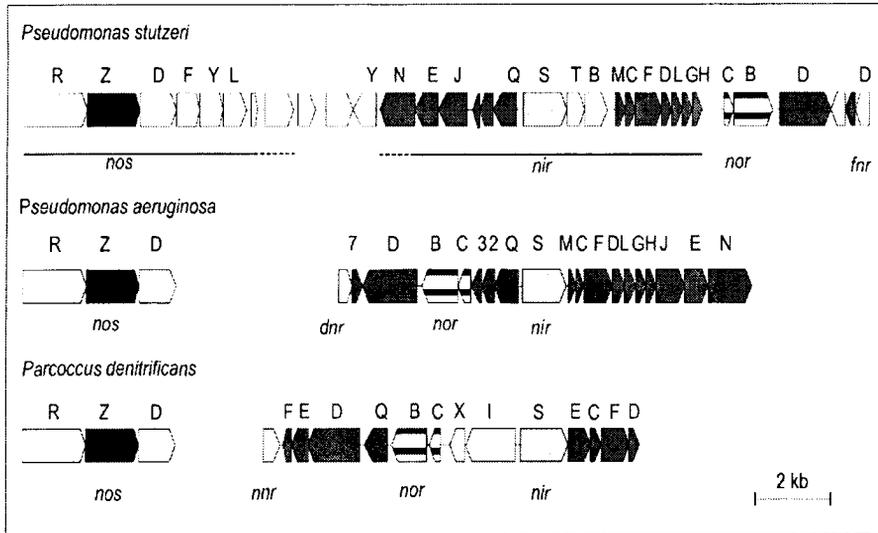


Figura 6. Organización comparativa de los genes entre *Pseudomonas* y *Paracoccus*. El tamaño aproximado y la dirección transcripcional de los genes se dan por las cajas de flecha. Cuadros en blanco no tienen homólogos. Los genes estructurales de óxido nítrico reductasa *nosZ*: negro, nitrito reductasa *nirS*: gris, y óxido nítrico reductasa *norCB*: trama línea. Fuente: (Zumft, 1997)

2.3.6 NO_3^- reductasa

Existen tres tipos de nitrato reductasa: (1) una enzima de tipo asimilación localizado en el citoplasma (Nas), (2) una enzima soluble asociada a la respiración (Nar) y (3) una enzima de tipo disimilatoria en la membrana plasmática (Nap) (Potter et al. 2001; Barton 2005). Cada una de ellas cumple una función fisiológica diferente. Se pueden encontrar en algunas bacterias gramnegativas, pero no en todas. *Paracoccus pantotrophus* y algunas *Pseudomonas*, sintetizan los tres tipos de nitrato reductasa (Potter et al. 2001).

La enzima nitrato reductasa (Nar) se encuentra unida a membrana (Bonete et al. 2008), con su sitio activo en el citoplasma (Potter et al. 2001) (Figura 7). Nar está asociada a la respiración anaeróbica de NO_3^- y es regulada por O_2 . Se compone de una subunidad catalítica que se une a un cofactor orgánico complejo [El cofactor bisdinucleótido guanina molibdeno: bis-MGD] (NarG) y una subunidad de transferencia de electrones con cuatro centros de Fe-S (NarH). En la mayor parte de las bacterias, este complejo está unido a un componente de quinol oxidante en membrana (NarL) (Bertero et al. 2003, Bonete et al. 2008).

Nar requiere una quinona, ya sea ubiquinona o menaquinona, para aceptar electrones de la oxidación de H_2 , NADH, formiato, lactato, o glicerol-3-fosfato. Con electrones de H_2 o

NADH, se bombean 4 H⁺ por cada molécula reducida de NO₃⁻ a NO₂⁻. Por otro lado, con lactato o glicerol-3-fosfato acoplada a la reducción del NO₃⁻, sólo 2 H⁺ son expulsados con la reducción de una molécula de NO₃⁻ (Barton 2005).

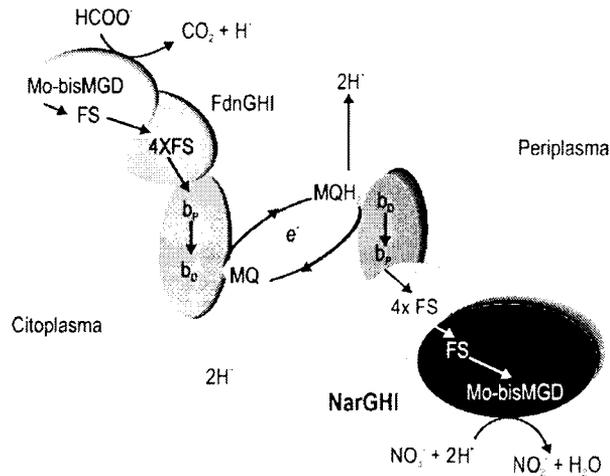


Figura 7. Mecanismo propuesto para la generación de fuerza motriz de protones del enlace redox por NARGHI y FndGHI. MQ: menaquinona, MQH₂: menaquinol, bD: grupo hemo b distal, bP: grupo hemo b proximal, FS: [Fe-S] cluster, Mo-bisMGD: cofactor de molibdeno. Fuente: Bertero 2003.

Los genes *narG*, *narH* y *narI* codifican las subunidades α , β y γ de Nar respectivamente. Estos tres genes y *narJ* codifican una proteína soluble que no forma parte de la enzima madura del complejo. El gen *narJ* es esencial para la síntesis del sitio activo Nar (Potter et al. 2001).

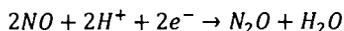
El operón *narGHJI* requiere de un regulador global FNR, la proteína NarL, IHF y ModE se conserva en la mayoría de las bacterias, arqueas halófilas. No obstante, los genes *nar* no conservan esta organización (Potter et al. 2001).

La enzima NO₃⁻ reductasa periplasmática (Nap) cataliza la reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻ y mantiene el balance redox en la célula. La enzima Nap está conformada de dos subunidades NapA (93.3 kDa) y NapB (18.9 kDa). La subunidad NapA se une al cofactor molibdeno y cuatro cisteínas. Y la subunidad NapB tiene dos sitios de unión hemo-C (Zumft, 1997). La enzima es expresada bajo condiciones aeróbicas, requerida en la desnitrificación aeróbica y codificada por el operón *NapFDAGHBC* (Ji et al. 2015).

2.3.7 NO reductasa

A la fecha se han identificado tres tipos de NO reductasa. La primera fue llamada cNor por recibir electrones del citocromo *c*, la segunda qNor por recibir electrones de quinol.

La enzima cNor es una enzima binucleada con hierro que cataliza la reducción de NO a N₂O bajo la siguiente reacción (Attia y Silaghi-Dumitrescu, 2015):



Fue descrita a partir de células de *P. stutzeri*. En esta bacteria, la actividad del ligando-membrana es debida a un complejo citocromo *bc*. La enzima tiene una masa de 45 kDa, la subunidad *b* del citocromo 53 kDa y su capacidad reductora depende de fosfolípidos (Zumft, 1993, Hollocher 1996, Zumft, 1997). Los genes estructurales de los citocromos *b* y *c* son *norC* y *norB* respectivamente. Se encuentran contiguos y organizados en un operón simple (Zumft, 1993). La actividad catalítica de cNor requiere cardiolipina, fosfatidiglicerol y fosfatidiletanolamina.

La enzima qNor es dependiente de quinol, fue identificada a partir de *Synechocystis* sp. PCC6803. Es muy probable que la qNor presente en los genomas de agentes patógenos, como *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium avium*, sea utilizada para la eliminación de NO tóxico producido ya sea en su medio ambiente o al matar las células del hospedante (Van Spanning et al. 2005).

2.3.8 N₂O-reductasa

La enzima óxido nitroso reductasa (NOS) (EC 1.7.99.6) es una enzima multicobre homodimérica, que ha sido purificada a partir de numerosas bacterias desnitrificantes gramnegativas, pero aún no a partir de una bacteria grampositiva (Henry et al. 2006).

2.4 Efectos de los sistemas agrícolas sobre el ciclo del N

2.4.1 Labranza

Una práctica utilizada y necesaria en la producción en campo es el tipo de labranza. La labranza con arado de disco al fracturar, abrir e invertir los suelos permite un intercambio de dióxido de carbono (CO₂) y oxígeno. Al mismo tiempo incorpora los residuos en el suelo (que son la fuente de energía de la población microbiana) (Reicosky 1997). Los efectos de la intensidad de esta práctica se ven reflejados en la compactación del suelo, en la pérdida de materia orgánica, en el incremento de escorrentía del agua, en la erosión del suelo (Alvarez y Alvarez, 2000, Jiménez et al. 2004, Mathew et al. 2012), en el flujo de N₂O

(Yamulki y Jarvis, 2002) y en la reducción de macroagregados que son el microhabitat de la población microbiana (Constancias et al. 2014, Lienhard et al. 2013).

Reducir la intensidad de la labranza favorece la retención de nutrientes, reduce la pérdida de materia orgánica, la liberación física de CO₂, incrementa la actividad zoológica y microbiana en el suelo (Höflich et al. 1999) y posiblemente, la oxidación biológica del Carbono (C) (Reicosky 1997, Dilly et al. 2002).

La labranza cero puede incrementar la materia orgánica del suelo (por el flujo constante de los residuos de cultivos que son adicionados a la superficie del suelo), reduce las emisiones de gases de efecto invernadero e incrementa el secuestro de C (Liu et al. 2015). Se ha demostrado que la adopción de la labranza cero y otros sistemas de labranza reducida alteran el ciclo del C y por lo tanto a su vez repercute en el ciclo del N en comparación con la labranza convencional (Bradford y Peterson, 2000). En condiciones controladas se ha observado una estratificación de la biomasa microbiana activa y el C mineralizado (Alvarez y Alvarez, 2000).

Constancias et al. (2014) observaron que la abundancia relativa y riqueza de bacterias es menor en microambientes bajo labranza que en suelos de pastoreo o con labranza cero. Y confirmaron que la labranza perturba la diversidad de bacterias que habita los microagregados del suelo. Por su parte, Höflich et al. (1999) afirman que la actividad fijadora de N₂ de *Rhizobium leguminosarum*, así como el contenido de Leghemoglobina en chicharos cultivados en suelos franco arenosos no es afectada por la labranza convencional y la labranza de conservación.

2.4.3 Fertilización

La fertilización es un mal necesario que permite nutrir a las plantas e incrementar el rendimiento de los cultivos. La fertilización inorgánica o nitrogenada es la más utilizada gracias a la diversidad de productos sintéticos existentes en el mercado. Los efectos de la fertilización nitrogenada sobre la comunidad bacteriana son identificados en la disminución en el número y diversidad de bacterias fijadoras de N₂ y en la capacidad de las bacterias simbiotes para interactuar con las plantas. En el cultivo de arroz (*Oryza spp.*) y sorgo (*Sorghum bicolor*) la diversidad de la comunidad bacteriana fijadora de N₂ disminuye. En caña de azúcar (*Saccharum spp.*), la colonización de *Acetobacter diazotrophicus* es afectada por el suministro de fertilización nitrogenada (Kraiser, 2011).

Diferentes estudios revelan que la cantidad y tipo de fertilizantes ocasiona cambios en los exudados de las plantas y que éstos a su vez influyen en los microorganismos del suelo. La asimilación del NH_4^+ por las plantas reduce el pH de la rizósfera debido a la liberación de los protones. Si la fuente de nitrógeno es el NO_3^- se liberan cargas negativas y principalmente hidroxilos (OH^-) (Weng et al. 2013).

El aporte de fertilización inorgánica en *Kandelia obovata* acelera la transformación del N en la rizósfera, se incrementa el número de exudados en la raíz (ácido oxálico, ácido tartárico, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico y ácido bibásico). El ácido bibásico se incrementa cuando la fertilización es con NH_4^+ y si la fertilización es con NO_3^- es el ácido tribásico (Weng et al. 2013).

Altas concentraciones de urea incrementan la abundancia relativa del grupo funcional de las bacterias que participan en la reducción del NO_3^- . (Colloff et al. 2008). La abundancia y composición de las AOB es alterada por el incremento de fuentes nitrógenadas (Shen et al. 2011).

La fertilización con desechos orgánicos y composta es una forma de reciclar el N terrestre disponible, reduciendo así la dependencia de los combustibles fósiles necesarios para producir fertilizantes sintéticos. Además, se ha sugerido que el uso de fertilizantes orgánicos, solos o mezclados con fertilizantes sintéticos, puede mitigar la contaminación de N por los sistemas agrícolas (Kramer et al. 2006).

En los abonos orgánicos (estiércoles maduros de vacas, puercos, gallinas y pollos de engorda) el N se encuentra en forma inorgánica (NH_4^+ , NH_3 en solución y después de su descomposición anaeróbica NO_3^-) y orgánica (el N_{org} está conformado por moléculas recalcitrantes). A diferencia de la fertilización inorgánica, las pérdidas de N en forma de N_2O y N_2 son mayores después de la aplicación de los abonos y son causadas por el tipo de suelo, la textura y la distribución de los abonos en el suelo (Webb et al. 2013).

2.4.4 Cultivos

Diferentes investigadores reportan que las condiciones ambientales, la textura del suelo y las concentraciones de NI, influyen en la fijación de N_2 por los diazótrofos. Al respecto Poly et al. (2001b), mencionan que en suelos cultivados y suelos con pastos permanentes las variaciones encontradas del gen *nifH*, se originan por la adaptación de los diazótrofos a las condiciones fluctuantes de estos sistemas.

El intercalado de cultivos es una alternativa de manejo agrícola antigua. En sistemas con cultivos intercalados las interacciones interespecíficas en la rizósfera facilitan la toma de N y fósforo. Las concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- en la rizósfera son reguladas por el tipo de intercalado. Y la composición de la comunidad bacteriana AOB en la rizósfera difiere debido a los diferentes exudados de la raíz y/o por la composición de los residuos (Song et al. 2007).

2.4.2 Residuos orgánicos

Otra estrategia utilizada en campo es la incorporación de residuos. Al mantener los residuos vegetales en la superficie del suelo, éstos quedan a disposición de los microorganismos (Reicosky 1997), la actividad microbiana es estimulada, esto permite la colonización bacteriana en la rizósfera de plantas a diferentes profundidades del suelo (Höflich et al. 1999).

2.5 Técnicas moleculares

En 1970 Colwell, introdujo el término "taxonomía polifásica" para referirse a una taxonomía que ensamblaba y relacionaba varios niveles de información, desde molecular hasta ecológica (Figura 8), su objetivo era utilizar todos los datos disponibles para reflejar lo más fielmente posible la realidad biológica para hacer frente a cualquier problema taxonómico (Brenner et al. 2005).

En los últimos años, se han desarrollado técnicas de fluorescencia de hibridación *in situ* (FISH). No obstante, la técnica FISH requiere de células fisiológicamente activas, tiempo y es difícil de usar en el suelo (Okano et al. 2004). Las técnicas de biología molecular han sido utilizadas para el estudio de los microorganismos del suelo y se ha extendido rápidamente (Wang et al. 2012). La PCR, la PCR en tiempo real, Electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización (DGGE), Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) y el Terminal marcado con fluorescencia (FLT)-RFLP (Poly et al. 2001a) son solo algunas de ellas.

Gracias a los avances tecnológicos se han desarrollado nuevas tecnologías y herramientas computacionales que facilitan el estudio de la microbiota de cualquier ambiente dando origen a la metagenómica.

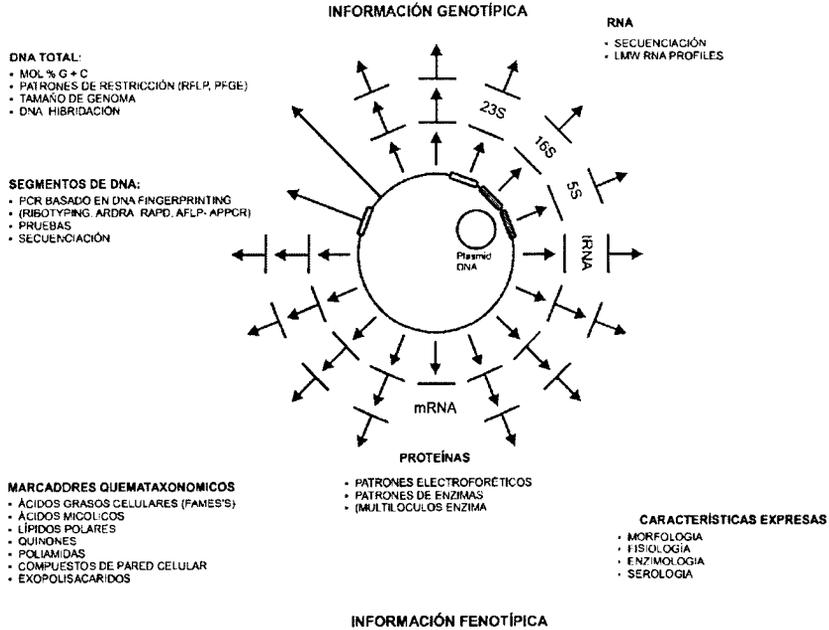


Figura 8. Representación esquemática de los distintos componentes celulares y las técnicas utilizadas en taxonomía bacteriana polifásico (adaptado de Vyamme et al. 1996a). Fuente: Brenner et al. 2005.

2.5.1 Metagenómica

La metagenómica es el estudio de la microbiota obtenida a partir de DNA genómico (gDNA) extraído de muestras ambientales. La calidad y pureza del gDNA es un requisito básico para utilizar esta técnica. Como se sabe, la forma en que se extrae el gDNA de una muestra afecta la recuperación de la comunidad microbiana (Rajesh et al. 2013). Una forma de recuperar gDNA de muestras de suelo es adicionar perlas de vidrio de tamaño pequeño para aplicar presión suficiente como para romper las células bacterianas sin causar ningún daño al DNA. Las perlas de vidrio junto con el suelo y los residuos de mayor tamaño son eliminados por centrifugación. Las sustancias húmicas son removidas mediante técnicas de purificación (Rajesh et al. 2013).

Una vez que se obtienen las lecturas de secuenciación del DNA, lo primero que se realiza es estimar el contenido taxonómico de cada muestra, lo segundo es calcular el contenido funcional y por último comparar las diferencias entre las muestras de estudio. El contenido taxonómico se genera mediante el alineamiento de las secuencias al utilizar programas específicos como BLASTX, ClustalW, mothur y QUIMME. En estos dos últimos programas se requiere de bases de datos como SILVA y Greengenes. SILVA y Greengenes son bases

de datos de secuencias obtenidas de la unidad ribosomal 16S, 18S, 23S y 28S de los dominios Arquea, Bacteria y Eucariota.

El propósito de los estudios comparativos metagenómicos es comprender la diferencia en estructura y función de cada comunidad microbiana en diferentes ambientes. Por lo que se han desarrollado herramientas como el programa STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles), el cual realiza el análisis de perfiles metagenómicos, tales como perfiles taxonómicos que indican el número de genes asignados a diferentes unidades taxonómicas o perfiles funcionales que indican el número de secuencias que contribuye a un subsistema o vía. Además, utiliza datos generados en otras aplicaciones como MG-RAST, IMG/M. mothur, CoMet y RITA (Parks y Beiko, 2013).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los suelos son el recurso geológico no renovable más importante que tenemos para asegurar el agua, la energía y la alimentación de las generaciones presentes y futuras. Las funciones y los servicios que brinda el suelo adquieren la categoría de bien común, cuya protección nos beneficia a todos. Por lo que se requieren alianzas estratégicas y cooperación a escala mundial en la búsqueda de sistemas de manejo agrícola que den sustento a la producción y reduzcan el impacto ambiental, considerando la dinámica de los ciclos biogeoquímicos, siendo el ciclo del N clave en este contexto. Los diferentes sistemas de manejo agrícola condicionan y regulan la dinámica bacteriana asociada a los procesos del ciclo del N en el suelo; lo que implica el grado de disponibilidad del N para las plantas y el impacto ambiental. Ante tal planteamiento, ¿Cuál es la dinámica y abundancia bacteriana en los diferentes procesos del ciclo del nitrógeno en diferentes sistemas agrícolas, cuando su manejo varía en el tipo de labranza, incorporación de residuos, insumos químicos u orgánicos y topología del cultivo para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en la zona oriente del Valle de México?. La respuesta brindará elementos para identificar un posible indicador robusto y sensible para medir la calidad del suelo bajo diferentes sistemas de manejo agrícola, respecto a la producción y productividad, e impacto ambiental.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Describir la dinámica bacteriana asociada a los diferentes procesos del ciclo del nitrógeno en diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en la zona oriente del Valle de México.

4.2 Específicos

Extraer, amplificar y secuenciar el DNA genómico de la comunidad bacteriana del suelo de siete diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo en la zona oriente del Valle de México.

Conocer la diversidad bacteriana asociada a los diferentes procesos del ciclo del nitrógeno en siete diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo en la zona oriente del Valle de México.

Analizar la participación funcional de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno en los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo en la zona oriente del Valle de México.

V. HIPÓTESIS

La diversidad y abundancia bacteriana asociada al ciclo del N aumentará en sistemas con labranza mínima (ZT) e incorporación de residuos (+r).

La estructura funcional de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno estará en mayor equilibrio en los sistemas con labranza mínima (ZT) e incorporación de residuos (+r)

-

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sitio de estudio y muestreo

El sitio de estudio se ubica en Cocotitlán, Estado de México (19°14'18.39" N y 98°52'21.42 O, 2 572 msnm). El suelo está formado por material parental de cenizas volcánicas es un Andosol vítrico éutrico epiarénico (WRB) (Cuadro 4). El clima es de tipo C(w1) (w), temperatura subhúmeda con lluvias en verano (García, 2004). La temporada de lluvia se extiende de mayo a octubre con una precipitación promedio anual de 784 mm. En el sitio de estudio se había cultivado ebo (*Vicia sativa*) en años anteriores.

Cuadro 4. Características físico químicas del suelo del sitio de estudio para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en la zona oriente del Valle de México.

Horizonte	Profundidad [cm]	Color		Textura arena	Estructura	Consistencia	Permeabilidad
		Seco	Húmedo				
Ap	0-20	10YR 5/2	10 YR 3/2	Francosa	Granular	Suelta	rápida
Bw	20-30	10YR 4/2	10 YR 3/3	Francosa	Bloques subangulares	Ligeramente dura	rápida
	PH	CE	TOC (%)	CIC	Na	K	Ca
Ap	6	0.22 dSm ⁻¹	0.65	12.33	2.7 CmolKg ⁻¹	0.19 CmolKg ⁻¹	3.86 CmolKg ⁻¹

6.2 Diseño experimental

El experimento se estableció en un diseño de bloques al azar (Figura 9) con siete tratamientos (Cuadro 5). Cada unidad experimental fue de 30 m de largo por 6.6 m de ancho, la distancia de separación entre repeticiones fue de 3 m y la distancia de separación de otras áreas de cultivo fue de 5 m. La distancia entre surcos fue de 0.8 m y 0.2 m entre plantas.

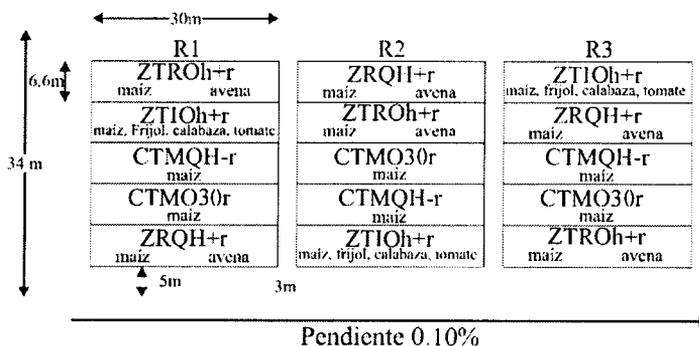


Figura 9. Diseño experimental para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en la zona oriente del Valle de México.

Las características de manejo para la producción de maíz nativo (chalqueño) se basaron en tipo de labranza (mínima: ZT y convencional: CT), el manejo de cultivo (rotación: R, monocultivo: M y cultivos intercalados: I), el uso de insumos orgánicos (O) y sintéticos (Q).

Los tratamientos ZTIOh+r y ZTRO+r(a/m) fueron fertilizados con estiércol de vaca compostado añadido a cada planta (4.4 t ha^{-1}); CTMO30r, en el que dos fertilizaciones se llevaron a cabo, la primera consistió en estiércol de vaca compostado (1.166 t ha^{-1}) y el segundo con un compost de estiércol diferente (2.733 t ha^{-1}). En 2013, la primera fertilización en los tratamientos ZTIOh+r y ZTROh+r(a/m) consistieron en una aplicación de microorganismos de montaña y 500 kg ha^{-1} de polvo de roca de basalto (187.5 kg), mientras que la segunda consistió en el estiércol compostado de oveja (3.3 t ha^{-1}) y estiércol de pollo (1.1 t ha^{-1}); CTMO30r, en el que la primera fertilización consistió en el estiércol seco de oveja (3.3 t ha^{-1}) y polvo de roca basáltica ($0,5 \text{ t ha}^{-1}$), mientras que el segundo abono de pollo (1.1 t ha^{-1}). Las arvenses fueron removidas manualmente. En 2012 y 2013, el manejo sintético consistió de fertilización con urea (243.5 kg ha^{-1}) y superfosfato triple de calcio (50 kg ha^{-1}), mientras que el herbicida (Hierbamina (2,4 D)) se aplicó a una velocidad de $12.5 \text{ Ly}^{-1}\text{ha}^{-1}$.

Antes de la implementación de los sistemas de manejo agrícola se realizó un muestreo y después del primer ciclo agrícola dos, uno en época de lluvia y otro en época de seca para los años 2013 y 2014. Las muestras de suelo fueron colectadas de 0-10 cm de profundidad. De cada unidad experimental se tomó una muestra compuesta a partir de seis submuestras las cuales fueron colocadas en una hielera. En laboratorio, las muestras fueron pasadas por un tamiz antes de ser almacenadas -70°C .

6.3 Comunidad Bacteriana Asociada al Ciclo del Nitrógeno (CBN)

El DNA genómico (gDNA) fue extraído con el kit NucleoSpin® Soil a partir de 0.5 g de suelo. El rendimiento y pureza del gDNA se valoró en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La verificación de la calidad del gDNA se efectuó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™. La observación y fotodocumentación del gel se realizó en el iluminador de luz ultravioleta Imager® Gel Doc™ XR (Bio Rad). Por cada evaluación, el pool de gDNA se formó de los gDNA de los triplicados de cada sistema. De cada pool se amplificó la región V4-V5 y todas las amplificaciones fueron secuenciadas mediante Illumina MiSeq (Reserch and Testing Laboratory of the South Plains LLC).

6.4 Diversidad bacteriana

La caracterización funcional de cada género fue verificada con la ayuda de publicaciones que hacen referencia a la función o confirmación de genes asociados al ciclo del N, con la ayuda de la base de datos Kioto Encyclopedia for Genes y Genomas (KEGG) (Kanehisa y

Goto 2000) y la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las categorías para agrupar a la CBN con base en su metabolismo energético fueron: desnitrificantes (DEN), fijadores de nitrógeno (NF), nitrificantes (NI), removedores de nitrato (NR) y las diferentes combinaciones de ellos (Figura 10).

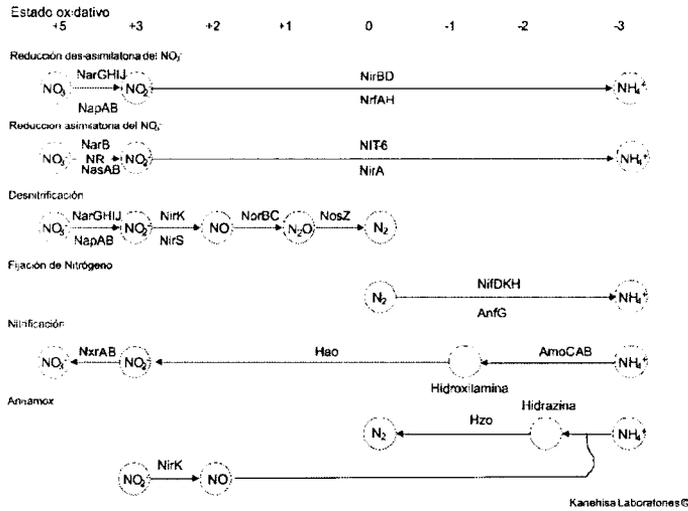


Figura 10. Confirmación de genes con base en el metabolismo energético del nitrógeno. Fuente: Kanehisa y Goto 2000.

La CBN fue estratificada en tres tipos: una comunidad única en cada sistema de manejo agronómico, una comunidad común en todos los sistemas de manejo y una comunidad común a algún sistema de manejo agrícola.

La abundancia relativa de cada género fue calculada con la siguiente fórmula:

$$ab = \frac{\text{Número de secuencias}}{\text{Total de secuencias identificadas}}$$

La similitud de las comunidades entre los diferentes sistemas de manejo agrícola se obtuvo con el índice de similitud de Jaccard con la siguiente fórmula:

$$I_j = \frac{c}{a + b - c}$$

donde a = número de géneros en el sitio A, b = número de géneros en el sitio B y c = número de géneros presentes en ambos sitios.

6.5 Funcionalidad bacteriana

Las categorías que se utilizaron para agrupar la comunidad bacteriana funcional del ciclo del N con base en su metabolismo energético fueron: desnitrificantes (DEN), fijadores de nitrógeno (NF), nitrificantes (NI), removedores de nitrato (NR) y las diferentes combinaciones de ellos.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los suelos destinados a la producción de alimentos son expuestos a diferentes prácticas agrícolas. Como resultado de ello se modifican las propiedades físicas, químicas, bioquímicas y sobre todo la estructura microbiana del suelo. La microbiota es un bioindicador de las condiciones de este recurso. Identificar que comunidades son susceptibles a estos cambios permite discernir la presencia, interacción y función de la microbiota en suelos agrícolas, como indicadora de la calidad del mismo o de los procesos que allí ocurren, lo cual desde el punto de vista agronómico podría coadyuvar a generar condiciones propicias para el desarrollo de las plantas, así como, controlar el impacto ambiental. A continuación, se describe el cambio en diversidad y abundancia de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del N en un suelo con diferentes sistemas de manejo agrícola.

7.1 Composición de la comunidad bacteriana del suelo sometido a diferentes manejos agrícolas

La comunidad bacteriana obtenida de la secuenciación masiva extraída a partir de DNA genómico de diferentes muestras de suelo fue distribuida en 22 filos, 38 clases, 79 ordenes, 151 familias, 275 géneros y 78 especies. Las secuencias no reconocidas a nivel de especie fueron catalogadas como “no clasificada” (76 especies), “desconocida” (243 especies) y como “sp” (192 especies).

De las especies “desconocidas” (las cuales no han sido reportadas) fueron reconocidas a nivel de filo 13 especies, a nivel de clase 16 especies y a nivel de orden 46 especies. En la categoría “no clasificada” (que se refiere a bacterias ya reportadas y que aún no han sido caracterizadas morfológicamente) a nivel de filo fueron 14 especies, a nivel de clase 20 especies y a nivel de orden 43 especies. Las secuencias clasificadas como “sp” todas fueron reconocidas a nivel de género.

A nivel de especie, 13 de las bacterias reconocidas en el suelo de todos los sistemas manejo agrícola registró metabolismo energético asociado al ciclo del N; dentro de las cuales se identificaron desnitrificantes (DE, 2.6%), removedores de NO_3^- (NR, 2.6%), especies con dos, tres y cuatro tipos de metabolismo relacionado al ciclo del N (69.2%) (Cuadro 5). Nueve de las especies fueron identificadas después de la implementación de los diferentes sistemas de manejo agrícola.

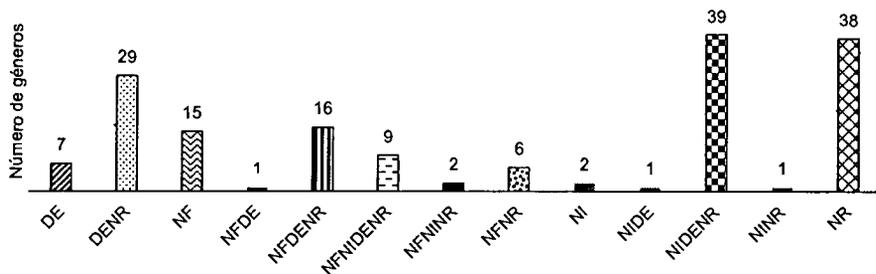
Cuadro 5. Clasificación de 13 especies bacterianas con base en el tipo de metabolismo energético relacionado al ciclo del nitrógeno, identificadas a partir de gDNA de muestras de suelo con diferente manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014.

Filo	Género	Especie	NapAB	NerB	NerGHU	NnsAB	NfD/KH	NfA	NfBD	NfK	NorAB	NorBC	NosZ	NrFAH
Desnitrificación (DE)														
Proteobacteria	<i>Legionella</i>	<i>Legionella pneumophila</i> *										+		
Chloroflexi	<i>Thermomicrobium</i>	<i>Thermomicrobium roseum</i> *												+
Desnitrificación/ reducción asimilatoria del NO₃⁻/ reducción des-asimilatoria del NO₃⁻ (DENR)														
Proteobacteria	<i>Sorangium</i>	<i>Sorangium cellulosum</i> *	+			+			+			+		+
Bacteroidetes	<i>Dyadobacter</i>	<i>Dyadobacter fermentans</i> *		+					+					+
Chloroflexi	<i>Sphaerobacter</i>	<i>Sphaerobacter thermophilus</i> *								+				+
Fijación del N/ nitrificación/ desnitrificación/ reducción asimilatoria del NO₃⁻/ reducción des-asimilatoria del NO₃⁻ (NFNIDENR)														
Verrucomicrobia	<i>Coraliomargarita</i>	<i>Coraliomargarita ekajimensis</i> *	+			+	+	+	+					+
Fijación del N/ reducción asimilatoria del NO₃⁻/ reducción des-asimilatoria del NO₃⁻ (NFNR)														
Firmicutes	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium botulinum</i>					+	+						
Proteobacteria	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium tropici</i> *				+	+		+					
Nitrificación/ desnitrificación/ reducción asimilatoria del NO₃⁻/ reducción des-asimilatoria del NO₃⁻ (NIDENR)														
Proteobacteria	<i>Anaeromyxobacter</i>	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> *	+	+					+		+	+	+	+
Actinobacteria	<i>Stacckebbrandtia</i>	<i>Stacckebbrandtia nassauensis</i> *			+	+			+		+			
Actinobacteria	<i>Conexibacter</i>	<i>Conexibacter woesei</i>			+						+			
Reducción asimilatoria del NO₃⁻/ reducción des-asimilatoria del NO₃⁻ (NR)														
Bacteroidetes	<i>Cytophaga</i>	<i>Cytophaga hutchinsonii</i> *		+					+					
Planctomycetes	<i>Pirellula</i>	<i>Pirellula staleyi</i>				+			+	+				

* Especies identificadas después de la implementación de todos los sistemas de manejo agrícola.

A nivel de género, 164 de los géneros obtenidos de la secuenciación masiva presentó metabolismo energético asociado al ciclo del N. Los demás géneros fueron clasificados en diferentes metabolismos (amino ácidos 1.1%, fijación de carbono 0.4%, descomponedores 9.8%, degradación 3.6%, fijación de metano 2.2% y desconocida 22.5%).

Los géneros con metabolismo energético asociado al ciclo del N, fueron distribuidos en 13 categorías. Es importante señalar que la mayoría de los microorganismos obtienen el N directamente de NH₄⁺ o mediante la reducción del NO₃⁻ a NH₄⁺ a través de un proceso conocido como reducción asimilatoria del NO₃⁻ (Canfield et al. 2010). De tal forma que 38 géneros con esta función fueron clasificados en la categoría removedor de NO₃⁻ (Figura 11).



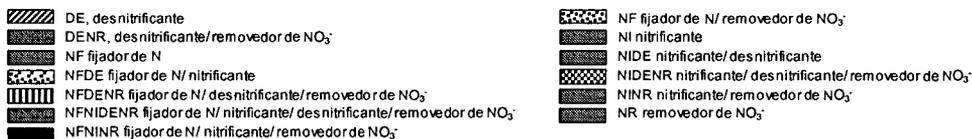


Figura 11. Distribución de géneros de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del Nitrógeno presente en suelos de todos los diferentes sistemas de manejo agrícola con base en el metabolismo energético registrado en la base de datos KEGG y revisión de literatura.

En algunas categorías se registró un género, por lo que fue necesario reagrupar estos géneros en otras categorías. Por ejemplo, la categoría fijador de N-desnitrificante (NFDE: 1 género) con la categoría fijador de N-desnitrificante-removedor de NO₃⁻ (NFDENR). La categoría nitrificante (NI: 2 géneros), la categoría nitrificante-desnitrificante (NIDE: 1 género) y la categoría nitrificante-removedor de NO₃⁻ (NINR: 1 género) con la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de NO₃⁻ (NIDENR). La categoría fijador de N-removedor de NO₃⁻ (NFNR: 6 géneros) con la categoría fijador de N-nitrificante-removedor de NO₃⁻ (NFNINR). El número de categorías disminuyó a 8 (Figura 12).

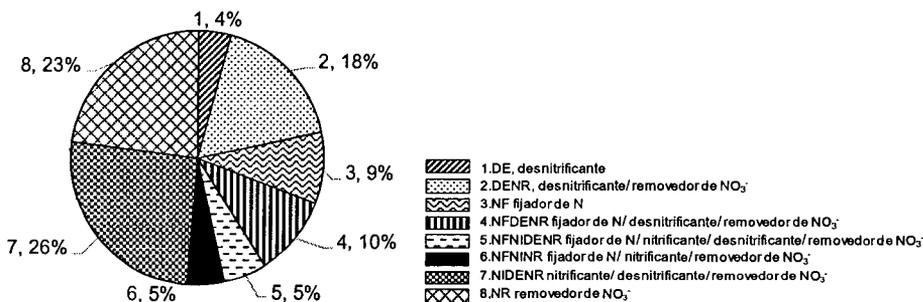


Figura 12. Reclasificación de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno presente en suelo de todos los diferentes sistemas de manejo agrícola con base al metabolismo energético registrado en la base de datos KEGG y revisión de literatura.

Así se conformó la Comunidad Bacteriana asociada al ciclo del Nitrógeno (CBN) de los suelos de todos los sistemas de manejo agrícola evaluados, en 15 filos, 28 clases, 58 ordenes, 98 familias, 164 géneros y 13 especies (Apéndice: Cuadro 1A). En los que se incluyeron fijadores de N (9%), desnitrificantes (4%) y algunos géneros con más de un tipo de metabolismo relacionado al ciclo del N (45.7%).

Es importante señalar que el 38.4% de la CBN fue registrada después de la implementación de las diferentes prácticas de manejo (Cuadro 6), ello reafirma la idea que los manejos agrícolas influyen en la composición y actividad de la comunidad bacteriana del suelo. Las categorías que se favorecieron por estos cambios fueron nitrificante-removedor de NO₃⁻ (NR),

nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NIDENR) y desnitrificante-removedor de NO_3^- (DENR).

Cuadro 6. Géneros nuevos registrados después de la implementación de los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México durante los ciclos 2013 y 2014.

Filo	Género	Función	AntG	Hao	PmoA	NarGHU	NapAB	NarB	NasAB	NiDKH	NirA	NirBD	NirK	NirS	NIT-6	NerAB	NerBC	NosZ	NirAH
Bacteroidetes	<i>Elizabethkingia</i>	DE															+		
Actinobacteria	<i>Thermobifida</i>	DENR											+						
Bacteroidetes	<i>Halscomenobacter</i>	DENR						+									+	+	
Chloroflexi	<i>Anaerolinea</i>	DENR												+					+
Cyanobacteria	<i>Cyanobacterium</i>	DENR						+			+						+		
Firmicutes	<i>Carboxythermus</i>	DENR						+				+							
Firmicutes	<i>Thermaerobacter</i>	DENR									+		+						
Ignavibacteriae	<i>Ignavibacterium</i>	DENR																+	+
Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	DENR				+			+			+							
Proteobacteria	<i>Alcaligenes</i>	DENR																	
Proteobacteria	<i>Cellvibrio</i>	DENR									+						+		
Proteobacteria	<i>Myxococcus</i>	DENR				+						+							+
Proteobacteria	<i>Sorangium</i>	DENR					+		+			+					+		+
Firmicutes	<i>Candidatus Desulfurudis</i>	NF								+									
Firmicutes	<i>Eubacterium</i>	NF																	
Fusobacteria	<i>Fusobacterium</i>	NF								+									
Proteobacteria	<i>Inquilinus</i>	NF																	
Spirochaetes	<i>Spirochaeta</i>	NF									+								
Cyanobacteria	<i>Chroococcidiopsis</i>	NFDENR						+		+							+		
Firmicutes	<i>Desulfosporosinus</i>	NFDENR					+			+							+	+	+
Proteobacteria	<i>Desulfovibrio</i>	NFDENR				+	+			+		+							+
Proteobacteria	<i>Rhodobacter</i>	NFDENR	+				+		+	+			+				+	+	+
Verrucomicrobia	<i>Coraliomargarita</i>	NFDENR					+		+	+		+							+
Proteobacteria	<i>Herbaspirillum</i>	NFNIDENR				+			+	+		+							
Proteobacteria	<i>Pantoea</i>	NFNIDENR				+	+		+	+		+					+		
Proteobacteria	<i>Polaromonas</i>	NFNIDENR				+			+	+		+	+				+	+	
Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i>	NFNR						+		+	+								
Firmicutes	<i>Syntrophomonas</i>	NFNR								+									+
Proteobacteria	<i>Beggiatoa</i>	NFNR							+	+		+							
Proteobacteria	<i>Nitrosovibrio</i>	NI																	
Proteobacteria	<i>Nitrosococcus</i>	NIDE		+	+														
Actinobacteria	<i>Blastococcus</i>	NIDENR				+							+			+		+	
Actinobacteria	<i>Brachybacterium</i>	NIDENR				+						+				+		+	
Actinobacteria	<i>Gordonia</i>	NIDENR				+						+				+		+	
Actinobacteria	<i>Stackebrandtia</i>	NIDENR				+			+			+				+		+	
Deinococcus-Thermus	<i>Thermus</i>	NIDENR				+					+		+	+			+	+	
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	NIDENR				+													+
Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>	NIDENR				+						+					+	+	
Proteobacteria	<i>Alcanivorax</i>	NIDENR				+			+			+	+			+	+	+	
Proteobacteria	<i>Halomonas</i>	NIDENR				+			+			+				+			
Proteobacteria	<i>Nitrosomonas</i>	NIDENR		+	+								+				+		
Proteobacteria	<i>Ochrobactrum</i>	NIDENR				+							+			+	+	+	
Proteobacteria	<i>Paracoccus</i>	NIDENR				+	+		+			+		+		+	+	+	
Proteobacteria	<i>Ralstonia</i>	NIDENR				+	+		+			+	+	+		+	+	+	
Actinobacteria	<i>Actinokineospora</i>	NR																	
Actinobacteria	<i>Dietzia</i>	NR																	
Actinobacteria	<i>Marmoricola</i>	NR																	
Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	NR																	
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	NR																	+
Bacteroidetes	<i>Cytophaga</i>	NR											+						
Bacteroidetes	<i>Spirosoma</i>	NR										+	+						
Cyanobacteria	<i>Arthrospira</i>	NR									+								
Cyanobacteria	<i>Leptolyngbya</i>	NR									+	+							
Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>	NR							+										
Firmicutes	<i>Oscillibacter</i>	NR											+						
Firmicutes	<i>Thermoanaerobacter</i>	NR											+						
Planctomycetes	<i>Isosphaera</i>	NR											+						
Proteobacteria	<i>Acetobacter</i>	NR											+						
Proteobacteria	<i>Coralliococcus</i>	NR											+						
Proteobacteria	<i>Granulibacter</i>	NR							+			+							+
Proteobacteria	<i>Parvularcula</i>	NR										+	+						
Proteobacteria	<i>Sendarcinus</i>	NR										+							
Proteobacteria	<i>Thermovum</i>	NR										+							

DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .

7.2 CBN a nivel de especie en los diferentes sistemas de manejo agrícola

De las 13 especies asociadas al ciclo del N, la presencia de *Clostridium botulinum* y *Pirellula staleyi* fue confirmada en todos los manejos agrícolas a diferencia de la especie *Stackebrandtia nassauensis* que fue registrada solo en el sistema ZTRQH+rm. Ningún sistema registró las 13 especies (Apéndice: Figura 1A). Por ejemplo, el sistema CTMQH-r registró ocho especies, pero no todas las especies se manifestaron en la misma época. A diferencia del sistema ZTROh+ra con seis especies y cinco de ellas registradas en época de seca de 2014. Este último sistema en comparación al sistema CTMQH-r podría estar generando una condición de suelo, más estable que permite la presencia de las comunidades a pesar de la fluctuación climática. Posible amortiguador MOS.

La abundancia relativa de cada especie fluctuó en el intervalo comprendido entre 3E-5 y 76E-5. La abundancia relativa máxima la registró la especie *D. fermentans* (DENR) en época de seca bajo el sistema ZTROh+ra. El valor mínimo de abundancia relativa fue identificado en la especie *C. botulinum* en el sistema ZTRQH+ra en época de Lluvia de 2014.

7.3 Estratificación de la CBN a nivel de género

7.3.1 CBN única

La CBN única se formó de 24 géneros; los cuales pertenecieron a siete filos: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria y Deinococcus-Thermus (Apéndice: Cuadro 2A). Los géneros de esta comunidad pertenecieron a las ocho categorías asociadas al ciclo del N. Al menos, ocho géneros fueron de la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NIDENR), seis géneros en la categoría removedor de NO_3^- (NR). En ésta comunidad, 23 géneros fueron identificados después de la implementación de los diferentes tratamientos. La presencia de los géneros fue oscilante (una, dos o tres evaluaciones); una vez identificado el género *Desulfosporosinus* su presencia fue continua.

Los sistemas ZTRQH+ra y ZTRQH+rm registraron cinco géneros, el sistema ZTIOh+r cuatro géneros, los sistemas CTMO30r, CTMQH-r y ZTROh+rm tres géneros y el sistema ZTROh+ra un género. Con respecto a la medición inicial, las condiciones del sistema ZTIOh+r estimularon un aumento en la abundancia relativa del género *Terriglobus* de 3.5E-5 a 5.9E-5. A diferencia del resto de los sistemas de manejo agrícola, el sistema ZTRQH+ra en las cuatro épocas de evaluación presentó miembros de la CBN única. La abundancia relativa de cada género varió en el intervalo entre 0.47E-4 a 3.25E-4 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno única obtenida de la secuenciación masiva y presente en los suelos de cada uno de los sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocotlán, Estado de México, durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014.

Filo	Género	Categoría	Sistema	Abundancia relativa			
				2013		2014	
				Lluvia	Seca	Lluvia	Seca
Acidobacteria	<i>Terriglobus*</i>	NR	ZTIOh+r				0.000059
Actinobacteria	<i>Blastococcus</i>	NIDENR	CTMO30r	0.000114			
Actinobacteria	<i>Dietzia</i>	NR	CTMO30r	0.000171			
Actinobacteria	<i>Marmoricola</i>	NR	CTMQH-r			0.000138	
Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	NR	ZTROh+rm	0.000084			
Actinobacteria	<i>Stackebrandtia</i>	NIDENR	ZTRQH+rm	0.000133			
Actinobacteria	<i>Thermobifida</i>	DENR	ZTRQH+ra		0.000122		
Bacteroidetes	<i>Elizabethkingia</i>	DE	CTMQH-r				0.000134
Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i>	NFNINR	ZTIOh+r		0.000118		
Deinococcus-Thermus	<i>Thermus</i>	NIDENR	ZTRQH+ra		0.000122		
Firmicutes	<i>Candidatus Desulforudis</i>	NF	CTMQH-r				0.000134
Firmicutes	<i>Desulfosporosinus</i>	NFDENR	ZTRQH+ra		0.000203	0.000047	0.000119
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	NIDENR	CTMO30r		0.000101		
Firmicutes	<i>Oscilibacter</i>	NR	ZTIOh+r	0.000135			
Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>	NIDENR	ZTROh+rm				0.000325
Firmicutes	<i>Thermaerobacter</i>	DENR	ZTROh+rm	0.000084			
Proteobacteria	<i>Acetobacter</i>	NR	ZTRQH+ra	0.000199			
Proteobacteria	<i>Alcaligenes</i>	DENR	ZTRQH+rm				0.000089
Proteobacteria	<i>Alcanivorax</i>	NIDENR	ZTRQH+rm				0.000089
Proteobacteria	<i>Beggiatoa</i>	NFNINR	ZTRQH+rm			0.000065	
Proteobacteria	<i>Halomonas</i>	NIDENR	ZTRQH+ra			0.000141	
Proteobacteria	<i>Inquilinus</i>	NF	ZTIOh+r	0.000135			
Proteobacteria	<i>Polaromonas</i>	NFNIDENR	ZTROh+ra	0.000124			
Proteobacteria	<i>Ralstonia</i>	NIDENR	ZTRQH+rm	0.000133			

* género identificado antes de implementar los diferentes sistemas de manejo.

ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvenso químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.

DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO₃⁻, NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO₃⁻, NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO₃⁻, NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO₃⁻ y NR= removedor de NO₃⁻.

La abundancia total por sistema fluctuó en el intervalo entre 0.4E-4 a 4.5E-4 (Figura 12). Los sistemas con labranza mínima (ZT) registraron valores máximos de abundancia a partir de la segunda época de evaluación a diferencia de los sistemas con labranza convencional (CT). Por los datos analizados se podría suponer que se requiere mínimo de un ciclo agrícola para mostrar diferencias en la composición de la CBN únicas asociadas al manejo. El aumento de abundancia de la CBN única que mostraron los tratamientos con ZT con respecto a CT, muestra que el no movimiento de suelo coadyuva al crecimiento de dicha comunidad (Reicosky 1997, Colloff et al. 2008, Shen et al. 2011, Davinic et al 2012).

En específico, en el sistema ZTRQH+ra se registró mayor abundancia a lo largo del tiempo (Figura 13), lo cual podría atribuirse al incremento de materia orgánica o a la diversidad metabólica de algunos de los géneros (Aislabe y Deslippe, 2013).

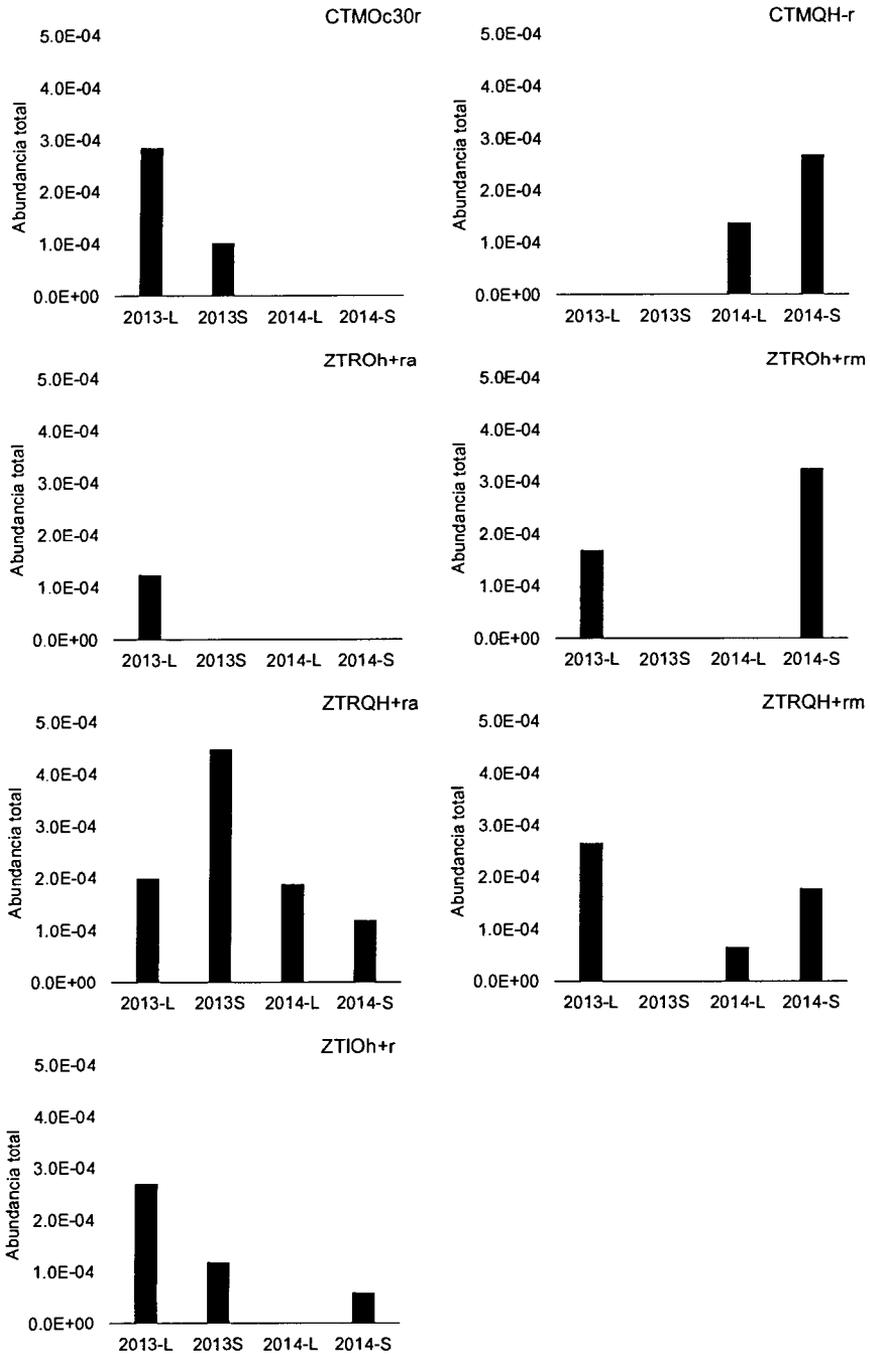


Figura 13. Abundancia total de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno única de los diferentes sistemas de manejo agrícola implementados durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014 para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el Municipio de Cocotitlán, Estado de México. ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.

7.3.2 CBN común

La CBN común fue conformada por 88 géneros distribuidos en 12 filos: Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes, Proteobacteria y Verrucomicrobia (Apéndice: Cuadro 3A). Después de la implementación de los diferentes tratamientos, la presencia de 85 géneros fue confirmada en todos los tratamientos. En los ciclos agrícolas 2013 y 2014, la presencia de 51 géneros en todos los sistemas fue intermitente (una, dos o tres evaluaciones) y en 37 de los géneros fue continua (Apéndice: Figura 2A).

El intervalo en el que fluctuó la abundancia relativa de los diferentes géneros fue entre 0.004% y 11.9%. Solo en ocho géneros fue mayor al 1%; dos de estos géneros (*Gemmatimonas* y *Sphingomonas*) la registraron en ambos ciclos agrícolas y en todos los sistemas.

CBN común continua

De los géneros con presencia continua (37 géneros), el 84% incrementó su abundancia después de la implementación de los diferentes tratamientos, el 76% en 2013-L vs 2013-S, el 78% en 2013-L vs 2014-L, el 92% en 2013-S vs 2014-S, el 84% en 2014-L vs 2014-S y después de tres ciclos agrícolas bajo los mismos sistemas de manejo agrícola la abundancia del 46% aumentó (Cuadro 8).

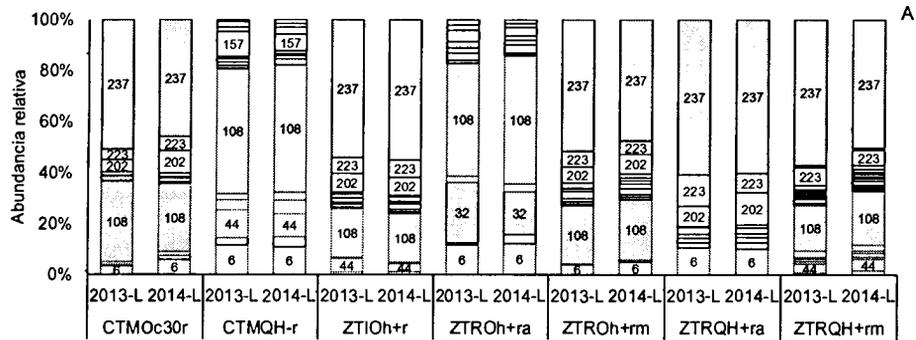
Cuadro 8. Géneros de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común con presencia continua e incrementos positivos en los suelos de cada uno de los sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México, durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014.

Periodo	CTMOc30r	CTMQH-r	ZTIOh+r	ZTROh+ra	ZTROh+rm	ZTRQH+ra	ZTRQH+rm
2011 vs 2013-L	16	14	14	11	21	14	11
2013-L vs 2013-S	16	19	15	15	12	11	18
2013-S vs 2014-L	14	23	21	20	16	20	25
2014-L vs 2014-S	12	13	23	16	9	16	5
2013-L vs 2014-L	12	14	16	12	13	9	20
2013-S vs 2014-S	29	25	23	26	24	24	26
2011 vs 2014-S	6	7	11	11	10	12	9

ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.

En el ciclo 2013-L vs 2014-L, los géneros *Sphingomonas*, *Gemmatimonas* y *Bacillus* fueron los más abundantes, pero no en todos los sistemas (Figura 14A). El género *Sphingomonas* además de fijar N, puede mineralizar herbicidas y solubilizar fosfatos (Souza et al. 2013) y *Bacillus* promueve el desarrollo de la raíz sin inducir auxinas o etileno (Kraiser et al. 2011).

En época de lluvia, el sistema ZTRQH+rm favoreció a 20 géneros y en el sistema ZTIOh+r, la abundancia total creció del 0.077 en 2013-L a 0.139 en 2014-L (Figura 14B). En un sistema con labranza convencional la humedad es baja lo que puede favorecer al género *Gemmatimonas* (DeBruyn et al. 2011). Sin embargo, llama la atención que la mayor abundancia de este género en época de lluvia se detectó en suelo con el sistema ZTROh+ra.



6	<i>Acidobacterium</i>	90	<i>Devosia</i>	151	<i>Methylobacterium</i>	196	<i>Planctomyces</i>
11	<i>Actinomyces</i>	108	<i>Gemmatimonas</i>	154	<i>Micromonospora</i>	202	<i>Prochlorococcus</i>
32	<i>Bacillus</i>	109	<i>Geoalkalibacter</i>	155	<i>Moorella</i>	223	<i>Rubrobacter</i>
35	<i>Bdellovibrio</i>	110	<i>Geobacter</i>	157	<i>Mycobacterium</i>	228	<i>Singulisphaera</i>
44	<i>Bradyrhizobium</i>	125	<i>Hyphomicrobium</i>	168	<i>Nitrospira</i>	237	<i>Sphingomonas</i>
61	<i>Candidatus Solibacter</i>	135	<i>Koileothrix</i>	180	<i>Paenibacillus</i>		
68	<i>Chloroflexus</i>	145	<i>Lysobacter</i>	191	<i>Pelobacter</i>		
74	<i>Conexibacter</i>	149	<i>Mesorhizobium</i>	193	<i>Phenylbacterium</i>		

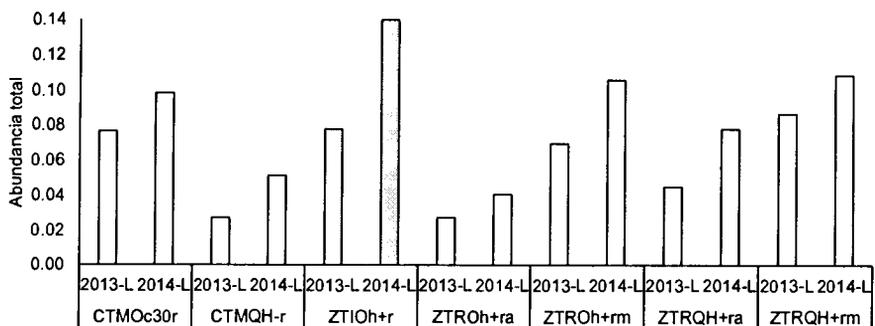


Figura 14. Comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común comparado por época de lluvia. Abundancia relativa por género (A) y abundancia total por sistema (B). ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.

En el ciclo 2013-S vs 2014-S, el número de géneros con incrementos positivos fue de 34. Sin embargo, la abundancia fue menor a la registrada en 2013-L vs 2014-L. Los géneros más abundantes fueron *Artrobacter*, *Gemmatimonas*, *Streptomyces* y *Acidobacterium*. Este último género, en el sistema ZTROh+ra registró una abundancia menor a la reportada en 2013-L vs 2014-L (Figura 15A). El sistema ZTROh+ra benefició a 20 géneros y el sistema ZTIOh+r registró la máxima abundancia total (de 0.032 en 2013-S a 0.079 en 2014-S) en comparación con los otros seis diferentes sistemas de manejo agrícola (Figura 15B).

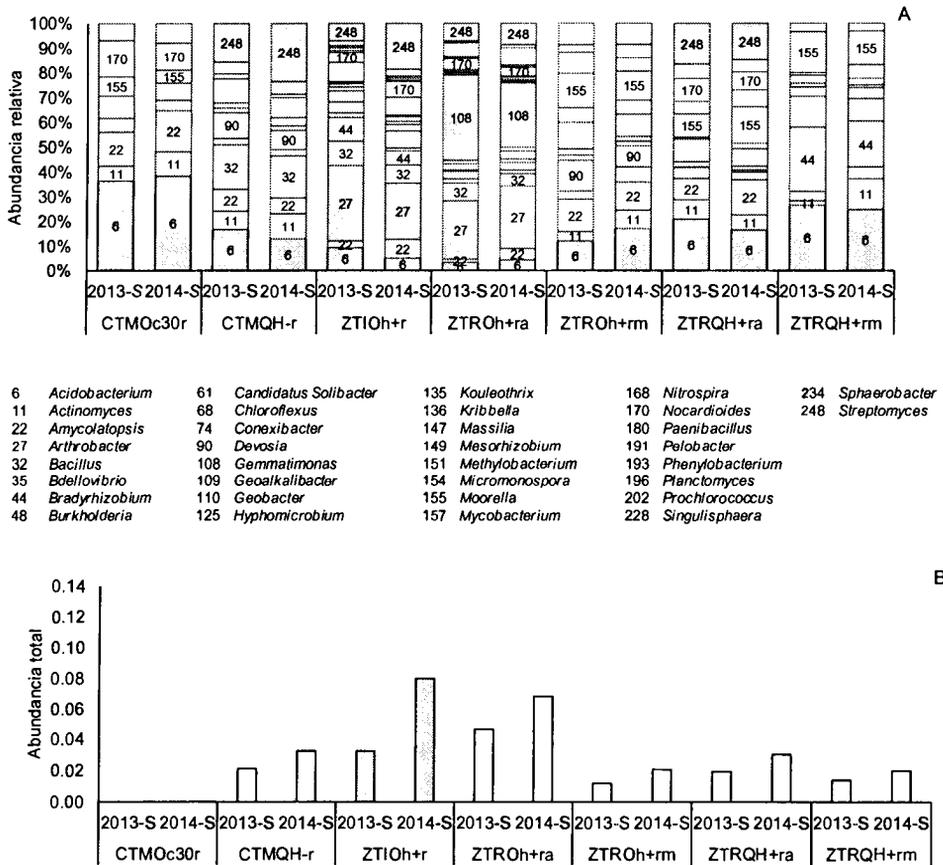
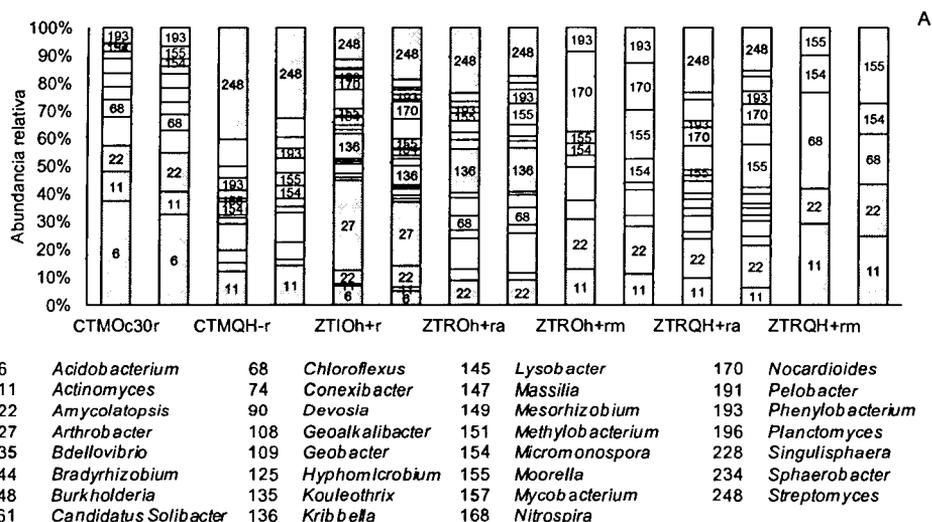


Figura 15. Comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común comparado por época de seca. Abundancia relativa por género (A) y abundancia total por sistema (B). ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.

En el último ciclo (2014-L vs 2014-S), el 84% de los géneros incrementó su abundancia relativa. Los géneros *Acidobacterium*, *Actinomyces*, *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Kribbella*, *Nocardioides* y *Streptomyces* fueron los más abundantes, pero no en todos los sistemas de manejo agrícola (Figura 16A). El sistema ZTIOh+r con 23 géneros incrementó su abundancia de 0.05 (2014-L) a 0.079 (2014-S). El sistema ZTRQH+ra fue el menos favorecido con una abundancia total del 1% y una diversidad de cinco géneros (Figura 16B).

Existe la posibilidad que la capacidad para producir antibióticos y metabolitos secundarios y con ello excluir a otras bacterias ayude a los géneros *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Kribbella* y *Streptomyces* a dominar en algunos sistemas de manejo agrícola (Soares et al. 2006).



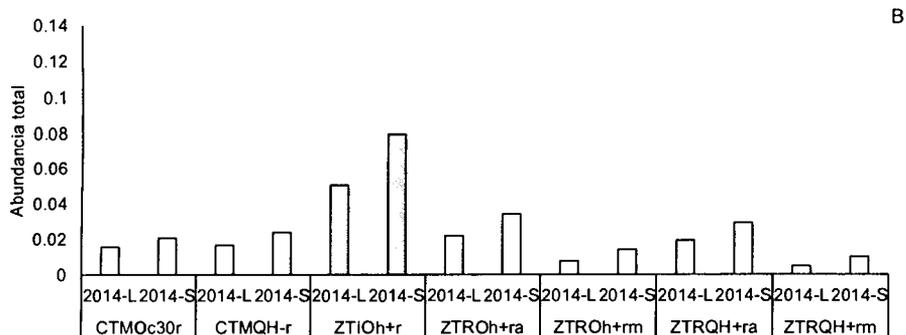


Figura 16. Comunidad CBN asociada al ciclo del nitrógeno del ciclo común agrícola 2014-L vs 2014-S. Abundancia relativa por género (A) y abundancia total por sistema (B). ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, += con residuos, -= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.

Después de tres ciclos agrícolas, los géneros que incrementaron su abundancia relativa con respecto a la inicial del 2011 fueron *Acidobacterium*, *Actinomyces*, *Bdellovibrio*, *Candidatus Solibacter*, *Chloroflexus*, *Gemmatimonas*, *Geoalkalibacter*, *Geobacter*, *Hyphomicrobium*, *Kouleothrix*, *Micromonospora*, *Moorella*, *Nitrospira*, *Pelobacter*, *Planctomyces*, *Prochlorococcus* y *Sphingomonas*.

El género *Gemmatimonas* se favoreció en los sistemas CTMO30r, ZTROh+ra, ZTROh+rm, ZTRQH+ra y ZTRQH+rm, pero la máxima abundancia relativa se registró en el sistema ZTRQH+ra. Las condiciones del sistema CTMQH-r permitieron que la abundancia relativa del género *Sphingomonas* fuera mayor al término del experimento en comparación al valor de 2011. Los géneros *Acidobacterium* y *Prochloroco* registraron incrementos en todos los diferentes sistemas de manejo agrícola (Figura 17A), los valores máximos de abundancia fueron para *Acidobacterium* en el sistema CTMO30r y *Prochloroco* en el sistema ZTIOh+r.

El sistema ZTRQH+ra registró incrementos en 12 géneros, mientras que el sistema con menor número de géneros con incrementos fue el sistema CTMO30r. El sistema CTMQH-r registró siete géneros y la abundancia total máxima por sistema (6%). En contraste, el sistema ZTIOh+r fue el segundo en favorecer la abundancia relativa de 11 géneros, sin embargo, con la abundancia total más baja (1.8%) de todos los sistemas de manejo agrícola (Figura 17B).

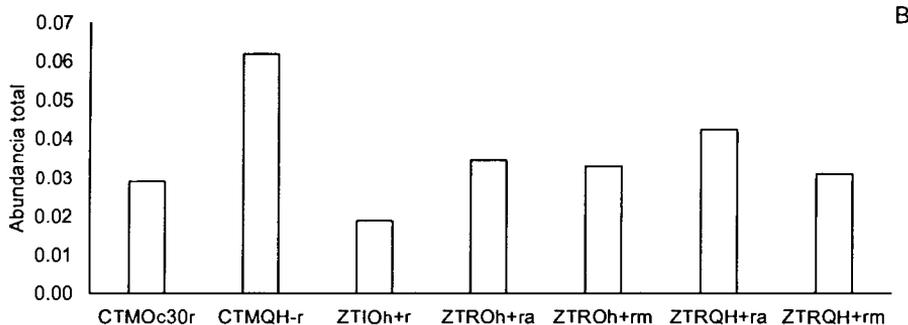
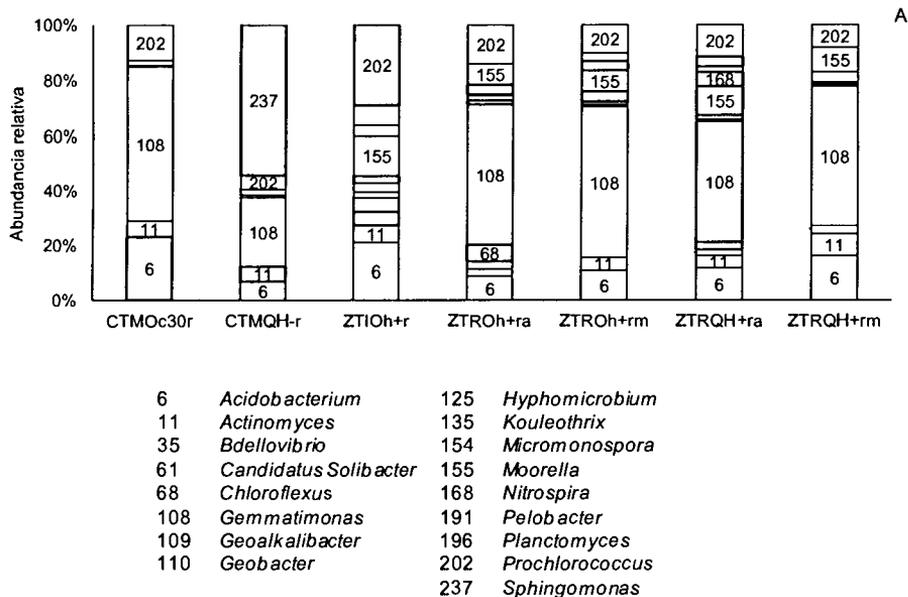


Figura 17. Comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común con incrementos positivos antes y después de la implementación de los diferentes sistemas de manejo agrícola. Abundancia relativa por género (A) y abundancia total por sistema (B). ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.

Intentar explicar el comportamiento de estos géneros es complicado. No obstante, estos géneros pudieran ser utilizados como indicadores de calidad en suelos que son reactivados para la producción agrícola. Diferentes estudios describen las características en las que son favorecidos. Ejemplo de ello son *Gemmatimonas*, *Sphingomonas* y *Planctomyces* (Henrique et al. 2013, Constancias et al. 2014) los cuales incrementan su abundancia en sistemas con labranza convencional, fertilización sintética y baja humedad. Condiciones diferentes a las generadas en suelo de los sistemas ZTIOh+r, ZTROh+ra, ZTROh+rm, ZTRQH+ra y ZTRQH+rm.

A pesar de ello es evidente que los sistemas con labranza mínima y aporte de residuos orgánicos tienen efectos positivos sobre determinadas comunidades bacterianas (Ceja-Navarro et al. 2010). En particular los sistemas ZT10h+r, ZTROh+ra, ZTROh+rm, ZTQRH+ra y ZTRQH+rm favorecieron a comunidades bacterianas como *Gemmatimonas* y *Sphingomonas* que predominan en sistemas con labranza convencional o bien en suelos con aportes de fertilizantes y poca humedad.

CBN común intermitente

De las 21 combinaciones diferentes de las comunidades de cada sistema de manejo agrícola y con base en el índice de Jaccard de la CBN común intermitente se observó que la CBN de los sistemas con labranza mínima (ZT) eran más semejantes que la CBN de los sistemas con labranza convencional (CT) (Figura 18).

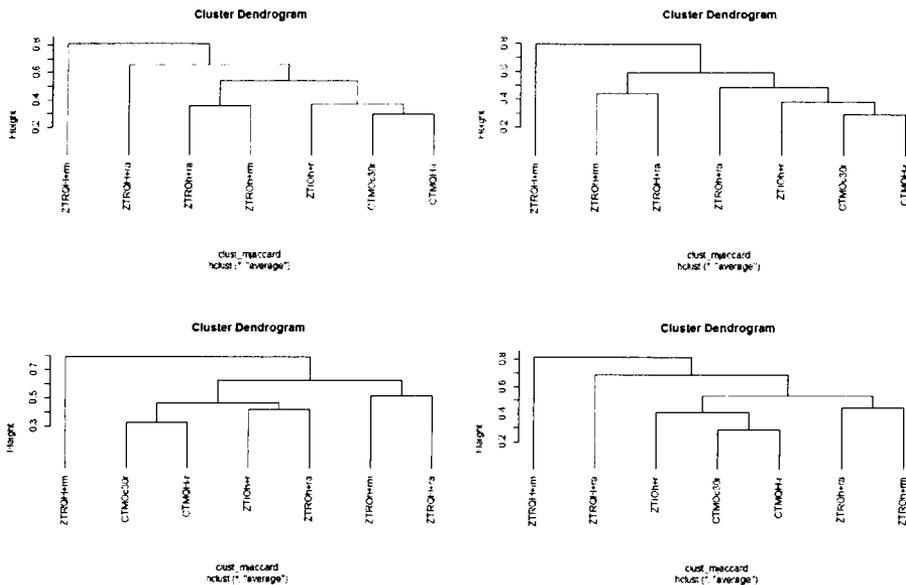


Figura 18. Similitud de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común intermitente de los diferentes sistemas de manejo agrícola. ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, l= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.

7.3.3 CBN común a algunos de los sistemas de manejo agrícola estudiados

La CBN común a algunos de los sistemas de manejo agrícola se formó de 52 géneros (Cuadro 3A), distribuidos en 11 filos (en específico en el filo Proteobacteria: 51.9%) y su presencia fue oscilatoria (en una, dos o tres evaluaciones) a excepción de *Rhodanobacter*

(DENR) y *Paracoccus* (NIDENR) que fueron identificados en las cuatro evaluaciones. La abundancia relativa de cada género osciló en el intervalo $3E-5$ a 0.01.

Es muy posible que estos microorganismos no sean dominantes, como es el caso de *Cyanobacteria* (Wartiainen et al. 2008). O bien, que su presencia esté regulada por los microambientes generados en los diferentes tamaños de agregados presentes en el suelo (Davinic et al. 2012).

El 69.2% de los géneros fue registrado después de la implementación de los diferentes sistemas de manejo agrícola. Lo que demuestra que las prácticas de manejo pueden influir en la presencia o ausencia de la comunidad bacteriana (Henrique et al. 2013). Los géneros pertenecieron a siete categorías relacionadas al ciclo del N, principalmente NR (removedores de NO_3^-) y desnitrificante-removedores de NO_3^- (DENR).

El número de géneros registrados en cada sistema osciló en el intervalo entre 24 a 37 géneros (Cuadro 9). El sistema ZTRQH+ra registró 37 géneros a diferencia de los sistemas CTMQH-r y ZTIOH+r ambos con el menor número de géneros presentes (24 géneros). En todos los sistemas, las categorías DENR y NR predominaron. Mientras que la categoría NIDENR fue sobresaliente en los sistemas CTMO30r, ZTIOH+r, ZTROh+rm, ZTRQH+ra y ZTRQH+m.

Cuadro 9. Comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común a algunos de los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014; clasificada por categoría metabólica.

Categoría	CTMOc30r	CTMQH-r	ZTIOh+r	ZTROh+ra	ZTROh+rm	ZTRQH+ra	ZTRQH+rm
DE	1	2	1	2	2	2	1
DENR	7	5	8	4	7	7	6
NF	3	3	3	3	2	4	1
NFDENR	3	2	4	2	4	2	2
NFNIDENR	2	1	2	3	2	2	3
NIDENR	6	1	5	2	7	6	6
NR	11	10	8	8	12	14	13
Número de géneros	33	24	31	24	36	37	32

DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- . ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.

Al comparar la comunidad obtenida de esta estratificación entre todos los sistemas. De las 28 diferentes combinaciones, las comunidades de los sistemas CTMO30r vs CTMQH-r, CTMQH-r vs ZTROh+ra, CTMO30r vs ZTROh+ra y ZTIOh+r vs ZTROh+ra fueron diferentes entre ellas (Cuadro 10). Mientras que la diversidad de la comunidad obtenida de esta estratificación, en los sistemas con labranza mínima (ZT) fue semejante en un 70%.

Cuadro 10. Relación de semejanza de la comunidad bacteriana común a algunos de los diferentes sistemas de manejo agrícola asociada al ciclo del nitrógeno en un suelo destinado para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México.

Sistema	CTMQH-r	ZTIOh+r	ZTROh+ra	ZTROh+rm	ZTRQH+ra	ZTRQH+rm
CTMO30r	0.39	0.58	0.45	0.79	0.73	0.73
CTMQH-r		0.63	0.42	0.58	0.79	0.54
ZTIOh+r			0.48	0.71	0.77	0.55
ZTROh+ra				0.75	0.75	0.75
ZTROh+rm					0.75	0.72
ZTRQH+ra						0.62

ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos. m= maíz y a= avena

Los géneros que incrementaron su abundancia en época de lluvia fueron *Anaerolinea*, *Gordonia*, *Paracoccus*, *Rhodanobacter* y *Thermomicrobium*. Estos géneros se presentaron en sistema con labranza mínima. En época de seca, el número de géneros que incrementó su abundancia de 2013-S a 2014-S fueron *Actinokineospora*, *Bacteroides*, *Coralloccoccus*, *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Haliscomenobacter*, *Isosphaera*, *Parvularcula*, *Pontibacter*, *Rhodanobacter*, *Sandaracinus*, *Sinorhizobium*, *Spirochaeta* y *Thermomicrobium* (Cuadro 10).

En el sistema CTMO30r se identificaron seis de estos géneros. El género *Sinorhizobium* fue identificado en el sistema CTMO30r y ZTROh+m. Sin embargo, se favoreció por las condiciones del sistema ZTROh+rm. Lo mismo ocurrió con el género *Rhodanobacter* presente en el sistema CTMQH-r y favorecido en el sistema ZTIOh+r (Cuadro 11).

Cuadro 11. Miembros de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común a algunos de los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México con incrementos positivos en los periodos 2013-L vs 2014-L y 2013-S vs 2014-S.

Sistema	Género	Abundancia relativa		Sistema	Género	Abundancia relativa	
		2013-L	2014-L			2013-S	2014-S
ZTIOh+r	<i>Anaerolinea</i>	0.00013	0.00033	CTMO30r	<i>Cytophaga</i>	0.00010	0.00011
ZTROh+ra	<i>Anaerolinea</i>	0.00004	0.00006		<i>Haliscomenobacter</i>	0.00010	0.00011
	<i>Gordonia</i>	0.00008	0.00013		<i>Isosphaera</i>	0.00005	0.00011
	<i>Thermomicrobium</i>	0.00004	0.00006		<i>Parvularcula</i>	0.00005	0.00011
ZTROh+rm	<i>Anaerolinea</i>	0.00038	0.00052		<i>Sandaracinus</i>	0.00005	0.00011
	<i>Rhodanobacter</i>	0.00021	0.00026		<i>Sinorhizobium</i>	0.00010	0.00011
ZTRQH+ra	<i>Paracoccus</i>	0.00005	0.00009	CTMQH-r	<i>Bacteroides</i>	0.00010	0.00013
ZTRQH+ra	<i>Rhodanobacter</i>	0.00010	0.00028		<i>Rhodanobacter</i>	0.00056	0.00094
					<i>Spirochaeta</i>	0.00010	0.00058
					<i>Rhodanobacter</i>	0.00006	0.00130
				ZTIOh+r	<i>Rhodanobacter</i>	0.00006	0.00130
				ZTROh+ra	<i>Actinokineospora</i>	0.00006	0.00011
				ZTROh+rm	<i>Coralloccoccus</i>	0.00005	0.00005
					<i>Pontibacter</i>	0.00010	0.00011
					<i>Sinorhizobium</i>	0.00010	0.00016
				ZTRQH+ra	<i>Coralloccoccus</i>	0.00008	0.00018
					<i>Thermomicrobium</i>	0.00004	0.00006
				ZTRQH+rm	<i>Flexibacter</i>	0.00010	0.00018
					<i>Sandaracinus</i>	0.00015	0.00035

ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.

La abundancia total por sistema varió en el intervalo 5.1E-4 a 0.01. Los sistemas con labranza mínima registraron máximas abundancias. En 2013-L fue el sistema ZTROh+rm, en la evaluación 2013-S fue el sistema ZTRQH+ra, en la evaluación de 2014-L fue el

sistema ZTRQH+rm y en 2014-S fue el sistema ZTIOh+r (Figura 19). La diferencia observada en la evaluación de 2014-L fue producida por el género *Rhodanobacter* que registró una abundancia relativa de 0.01. El género fue registrado en otros sistemas (CTMQH-r, ZTIOh+r, ZTROh+ra y ZTRQH+ra) con un valor de abundancia entre 1E-4 a 2.6E-3.

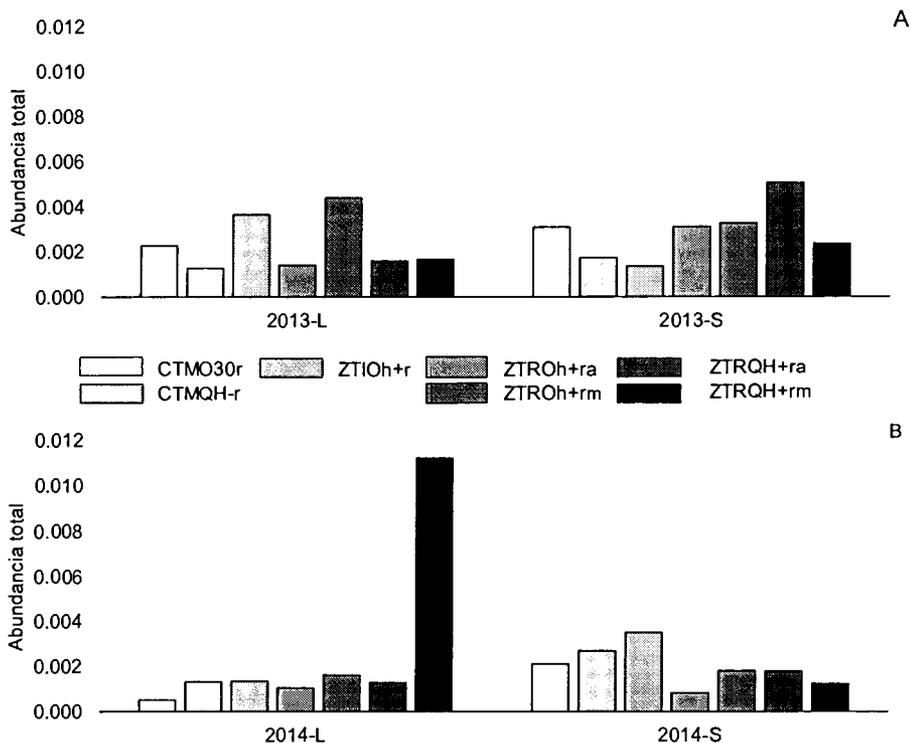


Figura 19. Abundancia de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno común a algunos de los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014. ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, l= intercalado, R= rotación, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H= control de arvense químico, += con residuos, -= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a= avena.

7.4 Clasificación de la CBN a nivel de filo

En época de lluvia de 2013, Actinobacteria predominó y con el tiempo Proteobacteria ocupó su lugar. Es muy posible que la competencia que tienen estos grupos por el nicho ecológico sea el origen de estos cambios (Davinic et al. 2012) y no a la teoría que el filo Proteobacteria es un grupo dominante en cualquier ambiente (Henrique et al. 2013, Degrunne et al. 2015).

Gemmatimonadetes fue el tercer filo más abundante. De acuerdo con DeBruyn et al. (2011) la abundancia del filo Gemmatimonadetes adicional a su versatilidad metabólica, no está

relacionado con el manejo al suelo y sí, inversamente correlacionado con la humedad del suelo.

7.5 Categorías funcionales en el suelo de los diferentes sistemas de manejo agrícola

Los cambios originados por la implementación de los diferentes sistemas de manejo agrícola con base en categorías funcionales asociadas al ciclo del N fueron oscilantes en cada sistema.

Sistema CTMO30r (Ecológico)

En el sistema CTMO30r, el 30% de la abundancia total fue atribuida a la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NIDENR). Es muy probable que los miembros de la comunidad sean favorecidos por la aireación generada durante la labranza, pues ésta estimula el proceso de mineralización del nitrógeno orgánico (Hayden, 2010). Después de la implementación del sistema, a excepción de los fijadores de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NFDENR) todas las demás categorías registraron incrementos positivos. Sin embargo, éste comportamiento no fue continuo. En todas las categorías el aporte a la estructura funcional fue variable de una época a otra y únicamente en la categoría DENR se identificó un patrón asociado al tiempo de Lluvia y Seca (Figura 20). En todas las evaluaciones, las categorías con mayor aporte al sistema fueron DENR, NFDENR y NIDENR

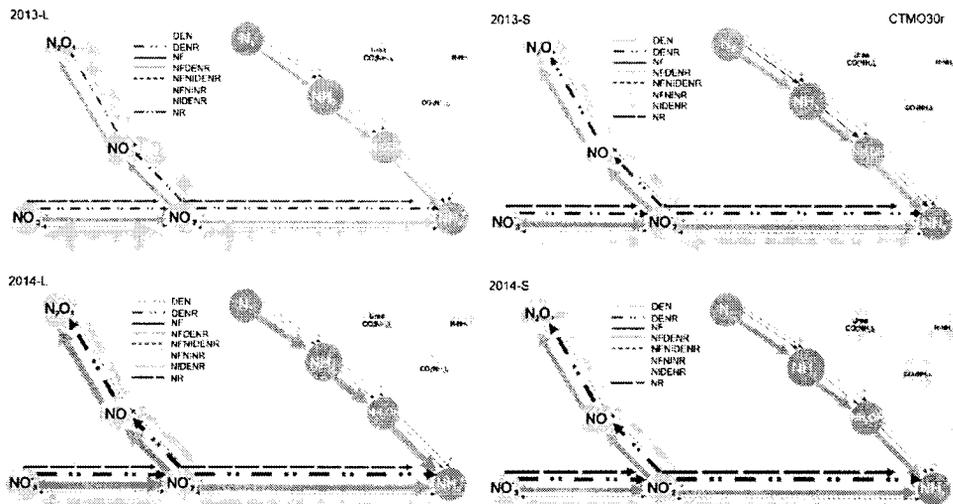


Figura 20. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema CTMO30r después de su implementación. CT= labranza convencional, M= monocultivo, O= fertilización orgánica, 30r= con el 30% de residuos. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .

Sistema CTMQH-r

En el sistema CTMQH-r, la categoría fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NFDENR) y la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NIDENR) aportaron el 60% de la funcionalidad del sistema. Después de un ciclo agrícola, los miembros de seis categorías redujeron su abundancia; principalmente en la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- . La categoría fijador de N disminuyó su aporte estructural en el sistema CTMQH-r. De acuerdo con Poly et al. 2001b las comunidades fijadoras de N disminuyen su abundancia en sistemas con aportes de N, pero principalmente en sistemas que no incluyen aporte de materia orgánica (Figura 21).

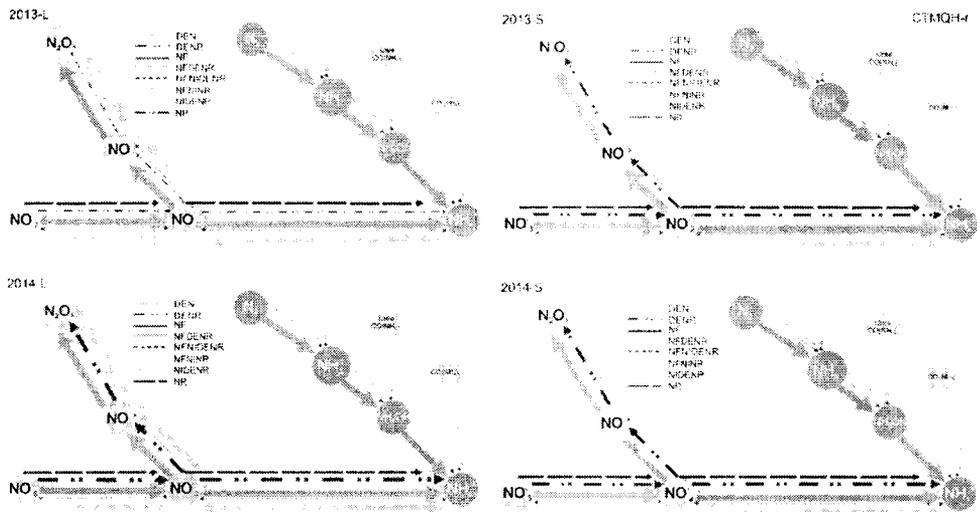


Figura 21. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema CTMQH-r después de su implementación. CT= labranza convencional, M= monocultivo, Q= fertilización química, H= control de arve químico, r= sin residuos. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .

Sistema ZTIOh+r

En el sistema ZTIOh+r, el 40% de la estructura funcional fue debida a la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NIDENR). Después de la implementación del

sistema a excepción de los desnitrificantes y los nitrificantes-desnitrificantes-removedor de NO_3^- todas las demás categorías disminuyeron su aporte, principalmente los removedores de NO_3^- . Las pérdidas de abundancia se observaron en época de lluvia en casi todas las categorías. Al término de la evaluación, únicamente los fijadores de N-nitrificantes-desnitrificantes-removedor de NO_3^- y los nitrificantes-desnitrificantes-removedores de NO_3^- disminuyeron su abundancia a la registrada antes de la implementación del sistema (Figura 22).

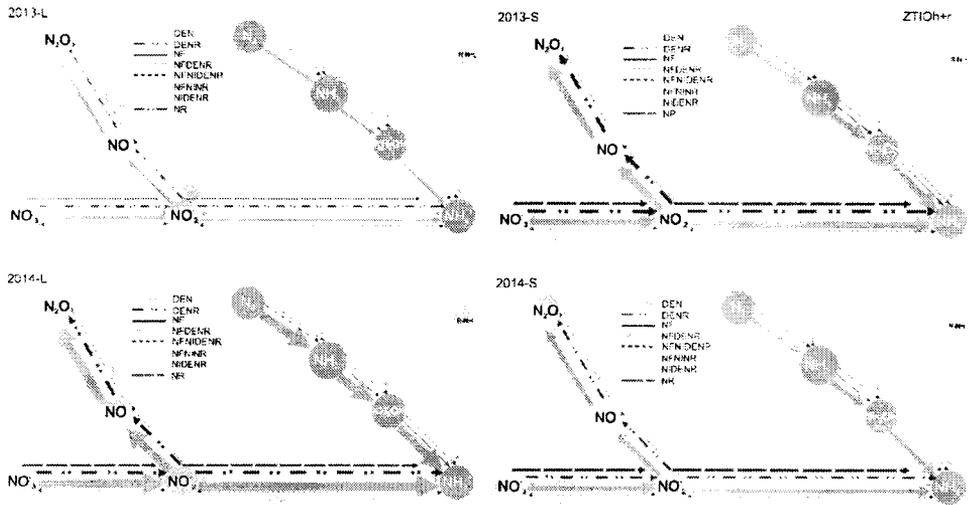


Figura 22. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema ZTIOh+r después de su implementación. ZT= labranza mínima, I= intercalado, O= fertilización orgánica, h= control de arvenses no químico, +r= con residuos. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .

Sistema ZTROh+ra

El sistema ZTROh+ra, la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- aportó el 35% de la estructura funcional del sistema. Después de la implementación del sistema tres categorías registraron pérdidas, principalmente la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- . Y en época de seca más de cuatro categorías disminuyeron su aporte funcional. Al término de la evaluación, los nitrificantes-desnitrificantes-removedores de NO_3^- disminuyeron su abundancia a la registrada antes de la implementación del sistema en un 20% (Figura 23).

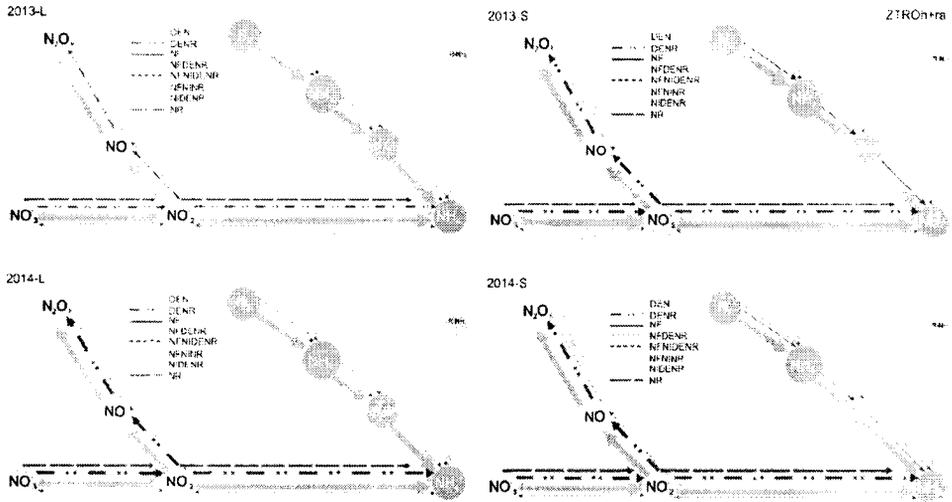


Figura 23. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema ZTROh+ra después de su implementación. ZT= labranza mínima, R=rotación, O= fertilización orgánica, h= control de arvenses no químico, +r= con residuos y a=avena. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .

Sistema ZTROh+rm

En el sistema ZTROh+rm, el aporte funcional de la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- fue del 42%. Después de la implementación del sistema cuatro categorías registraron cambios negativos. El aporte funcional de al menos cuatro categorías fue menor en época de lluvia. Y al termino del experimento tres categorías disminuyeron su aporte funcional (Figura 24). Por alguna razón, las condiciones del sistema provocaron una disminución de la categoría NR respecto al valor inicial de 2011.

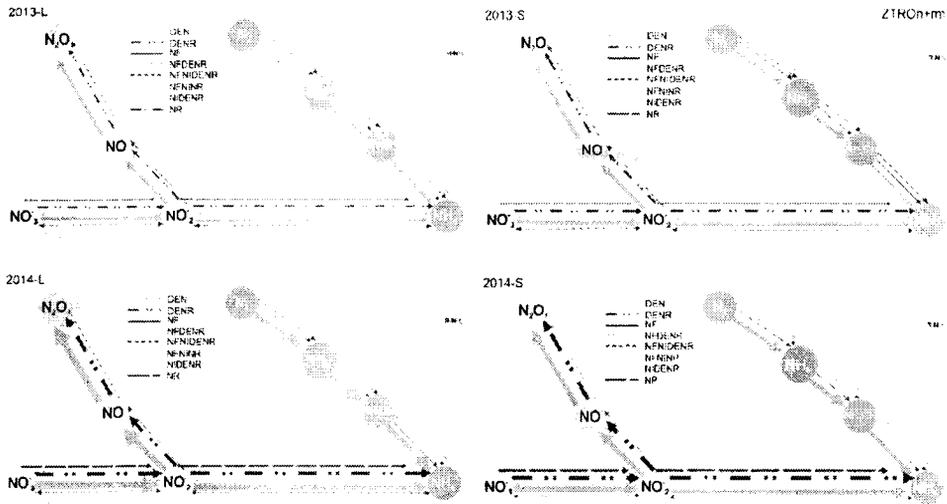


Figura 24. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema ZTROh+m después de su implementación. ZT= labranza mínima, R=rotación, O= fertilización orgánica, h= control de arvenses no químico, +r= con residuos, m= maíz. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNINR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .

Sistema ZTRQH+ra

Al igual que el sistema ZTROh+m, las categorías que caracterizaron al sistema fueron nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NIDENR) y fijador de N-denitrificante-removedor de NO_3^- (NFDENR). En todas las evaluaciones, la participación de las categorías fijador de N-nitrificante-removedor de NO_3^- (NFNINR) y desnitrificante (DE) fue menor al 1%. Después de la implementación del sistema cuatro categorías aumentaron DE, DENR, NF, NFNINR. En 2023-S vs 2013-L las categorías NFDENR, NFNINR fueron favorecidas. En 2014-L vs 2013-S únicamente NFNINR se incrementó y en 2014-S vs 2014-L nuevamente una sola categoría fue beneficiada (NF). En todas las evaluaciones, las categorías con mayor aporte al sistema fueron DENR, NFDENR, NIDENR y NR (Figura 25).

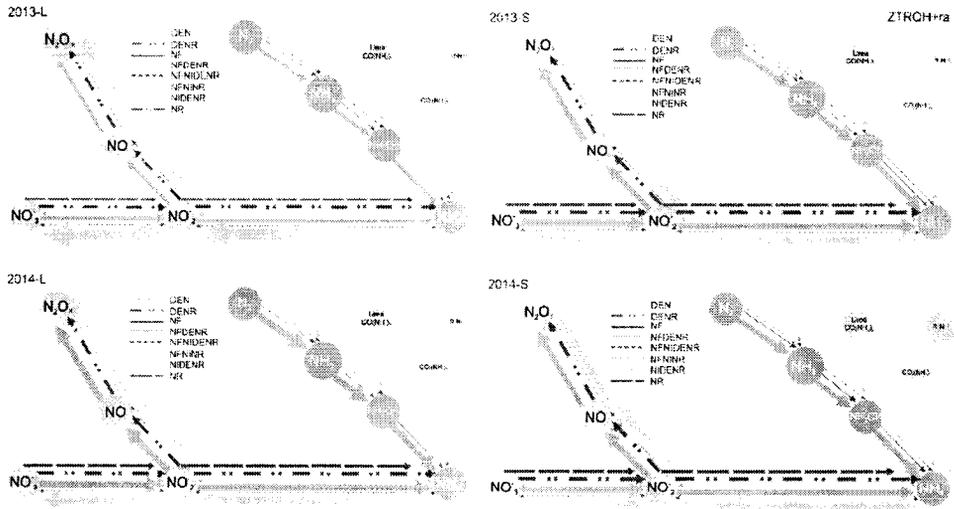


Figura 25. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema ZTRQH+ra después de su implementación. ZT= labranza mínima, R=rotación, Q= fertilización química, H= control de arvense químico, +r= con residuos y a=avena. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .

Sistema ZTRQH+rm

En el sistema ZTRQH+rm, la categoría fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NFDENR) contribuyó con el 32% de la estructura funcional del sistema. Al implementar el sistema de manejo agrícola se disminuyó el aporte de tres categorías, en específico la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NIDENR). En época de lluvia de 2014 cinco categorías registraron un descenso en su aporte funcional; sin embargo, fue el único sistema en registrar en todas las categorías de la evaluación 2014-S un aumento respecto a la época anterior. Al término de la evaluación, el sistema disminuyó su aporte funcional en las categorías nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- (Figura 26).

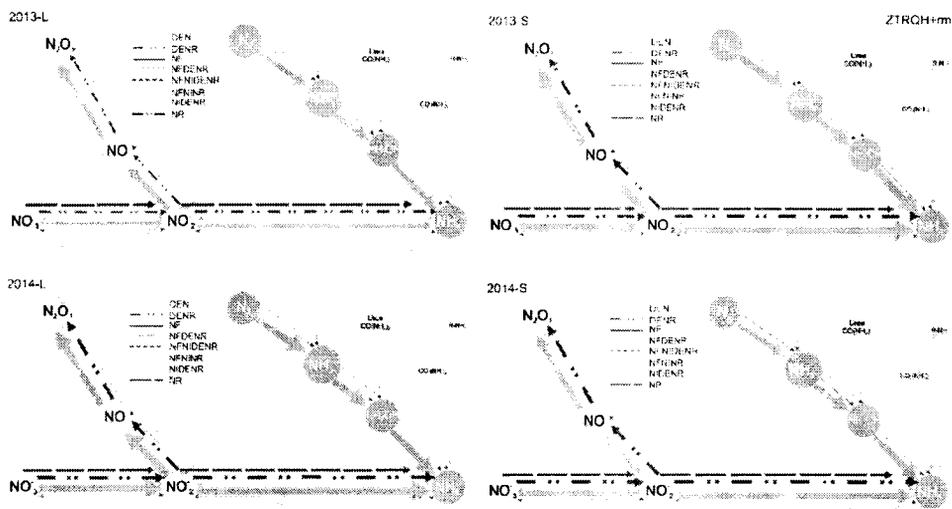


Figura 26. Comportamiento de los grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno en el sistema ZTRQH+rm después de su implementación. ZT= labranza mínima, R=rotación, Q= fertilización química, H= control de arvense químico, +r= con residuos y m= maíz. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .

En los diferentes sistemas de manejo agrícola tres categorías funcionales predominaron en la CBN, en específico la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor NO_3^- . En el tiempo, esta categoría disminuyó su aporte funcional en todos los sistemas, pero fue evidente en los sistemas CTMQH-r y ZTRQH+rm. De esta categoría, el género más afectado fue *Arthrobacter*. El efecto de las prácticas agrícolas, como labranza mínima y aporte de residuos, sobre la abundancia relativa del género ya ha sido reportado (Ramirez-Villanueva et al. 2015). Sin embargo, en esta investigación también se observó en sistemas convencionales.

La categoría fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- disminuyó su aporte funcional en todos los sistemas. A excepción del sistema CTMQH-r, en los demás sistemas incrementó su diversidad. La categoría registró tres géneros de la CBCN común a algún sistema, cinco de ellos a la CBCN común (*Anaeromyxobacter*, *Burkholderia*, *Geobacter*, *Methylobacterium* y *Paenibacillus*) y uno a la CBCN única (*Polaromonas*). Si bien, la abundancia relativa de estos géneros fue menor a 0.007 algunos de ellos son importantes.

Por ejemplo, *Burkholderia* es un heterótrofo, promotor de crecimiento usa aminoácidos simples, azúcares, recalcitrantes aromáticos, compuestos fenólicos es muy posible que participe en el intercambio de carbono (Aislabe et al. 2013, Souza et al. 2013), es favorecido

en suelos con un alto contenido en materia orgánica y en sistemas con labranza cero (Souza et al. 2015). *Herbaspirillum* es una bacteria endófito estrictamente asociada a raíces de avena y altamente eficiente para fijar N (Soares et al. 2006, Kraiser et al. 2011). Existe evidencia que los miembros del orden Myxococcales son los menos afectados por las prácticas agrícolas (Ceja Navarro et al. 2010). En éste estudio *Anaeromyxobacter* (orden Myxococcales) disminuyó su abundancia bajo las condiciones del sistema ZTROh+ra.

En los sistemas con labranza mínima era de esperar que las comunidades fijadoras de N, nitrificantes y removedor de NO_3^- incrementaran en diversidad y abundancia. Pero, no se tenía contemplado que estas comunidades pudieran participar en el proceso de desnitrificación. Lo que ratifica que los sistemas con labranza mínima emiten mayores concentraciones de N_2O a diferencia de los sistemas con labranza. Six et al. (2004), consideran que la adopción de técnicas de agricultura de conservación, y en especial de siembra directa, tienden a incrementar el contenido de agua del suelo esto disminuye la cantidad de aire en el perfil del suelo y promueve la desnitrificación y emisión de N_2O . A su vez, una mayor compactación en suelos bajo siembra directa, especialmente en los primeros años, puede estimular una mayor emisión de N_2O . No obstante, también se ha señalado una posible reducción de las emisiones de N_2O si se mantiene la siembra directa durante un largo periodo.

La categoría NR ocupó el cuarto lugar en aporte estructural en los diferentes sistemas de manejo agrícola. La categoría disminuyó su aporte funcional en el sistema ZTROh+rm. En los sistemas CTMO30r y CTMQH-r el aporte de los géneros *Amycolaptosis* y *Prochlorococcus* (≈ 0.01) fue significativo. *Amycolaptosis* pertenece a las Actinobacterias, las cuales se caracterizan por su capacidad para producir antibióticos y metabolitos secundarios y con ello excluir algunas bacterias (Soares et al. 2006) posible causa de su incremento en estos sistemas. Mientras que la diversidad de géneros registrada en los sistemas ZTRQH+ra y ZTRQH+rm originó el incremento. El aporte de la categoría en los sistemas con labranza mínima y fertilización orgánica (ZTIOh+r, ZTROh+ra y ZTROh+rm) fue bajo. Es posible que la perturbación de esta categoría en el sistema ZTROh+rm sea provocada por la combinación labranza mínima y aporte orgánico.

X CONCLUSIONES

Después de tres años de implementar los diferentes sistemas de manejo agrícola, los cambios registrados y analizados de la CBN confirman que la diversidad en los diferentes sistemas de manejo agrícola es variable, oscilante y su abundancia total disminuye en el tiempo.

Al estratificar la CBN se identifica un grupo de 37 géneros comunes a los diferentes sistemas de manejo agrícola que facilita identificar los cambios originados por dichos sistemas. Además, hay otro grupo reducido de géneros (17 géneros) comunes a los diferentes sistemas de manejo agrícola que no son afectados por la implementación de un sistema de manejo agrícola. Los cuales podrían ser utilizados como indicadores de calidad en suelos que han estado sin uso agrícola.

Los filos Proteobacteria, Actinobacteria fueron grupos predominantes en los diferentes sistemas de manejo agrícola. Las condiciones de humedad de los sistemas con labranza mínima y residuos orgánicos favorecieron al filo Gemmatimonadetes. En lo referente a los diferentes sistemas de manejo agrícola el sistema ZTIOh+r, ZTROh+ra y ZTRQH+rm destacan por registrar diversidad bacteriana y equilibrio funcional.

Las categorías DE y DENR no son las únicas relacionadas a las emisiones de gases de efecto invernadero (NO_2), adicional a ellas se identifican a las categorías fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NFDENR), fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NFDENR), nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NIDENR) y removedor de NO_3^- (NR). Esta última categoría tiene una participación considerable en la funcionalidad de los sistemas con labranza mínima.

Los sistemas de manejo agrícola que incluyen labranza mínima, incorporación de residuos, rotación e intercalado de cultivos funcionalmente son más equilibrados que los sistemas convencionales. Sin embargo, existe una posibilidad alta de que sean sistemas que emiten altas concentraciones de gases de efecto invernadero.

Bajo este estudio preliminar del comportamiento de la CBN se generaron nuevas perspectivas de desarrollo por un lado identificar si existe una correlación de la CBN con la comunidad excluida en el presente trabajo. El estudio de los miembros de las categorías fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- y nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- para ser usados como indicadores de calidad en suelos agrícolas.

XI LITERATURA CITADA

- Ågren G, Bosatta, E y Magill, A. (2001). Combining theory and experiment to understand effects of inorganic nitrogen on litter decomposition. *Oecologia*, 128(1): 94-98.
- Aguilar OM, Riva, O y Peltzer, E. (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(37): 13548-13553.
- Aislabie J, Deslippe, JR y Dymond, J. (2013). Soil microbes and their contribution to soil services. *Ecosystem services in New Zealand: conditions and trends*, 143161.
- Alvarez CR y Alvarez, R. (2000). Short-term effects of tillage systems on active soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*, 31(2): 157-161.
- Arp DJ, Yeager, C y Hyman, MR. (2001). Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. *Biodegradation*, 12(2): 81-103.
- Attia AA y Silaghi-Dumitrescu, R. (2015). Bacterial nitric oxide reductase: a mechanism revisited by an ONIOM (DFT:MM) study. *Journal of Molecular Modeling*, 21(5): 1-12.
- Barton LL. (2005). *Structural and Functional Relationships in Prokaryotes*. United States of America. 817 p.
- Beaumont HJE, Hommes, NG, Sayavedra-Soto, LA, Arp, DJ, Arciero, DM, Hooper, AB, Westerhoff, HV y van Spanning, RJM. (2002). Nitrite Reductase of *Nitrosomonas europaea* Is Not Essential for Production of Gaseous Nitrogen Oxides and Confers Tolerance to Nitrite. *Journal of Bacteriology*, 184(9): 2557-2560.
- Bertalan M, Albano, R, de Padua, V, Rouws, L, Rojas, C, Hemery, A, Teixeira, K, Schwab, S, Araujo, J, Oliveira, A, Franca, L, Magalhaes, V, Alqueres, S, Cardoso, A, Almeida, W, Loureiro, MM, Nogueira, E, Cidade, D, Oliveira, D, Simao, T, Macedo, J, Valadao, A, Dreschsel, M, Freitas, F, Vidal, M, Guedes, H, Rodrigues, E, Meneses, C, Brioso, P, Pozzer, L, Figueiredo, D, Montano, H, Junior, J, de Souza Filho, G, Martin Quintana Flores, V, Ferreira, B, Branco, A, Gonzalez, P, Guillobel, H, Lemos, M, Seibel, L, Macedo, J, Alves-Ferreira, M, Sachetto-Martins, G, Coelho, A, Santos, E, Amaral, G, Neves, A, Pacheco, AB, Carvalho, D, Lery, L, Bisch, P, Rossie, SC, Urményi, T, Rael Pereira, A, Silva, R, Rondinelli, E, von Kruger, W, Martins, O, Baldani, JI y Ferreira, PC. (2009). Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, 10: 450.
- Bertero MG, Rothery, RA, Palak, M, Hou, C, Lim, D, Blasco, F, Weiner, JH y Strynadka, NCJ. (2003). Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat Struct Mol Biol*, 10(9): 681-687.
- Bock E y Wagner, M. (2006). Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as an Energy Source. In M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer y E Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 457-495): Springer New York.
- Bonete MJ, Martínez-Espinosa, RM, Pire, C, Zafra, B y Richardson, DJ. (2008). Nitrogen metabolism in haloarchaea. *Saline Systems*, 4: 9.
- Brenner DJB, Krieg, NR y Staley, JT. (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (DJ Brenner, NR Krieg y JT Staley Eds. 2nd ed. ed. Vol. 2 The Proteobacteria). USA: Williams & Wilkins. 304
- Briones AM, Okabe, S, Umehiya, Y, Ramsing, NB, Reichardt, W y Okuyama, H. (2002). Influence of different cultivars on populations of ammonia-oxidizing bacteria in the root environment of rice. *Appl Environ Microbiol*, 68(6): 3067-3075.
- Buresh RJ, Ramesh, RK y C., KV. (2008). Nitrogen Transformations in Submerged Soils. *Nitrogen in Agricultural Systems, Agronomy Monograph*.
- Canfield DE, Glazer, AN y Falkowski, PG. (2010). The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science*, 330(192).
- Ceja-Navarro JA, Rivera-Orduna, FN, Patino-Zuniga, L, Vila-Sanjurjo, A, Crossa, J, Govaerts, B y Dendooven, L. (2010). Phylogenetic and multivariate analyses to determine the effects of different tillage and residue management practices on soil bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 76(11): 3685-3691.
- Colloff MJ, Wakelin, SA, Gomez, D y Rogers, SL. (2008). Detection of nitrogen cycle genes in soils for measuring the effects of changes in land use and management. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7): 1637-1645.
- Constancias F, Prévost-Bouré, N, Terrat, S, Aussems, S, Nowak, V, Guillemin, J-P, Bonnotte, A, Biju-Duval, L, Navel, A, Martins, J, Maron, P-A y Ranjard, L. (2014). Microscale evidence for a high decrease of soil bacterial density and diversity by cropping. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4): 831-840.
- Das S y Varma, A. (2011). Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. In G Shukla y A Varma (Eds.), *Soil Enzymology* (Vol. 22, pp. 25-42): Springer Berlin Heidelberg.
- Davinic M, Fultz, LM, Acosta-Martínez, V, Calderón, FJ, Cox, SB, Dowd, SE, Allen, VG, Zak, JC y Moore-Kucera, J. (2012). Pyrosequencing and mid-infrared spectroscopy reveal distinct aggregate stratification of soil bacterial communities and organic matter composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 46: 63-72.

- Day DA, Poole, PS, Tyerman, SD y Rosendahl, L. (2001). Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell Mol Life Sci*, 58(1): 61-71.
- DeBruyn JM, Nixon, LT, Fawaz, MN, Johnson, AM y Radosevich, M. (2011). Global Biogeography and Quantitative Seasonal Dynamics of Gemmatimonadetes in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17): 6295-6300.
- Degrune F, Dufréne, M, Colinet, G, Massart, S, Taminiau, B, Bodson, B, Hiel, M-P, Daube, G, Nezer, C y Vandenbol, M. (2015). A novel sub-phylum method discriminates better the impact of crop management on soil microbial community. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(3): 1157-1166.
- Dilly O, Blume, H-P y Munch, J. (2003). Soil microbial activities in Luvisols and Anthrosols during 9 years of region-typical tillage and fertilisation practices in northern Germany. *Biogeochemistry*, 65(3): 319-339.
- Fernández-Guerra A y Casamayor, EO. (2012). Habitat-associated phylogenetic community patterns of microbial ammonia oxidizers. *PLoS one*, 7(10): e47330.
- Fernández ML, Estrin, DA y Bari, SE. (2008). Theoretical insight into the hydroxylamine oxidoreductase mechanism. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(7): 1523-1530.
- Franche C, Lindström, K y Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1-2): 35-59.
- García E. (2004). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)*. Instituto de Geografía. México: UNAM. 98 pp.
- Henry S, Bru, D, Stres, B, Hallet, S y Philippot, L. (2006). Quantitative Detection of the nosZ Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ Genes in Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8): 5181-5189.
- Höflich G, Tauschke, M, Kühn, G, Wemer, K, Frielinghaus, M y Höhn, W. (1999). Influence of long-term conservation tillage on soil and rhizosphere microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, 29(1): 81-86.
- Hollocher TC. (1996). 9 - The Enzymology and Occurrence of Nitric Oxide in the Biological Nitrogen Cycle. In L Jack y JrA2 - Jack Lancaster, Jr. (Eds.), *Nitric Oxide*. San Diego: Academic Press. 289-344 pp
- Ji B, Yang, K, Zhu, L, Jiang, Y, Wang, H, Zhou, J y Zhang, H. (2015). Aerobic denitrification: A review of important advances of the last 30 years. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(4): 643-651.
- Jiménez GCA, Maciel, PLH, Peña, RA y Castillo, RA. (2004). *Principios y Fundamentos de Labranza de Conservación: guía para su implementación*. Folleto técnico Número 24. México: INIFAP. 40 pp
- Junier P, Molina, V, Dorador, C, Hadas, O, Kim, OS, Junier, T, Witzel, JP y Imhoff, JF. (2010). Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85(3): 425-440.
- Kanehisa M y Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1): 27-30.
- Kathleen RT y Hooper, BA. (1981). Hydroxylamine Oxidoreductase: A 20-Heme, 200 000 Molecular Weight Cytochrome c with Unusual Denaturation Properties Which Forms a 63 000 Molecular Weight Monomer after Heme Removal. *Biochemistry*, 20: 7026-7032.
- Kostka JE, Green, SJ, Rishishwar, L, Prakash, O, Katz, LS, Mariño-Ramírez, L, Jordan, IK, Munk, C, Ivanova, N, Mikhailova, N, Watson, DB, Brown, SD, Palumbo, AV y Brooks, SC. (2012). Genome Sequences for Six Rhodanobacter Strains, Isolated from Soils and the Terrestrial Subsurface, with Variable Denitrification Capabilities. *Journal of Bacteriology*, 194(16): 4461-4462.
- Kraiser T, Gras, DE, Gutiérrez, AG, González, B y Gutiérrez, RA. (2011). A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(4): 1455-1466.
- Kramer SB, Reganold, JP, Glover, JD, Bohannon, BJM y Mooney, HA. (2006). Reduced nitrate leaching and enhanced denitrifier activity and efficiency in organically fertilized soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12): 4522-4527.
- Lienhard P, Terrat, S, Prévost-Bouré, NC, Nowak, V, Régnier, T, Sayphoummie, S, Panyasiri, K, Tivet, F, Mathieu, O, Levêque, J, Maron, P-A y Ranjard, L. (2013). Pyrosequencing evidences the impact of cropping on soil bacterial and fungal diversity in Laos tropical grassland. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2): 525-533.
- Liu TQ, Fan, DJ, Zhang, XX, Chen, J, Li, CF y Cao, CG. (2015). Deep placement of nitrogen fertilizers reduces ammonia volatilization and increases nitrogen utilization efficiency in no-tillage paddy fields in central China. *Field Crops Research*, 184: 80-90.
- Mathew RP, Feng, Y, Githinji, L, Ankumah, R y Baikcom, KS. (2012). Impact of No-Tillage and Conventional Tillage Systems on Soil Microbial Communities. *Applied and Environmental Soil Science*, 2012: 1-10.

- Okano Y, Hristova, KR, Leutenegger, CM, Jackson, LE, Denison, RF, Gebreyesus, B, Lebauer, D y Scow, KM. (2004). Application of Real-Time PCR To Study Effects of Ammonium on Population Size of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2): 1008-1016.
- Parks D y Beiko, R. (2013). STAMP: Statistical Analysis of Metagenomic Profiles. In EK Nelson (Ed.), *Encyclopedia of Metagenomics* (pp. 1-6). New York, NY: Springer New York.
- Poly F, Monrozier, LJ y Bally, R. (2001a). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152(1): 95-103.
- Poly F, Ranjard, L, Nazaret, S, Gourbière, F y Monrozier, LJ. (2001b). Comparison of nifH Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5): 2255-2262.
- Potter L, Angove, H, Richardson, D y Cole, J. (2001). Nitrate reduction in the periplasm of gram-negative bacteria *Advances in Microbial Physiology* (Vol. Volume 45, pp. 51-112): Academic Press.
- Rajesh T, Rajendhran, J y Gunasekaran, P. (2013). Analysis of Microbial Diversity and Construction of Metagenomic Library. In DK Arora, S Das y M Sukumar (Eds.), *Analyzing Microbes* (pp. 187-208): Springer Berlin Heidelberg.
- Ramirez-Villanueva DA, Bello-López, JM, Navarro-Noya, YE, Luna-Guido, M, Verhulst, N, Govaerts, B y Dendooven, L. (2015). Bacterial community structure in maize residue amended soil with contrasting management practices. *Applied Soil Ecology*, 90: 49-59.
- Reicosky D. (1997). Tillage-induced CO₂ emission from soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 49(1-3): 273-285.
- Rösch C, Mergel, A y Bothe, H. (2002). Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 3818-3829.
- Schleper C y Nicol, GW. (2010). Ammonia-oxidising archaea—physiology, ecology and evolution. *Advances in microbial physiology*, 57: 1-41.
- Shen X-Y, Zhang, L-M, Shen, J-P, Li, L-H, Yuan, C-L y He, J-Z. (2011). Nitrogen loading levels affect abundance and composition of soil ammonia oxidizing prokaryotes in semiarid temperate grassland. *Journal of Soils and Sediments*, 11(7): 1243-1252.
- Six J, Ogle, SM, Jay breidt, F, Conant, RT, Mosier, AR y Paustian, K. (2004). The potential to mitigate global warming with no-tillage management is only realized when practised in the long term. *Global Change Biology*, 10(2): 155-160.
- Soares RA, Roesch, LFW, Zanatta, G, de Oliveira Camargo, FA y Passaglia, LMP. (2006). Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. *Applied Soil Ecology*, 33(3): 221-234.
- Song YN, Marschner, P, Li, L, Bao, XG, Sun, JH y Zhang, FS. (2007). Community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the rhizosphere of intercropped wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 44(2): 307-314.
- Souza RC, Hungria, M, Cantão, ME, Vasconcelos, ATR, Nogueira, MA y Vicente, VA. (2015). Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes. *Applied Soil Ecology*, 86: 106-112.
- Staal M, Lintel-Hekker, ST, Harren, F y Stal, L. (2001). Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. *Environ Microbiol*, 3(5): 343-351.
- Stopnisek N, Gubry-Rangin, C, Hofferte, S, Nicol, GW, Mandic-Mulec, I y Prosser, JI. (2010). Thaumarchaeal ammonia oxidation in an acidic forest peat soil is not influenced by ammonium amendment. *Appl Environ Microbiol*, 76(22): 7626-7634.
- Subbarao GV, Sahrawat, KL, Nakahara, K, Ishikawa, T, Kishii, M, Rao, IM, Hash, CT, George, TS, Srinivasa Rao, P, Nardi, P, Bonnett, D, Berry, W, Suenaga, K y Lata, JC. (2012). Chapter six - Biological Nitrification Inhibition—A Novel Strategy to Regulate Nitrification in Agricultural Systems. In LS Donald (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. Volume 114, pp. 249-302): Academic Press.
- Szukics U, Hackl, E, Zechmeister-Boltenstern, S y Sessitsch, A. (2012). Rapid and dissimilar response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to nitrogen and water amendment in two temperate forest soils. *Microbiological Research*, 167(2): 103-109.
- Van Spanning RJM, Delgado, MJ y Richardson, DJ. (2005). The Nitrogen Cycle: Denitrification and its Relationship to N₂ Fixation. In D Werner y W Newton (Eds.), *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment* (Vol. 4, pp. 277-342): Springer Netherlands.
- Wang Y, Nagaoka, K, Hayatsu, M, Sakai, Y, Tago, K, Asakawa, S y Fujii, T. (2012). A novel method for RNA extraction from Andosols using casein and its application to amoA gene expression study in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3): 793-802.
- Wartiainen I, Eriksson, T, Zheng, W y Rasmussen, U. (2008). Variation in the active diazotrophic community in rice paddy—nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Applied Soil Ecology*, 39(1): 65-75.

- Webb J, Sørensen, P, Velthof, G, Amon, B, Pinto, M, Rodhe, L, Salomon, E, Hutchings, N, Burczyk, P y Reid, J. (2013). Chapter Seven - An Assessment of the Variation of Manure Nitrogen Efficiency throughout Europe and an Appraisal of Means to Increase Manure-N Efficiency. In LS Donald (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. Volume 119, pp. 371-442): Academic Press.
- Weng B, Xie, X, Yang, J, Liu, J, Lu, H y Yan, C. (2013). Research on the nitrogen cycle in rhizosphere of *Kandelia obovata* under ammonium and nitrate addition. *Marine Pollution Bulletin*, 76(1-2): 227-240.
- Yamulki S y Jarvis, S. (2002). Short-term effects of tillage and compaction on nitrous oxide, nitric oxide, nitrogen dioxide, methane and carbon dioxide fluxes from grassland. *Biology and Fertility of Soils*, 36(3): 224-231.
- Zhang J, Müller, C y Cai, Z. (2015). Heterotrophic nitrification of organic N and its contribution to nitrous oxide emissions in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 84: 199-209.
- Zumft W. (1993). The biological role of nitric oxide in bacteria. *Archives of Microbiology*, 160(4): 253-264.
- Zumft WG. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4): 533-616.

ANEXOS

Toma de muestra de suelo

1. Ubique el punto a muestrear y con una barrena extraiga una muestra de suelo. Si son varios los puntos muestreados de un mismo sitio; primero homogenice la muestra y después pase sobre un tamiz de 80 mallas. Tome tres muestras como mínimo.
2. En tubo falcon de 50 mL o un tubo eppendorf de 5mL coloque la muestra de suelo y vierta nitrógeno líquido. O bien puede colocar la muestra dentro de una bolsa de plástico.
3. Cada muestra debe estar debidamente etiquetada con el nombre del sitio, geo-referencia, fecha y nombre del colector. Coloque las muestras dentro de una hielera.
4. Almacene la muestra o muestras a -70°C si no realizará la extracción de DNA genómico enseguida.

Pre-tratamiento de muestra de suelo.

1. En un tubo Falcon® de 15 ml (o eppendorf de 1.5 mL) pese 0.5 g de muestra.
2. Adicione 1 ml de pirofosfato al 0.15 M y agite en Vortex hasta homogenizar la solución (de 3 – 5 minutos). Dependiendo de la disponibilidad de las centrifugas, puede centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos, 7000 rpm por 7 min o 10,000 rpm por 5 min.
3. Elimine el sobrenadante y repita el proceso a partir del paso dos hasta que el sobrenadante sea casi trasparente. Nota: Si en el primer lavado el sobrenadante no es negro, es muy probable que el pirofosfato esté mal preparado.

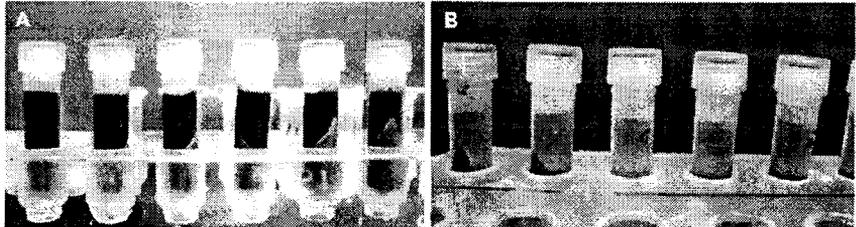


Figura A1. Prelavado de suelo con pirofosfato. A) primer lavado y B) después de cinco lavados

4. Después de eliminar el sobrenadante adicione 1 ml de buffer de fosfatos
5. Agite en vortex hasta homogenizar la solución (1 -2 min). Dependiendo de la disponibilidad de las centrifugas, puede centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos, 7000 rpm por 7 min o 10,000 rpm por 5 min.
6. Elimine el sobrenadante y repita el procedimiento a partir del paso cinco hasta eliminar la turbidez y obtener un sobrenadante claro (mínimo 2 veces máximo 5 veces).

Solución de pirofosfato de sodio 0.15 M

1. En un matraz limpio y estéril de 500 mL vierta 16.72 g de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ y adicione 200 ml de agua destilada estéril
2. Coloque en agitación hasta disolver las sales y afore a 250 mL
3. Esterilice por calor húmedo a 15 lb, 115°C , 15 min.

4. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución buffer de fosfato de sodio 0.15 M pH 8

1. En un matraz limpio y estéril de 500 mL vierta 5.17 g de NaH_2PO_4 y adicione 200 ml de agua destilada estéril.
2. Coloque en agitación hasta disolver las sales y afore a 250 mL.
3. Esterilice por calor húmedo a 15 lb, 115 °C, 15 min.
4. Almacene a temperatura ambiente. Nota: esta solución tiene una caducidad aproximada de 2 semanas.

Extracción de DNA genómico (Protocolo NucleoSpin Soil®)

Preparación de muestra

1. Coloque 250-500 mg de muestra en el tubo NucleoSpin® Bead, adicione 700 μL de la solución SL1 o SL2.

Lisis de muestra

2. Adicione 150 μL Enhancer SX
3. Agite en un Vortex durante 5 min con el tubo de forma horizontal.
4. Centrifugue la muestra durante 2 min a 11,000 x g
5. Recupere el sobrenadante y coloque en un tubo eppendor de 1.5 mL.
6. Adicione 150 μL SL3, mezcle durante 5 s un Vortex, coloque la muestra durante 5 min a una temperatura entre 0–4 °C y centrifugue a 11,000 x g durante 1 min.

Filtrado de muestra

7. Recupere el sobrenadante y vierta en la columna NucleoSpin® Inhibitor Removal Column (tapa anaranjada) 11,000 x g, 1 min
8. A la solución filtrada adicione 250 μL SB y agite en Vortex durante 5 s.
9. Vierta 550 μL de la muestra en la columna NucleoSpin® Soil Column (Tapa verde), centrifugue a 11 000 x g durante 1 min y deseche la solución filtrada.

Lavado de membrana de sílica

10. 1st 500 μL SB 11,000 x g, 30 s
11. 2nd 550 μL SW1 11,000 x g, 30 s
12. 3rd 700 μL SW2 Vortex 2 s 11,000 x g, 30 s
13. 4th 700 μL SW2 Vortex 2 s 11,000 x g, 30 s
14. 5th 700 μL SW2 Vortex 2 s 11,000 x g, 30 s (paso adicionado al protocolo)
15. Secado de membrana: 11,000 x g, 2 min
16. Elute DNA: 30–100 μL SE RT, 1 min 11,000 x g, 30 s. **Nota:** puede usar agua libre de DNAsas para recuperar el DNA genómico.

Verificación de calidad de DNA genómico

1. En un matraz de 150 mL limpio y estéril coloque 0.200g de Agarosa y vierta 20 mL de agua destilada estéril.
2. Agite suavemente la solución y caliente hasta disolver el agar.

3. Vierta 300 μL de TAE50x y 1 μL de red gel a la solución de agar, agite suavemente y caliente unos segundos (5 a 10 s).
4. En una base para gel limpia coloque el peine y selle los laterales de la base. Vierta la solución y espere a que solidifique. Una vez que el gel se solidificó puede colocar en refrigeración unos cinco minutos antes de usar.
5. Coloque la solución de TAE 1x en la cámara de electroforesis, sumerja el gel y remueva el peine con cuidado. Recuerde que el gel se coloca con los pozos hacia el lado negativo.
6. En un contenedor con hielo coloque la muestra o muestras de DNA genómico a verificar, marcador de peso molecular y el buffer de carga.
7. Sobre un pedazo de parafilm coloque de 1 μL de buffer de carga y de 1 a 2 μL de muestra mezcle perfectamente la solución.
8. Configure la micropipeta para cargar toda la solución y vierta sobre uno de los pozos. Repita el paso 7 y 8 dependiendo del número de muestras.
9. Encienda la fuente de poder y configure a 80-100 V y presione el botón "Run". Si el equipo lo permite configure el tiempo a 30 minutos.
10. Pasado los 30 min saque el gel de la cámara y coloque en la base limpia de un trasiluminador de luz ultravioleta (UV). Antes de encender el equipo colóquese lentes.

Cuando realiza una verificación de DNA genómico puede o no usar un marcador de peso molecular. Si decide usar el marcador de peso molecular puede usar una dilución 1:10. De preferencia, coloque el marcador de peso molecular en el primer pozo y en el segundo pozo un control negativo (buffer de carga con agua desionizada). Para lograr una imagen limpia del gel puede enjuagar el gel con agua antes de colocar en trasiluminador de luz UV.

Pureza y concentración de DNA genómico

1. Homogenice la muestra de DNA genómico y en un tubo eppendorf de 250 μL coloque una alícuota (4-10 μL) de la muestra. Almacene nuevamente la muestra de DNA genómico a -20°C .
2. Coloque el tubo eppendorf con la alícuota sobre una base con hielo.
3. Antes de cuantificar la concentración y pureza de DNA genómico calibre el espectrofotómetro con agua desionizada.
4. Una vez que ha calibrado el espectrofotómetro coloque un microlitro de agua desionizada como blanco.
5. Limpie la base del espectrofotómetro con papel sin ejercer presión o dañar la base
6. Coloque un 1-2 μL de la muestra de DNA genómico y cuantifique la concentración de y pureza de DNA. Y repita el paso cuatro.

Embalaje de muestras para su secuenciación masiva

En un tubo eppendorf de 250 mL se colocó una alícuota de 40 μL de DNA genómico y se rotuló con el nombre de la muestra. El borde del tubo fue sellado con parafilm. Cada tubo fue colocado en un contenedor de cartón con separaciones para tubos eppendorf.

En la tapa del contenedor se colocó una etiqueta con el número de tubo, el nombre de la muestra, la concentración, los valores de absorbancia y una fotografía de la verificación de la calidad de cada muestra de

DNA genómico. El contenedor fue envuelto con una cubierta de plástico con burbujas de aire y fue colocado dentro de una caja de unicef con bolsas de gel congeladas.

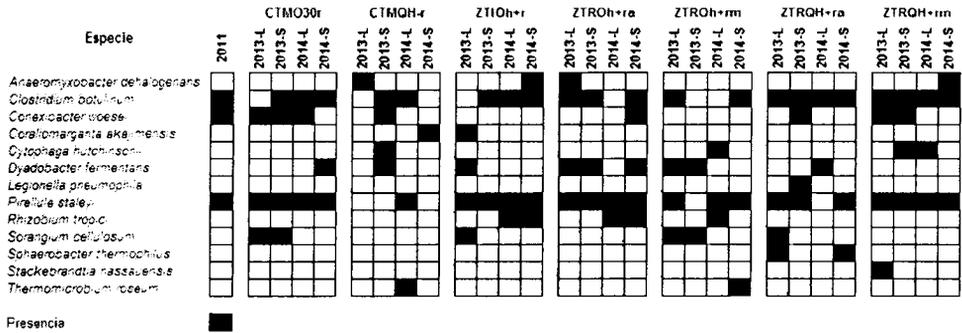


Figura 1A. Presencia de especies bacterianas asociadas al ciclo del N en suelo de todos los sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el Municipio de Cocotitlán, Estado de México durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014. ■ presencia.

Cuadro 1A. Comunidad bacteriana asociada al ciclo del N de suelo de todos los sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el Municipio de Cocotitlán, Estado de México durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014.

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Función	AnfO	Hao	Hzo	PmoA	NerOHU	NepAB	NerB	NaaAB	NMDKH	NHrA	NrRD	NrK	NrS	NrT6	NorAB	NorBC	NoazC	Nr	NrAH
Acidobacteria																								
Acidobacteria																								
Acidobacteriales																								
			Acidobacteriaceae	Acidobacterium	NR											*								
			Acidobacteriaceae	Candidatus																				
			Acidobacteriaceae	Koribacter	DE																			
			Acidobacteriaceae	Terriglobus	NR																			
Solibacterales																								
			Solibacteraceae	Candidatus																				
			Solibacteraceae	Solibacter	DENR											*								*
Actinobacteria																								
Actinobacteria																								
Actinomycetales																								
			Actinomycetaceae	Actinomyces	NIDENR																			
			Cellulomonadaceae	Cellulomonas	NIDENR					*		*				*								*
			Dermabacteraceae	Brachybacterium	NIDENR					*		*				*								*
			Dietziaceae	Dietzia	NR																			
			Frankiaceae	Frankia	NFMR								*		*									
			Geodermatophilaceae	Blasococcus	NIDENR					*														
			Glycomycetaceae	Glycomyces	NR																			
			Glycomycetaceae	Stackebrandtia	NIDENR					*		*				*								
			Gordoniaceae	Gordonia	NIDENR					*		*				*								
			Micrococccaceae	Arthrobacter	NIDENR					*		*				*								
			Micrococccaceae	Micrococcus	NR					*		*				*								
			Micromonosporaceae	Actinoplanes	NIDENR					*		*				*								
			Micromonosporaceae	Micromonospora	NIDENR					*		*				*								
			Mycobacteriaceae	Mycobacterium	NIDENR					*		*				*								*
			Nocardiaceae	Nocardia	NIDENR					*		*				*								*
			Nocardiaceae	Rhodococcus	NIDENR					*		*				*								*
			Nocardioideae	Actinopolymorpha	NR					*		*				*								*
			Nocardioideae	Kribbella	NIDENR					*		*				*								*
			Nocardioideae	Marmoricola	NR					*		*				*								*
			Nocardioideae	Nocardoides	NIDENR					*		*				*								*
			Nocardioideae	Nocardopsis	NIDENR					*		*				*								*
			Nocardioideae	Thermobifida	DENR					*		*				*								*
			Promicromonosporaceae	Promicromonospora	NR					*		*				*								*
			Pseudonocardiaceae	Actinokineospora	NR					*		*				*								*
			Pseudonocardiaceae	Amycolatopsis	NR					*		*				*								*
			Streptomycetaceae	Streptomyces	NIDENR					*		*				*								*
Rubrobacteriales																								
			Rubrobacteriaceae	Rubrobacter	NIDENR					*		*				*								*
Solirubrobacteriales																								
			Conexibacteraceae	Conexibacter	NIDENR					*		*				*								*
Bacteroidetes																								
Bacteroidetes																								
Bacteroidales																								
			Bacteroidaceae	Bacteroides	NR																			*
Cytophagia																								
Cytophagales																								
			Cytophagaceae	Cytophage	NR					*		*				*								*
			Cytophagaceae	Dyadobacter	DENR					*		*				*								*
			Cytophagaceae	Flexibacter	DE					*		*				*								*
			Cytophagaceae	Hymenobacter	DENR					*		*				*								*
			Cytophagaceae	Pontibacter	NF					*		*				*								*
			Cytophagaceae	Spirosome	NR					*		*				*								*
Flavobacteriales																								
Flavobacteriales																								
			Flavobacteriaceae	Elizabethkingia	DE																			*

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Función	AnrG	Hao	Hzo	PmoA	NarGHU	NepAB	NerB	NesAB	NIDDKI	NiFA	NiRD	NiRK	NiRS	NIT-6	NorAB	NorBC	NorZ	NR	Nr/AH
Spirochaetales																								
			Spirochaetaceae	Spirochaeta	NF																			
Verrucomicrobia																								
Opitutales																								
			Opitutaceae	Opitulus	DENR																			
			Punicococcales	Coralimargarita	NFDENR						*	*	*								*		*	
Verrucomicrobiae			Punicococaceae								*	*	*										*	
Verrucomicrobiae			Verrucomicrobiaceae	Verrucomicrobium	NF																			

DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO₃, NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO₃, NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO₃, NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO₃ y NR= removedor de NO₃.

Cuadro 2A. Géneros de la CBN única de todos los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014.

Filo	Género	DE	DENR	NF	NFDENR	NFNIDENR	NFNINR	NIDENR	NR
Acidobacteria	<i>Terriglobus*</i>								+
Actinobacteria	<i>Blastococcus</i>							+	
Actinobacteria	<i>Dietzia</i>								+
Actinobacteria	<i>Marmoricola</i>								+
Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>								+
Actinobacteria	<i>Stackebrandtia</i>							+	
Actinobacteria	<i>Thermobifida</i>		+						
Bacteroidetes	<i>Elizabethkingia</i>	+							
Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i>							+	
Deinococcus-Thermus	<i>Thermus</i>							+	
Firmicutes	<i>Candidatus Desulfuridis</i>				+				
Firmicutes	<i>Desulfosporosinus</i>					+			
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>							+	
Firmicutes	<i>Oscillibacter</i>								+
Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>							+	
Firmicutes	<i>Thermaerobacter</i>		+						
Proteobacteria	<i>Acetobacter</i>								+
Proteobacteria	<i>Alcaligenes</i>		+						
Proteobacteria	<i>Alcanivorax</i>							+	
Proteobacteria	<i>Beggiatoa</i>						+		
Proteobacteria	<i>Halomonas</i>							+	
Proteobacteria	<i>Inquilinus</i>			+					
Proteobacteria	<i>Polaromonas</i>						+		
Proteobacteria	<i>Ralstonia</i>							+	

DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO₃, NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO₃, NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO₃, NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO₃ y NR= removedor de NO₃.

Cuadro 3A. Géneros de la CBN común a algunos de los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocolitlán, Estado de México durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014.

Género	Categoría	LB	CTMOe30r	CTMQH-r	ZTIOh+r	ZTROh+ra	ZTROh+m	ZTROH+ra	ZTROH+m
<i>Fixibacter</i>	DE	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Thermomicrobium</i>	DE	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Acinetobacter</i>	DENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Anaerolinea</i>	DENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Carboxydothermus</i>	DENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Cyanobacterium</i>	DENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Haloscomenobacter</i>	DENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Ignavibacterium</i>	DENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Myxococcus</i>	DENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Oscillatoria</i>	DENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Rhodanobacter</i>	DENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Sarngium</i>	DENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Aminobacter</i>	NF	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Eubacterium</i>	NF	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Fusobacterium</i>	NF	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Pontibacter</i>	NF	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Rhodoplena</i>	NF	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Sprochaeta</i>	NF	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Bosea</i>	NFDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Coraformargarita</i>	NFDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Desulfotribrio</i>	NFDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Rhodobacter</i>	NFDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Sinorhizobium</i>	NFDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Acidithiobacillus</i>	NFNIDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Herbaspirillum</i>	NFNIDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Pantoea</i>	NFNIDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Brachybacterium</i>	NIDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Gordonia</i>	NIDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Mizavibrio</i>	NIDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Nitrosococcus</i>	NIDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Nitrosomonas</i>	NIDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Nitrososporium</i>	NIDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Ochrobacterium</i>	NIDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Paracoccus</i>	NIDENR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Actinokineaspora</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Actinopolyomorpha</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Arthrospira</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Alicycobacillus</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Bacteroides</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Bravibacillus</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Coralococcus</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Cytophaga</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Glycohalobium</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Granulibacter</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Isaaphaera</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Leptolyngbya</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Parvularcula</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Rhodospirillum</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Sarasinus</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Sporosoma</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Thermoanaerobacter</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Thermovum</i>	NR	*	*	*	*	*	*	*	*

LB= línea base, ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R=rotación, M=monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H: control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a=avena.

DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO₃⁻, NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO₃⁻, NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO₃⁻, NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO₃⁻ y NR= removedor de NO₃⁻.

DINÁMICA BACTERIANA ASOCIADA AL CICLO DEL NITRÓGENO EN DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO AGRÍCOLA

Eva Segundo Pedraza¹, Ana L Wegier Briuolo², Alejandro A Azaola Espinosa³, Luis M Rodríguez Sánchez⁴ y Mariela H Fuentes Ponce^{4✉}

¹Maestría en Ciencias Agropecuaria. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

²Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Jardín Botánico, Planta Baja 011.

³Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

⁴Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

*Autor de contacto: mfponce@correo.xoc.uam.mx. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, delegación Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México, Tel. 54 83 7000 ext. 7396.

RESUMEN

La intensificación de la producción agrícola y el suministro de fertilizantes nitrogenados sintéticos, ha perturbado el equilibrio de diferentes ciclos biogeoquímicos, los cuales son determinados en gran medida por la acción de diferentes microorganismos. El propósito del presente trabajo fue conocer la diversidad y abundancia de bacterias asociadas al ciclo del Nitrógeno (N) en diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.). La unidad experimental se ubica en Cocotitlán, Estado de México. Las estrategias utilizadas para la producción de maíz nativo fueron: tipo de labranza (convencional: CT, mínima: ZT), manejo de cultivo (rotación: R, monocultivo: M e intercalado: I), fertilización (química: Q y orgánica: O), control de malezas (química: H, orgánica: h) e incorporación de residuos (+r: más residuos, -r: sin residuos y 30r: 30% de residuos). Se realizaron tres muestreos: línea base, ciclos agrícolas 2013 y 2014 dos muestreos (época de lluvia y seca). La extracción de DNA genómico se realizó con el kit NucleoSpin® Soil. El rendimiento y pureza del gDNA se efectuó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). La Comunidad Bacteriana Asociada al Ciclo del N (CBN) de los suelos de todos los diferentes sistemas de manejo agrícola se distribuyó en 15 filos, 28 clases, 58 ordenes, 98 familias, 164 géneros y 13 especies. En los que se incluyeron fijadores de N (9%), desnitrificantes (64%) y algunos géneros con más de un tipo de metabolismo relacionado al ciclo del N (%). Los sistemas con mayor diversidad fueron los sistemas con labranza mínima. La abundancia total en cada sistema disminuyó en el tiempo. En la CBN común a los diferentes sistemas de manejo, el sistema ZTIOh+r fue el más abundante y el sistema ZTROh+ra el más diverso. La diversidad en los diferentes sistemas de manejo agrícola es variable, oscilante sin patrones asociados a condiciones de temporada y su abundancia total

34 disminuye en el tiempo. Los filos Proteobacteria, Actinobacteria fueron grupos predominantes en los
35 diferentes sistemas de manejo agrícola. Los sistemas de manejo agrícola que incluyen prácticas de
36 manejo de bajo impacto ecológico funcionalmente son más equilibrados que los sistemas
37 convencionales.

38 Palabras clave: ciclo del Nitrógeno, Proteobacterias, Diversidad bacteriana, metabolismo energético.

39 1. INTRODUCCIÓN

40 El suelo es una entidad dinámica con multitud de procesos geoquímicos y biológicos que muestran
41 una elevada heterogeneidad espacial y temporal, lo que ha llevado a implementar indicadores
42 asociados a las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo (Astier et al., 2002, Cerón y
43 Melgarejo 2005, Segueda et al., 2011) como una herramienta de monitoreo para obtener información
44 sobre los cambios en cuanto a sus propiedades, procesos y características al someterse a diferentes
45 manejos y condiciones (Astier et al., 2002).

46 La microbiota del suelo cambia rápidamente ante cualquier alteración o manejo del suelo (Bending
47 et al., 2004); varía estructural y funcionalmente dependiendo del tipo de suelo, el contenido de
48 humedad, la temperatura, el pH, el oxígeno, los minerales y la vegetación (Hayden, 2010) por lo que
49 se considera un indicador sensible en los cambios del mismo. Los indicadores propuestos hasta el
50 momento para analizar el comportamiento de la microbiota del suelo incluyen: tasa de respiración,
51 tasa de descomposición de residuos vegetales, Nitrógeno y Carbono de la biomasa microbiana (Cruz
52 et al., 2004).

53 Durante los últimos años se han iniciado investigaciones sobre la microbiota del suelo para
54 comprender su función, su intervención en los ciclos biogeoquímicos, su perturbación ante el
55 ambiente y manejo de los agrosistemas. Anteriormente, hablar de su comportamiento en el contexto
56 del suelo era complicado debido a que su estudio era posible siempre y cuando se aislaran bacterias
57 cultivables. Con el surgimiento de las técnicas moleculares y en específico el desarrollo de la técnica
58 de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se amplió la posibilidad de
59 estudiar y con ello comprender el funcionamiento de la microbiota del suelo.

60 La intensificación de la producción agrícola y el suministro de fertilizantes nitrogenados sintéticos en
61 los suelos agrícolas, ha perturbado el equilibrio de transformación de diferentes ciclos
62 biogeoquímicos, los cuales son determinados en gran medida por la acción de diferentes
63 microorganismos (Kartal et al., 2012) por ejemplo el ciclo del Nitrógeno.

64 La importancia del ciclo del Nitrógeno no radica únicamente en los requerimientos de los cultivos.
65 Va más allá; de no existir, el nitrógeno fijado y transformado no pasaría a la cadena alimenticia de tal

66 manera que ningún organismo podría existir a excepción de las bacterias, que se han adaptado a
67 diferentes microambientes para obtener su fuente de energía.

68 El objetivo del presente trabajo es conocer la diversidad de bacterias del suelo asociadas al ciclo del
69 N y su dinámica bajo diferentes sistemas de manejo e identificar si la comunidad bacteriana del suelo
70 asociada al ciclo del Nitrógeno puede ser utilizada como un indicador de calidad en suelos destinados
71 a la agricultura.

72 2. MATERIALES Y MÉTODOS

73 2.1 Sitio de estudio y muestreo de suelo

74 El sitio de estudio se ubica en Cocotitlán, Estado de México (19°14'18.39" y 98°52'21.42, 2 572
75 msm). El suelo está formado por material parental de cenizas volcánicas, es un Andosol vítrico éutrico
76 epiarénico (WRB). El clima es de tipo C(w1)(w), temperatura sub-húmedo con lluvias en verano
77 (García, 2004). La temporada de lluvia se extiende de mayo a octubre con una precipitación promedio
78 anual de 784 mm. En años anteriores se había cultivado Ebo (*Vicia sativa*) y Canola (*Brassica napus*).

79 2.2 Diseño experimental

80 Se estableció el experimento en un diseño de bloques al azar con siete tratamientos. Las características
81 de manejo para la producción de maíz nativo (Chalqueño) se basaron en tipo de labranza (mínima:
82 ZT y convencional: CT), el manejo de cultivo (rotación: R, monocultivo: M y cultivos intercalados:
83 I), el uso de insumos orgánicos (O) y sintéticos (Q). El manejo orgánico constaba de los siguientes
84 tratamientos: ZTIO + r y ZTRO+r, que fueron fertilizados con estiércol de vaca compostado añadido
85 a cada planta (4.4 t ha⁻¹); CTMO30r, en el que dos fertilizaciones se llevaron a cabo, la primera
86 consistió en estiércol de vaca compostado (1.166 t ha⁻¹) y el segundo con un compost de estiércol
87 diferente (2.733 t ha⁻¹). En 2013, la primera fertilización en los tratamientos ZTIOh+r y ZTROh+r
88 consistieron en una aplicación de microorganismos de montaña y 500 kg ha⁻¹ de polvo de roca de
89 basalto (187.5 kg), mientras que la segunda consistió en el estiércol compostado de oveja (3.3 t ha⁻¹)
90 y estiércol de pollo (1.1 t ha⁻¹); CTMO30r, en el que la primera fertilización consistió en el estiércol
91 seco de oveja (3.3 t ha⁻¹) y polvo de roca basáltica (0,5 t ha⁻¹), mientras que el segundo abono de pollo
92 (1.1 t ha⁻¹). Las arvenses fueron removidas manualmente. En 2012 y 2013, el manejo sintético
93 consistió de fertilización con urea (243.5 kg ha⁻¹) y superfosfato triple de calcio (50 kg ha⁻¹), mientras
94 que el herbicida (Hierbamina (2,4 D)) se aplicó a una velocidad de 12.5 Ly-1 ha⁻¹.

95 Antes de la implementación de los sistemas de manejo agrícola se realizó un muestreo. Después del
96 primer ciclo agrícola, en los años 2013 y 2014 se realizaron dos muestreos; uno en época de lluvia y
97 otro en época de seca. Las muestras de suelo fueron colectadas con una barrena de la capa arable (0-
98 10 cm). Por cada muestra compuesta de la unidad experimental se muestrearon seis sub-muestras. La

99 muestra fue preservada en una bolsa de plástico con cierre previamente etiquetada. En campo las
100 muestras fueron colocadas en una hielera y en laboratorio, las muestras fueron tamizadas antes de ser
101 almacenadas -70°C.

102 **2.3 Comunidad Bacteriana Asociada al Ciclo del Nitrógeno (CBN)**

103 El DNA genómico (gDNA) fue extraído con el kit NucleoSpin® Soil a partir de 0.5 g de suelo. El
104 rendimiento y pureza del gDNA se valoró en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo
105 Scientific). La verificación de la calidad del gDNA se efectuó mediante la técnica de electroforesis
106 en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™. La observación y fotodocumentación del gel se realizó
107 en el trasiluminador de luz ultravioleta Imager® Gel Doc™ XR (Bio Rad). Por cada evaluación, el
108 pool de gDNA se formó de los gDNA de los triplicados de cada sistema. De cada pool se amplificó
109 la región V4-V5 y todas las amplificaciones fueron secuenciadas mediante Illumina MiSeq (Reserch
110 and Testing Laboratory of the South Plains LLC).

111 **Diversidad de la Comunidad Bacteriana Asociada al Ciclo del Nitrógeno**

112 La caracterización funcional de cada género fue realizada con la ayuda de la base de datos Kioto
113 Encyclopedia for Genes y Genomas (KEGG) (Kanehisa y Goto 2000), la base de datos National
114 Center for Biotechnology Information (NCBI) y a partir de publicaciones que hacen referencia a la
115 función y/o confirmación de genes asociados al ciclo del N. Las categorías que se utilizaron para
116 agrupar la comunidad bacteriana funcional del ciclo del N con base en su metabolismo energético
117 fueron: desnitrificantes (DEN), fijadores de nitrógeno (NF), nitrificantes (NI), removedores de nitrato
118 (NR) y las diferentes combinaciones de ellos.

119 La CBN fue estratificada en tres tipos: una comunidad única en cada sistema de manejo agronómico,
120 una comunidad común en todos los sistemas de manejo y una comunidad común a algún sistema de
121 manejo agrícola.

122 La abundancia relativa de cada género fue calculada con la siguiente formula

$$123 \quad Ab = \frac{\text{Número de secuencias}}{\text{Total de secuencias identificadas}}$$

124 **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

125 **3.1 Composición de la comunidad bacteriana del suelo sometido a diferentes manejos agrícolas**

126 La comunidad bacteriana obtenida de la secuenciación masiva extraída a partir de gDNA de diferentes
127 muestras de suelo fue distribuida en 22 filos, 38 clases, 79 ordenes, 151 familias, 275 géneros y 78
128 especies. En el 59.6% de los géneros se confirmó el metabolismo energético asociado al ciclo del N.
129 De éstos, el 38.4% fue identificado en el segundo muestreo a un año de la implementación de los

130 diferentes sistemas de manejo agrícola, ello reafirma la idea que los manejos agrícolas influyen en la
131 composición y/o actividad de la comunidad bacteriana del suelo.

132 Los géneros con metabolismo energético asociado al ciclo del N, fueron distribuidos en 8 categorías
133 (Figura 1). La mayoría de los microorganismos obtienen el N directamente de NH_4^+ o mediante la
134 reducción del NO_3^- a NH_4^+ a través de un proceso conocido como reducción asimilatoria del NO_3^-
135 (Canfield et al. 2010). El 23% de los microorganismos con esta función lo hemos clasificado en la
136 categoría removedor de NO_3^- .

137 **Figura 1.**

138 La CBN de los suelos de todos los sistemas de manejo agrícola evaluados fue distribuida en 15 filos,
139 28 clases, 58 ordenes, 98 familias, 164 géneros y 13 especies, en los que se incluyeron fijadores de N
140 (9%), desnitrificantes (4%) y algunos géneros con más de un tipo de metabolismo relacionado al ciclo
141 del N (64%).

142 **3.2 Diversidad de la CBN en los diferentes sistemas de manejo agrícola**

143 En la CBN única se agruparon 24 géneros. Los sistemas ZTRQH+ra y ZTRQH+rm registraron cinco
144 géneros, el sistema ZTIOh+r cuatro, los sistemas CTMO30r, CTMQH-r y ZTROh+rm tres y el
145 sistema ZTROh+ra uno. La presencia del género *Desulfosporosinus* fue continua y con abundancia
146 relativa oscilante y la presencia del género *Terriglobus* fue confirmada antes de la implementación
147 de los diferentes sistemas de manejo agrícola.

148 A diferencia del resto de los tratamientos, el sistema ZTRQH+ra presentó una CBN específica en las
149 cuatro épocas de evaluación. La abundancia relativa de cada miembro de la CBN única en cada
150 sistema varió en el intervalo de $0.47\text{E-}4$ a $3.25\text{E-}4$. En el sistema ZTIOh+r el género *Terriglobus*
151 aumentó su abundancia con respecto a la medición inicial del 2011 de $3.5\text{E-}5$ a $5.9\text{E-}5$. La abundancia
152 total de la CBN única de cada sistema fluctuó en el intervalo de $0.4\text{E-}4$ a $4.5\text{E-}4$ (Figura 2). Los
153 sistemas con labranza mínima (ZT) registraron valores máximos de abundancia a partir de la época
154 de lluvia de 2013 a diferencia de los sistemas con labranza convencional (CT). Por la tendencia de
155 los datos analizados se podría suponer que se requiere de un ciclo agrícola mínimo para que existan
156 diferencias en la composición de la CBN única asociadas al manejo. La dinámica de dicha comunidad
157 bacteriana en el presente experimento, podría mostrar que los tratamientos con ZT con respecto a CT,
158 coadyuvan al crecimiento de la misma (Reicosky 1997, Colloff et al. 2008, Shen et al. 2011, Davinic
159 et al 2012).

160 En el sistema ZTRQH+ra se encontró mayor abundancia a lo largo del tiempo respecto a los otros
161 tratamientos (Figura 2), lo cual podría atribuirse al incremento de materia orgánica o a la diversidad
162 metabólica de algunos de los géneros (Aislabie y Deslippe, 2013).

163 **Figura 2.**

164 La CBN común en los siete diferentes sistemas de manejo agrícola fue conformada por 88 géneros.
165 La presencia de 85 de estos géneros fue confirmada antes y después de la implementación de los
166 diferentes sistemas de manejo agrícola. La presencia de 51 géneros en los ciclos agrícolas 2013 y
167 2014 fue oscilatoria (una, dos o tres veces) y en 37 de los géneros fue continua (Figura 3). Ningún
168 sistema presentó a los 88 géneros.

169 En la mayoría de estos géneros, la abundancia relativa fue menor al 1%, solo en diez géneros fue
170 mayor al 1%, de los cuales destacan *Gemmatimonas* y *Sphingomonas* por registrar abundancia
171 relativa mayor al 1% en todos los sistemas y en ambos ciclos agrícolas. El género *Sphingomonas* está
172 relacionado con la degradación de herbicidas y su abundancia es alta en sistemas con labranza
173 (Degruno et al. 2015). En un sistema con labranza mínima su abundancia también puede ser mayor a
174 la registrada en sistemas con labranza. *Gemmatimonas* fue el único género registrado en el filo
175 Gemmatimonadetes contrario a lo reportado por Ramirez-Villanueva et al. (2015) su abundancia
176 relativa fue mayor en algunos sistemas con labranza mínima.

177 **Figura 3.**

178 En los diferentes sistemas de manejo agrícola, el incremento de abundancia relativa de los 37 géneros
179 con presencia continua fue variable (Cuadro 3). En época de lluvia de 2013, el sistema ZTROh+rm
180 favoreció a 21 géneros. En todos los sistemas, la abundancia relativa de *Acidobacterium* (NR),
181 *Candidatus Solibacter* (DENR) y *Prochlorococcus* (NR) se incrementó en este periodo. Al comparar
182 época de lluvia de 2013 con 2014, las condiciones del sistema ZTRQH+rm favorecieron a 20 géneros.
183 En época de seca, de los años 2013-S y 2014, el sistema CTMO30r benefició a 29 géneros. En todos
184 los sistemas, los géneros *Arthrobacter* (NIDENR), *Burkholderia* (NFNIDENR), *Mesorhizobium*
185 (NFDENR), *Methylobacterium* (NFNIDENR), *Prochlorococcus* (NR) y *Sphingomonas* (NFDENR)
186 incrementaron su abundancia relativa. Al comparar el ciclo 2014-L y 2014-S, el sistema ZTRQH+ra
187 benefició a 23 géneros y en todos los sistemas, el género *Moorella* (NFNR) se incrementó.

188 **Cuadro 3.**

189 Es evidente que el aporte de los 37 géneros de la CBN común fue considerablemente mayor al aporte
190 de los 51 géneros de la misma comunidad.

191 La CBN común a algún sistema de manejo agrícola se formó de 52 géneros, su presencia fue
192 oscilatoria (en una, dos o tres evaluaciones) a excepción de *Rhodanobacter* (DENR) y *Paracoccus*
193 (NIDENR) que fueron identificados en las cuatro evaluaciones, pero en un solo sistema. La
194 abundancia relativa de cada género de la comunidad osciló en el intervalo $3E-5$ a 0.01 . Es posible que
195 estos microorganismos no sean dominantes, como es el caso de *Cyanobacteria* (Wartiainen et al

196 2008). O bien, que su presencia se deba a los microambientes generados por los diferentes tamaños
197 de agregados presentes en el suelo (Davinic et al. 2012).

198 El 69.2% de los géneros de esta comunidad fue registrado después de la implementación de los
199 diferentes sistemas de manejo agrícola, lo que demuestra que las prácticas de manejo pueden influir
200 en la presencia o ausencia de la comunidad bacteriana (Rampelotto et al. 2013).

201 En cada sistema, la diversidad de la CBN común a algún sistema osciló en el intervalo entre 24 a 37
202 géneros. El sistema ZTRQH+ra fue el más diverso a diferencia de los sistemas CTMQH-r y ZTIOh+r
203 ambos con 24 géneros. Ningún sistema registró todos los miembros de la CBN común a algún sistema
204 de manejo y en algunos sistemas fue 70 % similar (Cuadro 4).

205 **Cuadro 4.**

206 Los géneros de la CBN común a algunos de los diferentes sistemas que incrementaron su abundancia
207 en época de lluvia (2013-L vs 2014-L) fueron *Anaerolinea*, *Gordonia*, *Paracoccus*, *Rhodanobacter*
208 y *Thermomicrobium*. Estos géneros se presentaron en sistemas con labranza mínima. En época de
209 seca, los géneros que incrementaron su abundancia de 2013-S a 2014-S fueron *Actinokineospora*,
210 *Bacteroides*, *Coralloccoccus*, *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Haliscomenobacter*, *Isosphaera*, *Parvularcula*,
211 *Pontibacter*, *Rhodanobacter*, *Sandaracinus*, *Sinorhizobium*, *Spirochaeta* y *Thermomicrobium*
212 (Cuadro 5).

213 El género *Sinorhizobium* fue identificado en el sistema CTMO30r y ZTROh+rm, sin embargo, se
214 favoreció por las condiciones del sistema ZTROh+rm. Lo mismo ocurrió con el género
215 *Rhodanobacter* presente en el sistema CTMQH-r y favorecido en el sistema ZTIOh+r

216 **Cuadro 5.**

217 El aporte de esta comunidad a la abundancia total en cada sistema varió en el intervalo $5.1E-4$ a 0.01 .
218 El aporte de los sistemas con labranza mínima fue mayor que el de los sistemas con labranza
219 convencional. En 2013-L fue el sistema ZTROh+rm, en la evaluación 2013-S fue el sistema
220 ZTRQH+ra, en la evaluación de 2014-L fue el sistema ZTRQH+rm r y en 2014-S fue el sistema
221 ZTIOh+r (Figura 4). La diferencia observada en la evaluación de 2014-L fue producida por el género
222 *Rhodanobacter* que registró una abundancia relativa de 0.01 . El género fue registrado en otros
223 sistemas (CTMQH-r, ZTIOh+r, ZTROh+ra y ZTRQH+ra) con un valor de abundancia entre $1E-4$ a
224 $2.6E-3$.

225 **Figura 4.**

226 Contrario a lo reportado por otros autores (Degruno et al. 2015), la diversidad bacteriana en los
227 sistemas con labranza convencional fue menor a la registrada en los sistemas con labranza mínima.

228 **Estructura funcional de la CBCN del suelo en los diferentes sistemas de manejo agrícola**

229 En el sistema CTMO30r, el 30% de la abundancia total fue atribuida a la categoría nitrificante-
230 desnitrificante-removedor de NO_3^- (NIDENR). Es muy probable que los miembros de la comunidad
231 sean favorecidos por la aireación generada durante la labranza, pues ésta estimula el proceso de
232 mineralización del nitrógeno orgánico (Hayden, 2010). Después de la implementación del sistema, a
233 excepción de los fijadores de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NFDENR) todas las demás
234 categorías registraron incrementos positivos. Sin embargo, este comportamiento no fue continuo. En
235 todas las categorías el aporte a la estructura funcional fue variable de una época a otra y únicamente
236 en la categoría DENR se identificó un patrón asociado al tiempo de Lluvia y Seca (Figura 5).

237 **Figura 5.**

238 En el sistema CTMQH-r, los fijadores de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NFDENR) y los
239 nitrificantes-desnitrificantes-removedores de NO_3^- (NIDENR) aportaron el 60% de la funcionalidad
240 del sistema. Después de un ciclo agrícola, los miembros de seis categorías redujeron su abundancia;
241 principalmente los nitrificantes-desnitrificantes-removedores de NO_3^- . La categoría fijadora de N
242 disminuyó su aporte estructural en el sistema CTMQH-r. De acuerdo con Poly et al. 2001 las
243 comunidades fijadoras de N disminuyen su abundancia en sistemas con aportes de N, pero
244 principalmente en sistemas que no incluyen aporte de materia orgánica (Figura 6).

245 **Figura 6.**

246 En el sistema ZTIOh+r, el 40% de la estructura funcional fue debida a la categoría NIDENR. Después
247 de la implementación del sistema a excepción de los desnitrificantes y los nitrificantes-
248 desnitrificantes-removedor de NO_3^- todas las demás categorías disminuyeron su aporte,
249 principalmente los removedores de NO_3^- . Las pérdidas de abundancia se observaron en época de
250 lluvia en casi todas las categorías. Al término de la evaluación, únicamente los fijadores de N-
251 nitrificantes-desnitrificantes-removedor de NO_3^- y los nitrificantes-desnitrificantes-removedores de
252 NO_3^- disminuyeron su abundancia a la registrada antes de la implementación del sistema (Figura 7).

253 **Figura 7.**

254 En el sistema ZTROh+ra, la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- aportó el 35%
255 de la estructura funcional del sistema. Después de la implementación del sistema tres categorías
256 registraron pérdidas, principalmente la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- . Y en
257 época de seca más de cuatro categorías disminuyeron su aporte funcional. Al término de la
258 evaluación, los nitrificantes-desnitrificantes-removedores de NO_3^- disminuyeron su abundancia a la
259 registrada antes de la implementación del sistema en un 20% (Figura 8).

260 **Figura 8.**

261 En el sistema ZTROh+rm, el aporte funcional de la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor
262 de NO_3^- fue del 42%. Después de la implementación del sistema cuatro categorías registraron cambios
263 negativos. El aporte funcional de al menos cuatro categorías fue menor en época de lluvia. Y al
264 término del experimento tres categorías disminuyeron su aporte funcional (Figura 9).

265 **Figura 9.**

266 El sistema ZTRQH+ra, el aporte funcional de la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor de
267 NO_3^- fue del 38%. Después de la implementación del sistema dos categorías fueron afectadas
268 negativamente. En época de lluvia de 2014 cinco categorías registraron un descenso en su aporte
269 funcional. Sin embargo, fue el único sistema en registrar en todas las categorías de la evaluación
270 2014-S un aumento respecto a la época anterior. Al término de la evaluación, el sistema disminuyó
271 su aporte funcional en las categorías nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y fijador de N-
272 nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- (Figura 10).

273 **Figura 10.**

274 En el sistema ZTRQH+rm, la categoría fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- (NFDENR)
275 contribuyó con el 32% de la estructura funcional del sistema. Al implementar el sistema de manejo
276 agrícola se afectó negativamente tres categorías. Principalmente la categoría nitrificante-
277 desnitrificante-removedor de NO_3^- (NIDENR). En época de lluvia de 2014 cinco categorías
278 registraron un descenso en su aporte funcional; sin embargo, fue el único sistema en registrar en todas
279 las categorías de la evaluación 2014-S un aumento respecto a la época anterior. Al término de la
280 evaluación, el sistema disminuyó su aporte funcional en las categorías nitrificante-desnitrificante-
281 removedor de NO_3^- y fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- (Figura 11).

282 **Figura 11.**

283 Tres categorías predominaron en la estructura funcional de la CBN en los diferentes sistemas de
284 manejo agrícola. Principalmente la categoría nitrificante-desnitrificante-removedor NO_3^- . En el
285 tiempo, esta categoría disminuyó su aporte funcional en todos los sistemas, especialmente en los
286 sistemas CTMQH-r y ZTRQH+rm. El género más afectado fue *Arthrobacter*. El efecto de las
287 prácticas agrícolas de conservación sobre la abundancia relativa del género ya ha sido reportado
288 (Ramirez-Villanueva et al., 2015); sin embargo, en esta investigación también se observó en sistemas
289 convencionales.

290 La categoría fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- disminuyó su aporte
291 funcional en todos los sistemas. A excepción del sistema CTMQH-r, en los demás sistemas
292 incrementó su diversidad. La categoría registró tres géneros de la CBCN común a algún sistema,
293 cinco de ellos a la CBCN común (*Anaeromyxobacter*, *Burkholderia*, *Geobacter*, *Methylobacterium* y

294 *Paenibacillus*) y uno a la CBCN única (*Polaromonas*). Si bien, la abundancia relativa de estos géneros
295 fue menor a 0.007 algunos de ellos son importantes.

296 Por ejemplo, *Burkholderia* es un heterótrofo, promotor de crecimiento usa aminoácidos simples,
297 azúcares, recalcitrantes aromáticos, compuestos fenolíticos es muy posible que participe en el
298 intercambio de carbono (Aislabie et al. 2013, Souza et al., 2013), es favorecido en suelos con un alto
299 contenido en materia orgánica y en sistemas con labranza cero (Souza et al., 2015). *Herbaspirillum*
300 es una bacteria endófito estrictamente asociada a raíces de avena y altamente eficiente para fijar N
301 (Soares et al. 2006, Kraiser et al. 2011). Existe evidencia que los miembros del orden Myxococcales
302 son los menos afectados por las prácticas agrícolas (Ceja Navarro et al. 2010). En este estudio
303 *Anaeromyxobacter* disminuyó su abundancia bajo las condiciones del sistema ZTROh+ra.

304 En los sistemas con labranza mínima era de esperar que las comunidades fijadoras de N, nitrificantes
305 y removedor de NO₃⁻ incrementaran en diversidad y abundancia. Pero, no se tenía contemplado que
306 estas comunidades pudieran participar en el proceso de desnitrificación. Lo que ratifica que los
307 sistemas con labranza mínima emiten mayores concentraciones de N₂O a diferencia de los sistemas
308 con labranza. Six et al. (2004), consideran que la adopción de técnicas de agricultura de conservación,
309 y en especial de siembra directa, tienden a incrementar el contenido de agua del suelo disminuyendo
310 con ello la aireación en el perfil del suelo y favoreciendo, por tanto, la desnitrificación y emisión de
311 N₂O. A su vez, una mayor compactación en suelos bajo siembra directa, especialmente en los
312 primeros años, puede estimular una mayor emisión de N₂O. No obstante, también se ha señalado una
313 posible reducción de las emisiones de N₂O si se mantiene la siembra directa durante un largo periodo.

314 La categoría NR ocupó el cuarto lugar en aporte estructural en los diferentes sistemas de manejo
315 agrícola. La categoría disminuyó su aporte funcional en el sistema ZTROh+rm. En los sistemas
316 CTMO30r y CTMQH-r el aporte de los géneros *Amycolaptosis* y *Prochlorococcus* (≈0.01) fue
317 significativo. *Amycolaptosis* pertenece a las Actinobacterias, las cuales se caracterizan por su
318 capacidad para producir antibióticos y metabolitos secundarios y con ello excluir algunas bacterias
319 (Soares et al. 2006) posible causa de su incremento en estos sistemas. Mientras que la diversidad de
320 géneros registrada en los sistemas ZTRQH+ra y ZTRQH+rm originó el incremento. El aporte de la
321 categoría en los sistemas con labranza mínima y fertilización orgánica (ZTIOh+r, ZTROh+ra y
322 ZTROh+rm) fue bajo. Es posible que la perturbación de esta categoría en el sistema ZTROh+rm sea
323 provocada por la combinación labranza mínima y aporte orgánico.

324 CONCLUSIONES

325 La diversidad en los diferentes sistemas de manejo agrícola es variable, oscilante sin patrones
326 asociados a condiciones de temporada y su abundancia total disminuye en el tiempo. Al estratificar

327 la CBN se identifica un grupo de 37 géneros comunes con presencia continua en los diferentes
328 sistemas de manejo agrícola que facilitan identificar los cambios originados por dichos sistemas sobre
329 ésta. Además, hay otro grupo reducido de géneros (17 géneros) comunes a los diferentes sistemas de
330 manejo agrícola que no son afectados por la implementación de un sistema de manejo agrícola, los
331 cuales podrían ser utilizados como indicadores de calidad en suelos que han estado sin uso agrícola.
332 Asimismo, los filos Proteobacteria, Actinobacteria fueron grupos predominantes en los diferentes
333 sistemas de manejo agrícola y se confirma que el filo Gemmatimonadetes es afectado por la estructura
334 del suelo. En lo referente a los diferentes sistemas de manejo agrícola el sistema ZTIOh+r, ZTROh+ra
335 y ZTRQH+rm destacan por registrar diversidad bacteriana, funcional y equilibrio funcional.
336 Al parecer, los miembros de las categorías DE y DENR no son los únicos en originar gases de efecto
337 invernadero (N₂O), adicional a ellos se identifican a los miembros de las categorías NFDENR,
338 NFNIDENR, NIDENR y NR. Los sistemas de manejo agrícola que incluyen prácticas de labranza
339 mínima, rotación de cultivos e incorporación de residuos funcionalmente son más equilibrados que
340 los sistemas convencionales. Sin embargo, existe una posibilidad alta de que sean sistemas que emiten
341 altas concentraciones de gases de efecto invernadero.

342 **AGRADECIMIENTOS**

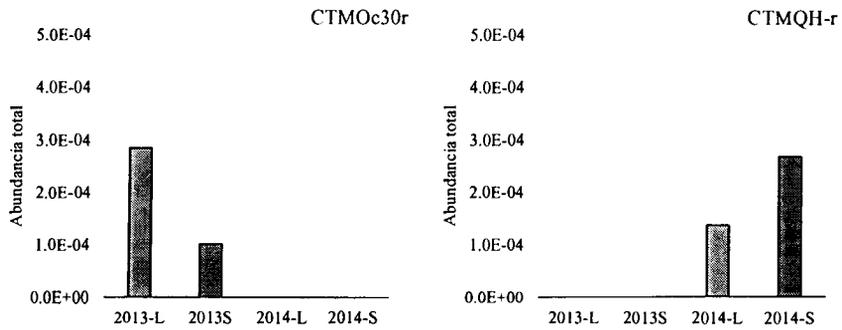
343 La presente investigación fue financiada por Conacyt, proyecto ciencia básica 2011, número 169056
344 denominado: "Indicadores microbiológicos de salud del suelo en diferentes sistemas de manejo
345 agrícola" y el Programa Sierra Nevada Poniente de la Universidad Autónoma Metropolitana.
346 Asimismo, agradecemos al Sr. José Guzmán por el préstamo de la parcela que fue utilizada como
347 unidad experimental.

348 **REFERENCIAS**

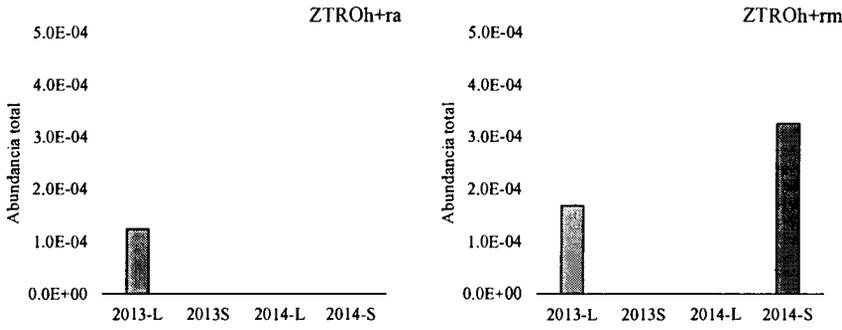
- 349 Aislabie J, Deslippe JR, Dymond J. 2013. Soil microbes and their contribution to soil services. *Ecosystem services in New*
350 *Zealand: conditions and trends*, 143-161.
- 351 Astier CM, Maass MM, Etchevers BJ. 2002. Derivación de indicadores de calidad de suelos en el contexto de la agricultura
352 sustentable. *Agrociencia*, 36: 15.
- 353 Ceja-Navarro JA, Rivera-Orduna FN, Patino-Zuniga L, Vila-Sanjurjo A, Crossa J, Govaerts B, Dendooven L. 2010.
354 Phylogenetic and multivariate analyses to determine the effects of different tillage and residue management
355 practices on soil bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 76(11): 3685-3691.
- 356 Cerón RLE, Melgarejo MLM. 2005. Enzimas del suelo: indicadores de salud y calidad. *Acta Biológica Colombiana*, 10(1):
357 5-18.
- 358 Cruz BA, Barra EJ, Del Castillo RF, Gutiérrez C. 2004. La calidad del suelo y sus indicadores. *Revista Ecosistemas*, 13(2).
- 359 Davinic M, Fultz LM, Acosta-Martinez V, Calderón FJ, Cox SB, Dowd SE, Allen VG, Zak JC, Moore-Kucera J. 2012.
360 Pyrosequencing and mid-infrared spectroscopy reveal distinct aggregate stratification of soil bacterial
361 communities and organic matter composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 46: 63-72.
- 362 Degruné F, Dufréne M, Colinet G, Massart S, Taminiau B, Bodson B, Hiel M-P, Daube G, Nezer C, Vandenberg M. 2015.
363 A novel sub-phylum method discriminates better the impact of crop management on soil microbial community.
364 *Agronomy for Sustainable Development*, 35(3): 1157-1166.

- 365 Hayden HL, Drake J, Imhof M, Oxley APA, Norng S, Mele PM. 2010. The abundance of nitrogen cycle genes *amoA* and
366 *nifH* depends on land-uses and soil types in South-Eastern Australia. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(10):
367 1774-1783.
- 368 Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein
369 annotation. *Nucleic acids research*, 44(D1): D457-D462.
- 370 Kartal B, van Niftrik L, Keltjens JT, Op den Camp HJ, Jetten MS. 2012. Anammox—Growth Physiology, Cell Biology,
371 and Metabolism. *Advances in Microbial Physiology*, 60: 212.
- 372 Kraiser T, Gras DE, Gutiérrez AG, González B, Gutiérrez RA. 2011. A holistic view of nitrogen acquisition in plants.
373 *Journal of Experimental Botany*, 62(4): 1455-1466.
- 374 Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Gourbière F, Monrozier LJ. 2001. Comparison of *nifH* Gene Pools in Soils and Soil
375 Microenvironments with Contrasting Properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5): 2255-2262.
- 376 Ramirez-Villanueva DA, Bello-López JM, Navarro-Noya YE, Luna-Guido M, Verhulst N, Govaerts B, Dendooven L. 2015.
377 Bacterial community structure in maize residue amended soil with contrasting management practices. *Applied*
378 *Soil Ecology*, 90: 49-59.
- 379 Rampelotto PH, de Siqueira Ferreira A, Barboza AD, Roesch LF. 2013. Changes in diversity, abundance, and structure of
380 soil bacterial communities in Brazilian Savanna under different land use systems. *Microb Ecol*, 66(3): 593-607.
- 381 Segueda NA, Correa VG, Blanco LJ, Gamino RMdL. 2011. Naturaleza y utilidad de los indicadores de calidad del suelo.
382 *ContactoS*, 80: 29-37.
- 383 Six J, Ogle SM, Jay breidt F, Conant RT, Mosier AR, Paustian K. 2004. The potential to mitigate global warming with no-
384 tillage management is only realized when practised in the long term. *Global Change Biology*, 10(2): 155-160.
- 385 Soares RA, Roesch LFW, Zanatta G, de Oliveira Camargo FA, Passaglia LMP. 2006. Occurrence and distribution of
386 nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological
387 techniques. *Applied Soil Ecology*, 33(3): 221-234.
- 388 Souza RC, Cantão ME, Vasconcelos ATR, Nogueira MA, Hungria M. 2013. Soil metagenomics reveals differences under
389 conventional and no-tillage with crop rotation or succession. *Applied Soil Ecology*, 72: 49-61.
- 390 Souza RC, Hungria M, Cantão ME, Vasconcelos ATR, Nogueira MA, Vicente VA. 2015. Metagenomic analysis reveals
391 microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes.
392 *Applied Soil Ecology*, 86: 106-112.
- 393 Wartainen J, Eriksson T, Zheng W, Rasmussen U. 2008. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy—
394 *nifH* PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Applied Soil Ecology*, 39(1): 65-75.
- 395

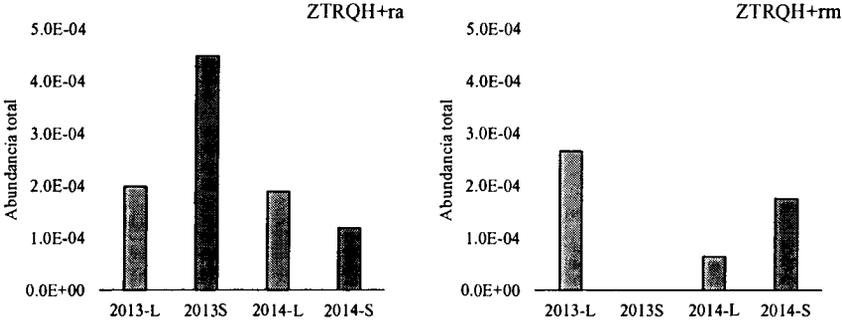
396



397



398



399
400
401

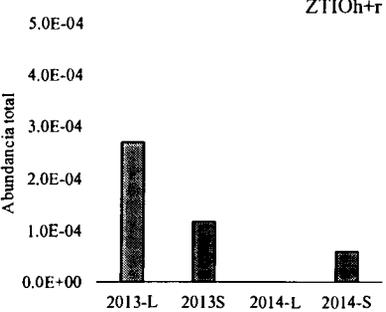


Figura 1. Abundancia total de la CBN única de los diferentes sistemas de manejo agrícola implementados durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014 para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el Municipio de Cocotitlán, Estado de México.

402 ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R=rotación, M=monocultivo, O= fertilización orgánica,
403 Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H: control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin
404 residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a=avena.
405

410 fertilización química, h= control de arvenses no químico, H: control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos,
 411 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a=avena. Color verde: abundancia relativa mayor 1%. Color amarillo: 0.001 <
 412 abundancia relativa ≤ 0.01. Color rojo: abundancia relativa ≤ 0.001.

413

414 **Cuadro 3.** Número de géneros de la Comunidad Bacteriana Asociada al Ciclo de Nitrógeno común con presencia continua
 415 beneficiados en los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el municipio
 416 de Cocotitlán, Estado de México.

Periodo	CTMO30r	CTMQH-r	ZTIOh+r	ZTROh+ra	ZTROh+rm	ZTRQH+ra	ZTRQH+rm
2011 vs 2013-L	16	14	14	11	21	14	11
2013-L vs 2014-L	12	14	16	12	13	9	20
2013-S vs 2014-L	29	25	23	26	24	24	26
2014-L vs 2014-S	12	13	23	16	9	16	5
2011 vs 2014-S	6	7	11	11	10	12	9

ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R=rotación, M=monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H: control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a=avena

417

418 **Cuadro 4.** Relación de semejanza de la Comunidad Bacteriana Asociada al Ciclo del Nitrógeno común a algunos de los
 419 diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocotitlán,
 420 Estado de México.

Sistema	CTMQH-r	ZTIOh+r	ZTROh+ra	ZTROh+rm	ZTRQH+ra	ZTRQH+rm
CTMO30r	0.39	0.58	0.45	0.79	0.73	0.73
CTMQH-r		0.63	0.42	0.58	0.79	0.54
ZTIOh+r			0.48	0.71	0.77	0.55
ZTROh+ra				0.75	0.75	0.75
ZTROh+rm					0.75	0.72
ZTRQH+ra						0.62

ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R=rotación, M=monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H: control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a=avena

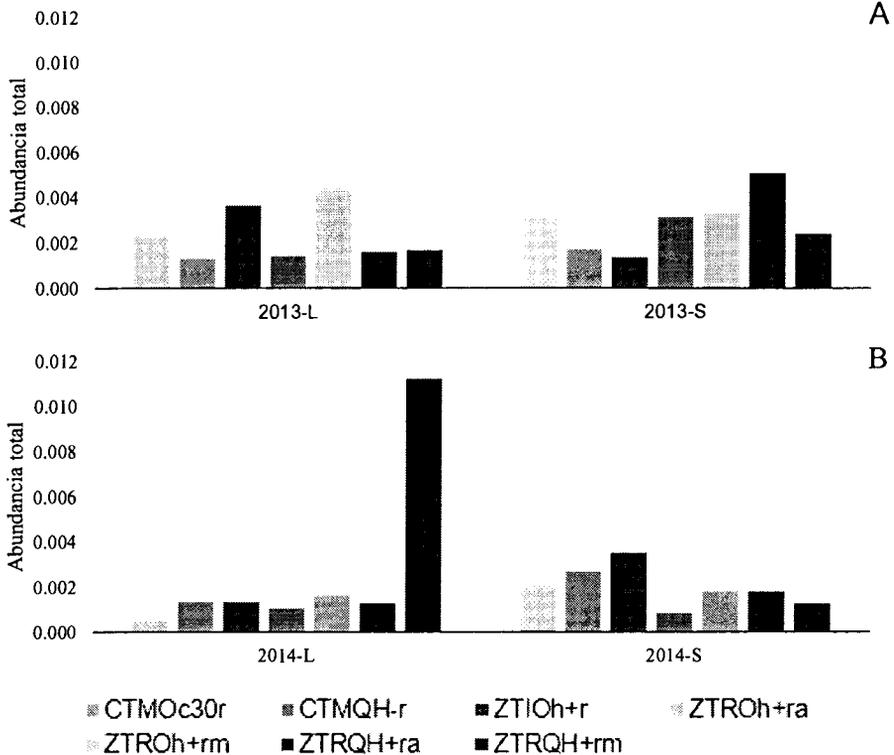
421

422 **Cuadro 5.** Miembros de la Comunidad Bacteriana Asociada al Ciclo del Nitrógeno común a algunos de los diferentes
 423 sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz nativo (*Zea mays* L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de
 424 México con incrementos positivos en época de lluvia y seca.

Sistema	Género	Abundancia relativa		Sistema	Género	Abundancia relativa	
		2013-L	2014-L			2013-S	2014-S
ZTIOh+r	<i>Anaerolinea</i>	0.00013	0.00033	CTMO30r	<i>Cytophaga</i>	0.00010	0.00011
ZTROh+ra	<i>Anaerolinea</i>	0.00004	0.00006		<i>Haliscomenobacter</i>	0.00010	0.00011
	<i>Gordonia</i>	0.00008	0.00013		<i>Isosphaera</i>	0.00005	0.00011
	<i>Thermomicrobium</i>	0.00004	0.00006		<i>Parvularcula</i>	0.00005	0.00011
ZTROh+rm	<i>Anaerolinea</i>	0.00038	0.00052		<i>Sandaracinus</i>	0.00005	0.00011
	<i>Rhodanobacter</i>	0.00021	0.00026	<i>Sinorhizobium</i>	0.00010	0.00011	
ZTRQH+ra	<i>Paracoccus</i>	0.00005	0.00009	CTMQH-r	<i>Bacteroides</i>	0.00010	0.00013
ZTRQH+ra	<i>Rhodanobacter</i>	0.00010	0.00028		<i>Rhodanobacter</i>	0.00056	0.00094
					<i>Spirochaeta</i>	0.00010	0.00058

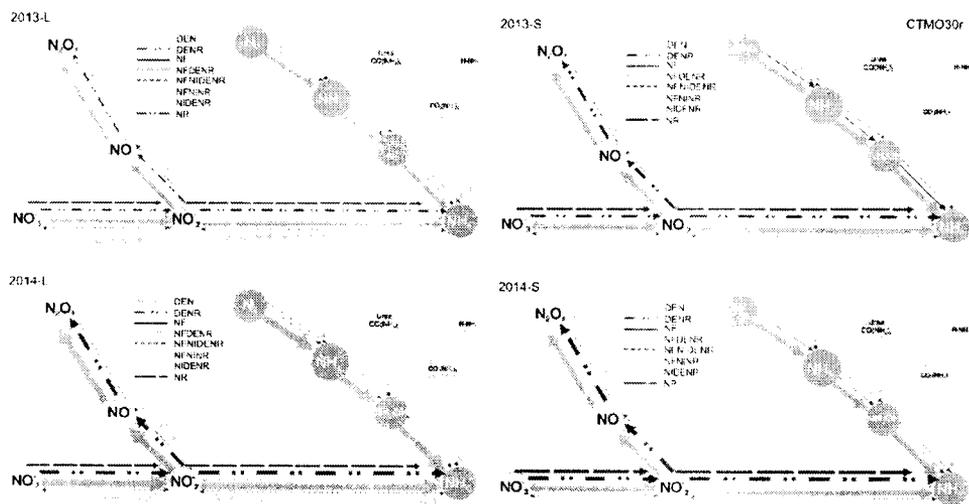
ZTIOh+r	<i>Rhodanobacter</i>	0.00006	0.00130
ZTROh+ra	<i>Actinokineospora</i>	0.00006	0.00011
ZTROh+rm	<i>Corallococcus</i>	0.00005	0.00005
	<i>Pontibacter</i>	0.00010	0.00011
	<i>Sinorhizobium</i>	0.00010	0.00016
	<i>Corallococcus</i>	0.00008	0.00018
ZTRQH+ra	<i>Thermomicrobium</i>	0.00004	0.00006
	<i>Flexibacter</i>	0.00010	0.00018
ZTRQH+rm	<i>Sandaracinus</i>	0.00015	0.00035

ZT= labranza mínima, CT= labranza convencional, I= intercalado, R=rotación, M=monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H: control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el 30% de residuos, m= maíz y a=avena.



428 Figura 4. Aporte de la CBN común a algunos de los diferentes sistemas de manejo agrícola para la producción de maíz (*Zea*
 429 *mays* L.) en el municipio de Cocotitlán, Estado de México durante los ciclos agrícolas 2013 y 2014. ZT= labranza mínima,
 430 CT= labranza convencional, I= intercalado, R=rotación, M=monocultivo, O= fertilización orgánica, Q= fertilización
 431 química, h= control de arvenses no químico, H: control de arvense químico, +r= con residuos, -r= sin residuos, 30r= con el
 432 30% de residuos, m= maíz y a=avena.

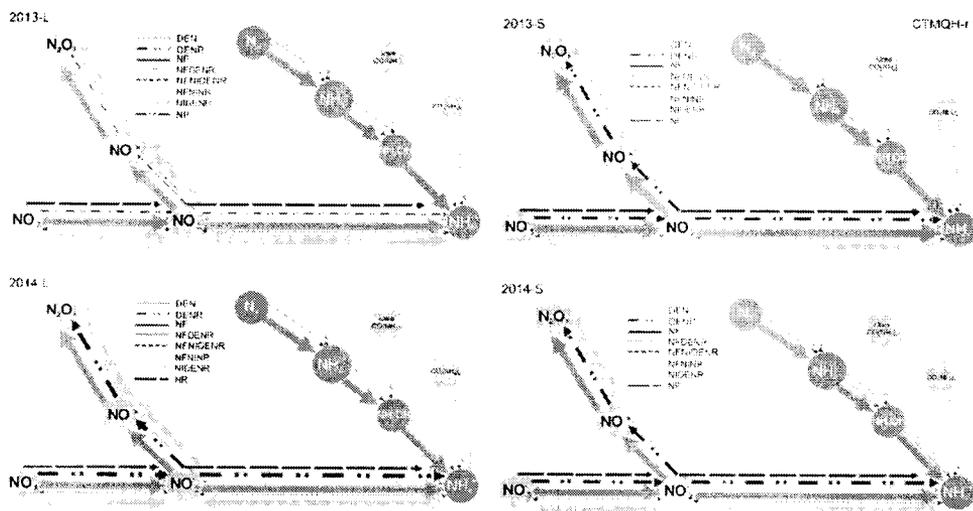
433



434

435 Figura 5. Estructura funcional de la comunidad bacteriana del ciclo del N en el sistema CTM030r después de su
 436 implementación. CT= labranza convencional, M=monocultivo, O= fertilización orgánica, 30r= con el 30% de residuos.
 437 DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-
 438 removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR= nitrificante-
 439 desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .

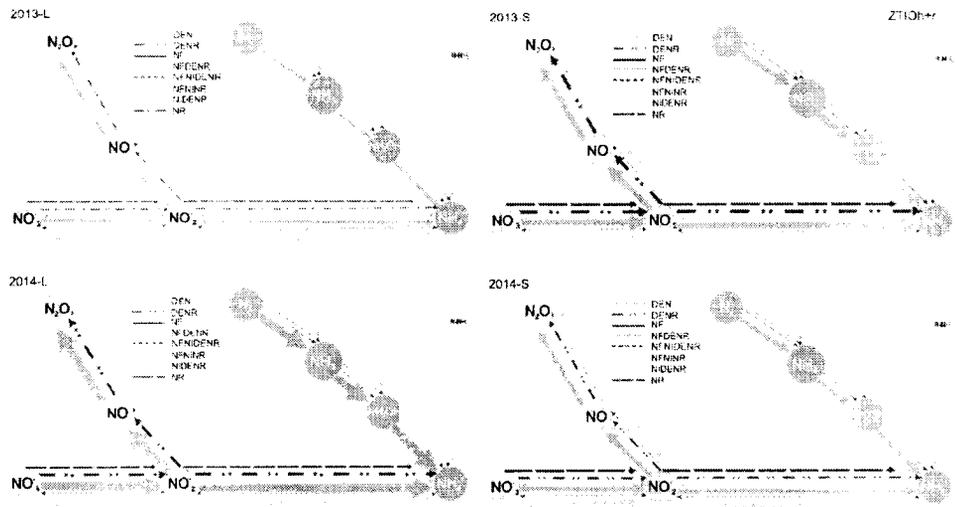
440



441

442 Figura 6. Estructura funcional de la comunidad bacteriana del ciclo del N en el sistema CTMQH-r después de su
 443 implementación. CT= labranza convencional, M=monocultivo, Q= fertilización química, H: control de arvense químico, -
 444 r= sin residuos. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de
 445 N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- ,
 446 NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .

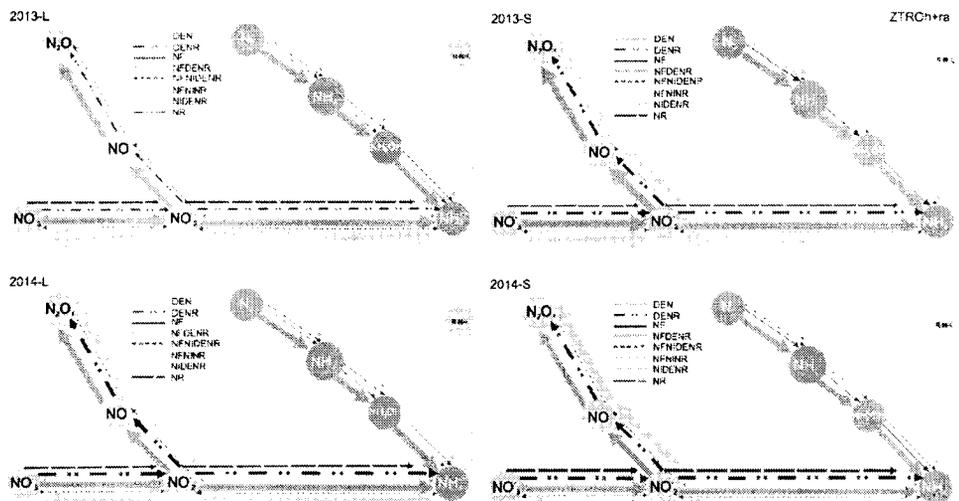
447



448

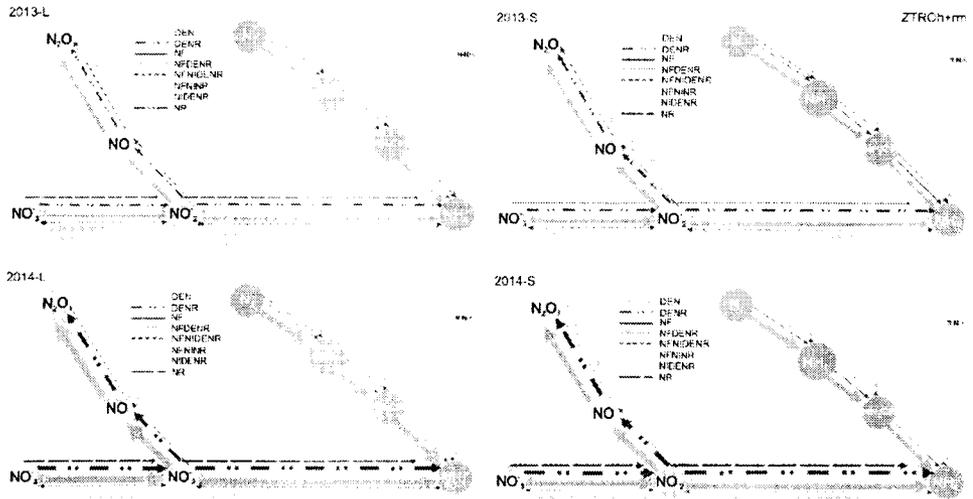
449 Figura 7. Estructura funcional de la comunidad bacteriana del ciclo del N en el sistema ZTIOh+r después de su
 450 implementación. ZT= labranza mínima, I= intercalado, O= fertilización orgánica, h= control de arvenses no químico, +r=
 451 con residuos. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-
 452 desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NIDENR=
 453 nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .

454



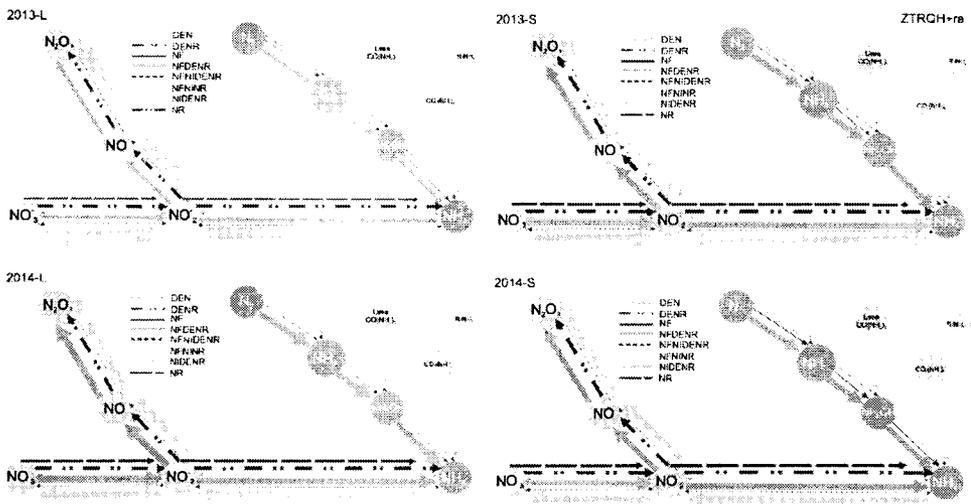
455

456 Figura 8. Estructura funcional de la comunidad bacteriana del ciclo del N en el sistema ZTROh+r después de su
 457 implementación. ZT= labranza mínima, R=rotación, O= fertilización orgánica, h= control de arvenses no químico +r= con
 458 residuos y a=avena. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- , NF= fijador de N, NFDENR= fijador
 459 de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- , NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- ,
 460 NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .



461
462
463
464
465
466

Figura 9. Estructura funcional de la comunidad bacteriana del ciclo del N en el sistema ZTROh+rm después de su implementación. ZT= labranza mínima, R=rotación, O= fertilización orgánica, h= control de arvenses no químico, +r= con residuos, m= maíz. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- ; NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- ; NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- ; NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .



467
468
469
470
471
472
473

Figura 10. Estructura funcional de la comunidad bacteriana del ciclo del N en el sistema ZTRQH+ra después de su implementación. ZT= labranza mínima, R=rotación, Q= fertilización química, h= control de arvenses no químico, H: control de arvense químico, +r= con residuos y a=avena. DE= desnitrificante, DENR= desnitrificante-removedor de NO_3^- ; NF= fijador de N, NFDENR= fijador de N-desnitrificante-removedor de NO_3^- ; NFNIDENR= fijador de N-nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- ; NIDENR= nitrificante-desnitrificante-removedor de NO_3^- y NR= removedor de NO_3^- .