



# El Colegio de la Frontera Sur

Dinámica del Carbono y Nitrógeno en suelos de manglar de la zona núcleo de La Reserva de Biosfera La Encrucijada, Chiapas

Tesis

Presentada como requisito parcial para optar al grado de

Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural Con orientación en  
Manejo y Conservación de los Recursos Naturales

Por

Williams Iván Selvas Villafuerte

2017



# El Colegio de la Frontera sur

Tapachula Chiapas, a 23 de junio de 2017.

Las personas abajo firmantes, miembros del jurado examinador de:

Williams Iván Selvas Villafuerte

hacemos constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada

**Dinámica del Carbono y Nitrógeno en suelos de manglar de la zona núcleo de La Reserva de Biosfera La Encrucijada, Chiapas**

para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural**

	Nombre	Firma
Tutor	<u>Dr. Cristian Tovilla Hernández</u>	_____
Asesor	<u>M. en C. Gamaliel Mejía González</u>	_____
Asesor	<u>Dr. Jorge López Portillo</u>	_____
Sinodal adicional	<u>M. en E. Javier Francisco Valle Mora</u>	_____
Sinodal adicional	<u>M. en C. Hermila Yadira Siu Rodas</u>	_____
Sinodal suplente	<u>Dra. Lislie Solís Montero</u>	_____

## Dedicatoria

A mi amado y bello Hijo **Israel Selvas López** y amada esposa **Alejandra López Pastrana**, gracias por que me inspiraron a esforzarme cada día, son lo más hermoso que la vida y Dios me han regalado. *Los Amo...*

A mi madre, por todo el apoyo brindado en todo este tiempo, este triunfo también es tuyo.

A mis hermanas Karina y Gabriela Selvas, sobrinos Gabriel, Debora y Santiago por su apoyo incondicional.

A mis abuelos, en especial a mi abuelo<sup>†</sup> quien me enseñó a no darme por vencido y que si teníamos un sueño debíamos de cumplirlo... *Los Amo...*

A mis compañeros y amigos Caro, Anita, Mauro, Gabo, Elvis, Trino, Julio C y Julio C, Wilmar, Tinin, por su amistad, y apoyo durante este proceso.

## Agradecimientos

A Dios por permitir obtener un grado más a nivel profesional y se que cumples el propósito en mi.

*Te alabo con todo mi corazón; por que has engrandecido tu nombre, y tu palabra sobre todas las cosas. El día que clamé me respondiste.*  
S. 138

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca

Al Colegio de la Frontera Sur, por haberme brindado la oportunidad de ingresar al programa de Posgrado de la Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural, con orientación en Manejo y Conservación de los Recursos Naturales.

Al **Dr. Cristian Tovilla Hernández**, por la oportunidad en poder desarrollar este trabajo y por los conocimientos brindados, y ser mi guía durante mi estancia en ECOSUR.

A mi Asesor M. en C. **Gamaliel Mejía González**, por su valiosa aportación en este proyecto, ya que con su conocimiento y experiencia a este estudio se obtuvo un buen trabajo.

A el M. en E. **Javier Francisco Valle Mora**, por su apoyo en los análisis estadísticos y asesorías brindadas, para poder obtener un buen trabajo.

## **Tabla de contenido**

Resumen	6
<b>Capitulo I</b>	
Introducción	7
<b>Capitulo II. Artículo</b>	
Dinámica del Carbono y Nitrógeno en suelos de manglar de la zona núcleo de La Reserva de Biosfera La Encrucijada, Chiapas	11
<b>Capitulo III</b>	
Conclusiones	27
Literatura citada	28
<b>Capitulo IV</b>	
Metodología detallada	33

## **RESUMEN**

En años recientes, los bosques de mangle han sufrido diversos daños a causa de actividades antropogénicas, y esto repercute en el suministro, almacén de carbono a nivel de suelo y estructura arbórea de las comunidades de manglar. Con el objetivo de conocer la importancia de la capacidad del suelo en la captura de carbono y nitrógeno, en este estudio, se evaluó la dinámica del carbono y nitrógeno en suelos de manglar de la zona núcleo de La Reserva de Biosfera La Encrucijada, Chiapas.

El diseño experimental consistió en el análisis de suelo en dos temporadas, abril-mayo y julio-agosto, de 2016, en seis sitios, cinco de ellos ubicados alrededor de la torre de flujo de Eddico Variance o de Remolinos; mientras el último sitio se ubicó en un bosque de mangle afectado en 2013 por un incendio forestal subterráneo, estos sitios se localizan dentro de zona núcleo de La REBIEN. En cada sitio, se estudio a tres profundidades las concentraciones de carbono orgánico total, respirometría, pH, ORP, OD, temperatura, salinidad, nitrógeno en sus estados de oxidación y reducción (amonio, nitritos, nitratos), y bacterias asociadas a los procesos de nitrificación y desnitrificación. Los resultados obtenidos demostraron que no existe diferencia significativa entre sitios y temporadas en ciertos parámetros estudiados. Sin embargo, las concentraciones de nitrato fueron los compuestos más abundantes en la mayoría de los sitios, así mismo los análisis de componentes principales, señalan que existe correlaciones específicas para cada temporada. Esto nos indica que en suelos pertenecientes al bosque de manglar de La REBIEN, tienen la capacidad de transformar y almacenar diferentes nutrientes del carbono y nitrógeno, conservando un suelo uniforme durante cierto tiempo.

**Palabras clave:** manglares, carbono, nitrógeno, desnitrificación, bacterias.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Los bosques de manglar, constituyen un importante recurso forestal en el planeta, sostienen la biodiversidad entre los ecosistemas costeros tropicales y contribuyen de manera natural en la captura de carbono azul, que amortigua el efecto de la pérdida de la capa atmosférica de ozono y el efecto invernadero sobre el planeta, almacenándolo a largo plazo en el sedimento (IPCC 2007). Se caracterizan por su complejidad, debido a que albergan una gran diversidad de especies de insectos, crustáceos, moluscos, anfibios, peces, aves, reptiles y mamíferos, adicionalmente a esta vegetación están asociadas algunas especies de orquídeas, bromelias, líquenes y musgos. Además, es un sistema en donde la salinidad y disponibilidad de nutrientes varían constantemente a lo largo del tiempo (Alongi 1988; Holguín *et al.*, 2006).

En México, los sistemas de manglar se distribuyen en el interior de lagunas costeras y sistemas deltaicos de las costas del Golfo de México las cuales son: Pacífico Norte (Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit), Pacífico Centro (Jalisco, Colima y Michoacán) Pacífico Sur (Guerrero, Oaxaca y Chiapas), Golfo de México (Tamaulipas, Veracruz y Tabasco) y Península de Yucatán (Campeche, Yucatán y Quintana Roo) (Spalding *et al.*, 1997; López-Portillo y Ezcurra, 2002). En particular, la región del Pacífico Sur, cuenta con una gran variedad de ecosistemas en sistemas lagunares y estuarinos, como el sitio denominado Chantuto-Panzacola, que se localiza en la costa sur de Chiapas, dentro de la zona núcleo de La Reserva de la Biosfera La Encrucijada (La REBIEN), dando como resultado, gran diversidad biológica, considerada una de las más importantes en el país (Flores-Verdugo *et al.*, 1992; Díaz-Ruíz *et al.*, 2004).

El bosque de mangle, tiene la capacidad de cambiar las propiedades del suelo en donde se desarrolla. Desde el punto de vista funcional, los procesos químicos y

microbianos del manglar contribuyen a través de los ciclos biogeoquímicos a la mineralización del nitrógeno, azufre, fósforo, y carbono orgánico, compuestos esenciales para que estos ecosistemas se puedan establecer, desarrollar y mantenerse en gran cantidad (Holguín *et al.*, 2006).

Existen dos tipos de suelos en los bosques de mangle: orgánicos e inorgánicos (Von Prhal *et al.*, 1990). Los suelos inorgánicos, se caracterizan por ser ricos en calcio, magnesio, potasio, con poca materia orgánica (<15 %), baja disponibilidad de carbono y nitrógeno <20 %, pH generalmente neutro, densidad aparente alta, porosidad baja (45-55 %), conductividad hidráulica baja, con un intercambio catiónico bajo (Mistch y Gosselink, 2000; Izaurrealde *et al.*, 2001). Con respecto a los suelos más orgánicos, los procesos anaerobios son los responsables en la liberación del 25 al 30% de los nutrientes, debido a la descomposición de la materia orgánica, con una continua mineralización y por lo tanto un alto potencial de almacenamiento de carbono y nitrógeno (>20 %), presentan pH ácido, densidad aparente baja, porosidad alta (80%), conductividad hidráulica variable, alta capacidad de retención hidráulica, baja disponibilidad de nutrientes, y capacidad de intercambio catiónico alta. Están constituidos principalmente por hojas y madera, debido a ello, son ricos en lignina, la cual es degradada por diferentes poblaciones microbianas (Alongi *et al.*, 1989).

La materia orgánica presente en suelo, se constituye por un conjunto de sustancias tales como la biomasa microbiana y restos vegetales senescentes; materia orgánica parcialmente transformada, con características químicas que pueden ser distinguidas como azúcares sencillos, aminoácidos, polisacáridos y proteínas; materia húmificada, que ha sido completamente transformada y ha perdido las características químicas de sus precursores (Porta *et al.*, 2003). Para que el material vegetal pueda ser transformado para su posterior degradación, primeramente comienza con la colonización superficial de diferentes poblaciones de hongos y bacterias, para facilitar su transformación a formas más reducidas como la generación de detritus, el cual está constituido por materia orgánica rica en contenido calórico, proteico y elevadas cargas microbianas (Odum y Heald, 1975; Matondkar *et al.*, 1981; Ranghukumar *et al.*, 1994;



Dunny y Winans, 1999; Whitehead *et al.*, 2001; Bosgelmez-Tinaz, 2003; Waters y Bassler, 2005).

En cuanto al estudio de la biogeoquímica del carbono y nitrógeno en suelos de esta vegetación, algunas investigaciones han reconocido que estos sistemas, contribuyen de manera significativa al secuestro de gases de efecto invernadero como el CO<sub>2</sub>, metano (CH<sub>4</sub>), y dióxido nitroso (NO<sub>2</sub>) (Purvaja y Ramesh 2001; Muñoz-Hincapié *et al.*, 2002; Kreuzwieser *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010). La fijación del nitrógeno, consiste en una función metabólica, que esta asociado a hojas muertas en proceso de descomposición, pneumatóforos o raíces aéreas, rizósfera, corteza de árboles, diferentes géneros de bacterias, y donde se han reportado potenciales de óxido-reducción (ORP) no mayores a 250 mV (Gotto y Taylor 1976; Zuberer y Silver 1978; Uchino *et al.*, 1984; Van der Valk y Attiwill, 1984; Hicks y Silvester, 1985; Toledo *et al.*, 1995; Neue *et al.*, 1997; Mitsch y Gosselink, 2000; Duarte *et al.*, 2013; Alongi 2014 ). Por otra parte, el monóxido de carbono (CO) puede actuar como fuente o sumidero de CO<sub>2</sub> atmosférico, que es almacenado por largos periodos de tiempo debido al elevado nivel freático en el suelo, alta productividad y baja descomposición provocada por la lenta difusión del oxígeno en estos sistemas, donde las partes fácilmente degradables se transforman en compuestos inorgánicos, y los compuestos recalcitrantes se depositan en partes más profundas del suelo, que forman suelos poco consolidados con materia vegetal fibrosa parcialmente descompuesta, que se acumula en un ambiente inundado, con potenciales de ORP menores a 200 mV (Neue *et al.*, 1997; Mitsch y Gosselink, 2000; Whiting & Chanton, 2001; Bouillon *et al.*, 2008, Alongi 2009).

En México, el estudio en bosques de mangle, se ha centrado principalmente en la descripción, distribución, cobertura y productividad (Flores-Verdugo *et al.*, 1992; Ramírez-García y Lot-Helgueras, 1994; Tovilla-Hernández 1998; Suárez-Altamirano, 2005), siendo recientes los estudios que se enfocan a la productividad y balance biogeoquímico.

Moreno *et al.*, en 2002, cuantificaron las reservas de carbono en suelos orgánicos con vegetación de *Rhizophora mangle* y *Laguncularia racemosa*, en la parte oeste del estado de Tabasco, reportando que el contenido de carbono fluctuó entre 47 y 82 Kg de C por m<sup>2</sup>. En este estudio no se determinó la biomasa superficial y la captura de carbono por la vegetación.

A pesar de los diferentes estudios realizados en La REBIEN para evaluar la calidad del suelo en bosques de mangle, se desconoce la dinámica de degradación de la materia orgánica, y la transformación de nitrógeno en los diferentes estados (oxidación-reducción), a lo largo del año. Por lo anterior, el objetivo en esta investigación fue explorar las diferencias de la dinámica de carbono y nitrógeno, a diferentes profundidades de suelo en un bosque de mangle, cinco sitios con un buen estado de conservación y un sitio afectado por un incendio forestal subterráneo, los cuales pertenecen a la zona núcleo de La REBIEN, a partir de la actividad microbiana (respirometría), análisis fisicoquímicos y moleculares dirigidas a las diferentes poblaciones de bacterias que están asociadas al ciclo del nitrógeno.

De acuerdo al objetivo establecido, se esperaba encontrar mayor concentración de carbono y nitrógeno en los sitios altamente conservados, en comparación con los suelos de bosque de mangle afectado por un incendio subterráneo.

La importancia de este estudio, fue proporcionar información sobre la captura, almacén y distribución de carbono y nitrógeno en suelos de manglar de la zona núcleo, a partir de tres profundidades evaluadas, siendo uno de los primeros trabajos en los que se presenta la dinámica de estos nutrientes y como varían las concentraciones en dos temporadas del año.

## CAPITULO II

### **Dinámica del Carbono y Nitrógeno en suelos de manglar de la zona núcleo de La Reserva de Biosfera La Encrucijada, Chiapas (Artículo sometido a la revista)**

**Williams Iván Selvas Villafuerte<sup>1</sup>, Cristian Tovilla Hernández<sup>1,2</sup>, Gamaliel Mejía González<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Grupo Académico de Ciencias de la Sustentabilidad, Unidad Tapachula, El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Antigua Aeropuerto Km 2.5, C.P. 30700, Tapachula, Chiapas, México; [williams selvas@gmail.com](mailto:williams selvas@gmail.com)

<sup>2</sup>Grupo Académico de Manejo Sustentable de Cuencas y Zonas Costeras, Unidad Tapachula, Chiapas, México; [ctovilla@ecosur.mx](mailto:ctovilla@ecosur.mx)

<sup>3</sup>Grupo Académico de Biotecnología Ambiental, Unidad Tapachula, Chiapas, México; [gmejia@ecosur.mx](mailto:gmejia@ecosur.mx)

#### **RESUMEN:**

**Dinámica del Carbono y Nitrógeno en suelos de manglar de la zona núcleo de La Reserva de Biosfera La Encrucijada, Chiapas.** Los suelos en los bosques de mangle, almacenan grandes cantidades de carbono (C) y nitrógeno (N), por ello son considerados como los sitios más importantes para el secuestro de nutrientes a nivel mundial. En este estudio se evaluaron las fuentes de C y N en el suelo, de dos localidades de la zona núcleo de La Reserva de la Biosfera La Encrucijada, Chiapas, México (La REBIEN). El estudio consistió, en un monitoreo efectuado en la época de secas y lluvias durante el año 2016. Se evaluaron seis sitios diferentes, cinco de ellos alrededor de la torre de flujo de carbono o Edicco Variance, y un sitio afectado por un incendio subterráneo. En cada sitio se estudio a tres profundidades las concentraciones de carbono orgánico total, respirometría, pH, ORP, OD, temperatura, salinidad, nitrógeno en los estados de oxidación y reducción (amonio, nitritos, nitratos) y técnicas moleculares de Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), para bacterias asociadas al ciclo del nitrógeno asociados a los procesos de nitrificación y desnitrificación. Los resultados obtenidos demostraron que no existe diferencia significativa entre sitios y temporadas en la mayoría de los parámetros estudiados. Sin embargo, las concentraciones de nitrógeno en forma de nitrato, fue las más abundante en la mayoría de los sitios, así mismo los análisis de componentes principales, señalan que existe correlaciones específicas para cada temporada, lo que indica que en suelos pertenecientes al bosque de manglar de La REBIEN, tienen la capacidad de transformar y almacenar, diferentes cantidades de carbono y nitrógeno, conservando un suelo uniforme durante cierto tiempo.

**Palabras Clave.** Biogeoquímica, carbono, ciclo del nitrógeno, bacterias, manglares.

Los bosques de mangle se desarrollan en las zonas costeras tropicales y subtropicales. Contribuyen de manera natural al almacén, captura de carbono (C), y nitrógeno (N) a nivel mundial, son considerados como sitios clave para el secuestro de estos nutrientes a través del suelo, los cuales aumentan su concentración con el transcurso del tiempo (IPCC 2007). El suelo de estos bosques, es la zona que provee el sustrato que hace posible la vida vegetal, animal, y contribuyen a la mineralización del nitrógeno, azufre, fósforo, carbono, que es retenido en el suelo por mucho tiempo (Holguín *et al.*, 2006; Bouillon *et al.*, 2008).

La degradación de la materia orgánica y el reciclamiento de los nutrientes presentes en el suelo, se lleva a cabo esencialmente por microorganismos, que en su mayoría utilizan al oxígeno como aceptor de electrones (Alongi, 1988; Laanbroek, 1990). Independientemente de las inundaciones, en los bosques de mangle el oxígeno no penetra más de dos centímetros en el suelo, sin embargo, tienen la capacidad de transferir oxígeno hasta las raíces en suelos anóxicos por la presencia de aerénquimas en los pneumatóforos o en las puntas de las raíces (Scholander *et al.*, 1955; Kristensen *et al.*, 2008). La acumulación de C y N en los humedales y suelos de manglar, es un proceso no lineal, estos nutrientes no solo son acumulados sino transformados y exportados mediante la respiración, además de la exportación de detritus por las mareas (Bouillon *et al.*, 2008; Alongi, 2011).

McKee *et al.*, (2007) & Kristensen *et al.*, (2008), mencionan que la mayor parte del suelo proveniente del bosque de mangle, está constituida por detritus. Sin embargo, la baja reducción de nitrato en estos sitios, se atribuye a la inhibición de bacterias nitrificantes por la baja o nula disposición de oxígeno presente en los intersticios del suelo por el agua presente (Purvaja *et al.*, 2008). Los procesos responsables en la producción y almacenamiento de C y N en manglares varían continuamente, por su naturaleza son afectados por tormentas y experimentan cambios constantes en la erosión y deposición de sedimentos, que cambian la composición del suelo a través del tiempo (Woodroffe, 1992; Gonnee *et al.*, 2004). En general se conocen dos vías para la transformación de nitrógeno, nitrificación y desnitrificación, la primera vía se dirige hacia la oxidación del amonio hasta nitrato y la segunda da como producto, gases tales como óxido nítrico, óxido nitroso y por último gas nitrógeno, (Ishimoto y Egami, 1959; Takahashi *et al.*, 1963; Knowles, 1982, Mahne y Tiedje, 1995).

En este estudio se evaluaron las formas de C y N, utilizando núcleos de suelo a tres profundidades con ayuda de un nucleador, identificándose visualmente los cambios de coloración y textura, en seis sitios diferentes de la Reserva de la Biosfera La Encrucijada (La REBIEN) en la costa del pacífico sur de Chiapas, México.

La importancia de realizar este estudio, fue para proporcionar información relevante sobre el estado en la captura, almacén y distribución de carbono y nitrógeno en el suelo de bosques de mangle pertenecientes a sitios bien conservados, a partir de tres profundidades analizadas.

## MATERIALES Y METODOS

**Área de estudio:** La REBIEN, se localiza al sur del estado de Chiapas, entre los 14° 43' y 15° 40' N y 92° 26' y 93° 20' O, con una precipitación media anual de 1567 mm (Sistema Meteorológico Nacional – Comisión Nacional del Agua Estación No. 7320, 1951-2010 (2014)). La Reserva cuenta con una superficie de 144, 868, 15-87.5 ha (INE-SEMARNAP, 1999). Se caracteriza por ser un ecosistema con grandes áreas de humedales de agua dulce y estuarina, así como grandes zonas de bosques de mangle. De acuerdo a Tovilla *et al.*, (2007), el bosque de mangle en esta zona está dominado por grandes árboles de *Rhizophora mangle* de 20 a 40 m de altura. Para evaluar las diferencias entre las fuentes de C y N, se establecieron seis puntos de muestreo, dominados por *R. Mangle* (Figura 1), cinco de ellos (C2S4, C4S2, C5S2, C7S4, C8S2), se ubicaron en una localidad donde el bosque se encuentra en buen estado de conservación, y el último sitio (ZC), fue afectado por un incendio subterráneo en mayo de 2013.

Las muestras fueron tomadas en secas y lluvias, durante los meses de abril y julio de 2016, respectivamente. Se colectaron muestras de suelo (núcleos) a tres profundidades diferentes: **1**, 0-15 cm, **2**, 30-50 cm, y **3**, 70-90 cm, utilizando un nucleador con una longitud de 1 m de profundidad y 8 cm de diámetro, unido a un mango transversal. Los núcleos obtenidos, fueron divididos de acuerdo a su coloración y textura. Por cada sitio y profundidad (estrato), se extrajeron de 300 a 400 g de suelo, y se almacenaron en bolsas de Polietileno de 1 kg con cierre hermético. Las muestras se preservaron a una temperatura no mayor a 5 °C, y se trasladaron al Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Ambiental y al Laboratorio de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas Costeros, en El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula, en un lapso no mayor a 4 horas posterior a la colecta para su análisis.

En cada muestra, se midió el potencial de óxido-reducción (ORP), temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH, con ayuda del equipo multiparamétrico Hanna Instruments Mod. 9828. La cuantificación de C, se realizó por la técnica de carbono orgánico total, por el método de Walkley-Black (1934) y respirometría por la técnica de Warburg. Los compuestos nitrogenados (amonio, nitritos, nitratos), se analizaron por la técnica de colorimetría, utilizando el equipo HACH Mod. DR/890. La cuantificación de amonio, se determinó por el método de salicilato de amonio. El análisis de nitrito, se realizó por el método de sulfato ferroso, y nitrato, por el método de reducción de cadmio. Con respecto a la presencia de bacterias asociadas al ciclo del nitrógeno, se empleó la técnica de Fluorescence *in situ* hybridization, utilizando sondas para el gen 16S rRNA, las cuales fueron: EUB338, para observar la presencia de bacterias (Amann *et al.*, 1990), NSO1225, para bacterias oxidadoras de amonio del género *Nitrosomonas* (Mobarry *et al.*, 1996), NIT3 para bacterias oxidadoras de nitrito del género *Nitrobacter* (Wagner *et al.*, 1996), PLA46, como testigo para bacterias del género *Planctomycetes* tales como *Brocadia* (Neef *et al.*, 1998), AMX820 para bacterias oxidadoras de amonio vía anaerobia del género *Brocadia anammoxidans* y *Kuenenia stuttgartiensis* (Schmid *et al.*, 2001), PAR651, para bacterias reductoras de nitrato, del género *Paracoccus* (Neef *et al.*, 1996) y TBD121, para *Thiobacillus denitrificans* y *Thiobacillus thioparus* (Fernández *et al.*, 2007). Las sondas mencionadas, fueron marcadas con Cy3, y el 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI), como indicador fluorescente, que se une a regiones enriquecidas en Adenina y Timina, para la visualización de ácidos nucleicos presente en cada una de las muestras. Todas las muestras de biomasa empleadas en esta investigación, se prepararon de acuerdo al método estándar de análisis de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) (Amann, 1995).

Para determinar la diferencia entre sitios en cada temporada, los datos se examinaron mediante un análisis de componentes principales, para las variables continuas, se consideraron aquellas que se asocian con el ciclo del nitrógeno, como oxígeno disuelto, ORP, amonio, nitrito, nitratos, además de evaluar la relación entre ellas. Para completar el análisis estadístico se incluyeron todas las variables tanto continuas (temperatura, salinidad, pH, COT, respirometría) y cualitativas (bacterias asociadas al ciclo del nitrógeno), y se empleó un análisis de componentes principales no lineal (Jan, L; Mair, P., 2009), para determinar posibles agrupaciones entre las observaciones, y la correlación entre parámetros fisicoquímicos y bacterias, utilizando el paquete estadístico R ver. 3.3 (R Core Team 2017).

## RESULTADOS

**Diferencia espacio-temporal entre ORP, temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH.** Los resultados obtenidos de los parámetros *in situ* en ambas temporadas, se muestran en el cuadro 1. Para el sitio C2S4, los valores de ORP oscilaron entre -350 a -197 mV, para los tres estratos evaluados, con respecto a C4S2, las lecturas se mantuvieron de más reducido (-251.23 mV) a más oxidado (82.27 mV), sin embargo, en el sitio C5S2, el ORP presentó resultados positivos de 141.2 a 170.4 mV, el sitio C7S4, se encuentra en contacto directo con el canal que se comunica con el estero principal, y los valores obtenidos estuvieron de -314.6 a 3.70 mV, para C8S2, las lecturas fueron de 41.3 a -64.67 mV. Para la zona denominada ZC, los valores indican que en la temporada de estiaje fue la más negativa (-362.1 mV para las tres profundidades), y valores de -105.7 mV, para la temporada de lluvias. La temperatura varía entre 29 y 31 °C en todos los sitios. La salinidad osciló entre 14.01 y 53.27 psu, con el valor mayor en la temporada de estiaje. Los valores de oxígeno disuelto no fueron mayores a 1 mg/L, así mismo el pH permaneció entre 5.8 a 6.9.

**Diferencia espacio-temporal entre carbono orgánico total, respirometría, amonio, nitrito y nitratos.**

Las pruebas que están asociadas a los ciclos del carbono (Carbono orgánico total, Respirometría) y nitrógeno (Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )) se muestran en el cuadro 2. Los resultados obtenidos de carbono orgánico total para la época de secas, fluctuaron entre 11.03 % a 25.9 %, y para la temporada de lluvias fue de 17.45 % a 24.94 %. Con respecto En cuanto al  $\text{CO}_2$ , el valor más bajo observado en la temporada de estiaje corresponde a los sitios C5S2 y ZC, con valores de 0.64 y 0.99 mg/L respectivamente. Para la temporada de lluvias el valor mínimo fue de 0.94 mg/L, del sitio C8S2, mientras que el valor más alto fue para el sitio ZC con 2.41 mg/L. Para los compuestos nitrogenados determinados en los diferentes sitios, los valores de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en temporada de secas, se ubicaron entre 8.55 a 28.44 mg/L, siendo el sitio ZC donde se presentó la mayor concentración, mientras que para la temporada de lluvias, el valor mínimo se obtuvo en C5S2 y el máximo en C7S4 (1.61 y 18.55 mg/L, respectivamente) con relación a los diferentes sitios. Las concentraciones de nitrito se mantuvieron similares para ambos periodos y diferentes sitios, con diferencia de  $\pm 7$  mg/L, sin embargo, los resultados para nitratos, muestran diferencias entre periodos y estratos, siendo C4S2, donde se obtuvo el valor más alto, seguido de C2S4, con valores que oscilaron entre 102.30 a 152.81 mg/L en el periodo de lluvias, con respecto a la temporada de estiaje, donde el valor más alto corresponde a la ZC y la más baja fue del C7S4 (38.11 y 6.17 mg/L, respectivamente). Mitsch y Gosselink (2000), mencionan que en suelos donde se

presenta mayor concentración de nitrato, se realiza el proceso de nitratación, el parámetro de ORP concuerda con esto, debido a que los valores se ubicaron entre 0 a 250 mV.

**Correlación entre parámetros en la temporada de secas y lluvias.** Se empleo un análisis de componentes principales (ACP), para evaluar las agrupaciones entre el oxígeno disuelto, potencial de oxido-reducción, amonio, nitrito y nitrato. En la figura 2, se muestran los resultados para la temporada de estiaje, donde el porcentaje de variabilidad para el componente 1 fue del 38.5 %, 26.5 % para el componente 2. Para el oxígeno disuelto y ORP, se presentan agrupaciones entre los sitios C4S2, C5S2, C8S2. Con respecto a los compuestos de nitrógeno (amonio, nitrito y nitrato), existe una tendencia con la ZC y C4S2, sin embargo, los sitios en los que no presentan agrupaciones son C2S4 y C7S4, ubicados a la orilla del bosque de manglar y contacto directo con el agua del canal, por lo que tienen un intercambio de nutrientes permanentemente, por lo tanto, puede no existir una correlación entre las variables medidas. El ACP realizado para la temporada de lluvias se presentan en la figura 3, donde el porcentaje de variabilidad obtenido en el componente 1 fue del 31.1 %, con respecto al componente 2, fue de 24.79 %. Las agrupaciones que arrojó este análisis, muestra que el ORP se asocia únicamente con el sitio C5S2. Con respecto a los compuestos nitrogenados, los sitios mejor relacionados a estas agrupaciones fueron C2S4, C4S2, C8S2 y ZC, siendo este último el que se encuentra con mayor correlación para estos compuestos junto con el OD. Sin embargo, el sitio C7S4 presentó la misma tendencia que en la temporada de estiaje, al no presentar agrupaciones con los parámetros evaluados, y esto puede ser atribuido al intercambio fijo de nutrientes con el estero.

**Presencia de microorganismos asociados al ciclo del nitrógeno por medio de la técnica de Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) entre sitios y temporadas.** Los resultados obtenidos se observan en el cuadro 3 (Figura 6. A y B), indicando que en el sitio C2S4 se registra la presencia de todas las bacterias de interés, sin embargo, para el C4S2, únicamente se presentó fluorescencia en la muestras de la profundidad 3. En cuanto al sitio C5S2, se observó presencia de ciertas bacterias tanto aerobias como anaerobias. Para el sitio C7S4, solamente se presentó fluorescencia para la profundidad 2 para ciertos grupos de bacterias, en cuanto a las bacterias oxidadoras de amonio vía anaerobia, los resultados fueron positivos para los estratos 1 y 3, respectivamente. Para el sitio C8S2, fue positiva únicamente para la profundidad 3, en este mismo sitio, las bacterias oxidadoras de amonio vía anaerobia presentó fluorescencia únicamente para la profundidad 1. Finalmente, para el sitio denominado ZC, los resultados fueron negativos para las tres profundidades. Con respecto a las bacterias oxidadoras de amonio *B.*



*anammoxidans*, fue positiva únicamente en la profundidad 1, demostrándose que el tiempo de regeneración posterior al incendio ocurrido tres años atrás, afectó a la microbiota y toda actividad que se realiza en el suelo.

Para la época de lluvias los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 4, para el sitio C2S4, únicamente se observó la presencia de bacterias en la profundidad 2. Para las bacterias oxidadoras de amonio vía anaerobia estuvieron presente en la profundidad 1 y 3. En el caso de C4S2, la prueba fue positiva únicamente para la profundidad 3, sin embargo se observó la presencia de las bacterias anaerobias de amonio en las tres profundidades. Con respecto al sitio C5S2, se observó la presencia de la mayoría de las bacterias estudiadas. En C7S4, fueron positivas para las profundidades 2 y 3. Para el sitio C8S2, se observó fluorescencia para las muestras de los estratos 1 y 3, para las bacterias oxidadoras de amonio se presentó fluorescencia para las tres profundidades. Con respecto al sitio ZC, los resultados obtenidos fueron negativos para las profundidades y poblaciones bacterianas estudiadas.

**Agrupaciones entre flora microbiana y características del suelo.** Para evaluar las posibles agrupaciones entre la flora microbiana y los parámetros fisicoquímicos estudiados, se llevó a cabo un análisis de componentes principales no lineales, con datos de amonio, nitrito, nitrato pH, ORP, T°, salinidad, oxígeno disuelto, carbono orgánico total, y de bacterias asociadas al ciclo del nitrógeno, para observar que componentes aportaban mayor información de acuerdo a este análisis.

En la cuadro 5, se muestran las cargas de los componentes obtenidos para la temporada de estiaje, la primera dimensión fue representada con mayor concentración por parte del nitrito (47.64 %), con respecto a la dimensión dos, fueron amonio (42.70 %), y salinidad (28.85%), por último, en la tercer dimensión, la variable que contribuyó en mayor proporción fue el potencial de óxido-reducción (42.15 %), seguido de la salinidad (24.19 %), considerando que los valores propios de cada dimensión fue de 0.1631 (D1), 0.1342 y 0.1563 (para D2 y D3 respectivamente) con un margen de error mínimo con una pérdida de 0.001448008. Cabe mencionar que las demás cargas contribuyen, pero no como aquellas que se acercan a un valor de 1. En la figura 4, se presentan los resultados obtenidos de este análisis, donde las variables con mayor explicación se diferenciaron por ser líneas más largas, con respecto a las que tienen poca información que fueron líneas más cortas. Siendo el nitrato y las bacterias del género *Thiobacillus* las que se correlacionan mejor. La temperatura está íntimamente ligada con bacterias del género *Paracoccus*, respirometría, pH y *Brocadia Anammoxidans*, oxígeno disuelto se asocia con la salinidad. Las bacterias

del género *Nitrosomonas* y *Nitrobacterias*, que son responsables del proceso de oxidación del nitrógeno, no se relaciona con ningún parámetro ni entre ellas.

En la temporada de lluvias las correlaciones se observan en la figura 5 y cuadro 6. Las cargas del primer componente con mayor valor, fueron los parámetros de respirometría, (39.12 %), salinidad (30.85 %), y las bacterias del género *Brocadia* (18.25 %), para la segunda dimensión, el pH (23.48 %) y salinidad (10.6 %) son los más representativos en este análisis, por último en la dimensión tres las variables que proporcionan mayor información fueron nitrato (37.73 %), amonio (30.31 %), salinidad (29.31 %) y respirometría (28.86 %) , y los valores propios a cada dimensión fueron de 0.1297 (D1), 0.1298 (D2) y 0.1223 (D3), con un margen de error mínimo para este análisis de 0.0013355423.

Las agrupaciones obtenidas son: bacterias *Brocadia anammoxidans* se asocia con la salinidad. El nitrato, potencial de óxido reducción y oxígeno disuelto se asocian entre si, así como las bacterias del género *Nitrosomonas*, *Thiobacillus*, *Paracoccus* y *Nitrobacter*, siendo estas últimas las quienes se encuentran estrechamente relacionados.

## DISCUSIÓN

En este estudio, los resultados obtenidos asociados a la cuantificación de C en suelo, son similares a los reportados por Sánchez-Junco (2011), midiendo la concentración de C/N en suelos de manglar con dominio de *R. mangle*, de Nuevo Campechito, Estado de Campeche, durante tres épocas del año (nortes, secas, lluvias), y en dos profundidades diferentes (0-30, y de 30-60 cm) las concentraciones fueron de 4.90 a 7.33 %, concluyendo que no existe diferencia significativa tanto en profundidades como en temporadas. Así mismo, Moreno *et al.*, (2002), cuantificando las reservas de C en suelos orgánicos con vegetación de *R. mangle* y *L. racemosa*, en la parte oeste del estado de Tabasco, en el Golfo de México, reportó concentraciones que fueron de 47 a 82 kg de C por m<sup>2</sup>. Sin embargo, en este estudio no determinaron la biomasa de mangle así como el secuestro de C por la vegetación. Adame *et al.*, (2015), cuantificaron las reservas de C y N en suelos de bosques de manglar, de ciertos sitios de La REBIEN, y obtuvieron valores que oscilaron entre  $784.5 \pm 73.5$  y  $722.2 \pm 63.6$  mg C ha<sup>-1</sup>, para el secuestro de C en suelo. Posteriormente Adame *et al.*, (2016), realizando este mismo estudio en siete sitios y tres profundidades (0-15, 15-30 y 30-50 cm) de La REBIEN, no encontró diferencias significativas, concluyendo que los valores obtenidos se encuentran dentro de los valores reportados por Fry & Corner (2011), Lovelock *et al.*, 2011, Adame *et al.*,

2015, que sugieren que la mayor parte del suelo se deriva de la producción autóctona.

La concentración de nitrógeno en forma de amonio y nitrito, no presentaron diferencias significativas entre temporadas y sitios, sin embargo, las concentraciones en forma de nitratos, fueron diferentes entre temporada y sitios. De acuerdo a estos resultados, Gómez-Ortega en 2013, evaluando la ecología del sistema lagunar Chantuto-Panzacola, reportó que el nitrógeno en forma de nitratos fue la forma más abundante en el agua, con concentraciones del 48.75 al 92.32 %, seguido del amonio con valores que oscilaron entre 7.13 a 49.45 %. Balk *et al.*, 2015, evaluando la nitrato reducción en suelos de manglar menciona que los suelos menos productivos tienen mayor capacidad de convertir el nitrato a amonio y viceversa con respecto a suelos más productivos, sugiriendo que el análisis molecular, arroja resultados que esclarezcan la presencia de microorganismos que influyan en este proceso.

La técnica molecular empleada en este estudio, nos permitió tener un panorama de las bacterias analizadas, donde se demostró que existe una distribución uniforme en los diferentes sitios y profundidades, de acuerdo a otros estudios, Días *et al.*, 2010, evaluando la diversidad bacteriana en suelos de zona conservada de manglar en Brasil, a partir de DGGE, reporto la presencia de tres poblaciones de bacterias en mayor concentración: Alphaproteobacteria (40.36 % de los clones), Gammaproteobacteria (19.28 %) y Acidobacteria (27.71 %), siendo estas últimas muy sensibles a las condiciones ambientales. En conclusión, el suelo de manglar de La Reserva de la Biosfera La Encrucijada indica que la acumulación de carbono y nitrógeno en los diferentes sitios, nos indica que las tasas de descomposición son lentos, y esto puede ser atribuido a que en el suelo la mayor parte esta constituida por detritus y por la exposición a las condiciones ambientales óxicas durante la sequía y anóxicas en la temporada de lluvias, así mismo la zona de estudio ha permanecido estable y sin cambios por mucho tiempo y que la mayoría de estos nutrientes provienen de la producción autóctona.

En este estudio, se muestra que los suelos de manglar de La REBIEN, pueden almacenar cantidades de carbono y nitrógeno uniformemente por mucho tiempo, por ello el poder contar con más puntos de muestreo por cada sitio de estudio, permitirá observar si existe diferencia entre profundidades y sitios en las mismas épocas y tener un panorama más amplio de la conversión de estos nutrientes a nivel del suelo.

## REFERENCIAS

- Adame, M., Fry, B., 2016. Source and stability of soil carbon in mangrove and freshwater wetlands of the Mexican Pacific coast. *Wetlands Ecol Manage.* 24:129–137
- Adame, M., Santini, N., Tovilla, C., Vázquez-Lule, A., Castro, L., Guevara, M., (2015). Carbon stocks and soil sequestration rates of tropical riverine wetlands. *Biogeosciences*, 12. p. 3805–3818.
- Alongi D, M., (1988). Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. *Microb Ecol* 15:59-79.
- Alongi D, M., (2011) Carbon payments for mangrove conservation: ecosystem constraints and uncertainties of sequestration potential. *Environ Sci Policy* 14:462–470. doi:[10.1016/j.envsci.2011.02.004](https://doi.org/10.1016/j.envsci.2011.02.004)
- Amann, R. I., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux R. and Stahl D. A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.
- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microb. Rev.* 59:143–169.
- Balk, M., Keuskamp, J., Laanbroek, H., Laverman, A. 2015. Nitrate ammonification in mangrove soils: a hidden source of nitrite?. Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO–KNAW), Netherlands. p. 1-8.
- Bouillon S, Borges AV, Castañeda-Moya E *et al.*, (2008) Mangrove production and carbon sinks: a revision of global budget estimates. *Global Biogeochem Cycles* 22:1-12
- Días. F.C.A.; Andreote. D.F.; Rigonato. J.; Fiore. F. M.; Melo. S. I.; Araújo. L. W. 2010. The bacterial diversity in Brazilian non disturbed mangrove sediment. Springer.
- Fernández N., Sierra-Álvarez R., Field J. A., Amils R., & Sanz J. L. 2007. Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *Chemosphere*.
- Fry B, Cormier N (2011) Chemical ecology of red mangroves, *Rhizophora mangle*, in the Hawaiian Islands. *Pac Sci* 65:219–234

- Gómez-Ortega, R., 2013. *Ecología del sistema Lagunar Chantuto-Panzacola, Chiapas, basada en la aplicación e interpretación de algunos índices tróficos, parámetros físico-químicos y biológicos*. El Colegio de la Frontera Sur. Tesis de Maestría, pp. 108.
- Gonneea M, E, Paytan A, Herrera-Silveira J. (2004) Tracing organic matter sources and carbon burial in mangrove sediments over the past 160 years. *Estuar Coast Shelf Sci* 61:211–227
- Holguin, G., Davila-Lule, A., Flores-Mireles, A.L., Villicaña, C., Geraldo, N. (2006). *Acyl homoserine lactone producing bacteria from mangrove roots with plant-growth promoting properties*. *Microbiol* (sometido)
- INE-SEMARNAP, 1999. *Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Encrucijada, México*. Cap.1 y Cap.2, p. 12,19:21-27.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2007) Fourth assessment report: climate change 2007.
- Jan, L., Mair, P. (2009). Gifi Methods for Optimal Scaling in R: The Package homals. *Journal of Statistical Software*, 31(4), 1-20. URL <http://www.jstatsoft.org/v31/i04/>.
- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46, 43–70.
- Kristensen, E. Bouillon, S. Dittmar, T. Marchand, C. (2008) Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: a review. *Aquat Bot* 89:201–219
- Laanbroek, H. J. (1990). Bacterial cycling of minerals that affect plant-growth in water logged soils—review. *Aquat. Bot.* 38, 109–125.doi:10.1016/0304-3770(90)90101-P
- Lovelock. C, E., Feller IC, Adame MF, Reef R, Penrose H, Wei L, Ball MC (2011) Intense storms and the delivery of materials that relieve nutrient limitations in mangroves of an arid zone estuary. *Funct Plant Biol* 36:514–522
- Mahne, I., and Tiedje, J. M. (1995). Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1110–1115.
- McKee KL, Cahoon DR, Feller IC (2007) Caribbean mangroves adjust to rising sea level through biotic controls on change in soil elevation. *Glob Ecol Biogeogr* 6:545–556
- Mitsch, W. J. and J. G. Gosselink. (2000). *Wetlands*. 3rd ed. John Wiley and Sons. New York, NY, USA.
- Mobarry, B. K., Wagner M., Urbain V., Rittmann B. E. and Stahl D. A. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:

2156-2162.

- Moreno, C. E., Guerrero, P. A., Gutiérrez, C. M., Ortiz, S. C., Palma, L. D., 2002. Los manglares de Tabasco, una reserva natural de carbono. *Madera y Bosques*. Número especial. p. 115-128.
- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H. and Schleifer K., 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology*. 144: 3257-3266.
- Neef, A., Zaglauer A., Meier H., Amann R., Lemmer H. and Schleifer K.-H. 1996. Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4329-4339.
- Purvaja, R., Ramesh, R., Ray, A. K., and Rixen, T. (2008). Nitrogen cycling: are view of the processes, transformations and fluxes in coastal ecosystems. *Curr.Sci.* 94, 1419–1438.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.Rproject.org/>.
- Sánchez-Junco, R. C., Damián-Hernández, D.L., Cerón-Bretón, R.M., Cerón- Bretón, J. G., Guerra-Santos, Rangel-Marrón. J. J., Zavala-Loría, J.C. (2011). Determination of stored carbón in soil with association of red mangrove in Nuevo Campechito, Campeche.
- Schmid, M., Schmitz-Esser, S., Jetten, M. and Wagner, M., 2001. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Environ. Microbiol.* 3: 450-459.
- Scholander, P. F., Vandam, L., and Scholander, S. I. (1955). Gas Exchange in the roots of mangroves. *Am. J. Bot.* 42, 92–98. doi:10.2307/2438597
- Sistema Meteorológico Nacional, Comisión Nacional del Agua, SMN. 2014.
- Tovilla, H. C., Salas R. L. R., de la Presa, P. J. C., Romero, E. I. B., Ovalle, E. F., Gómez, O, R., (2007) Informe final: Inventario forestal de los bosques de manglar del Soconusco, Gobierno del Estado de Chiapas. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. El Colegio de La Frontera Sur, Chiapas, México
- Wagner, M., Rath G., Koops H.P., Flood J. and Amann R. 1996. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat Sci Techn* 34: 237-244
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37. p. 29-38.

CUADROS Y FIGURAS

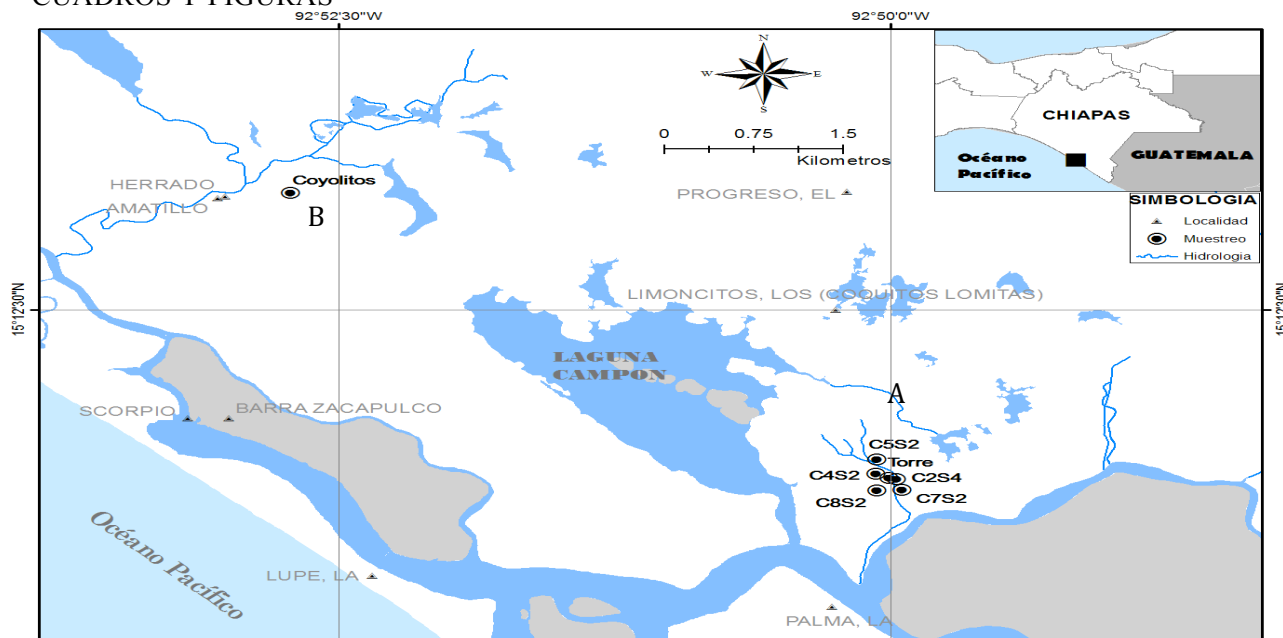


Figura 1. Sitios de muestreo. Zona A. Ubicación de los diferentes conglomerados alrededor de la torre de flujo de carbono. Zona B. El Coyolito, sitio de muestreo afectado por un incendio forestal

CUADRO 1

Media y error estándar de parámetros fisicoquímicos, en los diferentes sitios y épocas del año

Sitio	Especie de Manglar	Localización Latitud Longitud	ORP (mV)		Temperatura °C		Salinidad		Oxígeno disuelto (OD)		pH		
			Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	
C2S4	RM	15.188357 - 92.832903	Media	<b>-350.333</b>	<b>-197.133</b>	<b>30.676</b>	<b>30</b>	<b>36.463</b>	<b>16.123</b>	<b>0.200</b>	<b>0.733</b>	<b>6.933</b>	<b>6.55</b>
			Error. Std	±6.280	±25.859	±0.123	±0.11	±0.502	±0.177	±0.1	±0.216	±0.044	±0.007
C4S2	RM	15.188956 - 92.834453	Media	<b>-251.233</b>	<b>82.267</b>	<b>31.343</b>	<b>30.48</b>	<b>38.6</b>	<b>28.1</b>	<b>0.467</b>	<b>0.083</b>	<b>6.333</b>	<b>6.1</b>
			Error. Std	±16.189	±4.83	±0.094	±0.042	±0.225	±2.93	±0.145	±0.02	±0.06	±0.056
C5S2	RM	15.190701 - 92.834419	Media	<b>170.4</b>	<b>141.267</b>	<b>31.146</b>	<b>30.1</b>	<b>52.773</b>	<b>14.013</b>	<b>1.123</b>	<b>0.263</b>	<b>5.873</b>	<b>6.58</b>
			Error. Std	±1.802	±1.04	±0.008	±0.15	±0.471	±2.05	±0.031	±0.076	±0.024	±0.09
C7S4	RM	15.187081 - 92.832493	Media	<b>-314.666</b>	<b>3.7</b>	<b>30.760</b>	<b>30.5</b>	<b>31.63</b>	<b>18.04</b>	<b>0.36</b>	<b>0.033</b>	<b>6.86</b>	<b>6.38</b>
			Error. Std	±4.695	±61.5	±0.173	±0.028	±1.684	±0.188	±0.102	±0.016	±0.07	±0.028
C8S2	RM	15.18704 - 92.834366	Media	<b>-64.666</b>	<b>41.3</b>	<b>31.34</b>	<b>30.54</b>	<b>10.444</b>	<b>15.47</b>	<b>0.143</b>	<b>0.14</b>	<b>6.1</b>	<b>6.16</b>
			Error. Std	±19.572	±9.88	±0.26	±0.041	±1.965	±1.146	±0.047	±0.03	±0.027	±0.1
ZC	RM	15.222104 - 92.878675	Media	<b>-362.1</b>	<b>-105.7</b>	<b>29.753</b>	<b>30.3</b>	<b>28.444</b>	<b>26</b>	<b>0.441</b>	<b>0.6</b>	<b>6.79</b>	<b>6.03</b>
			Error. Std	±3.380	±51.41	±0.047	±0.01	±3.087	±2.12	±0.147	±0.152	±0.03	±0.092

CUADRO 2

Media y error estándar obtenidos de los parámetros fisicoquímicos, en los diferentes sitios y temporadas

Sitio	Especie de Manglar	Localización Latitud Longitud	COT (%)		CO <sub>2</sub> (mg/L)		NH <sub>3</sub> -N (mg/L)		NO <sub>2</sub> (mg/L)		NO <sub>3</sub> (mg/L)		
			Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	
C2S4	RM 15.188357 -92.832903	R.M	Media	25.592	24.825	1.637	1.886	10.666	5.888	42.222	51.000	17.733	134.944
			Error. Std	±0.339	±0.904	±0.174	±0.240	±1.258	±1.513	±1.392	±2.494	±2.545	±6.735
C4S2	RM 15.188956 -92.834453	R.M	Media	23.067	19.076	1.392	2.183	11.222	5.111	41.000	42.777	32.555	152.811
			Error. Std	±0.623	±1.580	±0.121	±0.181	±3.328	±1.447	±2.511	±1.808	±0.987	±1.388
C5S2	RM 15.190701 -92.834419	R.M	Media	19.597	17.448	0.645	1.713	9.444	1.611	32.666	13.722	25.555	102.300
			Error. Std	±2.703	±3.435	±0.184	±0.139	±1.537	±0.369	±5.826	±6.745	±2.316	±22.844
C7S4	RM 15.187081 -92.832493	R.M	Media	14.561	22.716	1.414	1.737	8.555	18.555	47.444	35.666	6.166	12.688
			Error. Std	±0.575	±2.570	±0.117	±0.206	±1.684	±2.550	±1.425	±3.395	±2.497	±3.160
C8S2	RM 15.18704 -92.834366	R.M	Media	22.126	24.944	1.588	0.943	10.444	2.777	44.222	48.555	32.222	46.288
			Error. Std	±2.375	±2.045	±0.212	±0.262	±1.965	±0.741	±2.120	±3.636	±1.210	±22.659
ZC	RM 15.222104 -92.878675	R.M	Media	11.027	19.333	0.992	2.404	28.444	4.222	49.333	34.222	38.111	80.488
			Error. Std	±1.479	±2.044	±0.193	±0.323	±3.087	±2.448	±0.707	±3.589	±1.183	±18.657

CUADRO 3

Presencia de bacterias asociadas al ciclo del nitrógeno en temporada de estiaje, en los diferentes sitios y profundidades

Época de Secas	Sitio C2S4			Sitio C4S2			Sitio C5S2			Sitio C7S4			Sitio C8S2			Sitio El Coyolito		
	Profundidad			Profundidad			Profundidad			Profundidad			Profundidad			Profundidad		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>B. annamoxidans</b>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<b>Planctomycetes</b>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
<b>Nitrosomonas</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
<b>Nitrobacterias</b>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<b>Paracoccus</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<b>T. denitrificans</b>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
<b>Bacterias</b>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-

CUADRO 4

Presencia de bacterias asociadas al ciclo del nitrógeno en temporada de lluvias en los diferentes sitios y profundidades

Época de Lluvias	Sitio C2S4			Sitio C4S2			Sitio C5S2			Sitio C7S4			Sitio C8S2			Sitio El Coyolito		
	Profundidad			Profundidad			Profundidad			Profundidad			Profundidad			Profundidad		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>B. annamoxidans</b>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<b>Planctomycetes</b>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<b>Nitrosomonas</b>	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<b>Nitrobacterias</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
<b>Paracoccus</b>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<b>T. denitrificans</b>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
<b>Bacterias</b>	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-



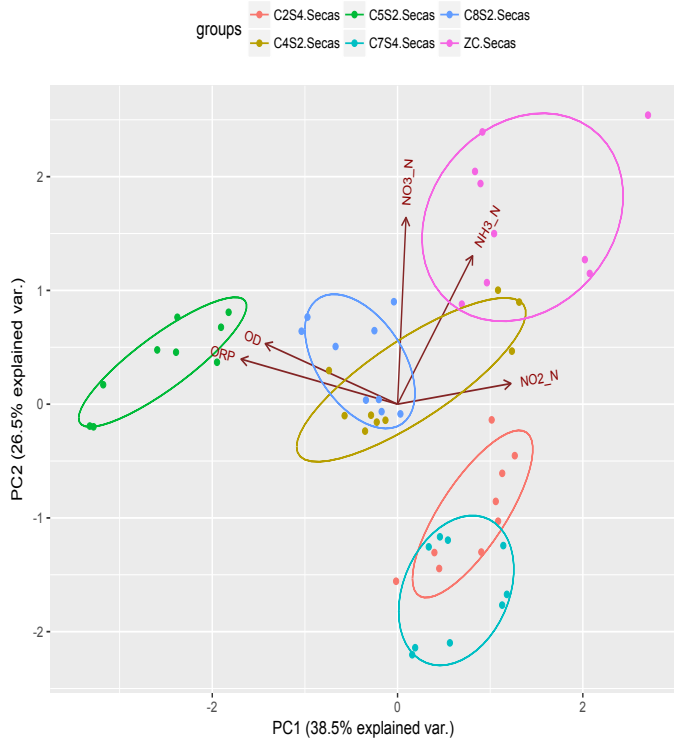


Figura 2. Agrupación entre OD, ORP,  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  en temporada de estiaje

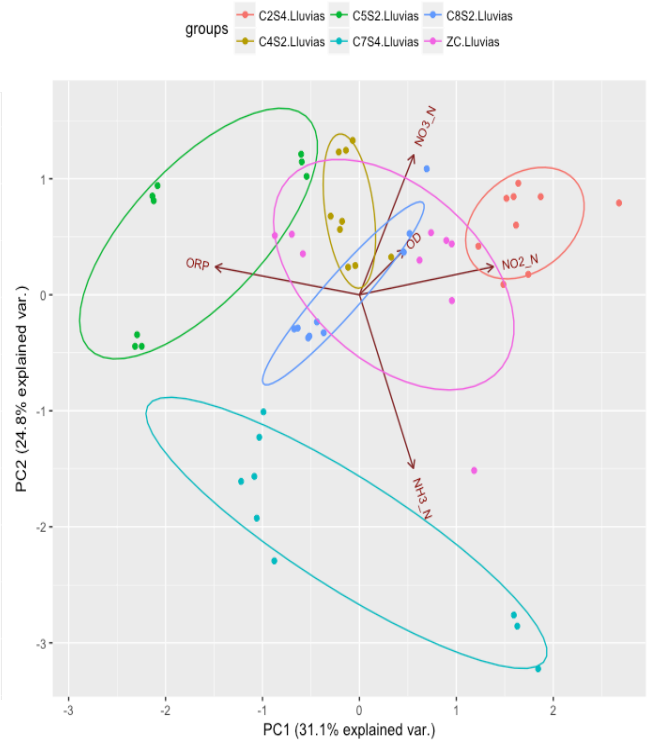


Figura 3. Agrupación entre OD, ORP,  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  en la temporada de lluvias

### Loadings plot

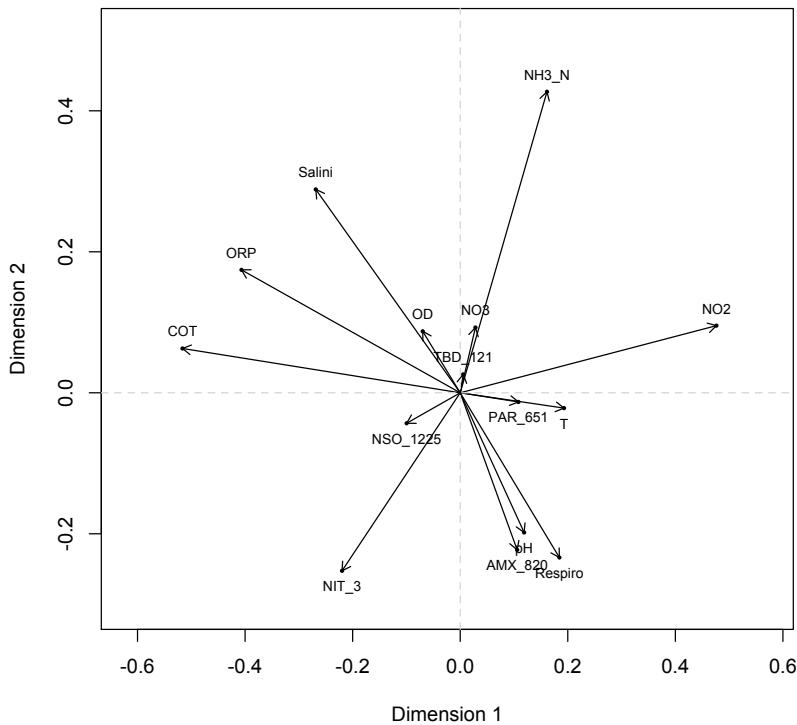


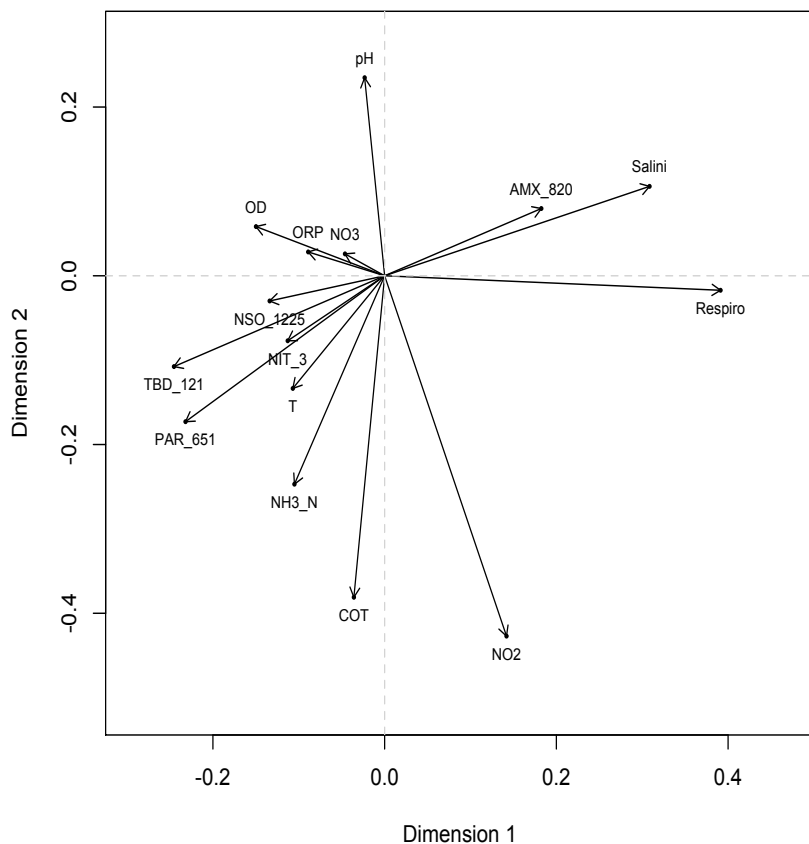
Figura 4. Correlación entre OD, ORP, COT,  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , y bacterias, en temporada de secas

### CUADRO 5

Valores obtenidos del análisis de componentes principales no lineal en el periodo de estiaje

	Componentes de cargas		
	D1	D2	D3
<b>Respiro</b>	0.1843	-0.2336	0.1492
<b>COT</b>	-0.5164	0.0629	-0.0537
<b>NH3_N</b>	0.1613	0.4270	-0.1867
<b>NO2</b>	0.4764	0.0952	0.0274
<b>NO3</b>	0.0283	0.0926	-0.0433
<b>pH</b>	0.1188	-0.1981	-0.0983
<b>ORP</b>	-0.4067	0.1744	0.4215
<b>T</b>	0.1930	-0.2600	-0.2383
<b>Salini</b>	-0.2686	0.2885	0.2419
<b>OD</b>	-0.0698	0.0872	0.1292
<b>AMX_820</b>	0.1059	-0.2229	0.0281
<b>NSO_1225</b>	-0.0997	-0.1371	-0.0939
<b>NIT_3</b>	-0.2197	-0.2525	-0.1856
<b>PAR_651</b>	0.1082	-0.0130	-0.3000
<b>TBD_121</b>	0.0056	0.0261	0.1068

Loadings plot



CUADRO 6

Valores obtenidos del análisis de componentes principales no lineal, en época de lluvias

	Componentes de cargas		
	D1	D2	D3
Respiro	0.3912	-0.0172	0.2886
COT	-0.0358	-0.3810	-0.1489
NH3_N	-0.1051	-0.2470	0.3031
NO2	0.1419	-0.4271	-0.0552
NO3	-0.0462	0.0260	0.3773
pH	-0.0233	0.2348	-0.3316
ORP	-0.0890	0.0283	-0.0711
T	-0.1069	-0.1335	0.0933
Salini	0.3085	0.1060	0.2931
OD	-0.1498	0.0583	-0.0722
AMX_820	0.1825	0.0797	-0.4089
NSO_1225	-0.1339	-0.0298	-0.1699
NIT_3	-0.1129	-0.0770	-0.4539
PAR_651	-0.2319	-0.1729	-0.0738
TBD_121	-0.2453	-0.1076	-0.0628

Figura 5. Correlación entre OD, ORP, COT, NH<sub>3</sub>N, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, y bacterias, en temporada de lluvias

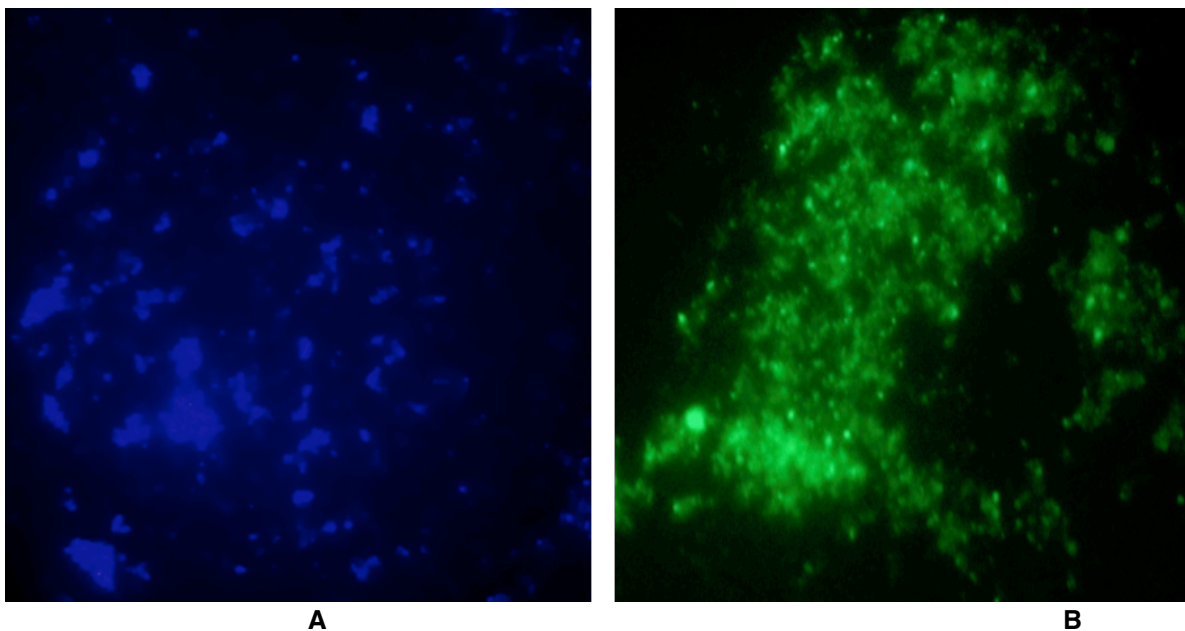


Figura 6. Foto obtenida del microscopio de epifluorescencia. A: Ausencia de ADN. B: Presencia de ADN.

## **CAPITULO III**

### **CONCLUSIONES**

El suelo de manglar de las áreas en las que se llevó a cabo este estudio, nos demostró, que la acumulación de carbono y nitrógeno en las diferentes sitios y temporadas, indica que las tasas de descomposición son lentas, por naturaleza, los suelos de estos bosques en su mayoría esta constituida por detritus y por la exposición a las condiciones ambientales óxicas durante la sequia y anóxicas en temporada de lluvia, así mismo la zona de estudio ha permanecido estable y sin cambios por mucho tiempo y que la mayoría de estos nutrientes provienen de la producción autóctona.

Al realizar la comparación entre los diferentes sitios tanto de la zona conservada, como la zona afectada por el incendio, se pudo observar la diferencia entre las poblaciones de bacterias y ciertos parámetros. Sin embargo, en este estudio se muestra que los suelos de manglar pueden almacenar cantidades de carbono y nitrógeno uniformemente por mucho tiempo, por ello el poder contar con más puntos de muestreo por cada sitio de estudio, permitirá observar si existe diferencia entre profundidades y sitios en las mismas épocas y tener un panorama más amplio de la conversión de estos nutrientes a nivel del suelo.

## LITERATURA CITADA

- Allen, D. E., Dalal R. C., Rennenberg, H., Meyer, R. L., Reeves, S., Schmidt, S., 2007. Spatial and temporal variation of nitrous oxide and methane flux between subtropical mangrove sediments and the atmosphere *Soil Biol. Biochem.* 39 622–31
- Alongi, D. M., 1988. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. *Microb Ecol* 15:59-79.
- Alongi, D. M., K.G. Boto y F. Tirendi., 1989. Effect of exported mangrove litter on bacterial productivity and dissolved organic carbon fluxes in adjacent tropical nearshore sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 56:133-144.
- Alongi, D. M., 2009. *The Energetics of Mangrove Forests* (Berlin: Springer)
- Alongi, D. M., 2014. Carbon cycling and storage in mangrove forests *Annu. Rev. Mar. Sci.* 6 195–219
- Bosgelmez-Tinaz, G. 2003. QS in Gram-negative bacteria. *Turk J. Biol.* 27: 85-93
- Bouillon, S., 2008. Mangrove production and carbon sinks a revision of global budget estimates *Glob. Biogeochem. Cycles* 22. GB2013
- Chen, G. C., Tam, N. F., Ye, Y., 2010. Summer fluxes of atmospheric greenhouse gases N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> from mangrove soil in South China *Sci. Total Environ.* 408 2761–7
- Díaz-Ruíz, S., E. Cano-Quiroga, A. Aguirre-León & R. Ortega-Bernal. 2004. *Diversidad,*

abundancia y conjuntos ictiofaunísticos del sistema lagunar-estuarino Chantuto-Panzacola, Chiapas, México. *Revista de Biología Tropical* 52 (1): 187-199.

Duarte, C. M., Losada, I. J., Hendriks, I. E., Mazarrasa, I. and Marbà, N., 2013. The role of coastal plant communities for climate change mitigation and adaptation *Nat. Clim. Change* 3 961–8.

Dunny G. M., Winans S. C. 1999. Bacterial life: neither lonely nor boring. En: Dunny GM, Winans SC (eds) *Cell-Cell Signaling in Bacteria*. ASM Press, Washington DC, p 1-5.

Flores-Verdugo, F.J., González-Farías, F., Zamorano, D.S., Ramírez-García, P., 1992. Mangrove ecosystems of the Pacific coast of Mexico: Distribution, Structure, Litterfall and Detritus Dynamics. En: U. Seeliger (ed.). *Coastal Plant Communities of Latin America*. Academic Press, Inc., p. 269-288.

Gotto, J. W. y Taylor, B. F. 1976. N<sub>2</sub> fixation associated with decaying leaves of the red mangrove (*Rhizophora mangle*). *Appl. Environ. Microbiol.* 31:781-783.

Hicks, B. J., Silvester, W. B., 1985. Nitrogen fixation associated with the New Zealand mangrove (*Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Var. *Resinífera* (Forst. F.) Bakh.). *Applied and Environmental Microbiology*. 46(4):955-959.

Holguin, G., Davila-Lule, A., Flores-Mireles, A.L., Villicaña, C., Geraldo, N., 2006. *AcyI homoserine lactone-producing bacteria from mangrove roots with plant-growth promoting properties*. *Microbiol (sometido)*

Izaurrealde, R. C., McGill, W. B., Robertson, J. A., Juma, N. G., Thurston, J. J., 2001. Carbon balance of the Breton classical plots over half a century. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65. p. 431-441

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2007) Fourth assessment report: climate change 2007.

Kreuzwieser, J., Buchholz, J., and Rennenberg, H., 2003. Emission of methane and nitrous oxide by Australian mangrove ecosystems Plant Biol. 5 423–31

López, J., Ezcurra, E., 2002. Los manglares de México: Una revisión. *Madera y Bosques*. Número especial. p. 27-51

Matondkar, S. G., Mahtani, S., Mavinkurve, S., 1981. Studies on mangrove swamps of Goa: I. Heterotrophic bacterial flora from mangrove swamps. *Mahasagar-Bulletin of the National Institute of Oceanography* 14:325-327

Mitsch, W. J. and J. G. Gosselink. 2000. *Wetlands*. 3rd ed. John Wiley and Sons. New York, NY, USA.

Moreno, C. E., Guerrero, P. A., Gutiérrez, C. M., Ortiz, S. C., Palma, L. D., 2002. Los manglares de Tabasco, una reserva natural de carbono. *Madera y Bosques*. Número especial. p. 115-128.

Muñoz-Hincapié, M., Morell, J., Corredor, J. E., 2002. Increase of nitrous oxide flux to the atmosphere upon nitrogen addition to red mangroves sediments *Mar. Pollut. Bull.* 44- 992–6

Neue, H. U., Gaunt, J. L., Wang, Z. P., Becker-Heidmann, P. Quijano, C., 1997. Carbon in tropical wetlands. *Geoderma* 79: 163-185.

Odum, W. E., Heald, E.J., 1975. Mangrove forests and aquatic productivity. pp.129-136. In: A.D. Hasler (ed.). Coupling of land and water systems; Ecological studies., New York: Springer.

Porta-Casanellas, J., López-Acevedo M., Roquero De Laburu C., 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente, Tercera edición; Impreso en España, Ediciones Mundi-prensa, pp.929.

Purvaja, R., Ramesh, R., 2001. Natural and anthropogenic methane emission from coastal wetlands of South India Environ. Manage. 27 547–57.

Raghukumar, S., Sharma, S., Raghukumar, C., Sathe-Pathak, V., Chandramohan, D., 1994. Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. IV. Laboratory studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora apiculata* Blume. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 183:113-131.

Ramírez-García, P., Lot-Helgueras, A., 1994. La distribución del manglar y “pastos marinos” en el Golfo de California, México. *An. Inst. Biol. Y Lim. U.N.A.M. Ser. Bot.* 65 p. 63-72

Spalding, M.D., Blasco, F., Field, C., 1997. World Mangrove Atlas. *The International Society for Mangrove Ecosystems*. Okinawa, Japón. p.178

Suárez-Altamirano, J. M., 2005. *Flujos de material suspendido y disuelto entre el estero “El Conchalito” y la laguna “Ensenada de la Paz”, B.C.S., México*. Tesis Maestro en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas Departamento de Oceanografía. La Paz, Baja California Sur, México, p.119

- Toledo, G., Bashan, Y., Soeldner, A., 1995. Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. *Can. J. Microbiol.* 41:999-1011.
- Tovilla-Hernández, C., 1998. *Ecología de los bosques de manglar y algunos aspectos socioeconómicos de la zona costera de Barra de Tecoanapa Guerrero, México*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Uchino, F., Hambali, G., Yatazawa, M., 1984. Nitrogen fixing bacteria from warty lenticellate bark of a mangrove tree, *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lamk. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:44-48.
- Van der Valk, A.G., Attiwill, P. M., 1984. Acetylene reduction in a *Avicennia marina* community in Southern Australia. *Aus. J. Bot.* 32:157-164.
- Von Prahl, H., Cantera J., Contreras R. 1990. *Manglares y Hombres del Pacífico Colombiano*. Editorial Presencia. Colombia. p. 184
- Waters, C. M., Bassler, B.L., 2005. QS: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:319-46
- Whitehead, N., Barnard, H., Slater, N., Simpson, J. L., Salmond, G. P., 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 25: 365-404
- Whiting, G. J., Chanton, J. P., 2001. *Greenhouse carbon balance of wetlands: methane emission versus carbon sequestration*. *Tellus B.* p. 521-528.
- Zuberer D, Silver W. S., 1978. Biological dinitrogen fixation (acetylene reduction) associated with Florida mangroves. *Appl Environ Microbiol* 35: 567-575.



## CAPITULO IV

### Metodología detallada

#### Muestreo

Se realizaron dos muestreos, uno en la temporada de estiaje en los meses de abril-mayo, y el segundo en época de lluvias durante los meses de julio-agosto, durante el año de 2016. Las muestras fueron obtenidas usando un nucleador, introduciéndolo a 1 m de profundidad. Después de obtener el núcleo, se identificaron visualmente cambios de coloración y textura (grados de descomposición de la materia orgánica). En todos los núcleos se tomaron muestras a tres profundidades: **1** de 0-10 cm, **2**, 30-50 cm y **3**, 70-90 cm. Se extrajeron de 300 a 400 g de muestra por cada profundidad, y se almacenaron en bolsas de Polietileno de 1 kg con cierre hermético, preservándose en hielo a una temperatura no mayor a 5°C y un tiempo aproximado de 4 horas. Posterior a la colecta, las muestras se trasladaron al laboratorio de Microbiología y Biotecnología Ambiental, y al laboratorio de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas Costeros de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula, para su análisis.

#### Parámetros *in situ* realizados:

Las pruebas fisicoquímicas para cada sitio y profundidad se realizaron *in situ*, por la técnica de colorimetría, utilizando el equipo HACH Mod. DR/890. La cuantificación del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), se realizó por medio del método de salicilato de amonio utilizando el programa número 67. La concentración de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), se cuantificó por el método de sulfato ferroso, en viales que contenían 10 ml de muestra y la adición del reactivo NitriVer 2, y se utilizó el programa número 59. El análisis de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) se determinó por el método de reducción de cadmio, en viales con 10 ml de muestra y el programa número 51 para su lectura, los resultados obtenidos de los compuestos nitrogenados, se expresaron en mg/L. Con respecto a los análisis de pH, potencial de oxido-reducción (ORP), temperatura (t), salinidad y oxígeno disuelto (OD), se realizaron con ayuda del

equipo multiparamétrico Hanna Instruments Mod. 9828.

### **Determinaciones en laboratorio:**

#### **Química del Carbono en el suelo**

Para cuantificar las concentraciones de carbono de los núcleos de muestras extraídas por sitio y profundidad, se utilizó el método de Walkley-Black (1934), basado en la oxidación de la materia orgánica del suelo, usando una mezcla de dicromato de potasio, ácido sulfúrico concentrado y ácido fosfórico. El contenido de carbono se expresó en porcentaje.

#### **Respiración del suelo**

El consumo de oxígeno en el suelo, se cuantificó a partir de la degradación de la materia orgánica, la cual se oxidó a  $\text{CO}_2$ , determinándose por la técnica de respirometría de Warburg (GSS), que consistió en depositar 20 gr de suelo en frascos de 250 ml, e introducir en el mismo, un frasco con 20 ml de NaOH al 0.089N, con un tiempo de incubación de 24 horas. Posterior al tiempo establecido, fue titulado con ácido clorhídrico al 0.093N, reportando los resultados en  $\text{mg}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{L}$ .

#### **Análisis molecular de Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)**

La técnica molecular de Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), se realizó en los laboratorios de análisis instrumental y Genética, de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal.

Se utilizaron sondas para el gen 16S rRNA, para observar la presencia o ausencia de los diferentes grupos de bacterias, asociadas al ciclo del nitrógeno, que intervienen específicamente en los procesos de nitrificación y desnitrificación, las cuales fueron: EUB338 para demostrar la presencia de bacterias (Amann *et al.*, 1990), NSO1225, para bacterias oxidadoras de amonio del género *Nitrosomonas* (Mobarry *et al.*, 1996), NIT3 para bacterias oxidadoras de nitrito del género *Nitrobacter* (Wagner *et al.*, 1996), PLA46 para bacterias del género *Planctomycetes* tales como *Brocadia* (Neef *et al.*, 1998), AMX820 para bacterias oxidadoras de amonio vía anaerobia del género *Brocadia anammoxidans* y *Kuenenia stuttgartiensis* (Schmid *et al.*, 2001), PAR651, para bacterias reductoras de nitrato, del género *Paracoccus* (Neef *et al.*, 1996) y TBD121, para bacterias del género *Thiobacillus denitrificans* y *Thiobacillus thioparus* (Fernández *et al.*, 2007). Las sondas mencionadas, fueron marcadas con colorante fluorescente Cy3, para la visualización de ácidos nucleicos presente en cada una de las muestras.

Para corroborar la presencia de ADN con las sondas de interés, primeramente, se procedió a concentrar las células, colocando 2 gr de suelo en tubos eppendorf, adicionando 1.5 ml de buffer de PBS (1x) y centrifugando a 13000 rpm (tres veces para ambos pasos). Seguido de la inmovilización de la biomasa, en la cual, se tomaron 10 µl del concentrado de células y se fijaron en cada pocillo del portaobjetos, los cuales estaban recubiertos de teflón. Posterior a la fijación se inmovilizó la biomasa y se hibridaron con las diferentes sondas, incubándose a una temperatura de 46 °C por alrededor de 1.5 horas. Transcurrido ese tiempo, se hizo un lavado de cada pocillo con agua estéril para retirar el exceso de sonda y minimizar la autofluorescencia, por cada pocillo se añadieron 20 µl de DAPI para teñir las células y apreciar la presencia del ADN en cada muestra.

Finalmente, las muestras fijadas con DAPI, se observaron bajo el microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss mod. AXIO IMAGER A1, manejando dos filtros diferentes (incluidos).