



# Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

---

**Instituto de Investigaciones Químico- Biológicas**

## **Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades microbianas en suelo a través de un gradiente de temperatura**

**Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en  
Biología Experimental**

**Presenta:**

**Biól. Aurora Inés Flores Piña**

**Director: D. C. Gustavo Santoyo Pizano**

**Co - director: D.C. Eduardo Valencia Cantero**

**Morelia, Mich., Agosto 2021**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO-BIOLÓGICAS  
UMSNH

## Resumen

El suelo como un ambiente altamente heterogéneo da lugar a diversos microambientes y a la diversidad, siendo los procariontes y hongos los organismos más abundantes. Diversos factores modulan su estructura y diversidad, no obstante, pocos son los trabajos que revelan los cambios en las comunidades microbianas expuestas a incendios subterráneos y los gradientes de temperatura que estos generan, es de esta forma que, un análisis metagenómico detallado de las comunidades procariontes y fúngicas de estos suelos puede ayudar a entender los mecanismos mediante los cuales estas taxa microbianas son capaces de adecuarse a tales condiciones. En este trabajo se presentan datos de diversidad obtenidos a través de distintas temperaturas en suelos de Pueblo Viejo. Con temperaturas desde 27 hasta 54 °C. El análisis metagenómico mostró que los suelos de Pueblo Viejo son dominados por 23 phyla de bacterias y arqueas, así como 5 phyla fúngicos. Los índices de diversidad demostraron que las bacterias presentan una mayor termotolerancia que los hongos, pues inclusive a 42 °C la diversidad es muy parecida a 27 °C (suelo control). Además, algunas taxa bacterianas son relacionadas de manera positiva con el incremento de temperatura. Adicionalmente, el aislamiento de bacterias de los suelos demostró que en el suelo afectado por incendios se ha promovido la adecuación de taxa con mayor termotolerancia que el suelo control, la identificación de algunos aislados exhibió la presencia de dos grupos que incrementan su abundancia en los suelos afectados. Estos resultados demuestran que las taxa Actinobacteria y Firmicutes incrementan su abundancia en suelos afectados por incendios debido a una mayor termotolerancia.

**Palabras clave:** Taxa, Procariontes, Hongos, Termotolerancia.

## **Abstract**

The heterogeneity of the soil gives rise to diverse microenvironments and diversity, it has been documented that prokaryotes and fungi are the organisms that dominate this complex environment. Multiple factors modulate its structure and diversity, however, only a few works show the changes in microbial communities exposed to underground fires, and the temperature gradients that these generate. It is in this way that a detailed metagenomic analysis of the prokaryotic and fungal communities can help to understand the mechanisms by which these microbial taxa are able to overcome such conditions. In this work, diversity data obtained through different temperatures in Pueblo Viejo soils are presented. The temperatures recorded cover a range from 27 to 54 °C. A metagenomic approach showed that, the Pueblo Viejo soils are dominated by 23 phyla of bacteria and archaea, as well as 5 fungal phyla, the diversity indices showed that the bacteria harbor higher thermotolerance than fungi, even at 42 °C the diversity is very similar at 27 °C (control soil), in addition some bacterial taxa are positively related to the increase in temperature. Additionally, the soil bacterial isolation showed that in affected areas the taxa adequacy with greatest thermotolerance has been promoted. Likewise, the identification of some isolates showed the presence of two taxa that increase their abundance in the affected soils. These results show that Actinobacteria and Firmicutes increase their abundance in soils affected by fire through greater thermotolerance.

**Keywords:** Taxa, Prokaryotes, Fungi, Thermotolerance.

# Contenido

Índice de figuras .....	4
Índice de tablas .....	6
1 Introducción.....	7
2 Antecedentes .....	14
2.1 El suelo como un complejo microambiente de diversidad.....	14
2.2 Efecto de diversas variables ambientales en taxa microbianos del suelo ....	14
2.3 Cambios en comunidades microbianas de suelo expuestas a incendios.....	17
2.4 Efecto de la temperatura en las comunidades microbianas.....	19
2.5 Efecto de los incendios en las propiedades físico-químicas del suelo .....	21
2.6 Pueblo Viejo .....	23
3 Justificación.....	25
4 Hipótesis.....	26
5 Objetivos .....	27
5.1 General .....	27
5.2 Específicos.....	27
6 Estrategia general .....	28
6.1 Recolecta de suelo de Pueblo Viejo.....	28

6. 2	Análisis físico-químico del suelo .....	29
6.3	Extracción de DNA metagenómico .....	29
6.4	Cuantificación del DNA metagenómico .....	31
6.5	Secuenciación de DNA metagenómico .....	31
6.6	Procesamiento de secuencias .....	32
6.7	Análisis de diversidad .....	32
6.8	Aislamiento de microorganismos .....	32
6.9	Identificación de aislados .....	33
6.10	Determinación de termotolerancia de aislados .....	33
7	Resultados .....	34
7.1	Cambios en las propiedades físico- químicas en los suelos de Pueblo Viejo .....	34
7.2	Composición de las comunidades microbianas de Pueblo Viejo .....	36
7.3	Diversidad de las comunidades microbianas de Pueblo Viejo .....	39
7.4	Correlación entre los taxa microbianos y variables ambientales.....	43
7.5	Abundancia de las comunidades procariotas a través de las temperaturas	45
7.6	Abundancia de las comunidades fúngicas a través de las temperaturas.....	46
7.7	Determinación de termotolerancia de aislados bacterianos .....	50
7.8	Identificación de aislados bacterianos termotolerantes.....	52
8	Discusión.....	58

8.1 La temperatura afecta de manera positiva y negativa algunas propiedades físico- químicas del suelo.....	58
8.2 Los organismos procariotas dominan las comunidades microbianas de Pueblo Viejo.....	60
8.3 Los organismos procariotas poseen una mayor termotolerancia que los hongos.....	63
8.4 Los incendios afectan de manera indirecta a las comunidades microbianas de Pueblo Viejo.....	63
8.5 El incremento de temperatura favoreció la abundancia de algunos géneros procariotas.....	65
8.6 El incremento de temperatura favoreció la abundancia de algunos géneros fúngicos en distintas temperaturas.....	68
8.7 Los aislados del suelo afectado demostraron mayor termotolerancia.....	71
8.8 La termotolerancia fue encontrada en dos taxa bacterianos.....	73
9 Resumen de resultados.....	76
10 Conclusión.....	78
11 Perspectivas.....	79
12 Referencias.....	80
13 Anexo.....	100

## Índice de figuras

Figura 1 Representación esquemática de entornos extremos encontrados en la tierra.....	9
Figura 2 Imagen compuesta de Pueblo Viejo.....	24
Figura 3 Estrategia general.....	28
Figura 4 Perfiles del suelo de Pueblo Viejo.....	35
Figura 5 Cambios en las Abundancias relativas de los phyla microbianos de Pueblo Viejo a través de distintas temperaturas .....	38
Figura 6 Índices de diversidad alpha de las comunidades microbianas de Pueblo Viejo.....	40
Figura 7 Índices de diversidad beta de las comunidades microbianas de Pueblo Viejo.....	42
Figura 8 Análisis de CCA entre los géneros más abundantes y variables físico-químicas.....	44
Figura 9 Mapa de calor de géneros procariotas de mayor abundancia en Pueblo Viejo.....	48
Figura 10 Mapa de calor de géneros fúngicos de mayor abundancia en Pueblo Viejo .....	49
Figura 11 Aislados bacterianos de Pueblo Viejo y su termotolerancia.....	51
Figura 12 Árbol filogenético de algunos aislados termotolerantes de Pueblo Viejo.....	53
Figura 13 Algunos aislados termotolerantes de Pueblo Viejo y su crecimiento a 30 °C.....	54

Figura 14 Algunos aislados termotolerantes de Pueblo Viejo y su crecimiento a 50 °C. ....	55
Figura 15 Imagen compuesta de Bacillus termolerantes de Pueblo Viejo.....	57
Figura 16Modelo de cambios en las comunidades microbianas de Pueblo Viejo en suelos afectados por incendios. ....	77

## Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación de organismos extremófilos.....	10
Tabla 2 Ejemplos de poli-extremófilos y sus condiciones de crecimiento.....	11
Tabla 3 Parámetros físico - químicos de los suelos de Pueblo Viejo con distintas temperaturas.....	36
Tabla 4 Categorías taxonómicas de las comunidades microbianas de Pueblo Viejo.....	37
Tabla 5 Índices de diversidad alpha de las comunidades microbianas de Pueblo Viejo.....	41

## 1 Introducción

Nuestro planeta cuenta con una amplia variedad de ambientes de origen natural, así como antropogénicos, los cuales proporcionan entornos con distintas condiciones que pudiesen limitar la vida, pues algunos de ellos pueden ser considerados ambientes extremos (Figura 1). Cada uno de estos entornos se distingue a través de distintos parámetros tales como la temperatura, presión, pH, salinidad, así como la contaminación generada por actividades humanas, entre otros (Merino et al., 2019).

Aunque no existe una definición consensuada para establecer un ambiente extremo, Torsvik & Øvreås (2008) lo definen como un entorno en el cual existen limitaciones tanto físicas como químicas que pueden llegar a restringir funciones celulares y con ello impedir la vida.

No obstante, a pesar de diversas condiciones hostiles, la vida persiste, fuera de los límites permisibles desde un punto de vista antropocéntrico, es decir temperaturas alrededor de 37 ° C, pH cercano a 7.4, salinidad de 0,9% a 3%, y 1 atm de presión, que se han establecido como condiciones estándar para la vida de diversos seres vivos. Dicho de otra forma, la vida prospera en entornos hostiles o extremos (Figura 1, Tabla 1) (Canganella & Wiegel, 2011).

Se han establecido diversas categorías para clasificar a los organismos de acuerdo al ambiente extremo en el habitan. De esta forma que son considerados termófilos aquellos organismos que prosperan en elevadas temperaturas, psicrófilos bajas temperaturas, halófitos condiciones salinas, acidófilos ambientes ácidos, alcalófilos entornos alcalinos), xerófilos ambientes secos, barófilos elevas presiones, entre otras condiciones (Tabla 1), así como sus respectivas combinaciones (Tabla 2) (Rothschild & Mancinelli, 2001; McKay 2014; Merino et al., 2019).

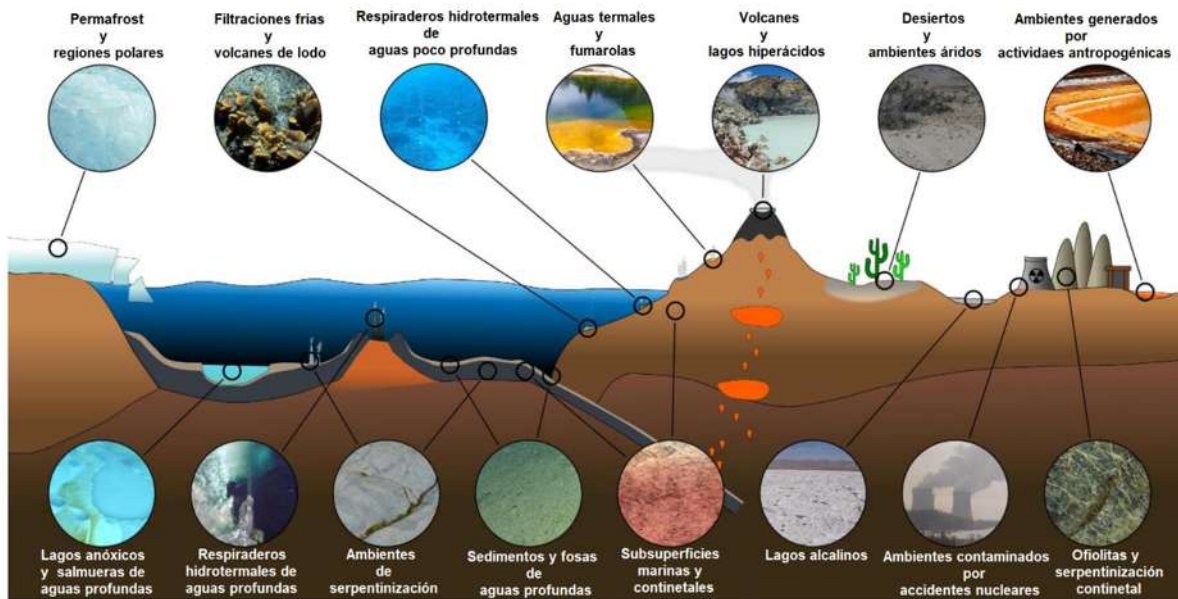
Si bien la vida en ambientes extremos es representada por diversos grupos taxonómicos, los microorganismos son los organismos dominantes, es de esta forma que a través de diversos ambientes podemos encontrar arqueas, bacterias y hongos que pueden ser considerados poli-extremófilos (Tabla 2).

De manera inicial el estudio de los microorganismos a través de distintos ambientes estaba restringido a enfoques tales como las técnicas dependientes de cultivo, las cuales a pesar de tener un alto nivel de resolución de identidad suelen subestimar la diversidad, pues se ha establecido que únicamente es cultivable alrededor del 1% de los microorganismos (Torsvik & Øvreås, 2002).

El trabajo pionero de Torsvik et al. (1990) demostró que la diversidad de microorganismos en suelo es subestimada al emplear técnicas dependientes de cultivo, dando paso al empleo del DNA para establecer la diversidad de muestras ambientales (Cowan et al., 2015; Mirete et al., 2016). Es de esta forma que el estudio de microorganismos es auxiliado por técnicas moleculares con diversos grados de resolución de identidad (Nannipieri et al., 2020), con distintas ventajas y desventajas entre cada técnica (Dash & Das, 2018).

Recientemente, la secuenciación de DNA a gran escala (meta-secuenciación) es empleada como una de las metodologías para conocer la diversidad microbiana en diversos ambientes (Cowan et al., 2015; Mirete et al., 2016; Smets et al., 2016).

Un análisis metagenómico de diversidad típico implica el aislamiento del DNA total de una muestra ambiental seguido de la amplificación total o parcial de genes marcadores, tales como genes ribosomales o espaciadores transcritos internos, dicha secuenciación es seguida por un análisis de lecturas y determinación de unidades taxonómica a través de distintas bases de datos (Dash & Das, 2018). Así pues, los enfoques metagenómicos han ayudado al estudio de las comunidades microbianas en ambientes extremos (Cowan et al., 2015; Mirete et al., 2016).



**Figura 1 Representación esquemática de entornos extremos encontrados en la tierra.** En la figura modificada de Merino et al. (2019) se ilustran diversos ambientes con condiciones extremas de origen natural, así como de origen antropogénico.

**Tabla 1 Clasificación de organismos extremófilos.**

<b>Parámetro</b>	<b>Bajo</b>			<b>Alto</b>	
<b>pH</b>	Hiper-acidófilo (<pH 3)	Acidófilo (<pH 5)	Neutrófilo (pH 5- 9)	Alcalófilo (>pH 9)	Hiper-alcalófilo (>pH 11)
<b>Temperatura</b>		Psicrófilo (<20 °C)	Mesófilo (20–45 °C)	Termófilo (45–80 °C)	Hiper-termófilo (>80 °C)
<b>Salinidad NaCl (w/v)</b>		No – halófilo (<1.2%)	Halotolerante (1.2–2.9%; tolera 14.6%)	Halófilo (>8.8%)	Halófilo extremo (>14.6%, sin crecimiento < 8.8%)
<b>Presión</b>			Barotolerante (0.1–10 MPa)	Piezófilo (10–50 MPa)	Hiperbarófilo (>50 MPa)
<b>Actividad del agua</b>			Xerófilo ( $a_w < 0.7$ )		
<b>Radiación</b>				Radiotolerante (50 Gy/h)	
<b>Oxígeno</b>		Anaerobio	Microaerófilo	Aerobio	
<b>Metales</b>				Metalotolerante	

Tabla modificada de Merino et al. (2019) con información de McKay et al. (2014), así como de Rothschild & Mancinelli, (2001).

Tabla 2 Ejemplos de poli-extremófilos y sus condiciones de crecimiento.

Cepa	Dominio	Tipo de extremófilo	Fuente de aislamiento	Temperatura (°C)	pH	Presión (MPa)	Salinidad (%)	Referencia
<i>Acidianus infernus</i> So4a	Archaea	Acido-termófilo	Cráter volcánico	65- 96	1.5-5.5	-	0.2	Segerer et al., 1986
<i>Colwellia piezophila</i> ATCC BAA-637	Bacteria	Piezo-psicrófilo	Mar profundo	4-15	7	40-80	3	Nogi et al., 2004
<i>Halomonas campisalis</i> MCM B-365	Bacteria	Hiper-alcalófilo	Lago alcalino	4-50	6-12	-	1.1-26.3	Aston & Peyton, 2007
<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	Bacteria	Alcalófilo, piezo-tolerante y halotolerante	Mar profundo	15-42	6.5-10	0.1-30	0-21	Lu et al., 2001

Cepa	Dominio	Tipo de extremófilo	Fuente de aislamiento	Temperatura (°C)	pH	Presión (MPa)	Salinidad (%)	Referencia
<i>Anoxybacillus pushchinensis</i> K1	Bacteria	Alcalino-termófilo	Estiércol	37-66	8-10.5	-	< 3	Pituka et al., 2000
<i>Actinopolyspora righensis</i> H23	Bacteria	Halófilo	Suelo salino	20-40	5.8	-	10-30	Meklat et al., 2013
<i>Geothermobacterium ferrireducens</i> FW-1a	Bacteria	Hipertermófilo	Manantial térmico	65-100	-	-	-	Kashefi et al., 2002
<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3	Bacteria	Piezófilo	Mar profundo	0-28	6-8	0.1- 50	1-7.2	Xiao et al., 2007
<i>Colwellia</i> sp. MT-41	Bacteria	Piezo-psicrófilo	Mar profundo	2	6.8	51.8-103.5	-	Yayanos et al., 1981

Cepa	Dominio	Tipo de extremófilo	Fuente de aislamiento	Temperatura (°C)	pH	Presión (MPa)	Salinidad (%)	Referencia
<i>Pedobacter arcticus</i> A12	Bacteria	Psicrófilo	Suelo de tundra	4-25	6-9	-	0-2	Zhou et al., 2012
<i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3	Archaea	Termófilo y radiotolerante	Vento hidrotermal	55-95	5.5-6.5	-	20	Jolivet et al., 2003
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	Bacteria	Vacío y radiotolerante	Comida enlatada			Condiciones de marte		De Vera et al., 2012
<i>Cryomyces antarcticus</i> MA5682	Fungi	Vacío y radiotolerante	Antártica			Condiciones de marte		De Vera et al., 2012
<i>Deinococcus geothermalis</i> DSMA11300	Bacteria	Xerotolerante	Manantial térmico	30- 55	5-8	-	-	Frösler et al., 2017

Tabla adaptada de Merino et al. (2019).

## **2 Antecedentes**

### **2.1 El suelo como un complejo microambiente de diversidad**

Las heterogeneidades espacio - temporales del suelo dan lugar a diversos microambientes cuya autoorganización es intermediada por los microorganismos que los colonizan (Young & Crawford, 2004). Es de esta forma que el suelo puede verse como un complejo ambiente, que puede tornarse hostil, pues puede llegar a ser severamente influenciado por disturbios y fluctuaciones ambientales (Nannimpieri, 2020), sin contar las complejas interacciones ecológicas de los microorganismos que lo habitan y soportan la vida en la tierra (Tecon & Or, 2017; Maron et al., 2018).

Por otro lado, aunque algunos autores retratan el suelo como un ambiente hostil para la vida microbiana (Nannimpieri, 2020), la vida aún prospera, pues tan sólo un gramo de suelo puede contener hasta  $10^9$ – $10^{10}$  células procariotas (Srinivasiah et al., 2008),  $10^4$ – $10^7$  protistas (Bates et al., 2013), hasta 100 metros de hifas (Bardgett and van der Putten 2014) y de  $10^8$ - $10^9$  virus (Brady & Weil, 2014).

De todos los microorganismos encontrados en el suelo, las bacterias, hongos y arqueas son los organismos más abundantes y dominantes (Fierer et al., 2009; Fierer, 2017). Así mismo diversos trabajos demuestran que algunos taxa raros, grupos con abundancias menores al 1% de la diversidad, pueden llegar a desempeñar funciones clave en los ecosistemas (Shade et al., 2014; Jousset et al., 2017; Lin et al., 2020).

### **2.2 Efecto de diversas variables ambientales en taxa microbianos del suelo**

Existen diversos factores que dominan la estructura y diversidad de las comunidades microbianas, es de esta forma que el pH, materia orgánica, humedad, disponibilidad de fosfatos, nitratos, textura del suelo, temperatura y vegetación, entre otros, han adquirido importante atención en el estudio de estos organismos (Fierer et al., 2017).

Por otro lado, debido a la amplia variedad de microorganismos del suelo y los factores que pueden llegar a modular su diversidad, en la literatura es posible encontrar diversos trabajos con enfoques metagenómicos en los cuales se realizan estimaciones de diversidad a diferentes escalas (Cowan et al., 2015; Mirete et al., 2016).

Un claro ejemplo de secuenciación a gran escala de suelo es demostrado por Laubert et al. (2009), quienes a través de la metasecuenciación de genes ribosomales bacterianos, exhiben la diversidad de estos procariotas a escala continental, pues al estudiar 88 diferentes tipos de suelo obtenidos a lo largo de América, lograron determinar que el pH es uno de los mayores predictores de la diversidad bacteriana, y que los suelos son estructurados principalmente por miembros de los phyla Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacterias, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes y Firmicutes, cambiando sus abundancias a través del pH.

De igual manera, Tedersoo et al. (2014) lograron determinar a escala global las comunidades fúngicas del suelo de 365 sitios a través de la metasecuenciación de espaciadores transcritos internos de hongos.

Tedersoo et al. documentaron que los phyla fúngicos de mayor abundancia en suelos fueron los grupos Basidiomycota con el 55.7%, Ascomycota con 31.3% y Mucoromycota con el 10.7%, entre otros, representados con el 2.3%. Así mismo, los autores establecieron los estilos de vida de estos microorganismos, siendo los saprófitos y ectomicorrízicos los principales con el 43.8 y 23.2%, respectivamente.

De manera similar a los datos obtenidos a gran escala de la diversidad de hongos y procariotas, existen otros trabajos los cuales documentan los cambios en la diversidad de estos microorganismos en el suelo ante otros factores a escalas menores, tal como Leff et al. (2015), autores que al estudiar el incremento de compuestos nitrogenados y fosfatados en pastizales encontraron aumentos en las abundancias de algunos microorganismos.

Leff et al. (2015) documentaron que phylum Crenarchaeota incrementaba su abundancia relativa en suelos con alto contenido de compuestos nitrogenados, y que dicho incremento se debía a la capacidad de estas arqueas de oxidar estos compuestos. De igual forma, los autores evidenciaron el decremento de hongos micorrízicos del subphylum Glomeromycotina atribuyendo su declive a la presencia de nutrientes, lo cual disminuye su beneficio a los hospederos, así mismo, mostraron el descenso de abundancias en Acidobacteria, adjudicando su decremento al estilo de vida oligotrófico de éstas.

Por otro lado, Kaiser et al. (2016) al analizar el papel de distintas propiedades edáficas en suelos de bosques y pastizales, mostraron que el pH resultó ser el mejor predictor de la estructura, diversidad y función de las comunidades microbianas, adjudicando el 26% de las variaciones estructurales de las poblaciones bacterianas. Así, los investigadores establecieron a los grupos Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexy, Gemmatimonadetes, Firmicutes y Nitrospirae, como los dominantes en estos suelos.

De manera similar, Hartmann et al. (2017) examinaron el efecto de la irrigación en el microbioma de suelo de bosques. Los autores concluyen que el incremento de humedad produjo un aumento de abundancias de bacterias copiótrofas del phylum Proteobacteria, así como de hongos del phylum Mucoromycota, hongos con la capacidad de metabolizar una amplia variedad de compuestos orgánicos complejos, tales como quitina y celulosa. Gracias a estos estudios se demuestra que la diversidad de las comunidades microbianas es influenciada por cambios en las propiedades físico - químicas del suelo.

### **2.3 Cambios en comunidades microbianas de suelo expuestas a incendios**

Además de las variaciones ambientales, la diversidad microbiana del suelo es influenciada por eventos estresantes y letales tales como los incendios, pues las combustiones pueden afectar a las comunidades microbianas de manera directa e indirecta (Dooley & Treseder, 2012; Piazza et al., 2020; Certini et al. 2021).

De manera directa, a través de fluctuaciones en las temperaturas, ya que el crecimiento y proliferación de los microorganismos se afecta al grado de ser letal. Mientras que de manera indirecta la diversidad de las comunidades microbianas es alterada, mediante las modificaciones de las propiedades físico - químicas del suelo, dependientes de las temperaturas alcanzadas (Dooley & Treseder, 2012; Santín & Doerr, 2016; Piazza et al., 2020; Certini et al. 2021).

Entre los trabajos que demuestran los cambios de las comunidades microbianas expuestas a incendios se encuentra el de Pérez -Valera et al. (2018), los autores al estudiar las comunidades microbianas de suelos afectados por incendios a través de una cronosecuencia de 20 años y compararlas con suelos control, documentaron que la diversidad de las bacterias y hongos es afectada de manera inmediata después de un incendio, siendo los hongos los organismos más sensibles en las combustiones, mientras que las arqueas muestran una mayor resistencia a los cambios generados seguido de las bacterias.

Así mismo, Li et al. (2019) mostraron que la diversidad de las comunidades bacterianas afectas por incendios es diferencial atendiendo a la severidad del incendio. Es de este modo que los incendios determinados con baja y media intensidad (donde las temperaturas alcanzadas en el suelo no rebasan los 50 °C) no afectan de manera diferencial la diversidad bacteriana, mientras que los incendios con intensidades altas (aquellos donde el suelo alcanza temperaturas de 100 °C) tienen un efecto negativo en la diversidad bacteriana.

Además de los incendios superficiales, también existen los incendios subterráneos, que son “humeantes”, lentos, y de duración variable, los cuales pueden prolongarse desde semanas hasta años, dependiendo de la cantidad de materia orgánica. Adicionalmente, estos incendios también pueden propagarse a la cobertura vegetal superficial, y extenderse a través de llamas en presencia de corrientes de aire (Rein, 2013; Turetsky et al., 2015).

De acuerdo con Rein (2013) las “combustiones humeantes” son generadas en grandes depósitos de materia orgánica, tales como turberas o suelos ricos en carbono, los cuales se calientan hasta alcanzar un umbral de temperatura en la cual comienza un proceso de descomposición químico y dan lugar a diversos compuestos orgánicos volátiles e hidrocarburos con derivados poli - aromáticos.

Si bien, este tipo de combustiones pueden ser generadas de manera natural a través del proceso de autocalentamiento en bajas concentraciones de oxígeno por actividad microbiana, truenos, o actividad geotérmica, estos también pueden generarse como consecuencia de actividades antropogénicas (Kuenzer & Stracher, 2012; Rein, 2013), es de este modo que este tipo de combustiones han sido documentadas en diversas partes del mundo (Kuenzer & Stracher, 2012).

Un claro ejemplo de las “combustiones humeantes” o incendios subterráneos, es representado por Centralia en Pensilvania, ciudad que se encuentra en constante ignición desde 1962 (Nolter & Vice, 2004).

Lee et al. (2017) estudiaron las comunidades bacterianas y arqueas en suelos afectados por los incendios, suelos afectados y recuperados, así como suelos que no han sido afectados por los incendios y que cuentan con cobertura vegetal (suelo control). Los suelos control, aquellos sin ser afectados y con temperaturas de 13 a 15 °C, demostraron ser dominados por phyla pertenecientes al grupo Proteobacteria, Acidobacteria y Verrucomicrobia; mientras que los suelos afectados por los incendios, con temperaturas registradas de 21 a 58 °C, las bacterias del grupo Chloroflexy, arqueas del phylum Crenarchaeota, así como OTUs sin

determinación de identidad incrementaron su abundancia. Mientras que en los suelos recuperados se registraron incrementos de abundancias de los grupos Bacteroidetes y Acidobacteria, los autores atribuyeron los cambios al decremento del pH.

Con base en los datos anteriores, se estable que los incendios pueden afectar a las comunidades microbianas de manera directa e indirecta.

#### **2.4 Efecto de la temperatura en las comunidades microbianas**

Todos los seres vivos poseen un rango de temperatura de crecimiento óptimo, por lo que la temperatura actúa como uno de los impulsores principales de cualquier proceso biológico (Brown et al., 2004).

El incremento o decremento de la temperatura puede llegar a desafiar la integridad y funcionamiento celular, y con ello la vida misma. Se sabe que, a elevadas temperaturas, ocurre la desnaturalización de biomoléculas, mientras que a bajas temperaturas, se presentan daños estructurales a través de la formación de cristales (Rothschild & Mancinelli, 2001).

El estudio de microorganismos en ambientes termófilos inició en los 70s con los trabajos de Brock en el parque Nacional de Yellowstone. Desde entonces diversos trabajos demuestran la diversidad de microorganismos asociados a estos ambientes.

De manera reciente, se pueden encontrar clasificaciones de microorganismos de acuerdo al rango de temperatura en el cual pueden crecer (Tabla 1). De acuerdo con Merino et al. (2019) los organismos termófilos son aquellos capaces de crecer entre 45 y 80 °C de manera óptima, mientras los hipertermófilos a temperaturas arriba de 80 °C, no obstante, estos rangos de temperaturas han sido establecidos en procariotas capaces de crecer hasta en 100 °C (Tabla 2).

Maheshwari et al. (2000) propusieron el término termotolerantes para definir aquellas especies de hongos capaces de crecer con una temperatura máxima de 50 °C y una mínima de 20 °C. Además, establecieron como termófilos, a aquellas especies capaces de crecer óptimamente en temperaturas mayores de 50 °C, y conservan un crecimiento mínimo en temperaturas cercanas a 20 °C.

Por otra parte, entre los organismos ampliamente reconocidos por su capacidad de tolerar elevadas temperaturas se encuentran las arqueas (Tabla 2), procariotas capaces de tolerar altas temperaturas debido a su característica membrana celular con enlaces tipo éter, en lugar de éster tan comunes en bacterias y eucariotas (Rothschild & Mancinelli, 2001).

Así mismo, al igual que las arqueas, las bacterias son capaces de tolerar condiciones extremas, tales como elevadas temperaturas (Tabla 2). Entre las estrategias conocidas de las bacterias para tolerar altas temperaturas se encuentra la generación de estructuras de resistencia tales como esporas y acinetos (Dworkin, 2006).

De igual manera, los hongos poseen la capacidad de generar masas compactas de micelio con paredes celulares gruesas (esclerocios) y esporas como estructuras de resistencia ante diversas condiciones adversas, tales como elevadas temperaturas (Snyder et al., 2019).

Adicionalmente, además de las estructuras de resistencia, algunos microorganismos termófilos se han adaptado a vivir a elevadas temperaturas en ambientes extremos (Tabla 2), pues a lo largo de la historia evolutiva han adquirido adaptaciones de termoestabilidad en sus biomoléculas, tales como un mayor contenido de residuos hidrofóbicos en proteínas, ácidos grasos de cadenas más largas y saturadas, asociación del DNA con proteínas termoestables, así como super-torsiones positivas en su material genético catalizadas por girasas inversas, entre otras (Torsvik & Øvreås, 2008).

Por otro lado, además de las adaptaciones en diversas biomoléculas a manera de colonizar nichos con elevadas temperaturas en organismos termófilos o hipertermófilos (Tabla 1), también se ha documentado la termotolerancia, es decir, la capacidad de crecer en rangos de temperaturas fuera del crecimiento óptimo.

De acuerdo con los trabajos de los años 60's de Bausum & Matney (1965), así como de Dowben & Weidenmuler (1968), se sabe que la termotolerancia puede ser pre - condicionada a través de exposiciones a shocks térmicos e incrementos graduales de temperaturas, es de esta forma que organismos mesófilos pueden llegar a crecer más allá de su rango de temperatura óptimo.

La termotolerancia es intermediada por diversos mecanismos moleculares a nivel celular tales como activación de proteínas de shock térmico, producción de agentes termo - protectores, cambios en las membranas celulares, etc. (Macario & Conway, 2007).

## **2.5 Efecto de los incendios en las propiedades físico-químicas del suelo**

Además de que las comunidades microbianas son afectadas en el suelo, las propiedades físico – químicas de estos también son modificadas (Certini et al., 2005; Certini et al., 2021).

Los cambios en las propiedades físico - químicas del suelo han sido relacionadas como marcadores de severidad de los incendios, es de esta forma que modificaciones en el color, textura, pH, nutrientes, así como materia orgánica, son monitoreados con la finalidad de establecer la severidad de los incendios (Zavala et al., 2014).

Entre los marcadores de severidad de incendios se encuentran los cambios en el color del suelo, dichas alteraciones son mayormente determinadas por las cantidades de óxidos generados, la materia orgánica incinerada, el nivel de combustión y las temperaturas alcanzadas (Wohlgemuth et al., 2018).

Es de esta forma que, en suelos con alto contenido de hierro las tonalidades alcanzadas son rojas (Verma & Jayakumar, 2012), aunque también pueden alcanzar tonalidades negras cuando las temperaturas se encuentran entre los 100 - 250 °C, grises con 300 - 400 °C, y blancas con temperaturas mayores a 500 °C, (Wohlgemuth et al., 2018).

Así mismo, los suelos afectados por incendios modifican sus propiedades en gran medida debido a la incorporación de cenizas, Bodí et al. (2014) definen la ceniza generada en incendios forestales como un material residual complejo producido a través de la combustión total o parcial de materia orgánica modificada químicamente, acompañada de fracciones inorgánicas de origen vegetal y atmosférico. En este sentido, la ceniza generada en incendios forestales puede establecerse como un residuo compuesto de materiales minerales y componentes orgánicos carbonizados con distinta composición, atendiendo al material vegetal incinerado.

Por otro lado, el contenido de materia orgánica es reducido en los incendios a través del proceso de combustión atendiendo al nivel de severidad (Certini, 2005). La reducción en este material, entre otros, tales como los fosfatos, son apreciables debido a la volatilización de componentes menores (Certini, 2005), así como carbonización, y oxidación total o parcial de estos (González- Pérez, et al., 2004; Certini, 2005).

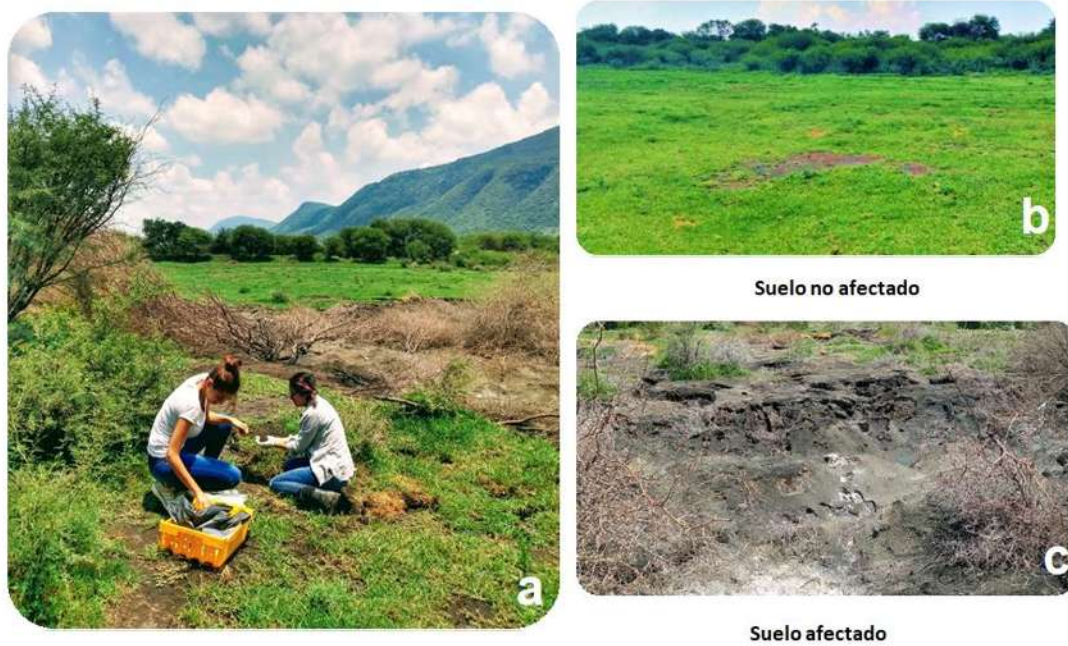
En contraste al decremento de algunos componentes, el pH puede incrementar de manera inmediata en el momento que ocurren los incendios, pues se genera la incorporación cationes, tales como Ca, K, Na, y Mg, así como óxidos, hidróxidos y carbonatos, del mismo modo que se desnaturalizan ácidos orgánicos y disminuye la disponibilidad de fosfatos, pues estos tienden a ser disponibles en pH cercanos a 6.5 (Certini, 2005; Thomaz et al., 2014; Wohlgemuth et al., 2018).

Adicionalmente, de acuerdo con Wohlgemuth et al. (2018) a una mayor concentración de materia orgánica incinerada se liberan cantidades superiores de cationes de cenizas conduciendo a incrementos significativos de pH, así mismo, estos cambios en el pH pueden ser atenuados debido al alto contenido de arcillas en el suelo que actúan como amortiguadores.

## **2.6 Pueblo Viejo**

La comunidad de Pueblo viejo se ubica en el municipio de Venustiano Carranza en el estado de Michoacán de Ocampo, en la región Centro - Occidente de la República Mexicana entre las coordenadas 20° 23' 27" y 17° 53' 50" de la Latitud Norte, y entre 100° 03' 32" y 103° 44' 49" de la Longitud Oeste, limitando al norte con el estado de Jalisco y el lago de Chapala.

La comunidad de Pueblo Viejo se ubica en una zona plana cercana a una falla geológica en la prolongación de la Sierra de Pajacuarán asociada con cierta actividad volcánica. El suelo es originado a través de procesos de sedimentación con alto contenido de arcillas y materia orgánica. Debido a este alto contenido de materia orgánica y a su ubicación dentro de una zona geotérmica, que la comunidad de Pueblo Viejo ha presentado incendios subterráneos intermitentes de duración variable desde el año 2017 creando paisajes mezclados (Figura 2).



**Figura 2 Imagen compuesta de Pueblo Viejo.** En las fotografías es posible apreciar zonas afectadas por incendios (c), zonas no afectadas por incendios (b) y vista compuesta del paisaje de Pueblo Viejo en agosto del 2019 (a).

### **3 Justificación**

Las comunidades microbianas del suelo están expuestas a diversos factores ambientales, los cuales modulan su estructura y diversidad, incluyendo las altas temperaturas provocadas por incendios subterráneos. Pocos son los estudios que se han realizado para conocer a las comunidades microbianas en suelos a través de un gradiente de temperatura, generado en combustiones subterráneas. Por lo que un análisis detallado de la composición, diversidad, y funcionalidad de las comunidades microbianas de los suelos expuestos a incendios en Pueblo Viejo, a través de herramientas metagenómicas, puede ayudar a entender los mecanismos mediante los cuales estas taxa microbianas son capaces de adecuarse a tales condiciones.

## **4 Hipótesis**

Los incendios subterráneos en suelos de Pueblo Viejo favorecen la adecuación de taxa microbianos termotolerantes.

## **5 Objetivos**

### **5.1 General**

Analizar la estructura y diversidad de las comunidades microbianas en suelo a través de un gradiente de temperatura en la comunidad de Pueblo Viejo.

### **5.2 Específicos**

1.- Determinar la composición taxonómica de las comunidades procariotas y fúngicas en suelos de Pueblo Viejo.

2.- Realizar un análisis de diversidad de las comunidades microbianas en un gradiente de temperatura en los suelos de Pueblo Viejo.

3.- Establecer una correlación entre los taxa microbianos y variables ambientales de Pueblo Viejo.

4.- Obtener e identificar aislados termotolerantes de Pueblo Viejo.

## 6 Estrategia general

### 6.1 Recolecta de suelo en Pueblo Viejo

La recolecta de muestras de suelo en Pueblo Viejo se efectuó a través de la selección de dos zonas: en una se colectó suelo de la parte afectada por los incendios subterráneos, y en la otra zona suelo control sin rastros visibles de incendios. Las muestras fueron colocadas en bolsas para el análisis físico - químico y en tubos cónicos estériles para extracción de DNA y obtención de aislados (Figura 3). La recolecta de suelo control fue obtenida a través de zonas con cobertura vegetal, en secciones de 10 cm hasta una profundidad de 30 cm y registrando la temperatura. Mientras que el suelo afectado fue seleccionado como aquel sin cobertura vegetal, y de igual manera se tomaron muestras por secciones de 10 cm hasta una profundidad de 30 cm con los registros de temperaturas.

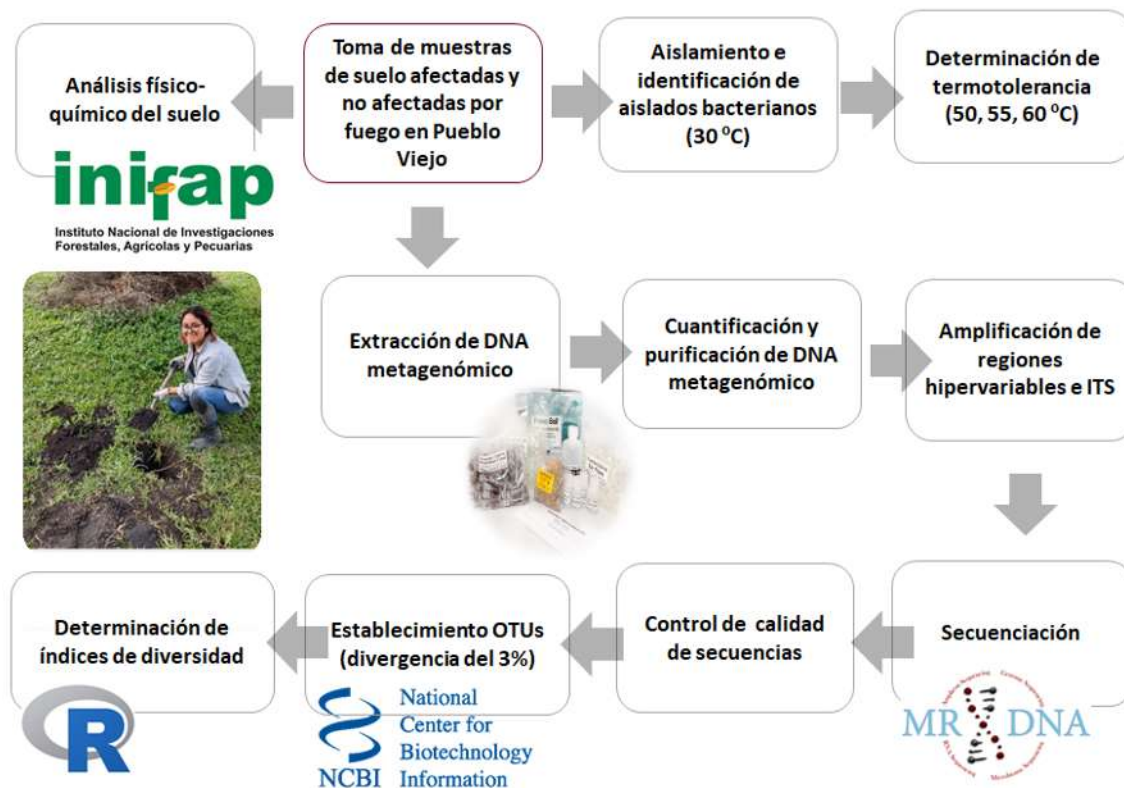


Figura 3 Estrategia general.

## 6.2 Análisis físico-químico del suelo

Los análisis físico- químicos del suelo fueron realizados en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de Celaya, Guanajuato. Los parámetros a analizar en los suelos registrados con distintas temperaturas fueron textura, pH, materia orgánica, fosfatos y nitratos.

## 6.3 Extracción de DNA metagenómico

La extracción de DNA metagenómico se llevó a cabo empleando el Kit de MoBio usando cada una de las muestras compuestas a distintas temperaturas. De acuerdo a las instrucciones del fabricante se siguieron los siguientes pasos:

- 1.- Se agregaron 0.25 g suelo a los tubos **PowerBead**.
- 2.- Una vez colocados las respectivas muestras en los tubos estos fueron sometidos a un vórtex por algunos segundos.
3. Se agregaron 60  $\mu$ L de **solución C1**, esta solución contiene agentes que ayudarán a la disrupción de membranas.
- 4.- Una vez agregada la solución C1 los tubos fueron sometidos a un vórtex por al menos durante 5 minutos.
- 5.- Posterior al proceso de disrupción de membranas los tubos fueron centrifugados por 30 segundos a 10, 000 x g a temperatura ambiente.
6. Después de centrifugar el sobrenadante fue recuperado y transferido a un tubo limpio de 2 mL.
- 7.- Posteriormente se agregaron a cada tubo 250  $\mu$ L de **solución C2** y nuevamente los tubos fueron sometidos a vórtex por algunos segundos, seguidos de un periodo de incubación en hielo por 5 minutos.

8.- Posterior al periodo de incubación en hielo los tubos fueron llevados a centrifugar por 1 minuto a 10, 000 x g.

9. Una vez que los tubos fueron centrifugados se recuperó el sobrenadante y fue transferido a tubos nuevos de 2 mL.

10. Ya transferido el sobrenadante en un tubo limpio fueron añadidos 200  $\mu$ L de **solución C3** y mezclados por inversión de tubos. La solución C3 contiene agentes que actúan precipitando materiales orgánicos e inorgánicos que pudieran estar aún presentes en las muestras.

11.- Los tubos fueron centrifugados a temperatura ambiente por un minuto a 10,000 x g y el sobrenadante nuevamente recuperado y transferido a un tubo limpio de 2 mL.

13.- Después de transferir el sobrenadante a un nuevo tubo se agregaron 1.2 mL de **solución C4** y los tubos fueron sometidos a vórtex durante unos segundos. La solución C4 es una solución salina la cual permitirá unión del DNA en los filtros del siguiente paso.

14.- Las muestras con la solución C4 fueron cargadas en los **Filtros de centrifugado** y posteriormente centrifugadas a 10, 000 x g durante un minuto, este proceso se repitió hasta cargar toda la mezcla. Los filtros contenían sílica gel para permitir la adhesión del DNA.

15.- Posterior al proceso de filtración y centrifugación con la solución C4 los filtros fueron colocados en los tubos de recolección agregando 500  $\mu$ L de **solución C5**. La solución C5 es una solución de lavado con etanol con la función de remover residuos de soluciones anteriores.

16.- Después del proceso de lavado, los filtros fueron colocados en los tubos de recolecta con 100  $\mu$ L de **solución C6** en el centro de las membranas. La solución C6 contiene un amortiguador que permitió la elución del DNA de las membranas.

17.- Los filtros con la solución C6 fueron dejados reposar por un minuto a temperatura ambiente y posteriormente fueron sometidos a un proceso de centrifugación durante un minuto a 10, 000 x g.

18.- Finalmente, los filtros se descartan y el DNA obtenido fue almacenado en refrigeración para su posterior uso.

#### **6.4 Cuantificación del DNA metagenómico**

La pureza, integridad y cuantificación del DNA metagenómico obtenido a través del Kit de extracción fueron establecidos empleando un micro espectrofotómetro Nanodrop, así como una electroforesis en gel de agarosa con la finalidad de cumplir con las características de calidad requeridas para el proceso de secuenciación.

#### **6.5 Secuenciación de DNA metagenómico**

Una vez obtenido el DNA metagenómico de las muestras de suelo, este se secuenció comercialmente empleando los servicios de Mr. DNA en Texas. La región hipervariable V4 de arqueas y bacterias se amplificó con los oligonucleótidos 515-806 para conocer la diversidad de estos microorganismos, mientras que el espaciador transcrito interno de hongos se amplificó empleando los oligos ITS1-ITS2. La amplificación se realizó empleando el kit de mezcla Hot Star Taq Plus (Qiagen, EE. UU.) por 30 ciclos con las siguientes condiciones: 94 ° C durante 3 minutos, seguido de 30-35 ciclos de 94 ° C durante 30 segundos, 53 ° C durante 40 segundos y 72 ° C durante 1 minuto, después de lo cual se generará una polimerización final a 72°C durante 5 minutos.

Los productos amplificados fueron evaluados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% y fueron usados en la preparación de bibliotecas para secuenciación con tecnología de Illumina a través del sistema de código de barras de Mr. DNA bTEFAP®.

## **6.6 Procesamiento de secuencias**

Las lecturas obtenidas fueron sometidas a un proceso de depuración y control de calidad removiendo adaptadores y secuencias menores a 150 bp así como eliminación de quimeras. Las unidades taxonómicas operativas (OTUs) fueron definidas como aquellas secuencias con un 3% de divergencia (97% de similitud) usando BLASTn. Los OTUs finales se clasificaron taxonómicamente contra una base de datos curada derivada de RDPII y NCBI (<http://rdp.cme.msu.edu/>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ).

## **6.7 Análisis de diversidad**

Los análisis de diversidad serán efectuados a través de diversos paquetes en el estadístico R (<https://www.r-project.org/>), así mismo a través del programa PAST (Hammer et al., 2001). Los índices de diversidad Alfa (riqueza, dominancia y homogeneidad) serán obtenidos empleando el paquete Vegan (<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>) así como los análisis de correspondencias canónicas entre las variables ambientales y abundancias de microorganismos.

Los OTUs compartidos y únicos serán obtenidos a través del paquete Vennerable ("Vennerable", repos="<http://R-Forge.R-project.org>"), mientras que la diversidad beta bajo el índice de Bray- Curtis será obtenido a través del programa PAST.

## **6.8 Aislamiento de microorganismos**

El aislamiento de microorganismos se llevó a cabo a través de distintas diluciones seriales del suelo control y del suelo afectado por incendios en amortiguador de fosfatos. 100 µL de distintas diluciones fueron empleadas para cultivo en placa con asa triangular. Las diluciones seriadas de suelo fueron cultivadas en un medio extracto de suelo (DSMZ, 2007), e incubadas a 30° C por una semana.

Después de una semana de incubación, las colonias con distinta morfología fueron seleccionadas, aisladas y sembradas hasta la obtención de cultivos puros.

## **6.9 Identificación de aislados**

La identificación de aislados se llevó a cabo mediante análisis filogénicos empleando el gen ribosomal 16S. Brevemente, de los cultivos puros se realizó aislamiento de DNA genómico siguiendo la metodología propuesta por Mahuku (2004), una vez extraído el DNA se prosiguió a realizar amplificación del gen 16S empleando los oligos universales FD1-RD1 (Weisburg et al., 1991). La reacción de polimerización del gen ribosomal se efectuó con el kit de GoTaq® Green Master Mix de Promega con las siguientes condiciones: Un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos compuestos de un minuto a 95°C, un minuto a 55 °C, dos minutos a 72 °C y un ciclo de polimerización final de 10 minutos a 72°C. Los amplicones serán evaluados a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, así como cuantificados para cumplir con las características requeridas para secuenciación de productos de PCR requeridos por Macrogen, Korea.

Las secuencias obtenidas se evaluaron a través de la base de datos de NCBI usando BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de cepas referenciadas con un porcentaje de identidad del 97%, mientras que los análisis filogenéticos se efectuaron en el programa MEGA7 (Kumar et al., 2016) empleando un análisis de 1000 bootstrap o replicas con el método de Maximum Likelihood.

## **6.10 Determinación de termotolerancia de aislados**

Para determinar la termotolerancia de los aislados puros, estos se cultivaron a 30 °C y fueron transferidos, sin ningún tratamiento precondicional a 50, 55 y 60 °C.

## **7 Resultados**

### **7.1 Cambios en las propiedades físico- químicas en los suelos de Pueblo Viejo**

El proceso de combustión en Pueblo Viejo generó gradientes de temperatura en zonas afectadas, las cuales mostraron perfiles de suelo influenciados con distintos grados de severidad, estas diferencias lograron captarse a simple vista pues se encontraron conglomerados con distinta coloración a medida que incrementa la temperatura (Figura 4).

Es de esta forma que, para las muestras de suelo afectado, únicamente se colectaron porciones edáficas con temperaturas de 42, 50 y 54 °C pues a mayores temperaturas se encontraron conglomerados blanquecinos generados a través de combustiones completas (Figura 4). Mientras que para el suelo control se tomaron muestras con temperatura de 27 °C.

Los parámetros físico - químicos analizados demostraron que el suelo de Pueblo Viejo posee un alto contenido de materia orgánica (Tabla 3), mientras que los porcentajes de arena, limo y arcillas se mantuvieron similares en todas las muestras identificando el suelo como franco- arcillo-arenoso o franco-arcilloso (FAO, 2020).

Así mismo, se detectaron cambios en el contenido de materia orgánica, fosfatos, nitratos y pH. Los valores más altos de materia orgánica y fosfatos fueron identificados en la muestra de control, con 27 °C, mientras que las muestras de suelo afectadas por los incendios se distinguieron por sus elevados valores en nitratos y pH (Tabla 3).



**Figura 4 Perfiles del suelo de Pueblo Viejo.** Las secciones **a** y **b** muestran el perfil del suelo control, la sección **c** muestra un perfil del suelo afectado por los incendios, mientras que las secciones **d**, **e**, **f** y **g** muestran conglomerados encontrados a través de diversas profundidades del suelo afectado.

**Tabla 3 Parámetros físico - químicos de los suelos de Pueblo Viejo con distintas temperaturas.**

Temperatura (°C)	pH	MO (%)	Fosfatos (p.p.m.)	Nitratos (p.p.m.)	Arena (%)	Limo (%)	Arcillas (%)
27	7.55	98.65	6.069	278.166	35.64	21.28	33.08
42	7.77	16.19	1.413	386.268	39.64	31.08	29.08
50	8.04	14.32	1.359	628.37	27.64	41.28	31.08
54	7.79	12.20	1.462	570.831	29.64	37.28	33.08

## 7.2 Composición de las comunidades microbianas de Pueblo Viejo

El análisis de las lecturas de los espaciadores transcritos internos y secuencias hipervariables reveló que las comunidades microbianas de Pueblo Viejo se componen principalmente de poblaciones procariotas (Tabla 4).

De manera general se determinaron 23 Phyla procariotas, de los cuales 21 corresponden a bacterias, y únicamente dos, Euryarchaeota y Thaumarchaeota a arqueas, taxa presentes en todas las muestras.

Los phyla bacterianos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria y Gemmatimonadetes son los grupos predominantes en el suelo control con abundancias del 38.12, 11.87, 9.87, 7.84, 6.44 y 6.15%, respectivamente.

Si bien, a 42 °C los 6 phyla bacterianos mencionados anteriormente continúan siendo los más abundantes, algunos de estos grupos disminuyeron sus abundancias.

Es así que a 42 °C los taxa Firmicutes (13.03 %), Actinobacteria (15.21 %) y Gemmatimonadetes (8.15%) incrementan sus porcentajes (Figura 5a).

De manera interesante, el phylum Firmicutes fue el grupo de mayor abundancia en temperaturas de 50 y 54 °C, pues fue representado con hasta el 51.36 % y 56.04 %, respectivamente (Figura 5a).

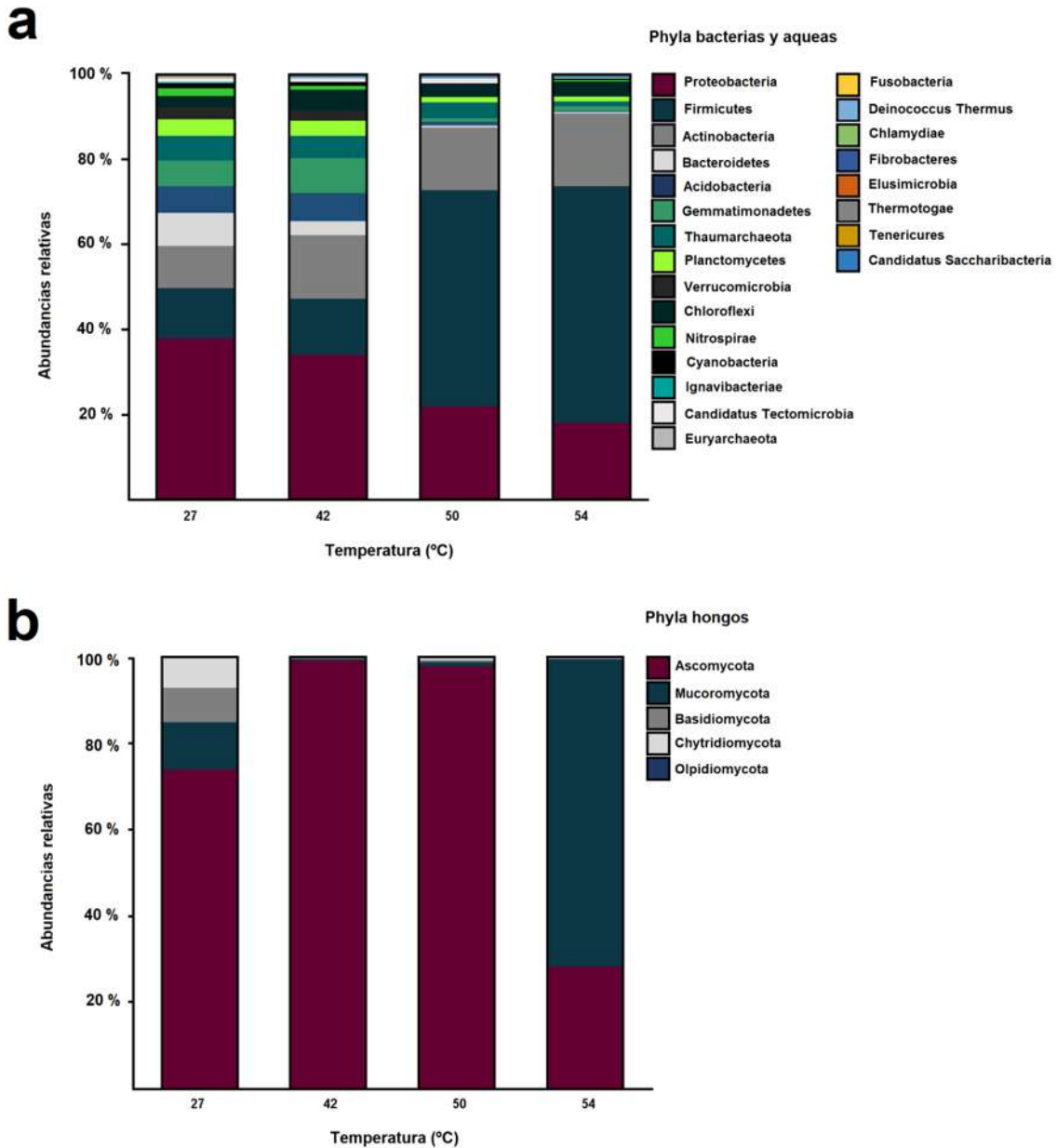
Así mismo, el phylum Actinobacteria incrementó su abundancia en 54 °C pues a esta temperatura su porcentaje fue del 17.13 %, de manera contraria al grupo Proteobacteria que disminuyo sus abundancias con el incremento de las temperaturas (Figura 5a).

Por otro lado, las comunidades fúngicas encontradas en los suelos analizados fueron representadas por los phyla Ascomycota, Mucoromycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Olpidiomycota (Figura 5b).

De los 5 phyla fúngicos, el phylum Ascomycota domina hasta los 50°C con el 98.25 % de las abundancias, así como en 27 °C y 42 °C con el 74.14% y 99.45 %, respectivamente, mientras que a 54 °C notablemente el phylum Mucoromycota es el dominante con el 71.39 % de las abundancias relativas (Figura5b).

**Tabla 4 Categorías taxonómicas de las comunidades microbianas de Pueblo Viejo.**

<b>Comunidad</b>	<b>Phyla</b>	<b>Clases</b>	<b>Ordenes</b>	<b>Familias</b>	<b>Géneros</b>	<b>OTUs</b>
<b>Procariota</b>	23	50	104	204	453	638
<b>Fúngica</b>	5	17	30	53	86	115



**Figura 5 Cambios en las Abundancias relativas de los phyla microbianos de Pueblo Viejo a través de distintas temperaturas. El panel a muestra abundancias relativas de bacterias y arqueas, mientras que el b muestra las abundancias de hongos.**

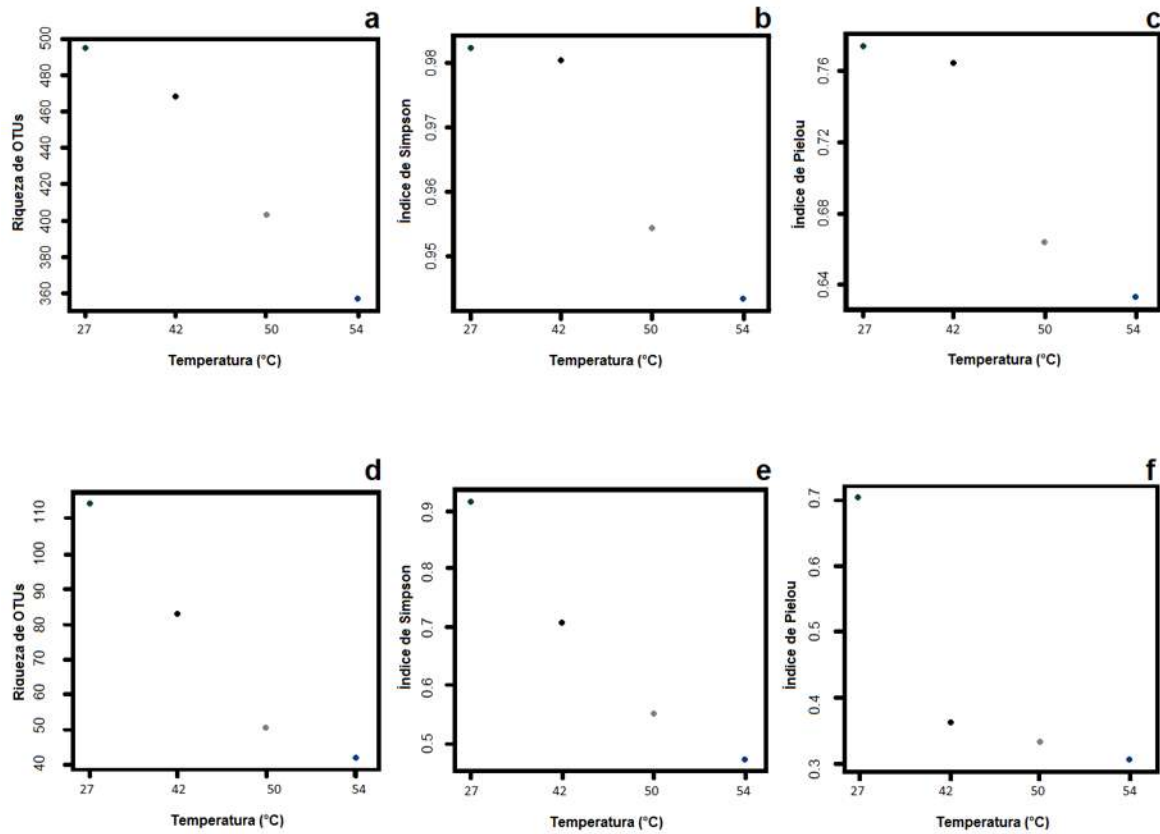
### **7.3 Diversidad de las comunidades microbianas de Pueblo Viejo**

Los índices de diversidad alfa a través de la riqueza de filotipos, índice de Simpson e índice de Pielou, demostraron que las bacterias y arqueas son los organismos dominantes en los suelos de Pueblo Viejo, pues sus índices de diversidad alfa fueron superiores a los de los hongos (Tabla 5).

Así mismos estos índices demuestran que existe una disminución de riqueza de OTUs mientras incrementa la temperatura, no obstante, este decremento no es tan marcado en bacterias como lo es en hongos (Tabla 5, Figuras 6a- 6f), pues inclusive a 42 °C se pueden apreciar abundancias similares con el suelo control (Figura. 5a).

Adicionalmente, un análisis de similitud entre las comunidades (diversidad beta) con distintas temperaturas demostró que las comunidades microbianas asociadas a 27 y 42 °C son muy similares pues comparten un índice de similitud de Bray- Curtis de 0.1573 con 103 OTUs compartidos (Figuras 7a y 7b), además, los índices de diversidad alfa son muy similares entre las comunidades procariotas en estas temperaturas (Tabla 3).

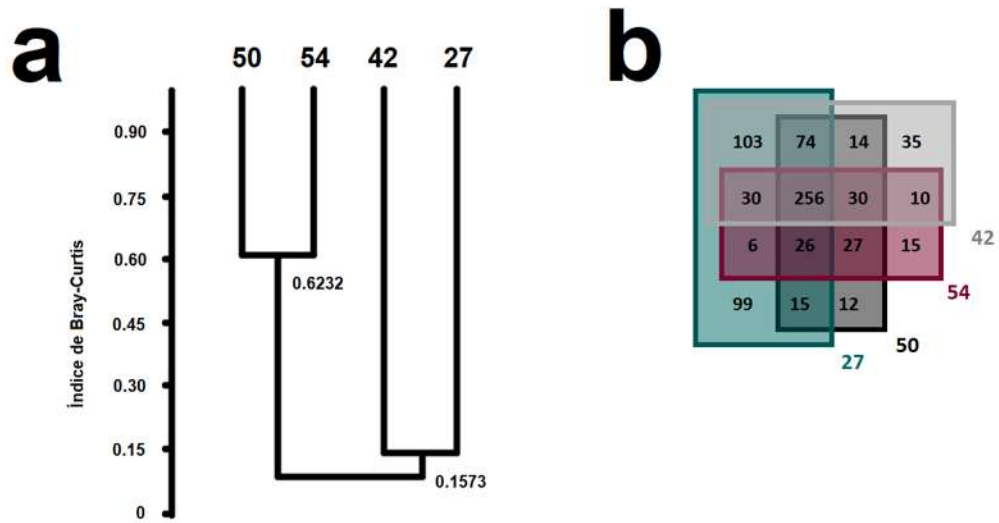
Por otro lado, las comunidades fúngicas demostraron ser menos termotolerantes a través del incremento de temperatura, pues los cambios en los índices de diversidad son reducidos de manera más evidente a partir de los 42 °C (Tabla 5, Figuras 5b y 6c-6f). Así mismo, el número de OTUs fúngicos compartidos entre las 4 temperaturas es menor que los procariotas, ya que de los 256 OTUs compartidos únicamente 26 son hongos (Figura 7b). Lo anterior demuestra la dominancia de las poblaciones procariotas en los suelos de Pueblo Viejo.



**Figura 6** Índices de diversidad alpha de las comunidades microbianas de Pueblo Viejo. Los recuadros a, b y c muestran los índices de bacterias y arqueas mientras que las tres últimas (d, e y f) los índices de las comunidades fúngicas.

**Tabla 5 Índices de diversidad alpha de las comunidades microbianas de Pueblo Viejo.**

<b>Comunidad</b>	<b>Índice</b>	<b>27 °C</b>	<b>42 °C</b>	<b>50 °C</b>	<b>54 °C</b>
	Riqueza	495	468	403	357
<b>Procariota</b>	Simpson	0.982	0.980	0.954	0.943
	Pielou	0.773	0.764	0.663	0.632
	Riqueza	114	83	51	42
<b>Fúngica</b>	Simpson	0.915	0.706	0.555	0.474
	Pielou	0.703	0.358	0.333	0.305



**Figura 7 Índices de diversidad beta de las comunidades microbianas de Pueblo Viejo.** La sección **a** muestra los índices de Bray- Curtis mientras la parte **b** muestra un diagrama de Venn con los OTUs compartidos y únicos entre los suelos con distintas temperaturas.

#### **7.4 Correlación entre los taxa microbianos y variables ambientales**

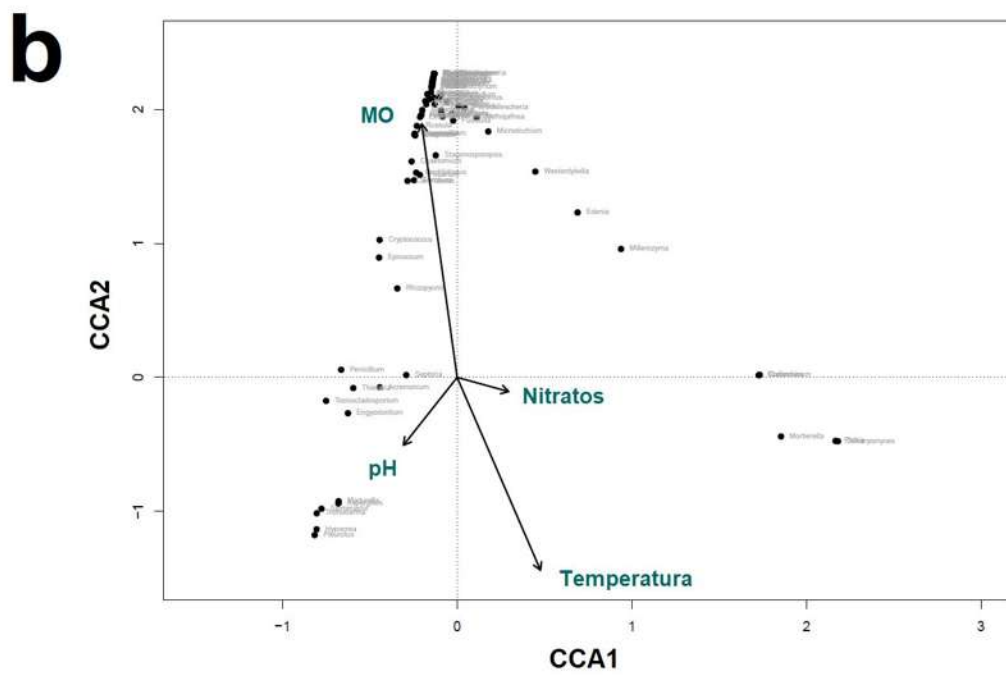
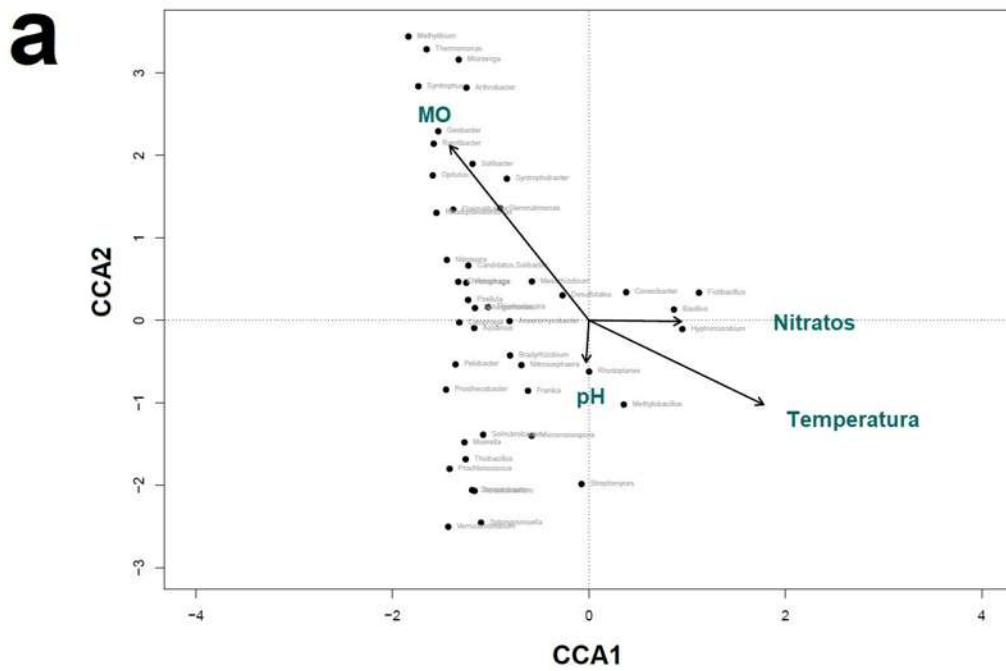
El análisis de correspondencia canónico (CCA) se llevó a cabo con la finalidad de establecer una correlación entre las variables ambientales y las abundancias de algunos taxa procariotas y fúngicos.

Para dicho análisis la textura del suelo no fue considerada, pues a pesar de variaciones en el contenido de arena, limo y arcillas de las muestras analizadas, los porcentajes de estos componentes establecen a estos suelos como franco-arcillosos.

Así mismo, a través del análisis de las variables físico- químicas los fosfatos mostraron ser redundantes con la materia orgánica por lo cual estos nutrientes no fueron mostrados en el CCA.

Es de este modo que el CCA demostró que en el caso de las bacterias y arqueas el 83.4 % de las variaciones de las abundancias se explican en el CCA1, mientras que el CCA2 el 9.9 % de las variaciones (Figura 8a)

Para el caso de los hongos, el 37.74% de las variaciones de las abundancias son explicadas en el CCA1, mientras que el 32.99 % en el CCA2 (Figura 8b).



**Figura 8** Análisis de CCA entre los géneros más abundantes y variables físico-químicas. El panel a muestra el CCA de procariontas mientras que el b muestra el CCA de hongos.

## 7.5 Abundancia de las comunidades procariotas a través de las temperaturas

Al analizar los cambios en las abundancias de algunos de los géneros procariotas en las distintas temperaturas, se registraron distintos grupos a través de un mapa de calor (Figura 9).

Entre todos los grupos destacó el género *Bacillus* por las siguientes características: fue el taxon predominante en las 4 temperaturas e incrementó sus abundancias en todos los rangos térmicos. Este género fue representado con el 11.12 % en 27°C, 13.38 % en 42°C, 53.60% en 50 °C, y el 61.18% en 54 °C.

Así mismo el género *Hyphomicrobium*, fue una de las Proteobacterias con mayor abundancia en 54°C representada con el 11.98 % (Figura 9).

De las Actinobacterias, el género *Arthrobacter*, representa el 1.42% de las abundancias en 27 °C y se identificaron OTUs como *Arthrobacter sp.*, *A. ramosus*, *A. humicola*. En el grupo de las Proteobacterias los géneros *Sphingomonas* y *Steroidobacter*, representan el 5.32% y el 2.65% respectivamente de las abundancias relativas en 27 °C; los OTUs identificados para este grupo son *Sphingomonas sp.*, *S. echinoides*, y *Steroidobacter sp.* los cuales mantuvieron abundancias similares entre 27 y 42 °C, y disminuyeron en 50 y 54 °C (Figura 9).

Otro grupo de bacterias con mayores abundancias en 27 °C, fueron los géneros pertenecientes al taxon *Flavisolibacter*, OTU del phylum Bacteroidetes compartido hasta los 50 °C, *Defluviicoccus*, Proteobacteria compartida hasta 42 °C, así como *Rubrobacter*, género del grupo Actinobacteria compartido hasta los 54 °C, con decremento de abundancias (Figura 9)

Así mismo, otros géneros reportados como mesófilos fueron encontrados con mayor abundancia en temperaturas fuera de este rango, entre ellos la Proteobacteria *Methylobacillus*, que registró mayor abundancia en 50 °C, de la misma forma que el género *Nitrospira* del phylum Nitrospirae, y *Nitrososphaera*, siendo este último perteneciente al phylum Thaumarchaeota con *N. gargensis* identificado dentro de los OTUs de este género (Figura 9).

Por otra parte, otros géneros tal como *Anaeromyxobacter*, *Preteobacetrria* con OTUs identificados como *Anaeromyxobacter dehalogenans* y *Anaeromyxobacter* sp. mantuvieron sus abundancias similares a lo largo de las distintas temperaturas (Figura 9).

## **7.6 Abundancia de las comunidades fúngicas a través de las temperaturas**

Al igual que los grupos procariontes, algunos géneros fúngicos y sus cambios a través de las temperaturas fueron establecidos en un mapa de calor (Figura 9).

Distintos grupos de hongos dominaron de manera diferencial a través de las temperaturas, entre ellos se destacó la abundancia del género *Fusarium* en el suelo control con el 34.93% de las abundancias relativas (Figura 10), mientras que a 42 °C el género *Aspergillus* con el 91.76 % de las abundancias (Figura 10).

*Claroideoglossum* taxon del grupo Mucoromycota fue otro de los géneros de mayor abundancia en 27 °C representado con 10.03 % de las abundancias y con *Claroideoglossum claroideum* como el filotipo identificado (Figura 10). Seguido de *Claroideoglossum*, *Chlorophyllum* género del Phylum Basidiomycota, fue el grupo representado con el 6.33 % de las abundancias relativas en 27 °C, entre los filotipos encontrados se registró la especie *Chlorophyllum molybdites* (Figura 10).

Por otra parte, entre otros grupos de menor abundancia que los previamente mencionados en 27 °C, pero de igual forma claramente presentes en esta temperatura, se encuentran *Rhizophyllum*, y *Lobulomycetes*. taxa del grupo *Chytridiomycota*.

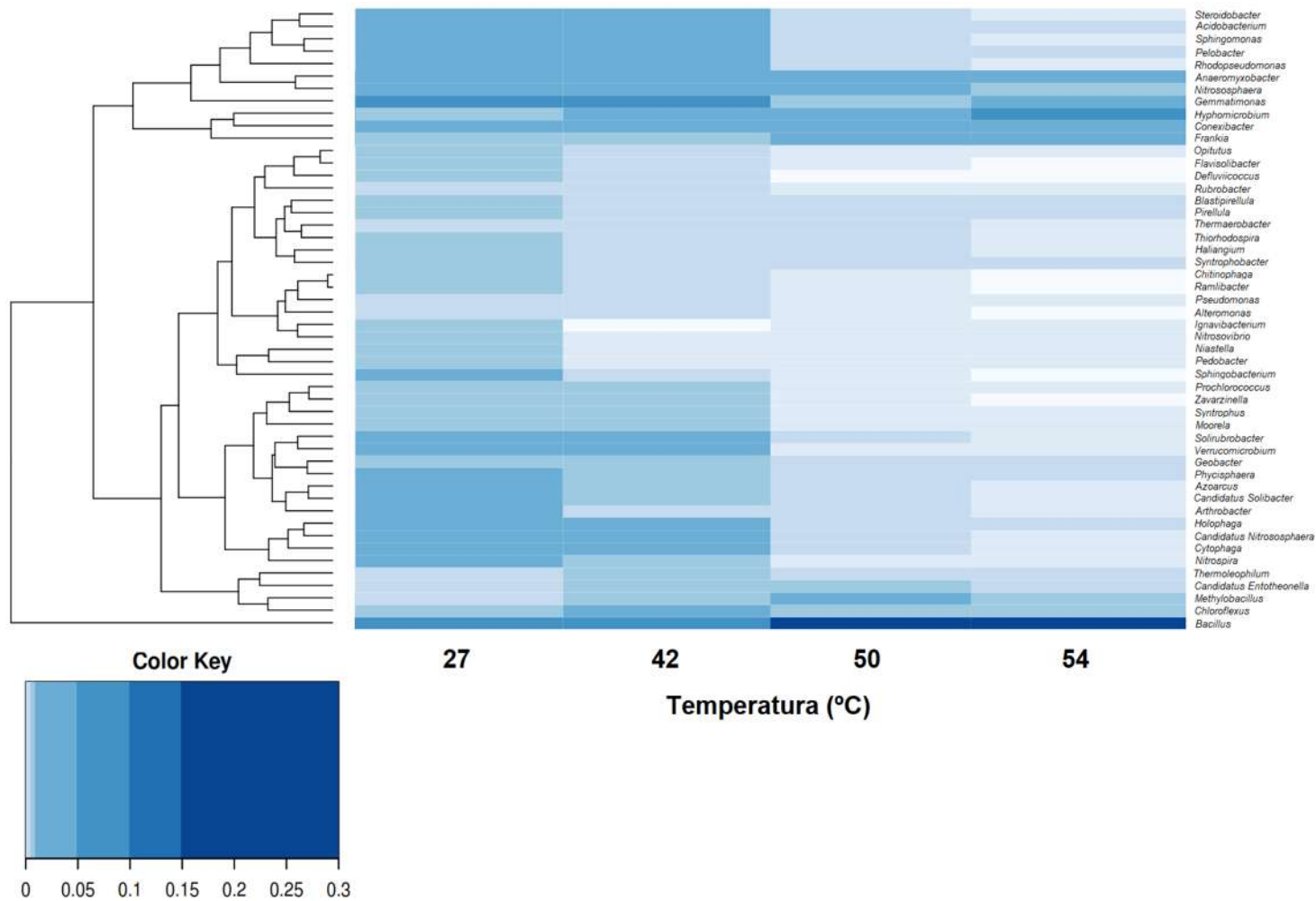
Los organismos del grupo *Chytridiomycota*, tales como *Rhizophydium* y *Lobulomyces* presentes en el suelo con 27 °C, con el 1.53 y el 2.30 % de las abundancias, respectivamente, disminuyeron sus abundancias en los suelos con temperaturas superiores.

De igual manera el género *Chaetomium*, Ascomycota representado con el 1.12% de las abundancias relativas en 27 °C se registró con menor abundancia en 42 °C con el filotipo *Chaetomium* sp.

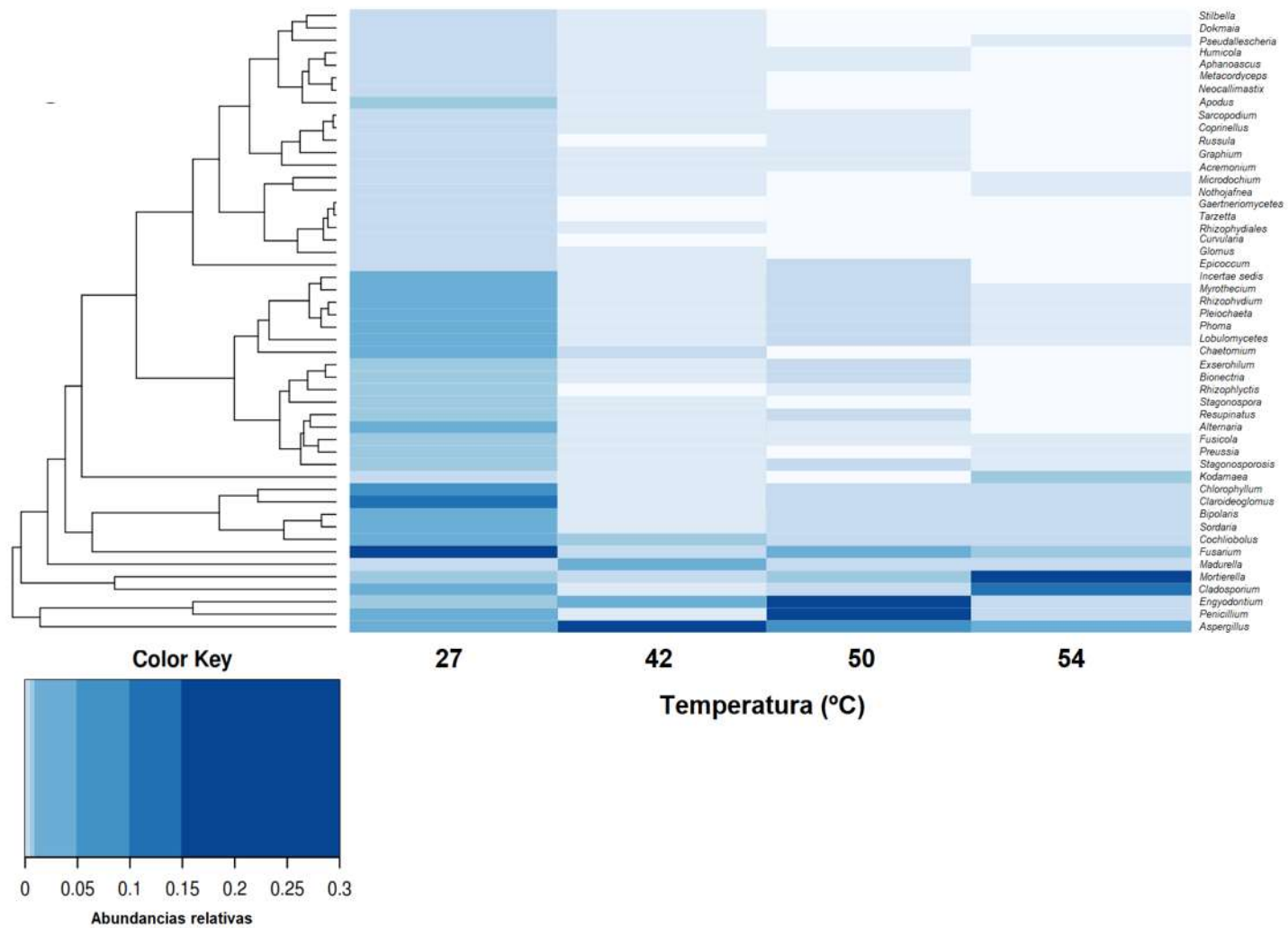
Por otro lado, algunos de los OTUs identificados dentro del género *Aspergillus* y con incremento de abundancia a 42°C se encuentran los organismos: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tamaritii* y *Aspergillus fumigatus*, mismos que disminuyen su abundancia en 50 y 54°C (Figura 10).

En el caso de las muestras identificadas en 50 °C, el género *Penicillium* tiene un incremento de abundancia con el 26.33 % de las abundancias relativas (Figura 10), con filotipos identificados como *Penicillium crustosum*, de igual manera que el género *Engyodontium* con el 61.30 % de las abundancias relativas en esta temperatura (Figura 10).

En temperatura de 54 °C domina el género *Mortierella*, identificándose filotipos como *Mortierella alpina* y *Mortierella* sp. miembros pertenecientes al Phylum Mucoromycota, así como el género *Cladosporium* con el 14.36 % de las abundancias relativas y el filotipo *Cladosporium colombiae* (Figura 10).



**Figura 9** Mapa de calor de géneros procariotas de mayor abundancia en Pueblo Viejo. El mapa muestra algunos géneros procariotas encontrados en las muestras de suelo de Pueblo Viejo y sus abundancias en las distintas temperaturas



**Figura 10** Mapa de calor de géneros fúngicos de mayor abundancia en Pueblo Viejo. El mapa muestra algunos géneros fúngicos encontrados en las muestras de suelo de Pueblo Viejo y sus abundancias en las distintas temperaturas

## 7.7 Determinación de termotolerancia de aislados bacterianos

En este trabajo fueron obtenidos 308 aislados bacterianos, de los cuales 157 fueron obtenidos del suelo control y 151 del suelo afectado por los incendios. Todos los aislados mostraron crecimiento a 30 °C (Figura 11).

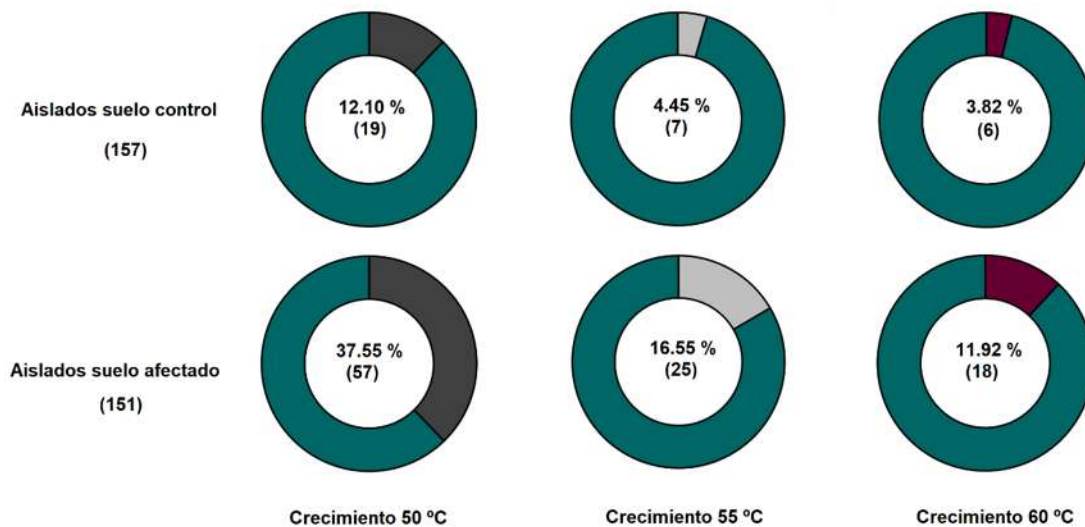
Al realizar los ensayos de termotolerancia todos los aislados fueron resembrados de 30 °C a 50, 55 y 60°C con la finalidad de evitar un tratamiento pre - condicional con incremento de termotolerancia.

De acuerdo a la temperatura registrada en el suelo control (27°C) era esperado el aislamiento de organismos mesófilos, no obstante, también fue posible obtener aislados capaces de crecer fuera de este rango de temperatura a través del suelo control (Figura 11).

Los aislados del suelo control mostraron porcentajes de crecimiento del 12.10 % (19 aislados), 4.45 % (7 aislados) y el 3.82 % (6 aislados) en 50, 55 y 60 °C, respectivamente (Figura10), mientras que los aislados del suelo afectado por los incendios mostraron porcentajes de crecimiento del 37.55 % (57 aislados), 16.55 % (25 aislados) y el 11.92 % (18 aislados) en 50, 55 y 60 °C, respectivamente (Figura10).

Además, al realizar un análisis de proporciones, seguido de una prueba de  $\chi^2$  con una alpha de 0.005, se estableció que existen diferencias significativas entre los porcentajes de aislados termotolerantes del suelo control y del suelo afectado (Figura 11).

Por otra parte, a través del proceso de aislamiento también fue posible obtener aislados fúngicos, no obstante, no fueron considerados para los ensayos de termotolerancia.



**Figura 11 Aislados bacterianos de Pueblo Viejo y su termotolerancia.** La figura muestra anillos con los porcentajes de aislados capaces de crecer en las distintas temperaturas representados por diferentes colores, las porciones en gris oscuro representan los porcentajes de aislados capaces de crecer en 50 °C, en gris claro, en 55 °C y guinda los porcentajes en 60°C.

## 7.8 Identificación de aislados bacterianos termotolerantes

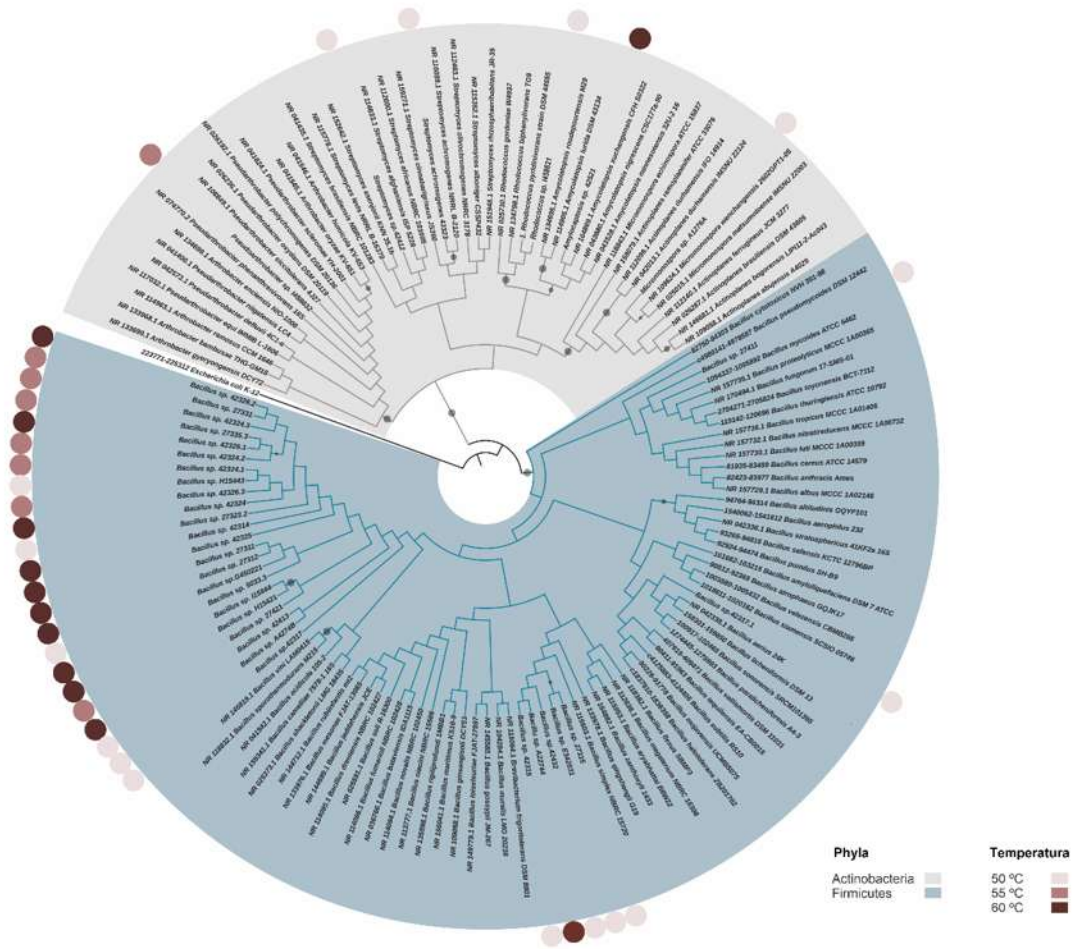
La identificación de los aislados a través del gen ribosomal 16S y la amplificación parcial de este resultó en la identificación de miembros pertenecientes a dos clados bacterianos que incrementaron sus abundancias en los suelos afectados por los incendios: Actinobacterias y Firmicutes (Figuras 5a y 10)

Dentro del grupo Firmicutes fueron identificados miembros pertenecientes al género *Bacillus*, en específico grupos dentro de los linajes de *B. pumilus*, *B. subtilis* y *B. cereus*, entre otros capaces de crecer hasta 60 °C (Figura 12).

Si bien la amplificación y secuenciación de los genes ribosomales es una metodología usada de manera rutinaria en la determinación taxonómica y filogenética bacteriana (Kim & Chun, 2014) su uso carece de resolución en linajes estrechamente relacionados, tal como los mencionados con anterioridad. Es de este modo que al tratarse de miembros pertenecientes a estos grupos se han utilizado diferentes genes marcadores para distinguir entre especies de estos linajes (Wang et al., 2007; Guo et al., 2012; Liu et al., 2013; Yu et al., 2017), así mismo se ha acudido al uso de índices generales relacionados al genoma (OGRIs) para concretar una identidad taxonómica (Flores et al., 2020).

Es en este sentido que, al encontrarse aislados identificados como miembros de los linajes de *B. pumilus*, *B. subtilis* y *B. cereus*, entre otros, y a que las amplificaciones parciales pueden sesgar su filogenia, se decidió asignarlos únicamente como integrantes del género *Bacillus* (Figura 12).

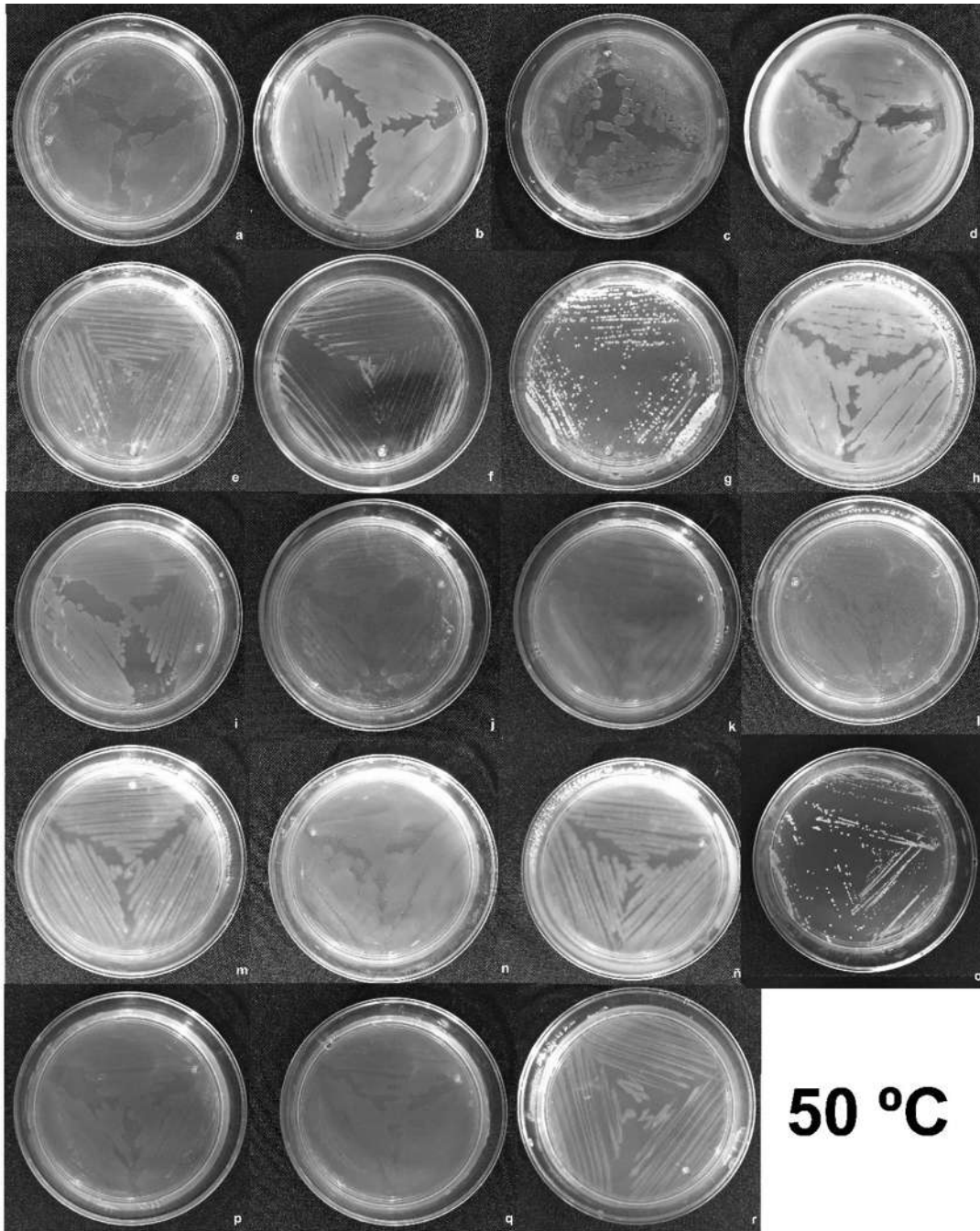
Por otro lado, entre los miembros pertenecientes al Phylum Actinobacteria fueron identificadas cepas de los géneros *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Pseudarthrobacter*, géneros que han sido reportados como mesófilos de acuerdo con la base de datos BacDive (Reimer et al., 2019). No obstante, en este trabajo se registra su crecimiento hasta 60 °C (Figura 12) con cambios fenotipos a través de las temperaturas (Figuras 13-15).



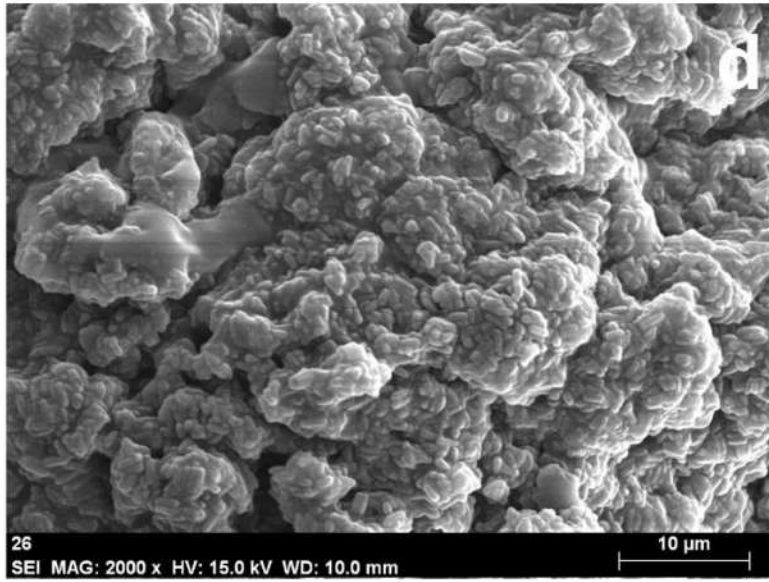
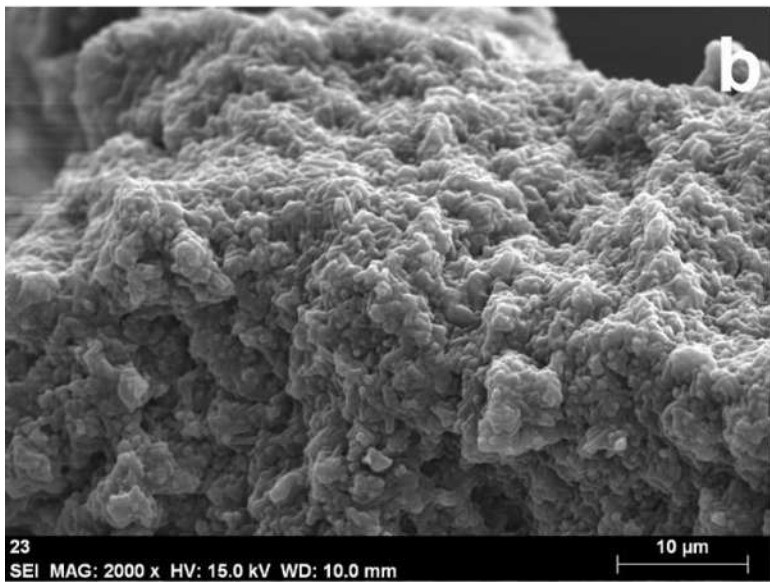
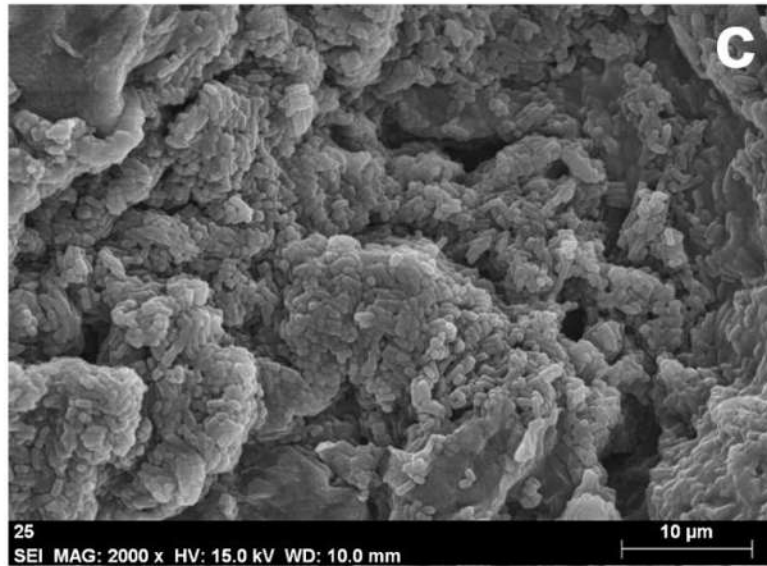
**Figura 12** **Árbol filogenético de algunos aislados termotolerantes de Pueblo Viejo.** La figura muestra el árbol filogenético obtenido a través del gen ribosomal 16S de algunos aislados de Pueblo Viejo, el filograma está dividido en dos grupos principales: Actinobacterias (gris) y Firmicutes (Azul). Los aislados identificados son destacados con marcas guindas atendiendo a su termotolerancia, guinda oscuro (crecimiento a 60 °C), guinda intermedio (crecimiento a 55 °C), y guinda claro (crecimiento a 50 °C). El árbol fue obtenido en el programa MEGA 7 a través de un análisis de 1000 bootstrap y el método de *máximum likelihood*. La figura muestra únicamente en círculos grises porcentajes iguales o mayores al 90% de los Bootstrap.



**Figura 13 Algunos aislados termotolerantes de Pueblo Viejo y su crecimiento a 30 °C.** Las primeras 5 fotografías (a, b c, d y e) muestran algunos aislados del suelo control, mientras las cajas restantes (f, g, h, i, j, k, l, m, n, ñ, o, p, q, y r) muestran algunos aislados del suelo afectado.



**Figura 14 Algunos aislados termotolerantes de Pueblo Viejo y su crecimiento a 50 °C.** En las fotografías es posible apreciar el crecimiento de los mismos aislados mostrados en la figura 13 con el mismo orden (a-e aislados suelo control, f-r aislados del suelo afectado) pero con cambios en su morfología a 50 °C.



**Figura 15 Imagen compuesta de *Bacillus* termolerantes de Pueblo Viejo.** En las fotografías **a** y **b** es posible apreciar la morfología de un aislado del suelo control identificado como *Bacillus* sp. 27323.2 cultivado a 30 y 50 °C, respectivamente, mientras que en las figuras **c** y **d** se aprecia la morfología de un aislado del suelo afectado identificado como *Bacillus* sp. 42334.2. Nótese que en los paneles **c** y **d**, las células bacterianas cultivadas a 50 °C están inmersas en un posible revestimiento de exopolisacáridos, cobertura no apreciable en las bacterias cultivadas a 30 °C.

## **8 Discusión**

### **8.1 La temperatura afecta de manera positiva y negativa algunas propiedades físico- químicas del suelo**

En este trabajo el porcentaje de arcillas, así como el alto contenido de materia orgánica son similares a suelos de humedales (Wei et al., 2020) y suelos generados a través de procesos de sedimentación (Munroe, 2012), datos que pueden ser relacionados con origen del suelo de Pueblo Viejo.

Por otro lado, de acuerdo con Alcañiz et al. (2018) los suelos afectados por incendios suelen cambiar sus propiedades fisicoquímicas, el pH de los suelos expuestos a incendios tienden a cambiar su pH, disminuir el contenido de materia orgánica y fosfatos, así como cambiar su textura, si alcanza temperaturas arriba de 500 °C.

Al analizar la textura del suelo afectado por los incendios y compararla con el suelo control se encontró que los porcentajes de arena, limo y arcillas clasifican a ambos tipos de muestras edáficas como franco-arcillosas (Tabla 3), por lo cual se infiere que las temperaturas alcanzadas en los incendios no fueron suficientemente altas para cambiar la textura del suelo, pues el tipo de ignición en Pueblo Viejo fue del tipo “humeante”, es decir una combustión lenta dependiente de la cantidad de materia orgánica que pudo no haber excedido los 500 °C (Rein, 2013).

De manera contraria a la textura, otras propiedades del suelo mostraron ser afectadas de manera positiva y negativa ante el incremento de temperatura, es de esta forma que en las muestras afectadas por los incendios se detectó un incremento en el pH y nitratos, así como reducción en el contenido de materia orgánica y fosfatos respecto al suelo control (Tabla 3).

Como resultado del proceso de combustión lenta se infiere que el contenido de materia orgánica y fosfatos en Pueblo Viejo es reducido debido al proceso de volatilización a través de grietas y porosidades, así como la transformación en material pirogénico (González- Pérez, et al., 2004; Certini, 2005; Rein, 2013).

Por otro lado, a través del proceso de ignición son generados diversos compuestos de combustión y oxidación total y parcial, lo que permite un incremento en el pH al incorporarse diversos cationes (Certini, 2005; Thomaz et al., 2014; Wohlgemuth et al., 2018), es así que se aprecian valores de pH más alcalinos en las muestras afectadas por los incendios en Pueblo Viejo.

Así mismo, el alto contenido de nitratos encontrado en los suelos analizados (Tabla 3) también se ha encontrado en pastizales con actividad de procariotas oxidantes de amonio (Clark et al., 2020). Interesantemente, las concentraciones de nitratos en el suelo afectado por los incendios en Pueblo Viejo mostraron un incremento, comparados con la muestra control (Tabla 3), este aumento de nutrientes se ha documentado en otros suelos afectados por incendios (Kucuk & Kahveci, 2020; Prendergast-Miller et al., 2020). Betts & Jones (2009) así como Prendergast-Miller et al. (2020). sugieren que el incremento de nitratos en suelos que han sido expuestos a un proceso de combustión es debido a la baja competencia de amonio entre microorganismos y vegetación lográndose de esta forma aumento en la tasa de nitrificación.

Recientemente Yu et al. (2020), a través de la evaluación de expresión del gen *amoA* en ensayos de mesocosmos adicionados con material pirogénico de origen vegetal, lograron documentar incremento de nitratos y actividad del gen *amoA* de procariotas. Debido a lo anterior, se sugiere que el incremento de nitratos en el suelo afectado por incendios es debido al incremento en la tasa de nitrificación, así como a la disminución de cobertura vegetal, ya que a una menor cobertura vegetal existe mayor disponibilidad de estos nutrientes.

Si bien el incremento de las temperaturas actuó de dos formas en los valores físico-químicos del suelo (Tabla 1) es necesario establecer más ensayos para evaluar de manera detallada los cambios en el ciclo de nutrientes de los suelos afectados por la combustión en Pueblo Viejo.

## **8.2 Los organismos procariotas dominan las comunidades microbianas de Pueblo Viejo**

De manera general se encontró que los taxa procariotas dominan las comunidades microbianas de Pueblo Viejo pues estos grupos fueron los más diversos en las muestras analizadas (Tabla 5).

Los taxa bacterianos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria y Gemmatimonadetes de mayor abundancia en 27 y 42 °C han sido reportados como los más abundantes en suelos por Laubert et al. (2009) así como por Maron et al. (2018).

Además, los mismos phyla dominantes en 27 °C son encontrados en 42 °C, con abundancias relativas muy similares (Figura 5a) y disminución de algunas abundancias. Tal como el grupo Proteobacteria, taxon que disminuyó su abundancia relativa en 42 °C (Figura 5a). De acuerdo con Guo et al. (2020) el phylum Proteobacteria puede llegar a ser el grupo dominante en ambientes con temperaturas de hasta 45 °C, y en suelos afectados por incendios con severidad baja (De Miera et al., 2020), es de esta manera que en este trabajo se establece la dominancia de este phylum bacteriano hasta 42°C.

Así mismo, entre las diferencias en abundancias más destacables de 27 y 42 °C se pueden señalar a los phyla Actinobacteria y Gemmatimonadetes, taxa que incrementaron sus abundancias en 42 °C (Figura 5a). Este incremento de abundancias ya ha sido registrado en suelos expuestos a incendios (Prendergast-Miller et al., 2017), y ha sido atribuido a un rol potencial de miembros de estos grupos en la degradación de compuestos pirogénicos, pues incrementan su abundancia en presencia de estos componentes (Khodadad et al., 2011).

En contraste, el suelo con 50 y 54 °C es dominado por organismos del phylum Firmicutes pues a estas temperaturas representa el 51.36 y 56.04 % de las abundancias relativas (Figura 5a).

De acuerdo con De Miera et al. (2020) el phylum Firmicutes es reportado como el taxon de mayor abundancia en suelos afectados por incendios de mayor severidad y su dominancia es atribuida a su capacidad de termorresistencia a través de la formación de endosporas.

Por otro lado, las comunidades fúngicas encontradas en los suelos analizados fueron representadas por cinco phyla, Ascomycota, Mucoromycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Olpidiomycota (Figura 5b). Estos phyla ya han sido reportados como parte del microbioma del suelo (Tedersoo et al., 2014).

El phylum Ascomycota ha sido definido como uno de los grupos de mayor abundancia y riqueza en suelos (Egidi et al., 2019), así mismo, ha sido reportado como el phylum de mayor abundancia en suelos con alto contenido de materia orgánica, tales como turberas (Liu et al., 2020), y como el de mayor abundancia en suelos afectados por incendios (Huffman & Madritch, 2018). Los resultados del presente trabajo demuestran que este phylum es dominante en el suelo control, así como en temperaturas de 42 y 50 °C (Figura 5b).

Adicionalmente, el phylum Ascomycota ha sido reportado como dominante en sistemas de composta a través de sus distintas etapas de maduración, entre miembros de este grupo se han detectado *Aspergillus fumigatus*, así como diversas especies del género *Penicillium* y su capacidad de degradar complejos compuestos tales como la lignocelulosa (López-González et al., 2015; Tian et al., 2017), géneros con OTUs encontradas el presente trabajo (Figura 10).

Por otro lado, en este trabajo se encontró una reducción del phylum Basidiomycota en los suelos afectados por los incendios (Figura 5b). Este grupo se ha establecido como uno de los grupos más sensibles en incendios (Holden et al., 2016), además,

estos organismos son reconocidos por la degradación de compuestos orgánicos complejos recalcitrantes tales como la madera (Couturier et al., 2018). Adicionalmente, se ha correlacionado de manera negativa la abundancia de este grupo en estados de maduración y etapas termófilas en sistemas de composta (Tian et al., 2017), por lo cual se propone que la disminución de este grupo en las distintas temperaturas en el suelo afectado es debido a su sensibilidad.

Por otro parte, e interesantemente, el phylum Mucoromycota fue el dominante en el suelo con temperatura de 54°C (Figura 5b). De acuerdo con Bonfante & Venice (2020) este phylum cuenta con miembros asociados a plantas como patógeno, simbiote o endófito, además, es hospedero de bacterias y posee miembros patógenos oportunistas, así como un amplio repertorio metabólico en la degradación de diversos compuestos.

Por su parte, Melida et al., (2015), al realizar una comparación de paredes celulares entre miembros del grupo Ascomycota y Mucoromycota, encontraron que este último poseía un mayor contenido de quitina y complejos hetero-poliméricos compuestos de fucosa y N-acetilglucosamina.

De acuerdo con Di Piazza et al. (2020), los cambios en la estructura de las comunidades microbianas en sistemas de compostas pueden ser directamente atribuidas a las temperaturas alcanzadas, ya que a través de las distintas etapas de maduración se pueden encontrar organismos predominantes, así como transitorios, cuyo crecimiento y proliferación es promovido por su termotolerancia. Es de este modo que en este trabajo se postula que la dominancia en 54 °C por el phylum Mucoromycota es transitorio debido a una mayor termoestabilidad en su pared celular favorecida por una mayor termoestabilidad en su pared celular y su amplio repertorio metabólico, el cual podría permitirle ser dominante en suelos con bajo contenido de materia orgánica tal como es el caso de los suelos de Pueblo Viejo (Tabla 3).

### **8.3 Los organismos procariotas poseen una mayor termotolerancia que los hongos**

El efecto directo e inmediato de los incendios sobre las comunidades microbianas es determinado por las temperaturas alcanzadas las cuales puede llegar a alterar la estructura de la comunidad a través de la supervivencia diferencial de microorganismos sensibles y microorganismos resistentes (Adkins et al., 2020; Certini et al., 2021) cuyo crecimiento y proliferación es promovido por su termotolerancia (Di Piazza et al., 2020).

En este trabajo, a través de los índices de diversidad alpha (riqueza, Simpson y Pielou) y beta (Bray-Curtis) se exhibe que las bacterias y arqueas son los organismos dominantes en los suelos de Pueblo Viejo en las distintas temperaturas (Figuras 6 y 7; Tablas 4 y 5), pero especialmente a 54°C.

Lo anterior demuestra que las comunidades procariotas poseen mayor termotolerancia que los hongos, o, dicho de otra manera, las poblaciones fúngicas son más sensibles a cambios de temperaturas tal como es demostrado en el trabajo de Pérez -Valera et al. (2018).

### **8.4 Los incendios afectan de manera indirecta a las comunidades microbianas de Pueblo Viejo**

Además de los efectos directos sobre los microorganismos, debido a la temperatura, los incendios también llegan modificar la estructura de las comunidades de manera indirecta, pues se generan cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo (Figura 16) (Certini et al., 2005; Certini et al., 2021).

Si bien el pH ha sido aceptado como uno de los mayores predictores de diversidad microbiana tanto a escala continental (Lauber et al., 2009) como a escala global (Delgado-Baquerizo et al., 2019) este no lo hace a escala local pues los valores tienden a ser muy similares (Fierer et al., 2017).

Es de este modo que diversos autores demuestran el efecto de diversas variables sobre las comunidades microbianas a escala local, tales como como Tian et al. (2017) quienes demostraron que variables como contenido de carbono y nitrógeno, así como la temperatura son los mejores predictores de la diversidad a escala local.

Así mismo, Guo et al. (2020) evidenciaron que la temperatura puede ser uno de los mejores parámetros al estudiar las comunidades bacterianas asociadas a manantiales termales a lo largo del sudeste de China, en lugar de otros parámetros tales como localizaciones geográficas pues lograron determinar grupos bacterianos asociados a bajas temperaturas (45 °C), temperaturas moderadas (55–70 °C) y altas temperaturas (70 °C).

De igual manera, Zhou et al. (2016) demuestran que la temperatura es una de las mayores variables que explican la estructura y diversidad microbiana, pues tiene una mayor correlación con la diversidad microbiana, inclusive mayor que el pH, los autores determinaron una correlación del 67.4% para bacterias y 28.4% para hongos, no obstante, en el trabajo realizado por los autores no se registraron temperaturas mayores a 26.85°C.

En este trabajo los análisis de CCA demostraron que la mayoría de las procariotas, así como hongos de mayor abundancia en las diferentes temperaturas se correlacionan de manera positiva con la materia orgánica y de manera negativa con la temperatura, pues solamente algunos miembros de los phyla Firmicutes y Mucoromycota se relacionan de manera positiva con el incremento de la temperatura (Figuras 8a y 8b).

Además, al realizar otro análisis de correlación a través de un análisis de componentes principales entre variables fisicoquímicas en conjunto con la diversidad de procariotas y hongos (Anexo), se encontró que la diversidad es agrupada con el contenido de materia orgánica y fosfatos, mientras que la temperatura, los nitratos y el pH se agrupaban en otro cluster, es de esta forma que se puede sostener que los incendios actuaron de manera directa e indirecta sobre

la diversidad microbiana, de primer instancia afectaron negativamente a la diversidad microbiana a través de las temperaturas alcanzadas, pero también a través de los cambios físico - químicos (indirectamente) (Figura 16).

### **8.5 El incremento de temperatura favoreció la abundancia de algunos géneros procariotas**

De acuerdo con Auld & Bradstock (1996) las temperaturas registradas en el suelo referido como afectado en Pueblo Viejo corresponden a temperaturas documentadas en suelos post - incendios con antigüedad de hasta 19 días en verano, además, se sabe que los incendios subterráneos están mejor aislados de las pérdidas de calor que los incendios superficiales (Rein, 2013), es de esta forma que se logran registrar temperaturas elevadas en los suelos afectados después del proceso de combustión, tal como se infiere con las temperaturas reportadas en el presente trabajo (Tabla 3, Figura 4)

En este trabajo se estudiaron los cambios en las comunidades procariotas y fúngicas del suelo afectado por incendios en Pueblo Viejo con temperaturas de 42, 50 y 54 °C y suelo sin afectar (27 °C).

A través de las distintas temperaturas diferentes grupos de abundancias fueron encontrados, pero únicamente el género *Bacillus* incremento su abundancia en conjunto con las temperaturas registradas (Figura 9).

La dominancia del género *Bacillus* ya ha sido reportada en suelos afectados por incendios (Smith et al., 2008; de Miera et al. 2020), además el género *Bacillus* ha sido documentado como uno de los géneros bacterianos de mayor diversidad y versatilidad (Saxena et al., 2020). Así mismo el incremento de su abundancia en suelos afectados por incendios puede ser atribuido a su capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) generados de la combustión, pues se ha documentado la degradación e incremento de la abundancia de cepas del género *Bacillus* en presencia de PAHs (Gupta et al., 2017; Galachyants et al., 2020), es de esta forma que se presume de su dominancia en el presente trabajo.

De manera similar al género *Bacillus*, el taxon *Hyphomicrobium*, con proteobacterias compartidas entre las cuatro temperaturas registradas mostro incremento de abundancia en 54 °C (Figura 9), este género ha sido reconocido por poseer especies activas en el proceso de desnitrificación (Martineau et al., 2015), por lo cual el incremento de su abundancia en temperaturas podría estar favorecido por los cambios en las propiedades del suelo tales como el incremento de nitratos en temperaturas mayores de 27 °C (Figura 8a, Tabla 3).

Por otro lado, entre los géneros que mantuvieron sus abundancias relativas por poco mutables entre las 27 y 42°C se destacan los géneros *Arthrobacter* *Sphingomonas* y *Steroidobacter*, mismos géneros que reducen sus abundancias en 50 y 54°C (Figura 9), además el incremento de abundancias de algunos de estos géneros también se ha reportado en suelos afectados por incendios (Whitman et al., 2019; De Miera et al., 2020).

Así mismo, pesar de que existen aislados identificados dentro del género *Arthrobacter* capaces de crecer hasta 50°C (Sezen et al., 2020) y 55 °C la base de datos de BacDive (Reimer et al., 2019) registra a cepas tipo de esta Actinobacteria como mesófilas, tal como las Proteobacterias *Sphingomonas* y *Steroidobacter*. En este trabajo se encontraron OTUs de estos géneros en temperaturas con 50 y 54 °C (Figura 9), si bien sus abundancias son menores que las encontradas en menores temperaturas otros trabajos demuestran que es posible encontrar a estos taxa bacterianos fuera de los limites mesófilos (Zhou et al., 2014; Jardine et al., 2017; Sezen et al., 2020).

Entre otro grupo de mayor cuyas abundancias fueron mayores en 27°C fue encontrado el género *Flavisolibacter*, *Defluviicoccus*, *Rubrobacter*, entre otros, con abundancias menores a mayores temperaturas (Figura 9).

Especies pertenecientes a este género han sido aisladas de suelo cuyos rangos de crecimiento optimo han sido reportado desde 10 hasta 37 °C (Yoon & Im, 2007; Lee et al., 2016). En los registros de OTUs compartidos se encontró que este género es

representado por *Flavisolibacter* sp. cuyas OTUs son compartidas en 27, 42 y 50 °C. Si bien, miembros de este grupo taxonómico han sido reportados con estilo de vida mesófilo su crecimiento fuera de este rango también podría estar favorecido por los cambios en las propiedades del suelo ocasionadas por los incendios, tales como el pH y materia orgánica, pues su crecimiento ha sido reportado en pH desde 6 hasta 8 (Maeng et al., 2021).

Así mismo *Defluviicoccus*, con OTUs identificados como *Defluviicoccus* sp. fueron compartidos hasta 42 °C (Figura 9), proteobacteria reportada como mesófila con crecimiento óptimo entre 25- 30 °C, y aislada de sistemas con alto contenido de materia orgánica (Maszenan et al., 2005), con reportes de abundancias similares en pH mayores de 7 (Ahn et al., 2009).

De manera similar el género *Rubrobacter* compartido entre las cuatro temperaturas mostro mayor abundancia en 27 °C (Figura 9). Actinobacterias pertenecientes a este grupo taxonómico han sido reportadas con crecimiento óptimo dentro y fuera del rango mesófilo (Jurado et al., 2012; Norman et al., 2017), tales como como *Rubrobacter spartanus*, bacteria capaz de crecer hasta 55 °C con la capacidad de degradar una gran variedad de fuentes de carbono, así como de crecer en pH desde 5 hasta 10 (Norman et al., 2017).

Es de esta forma que se sugiere que la disminución de abundancias de géneros como *Flavisolibacter*, *Defluviicoccus*, *Rubrobacter*, entre otros, en temperaturas mayores a 27 °C es promovida por los cambios en las propiedades del suelo, tales como la materia orgánica y el pH.

Por otra parte, géneros tales como *Methylobacillus*, registraron mayor abundancia en 50 °C (Figura 9), a pesar de que esta Proteobacteria se define como mesófila (BacDive), trabajos de mesocosmos revelan su capacidad de crecer a esta temperatura (Rai et al., 2020).

Así mismo, se encontraron géneros participantes en el proceso de nitrificación tales como *Nitrospira* y *Nitrososphaera* (Ushuki et al., 2017; Zhao et al., 2020), siendo este último encontrado con mayor abundancia en 50 °C (Figura 9). De acuerdo con Zhalnina et al. (2014) el crecimiento óptimo de *Nitrososphaera gargensis* es de 46°C, no obstante, se ha cultivado y mostrado crecimiento a 50°C. Es de esta forma que miembros identificados dentro de estos géneros, con OTUs tales como *N. gargensis* son encontrados en este trabajo.

Por otra parte, grupos como *Anaeromyxobacter* con OTUs sin determinación específica y *Anaeromyxobacter dehalogenans* mantuvieron su abundancia a lo largo de las distintas temperaturas reportadas en este trabajo (Figura 8a). De acuerdo a la base de datos BacDive (Reimer et al., 2019) esta proteobacteria es mesófila, no obstante, de acuerdo a los datos de abundancias encontradas a través de las temperaturas de Pueblo Viejo en podría plantear la idea de este género como una deltaproteobacteria termófila facultativa favorecida por los cambios en las propiedades físico- químicas de los suelos afectados (Figura 8a)

### **8.6 El incremento de temperatura favoreció la abundancia de algunos géneros fúngicos en distintas temperaturas**

Las abundancias de algunos géneros fúngicos fueron marcadas a través de las temperaturas, es de este modo que en 27 °C algunos de los géneros dominantes fueron *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, en orden descendente de abundancias (Figura 10), Ascomycetes ya reportados como miembros de mayor abundancia en suelos (Egidi et al., 2019).

Además de la dominancia del grupo Ascomycota en 27 °C, el Phylum Mucoromycota se representó en esta temperatura con el género *Claroideoglossum* y el filotipo *Claroideoglossum claroideum*. Esta especie ha sido establecida como un hongo micorrízico (Chiomento et al., 2019), debido a la carencia de vegetación en las muestras expuestas a los incendios se infiere su reducción en suelos de Pueblo Viejo.

Así mismo, con una menor abundancia en 27 °C, el Phylum Basidiomycota fue registrado en esta temperatura con el filotipo *Chlorophyllum molybdites* especie de igual manera reconocida como hongo micorrízico (Liu et al., 2018).

Por otra parte, entre otros grupos de menor abundancia que los previamente mencionados en 27 °C, pero de igual forma representados en esta temperatura se encuentran *Rhizophydium*, y *Lobulomyces*. taxa del grupo *Chytridiomycota*.

Miembros del Phylum *Chytridiomycota* son comunes en suelos con un alto contenido de humedad, así como estanques temporales donde actúan como saprótrofos de distintas fuentes de carbono (Davis et al., 2018), es así que se sugiere su registro en el suelo con 27 °C y mayor contenido de materia orgánica.

De manera similar al suelo control, el género de mayor abundancia del suelo con 42°C fue el género *Aspergillus* (Figura 10), de acuerdo con Mouchacca (2000) el género *Aspergillus* cuenta con miembros tales como *A. fumigatus*, capaces de crecer en un rango de temperaturas desde 12- 57°C han sido aislados y cultivados de suelos que pueden alcanzar los 50°C (Grishkan, 2018), no obstante, su crecimiento óptimo se encuentra entre 37 y 43°C por lo cual se sugiere que es el género dominante en el suelo con 42°C.

De igual manera el género *Chaetomium* con el filotipo *Chaetomium* sp, Ascomycota representado con el 1.12% de las abundancias relativas en 27 °C, se registró con menor abundancia en 42 °C (Figura 10). El filotipo *Chaetomium* sp. han sido aislado de rizósferas de distintas especies vegetales, así como saprófito de diversas fuentes (Ruppavalli, et al., 2019) es así que se sugiere su reducción en 42 °C.

Por otro lado, el género *Penicillium* tiene un incremento de abundancia en 50°C (Figura 10), con filotipos identificados como *Penicillium crustosum*. Figueredo et al. (2019) aislaron y cultivaron organismos del género *Penicillium* de suelos con temperaturas de 50 °C, además, el incremento de abundancia de este género de

igual forma ha sido reportado en suelos afectados por incendios (Whitman et al., 2019), es así que se infiere su mayor abundancia a esta temperatura.

Adicionalmente, y de acuerdo con Awasthi et al. (2017) los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* pueden ser considerados saprofitos universales pues son capaces de incrementar sus abundancias en diferentes compuestos orgánicos, incluidos aquellos derivados de la pirólisis, tal como puede ser el caso de los suelos afectados por los incendios en Pueblo Viejo.

Así mismo, entre los géneros con incremento de abundancias en 50 °C se destacó el grupo *Engyodontium* taxon del Phylum Ascomycota con el 61.30 % de las abundancias relativas en esta temperatura (Figura 10). Miembros de este género han sido aislados de suelos con pH alcalinos (Long et al., 2021) por lo cual se sugiere el incremento de abundancia en esta temperatura en la cual se registraron los valores de pH más altos (Tabla 3).

Por otro lado, en temperatura de 54 °C domina el género *Mortierella*, identificándose filotipos como *Mortierella alpina* y *Mortierella* sp, de acuerdo con Oliveira et al. (2015) el género *Mortierella* es capaz de crecer a temperaturas arriba de 50°C. El género *Mortierella* es común en suelos (Lima et al., 2020) además, posee una amplia capacidad metabólica (Al-Shammari et al., 2013), y se han registrado incrementos de su abundancia en presencia de quitina (De Tender et al., 2019), es de este modo que este género podría verse favorecido con restos celulares reminiscentes.

Interesantemente el Ascomiceto *Cladosporium* fue de igual manera registrado en 54 °C con el 14.36 % de las abundancias relativas con el filotipo *Cladosporium colombiae*. Especies de este género han sido aisladas de muestras de suelo (Ma et al., 2017), así mismo se han reportado como degradadoras de compuestos tan complejos como el pireno (Potin et al., 2004), por lo cual no se descarta esta posible actividad en los suelos afectados por los incendios en Pueblo Viejo.

## **8.7 Los aislados del suelo afectado demostraron mayor termotolerancia**

Bausum & Matney (1965) trabajando con el termófilo facultativo *B. licheniformis* encontraron que muchas bacterias crecidas a 37° C rápidamente mueren al ser transferidas a cultivos de 55 °C, no obstante, cuando las bacterias son pre - incubadas a 49° y después transferidas a 55° la muerte celular no ocurre.

Así mismo, Dowben y Weidenmuler (1968) mediante el incremento gradual de temperatura y periodos de incubación lograron que bacterias mesófilas fueran capaces de crecer hasta 72° C. Es de esta forma que los autores de los 60s concluyen que la termotolerancia puede ser generada a través de tratamientos de pre - incubación.

En este trabajo a manera de evitar promover la termotolerancia los aislados bacterianos obtenidos fueron transferidos de 30 °C a 50, 55 y 60 °C sin ningún tratamiento de pre- incubación.

De manera general se detectó una mayor termotolerancia en los aislados obtenidos a través del suelo afectado que del suelo control (Figura 11). De acuerdo a la temperatura registrada en el suelo control (27°C) era esperado el aislamiento de organismos mesófilos, es decir, bacterias con temperatura de crecimiento entre 20 y 45°C, de acuerdo con Schiraldi & De Rosa (2014), al menos para los aislados del suelo control, no obstante, aislados del suelo con 27°C mostraron crecimiento a 50, 55 e inclusive 60 °C con diferencias significativas (Figura 11).

Si bien en el suelo control fueron encontrados aislados capaces de crecer fuera de su rango mesófilo (Figuras 11-15), podría establecerse que los suelos cuentan con poblaciones de organismos termófilos facultativos, conforme a la definición de Bausum & Matney (1965), pues son capaces de crecer en rangos de temperaturas tanto de mesófilos como de termófilos.

Además, probablemente la presencia de termófilos facultativos en el suelo forma parte del “microbioma banco” como taxa que bajo condiciones estresantes incrementan su abundancia y desempeñan roles claves en el restablecimiento de estabilidad (Shade et al., 2014; Lin et al., 2020), tal como pudo haber sido el caso de los aislados obtenidos de las muestras de suelo afectado por los incendios, pues mostraron mayores porcentajes de crecimiento en temperaturas mayores a 30 °C, con el 37.55 % (57 aislados), el 16.55 % (25 aislados) y el 11.92 % (18 aislados), a 50, 55 y 60 °C, respectivamente (Figura 11)

Además, al realizar un análisis de proporciones, seguido de una prueba de  $\chi^2$ , demostró que existen diferencias significativas entre los porcentajes de aislados termotolerantes (Figura 11). Es de este modo que puede establecerse que las bacterias encontradas en los suelos afectados por los incendios poseen mayor termotolerancia que las encontradas en el suelo control.

Por otra parte, a través del proceso de aislamiento también fue posible obtener aislados fúngicos, no obstante, no fueron considerados para los ensayos de termotolerancia por diversas razones estratégicas. La primera, es que las poblaciones bacterianas mostraron ser mayor parte de las comunidades microbianas en los suelos de pueblo viejo; la segunda, es debido a que las poblaciones bacterianas fueron los microorganismos que mostraron menor afectación ante los cambios de temperatura que los hongos; la tercera, debido a que la abundancia de algunos taxa bacterianos fue favorecida por la temperatura; y la cuarta y última, debido a que los hongos mostraron una menor tasa de crecimiento a comparación de las bacterias. Es de esta forma que los aislados fúngicos no fueron considerados en estos ensayos, no obstante, sin lugar a dudas la evaluación de la termotolerancia de estos microorganismos es actualmente valorada pues parecen ser una fuente potencial de diversas biomoléculas termoestables con aplicaciones industriales (Ja’afaru et al., 2020; Qin et al., 2020).

## 8.8 La termotolerancia fue encontrada principalmente en dos taxa bacterianos

Al analizar la identidad de algunos de los aislados que mostraron termotolerancia se encontró que estos pertenecen a dos taxa: Firmicutes y Actinobacteria (Figura 12), phyla que incrementaron sus abundancias en los suelos afectados por los incendios (Figura 5a).

Si bien el incremento de abundancia de los taxa Firmicutes y Actinobacterias en los suelos afectados por incendios ha sido atribuida a su capacidad de generar esporas (Prendergast-Miller et al., 2017; De Miera et al., 2020), miembros de estos phyla de igual forma han sido caracterizados como microorganismos con la capacidad de degradar compuestos aromáticos generados en el proceso de combustión (Whitman et al., 2019), es de esta forma que la identificación de aislados de estos grupos en suelos expuestos a incendios pudo haber sido favorecida (Figura 8a). Además, el Phylum Actinobacteria ha sido reconocido como un taxon con una amplia capacidad metabólica la cual les ha permitido colonizar ambientes extremos o más allá de los límites permisivos para la mayoría de los organismos (Lewin et al., 2016; Kurtböke, 2017), es de esta forma que miembros de este grupo tales como *Streptomyces* y *Arthrobacter* han sido encontrados en ambientes oligotróficos (Arocha-Garza et al., 2017), de igual manera que encontrados en los datos de metagenómicos del presente trabajo (Figura 9) así como en los aislados identificados (Figura 12).

Así mismo, de acuerdo con Battistuzzi & Hedges (2009) los Phyla Actinobacteria y Firmicutes son dos grupos de bacterias pertenecientes al clado Terrabacteria cuyas características les permitieron lograr la transición al ambiente terrestre con un alto repertorio de adaptaciones ambientales tales como la desecación, salinidad y radiación ultravioleta, por lo tanto, no es de extrañar que estos miembros sean capaces de adecuarse a elevadas temperaturas, o dominar suelos afectados por incendios, tal como ha sido reportados por Cobo-Díaz (2015) o De Miera et al. (2020), así como el presente trabajo (Figuras 5a y 11).

Los aislados identificados en este trabajo demuestran que los géneros *Streptomyces*, *Amycolaptosis*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Pseudarthrobacter* (Actinobacterias) son capaces de crecer hasta 60 °C, al igual que el género *Bacillus* (Firmicutes) con cambios fenotípicos a través de las temperaturas (Figuras 11 -15).

Diversos trabajos documentan el aislamiento de especies de estas Actinobacterias del suelo y su crecimiento mesófilo (Gupta et al., 2020; Ma et al., 2020; Nicault et al., 2020; Saygin et al., 2020; Teo et al., 2020), entre ellos destacan los que describen su potencial como nuevo reservorio de compuestos bioactivos con un amplio espectro de actividad (Hifnawy et al., 2020; Nicault et al. 2020), los que revelan su capacidad para degradar complejos hidrocarburos aromáticos policíclicos (Song et al., 2011; Peng et al., 2020) y exhiben ensayos donde se prueba su actividad como eficientes degradadores de complejos compuestos, tales como la quitina y aromáticos de alto peso molecular (Ma et al., 2020; Xu et al., 2020). Debido a lo anterior, las actinobacterias identificadas podrían ser favorecidas por los cambios en las propiedades físico - químicas de los suelos afectados por los incendios de Pueblo Viejo (Figura 16).

Por otro lado, entre los aislados Firmicutes fue posible identificar miembros pertenecientes a los grupos de *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. pumilus*, entre otros *Bacillus* (Figura 12), bacterias que al igual que los actinobacterias identificadas son de estilo de vida mesófilo con crecimiento óptimo a 30 °C.

Si bien se han catalogado a miembros de este género como mesófilos, diversos trabajos demuestran que especies de este género son capaces de crecer a 45 °C, tal como *B. altitudinis* (Shivaji et al., 2006), a 50 °C, tal como *B. atrophaeus* (Nakamura et al., 1989), a 55 °C, tal como *B. sonorensis* (Palmisano et al., 2001), a 65°C, tal como como *B. pumilus* (Baltaci et al., 2017), e inclusive hasta 70 °C, tal como *B. licheniformis* (Kumar et al., 2014) entre otros aislados obtenidos inclusive de suelos templados (Marchant et al., 2002).

De acuerdo con Hurtado-Bautista (2020), el género *Bacillus* presenta una plasticidad fenotípica la cual le ha permitido adecuarse a distintos rangos de temperatura es de este modo que inclusive en miembros de un mismo linaje pueden apreciarse diferencias en normas de reacción en las mismas temperaturas (Figura 12).

Además, a pesar de que la termofilia ha sido atribuida a este grupo como una característica de origen ancestral se ha encontrado que a través de la historia evolutiva la termofilia se ha perdido y obtenido, es de esta forma que diversas especies dentro de este género se diversifican a través de distintos rangos de temperaturas (Hobbs et al., 2020).

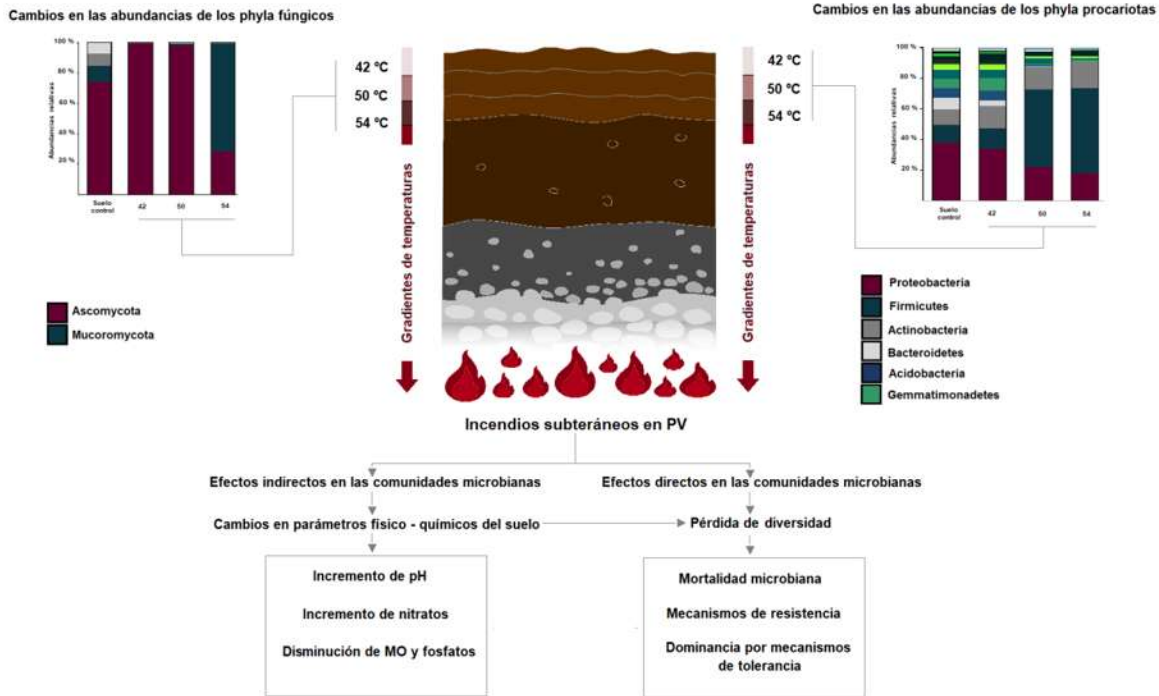
Indudablemente el phylum Actinobacteria es un taxon compuesto por especies con capacidades metabólicas extraordinarias, además, al igual que el phylum Firmicutes es capaz de generar endosporas como mecanismo de resistencia (Galperin et al., 2016. Van Bergeijk et al., 2020), estrategia que ha sido atribuida como táctica para superar incendios y dominar las comunidades de suelos afectados por estos (Smith et al., 2008; De Miera et al., 2020). En este trabajo se demuestra que el suelo alberga organismos termófilos facultativos que incrementaron su termotolerancia a través de los incendios subterráneos (Figura 11).

Finalmente, aunque en este trabajo no se exploraron a fondo los nichos térmicos que pueden llegar a colonizar estas bacterias o los mecanismos de termotolerancia, como la producción de exopolisacáridos (Donot et al., 2012), o la generación de pigmentos (Jagannadham et al., 2000), entre otros, fue posible apreciar diferencias fenotípicas en el crecimiento en distintas temperaturas (Figuras 12-15).

Sin lugar a dudas, la exploración de los mecanismos detrás de la termotolerancia exhibida por los aislados bacterianos obtenidos, proporcionará de manera puntual detalles sobre sus estrategias de adecuación a las temperaturas elevadas, así mismo, definirá su función en la estructura de las comunidades microbianas en suelos.

## 9 Resumen de resultados

- Los incendios subterráneos en Pueblo Viejo propiciaron cambios en las propiedades físico - químicas del suelo y afectaron a las poblaciones microbianas de manera directa e indirecta.
- Los procariotas dominan el suelo de Pueblo Viejo con 638 OTUs, mientras que los hongos son representados con 115 OTUs.
- Las phyla Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes son los phyla bacterianos de mayor abundancia.
- Los índices de diversidad disminuyen mientras incrementa la temperatura.
- La abundancia de algunos taxa procariotas, Actinobacteria y Firmicutes, se correlaciona de manera positiva con la temperatura.
- Las abundancias de la mayoría de las de las poblaciones fúngicas se correlaciona de manera negativa con la temperatura
- De los 753 OTUs determinados en el suelo de Pueblo Viejo se comparte un núcleo de 256.
- El género *Bacillus* incrementa su abundancia en conjunto con la temperatura.
- El género *Fusarium* es el género más abundante en suelos con 27° C mientras que el género *Aspergillus* en 42, *Penicillium* en 50 y *Mortierella* en 54°C.
- Los aislados del suelo afectado exhibieron mayor termotolerancia.
- La termotolerancia fue encontrada en dos taxa bacterianos los cuales incrementaron su abundancia en los suelos afectados por los incendios.



**Figura 16 Modelo de cambios en las comunidades microbianas de Pueblo Viejo en suelos afectados por incendios.** La figura muestra variaciones de temperaturas a través de un perfil de suelo afectado por los incendios, y los cambios en los phyla microbianos, destacando aquellos de mayor abundancia. De acuerdo con el esquema, la diversidad microbiana puede ser influenciada de manera directa e indirecta por los gradientes de temperatura. De manera directa, la diversidad microbiana se ve afectada debido a mortalidad. Así mismo, la diversidad puede ser influenciada de manera negativa, pues algunos microorganismos pueden escapar de las condiciones estresantes a través de estructuras de resistencia, mientras que otros son favorecidos debido a mecanismos de tolerancia, llegando a ser dominantes, tal puede ser el caso de miembros pertenecientes a los taxones Firmicutes y Actinobacterias. Por otro lado, la pérdida de diversidad también puede ser influenciada por los cambios en las propiedades físico - químicas del suelo, se sugiere que además de la pérdida de diversidad en las comunidades fúngicas, debido a una menor termotolerancia que los organismos procariontes, esta pudo haber sido igualmente influenciada por la disminución de MO llevando a algunos grupos de hongos a emplear otras fuentes de carbono tales como restos celulares, estrategia posiblemente empleada por taxa del phylum Mucoromycota en 54 °C.

## **10 Conclusión**

Los incendios subterráneos en suelos de Pueblo Viejo favorecen la adecuación de taxa microbianos termotolerantes.

## 11 Perspectivas

Con la finalidad de estudiar los mecanismos detrás de la plasticidad fenotípica y capacidad metabólica de los aislados termotolerantes, así como su papel modulando comunidades microbianas ante diversos tipos de estrés, se propone el siguiente proyecto y objetivos:

“Evaluación de las actividades metabólicas de aislados termotolerantes como modulares de comunidades microbianas ante diversos tipos de estrés”

- Explorar mecanismos de termotolerancia y termorresistencia de los aislados obtenidos de suelo de Pueblo Viejo.
- Analizar las capacidades metabólicas de los aislados termotolerantes expuestos a distintas temperaturas y sustratos pirogénicos.
- Examinar los mecanismos de los aislados termotolerantes como moduladores de comunidades microbianas expuestas a diversos tipos de estrés.

Así mismo, debido a las características de las Actinobacterias y Firmicutes que les permitieron colonizar el ambiente terrestre, y a la termotolerancia de los aislados obtenidos pertenecientes a esto phyla, se propone el siguiente trabajo y objetivos con la finalidad de explorar las capacidades de promoción del crecimiento vegetal:

“Análisis de aislados termotolerantes como bacterias promotoras del crecimiento vegetal ante diversos tipos de estrés ambiental”

- Determinar los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de los aislados termotolerantes.
- Evaluar los mecanismos de acción de los aislados termofílicos ante diversos tipos de estrés ambiental.
- Inocular plantas sometidas a diversos tipos de estrés con aislados termotolerantes y analizar sus capacidades como PGPB.

12 Referencias Adkins, J., Docherty, K. M., Gutknecht, J. L., & Miesel, J. R. (2020). How do soil microbial communities respond to fire in the intermediate term? Investigating direct and indirect effects associated with fire occurrence and burn severity. *Science of The Total Environment*, 745: 1-15.

Ahn, J., McIlroy, S., Schroeder, S., & Seviour, R. (2009). Biomass granulation in an aerobic: anaerobic-enhanced biological phosphorus removal process in a sequencing batch reactor with varying pH. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 885-893.

Al-Shammari, T. A., Bahkali, A. H., Elgorban, A. M., El-Kahky, M. T., & Al-Sum, B. A. (2013). The use of *Trichoderma longibrachiatum* and *Mortierella alpina* against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on tomato. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7: 199-207.

Arocha-Garza, H. F., Canales-Del Castillo, R., Eguiarte, L. E., Souza, V., & De la Torre-Zavala, S. (2017). High diversity and suggested endemism of culturable Actinobacteria in an extremely oligotrophic desert oasis. *PeerJ*, 5: 1-21.

Awasthi, M. K., Li, J., Kumar, S., Awasthi, S. K., Wang, Q., Chen, H., Zhang, Z. (2017). Effects of biochar amendment on bacterial and fungal diversity for co-composting of gelatin industry sludge mixed with organic fraction of municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 246: 214–223.

BacDive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis Reimer, L. C., Vetschinova, A., Sardà Carbasse, J., Söhngen, C., Gleim, D., Ebeling, C., Overmann, J. *Nucleic Acids Research*; database issue 2019.

Baltaci, M. O., Genc, B., Arslan, S., Adiguzel, G., & Adiguzel, A. (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary research on biotechnologically important enzyme production. *Geomicrobiology journal*, 34: 53-62.

Bardgett, R. D., & Van Der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 515: 505-511.

Bates, S. T., Clemente, J. C., Flores, G. E., Walters, W. A., Parfrey, L. W., Knight, R., & Fierer, N. (2013). Global biogeography of highly diverse protistan communities in soil. *The ISME journal*, 7: 652-659.

Battistuzzi, F. U., & Hedges, S. B. (2009). A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. *Molecular biology and evolution*, 26:335-343.

Bausum, H. T., & Matney, T. S. (1965). Boundary between bacterial mesophilism and thermophilism. *Journal of bacteriology*, 90: 50-53.

Betts, E. F., & Jones Jr, J. B. (2009). Impact of wildfire on stream nutrient chemistry and ecosystem metabolism in boreal forest catchments of interior Alaska. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 41: 407-417.

Bodí, M. B., Martin, D. A., Balfour, V. N., Santín, C., Doerr, S. H., Pereira, P., Mataix-Solera, J. (2014). Wildland fire ash: Production, composition and eco-hydro-geomorphic effects. *Earth-Science Reviews*, 130, 103–127.

Bonfante, P., & Venice, F. (2020). Mucoromycota: going to the roots of plant-interacting fungi. *Fungal Biology Reviews*, 34: 100-113.

Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., & West, G. B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85: 1771-1789.

Canganella, F., & Wiegel, J. (2011). Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*, 98: 253-279.

Certini, G. (2005). Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia*, 143: 1-10.

Certini, G., Moya, D., Lucas-Borja, M. E., & Mastrodonato, G. (2021). The impact of fire on soil-dwelling biota: A review. *Forest Ecology and Management*, 488: 11-15.

Chen, Q. L., Ding, J., Zhu, D., Hu, H. W., Delgado-Baquerizo, M., Ma, Y. B., & Zhu, Y. G. (2020). Rare microbial taxa as the major drivers of ecosystem multifunctionality in long-term fertilized soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1- 37.

Chiomento, J. L. T., Stürmer, S. L., Carrenho, R., da Costa, R. C., Scheffer-Basso, S. M., Antunes, L. E. C., & Calvete, E. O. (2019). Composition of arbuscular mycorrhizal fungi communities signals generalist species in soils cultivated with strawberry. *Scientia Horticulturae*, 253: 286-294.

Clark, D. R., McKew, B. A., Dong, L. F., Leung, G., Dumbrell, A. J., Stott, A., & Whitby, C. (2020). Mineralization and nitrification: Archaea dominate ammonia-oxidising communities in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 143: 1-12.

Cobo-Díaz, J. F., Fernández-González, A. J., Villadas, P. J., Robles, A. B., Toro, N., & Fernández-López, M. (2015). Metagenomic Assessment of the Potential Microbial Nitrogen Pathways in the Rhizosphere of a Mediterranean Forest After a Wildfire. *Microbial Ecology*, 69: 895–904.

Couturier, M., Ladeveze, S., Sulzenbacher, G., Ciano, L., Fanuel, M., Moreau, C., & Labourel, A. (2018). Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation. *Nature chemical biology*, 14: 1-5.

Cowan, D. A., Ramond, J. B., Makhallanyane, T. P., & De Maayer, P. (2015). Metagenomics of extreme environments. *Current opinion in microbiology*, 25: 97-102.

Dash, H. R., & Das, S. (2018). Molecular methods for studying microorganisms from atypical environments. *Methods in Microbiology*, 45: 89-122.

Davis, W. J., Picard, K. T., Antonetti, J., Edmonds, J., Fults, J., Letcher, P. M., & Powell, M. J. (2018). Inventory of chytrid diversity in two temporary forest ponds using a multiphasic approach. *Mycologia*, 110: 811-821.

De Miera, L. E. S., Pinto, R., Gutierrez-Gonzalez, J. J., Calvo, L., & Ansola, G. (2020). Wildfire effects on diversity and composition in soil bacterial communities. *Science of The Total Environment*, 726: 2-10.

De Tender, C., Mesuere, B., Van der Jeugt, F., Haegeman, A., Ruttink, T., Vandecasteele, B., & Kuramae, E. E. (2019). Peat substrate amended with chitin modulates the N-cycle, siderophore and chitinase responses in the lettuce rhizobiome. *Scientific reports*, 9: 1-11.

Delgado-Baquerizo, M., & Eldridge, D. J. (2019). Cross-biome drivers of soil bacterial alpha diversity on a worldwide scale. *Ecosystems*, 22: 1220-1231.

Di Piazza, S., Houbraken, J., Meijer, M., Cecchi, G., Kraak, B., Rosa, E., & Zotti, M. (2020). Thermotolerant and Thermophilic Mycobiota in Different Steps of Compost Maturation. *Microorganisms*, 8: 1-9.

Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87: 951-962.

Dooley, S. R., & Treseder, K. K. (2012). The effect of fire on microbial biomass: a meta-analysis of field studies. *Biogeochemistry*, 109: 49-61.

Dowben, R. M., & Weidenmüller, R. (1968). Adaptation of mesophilic bacteria to growth at elevated temperatures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 158: 255-261.

DSMZ. (2007). German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. Soil extract medium. Disponible en: [https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium12.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium12.pdf). Fecha de consulta : 16/ 08/ 2020.

Dworkin, M. (2006). Prokaryotic life cycles. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria. Ecophysiological and biochemical aspects* (pp. 140–160). New York, NY: Springer.

Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J. M., Wang, J., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., & Singh, B. K. (2019). A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature communications*, 10: 1-9.

Evans, H. C. (1971). Thermophilous fungi of coal spoil tips: II. Occurrence, distribution and temperature relationships. *Transactions of the British Mycological Society*, 57: 255-266.

FAO. (2020). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Textura del suelo. Disponible en: [http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO\\_Training/FAO\\_Training/General/x6706s/x6706s06.htm](http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s06.htm) . Fecha de consulta: 30/ 07/ 2020.

Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15: 579-590.

Fierer, N., Strickland, M. S., Liptzin, D., Bradford, M. A., & Cleveland, C. C. (2009). Global patterns in belowground communities. *Ecology letters*, 12: 1238-1249.

Figueredo, H. M., Gonçalves, V. N., Godinho, V. M., Lopes, D. V., Oliveira, F. S., & Rosa, L. H. (2020). Diversity and ecology of cultivable fungi isolated from the thermal soil gradients in Deception Island, Antarctica. *Extremophiles*, 24: 219-225.

Flores, A., Diaz-Zamora, J. T., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Chávez, A., de los Santos-Villalobos, S., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2020). Bridging genomics and field research: draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* CR71, an endophytic bacterium that promotes plant growth and fruit yield in *Cucumis sativus* L. *3 Biotech*, 10: 1-7.

Galachyants, A. D., Suslova, M. Y., Marinayte, I. I., Izosimova, O. N., Krasnopeev, A. Y., Shtykova, Y. R., Belykh, O. I. (2020). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Surface Microlayer of Lake Baikal during Wildfires and Naphthalene-degrading Strains from the Bacterioneuston. *Microbiology*, 89: 609–615.

Galperin, M. Y. (2016). Genome diversity of spore-forming Firmicutes. *The Bacterial Spore: from Molecules to Systems*. American Society for Microbiology, 1-18.

González-Pérez, J. A., González-Vila, F. J., Almendros, G., & Knicker, H. (2004). The effect of fire on soil organic matter—a review. *Environment International*, 30: 855–870.

Grishkan, I. (2018). Thermotolerant mycobiota of Israeli soils. *Journal of basic microbiology*, 58: 30-40.

Guo, L., Wang, G., Sheng, Y., Sun, X., Shi, Z., Xu, Q., & Mu, W. (2020). Temperature governs the distribution of hot spring microbial community in three hydrothermal fields, Eastern Tibetan Plateau Geothermal Belt, Western China. *Science of The Total Environment*, 720: 1-13.

Guo, Q., Li, S., Lu, X., Li, B., Stummer, B., Dong, W., & Ma, P. (2012). *phoR* sequences as a phylogenetic marker to differentiate the species in the *Bacillus subtilis* group. *Canadian journal of microbiology*, 58: 1295-1305.

Gupta, G., Kumar, V., & Pal, A. K. (2017). Microbial Degradation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Emphasis on Pyrene. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 1–13.

Gupta, N., Skinner, K. A., Summers, Z. M., Edirisinghe, J. N., Weisenhorn, P. B., Faria, J. P., & O'Loughlin, E. J. (2020). Draft Genome Sequence of *Pseudarthrobacter* sp. Strain ATCC 49442 (Formerly *Micrococcus luteus*), a Pyridine-Degrading Bacterium. *Microbiology resource announcements*, 9: 1-3.

Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4: 1 - 9.

Hartmann, M., Brunner, I., Hagedorn, F., Bardgett, R. D., Stierli, B., Herzog, C., & Frey, B. (2017). A decade of irrigation transforms the soil microbiome of a semi-arid pine forest. *Molecular Ecology*, 26:1190-1206.

Hifnawy, M. S., Fouda, M. M., Sayed, A. M., Mohammed, R., Hassan, H. M., AbouZid, S. F., & Abdelmohsen, U. R. (2020). The genus *Micromonospora* as a model microorganism for bioactive natural product discovery. *RSC Advances*, 10(35), 20939-20959.

Hobbs, J. K., Shepherd, C., Saul, D. J., Demetras, N. J., Haaning, S., Monk, C. R., & Arcus, V. L. (2012). On the origin and evolution of thermophily: reconstruction of functional precambrian enzymes from ancestors of *Bacillus*. *Molecular biology and evolution*, 29(2), 825-835.)

Holden, S. R., Rogers, B. M., Treseder, K. K., & Randerson, J. T. (2016). Fire severity influences the response of soil microbes to a boreal forest fire. *Environmental Research Letters*, 11: 1-10.

Huffman, M. S., & Madritch, M. D. (2018). Soil microbial response following wildfires in thermic oak-pine forests. *Biology and Fertility of Soils*, 54: 985-997.

Hurtado-Bautista, E., Pérez-Sánchez, L. F., Islas-Robles, Á., Santoyo, G., & Olmedo-Alvarez, G. (2020). Phenotypic plasticity and evolution of thermal tolerance in two lineages of bacteria from temperate and hot environments. *bioRxiv*, 1-38.

Ja'afaru, M. I., Chimbekujwo, K. I., & Ajunwa, O. M. (2020). Purification, characterization and de-staining potentials of a thermotolerant protease produced by *Fusarium oxysporum*. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 64: 539-547.

Jagannadham, M. V., Chattopadhyay, M. K., Subbalakshmi, C., Vairamani, M., Narayanan, K., Rao, C. M., & Shivaji, S. (2000). Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, *Sphingobacterium antarcticus*, and a mesophilic bacterium, *Sphingobacterium multivorum*. *Archives of microbiology*, 173: 418-424.

Jardine, J. L., Abia, A. L. K., Mavumengwana, V., & Ubomba-Jaswa, E. (2017). Phylogenetic analysis and antimicrobial profiles of cultured emerging opportunistic pathogens (phyla Actinobacteria and Proteobacteria) identified in hot springs. *International journal of environmental research and public health*, 14: 1-18.

Jousset, A., Bienhold, C., Chatzinotas, A., Gallien, L., Gobet, A., Kurm, V., & Van Der Heijden, M. G. (2017). Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *The ISME journal*, 11: 853-862.

Jurado, V., Miller, A. Z., Alias-Villegas, C., Laiz, L., & Saiz-Jimenez, C. (2012). *Rubrobacter bracarensis* sp. nov., a novel member of the genus *Rubrobacter* isolated from a biodeteriorated monument. *Systematic and applied microbiology*, 35: 306-309.

Kaiser, K., Wemheuer, B., Korolkow, V., Wemheuer, F., Nacke, H., Schöning, I., & Daniel, R. (2016). Driving forces of soil bacterial community structure, diversity, and function in temperate grasslands and forests. *Scientific Reports*, 6:1-12.

Khodadad, C. L. M., Zimmerman, A. R., Green, S. J., Uthandi, S., & Foster, J. S. (2011). Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 385–392.

Kim, M., & Chun, J. (2014). 16S rRNA gene-based identification of bacteria and archaea using the EzTaxon server. In *Methods in microbiology* (Vol. 41, pp. 61-74). Academic Press.

Kucuk, M., & Kahveci, U. (2020) Determination of short-term effects of wild fire on soil properties and nitrogen mineralization in turkish pine (*Pinus Brutia* Ten.) in Turkey (The case of sariçiçek sub-district directorate). *Applied Ecology And Environmental Research*, 18: 8355-8371.

Kuenzer, C., & Stracher, G. B. (2012). Geomorphology of coal seam fires. *Geomorphology*, 138: 209-222.

Kumar, M., Yadav, A. N., Tiwari, R., Prasanna, R., & Saxena, A. K. (2014). Deciphering the diversity of culturable thermotolerant bacteria from Manikaran hot springs. *Annals of microbiology*, 64: 741-751.

Kurtböke, D. Ecology and habitat distribution of actinobacteria. In: *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. J. Wink, F. Mohammadipanah, and J. Hamedi, Cham: Springer; 2017: 123–149

Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and environmental microbiology*, 75: 5111-5120.

Lee, J. J., Kang, M. S., Kim, G. S., Lee, C. S., Lim, S., Lee, J., & Kim, M. K. (2016). *Flavisolibacter tropicus* sp. nov., isolated from tropical soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66: 3413-3419.

Lee, S. H., Sorensen, J. W., Grady, K. L., Tobin, T. C., & Shade, A. (2017). Divergent extremes but convergent recovery of bacterial and archaeal soil communities to an ongoing subterranean coal mine fire. *The ISME journal*, 11: 1447-1459.

Leff, J. W., Jones, S. E., Prober, S. M., Barberán, A., Borer, E. T., Firn, J. L., & McCulley, R. L. (2015). Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112:10967-10972.

Lewin, G. R., Carlos, C., Chevrette, M. G., Horn, H. A., McDonald, B. R., Stankey, R. J., & Currie, C. R. (2016). Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. *Annual review of microbiology*, 70: 235-254.

Li, W., Niu, S., Liu, X., & Wang, J. (2019). Short-term response of the soil bacterial community to differing wildfire severity in *Pinus tabulaeformis* stands. *Scientific reports*, 9: 1-10.

Lima, D. X., Corderiro, T. R. L., de Lima, C. L. F., de Souza, C. A. F., de Azevedo, A. L. C. M., & Souza-Motta, C. M. (2020). A new occurrence of *Mucor nidicola* (Madden, Stchigel, Guarro, Sutton et Starks)(Mucorales, Mucoromycota) in the Upland Rainforest of the Brazilian Northeast and first report as a saprobe in soil. *Check List*, 16: 163-167.

Liu, B., Talukder, M. J. H., Terhonen, E., Lampela, M., Vasander, H., Sun, H., & Asiegbu, F. (2020). The microbial diversity and structure in peatland forest in Indonesia. *Soil Use and Management*, 36: 123-138.

Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G., & Shao, Z. (2013). Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PloS one*, 8: 1-11.

Liu, Y., Sun, Q., Li, J., & Lian, B. (2018). Bacterial diversity among the fruit bodies of ectomycorrhizal and saprophytic fungi and their corresponding hyphosphere soils. *Scientific reports*, 8: 1-10.

Long, Y., Yang, X., Cao, Y., Lv, G., Li, Y., Pan, Y., ...& Liu, Y. (2021). Relationship between Soil Fungi and Seedling Density in the Vicinity of Adult Conspicifics in an Arid Desert Forest. *Forests*, 1-16.

López-González, J. A., del Carmen Vargas-García, M., López, M. J., Suárez-Estrella, F., del Mar Jurado, M., & Moreno, J. (2015). Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting. *Bioresource technology*, 187: 305-313.

Ma, Q., Gao, X., Bi, X., Tu, L., Xia, M., Shen, Y., & Wang, M. (2020). Isolation, characterisation, and genome sequencing of *Rhodococcus equi*: a novel strain producing chitin deacetylase. *Scientific reports*, 10: 1-9.

Ma, R., Chen, Q., Fan, Y., Wang, Q., Chen, S., Liu, X., ... & Yao, B. (2017). Six new soil-inhabiting *Cladosporium* species from plateaus in China. *Mycologia*, 109: 244-260.

Macario, A.J.L., & Conway E. (2007). Heat resistance. In: *Encyclopedia of Stress* (pp. 278- 282). Elsevier, New York, USA.

Maeng, S., Park, Y., Lee, S. E., Han, J. H., Bai, J., & Kim, M. K. (2021). *Flavisolibacter longurius* sp. nov., isolated from soil. *Archives of Microbiology*, 1-6.

Maheshwari, R., Bharadwaj, G., & Bhat, M. K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64: 461-488.

Mahuku, G. S. (2004). A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 71-81.

Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., & Berzano, M. (2002). The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental microbiology*, 4: 595-602.

Maron, P. A., Sarr, A., Kaisermann, A., Lévêque, J., Mathieu, O., Guigue, J., & Chabbi, A. (2018). High microbial diversity promotes soil ecosystem functioning. *Applied and Environmental Microbiology*, 8: 1-13.

Martineau, C., Mauffrey, F., & Villemur, R. (2015). Comparative analysis of denitrifying activities of *Hyphomicrobium nitratorans*, *Hyphomicrobium denitrificans*, and *Hyphomicrobium zavarzinii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81: 5003-5014.

Maszenan, A. M., Seviour, R. J., Patel, B. K. C., Janssen, P. H., & Wanner, J. (2005). *Defluvicoccus vanus* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-negative coccus/coccobacillus in the 'Alphaproteobacteria' from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55: 2105-2111.

McKay, C. P. (2014). Requirements and limits for life in the context of exoplanets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 12628-12633.

Mélida, H., Sain, D., Stajich, J. E., & Bulone, V. (2015). Deciphering the uniqueness of Mucoromycotina cell walls by combining biochemical and phylogenomic approaches. *Environmental Microbiology*, 17:1649-1662.

Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., Feyhl-Buska, J., Wong, M. L., Zhang, S., & Giovannelli, D. (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in microbiology*, 10: 1-25.

Mirete, S., Morgante, V., & González-Pastor, J. E. (2016). Functional metagenomics of extreme environments. *Current opinion in biotechnology*, 38: 143-149.

Mouchacca, J. (2000). Thermotolerant fungi erroneously reported in applied research work as possessing thermophilic attributes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 869-880.

Munroe, J. S. (2012). Physical, chemical, and thermal properties of soils across a forest-meadow ecotone in the Uinta Mountains, Northeastern Utah, USA. *Arctic, antarctic, and alpine research*, 44:95-106.

Nakamura, L. K. (1989). Taxonomic Relationship of Black-Pigmented *Bacillus subtilis* Strains and a Proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39: 295-300.

Nannipieri, P., Ascher-Jenull, J., Ceccherini, M. T., Pietramellara, G., Renella, G., & Schloter, M. (2020). Beyond microbial diversity for predicting soil functions: A mini review. *Pedosphere*, 30: 5-17.

Nicault, M., Tidjani, A. R., Gauthier, A., Dumarcay, S., Gelhaye, E., Bontemps, C., & Leblond, P. (2020). Mining the biosynthetic potential for specialized metabolism of a *Streptomyces* soil community. *Antibiotics*, 9: 271.

Nolter, M.A., & Vice D.H. (2004) Looking back at the Centralia coal fire: a synopsis of its presentstatus, *International Journal of Coal Geology* 59:99-106.

Norman, J. S., King, G. M., & Friesen, M. L. (2017). *Rubrobacter spartanus* sp. nov., a moderately thermophilic oligotrophic bacterium isolated from volcanic soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67: 3597-3602.

Palmisano, M. M., Nakamura, L. K., Duncan, K. E., Istock, C. A., & Cohan, F. M. (2001). *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1671-1679.

Peng, T., Kan, J., Hu, J., & Hu, Z. (2020). Genes and novel sRNAs involved in PAHs degradation in marine bacteria *Rhodococcus* sp. P14 revealed by the genome and transcriptome analysis. *3 Biotech*, 10: 1-10.

Pérez-Valera, E., Verdú, M., Navarro-Cano, J. A., & Goberna, M. (2018). Resilience to fire of phylogenetic diversity across biological domains. *Molecular Ecology*, 27: 2896-2908.

Potin, O., Veignie, E., & Rafin, C. (2004). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(1), 71-78.

Prendergast-Miller, M. T., de Menezes, A. B., Macdonald, L. M., Toscas, P., Bissett, A., Baker, G., Thrall, P. H. (2017). Wildfire impact: Natural experiment reveals differential short-term changes in soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 109: 1–13.

Qin, Y., Li, Q., Luo, F., Fu, Y., & He, H. (2020). One-step purification of two novel thermotolerant  $\beta$ -1, 4-glucosidases from a newly isolated strain of *Fusarium chlamydosporum* HML278 and their characterization. *AMB Express*, 10: 1-11.

Rai, R. K., Chetri, J. K., & Reddy, K. R. (2020, February). Role of Temperature in Microbial Methane Oxidation in Landfill Cover Soil. In *Geo-Congress 2020: Geo-Systems, Sustainability, Geoenvironmental Engineering, and Unsaturated Soil Mechanics* (pp. 151-158). Reston, VA: American Society of Civil Engineers.

Reimer, L. C., Vetcinova, A., Carbasse, J. S., Söhngen, C., Gleim, D., Ebeling, C., & Overmann, J. (2019). Bac Dive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis. *Nucleic acids research*, 47: D631-D636.

Rein, G. (2013). Smouldering fires and natural fuels. In *Fire phenomena and the Earth system: an interdisciplinary guide to fire science* (pp.15- 34). Wiley and Sons, United Kingdom, London.

Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409: 1092-1101.

- Ruppavalli, M. V., Muthamilan, M., Nakkeeran, S., & Subramanian, K. S. (2019). Phenotypic and molecular characterization of *Chaetomium globosum* (Gustav Kunze) from different microhabitats of Tamil Nadu, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8: 1496-1506.
- Santín, C., & Doerr, S. H. (2016). Fire effects on soils: the human dimension. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371: 1- 8.
- Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2020). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*. 128: 1583—1594.
- Saygin, H., Ay, H., Guven, K., Cetin, D., & Sahin, N. (2020). *Micromonospora deserti* sp. nov., isolated from the Karakum Desert. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70: 282-291.
- Schiraldi C., De Rosa M. (2014) Mesophilic Organisms. In: Drioli E., Giorno L. (eds) *Encyclopedia of Membranes* (pp. 1-2). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sezen, S., Gulluce, M., Karadayi, M., Işık, C., Alaylar, B., Dogan, S., & Koc, T. Y. (2020). Characterization of Bacterial Flora from Afşin–Elbistan Lignite Mine for Potential Microbial Biotech Applications. *Geomicrobiology Journal*, 1-6.
- Shade, A., Jones, S. E., Caporaso, J. G., Handelsman, J., Knight, R., Fierer, N., & Gilbert, J. A. (2014). Conditionally rare taxa disproportionately contribute to temporal changes in microbial diversity. *MBio*, 5: 1-9.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., & Suresh, K. (2006). *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes, 56: 1-9.

Smets, W., Leff, J. W., Bradford, M. A., McCulley, R. L., Lebeer, S., & Fierer, N. (2016). A method for simultaneous measurement of soil bacterial abundances and community composition via 16S rRNA gene sequencing. *Soil Biology and Biochemistry*, 9: 145-151.

Smith, N. R., Kishchuk, B. E., & Mohn, W. W. (2008). Effects of wildfire and harvest disturbances on forest soil bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 216-224.

Snyder, A. B., Biango-Daniels, M. N., Hodge, K. T., & Worobo, R. W. (2019). Nature abhors a vacuum: highly diverse mechanisms enable spoilage fungi to disperse, survive, and propagate in commercially processed and preserved foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18: 286-304.

Song, X., Xu, Y., Li, G., Zhang, Y., Huang, T., & Hu, Z. (2011). Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 2122–2128.

Srinivasiah, S., Bhavsar, J., Thapar, K., Liles, M., Schoenfeld, T., & Wommack, K. E. (2008). Phages across the biosphere: contrasts of viruses in soil and aquatic environments. *Research in Microbiology*, 159: 349-357.

Sriswasdi, S., Yang, C. C., & Iwasaki, W. (2017). Generalist species drive microbial dispersion and evolution. *Nature communications*, 8: 1-8.

Tecon, R., & Or, D. (2017). Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS microbiology reviews*, 41: 599-623.

Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., & Smith, M. E. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346:1052–1053.

Teo, W. F. A., Srisuk, N., & Duangmal, K. (2020). *Amycolatopsis acidicola* sp. nov., isolated from peat swamp forest soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70: 1547-1554.

Thomaz, E. L., Antoneli, V., & Doerr, S. H. (2014). Effects of fire on the physicochemical properties of soil in a slash-and-burn agriculture. *CATENA*, 122: 209–215.

Tian, J., Zhu, D., Wang, J., Wu, B., Hussain, M., & Liu, X. (2018). Environmental factors driving fungal distribution in freshwater lake sediments across the Headwater Region of the Yellow River, China. *Scientific reports*, 8: 1-8.

Tian, X., Yang, T., He, J., Chu, Q., Jia, X., & Huang, J. (2017). Fungal community and cellulose-degrading genes in the composting process of Chinese medicinal herbal residues. *Bioresource technology*, 241: 374-383.

Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 5: 240-245.

Torsvik, V., & Øvreås, L. (2008). Microbial diversity, life strategies, and adaptation to life in extreme soils. In *Microbiology of extreme soils* (pp. 15-43). Springer, Berlin, Heidelberg.

Torsvik, V., Goksøyr, J., & Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 782-787.

Turetsky, M. R., Benscoter, B., Page, S., Rein, G., Van Der Werf, G. R., & Watts, A. (2015). Global vulnerability of peatlands to fire and carbon loss. *Nature Geoscience*, 8:11-14.

Ushiki, N., Jinno, M., Fujitani, H., Suenaga, T., Terada, A., & Tsuneda, S. (2017). Nitrite oxidation kinetics of two *Nitrospira* strains: the quest for competition and

ecological niche differentiation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 123: 581-589.

Van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., & van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 18: 546-558.

Verma, S., & Jayakumar, S. (2012). Impact of forest fire on physical, chemical and biological properties of soil: A review. *proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 2: 168-176.

Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., & Kasai, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57: 1846-1850.

Wei, Z., Wang, J. J., Dodla, S. K., Fultz, L. M., Gaston, L. A., Park, J. H., ... & Meng, Y. (2020). Exploring anaerobic CO<sub>2</sub> production response to elevated nitrate levels in Gulf of Mexico coastal wetlands: Phenomena and relationships. *Science of The Total Environment*, 709: 9-10.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173: 697-703.

Whitman, T., Whitman, E., Woolet, J., Flannigan, M. D., Thompson, D. K., & Parisien, M.-A. (2019). Soil bacterial and fungal response to wildfires in the Canadian boreal forest across a burn severity gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 138: 1-13.

Wohlgemuth, P. M., Hubbert, K. R., Procter, T., & Ahuja, S. (2018). Chapter Seven. Fire and Physical Environment Interactions Soil, Water, and Air. In *Fire in California's ecosystems* (pp. 87-102). University of California Press.

Xu, H. Y., Ge, J. L., Zhang, L. L., Zhang, C., Jin, R., & Wang, X. H. (2020). A Dibenz [a, h] Anthracene-Degrading Strain *Amycolatopsis* sp. Y1-2 from Soils in the Coal Mining Areas. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 4: 166-178.

Yoon, M. H., & Im, W. T. (2007). *Flavisolibacter ginsengiterrae* gen. nov., sp. nov. and *Flavisolibacter ginsengisoli* sp. nov., isolated from ginseng cultivating soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57: 1834-1839.

Young, I. M., & Crawford, J. W. (2004). Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science*, 304:1634-1637.

Yu, C., Jin, J., Meng, L. Q., Xia, H. H., Yuan, H. F., Wang, J., & Sha, C. Q. (2017). Sequence comparison of *phoR*, *gyrB*, *groEL*, and *cheA* genes as phylogenetic markers for distinguishing *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. subtilis* and for identifying *Bacillus* strain B29. *Cellular and Molecular Biology*, 63: 19-24.

Yu, M., Liang, S., Dai, Z., Li, Y., Luo, Y., Tang, C., & Xu, J. (2020). Plant material and its biochar differ in their effects on nitrogen mineralization and nitrification in a subtropical forest soil. *Science of The Total Environment*, 1-33.

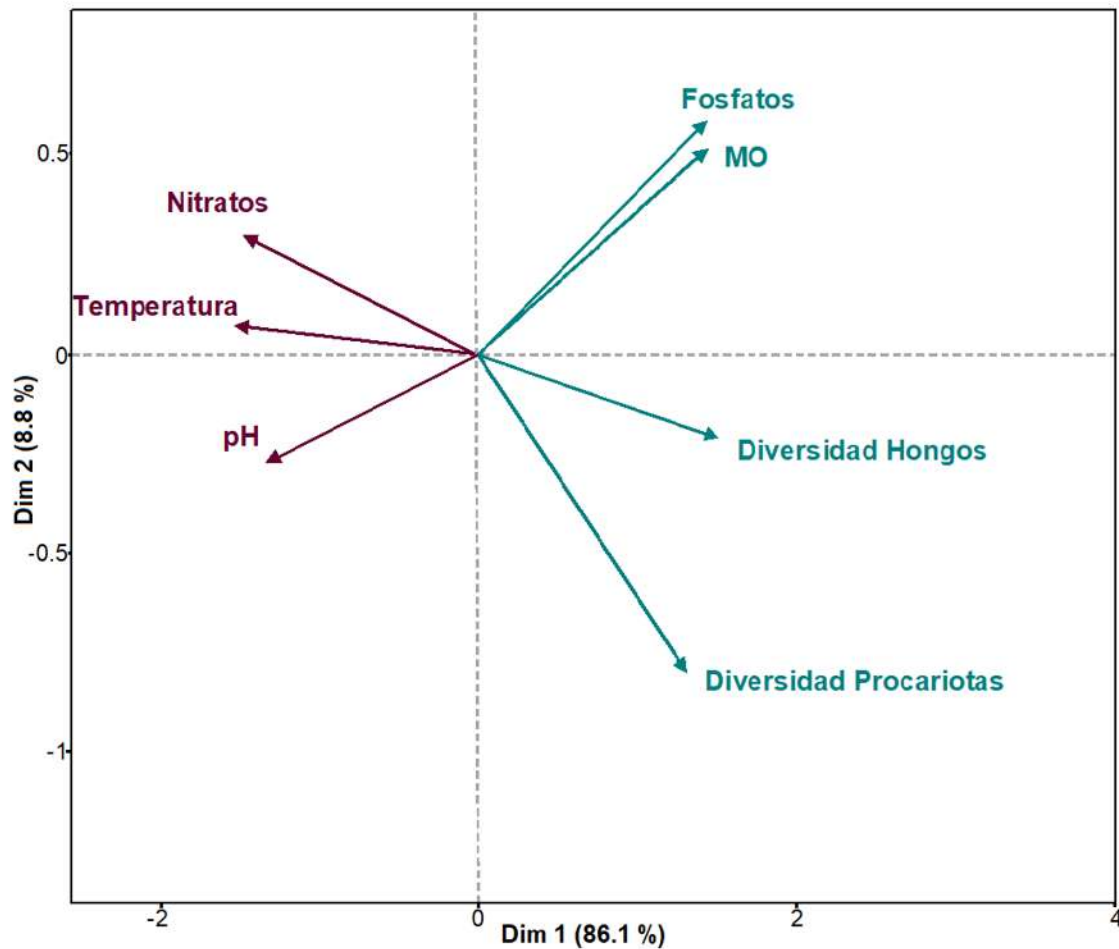
Zavala, L. M. M., de Celis Silvia, R., & López, A. J. (2014). How wildfires affect soil properties. A brief review. *Cuadernos de investigación geográfica/Geographical Research Letters*, 40: 311-331.

Zhalnina, K. V., Dias, R., Leonard, M. T., de Quadros, P. D., Camargo, F. A., Drew, J. C., & Triplett, E. W. (2014). Genome sequence of *Candidatus Nitrososphaera gargensis* from group I. 1b enriched from Everglades soil reveals novel genomic features of the ammonia-oxidizing archaea. *PLoS one*, 9: 542–552.

Zhao, J., Meng, Y., Drewer, J., Skiba, U. M., Prosser, J. I., & Gubry-Rangin, C. (2020). Differential ecosystem function stability of ammonia-oxidizing archaea and bacteria following short-term environmental perturbation. *Msystems*, 5: 1-14.

Zhou, J., Deng, Y., Shen, L., Wen, C., Yan, Q., Ning, D., & Voordeckers, J. W. (2016). Temperature mediates continental-scale diversity of microbes in forest soils. *Nature communications*, 7: 1-10.

## 13 Anexo



**Anexo 1 Análisis de Componentes Principales entre las variables ambientales y la diversidad microbiana.** El diagrama muestra las variables agrupadas por dos colores en donde la diversidad de organismos procariotas y hongos se relaciona de manera positiva con las concentraciones de materia orgánica y fosfatos, y de manera negativa con el incremento de temperatura, nitratos y pH.