

**MÁSTER EN
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA: I+D**

TRABAJO FIN DE MÁSTER



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID**

ALUMNO: RAFAEL ALEJANDRO ALONSO CONDE.

TÍTULO DEL TRABAJO: Estudio ecofuncional de la microbiota asociada a suelos de interés vitivinícola.

CURSO ACADÉMICO: 2015-16.

CONVOCATORIA: Septiembre.

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Biología
Departamento de Microbiología III

Estudio ecofuncional de la microbiota asociada a suelos de interés vitivinícola



TRABAJO FIN DE MÁSTER

V. B. del Director:

Dr. Domingo Marquina Díaz

Septiembre 2016, Madrid

Índice

1. Introducción.....	3
1.1 El suelo.....	3
1.2 Factores abióticos.....	4
1.3 Factores bióticos.....	4
2. Justificación y objetivos.....	5
3. Materiales y Métodos.....	6
3.1 Muestras de suelo.....	6
3.2 Capacidad de Campo y Punto de Marchitez Permanente.....	6
3.3 Medidas electroquímicas.....	6
3.4 Recuento de microorganismos viables.....	7
3.4.1 Medios de cultivo.....	7
3.4.2 Condiciones de incubación.....	7
3.5 Medidas indirectas de actividad microbiana.....	7
3.5.1 Respiración Inducida por Sustrato.....	7
3.5.2 Determinación de actividades enzimáticas del suelo.....	8
3.5.2.1 Actividad deshidrogenasa (EC 1.1).....	8
3.5.2.2 Actividad fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1).....	8
3.6 Diversidad microbiana no cultivable.....	8
3.6.1 Extracción de ADN.....	9
3.6.2 Amplificación génica.....	9
3.6.3 Electroforesis en Gel en Gradiente Desnaturalizante (DGGE).....	9
3.6.4 Software analítico.....	9
4. Resultados.....	10
4.1 Capacidad de Campo y Punto de Marchitez Permanente.....	10
4.2 Medidas electroquímicas.....	11
4.3 Diversidad microbiana bacteriana viable.....	12
4.4 Recuento de microorganismos eucariotas: Levaduras y Hongos Filamentosos.....	14
4.5 Respiración microbiana heterótrofa.....	14
4.6 Actividades enzimáticas en suelo.....	15
4.6.1 Actividad fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1).....	15
4.6.2 Actividad deshidrogenasa (EC 1.1).....	16
4.7 Diversidad bacteriana edáfica no cultivable.....	17
5. Discusión.....	18
5.1 Retención hídrica.....	18
5.2 pH.....	18
5.1 Recuento microbiano.....	19
5.2 Respiración Inducida por Sustrato.....	19
5.3 Actividades enzimáticas:.....	20
5.3.1 Actividad fosfatasa alcalina.....	20
5.3.2 Actividad deshidrogenasa.....	20
5.4 DGGE.....	21
6. Conclusiones.....	22
7. Bibliografía.....	23

Resumen

El suelo es el principal recurso del que disponemos para hacer frente a la creciente demanda mundial de alimentos. Las prácticas agrícolas determinan el uso sostenible del suelo para evitar procesos de desertización y aumentar el rendimiento productivo. En distintas parcelas de suelos con prácticas vitivinícolas se han estudiado las principales variables abióticas y bióticas que contribuyen a un aumento en la producción, atendiendo a los principales estados fisiológicos de la vid.

En este estudio se ha determinado la Capacidad de Campo, cuyos valores oscilan entre 42,09 y 165,90 ml H₂O/kg de suelo. La medida del pH determina los procesos biogeoquímicos que se cursan en el suelo, en este caso el pH está determinado por presencia de CaCO₃, definiendo un suelo fuertemente alcalino. Las actividades fosfatasa y deshidrogenasa son indicadores de la actividad microbiana total del suelo, debido al pH básico, se determinó la actividad enzimática fosfatasa alcalina obteniendo valores de 31,6 mg y 132,9 PNP/kg·h, similares a los encontrados en cultivos de maíz con un pH similar. Los valores obtenidos con la actividad deshidrogenasa están en torno a una media de 44 mg INTF/kg·h, muy superior a la actividad en otros suelos agrícolas. Se ha observado una predominancia de microorganismos viables fijadores de nitrógeno alcanzando el 43% de presencia en el estado fisiológico de Lloro. El SIR durante la fase de Reposo se correlaciona linealmente con el recuento microbiano de heterótrofos (Coef. correlación=0,87). El estado fisiológico de Reposo es el que presenta mayor biodiversidad (Índice de Shannon) edáfica.

Abstract

Soil is the main resource that we have to address the growing global demand for food. Agricultural practices determine sustainable land use not lead to a process of desertification and increase the production yield. In soils with viticultural practices the main abiotic and biotic variables, which contribute to a production increase, have been studied basing on the main physiological states of the vine.

This study determined the field capacity, which values are between 42.09 and 165.90 ml H₂O/kg of soil. pH measurement determines the biogeochemical processes that occurs in the ground, in this case the pH is determined by the presence of CaCO₃, defining a strongly alkaline soil. Dehydrogenase activities and phosphatase are indicators of overall soil microbial activity due to basic pH, enzyme activity was determined by obtaining alkaline phosphatase values 31.6 132.9 mg PNP/kg of soil·h, similar to those found in corn cultures with a similar pH. The values obtained with dehydrogenase activity are around an average of INTF 44.0 mg/kg of soil·h, much higher than the activity in other agricultural soils. It has been observed a predominance of viable microorganisms nitrogen fixers reaching 43% presence in the physiological state of Cry. The SIR during the Resting phase correlates linearly with heterotrophic microbial count (Coef. Correlation = 0.87). The physiological state of Rest is the most biodiverse (Shannon Index).

1. Introducción

1.1 El suelo

El suelo se define como la parte más externa de la corteza terrestre, resultante de la meteorización de las rocas subyacentes y con unas características claramente diferenciadas de las mismas. Podemos considerar el suelo como un sistema de interacción entre tres fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida, y una fase gaseosa o atmósfera del suelo. El tipo y composición de la materia mineral viene dado por las características de las rocas del subsuelo, así como de los procesos edáficos que hayan tenido lugar en su formación. La porción inorgánica es muy importante por su influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación y retención de agua. La materia orgánica procede de la actividad de los distintos organismos vivos del suelo y su composición y cantidad es variable, principalmente en función del tipo de cubierta vegetal. El resto del volumen del suelo está prácticamente constituido por espacios porosos, que a su vez están ocupados por agua y los gases que constituyen la atmósfera edáfica (**Fig. 1**). La porosidad (cantidad y tamaño de los poros) depende de la textura, determinada por la cantidad de arena, limo y arcilla, la estructura y el contenido en materia orgánica (USDA, 1999).

La cantidad de agua que almacena el suelo, en relación a la cesión a la planta, está determinado por los parámetros: Capacidad de Campo (CC) y Punto de Marchitez Permanente (PMP). La CC se define como la cantidad relativamente constante de agua que contiene un suelo saturado después de 48 horas de drenaje y el PMP se refiere al contenido de agua de un suelo que ha perdido toda su agua a causa del cultivo y, por lo tanto, el agua que permanece en el suelo no está disponible para la planta. La diferencia entre CC y PMP permite el cálculo del Agua Disponible (AD) para el cultivo (FAO, 2005).

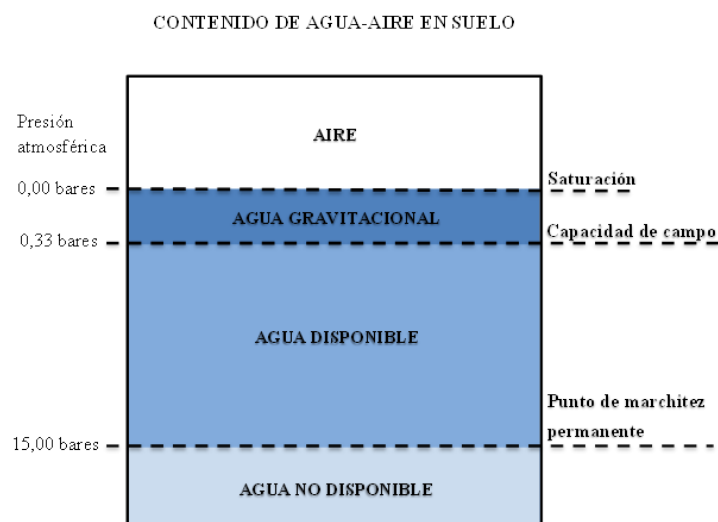


Figura 1: La columna edáfica se encuentra constituida por agua y aire, además de los materiales geológicos característicos. En el sistema suelo-planta-atmósfera la presión mínima que ejerce la planta para adquirir agua es 0,33 bares y la máxima es 15,00 bares sobre la presión atmosférica. La diferencia de presión determina el agua útil que un suelo es capaz de ceder al cultivo.

El suelo tiene funciones diversas muy importantes para los ecosistemas terrestres y el medio ambiente del planeta, es el sustento para la vida vegetal y del cual las plantas obtienen soporte mecánico y muchos de sus nutrientes; es el hábitat para una gran diversidad, tanto del

componente microbiano (bacterias, actinomicetos, hongos, algas, protozoarios y virus), así como de otros organismos (coleópteros, miriápodos, hormigas, colémbolos, nematodos, ácaros, larvas, mamíferos pequeños y reptiles); es el lugar donde se llevan a cabo la mayor parte de los ciclos biogeoquímicos de los ecosistemas terrestres (mineralización de la materia orgánica, nitrificación, fijación de nitrógeno, oxidación de metano y la movilización del fósforo entre otros procesos), (Luna *et al.*, 2002).

Los suelos vitivinícolas se caracterizan por ser pedregosos debido a su cercanía al entorno fluvial y se definen como suelos con baja o muy baja concentración de este ión o sus sales (Van Leeuwenhoek, 2015).

1.2 Factores abióticos

La pluviosidad de la zona de estudio es el principal factor abiótico, enmarcado en la meteorología de la zona, que condiciona el desarrollo vegetal y de los microorganismos edáficos. El 70% del agua dulce se destina a la producción agrícola (FAO, 2015) siendo la principal fuente la hidrografía cercana a la zona de cultivo.

El pH, dependiente del carácter biogeoquímico del suelo agrícola, condiciona las relaciones bióticas que suceden en el entorno edáfico. Así como la textura del suelo permite una disponibilidad hídrica determinante para la práctica vitivinícola.

1.3 Factores bióticos

Las comunidades microbianas edáficas cumplen funciones fundamentales en el reciclaje de nutrientes, descomposición de materia orgánica, efectos en la estructura y características fisicoquímicas del suelo como humedad y pH (Nannipieri *et al.*, 2003; Mustafa *et al.*, 2006).

La calidad del suelo es un término cada vez más usado para referirse a atributos físicos, químicos y biológicos relacionados con la capacidad funcional del suelo para sostener la productividad (Doran and Parkin 1994, Karlen *et al.*, 1997, Brejda *et al.*, 2000; Shober, 2003). Dentro de los atributos biológicos la microbiota del suelo tiene el potencial de ser indicadores importantes de calidad del suelo (Roper and Ophel-Keller 1997). Esto se debe a que los microorganismos participan activamente en procesos de descomposición de la materia orgánica y la mineralización de nutrientes (Alexander, 1981) y a que cambios en el uso del suelo pueden influir sobre sus características fisico-químicas (Bramley and White, 1989). Estas a su vez pueden provocar modificaciones en la estructura y función de la microbiota (Beare *et al.* 1992, Mikhnovskaya *et al.*, 1993).

Dicha microbiota constituye un componente muy lábil de la fracción orgánica, contiene de 1 a 3% del carbono total y hasta 5% del nitrógeno total del suelo. Las características físicas, químicas y biológicas del suelo, así como la presencia de plantas, tienen influencia sobre el número y la actividad de las poblaciones microbianas, (Luna *et al.*, 2002).

Las bacterias representan entre el 25 y 30% de la biomasa microbiana del suelo, comportándose como los organismos más numerosos del suelo (entre 10^6 y 10^7 bacterias g^{-1} de suelo), mientras que los hongos filamentosos y levaduras, dado su mayor tamaño y presentando menor abundancia, supone la biomasa más significativa (Olalde and Aguilera, 1998), alcanzan hasta un 80%. Entre éstos sobresalen los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Verticillum*, etc. Sus principales funciones son heterotróficas sobre los restos vegetales y formación de simbiosis del tipo micorrízicas y relaciones parásitas (Gómez, 2000).

Para entender la relación entre las poblaciones microbianas de un suelo y su efecto sobre la calidad y productividad del mismo, es necesario diseñar y desarrollar métodos que permitan conocer el número de microorganismos de una muestra, el tipo de matriz en que se

desarrollan, y las relaciones microbianas en la muestra manejando biomasa y actividad microbiana como datos independientes (Bartha, 2001). Por esta razón no se puede aplicar una metodología general para cualquier tipo de muestra. Así, es recomendable emplear métodos de recuentos directos e indirectos dependiendo del tipo de suelo.

Sin embargo, la comparación de recuentos microscópicos directos de células con los obtenidos en placas de cultivo ha puesto de manifiesto que al menos el 99% de los procariotas presentes en el suelo son incapaces de desarrollarse en medios de cultivo (Roszak, *et al.*, 1987; Torsvik, *et al.*, 1990). Por lo tanto, la mayor parte de la diversidad procariota que integra la microbiota del suelo queda fuera del alcance de los métodos de estudio tradicionales, por no mencionar los hongos y protozoos, mucho más difíciles de cultivar en laboratorio.

Una medida indirecta de la microbiota cultivable y no cultivable del suelo es el estudio enzimático del mismo. Las enzimas en el suelo provienen principalmente de los microorganismos (Dick and Tabatabai, 1993). Por tanto, el estudio de la microbiota del suelo basado en la actividad enzimática parece ser la opción más apropiada para obtener información basada en la población edáfica en su totalidad.

2. Justificación y objetivos

El incesante incremento del comercio enológico, a nivel tanto nacional como internacional, determina la adquisición de técnicas novedosas para promover la singularidad y carácter de los vinos de una determinada instalación y/o Denominación de Origen. La relación que existe entre los tratamientos agrícolas o enmiendas realizadas en campo y el estado de salud de la vid permite la elaboración de mejores vinos, dado un contenido de precursores en la uva de mayor variedad y calidad. No sólo las enmiendas contribuyen a que la vid se encuentre en un mejor estado fisiológico, sino que el *terroir* puede enriquecerse de forma óptima. Dentro de este concepto denominado *terroir* por Van Leeuwen and Seguin (2006) se define la diversidad microbiana característica de cada finca, de cada viñedo. Realmente la enmienda aplicada se mineraliza por esta comunidad microbiana edáfica y posteriormente se adquieren por la planta los metabolitos necesarios para la producción de una baya de calidad. Por ello se hace necesario caracterizar y cuantificar la actividad microbiana en el suelo, para relacionar la biodiversidad del suelo con la calidad del producto final: el vino.

Los objetivos que se plantean en este trabajo, por tanto, son:

- Realizar un estudio que permita la caracterización textural y electroquímica del suelo agrícola de las parcelas de interés enológico objeto de estudio.
- Estudiar las actividades enzimáticas más representativas presentes en el suelo y su relación en procesos catalíticos para la mineralización de enmiendas.
- Analizar la biodiversidad microbiana edáfica aplicando técnicas clásicas de Microbiología y mediante *fingerprinting*.
- Desarrollar un *software* que permita el análisis de las variables que caracterizan la biodiversidad edáfica, bióticas y abióticas, para el pronóstico de tratamientos en la optimización del suelo para la práctica vitivinícola.

3. Materiales y Métodos

3.1 Muestras de suelo

El suelo, objeto de estudio, corresponde a un entorno vitivinícola perteneciente a la Denominación de Origen Ribera del Duero, Peñafiel, UTM: 30T 409359 4605285. El clima según clasificación de Köppen-Geiger se corresponde a un perfil Csb (Mediterráneo con influencia oceánica). El viñedo presenta un área de 160 ha y se subdivide en doce parcelas con características geofísicas diferentes (determinadas en un estudio previo), en las cuales prevalece el cultivo varietal de Tinto Fino (perteneciente al clon Tempranillo). La temperatura media anual es de 12,7 °C y la precipitación media anual de 433 mm (AEMET, 2012), con una altura media de 754 msnm. Sobre estos suelos se han aplicado de forma estacional enmiendas basadas en compost de oveja con un pH=9,8 y una relación C/N=12,54. La toma de muestras se realizó en los tres estados fisiológicos de la vid (Reposo: Noviembre-Enero, Lloro: Abril-Mayo y Maduración: Septiembre), se eliminó previamente la hojarasca y material superficial del suelo. Posteriormente se extrajeron 3 sub-muestras de 500g de suelo con una pala de 25 x 25 cm de entre los 5 cm y 25 cm de la columna edáfica. Durante el transporte se preservó el material de radiación solar y de posibles fuentes de humedad en un contenedor isotérmico de poli-estireno expandido. Las muestras de suelo se conservaron a -80°C sin tratamiento previo en el caso de destinarse al análisis molecular; o se secó a temperatura ambiente, se tamizó por una luz de maya <2 mm y posteriormente se mantuvo a 4°C en envase hermético, para el resto de análisis.

3.2 Capacidad de Campo y Punto de Marchitez Permanente

Los parámetros hídricos de un suelo determinan la capacidad de retención del agua y su cesión a la planta, por tanto, es necesario el conocimiento del agua disponible en un suelo para la hidratación vegetal. La determinación de la retención hídrica, una vez eliminada el agua gravitacional, o Capacidad de Campo (CC), se realizó depositando 10,00 g de cada suelo de las 12 parcelas en una membrana de porcelana y posteriormente se llevaron a saturación hídrica con agua destilada. A continuación, mediante la inyección de aire seco con una presión de 0,33 bares en cámara de Richards, se eliminó el agua excedente hasta llegar a CC. La presencia de agua en el suelo no indica que esté disponible para la vid. Por ello se realizó un análisis para determinar del Punto de Marchitez Permanente (PMP) sometiendo a la muestra a una presión de 15,00 bares. Ambos tratamientos se aplicaron durante 24h y posteriormente se eliminó el agua contenida en cada muestra siguiendo la normativa ISO 11465:1993, realizando seguidamente el estudio gravimétrico para determinar la cantidad de agua disponible para una planta en el suelo objeto de estudio.

3.3 Medidas electroquímicas

La determinación de pH de las muestras de suelo se realizó con el pHmetro modelo Crison pH Meter Basic 20 siguiendo la normativa ISO 10390:2005. Las medidas de pH del suelo se realizaron en agua destilada con fracción volumétrica 1:5 (suelo:agua), en agitación continua hasta estabilización de la lectura. Para la determinación del potencial ácido del suelo, en caso de sustitución por iones mono- o di-valentes, se realizó con un homogeneizado de suelo (1:5) en KCl 1,00 M o CaCl₂ 0,01 M respectivamente.

3.4 Recuento de microorganismos viables

La cuantificación de microorganismos (procariotas y eucariotas) requiere el uso de medios generales y selectivos que permita inferir la actividad metabólica de los mismos mediante el empleo de técnicas de Microbiología clásica. El recuento microbiológico se realizó usando el método estadístico del Número Más Probable (NMP), (Woomer, 1994).

3.4.1 Medios de cultivo

Los medios generales que se han usado en este estudio han sido: **YMA** (Extracto de levadura 0,3%; Extracto de Malta 0,3%; Glucosa 1,0; Proteosa peptona 0,3%; Agar europeo 1,5% (p/v)), para el recuento de levaduras; **PDA** (Sigma-Aldrich), para recuento de hongos filamentosos y **TSA** (CONDA), para el recuento en placa de bacterias heterótrofas viables.

Para el estudio de la actividad metabólica de las poblaciones bacterianas del suelo se usaron los siguientes medios selectivos: Cuantificación de microorganismos movilizados de fósforo **A1** (Glucosa 0,4%; NaCl 0,02%; Na₃PO₄ 0,25%; KNO₃ 0,2%; MgSO₄ · 7H₂O 0,0025%; MnSO₄ · 2H₂O 0,0025%; FeSO₄ 0,0025%; Agar europeo 1,5%, (p/v)) ajustado a pH 7,0, (Guzmán, 2011); medio **Ashby** para el microorganismo fijadores de N₂ (Sacarosa 0,5%; Glucosa 0,5%; KH₂PO₄ 0,02%; MgSO₄ 0,02%; NaCl: 0,02%; CaSO₄: 0,02%; CaCO₃ 0,5%; Agar europeo 1,5%, (p/v)) pH 5,8, (Becking, 2006); medio para el recuento de microorganismos movilizados de potasio **Piksovaya** (Glucosa 1,0%; KNO₃ 0,5%; KCl 0,02%; (NH₄)₂SO₄ 0,05%; MgSO₄ · 7H₂O 0,01%; MnSO₄ 0,01%; Púrpura de bromocresol 0,0125%; Agar europeo 1,5%, (p/v)); medio para crecimiento de microorganismos **Proteolíticos** (Tritipcaseína de soja agar; gelatina 1%), revelado con solución de Frazier (HgCl₂ 15% p/v; HCl 7% v/v); medio para crecimiento de microorganismos **Amilolíticos** (Tritipcaseína de soja agar; almidón 1%), revelado con lugol (KI 1% p/v; I₂ 0,5% p/v); **Agar para Actinomycetos** (ADSA MICRO), **Agar urea** (Cultimed).

3.4.2 Condiciones de incubación

Los medios de cultivo se incubaron atendiendo a las preferencias térmicas de crecimiento de los microorganismos analizados. Para microorganismos mesófilos cultivados en medios A1, Ashby, Piksovaya, TSA, medio de recuento para M. Amilolíticos, medio de recuento para M. Proteolíticos, agar para Actinomycetos y agar urea, la temperatura óptima de crecimiento es 32±1°C. Para levaduras y hongos (PDA e YMA) se incubó a una temperatura de 28±1°C. La humedad del aire en las cámaras de cultivo se mantuvo en 80±5 %HR.

3.5 Medidas indirectas de actividad microbiana

El análisis de la actividad total de la actividad microbiana permite inferir en el metabolismo de los microorganismos cultivables y no cultivables presentes en el suelo.

3.5.1 Respiración Inducida por Sustrato

La medida de respiración inducida por sustrato representa la tasa de consumo de glucosa por los microorganismos que contiene un gramo de suelo seco, es por tanto una medida indirecta de la actividad metabólica de los microorganismos heterótrofos presentes en el suelo. El equipo utilizado para este análisis fue el μ -Trac 4200, SYLAB. Las muestras analizadas contenían de 30g de suelo seco que se incubaron previamente a temperatura ambiente durante 48 h al 70% de CC y se adiciono talco y glucosa (10:1) justo antes del análisis. En los viales con electrodos se depositan 2 ml de KOH 2% p/v y sobre los electrodos

un vial con 5 g de cada muestra, incubada previamente. En el equipo la temperatura se mantuvo constante a 30°C durante el análisis. El metabolismo respiratorio fue medido por cambios en la conductividad del KOH (2% p/v) producido por la fijación de CO₂ en la cámara de respiración. Estos datos se analizaron en tiempo real permitiendo la representación gráfica del proceso respiratorio.

Los análisis de regresión simple, para el estudio de correlación del SIR con diferentes parámetros, se realizaron con el programa informático STATGRAPHICS[®] Centurion XVII 17.1.12 (64-bits).

3.5.2 Determinación de actividades enzimáticas del suelo

En este estudio se determinan dos actividades enzimáticas que son de vital importancia para describir el estado metabólico de un suelo, refiriéndose a la potencialidad degradadora del mismo y a la capacidad de proporcionar fósforo inorgánico a la vid.

3.5.2.1 Actividad deshidrogenasa (EC 1.1)

La actividad deshidrogenasa en el suelo nos informa acerca de la actividad metabólica general por ser una enzima intracelular. La determinación de esta actividad enzimática se basa en el uso de aceptores finales de electrones artificiales, como el 2-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT). Se añadió 1,00 g de suelo, incubado a temperatura ambiente durante 48 h al 60% de CC, por triplicado, en tubos de vidrio junto con 2 ml de INT (0,5% p/v) y se incubó a 40°C durante 1h en agitación orbital a 120 rpm. Transcurrido este tiempo se añadieron 10 ml de la solución extractora etanol:dimetilformamida (1:1). Para cada suelo se prepararon blancos con 2 ml de agua y 1,00 g de suelo, para corregir la absorción a 490 nm de otros compuestos que pudiera haber en el suelo. Posteriormente las muestras se filtraron con papel Whatman no. 1 para eliminar material particulado, ya que interfiere en la lectura espectrofotométrica. La determinación de la actividad enzimática se realiza mediante la lectura a 490nm frente a un blanco (2 ml de agua destilada; 1,5 ml de Tris-HCl 1M pH 7,5; 10 ml de etanol:dimetilformamida).

3.5.2.2 Actividad fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1)

La fosfatasa alcalina es una enzima extracelular que se encuentra participando en el ciclo del fósforo en el suelo y permite la disponibilidad de fósforo inorgánico mediante la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico. La utilización de un sustrato cromogénico, como el p-nitrofenol fosfato (PNPP), permite la cuantificación de la actividad fosfatasa mediante la valoración del p-nitrofenol (PNP). El método para cuantificar la actividad fosfatasa se basa en la valoración espectrofotométrica a 405 nm del p-nitrofenol liberado incubando en suelo a 37°C 1 h. Para ello se pesó 1,00 g de suelo, incubado previamente durante 48 h al 60% de CC, por triplicado, y se añadieron 4 ml de tampón MUB (pH 11,0) junto con 1 ml de p-nitrofenol fosfato (0,025M). Transcurrido el tiempo de incubación se interrumpe la reacción con 1 ml de CaCl₂ (0,5 M) y 4 ml de NaOH (0,5 M). La reacción se filtró con papel Whatman no. 1 y posteriormente se efectuaron las lecturas en el espectrofotómetro a 405 nm.

3.6 Diversidad microbiana no cultivable

El 99% de los microorganismos presentes en el suelo son no cultivables, sin embargo, se pueden aplicar técnicas no dependientes de cultivo, como la PCR-DGGE, para determinar la biodiversidad microbiana edáfica.

3.6.1 Extracción de ADN

Se tomaron muestras de 4,00 g de suelo y se incubaron en tampón fosfato (50Mm, pH=6,80) durante 48h a 28°C y con una agitación orbital de 120 rpm. El sedimento se centrifugó durante 10 minutos a 4.000 rpm. Previa eliminación del sobrenadante, el ADN total de cada una de las muestras de suelo de las doce parcelas, se extrajo siguiendo el protocolo del Kit Mo Bio PowerSoil® DNA Isolation, Mo Bio Laboratories Inc. (Carlsbad, CA, USA).

3.6.2 Amplificación génica

En el suelo, la mayor parte de microorganismos se corresponden al Dominio de las bacterias y, por tanto, el perfil bacteriano de un suelo agrícola es un parámetro representativo para el estudio de la biodiversidad edáfica. El análisis polimórfico bacteriano o *fingerprinting* se llevó a cabo mediante la amplificación génica de la región V3-V5 del ADNr 16S. Para la amplificación se usó DreamTaq Green Master Mix (Thermo SCIENTIFIC), que incluye la Taq polimerasa, dNTPs, el tampón NH⁴⁺, MgCl₂ y el tampón de carga para la resolución de los productos de PCR por técnicas electroforéticas. Para evitar el efecto quelante de las trazas de ácidos húmicos y fúlvicos que pudieran contener la muestras y que inhiben la actividad polimerasa, se suplementó la reacción con BSA (0,03 mg/ml) y MgCl₂ (3 mM). Los oligonucleótidos que permitieron la amplificación de dicho fragmento son 341F-GC (5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG 3') y 907R (5' CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3'), siguiendo el programa de PCR siguiente: 95°C durante 5' para desnaturalización inicial; 30 ciclos: 95°C, 1' / 58°C, 1' / 72°C, 2'; 72°C, 10' de polimerización final; conservación a 4°C hasta la recogida. Los productos de PCR fueron conservados a una temperatura de -80°C hasta su resolución.

3.6.3 Electroforesis en Gel en Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

La resolución de los productos de PCR se realizó en gel de poli-acrilamida al 6% p/v (40% acrilamida; 37,5:1) en gradiente desnaturalizante. El gradiente de urea/formamida se preparó mediante el empleo de un generador de gradientes, en el cual se depositan 25 ml de las soluciones stock 70% y 30% de urea/formamida y se polimeriza con 100 µl (NH₄)₂S₂O₈ (10% p/v) y 18,8 µl de TEMED (Sigma-Aldrich). La cubeta del equipo *INGENY phorU System* debe contener TAE 1x a 60°C en el momento de introducir el gel. Se cargaron 25 µl de los productos de PCR en cada pocillo. El gel se sometió a una diferencia de potencial de 100V y con intensidad de 35-40mA durante 14-16h. Posteriormente se incubó el gel en 500ml de TAE 1x con 50 µl de SYBR® GOLD (Thermo) durante 60 minutos. La captura de imagen del gel se realizó con el equipo de documentación de geles SYNGENE Gen-i.

3.6.4 Software analítico

El análisis del gel DGGE se realizó mediante un programa diseñado en Matlab® R2016a. Se generaron 7 subprogramas denominados: Recortador de carriles, sumador de intensidades, amplificador, buscador de picos en el espectro, escalado lineal, índice de Shanon-Wiener y representación gráfica. Los datos resueltos mediante este análisis computacional informan sobre la biodiversidad bacteriana mediante el Índice de Shanon-Wiener. Este software se ha creado en el Dept. de Microbiología III en colaboración con el Dept. de Biomatemática de la UCM.

4. Resultados

Los procedimientos analíticos que se realizaron en las muestras de suelo del viñedo determinaron la relación local que existe entre los componentes abióticos del suelo (pH, CC, PMP) y los factores bióticos, que en esencia se complementan para producir cambios globales en el sistema edáfico de forma estacional.

4.1 Capacidad de Campo y Punto de Marchitez Permanente

La determinación de la CC permite conocer la capacidad de retención hídrica útil en un determinado suelo. Se determinó la CC en las 12 parcelas mediante la aplicación de 0,33 bares de presión en cada una de las 12 muestras. La CC En la parcela PSTM8 se obtiene el dato de 165,90 ml H₂O/kg de suelo, siendo el dato más elevado entre las parcelas estudiadas (Fig. 2). En el caso de la parcela V3 el valor de CC es 42,09 ml H₂O/kg de suelo, siendo el valor más bajo encontrado. Entre las citadas parcelas se establece un gradiente con distintos valores de CC.

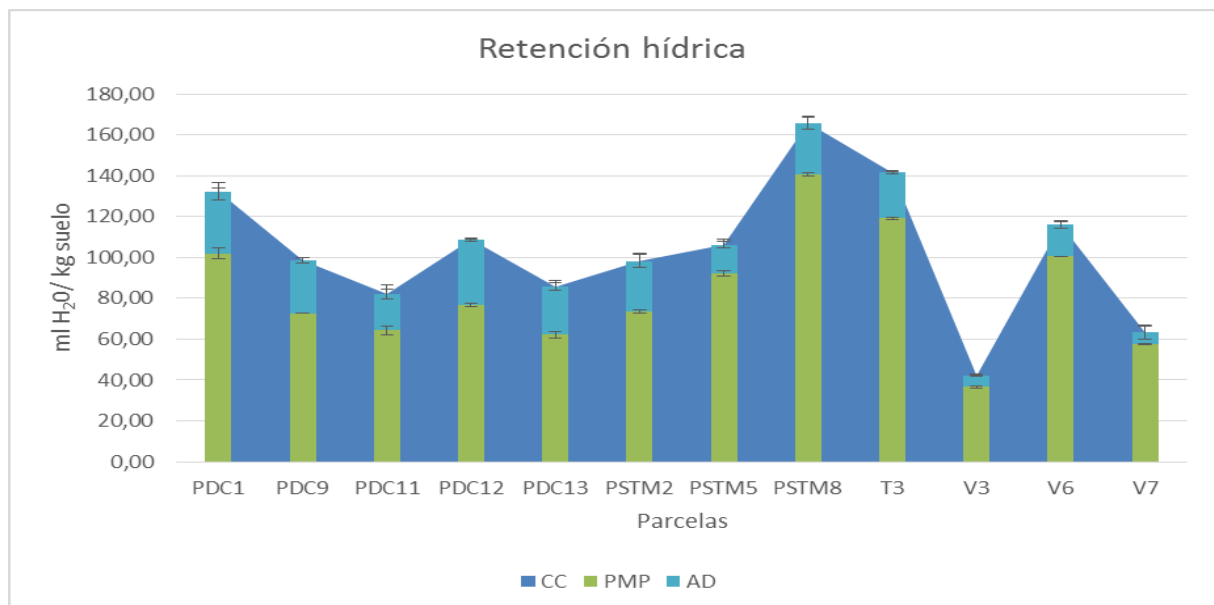


Figura 2: Retención hídrica de cada parcela estudiada definida por los parámetros CC (Capacidad de Campo), PMP (Punto de Marchitez Permanente) y AD (Agua Disponible).

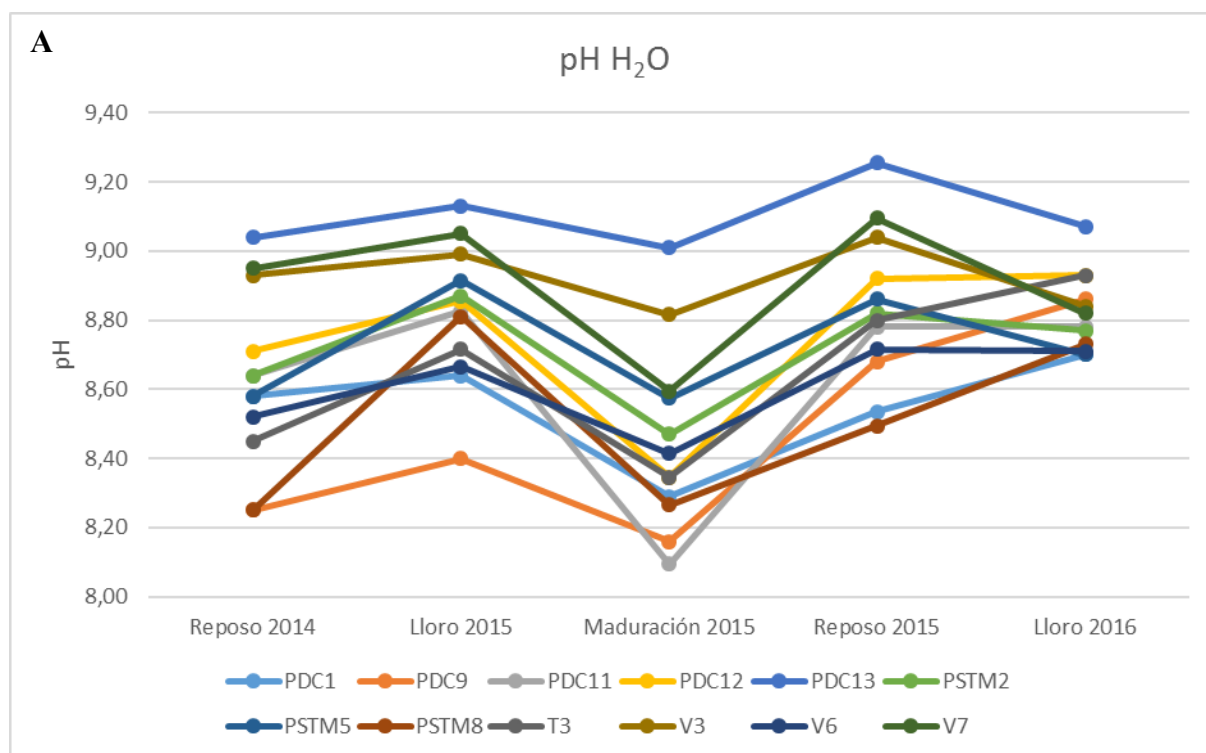
La CC y PMP determinan el Agua Disponible (AD) para una planta en un determinado entorno edáfico se define mediante la ecuación lineal $AD=CC-PMP$. Este parámetro derivado determina el agua útil para la planta, en el caso de la parcela PDC1 el valor de $AD = 30,31$ ml H₂O/kg de suelo define la parcela con un valor máximo de AD, en comparación con las demás parcelas estudiadas.

4.2 Medidas electroquímicas

El valor de pH medido en solución acuosa de las parcelas estudiadas se encuentra entre valores de 9,26 y 8,10, correspondiendo el valor más alto a la parcela PDC13 en fase de Reposo y el valor más bajo a la parcela PDC11 en fase de Maduración. La parcela PDC13 presenta los valores medios estacionales más altos de pH y la parcela PDC9 la que no mantiene el pH en el sustrato de media más bajo (**Fig. 3A**). La tendencia de evolución del pH es a la baja en el mes de septiembre, correspondiente la fase de Maduración. El promedio estacional y espacial del valor de pH es de 8,71.

De la medida del pH en solución salina de KCl (0,1M) se obtienen los siguientes datos: Los valores de pH obtenidos son más bajos en todas las parcelas que en el caso de la medida con agua; en las fases de Lloro la dispersión de los datos de pH es menor que en los estados de Maduración y Reposo, siendo esta última la que presenta mayor variabilidad; el mayor potencial ácido del suelo se encuentra en la parcela PDC1 (**Fig. 3B**).

Los valores de pH en la medida con solución salina de CaCl_2 (0,01M) son inferiores a los mostrados en las **Figuras 3A y 3B**. La parcela PDC1 no se ajusta a la tendencia que define el pH en las demás parcelas, presentando un pico en lloro de 2015 y restableciendo el pH en la fase de Reposo del mismo año (**Fig. 3C**).



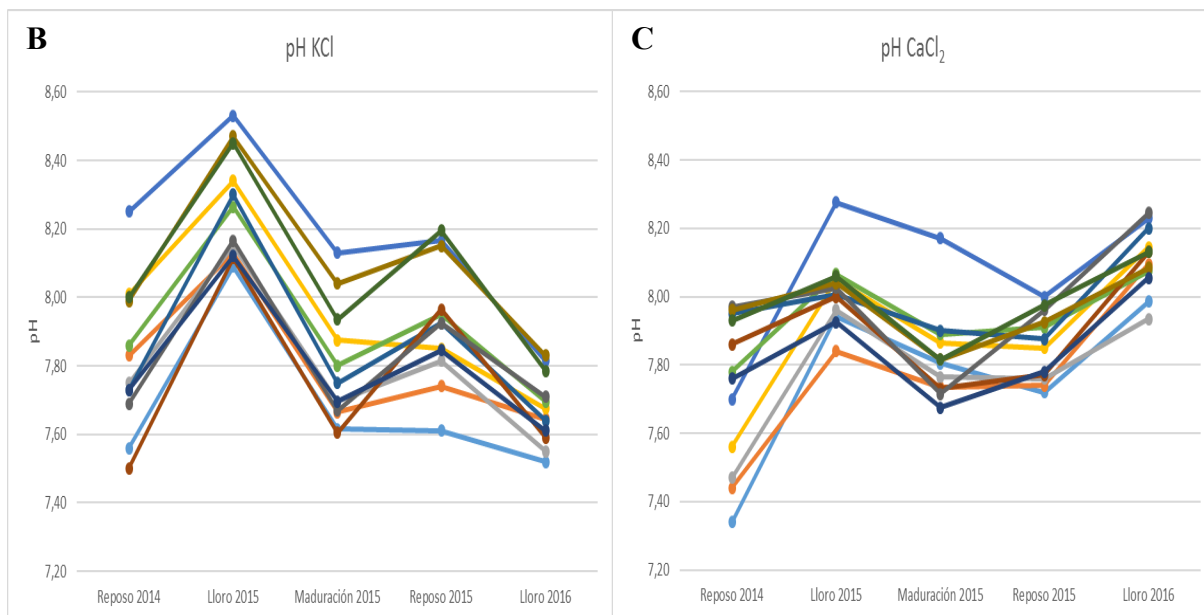


Figura 3: Valores de pH de los suelos estudiados en los años 2014 (Reposo), 2015 (Lloro, Maduración y Reposo) y 2016 (Lloro). A: Medida de pH en agua; B: Valores de pH medidos en KCl (0,1M); C: Medidas en CaCl₂.

4.3 Diversidad microbiana bacteriana viable

Los datos de abundancia relativa de las poblaciones de microorganismos procariotas estudiados permiten, atendiendo a sus actividades metabólicas específicas, realizar un estudio del suelo desde el punto de vista funcional, prestando especial atención a los requerimientos nutricionales de cada población estudiada.

Se obtienen datos de la abundancia relativa de los microorganismos procariotas viables atendiendo a sus actividades metabólicas específicas permite realizar el estudio del suelo desde un punto de vista funcional, prestando especial atención a los requerimientos nutricionales de cada población estudiada.

Durante la fase de **Reposo**, se observa gran variabilidad en los perfiles bacterianos de las diferentes parcelas. En PDC11 las bacterias movilizadoras de fósforo se encuentran en una abundancia relativa >70%. Los fijadores de nitrógeno juegan un papel importante en la parcela PDC1, con un porcentaje de abundancia relativa >70%, En las parcelas T3 y V3 la presencia de bacterias con actividad proteolítica supera el 40% de abundancia relativa.

En la fase de **Lloro** la abundancia promedio de fijadores de nitrógeno es de 43%. En la parcela V6 el grupo predominante son los Actinomicetos. Y en la parcela PDC9 se observa una marcada actividad amilolítica junto con fijadores de nitrógeno.

La abundancia de actinomicetos en el perfil microbiano edáfico define la fase de **Maduración**. Las bacterias con actividad proteolítica en la parcela T3 representan un 50% de la abundancia relativa procariota.

Es muy importante indicar la gran heterogeneidad en los recuentos microbianos de los distintos grupos analizados durante las distintas fases del desarrollo de la vid. Las poblaciones analizadas, si bien son importantes suponen un porcentaje muy pequeño en cuanto a la biodiversidad microbiana edáfica total.

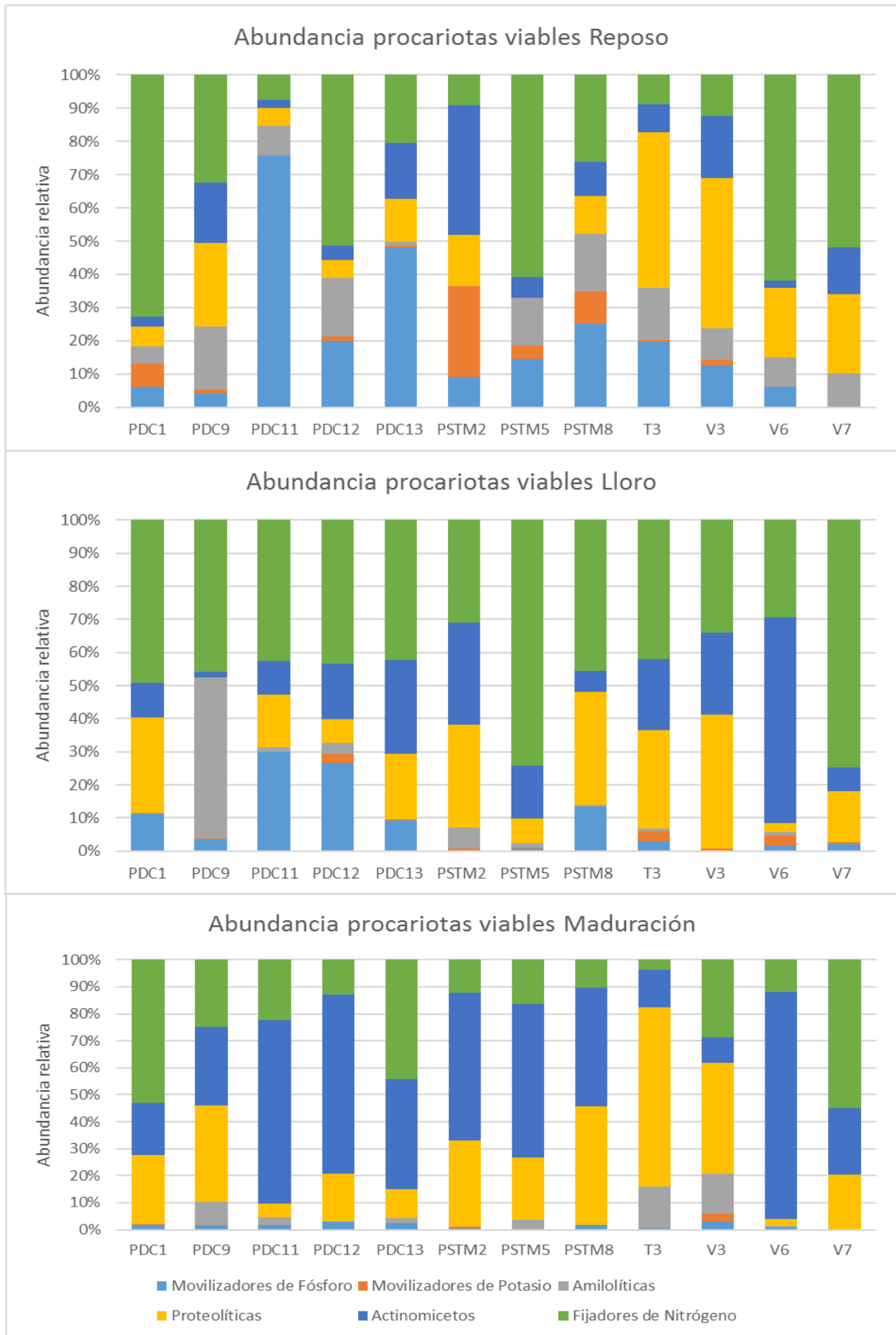


Figura 7: Abundancia relativa de Microorganismos procarionas en las fases fisiológicas de Reposo, Lloro y Maduración de la vid. Los perfiles de diversidad se analizan por cada parcela estudiada basándose en seis características ecofisiológicas de las bacterias presentes en el suelo.

4.4 Recuento de microorganismos eucariotas: Levaduras y Hongos Filamentosos

Los datos obtenidos a partir del recuento de microorganismos eucariotas (levaduras y hongos filamentosos) permiten establecer una relación espacio-temporal, atendiendo como variable temporal los tres estados fisiológicos de la vid.

Tabla 1. Porcentaje de Levaduras y Hongos filamentosos en las parcelas estudiadas. L: Levaduras, Hf: Hongos filamentosos, R14: Fase Reposo 2014, LL15: Fase Lloro 2015, M15: Fase Maduración 2015.

	PDC1	PDC9	PDC11	PDC12	PDC13	PSTM2	PSTM5	PSTM8	T3	V3	V6	V7
L R14	57,10	0,99	0,00	56,91	0,00	12,13	1,60	28,53	2,30	0,00	0,00	0,00
Hf R14	42,90	99,01	100,00	43,09	100,00	87,87	98,40	71,47	97,70	100,00	100,00	100,00
L LL15	4,76	5,01	14,62	52,32	0,41	2,76	0,59	10,98	37,70	11,11	46,48	2,78
Hf LL15	95,24	94,99	85,38	47,68	99,59	97,24	99,41	89,02	62,30	88,89	53,52	97,22
L M15	0,00	4,76	1,28	16,96	100,00	0,00	1,01	12,09	4,00	2,32	43,95	4,76
Hf M15	100,00	95,24	98,72	83,04	0,00	100,00	98,99	87,91	96,00	97,68	56,05	95,24

Los resultados indican que la parcela PDC12 mantiene de forma notable la población levaduras en el suelo a lo largo de los tres estados fisiológicos de la vid. De forma opuesta, las parcelas PDC9, PSTM5 y V7, presentan valores de abundancia relativa bajos, describiendo una alta abundancia en hongos filamentosos.

En el caso de la parcela PDC13, se observa que, la población de levaduras en la fase de Maduración supone un 100,00% de la prevalencia frente a hongos filamentosos. Siendo la abundancia en los estados de Reposo y Lloro cercana a 0,00%. La parcela que presenta una mayor abundancia relativa en los tres estados fisiológicos de la vid es PDC12, con un 42,06% de prevalencia en promedio. La presencia relativa de hongos filamentosos es muy elevada en todas las parcelas y superior al nivel de levaduras encontradas. No obstante, la presencia de estas últimas justifica su ciclo vid-suelo-bodega.

4.5 Respiración microbiana heterótrofa

La adición de glucosa como sustrato inductor de la respiración en la microbiota heterótrofa edáfica ha permitido obtener los siguientes resultados en las fases o estados fisiológicos de la vid correspondientes a Reposo, Lloro y Maduración. Además de la determinación del anterior parámetro indirecto, se ha realizado el recuento de las poblaciones microbianas heterótrofas cultivables (Bacterias, Levaduras y Hongos Filamentosos) mediante el uso de técnicas de Microbiología clásica.

El valor de la tasa máxima de respiración se ha registrado en la parcela PDC11 en fase de Reposo, con un valor de 342 mg de CO₂/kg de suelo·día. Y el valor menor de tasa en la parcela V3 en estado de Maduración con un valor de 53 mg de CO₂/kg de suelo·día. En el estado de Reposo se observa correlación significativa en suelos entre el recuento microbiano de la población heterótrofa y el SIR (Coef. correlación=0,87). En el caso de la fase de Lloro y Maduración los coeficientes de correlación, entre el recuento microbiano mediante técnicas clásicas de Microbiología, y SIR son de 0,44 y 0,49, respectivamente. No observándose, por tanto, relación aparente entre el recuento microbiano y la respiración celular heterótrofa.

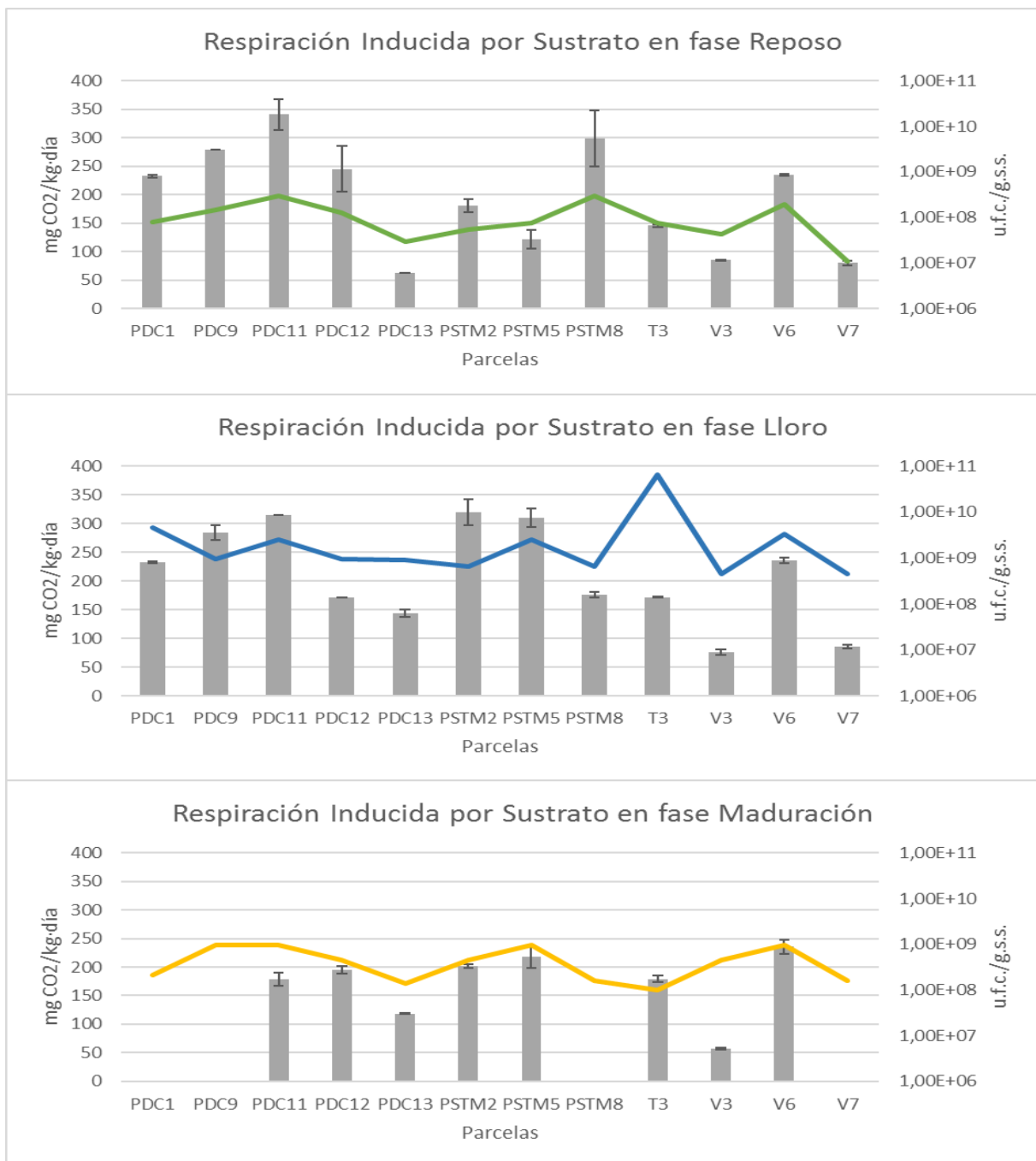


Figura 6: Respiración Inducida por Sustrato en los estados de Reposo, Lloro y Maduración de la vid. La línea continua indica el recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en ufc/gss.

4.6 Actividades enzimáticas en suelo

La cuantificación de determinadas actividades enzimáticas en un suelo determina la capacidad de este para mineralizar una enmienda y permite inferir en el estado metabólico de la población microbiana presente.

4.6.1 Actividad fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1)

Los resultados obtenidos (**Fig. 4**) muestran elevados niveles de actividad fosfomonoesterasa alcalina en el estado fisiológico de Maduración de la vid. Las parcelas con

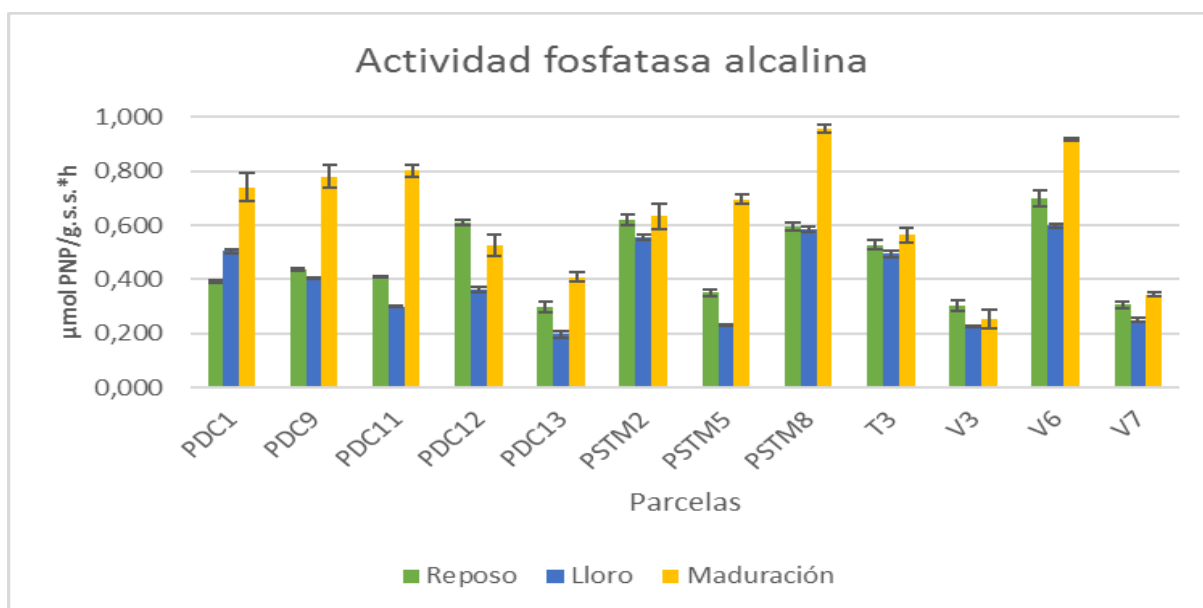


Figura 4: Datos de actividad fosfatasa alcalina en los años 2014 (Reposo), 2015 (Lloro, Maduración y Reposo) y 2016 (Lloro). La actividad se expresa en μmoles de PNP que se han generado en un gramo de suelo seco y por hora.

mayor actividad son PSTM8 y V6. Entre los estados fisiológicos de reposo y lloro no se encuentran diferencias significativas.

4.6.2 Actividad deshidrogenasa (EC 1.1)

La deshidrogenasa es una enzima intracelular y nos informa del estado metabólico global de una determinada población microbiana edáfica.

En la **Figura 5** se muestran los resultados obtenidos de la actividad deshidrogenasa destacando las parcelas PDC9, PDC11 y V6 con los valores más altos de las 12 parcelas estudiadas. En el caso de PDC 9 y PDC11 los picos de actividad se encuentran en el estado de Maduración, y en la parcela V6 el valor estacional más alto es en la fase de lloro.

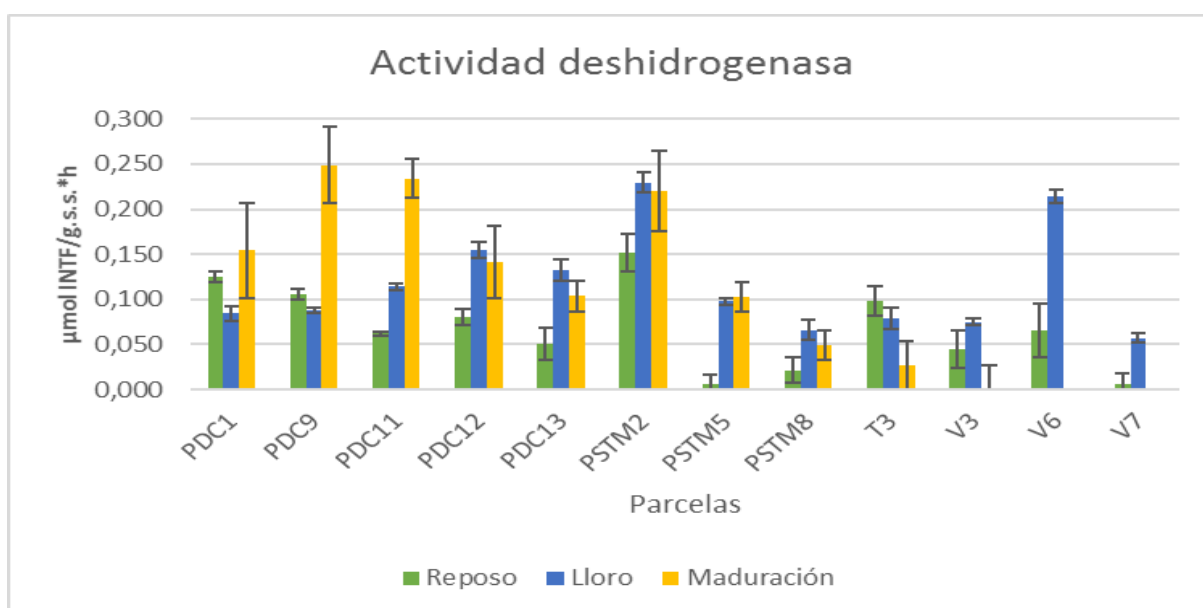


Figura 5: Datos de actividad deshidrogenasa en los años 2014 (Reposo), 2015 (Lloro, Maduración y Reposo) y 2016 (Lloro). La actividad se expresa en μmoles de INTF que se han generado en un gramo de suelo seco y por hora.

4.7 Diversidad bacteriana edáfica no cultivable

La actividad metabólica de los microorganismos en la columna edáfica no nos informa sobre la biodiversidad que se puede encontrar en el suelo. Para ello se realizó el estudio documentado en DGGE.

A la vista de los resultados se observa que en las tres fases de desarrollo de la vida las parcelas se dividen en dos grupos diferenciados en un 100% de los casos. En la fase de Reposo y Lloro, la parcela V7 se agrupa en la raíz como una parcela fuera de grupo.

En la parcela PSTM8 observamos el valor máximo y mínimo del Índice de Shannon en todas las parcelas (0,60-2,57). La mayor diversidad en promedio se encuentra en la fase de Lloro con un Índice de Shannon de 2,36 y, además corresponde con el valor más alto de Riqueza con una media de 14 especies.

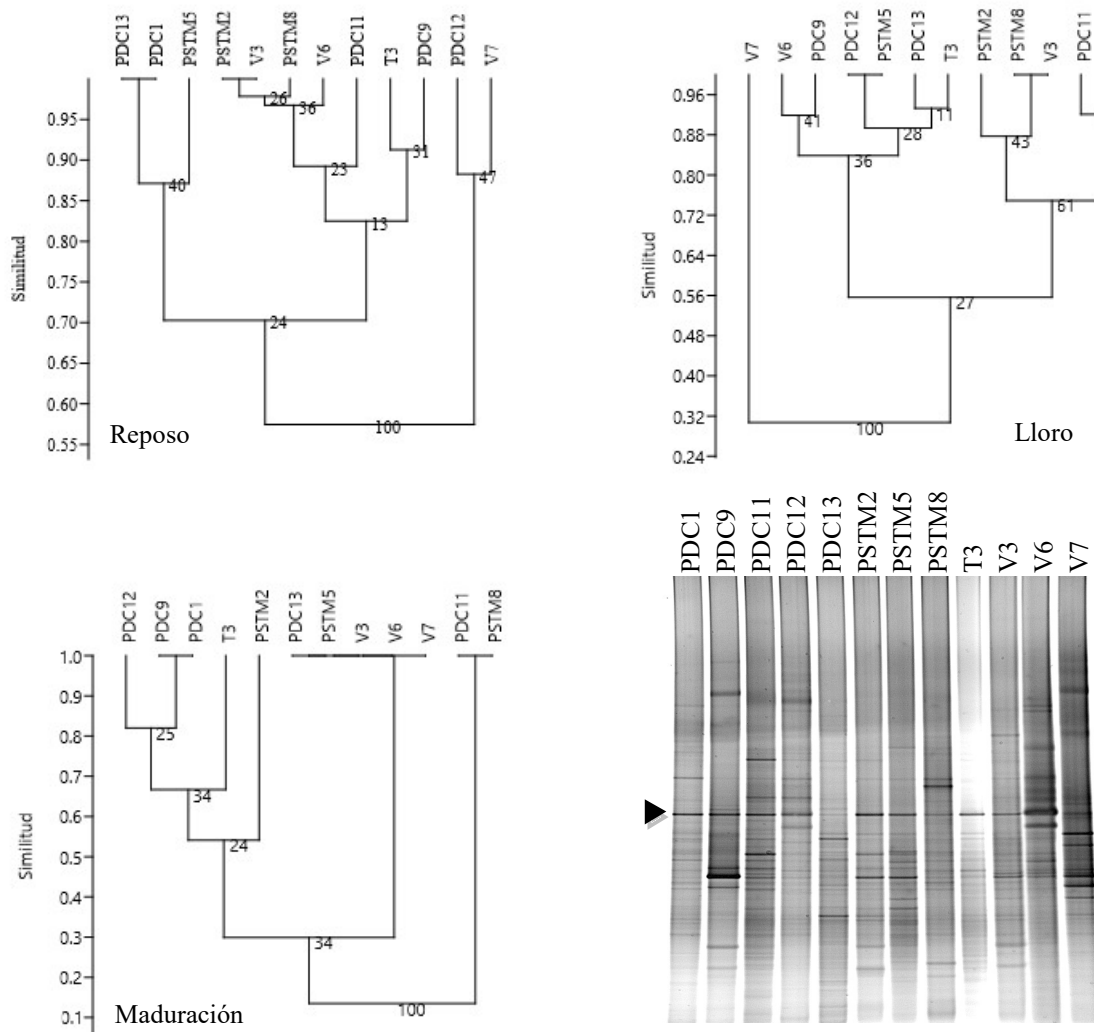


Figura 8: Dendrograma de similitud en las parcelas estudiadas atendiendo a la biodiversidad procariota. El bootstrap utilizado en el análisis es 1000. El documento DGGE mostrado indica las parcelas estudiadas en el estado de Reposo.

La fase de Maduración define los valores de Riqueza e Índice de Shannon más bajos en comparación con los estados de Reposo y Lloro. El promedio de Riqueza es 6 y el Índice de Shannon se encuentra en 1,33.

Tabla 2. Índices de Shannon-Wiener de las Parcelas estudiadas. R: Riqueza o número de bandas. H: Índice de Shannon-Wiener.

		PDC1	PDC9	PDC11	PDC12	PDC13	PSTM2	PSTM5	PSTM8	T3	V3	V6	V7
R14	R	15	11	13	10	14	11	14	12	11	12	12	9
	H	2,12	1,95	2,35	1,99	2,41	2,04	2,40	2,32	1,88	2,28	2,03	2,00
LL15	R	18	13	19	11	10	17	11	16	11	16	12	9
	H	2,67	2,30	2,53	2,13	2,12	2,71	2,25	2,57	2,08	2,63	2,39	1,88
M15	R	4	4	2	5	9	3	9	2	5	9	9	9
	H	1,36	1,34	0,68	1,24	1,75	0,92	1,99	0,60	1,00	1,61	1,70	1,73

5. Discusión

5.1 Retención hídrica

La Capacidad de Campo, definida a través de la clase textural del suelo, varía en relación a la capacidad de retención hídrica (Cassel and Nielssen 1986, Zhen-tao *et al.*, 2014). Los valores de capacidad de campo CC obtenidos en este estudio oscilan entre 165,90 ml H₂O/kg de suelo, para la parcela PSTM8, que corresponde a un suelo con un contenido en materiales geológicos de gran porosidad como las arcillas y de 42,09 ml H₂O/kg de suelo, para la parcela V3, indicando un alto porcentaje en materiales silíceos de baja porosidad tales como arenas de diferente granulometría. Entre ese máximo y mínimo de CC de las parcelas PSTM8 y V3 se observa una gradación en los valores, indicando una disminución de materiales geológicos porosos conjuntamente con un incremento del porcentaje de arenas según disminuye la CC (Zettl *et al.*, 2011). Un alto valor de CC no tiene que corresponder necesariamente con un valor de AD elevado (Coef. correlación=0,65), como es el caso de la parcela PDC1 con un valor de AD = 30,31 ml H₂O/kg de suelo, siendo esta la parcela que mayor AD presenta no relacionándose con el valor máximo de CC. Esto puede ser debido a componentes mineralizados de materia orgánica aplicada en forma de enmienda, tales como ácidos húmicos y/o fúlvicos (Bárta *et al.*, 2010; Moreno and Benitez, 2016).

El PMP se determina la cantidad de agua que no se encuentra disponible en el suelo debido a que la planta cultivada no es capaz de generar una presión negativa mayor a 15,0 bares. De esta forma se observa una accesibilidad hídrica menor cuanto mayor es el valor de PMP debido a las características del material geológico, definiendo una mayor pérdida de agua en materiales menos porosos, como pueden ser arenas de diferente granulometría, y menor eflujo en materiales arcillosos (Zupanc and Justin, 2010; Öztekin, 2013). El PMP se relaciona linealmente (Coef. correlación =0,97) con la CC debido a la contribución intrínseca de los materiales geológicos que determinan los dos parámetros de retención hídrica.

5.2 pH

El pH del suelo define las interacciones entre el componente mineral y la microbiota, estableciendo un determinado entorno electroquímico que pueda interactuar con el sistema suelo-planta-atmósfera (Manoli *et al.*, 2016). Los valores de pH observados tienen un valor promedio de 8,71, estos valores definen un suelo fuertemente alcalino (USDA, 1998), estos valores tan elevados son debidos a que en las parcelas se encuentran conos de eyección de

CaCO₃ o que la trayectoria fluvial de este material atraviesa estos suelos, elevando así el pH. En el caso del estado fisiológico de Lloro, el valor de pH aumenta de forma global en todas las parcelas, debido al gran aporte hídrico estacional, pues en los meses de abril y mayo se suceden importantes episodios pluviales en esta zona debido a la influencia del clima oceánico (AEMET, 2012). Permitiendo un transporte de electrolitos a favor de gravedad, y este proceso interviene de forma dramática en la composición de la microbiota edáfica y su metabolismo (García-Salamanca *et al.*, 2013).

5.1 Recuento microbiano

Los perfiles de abundancia bacteriana, basados en las características metabólicas que contribuyen a la riqueza nutricional edáfica, difieren de forma notable entre los diferentes estados fisiológicos de la vid.

En el periodo de **Reposo**, se observa gran variabilidad en los perfiles bacterianos de las diferentes parcelas. En PDC11 las bacterias movilizadoras de fósforo se encuentran en una abundancia relativa >70%, mineralizando el fósforo orgánico en inorgánico moduladas por señales de la raíz vegetal (Fernández *et al.*, 2008). Los fijadores de nitrógeno juegan un papel importante en la parcela PDC1, esto es debido a que en la fase de Reposo anterior se sembró cebada para extraer el exceso de nitrógeno de forma puntual, pero a lo largo del año esta parcela se enriqueció en materia vegetal, mineralizando de nuevo este macronutriente. En las parcelas T3 y V3 la presencia de bacterias con actividad proteolítica indica un enriquecimiento del suelo, en fases anteriores, con algún tipo de enmienda rica en proteínas.

La prevalencia media de abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno en la fase de **Lloro** es de 43%, indicando la necesidad fisiológica por parte de la vid de nutrientes nitrogenados para la generación foliar característica en este periodo. En la parcela V6 el grupo predominante son los Actinomicetos. Y en la parcela PDC9 se observa una marcada actividad amilolítica.

El orden *Actinomycetales* se caracteriza por ser productor de antibióticos (Gebreyohannes *et al.*, 2013) que puedan disminuir la abundancia relativa de las demás poblaciones edáficas, en la fase de **Maduración** la abundancia de este orden ha podido influir en el perfil microbiano edáfico. Los Actinomicetos resisten condiciones de stress hídrico debido a la resistencia en formas esporuladas, es posible que desde meses posteriores a la fase de Lloro hayan contribuido a la movilización de nutrientes por su capacidad micorrízica (Poovarasan *et al.*, 2013). Las bacterias con actividad proteolítica en la parcela T3 representan un 50% de la abundancia relativa procariota en el estado fisiológico de Maduración, esto puede ser debido a la caída de la uva en el suelo aumentando la actividad oxidativa bacteriana y posteriormente aumentando la población con actividad proteolítica degradando componentes celulares de bacterias senescentes.

Las bacterias movilizadoras de potasio no contribuyen en este entorno agrícola debido a que los suelos vitivinícolas se definen como suelos con baja o muy baja concentración de este ion o sus sales (Van Leeuwenhoek, 2015).

Una buena parte de esta heterogeneidad viene definida por la incorporación de enmiendas orgánicas, cambios en la humedad del suelo, sin olvidar la orografía del terreno y su composición.

5.2 Respiración Inducida por Sustrato

La respiración inducida por sustrato es una medida indirecta que sirve para determinar la actividad biológica de los microorganismos heterótrofos en los suelos (Salazar-Villegas *et al.*, 2016). Hemos observado que la tasa de respiración observada, en la fase de Reposo, se

correlaciona positivamente con el recuento de microorganismos heterótrofos viables (bacterias, levaduras y hongos filamentosos). El coeficiente obtenido ha sido de $R^2=0,87$ ($p<0,05$), aunque es elevado para el análisis de suelos por su baja homogeneidad, no permite explicar la correlación de las dos medidas en su totalidad. Esto puede ser debido a que el recuento microbiológico de heterótrofos viables únicamente permite determinar el número de microorganismos cultivables mientras en el caso del SIR se analiza la actividad respiratoria de microorganismos viables cultivables y no cultivables. La diferencia del coeficiente de correlación hasta la unidad estaría justificada por la imposibilidad de cultivar ciertas especies microbianas en los medios de cultivo en el laboratorio.

El pH del suelo promedio por parcela medido en agua respecto al SIR promedio presenta un coeficiente de correlación de $R^2=0,85$. Indica que la tasa de respiración disminuye al aumentar el pH según la ecuación lineal $SIR = 3064,59 - 329,36 \cdot pH_{H_2O}$, con un nivel de confianza del 95,0 %. Es posible que el CO_2 se fije en el sustrato con un pH básico formando el anión HCO_3^- soluble agua sin llegar a la cámara de fijación de CO_2 , donde el KOH no produce el cambio de potencial esperado por la ausencia del anhídrido carbónico (Aciego-Pietria and Brookesb, 2008).

5.3 Actividades enzimáticas:

5.3.1 Actividad fosfatasa alcalina

Las fosfatasas microbianas son enzimas muy importantes dentro de los suelos agrícolas, pues permiten la transformación de fósforo por acción de los microorganismos de forma orgánica a inorgánica permitiendo así su asimilación por parte de las plantas (Bergkemper *et al.*, 2016). Las fosfatasas ácidas se localizan principalmente en suelos ácidos, mientras que las alcalinas predominan en suelos con pH básico (Dick and Tabatabai 1993). En este estudio se ha analizado la fosfomoclerasa alcalina debido a que el promedio anual de pH del suelo de 8,71. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación permitieron determinar que la actividad fosfatasa ácida en estos suelos es nula. Los valores de actividad fosfatasa obtenidos oscilan entre 31,6 mg y 132,9 PNP/kg·h, siendo mayores que en otros cultivos agrícolas como el de soja, en los cuales se encuentran entre 5,7-15,5 mg PNP/kg·h, observando que, en comparación a nuestros análisis, los valores son inferiores debido al pH ácido del suelo (Fernández *et al.*, 2008). Y similares a los analizados en plantaciones de maíz con un pH de 8,5, con un valor de 130,0 mg PNP/kg·h en el horizonte O (García-Salamanca *et al.*, 2013). Los valores obtenidos indican un alto potencia de mineralización del fósforo mediado por bacterias cultivables y no cultivables con actividad fosfatasa en el suelo.

5.3.2 Actividad deshidrogenasa

La actividad microbiana en el suelo es un elemento decisivo en el funcionamiento edáfico, además de un importante indicador de fertilidad (De Vries and Shade, 2013; Swędrzyńska and Grześ, 2015). Las enzimas deshidrogenasas presentes en los microorganismos edáficos viables independientes de cultivo, permiten determinar la actividad microbiana total del suelo (Wolińska and Bennicelli, 2010; Wolińska *et al.*, 2013). Este ensayo enzimático es un potente indicador de la calidad operacional del suelo, muy sensible en la práctica agrícola, e incluso permitiendo inferir en el uso pretérito del suelo. (Jia *et al.*, 2010; Martinez-Selgado *et al.*, 2010).

Aunque los suelos vitivinícolas son pobres en nutrientes (cita), los microorganismos que participan en el suelo pueden desarrollar una alta actividad enzimática reductasa que sea capaz de oxidar la materia orgánica aplicada en forma de enmienda. En los ensayos realizados

en este estudio se obtuvieron valores de actividad deshidrogenasa entre 0 y 117 mg INTF/kg·h, siendo la media 44 mg INTF/kg·h, estos datos indican una elevada actividad deshidrogenasa si comparamos con cultivos de maíz del sur de España con un valor 8 mg INTF/kg·h de actividad enzimática (García-Salamanca *et al.*, 2013). Por tanto, podemos concluir, que las muestras de suelo analizadas presentan una alta actividad deshidrogenasa, indicando una calidad metabólica del suelo excelente y un gran potencial en la mineralización de la materia orgánica aplicada.

5.4 DGGE

En entornos edáficos, la población bacteriana edáfica se encuentra representada por géneros de bacterias no cultivables, representando el 99% de la población (Roszak, *et al.*, 1987; Torsvik, *et al.*, 1990). Los suelos donde se realizan prácticas agrícolas presentan una riqueza de 140-150 especies por gramo, en comparación con suelos naturales en los que hay miles de especies microbianas diferentes por gramo (Torsvik *et al.* 2002; Tscharncke *et al.*, 2012). Por ello es de vital importancia la utilización de técnicas que sean independientes de cultivo y permitan determinar la biodiversidad procariota en suelos vitivinícolas (Van Leeuwenhoek, 2015).

Las bacterias no cultivables representan un papel importante en el suelo por su actividad metabólica. Por este motivo se estudian actividades enzimáticas y respiración en el suelo, para tener una medida indirecta de la actividad, pero sin llegar a definir la diversidad bacteriana sino una medida total de población microbiana (García-Salamanca *et al.*, 2013). Para el estudio de la diversidad procariota se ha utilizado la técnica PCR-DGGE y posteriormente se ha analizado la imagen mediante un programa de densitometrado creado por nuestro equipo. El programa diseñado para el análisis permite establecer un umbral mediante una ratio de señal/ruido > 1,6. De esta forma se analizan únicamente las bandas representativas ajustando la intensidad de los pixels a la visión humana mediante regresión logarítmica. La salida de datos ha permitido realizar un análisis de *clustering* (**Fig. 8**) para estimar la similitud, en valores de biodiversidad, de los suelos estudiados. En Reposo se observan tres grupos diferentes de suelos, en los cuales PDC12 y V7 forman un *cluster* independiente de los demás. La fase Lloro se articula desde la parcela V7, que se encuentra fuera de grupo de las demás parcelas de esta explotación vitivinícola. Es posible que la realización de una canalización que atraviesa esta parcela, para desviar el cono de eyección aluvial, haya afectado al curso habitual del agua y por este motivo sea muy poco similar a las demás. De la misma forma que en Reposo, se forman dos grupos de similitud: en el primero las parcelas PDC12 y PSTM5 presentan un índice de similitud de 1,00; y en el segundo grupo las parcelas PSTM8 y V3 también presentan el mismo índice, no hay desviación en biodiversidad. En general el patrón gráfico del análisis de *clustering* determina una agrupación variable entre las diferentes parcelas. Sin embargo, en el caso de Maduración, se establece una marcada agrupación entre las parcelas PDC13, PSTM5, V3, V6 y V7 fruto del laboreo propio en época de cosecha, homogeneizando la tensión de oxígeno en el suelo y disminuyendo la biodiversidad procariota, indicando un índice de Shannon menor que en Reposo y Lloro (**Tabla 2**). Destaca la banda en la DGGE de la **Fig. 8** que se mantiene constante en todas las parcelas estudiadas. Debido a que se trata de un entorno vitivinícola, podemos pensar que se trata de las mitocondrias presentes en levaduras que se encuentran en suelo.

Aunque aparentemente los suelos vitivinícolas estudiados presentan las mismas características físico-químicas, la biodiversidad presente en estos determina la relación entre la microbiota edáfica y la vid. Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo son muy complejos y requieren una toma de muestras que excede a la que se ha realizado para este TFM. Así pues, además de aumentar el número de muestras analizadas, es necesario

incorporar un estudio metagenómico del suelo que permita determinar con más precisión las poblaciones microbianas presentes en el mismo a lo largo del ciclo de la vida y su influencia en la fertilidad.

6. Conclusiones

1. La respiración inducida por sustrato parece ser un buen método para correlacionar la cantidad de microorganismos heterótrofos cultivables del suelo y su actividad metabólica. No obstante, hay que tener en cuenta que, en suelos fuertemente alcalinos, la tasa de respiración disminuye al aumentar el pH del suelo, este factor hace que la medida obtenida en la respiración sea inferior a la real.
2. Los niveles de actividades fosfomonoesterasa alcalina y deshidrogenasa en los suelos analizados presentan niveles elevados en las fases de Maduración y Lloro, similares a los encontrados en otros suelos agrícolas, indicando que en estas fases existe una elevada actividad microbiana en el suelo para aportar nutrientes a las plantas.
3. A lo largo las fases del ciclo de la vida se observa una gran heterogeneidad en los recuentos de los grupos de microorganismos viables edáficos estudiados. Durante la fase de reposo no se observa la predominancia de ningún grupo microbiano, mientras que en la fase de Lloro predominan las bacterias fijadoras de nitrógeno, las movilizadoras de fósforo, proteolíticas y actinomicetos, y durante la fase de Maduración se observa un predominio mayoritario de los actinomicetos. Estas variaciones poblacionales pueden estar relacionadas con las necesidades nutricionales de las plantas, la incorporación de enmiendas o incluso el aporte de azúcares que proviene de las bayas y que se incorporan al suelo durante la cosecha y poda.
4. Los estudios mediante la técnica de PCR-DGGE han permitido comprobar la gran heterogeneidad poblacional procariota presente en cada una de las parcelas analizadas. La biodiversidad se ve reducida dramáticamente durante la fase de Maduración debido a prácticas de laboreo y la prevalencia de microorganismos como los actinomicetos. Para poder realizar un análisis más completo de la microbiota edáfica cultivable y no cultivable es preciso ampliar este trabajo con el empleo de técnicas metagenómicas.

El presente estudio ha permitido la caracterización integral de las variables bióticas y abióticas que se suceden en el suelo y su comprensión en el medio agrícola. Debido a la heterogeneidad del material edáfico, las interacciones entre los parámetros físicos-químicos-biológicos suponen un reto a la hora de la interpretación. El conocimiento profundo de estas interacciones nos permitirá, en un futuro próximo, evitar procesos de desertización por explotación agrícola. Definiendo un punto de partida para el compromiso entre actividad antropogénica y sostenibilidad.

7. Bibliografía

- Aciego-Pietria, J.C., and Brookes, P.C. (2008) Relationships between soil pH and microbial properties in a UK arable soil. *Soil Biol Biochem* **40**: 1856–1861. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.03.020
- AEMET. (2012). Guía resumida del clima en España 1981-2010. URL <http://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/datosclimatologicos/valoresclimatologicos?l=2422&k=cle>
- Alexander, M. (1981) Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* **211**: 132–138.
- Balser, T.C., Kinzig, A.P., and Firestone, M.K. (2002) Linking soil microbial communities and ecosystem functioning. In *The Functional Consequences of Biodiversity: Empirical Progress and Theoretical Extensions (MPB-33)*. Kinzig, A. P., Pacala, S. W. and Tilman, D. (eds). Princeton: Princeton Univ. Press, pp. 265–293.
- Bárta, J., Melichová, T., Vaněk, D., Pícek, T., and Šantrůčková, H. 2010. Effect of pH and dissolved organic matter on the abundance of nirK and nirS denitrifiers in spruce forest soil. *Biogeochemistry*. 101(1-3): 123-132.
- Bartha, R., and Atlas, M. (2001) *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. N.Y., USA: Addison-Wesley, pp. 217–262.
- Beare, M.H., Parmelee, R.W., Hendrix, P.F., and Cheng, W. (1992) Microbial and faunal interactions and effects on litter nitrogen and decomposition in agroecosystems. *Ecol Monogr* **62**: 569–591.
- Becking, J. (2006) The family azotobacteraceae. *Prokaryotes* **6**: 759–783. doi: 10.1007/0-387-30746-x_26
- Berg, G., and Smalla, K. (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* **68**: 1–13. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x
- Bergkemper, F., Kublik, S., Lang, F., Krüger, J., Vestergaard, G., Schloter, M., and Schulz, S. (2016) Novel oligonucleotide primers reveal a high diversity of microbes which drive phosphorous turnover in soil. *J Microbiol Methods* **125**: 91–97. doi: 10.1016/j.mimet.2016.04.011
- Bramley, R.G.V., and White, R.E. (1989) The effect of pH, liming, moisture and temperature on the activity of nitrifiers in a soil under pasture. *Aust J Soil Res* **27**: 711–724.
- Brejda, J.J., Moorman, T.B., Karlen, D.L., and Dao, T.H. (2000) Identification of regional soil quality factors and indicators: I. Central and southern high plains. *Soil Sci Soc Am J* **64**: 2115–2124.
- Cassel, D.K., and Nielsen, D.R. (1986) Physical and Mineralogical Methods – Agronomy Monograph no. 9. In *Methods of Soil Analysis. Part 1. (2nd Edition)*. Klute, A. (eds). Wisconsin: American Society of Agronomy – Soil Science Society of America, pp. 901–924.
- Chappel M.J., and LaValle L.A. (2011) Food security and biodiversity; can we both? An agroecological analysis. *Agric Hum Val* **28**: 3–26. doi: 10.1007/s10460-009-9251-4
- De Vries, F.T., and Shade, A. (2013) Controls on soil microbial community stability under climate change. *Front Microbiol* **4**: 256. doi: 10.3389/fmicb.2013.00265
- Dick, W. A., and Tabatabai, M. A. (1993) Significance and potential uses of soil enzymes. In *Soil Microbial Ecology*. B. Metting (eds). New York: Marcel Dekker, pp. 95-127.
- Doran, J.W., and Parkin, T.B. (1994) Defining and assessing soil quality. In *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Doran, J.C., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., and Stewart, B.A. (eds). Madison: SSSA Special Publication. Vol 35. Soil Science Society of America, pp. 3–21.
- FAO. (2005). Optimización de la humedad del suelo para la producción vegetal. <http://www.fao.org/docrep/008/y4690s/y4690s02.htm#TopOfPage>
- FAO. (2015). AQUASTAT. URL <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/main/index.stm>
- Fernández, L.A., Sagardoy, M.A., and Gómez, M.A. (2008). Estudio de la fosfatasa ácida y alcalina en suelos de la Región Pampeana Norte del área sojera argentina. *Ciencia del suelo* **26**: 35-40. EISSN 1850-2067

- García-Salamanca, A., Molina-Henares, M.A., Van Dillewijn, P., Solano, J., Pizarro-Tobías, P., Roca, A., *et al.* (2013) Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. *Microb Biotechnol* **6**: 36–44. doi: 10.1111/j.1751-7915.2012.00358.x
- Gebreyohannes, G., Moges, F., Sahile, S., and Raja, N. (2013) Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed* **3**: 426–435. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60092-1
- Gómez Alvarez, R. (2000) Elaboración de abonos orgánicos con bajos insumos en las condiciones del productor rural. In *Memoria del Primer Seminario de Investigación Científica y Tecnológica sobre El Istmo de los Estados de Veracruz, Chiapas, Tabasco y Oaxaca*. México: ECOSUR, Unidad Tabasco.
- Guzmán, E. (2011) Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de cuatro suelos de la provincia de Chimborazo. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Heinemeyer, A., and Fitter, A.H. (2004) Impact of temperature on the arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis: growth responses of the host plant and its AM fungal partner. *J Exp Bot* **55**: 525–534. doi: 10.1093/jxb/erh049
- Jia, G.M., Zhang, P.D., Wang, G., Cao, J., Hang, J.C., and Huang, Y.P. (2010) Relationship between microbial community and soil properties during natural succession of abandoned agricultural land. *Pedosphere* **20**: 352–360. doi: 10.1016/S1002-0160(10)60024-0
- Karlen, D.L., Mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F., and Schuman, G.E. (1997) Soil quality: a concept, definition and framework for evaluation. *Soil Sci Soc Am J* **61**: 4–10.
- Luna, M.L., Vega, C., Franco, M.O. Vásquez, S. Trujillo, N., Ramírez, E., and Dendooven, L. (2002) Actividad microbiana en suelos. *Avance y Perspectiva (XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería)* **21**: 328–331.
- Manoli, G., Domec, J.C., Novick, K., Oishi, A.C., Noormets, A., Marani, M., and Katul, G. (2016) Soil-plant-atmosphere conditions regulating convective cloud formation above southeastern US pine plantations. *Glob Chang Biol* **22**: 2238–2254. doi: 10.1111/gcb.13221
- Martínez-Salgado, M.M., Gutiérrez-Romero, V., Janssens, M., Ortega-Blu, R. (2010) Biological soil quality indicators: a review. In *Current Research, Technology And Microbiology And Microbial Biotechnology*. Méndez Vilas, A. (eds). Badajoz: Formatex Research Centre, pp. 319–328.
- Mikhnovskaya, A.D., Kirichenko, T.P., and Panchenko, V.P. (1993) Microbiological processes of transformation of organic matter with different cultivation practices of typical chernozem. *Eurasian Soil Sci* **25**: 100–109.
- Moreno, B., and Benitez, E. (2016) Impact of agricultural management on bacterial laccase-encoding genes with possible implications for soil carbon storage in semi-arid Mediterranean olive farming. *PeerJ* **4**: e2257. doi: 10.7717/peerj.2257
- Mustafa, G., Kookana, R.S., and Singh, B. (2006) Desorption of cadmium from goethite: Effects of pH, temperature and aging. *Chemosphere* **64**: 856–865. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.10.041
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G. and Renella, G. (2003) Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* **54**: 655–670. doi:10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x
- Olalde, V.P., Aguilera, L.I. (1998) Microorganismos y Biodiversidad. *Terra* **16**: 289–292.
- Öztek, T. (2013) Short-term effects of land leveling on irrigation-related some soil properties in a clay loam soil. *The Scientific World Journal* **2013**: Art. ID 187490, 16 pp. doi: 10.1155/2013/187490
- Poovarasan, S., Sukhada Mohandas, Paneerselvam, P., Saritha, B., Ajay, K.M. (2013) Mycorrhizae colonizing actinomycetes promote plant growth and control bacterial blight disease of pomegranate (*Punica granatum* L. cv Bhagwa). *Crop Protection* **53**: 175–181. doi: 10.1016/j.cropro.2013.07.009
- Roper, M.M., and Ophel-Keller, K.M. (1997) Soil microflora as bioindicators of soil health. In *Biological Indicators of Soil Health*. Pankhurst, C., Doube, B.M., and Gupta, V.V.S.R. (eds). Wallingford: CAB Internacional, pp. 157-177.

- Roszak, D., and Colwell, R. (1987) Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viables count. *Appl Environ Microbiol* **52**: 2889–2893.
- Salazar-Villegas, A., Blagodatskaya, E., and Dukes, J.S. (2016) Changes in the size of the active microbial pool explain short-term soil respiratory responses to temperature and moisture. *Front Microbiol* **7**: 524. doi: 10.3389/fmicb.2016.00524
- Shober, A.L., Stehouwer, R.C., and Macneal, K.E. (2003) On-farm assessment of biosolids effects on soil and crop tissue quality. *J Environ Qual* **32**: 1873–1880.
- Six, J., Frey, S. D., Thiet, R.K., and Batten, K.M. (2006) Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Sci Soc Am J* **70**: 555–569. doi: 10.2136/sssaj2004.0347
- Sun, H.Y., Deng, S.P. and Raun, W.R. (2004) Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5868–5874. doi: 10.1128/AEM.70.10.5868-5874.2004
- Swędryńska, D., and Grześ, S. (2015) Microbiological parameters of soil under sugar beet as a response to the long-term application of different tillage systems. *Pol J Environ Stud* **24**: 285–294. doi: 10.15244/pjoes/25102
- Torsvik V., Øvreås L., and Thingstad T.F. (2002) Prokaryotic diversity -- magnitude, dynamics and controlling factors. *Science* **296**: 1064–1066. doi: 10.1126/science.1071698
- Torsvik, V., Goksøyr, J., and Daae, F.L. (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**: 782–787.
- Tscharntke T., Clough Y., Wanger T.C., Jackson L., Motzke I., Perfecto I., *et al.* (2012) Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. *Biol Conserv* **151**: 53–59. doi: 10.1016/j.biocon.2012.01.068
- USDA. (1998). Soil quality indicators: pH. URL http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_052208.pdf
- USDA. (1999). Guía para la evaluación de la calidad y salud del suelo. URL http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/stelprdb1044786.pdf
- Van Leeuwen, C., and Seguin, G. (2006) The Concept of Terroir in Viticulture. *J Wine Res* **17**: 1–10. doi: 10.1080/09571260600633135
- Wolińska, A., and Bennicelli, R.P. (2010) Dehydrogenase activity response to soil reoxidation process described as varied conditions of water potential, air porosity and oxygen availability. *Pol J Environ Stud* **19**: 651–657.
- Wolińska A., Stępniewska Z., and Szymańska E. (2013) Dehydrogenase activity of soil microorganisms and total DNA level in soil of different use. *J Agric Sci Tech B* **3**: 613–622.
- Woomer, P.L. (1994) Most probable number counts. In *Methods of Soil Analysis, Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*. Weaver, R.W., Angle, J.S., and Bottomley, P.S. (eds). Madison: Soil Science Society of America, pp. 59–79.
- Zettl, J.D., Barbour, S.L., Huang, M., Si, B.C., and Leskiw, L.A. (2011) Influence of textural layering on field capacity of coarse soils. *Can J Soil Sci* **91**: 133–147. doi: 10.4141/CJSS09117
- Zhen-tao, CONG., Hua-fang, LÜ., and Guang-heng, NI. (2014) A simplified dynamic method for field capacity estimation and its parameter analysis. *Water Science and Engineering* **7**: 351–362. doi: 10.3882/j.issn.1674-2370.2014.04.001
- Zupanc, V., and Justin M.J. (2010) Changes in soil characteristics during landfill leachate irrigation of *Populus deltoides*. *Waste Management* **30**: 2130–2136. doi: 10.1016/j.wasman.2010.05.004

Lista de abreviaturas

AD: Agua Disponible.

CC: Capacidad de Campo.

DGGE: *Denaturing gradient gel electrophoresis*; Gel de Electroforesis en Gradiente Desnaturalizante.

g.s.s.: Gramo de suelo seco.

h: Horas.

HR: Humedad Relativa.

INT: *2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride*.

INTF: *2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride formazan*.

mA: mili-Amperios.

MUB: *Modified Universal Buffer*.

NMP: Número Más Probable.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*; Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PDA: *Potato Dextrose Agar*.

PMP: Punto de Marchitez Permanente.

PNP: *p-nitrophenol*.

PNPP: *p-nitrophenol fosfate*.

TEMED: *Tetramethylethylenediamine*.

TSA: *Tryptone Soya Agar*.

V: Voltios.