

Análisis molecular de la biodiversidad microbiana en suelos de Andalucía afectados por incendios ¹

J. Rodríguez¹, A. Turmero¹, M.I. Pérez Leblic¹, M. Hernández¹, J.M. Molina¹, J.B. González-Sitges², J.C. Costa³, F.J. González-Vila⁴, J.A. González- Pérez⁴ y M.E. Arias¹

Introducción

En los últimos años se ha incrementado notablemente el interés por el estudio de los microorganismos presentes en el suelo como indicadores del estado de salud del mismo (Arias y col., 2005). Los microorganismos han sido descritos como el motor de los ecosistemas terrestres (Killham, 1994), dado su papel en la mineralización y transformación de la materia orgánica. Estos organismos ayudan a mantener la estructura del suelo, ya que actúan como agentes cementantes que estabilizan los agregados del mismo (Elliott y col., 1996). La utilización de la diversidad microbiana como indicativo de la capacidad de los suelos para responder ante condiciones de estrés, como es el caso de los incendios forestales, resulta clave para conocer la capacidad de los ecosistemas perturbados para recuperarse y sustentar así la actividad biológica.

El fuego afecta a las comunidades microbianas del suelo y a su estructura trófica, lo que modifica los procesos de reciclaje de los materiales orgánicos y provoca pérdidas de estructura y cambios en sus propiedades físicas y biológicas. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los efectos del fuego sobre las propiedades coloidales del suelo y sobre las comunidades microbianas son reversibles. De esta forma, pasado cierto tiempo, los suelos afectados por el fuego, vuelven a recuperar sus propiedades iniciales y su funcionalidad de forma natural. Por tanto, la detección temprana de la recuperación de un suelo es importante para la toma de decisiones y para la planificación de las acciones de restauración medioambiental que siguen a los episodios de incendios forestales.

El objetivo principal de este estudio es la identificación de marcadores microbiológicos de la recuperación de suelos afectados por incendios forestales. Para este estudio se han seleccionado diferentes tipos de suelos de Andalucía (sur de

¹ Universidad de Alcalá. 28871 Alcalá de Henares (Madrid), Spain.

E-mail: juana.rodríguez@uah.es

² EGMASA. Calle Johan G. Gutenberg, 1. Isla de la Cartuja, 41092 Sevilla, Spain.

³ Consejería de Medio Ambiente. Avda. Manuel Siurot, 50, 41071 – Sevilla, Spain.

⁴ IRNAS-CSIC. Avda. Reina Mercedes, 10. 41012 Sevilla, Spain.

España), afectados por incendios durante los pasados 10 años, así como suelos cercanos no afectados como controles. El estudio trata de analizar el efecto del fuego sobre las comunidades microbianas, tanto mediante las técnicas convencionales para la estimación de la biodiversidad (recuento de organismos viables en medios apropiados, biomasa total viable, tasa de respiración, SIR, etc.), como mediante técnicas moleculares específicas (DGGE y clonaje del gen codificante para ARNr 16S).

Materiales y Métodos

Las zonas de muestreo seleccionadas en este estudio fueron en Jaén el Parque Natural de Cazorla, Segura y las Villas (dos zonas, quemada y control 1 y quemada y control 2) situadas a ambos lados de la carretera que lleva al embalse del Tranco) y en Sevilla, en el municipio de Aznalcóllar (una zona control - Barranco de los Laureles- y tres zonas quemadas - Arroyo de las Cañadas, Casa de las Cañadas y Carril de la Osa-). Las muestras se tomaron, mediante azada, en distintos puntos al azar de la superficie (0-10 cm de profundidad) tanto de suelos quemados como de suelos control.

El estudio de la biodiversidad microbiana del suelo, requirió la puesta a punto de las siguientes técnicas:

- a) Método de extracción del ADN de las muestras de suelo.
- b) Condiciones de desarrollo de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).
- c) Condiciones de desarrollo de la electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE).
- d) Clonaje del fragmento de ADNr 16S.
- e) Condiciones de fijación de las muestras para el recuento directo de microorganismos al microscopio.

Así mismo, se llevó a cabo la valoración de actividades enzimáticas relacionadas con los ciclos de carbono, nitrógeno y fósforo.

Método de extracción del ADN de las muestras de suelo

Para la extracción del ADN a partir de las diferentes muestras de suelo, se ensayaron distintos procedimientos descritos en la bibliografía (Girvan y col., 2003; Fortin y col., 2004; Costa y col., 2004), así como los Kits comerciales “Fast DNA spin Kit” (Q BIOgene) y Power Soil DNA Isolation Kit (Mobio).

Condiciones de desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa

A partir de las distintas muestras de ADN se amplificaron por PCR fragmentos del gen codificante para ARNr 16S. Para ello, se utilizaron cebadores universales del dominio *Bacteria* (341F + GC clamp y 907 R; 27 F y 1492 R) y del dominio *Archaea* (340F + GC clamp y 915R). Se utilizaron distintos programas de amplificación, distintas polimerasas (“Master Taq”, “FidelityTaq”).

Condiciones de desarrollo de la electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE)

Los fragmentos de ADNr 16S elegidos para su amplificación y posterior análisis por DGGE fueron los correspondientes a la región V3-V5 (347F + GC clamp y 907 R) para el dominio *Bacteria*, y a la región amplificada por el cebadores 340F + GC clamp y 915R para el dominio *Archaea* (Nakatsu et al., 2000; Yu & Morrison, 2004). Para separar los distintos fragmentos de ADNr 16 S amplificados por PCR, se realizó una DGGE utilizando un gradiente de urea-formamida siguiendo las indicaciones descritas por Muyzer et al. (1993). Se prepararon geles de poliacrilamida al 6 % (v/v) con diferentes gradientes desnaturizantes de urea-formamida, con el fin de conocer cuál era el gradiente óptimo de separación de los fragmentos amplificados.

Clonaje del gen codificante para ARNr 16S

Para el clonaje del gen de ADNr 16S se llevó a cabo la amplificación del citado gen utilizando los cebadores universales 27F y 1492R. El producto de amplificación se clonó en células competentes de *E. coli* utilizando el kit de clonación “TOPO TA Cloning Kit” (Invitrogen). Los clones positivos se analizarán en el servicio de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá.

Condiciones de fijación de las muestras para el recuento directo de microorganismos al microscopio

El recuento total directo de microorganismos se llevó a cabo en un microscopio de epifluorescencia Nikon, utilizando el colorante fluorescente DAPI para teñir las células. Se probaron distintas condiciones de fijación de las muestras antes de su observación al microscopio: fijación con PBS-formaldehído, fijación con PBS-etanol y fijación con PBS-formaldehído y centrifugación en gradiente de densidad Nycodenz. El número de microorganismos estimados mediante esta técnica se comparó con el obtenido mediante la técnica de recuento de microorganismos viables en placa.

Recuento en placa de microorganismos viables del suelo

El recuento de bacterias viables se llevó a cabo en placas que contenían el medio TSA (Agar Tripton de Soja) diluido 1:10 y el de mohos y levaduras en el medio agar Sabouraud con oxitetraciclina. En ambos casos, las placas se incubaron durante 1 semana a 28 °C.

Valoración de actividades enzimáticas

Hasta el momento se han valorado las siguientes actividades enzimáticas:

- 1.- Fosfatasa ácida y alcalina (Tabatabai y Bremner, 1969).
- 2.- β -glucosidasa (Tabatabai, 1982).

- 3.- Xilanasas (Pancholy y Rice, 1973, modificado por García-Alvárez e Ibáñez, 1994)
- 4.- Invertasa (Hoffmann y Pallauf, 1965, modificado por García-Álvarez e Ibáñez, 1994).
- 5.- β -N-acetilglucosaminidasa (Boerner y col., 2005).

Resultados y Discusión

Estimación de la biomasa presente en las muestras mediante las técnicas de recuento en placa de microorganismos viables y recuento directo al microscopio

En todas las muestras analizadas mediante la técnica de recuento en placa, el número de bacterias fue siempre mayor que el de mohos y levaduras. No se observaron diferencias significativas en los microorganismos viables de las muestras control y quemadas en ninguna de las dos zonas estudiadas (Cazorla y Aznalcóllar).

Es importante destacar, que solamente se logró visualizar los microorganismos al microscopio cuando las muestras se fijaron con PBS-formaldehído y se concentraron utilizando la centrifugación en gradiente de densidad Nycodenz. Cuando las muestras se fijaron únicamente con PBS-formaldehído, no se pudieron distinguir los microorganismos de los restos de partículas del suelo, a pesar de realizar distintas diluciones de la muestra.

Optimización del método de extracción del ADN de las muestras de suelo y de las condiciones de PCR

De los distintos métodos de extracción de ADN del suelo ensayados (Kits comerciales y protocolos descritos en la bibliografía), únicamente el Kit comercial “Power Soil DNA Isolation Kit” (Mobio) permitió obtener preparaciones de ADN de buena calidad, tal y como puede observarse en la Figura 1.

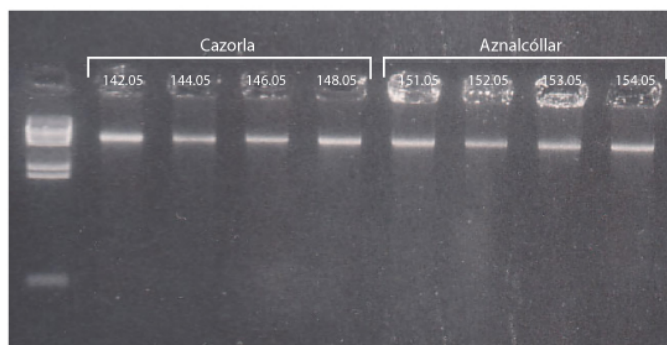


Figura 1. Fotografía correspondiente a las preparaciones de DNA obtenidas a partir de las muestras estudiadas tras utilizar el kit comercial “Power Soil DNA Isolation KIT” (Mobio). Muestras Cazorla: 142 (quemado zona 1), 144 (control zona 1), 146 (quemado zona 2), 148 (control zona 2). Muestras Aznalcóllar: 151(control), 152, 153 y 154 (quemados zona 1, 2 y 3, respectivamente). Marcador de peso molecular II de Roche (0,12 – 23,1 Kpb).

Para la amplificación de los fragmentos de ADNr 16S de los dominios *Bacteria* y *Archaea* (para su utilización en la DGGE) y del fragmento amplificado utilizando los

primers 27F y 1492R (para la clonación parcial del gen codificante para ARNr 16S), se eligió la enzima FidelityTaq (USB), por ser la enzima con la que se producían menos amplificaciones inespecíficas. Las condiciones óptimas de desarrollo de la PCR para la amplificación del fragmento de ADNr correspondiente al dominio *Bacteria* fueron: desnaturalización a 94 °C, 7 min; 32 ciclos para permitir el acoplamiento de los iniciadores (95 °C, 45 seg, 49 °C, 45 seg; 72 °C, 90 seg) y extensión por la polimerasa a 72 °C, 10 min; para el dominio *Archaea* fueron: desnaturalización a 94 °C, 5 min; 32 ciclos para permitir el acoplamiento de los iniciadores (94 °C, 45 seg, 54 °C, 60 seg; 72 °C, 60 seg) y extensión por la polimerasa a 72 °C, 10 min.

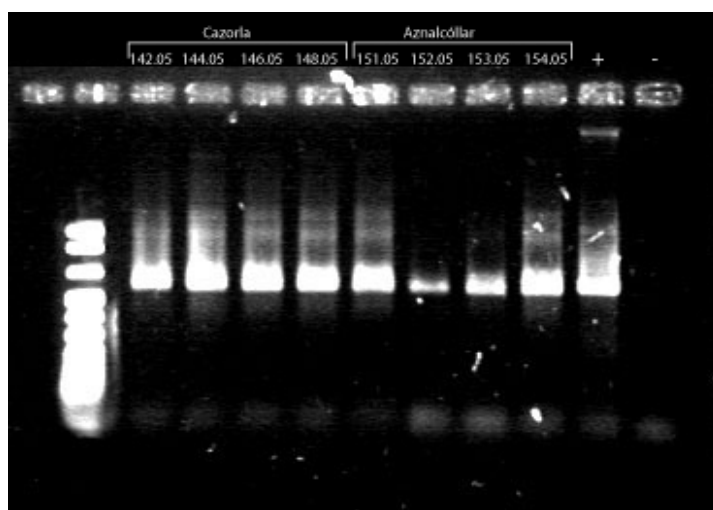


Figura 2. Fotografía de los productos de amplificación del fragmento de V3-V5 de ADNr 16S de microorganismos del dominio *Bacteria*. Marcador de peso molecular VIII de Roche (19-1114 pb). Muestras Cazorla: 142 (quemado zona 1), 144 (control zona 1), 146 (quemado zona 2), 148 (control zona 2). Muestras Aznalcóllar: 151 (control), 152, 153 y 154 (quemados zona 1, 2 y 3, respectivamente).

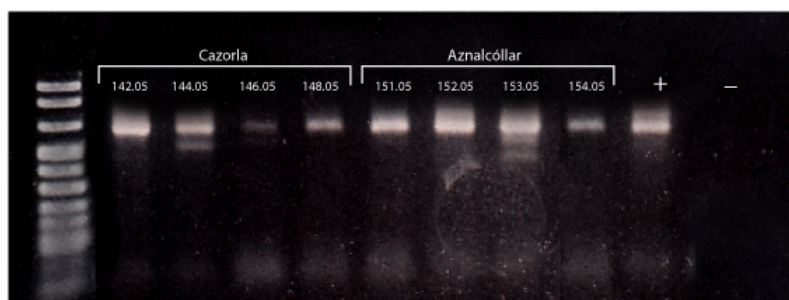


Figura 3. Fotografía de los productos de amplificación del fragmento de ADNr 16S de microorganismos del dominio *Archaea*. Marcador de peso molecular VIII de Roche (19-1114 pb). Muestras Cazorla: 142 (quemado zona 1), 144 (control zona 1), 146 (quemado zona 2), 148 (control zona 2). Muestras Aznalcóllar: 151 (control), 152, 153 y 154 (quemados zona 1, 2 y 3, respectivamente).

Condiciones de desarrollo de la electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE)

La electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante es una de las técnicas más idóneas para establecer “huellas moleculares” (fingerprinting) de las comunidades microbianas de diversos hábitats.

Para la selección del gradiente óptimo de urea-formamida que permitiera la mejor separación de la mezcla de fragmentos amplificados por PCR, se probaron distintas concentraciones de urea-formamida. En las muestras de Cazorla, los patrones de bandas fueron más definidos cuando se utilizó el gradiente desnaturalizante del 55 al 60% para el dominio *Bacteria* y de 50 al 70 % para el dominio *Archaea* (Figura 4). En las muestras de Aznalcóllar, los mejores resultados se obtuvieron al utilizar un gradiente desnaturalizante de 50–70 % para el dominio *Bacteria* y del 45 al 65 % para el dominio *Archaea* (Figura 5).

De los resultados obtenidos mediante la técnica DGGE, se pueden extraer las siguientes conclusiones: 1) se observan patrones de bandas diferentes, no sólo entre las muestras de los suelos control y los quemados, sino también entre las muestras tomadas en los distintos puntos de muestreo de una misma zona (Cazorla o Aznalcóllar); 2) Tanto en las muestras de Cazorla como de Aznalcóllar se observa siempre menor número de bandas en los DGGE correspondientes al dominio *Archaea* que al dominio *Bacteria*; 3) Las diferencias observadas entre los patrones de bandas de los suelos control y de los suelos quemados son más notables en el dominio *Archaea* que en el dominio *Bacteria*.

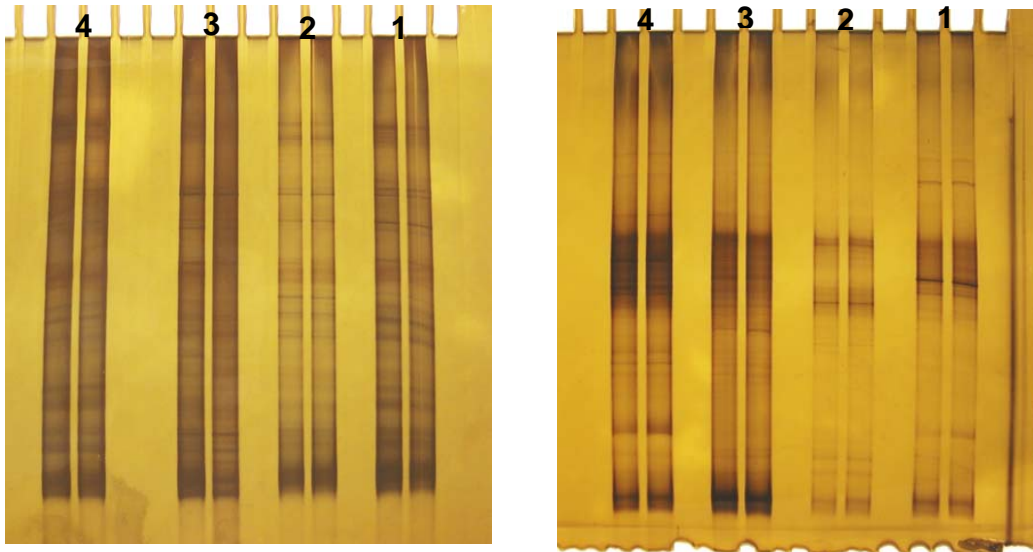


Figura 4. Fotografías correspondientes a los patrones de bandas obtenidos por DGGE de las muestras de Cazorla. Izquierda: dominio *Bacteria*; Derecha: dominio *Archaea*. Muestras: 1, suelo quemado zona 1 (142); 2, suelo control zona 1(144); 3, suelo quemado zona 2 (146); 4, suelo control zona 2 (148).

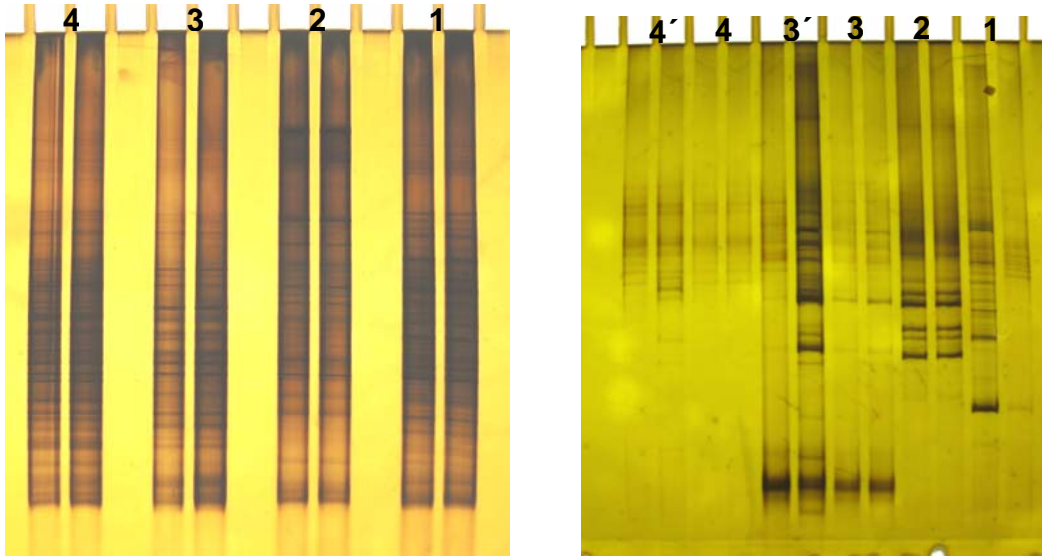


Figura 5. Fotografías correspondientes a los patrones de bandas obtenidos por DGGE de las muestras de Aznalcóllar. Izquierda: dominio Bacteria; Derecha: dominio Archaea. Muestras: 1, suelo control (151); 2, suelo quemado zona 1(152); 3 y 3', suelo quemado zona 2 (153)(50 y 100 μ l del producto de amplificación, respectivamente); 4 y 4', suelo quemado zona 3 (154)(50 y 100 μ l del producto de amplificación, respectivamente) .

Clonaje del gen codificante para ARNr 16S

El proceso de clonación parcial del gen de ADNr 16S de *Bacteria* se encuentra en proceso de realización, tanto en los suelos quemados y controles de la zona de Cazorla como en los de Aznalcóllar. Se ha conseguido amplificar la región deseada, utilizando los cebadores 27F-1492R y se han obtenido células transformadas portadoras del inserto. Las condiciones óptimas de desarrollo de la PCR fueron: desnaturalización a 94 °C, 5 min; 30 ciclos para permitir el acoplamiento de los iniciadores (95 °C, 1 min., 52 °C, 1 min.; 72 °C, 1min.) y extensión por la polimerasa a 72 °C, 10 min. Después de confirmar la presencia del inserto en los transformantes, se procederá al análisis de las secuencias de los productos de amplificación, lo que nos permitirá identificar los microorganismos presentes en las muestras control y quemadas en cada una de las zonas de estudio. Además, se relacionarán los resultados obtenidos mediante la técnica de clonaje con los obtenidos mediante la técnica de DGGE.

Valoración de actividades enzimáticas

Hasta el momento se han valorado las actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo del carbono y del fósforo, únicamente en las muestras de Cazorla (Tabla 1).

	Fosfatasa Ácida U/g/h	Fosfatasa Alcalina U/g/h	β -glucosidasa U/g/h	Invertasa U/g/h	Xilanasa U/g/h	β -N-acetil- glucosaminidasa U/g/h
Quemado (142) zona 1	1,49	3,71	1,70	26,37	0,164	0,34
Control (144) zona 1	0,72	1,77	0,56	13,31	1,47	0,09
Quemado (146) zona 2	2,70	5,01	1,40	21,85	0,014	0,59
Control (148) zona 2	2,12	4,70	2,22	17,60	0,66	0,40

Tabla 1. Actividades enzimáticas determinadas en los suelos quemados y control de la zona de Cazorla.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que: 1) los niveles de actividad de todas las enzimas valoradas son siempre mayores en los suelos de la zona 2 (tanto en los suelos control como quemado) que en los de la zona 1, lo que está en concordancia con los resultados obtenidos en el recuento del número de viables y recuento directo al microscopio (datos no mostrados) y con la detección de un mayor número de bandas en los DGGE correspondientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea*. 2) Para la mayoría de las actividades enzimáticas, los valores de actividad de las mismas son más elevados en los suelos quemados que en los suelos control. Este resultado se relaciona directamente con el contenido en materia orgánica en dichos suelos, menor en los suelos control que en los suelos quemados (0,81 y 2,87 % en los suelos control y quemado de la zona 1, respectivamente; 3,24 y 3,53 en los suelos control y quemado de la zona 2, respectivamente).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del proyecto Convenio 2005/002 (Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía) y por el proyecto CGL 2006-12730-C03-02 (CICYT).

Referencias bibliográficas

- Arias, ME., González-Pérez, JA, González-Vila, FJ and Ball, AS. (2005). Soil Health -a new challenge for microbiologists and chemists-. *International Microbiology*. **8**: 13-21.
- Boerner, R.E.J., Brinkman, J.A. and Smith, A. (2005). Seasonal variations in enzyme activity and organic carbon in soil of a burned and unburned hardwood forest. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 1419-1426.
- Costa, R; Gomes, N; Milling, A. and Smalla, K. (2004). An Optimized protocol for simultaneous extraction of DNA and RNA from soils. *Brazilian Journal of Microbiology*. **35**: 230-234.
- Elliot, LF, Lynch, JM and Papendick, RI (1996). The microbial component of soil quality. En: *Soil biochemistry*. Stotzky, G., Bollag, J.M. (eds.). Marcel Dekker Inc. New York, USA. pp.1-21.
- Fortin, N., Beaumier, D., Lee, K. and Greer, W. (2004). Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *Journal of Microbiology Methods*. **56**: 181-191.
- García-Álvarez, A. and Ibáñez, J.J. (1994). Seasonal fluctuations and crop influence on microbiota and enzyme activity in fully developed soils of central Spain. *Arid Soil Research and Rehabilitation* **8**: 161-178.
- Girvan, M.S, Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M. and Ball, A.S. (2003). Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **69(23)**: 1800-1809.
- Killham, K. (1994). *Soil Ecology*. University Press, Cambridge, United Kingdom. 241p.
- Hoffmann, G. and Pallauf, J. (1965). A colorimetric method for determining saccharase activity in soils. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, und Bodenkunde* **110**: 193-201.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 695-700.
- Nakatsu, C., Torsvik, V. and Ovreas, L. (2000). Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society American Journal*, **64**: 1382-1388.
- Pancholy, S.K. and Rice, E.L. (1973). Soil enzymes in relation to old field succession: Amylase, cellulase, invertase, dehydrogenase and urease. *Soil Science Society American Proceedings* **37**, 47-50.
- Tabatabai, M.A. and Bremner, J.M. (1969). Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil and Biochemistry* **1**: 301-307.
- Tabatabai, M.A. (1982). Soil enzyme. En: Page, A.L., Miller, E.M. and Keeney, D.R. (Eds). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Soil Science Society of America, Inc, Madison. Pp. 903-947.
- Yu, Z. and Morrison, M. (2004). Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. **70(8)**: 4800-4806.