







**Universidad de Alcalá**

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DEL EFECTO DEL FUEGO Y DE LA PRESENCIA  
DE CONTAMINANTES SOBRE LA ACTIVIDAD Y  
BIODIVERSIDAD MICROBIANA DEL SUELO**

**TESIS DOCTORAL**

**Adriana Isabel Turmero Hidalgo**


**2013**



**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS**

**PARA SU PRESENTACIÓN**

**(Art. 11º del R.D. 56/2005)**



Las Doctoras, **D<sup>a</sup>. Juana Rodríguez Bullido** y **D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Enriqueta Arias Fernández**, como Directoras de la Tesis Doctoral titulada: **“ANÁLISIS DEL EFECTO DEL FUEGO Y DE LA PRESENCIA DE CONTAMINANTES SOBRE LA ACTIVIDAD Y BIODIVERSIDAD MICROBIANA DEL SUELO”**, realizada por **D<sup>a</sup> Adriana Isabel Turmero Hidalgo** en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá, **autorizan su presentación a trámite**, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente autorización en Alcalá de Henares a 15 de julio de 2013.

Fdo.: Dra. M<sup>a</sup> Enriqueta Arias Fernández

Fdo.: Dra. Juana Rodríguez Bullido





# Universidad de Alcalá

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

D. Juan Soliveri de Carranza, Catedrático de Microbiología y Director del Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá,

## **CERTIFICA:**

Que **D<sup>a</sup>. Adriana Isabel Turmero Hidalgo**, Licenciada en Biología por la Universidad Simón Bolívar (Venezuela), ha realizado en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá, bajo la dirección de las Doctoras **D<sup>a</sup>. Juana Rodríguez Bullido** y **D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Enriqueta Arias Fernández**, el trabajo de investigación titulado: **“ANÁLISIS DEL EFECTO DEL FUEGO Y DE LA PRESENCIA DE CONTAMINANTES SOBRE LA ACTIVIDAD Y BIODIVERSIDAD MICROBIANA DEL SUELO”**, que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Alcalá de Henares a 15 de julio de 2013.

Fdo.: Juan Soliveri de Carranza





Este trabajo ha sido posible gracias a la beca concedida por la Universidad de Alcalá dentro del Programa de Becas Miguel de Cervantes 2005 y a la financiación del proyecto CICYT CGL2006-12730-C03-02, del Convenio 2005/002 de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía y del proyecto EIADES S-0505/AMB/0296 de la Comunidad de Madrid.



## Agradecimientos

A mis directoras de Tesis, Dra. M<sup>a</sup> Enriqueta Arias Fernández y Dra. Juana Rodríguez Bullido, por ofrecerme la oportunidad de realizar este trabajo, por su ánimo, confianza y guía a lo largo de todo el proceso. Por sus apreciados y relevantes comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. María Isabel Pérez Leblic, por su apoyo constante durante todos estos años y por su valiosa contribución en el desarrollo del proyecto de los vertederos.

A la Dra. Ana Jesús Hernández, por permitirme colaborar en el proyecto de los vertederos.

Al Dr. Manuel Hernández Cutuli, por estar siempre dispuesto a ayudarme y resolver cualquier contratiempo en el laboratorio.

A los Dres. Juan Soliveri de Carranza, José Luis Copa Patiño y Francisco Guillén Carretero, por su amabilidad y por mantener siempre un buen ambiente de trabajo.

A mis amigas, Raquel, Ana y Lyli, por todo el cariño, la paciencia, las risas, por hacerme sentir como en casa (y por todas las veces que me sacaron las PCRs).

A la Dra. María Arenas, por toda la ayuda prestada al comienzo para familiarizarme con el laboratorio y a Alba por darme ánimos en la fase final y por su imprescindible colaboración en el análisis de las últimas secuencias.

A mis padres por ser fuente infinita de afecto y motivación, al igual que mis abuelos y mi hermana.

A Álvaro, *“si te quiero es porque sos / mi amor mi cómplice y todo / y en la calle codo a codo / somos mucho más que dos”* (M.B.)



*A mis padres y abuelos*

*A Álvaro*



## RESUMEN

La salud de un suelo se puede definir como la capacidad del mismo para funcionar como un sistema vivo dentro de un ecosistema, sustentar la productividad biológica, promover la calidad ambiental y mantener la salud de plantas, animales y del hombre. El concepto de salud del suelo se relaciona, por tanto, con las características biológicas, químicas y físicas del mismo, que son esenciales para una productividad agrícola sostenible a largo plazo, con un mínimo impacto ambiental.

El estudio del papel que desempeña la biodiversidad microbiana en la salud del suelo, la capacidad de los suelos para responder ante condiciones de estrés y la relación existente entre ambos factores, resulta clave para comprender los límites de funcionamiento de los ecosistemas y la capacidad de recuperación de la actividad biológica en ecosistemas perturbados. Los indicadores microbianos de la salud de un suelo más utilizados son la biomasa, la actividad microbiana y la diversidad microbiana, los cuales proporcionan información sobre el papel multifuncional que las comunidades microbianas desempeñan en el ecosistema.

Los suelos, como cualquier otro ecosistema, pueden sufrir perturbaciones capaces de alterar su estructura. Las perturbaciones pueden ser naturales (fuego, avalanchas de nieve, fenómenos meteorológicos extremos, inundaciones, etc.) o generadas por el hombre (contaminación, introducción y extinción de especies, etc.). El efecto de las perturbaciones sobre los ecosistemas depende de la magnitud del agente perturbador y de la susceptibilidad del ecosistema.

En este trabajo se ha analizado el efecto de dos agentes perturbadores, incendios forestales y presencia de contaminantes, sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas (actividad y diversidad microbiana) de distintos suelos. El efecto del fuego se estudió en tres áreas determinadas de nuestro país, dos pertenecientes a la Comunidad de Andalucía (Aznalcóllar y Cazorla) y otra a la Comunidad de Canarias (Tenerife), que sufrieron uno o varios incendios forestales en diferentes años. Por otra parte, se estudió el efecto de la presencia de contaminantes de naturaleza orgánica (hidrocarburos) e inorgánica (metales pesados) en suelos provenientes de dos vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU) situados en la Comunidad de Madrid, concretamente, en las localidades de Torrejón de Ardoz y de Getafe, respectivamente.

La caracterización física y química de los suelos quemados, en relación con sus respectivos controles, se llevó a cabo mediante la estimación de los siguientes parámetros: pH, capacidad de retención hídrica, contenido en carbono y materia orgánica y contenido en nitrógeno. Cabe destacar el incremento observado en el

contenido en carbono total oxidable y/o nitrógeno total en los suelos quemados, lo cual puede ser atribuido al impacto de los incendios sobre la cubierta vegetal.

Para el estudio del efecto del fuego sobre la actividad microbiana se utilizaron los siguientes indicadores biológicos: biomasa, respiración inducida por sustrato (SIR) y actividad de distintas enzimas relacionadas con el ciclo de carbono ( $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -N-acetil glucosaminidasa e invertasa), nitrógeno (ureasa) y fósforo (fosfatasas ácida y alcalina). De los resultados obtenidos cabe señalar, que en la mayoría de los suelos quemados se detectó un aumento de la biomasa bacteriana y fúngica y de la actividad respiratoria, en relación a los suelos control. En lo que respecta a las actividades enzimáticas analizadas, no se pudo establecer un patrón común de comportamiento en los distintos escenarios estudiados, a no ser en el caso de la actividad fosfatasa, para la que se detectaron mayores niveles en los suelos quemados que en los controles.

El estudio del efecto del fuego sobre la diversidad microbiana se llevó a cabo mediante el análisis de los patrones de bandas de ADN, correspondientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea*, obtenidos por la técnica de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), así como mediante el análisis de las secuencias de los clones obtenidos a partir de la clonación del gen codificante para ARNr 16S del dominio *Bacteria*. Ambos abordajes necesitaron la puesta a punto de las técnicas moleculares empleadas. A partir de los patrones de bandas obtenidos mediante DGGE, se calculó el índice de Shannon y se realizó un análisis jerárquico de grupos o conglomerados (“cluster analysis”). Los valores de índice de Shannon obtenidos pusieron de manifiesto una mayor diversidad de grupos en el dominio *Bacteria* que en el dominio *Archaea*, en todos los suelos analizados. En las muestras de Aznalcóllar, los suelos quemados presentaron índices de diversidad ligeramente superiores al del suelo control, para ambos dominios (*Bacteria* y *Archaea*). En los suelos del área de Cazorla, en los que se realizaron tres análisis consecutivos en diferentes años en dos zonas de diferente ubicación, los resultados de índice de Shannon reflejan una mayor o menor diversidad microbiana dependiendo del año de muestreo y del área muestreada. A partir del análisis de conglomerados realizado, se puede deducir que el efecto del fuego fue más significativo sobre las comunidades microbianas del dominio *Archaea* que sobre las del dominio *Bacteria*. De los resultados correspondientes al índice de Shannon y al análisis de conglomerados obtenidos en los suelos de Tenerife muestreados antes y después de las lluvias, no se pudo deducir un patrón claro del efecto del fuego sobre la diversidad microbiana.

A continuación, a partir del ADN genómico de cada una de las muestras de suelo, se amplificó mediante PCR el gen codificante para el ARN ribosómico 16S y los fragmentos amplificados fueron clonados para realizar su identificación utilizando la base de datos del RDP (Ribosomal Database Project). En total, se lograron identificar 1268 secuencias con más del 95% de similitud a nivel de *phyla*. Tras realizar las curvas de rarefacción de cada una de las librerías se puso de manifiesto, que en la mayoría de las muestras se hubiera necesitado analizar un



mayor número de secuencias para poder estimar de modo concluyente la diversidad microbiana presente en los suelos. No obstante, del estudio realizado se pudo comprobar, que los grupos bacterianos mayoritarios presentes en los suelos analizados se corresponden con los *phyla Proteobacteria, Acidobacteria* y *Actinobacteria*. Por otro lado, la identificación a nivel de género no permitió establecer diferencias entre los suelos control y quemados, ya que en la mayor parte de los casos se identificaron los mismos géneros.

En la segunda parte del trabajo se llevó a cabo la caracterización física, química y biológica de suelos de dos vertederos de RSU (Torrejón de Ardoz y Getafe) contaminados con hidrocarburos y metales pesados, respectivamente. En el vertedero de Torrejón de Ardoz se detectó una alta concentración de hidrocarburos totales (alifáticos y aromáticos), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y bifenilos policlorados (PCBs), particularmente en las zonas denominadas T2 y T9 del vertedero. Los resultados de la caracterización física, química y biológica de los suelos de este vertedero pusieron de manifiesto la existencia de correlaciones negativas estadísticamente significativas entre la concentración de PAHs y PCBs y la capacidad de campo, número de bacterias y hongos viables, actividad respiratoria y actividad enzimática, lo cual es indicativo del efecto tóxico ejercido por los contaminantes sobre las poblaciones microbianas del suelo. Este mismo efecto se observó también tras la estimación de los índices de Shannon calculados a partir del patrón de bandas de ADN y de las librerías de clones. Así, se observó, que los suelos con menor contaminación (T2B y T8) presentaron mayor diversidad bacteriana que los suelos con mayor concentración de contaminantes (T2 y T9). En estas muestras se lograron identificar 180 secuencias con más del 95% de similitud con las secuencias publicadas en la base de datos RDP. Las curvas de rarefacción mostraron que en tres de las cuatro muestras estudiadas (T2B, T8 y T9), el número de secuencias analizadas fue suficiente para poder determinar los *phyla* presentes en dichas zonas, habiendo sido detectados como mayoritarios los *phyla Proteobacteria, Acidobacteria* y *Actinobacteria*.

Por último, en el estudio realizado en el VRSU de Getafe, no se pudo establecer una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de metales pesados y ninguno de los parámetros analizados. Este hecho podría justificarse sobre la base de que las comunidades microbianas de estos suelos se hubieran adaptado a la concentración de metales pesados presente en los mismos, o a que dicha concentración no alcance el umbral de toxicidad necesario para causar un efecto detectable sobre los indicadores seleccionados.

## SUMMARY

Soil health can be defined as its ability to function as a living system, sustaining biological productivity and promoting environmental quality. The concept of soil health is related with its biological, chemical and physical properties, which are essential for sustainable agricultural productivity in the long term, with minimal environmental impact.

The study of the role of microbial biodiversity in soil health, soil's ability to respond to stress conditions and the relationship between the two factors, is key to understanding the limits of ecosystem functioning and resilience biological activity in disturbed ecosystems. The most common microbial indicators of soil health used are biomass, microbial activity and microbial diversity, which provide useful information on the multifunctional role that microbial communities have in the ecosystem.

Soils, like any other ecosystem, may suffer disturbances which alter its structure. Disturbances can be natural (fire, snow avalanches, extreme weather, floods, etc.) or generated by man (pollution, introduction and extinction of species, etc.). The effect of disturbances on ecosystems depends on the magnitude of the perturbing agent and the susceptibility of the ecosystem.

In this study we have analyzed the effect of wildfires and pollutants on the physical, chemical and biological (microbial activity and diversity) properties of different soils. The effect of fire was studied in three specific areas of our country, two belonging to the Autonomous community of Andalusia (Aznalcóllar and Cazorla) and another to the Autonomous community of the Canary Islands (Tenerife), who suffered one or more wildfires in different years. Moreover, we studied the effect of the presence of organic pollutants (hydrocarbons) and inorganic (heavy metals) in soils from two municipal solid waste landfills located in the Autonomous community of Madrid, specifically, the villages of Torrejon de Ardoz and Getafe respectively.

Chemical and physical characterization of burned soils in comparison to their respective controls was carried out by estimating the following parameters: pH, water retention capacity, carbon and organic matter and nitrogen content. The observed increase in the total carbon content of oxidizable and/or total nitrogen in burned soils can be attributed to the impact of fires on vegetation cover.

To study the effect of fire on microbial activity we analyzed the following biomarkers: biomass, substrate induced respiration (SIR) and activity of various enzymes involved in the carbon cycle ( $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase and invertase), nitrogen (urease) and phosphorus (acid and alkaline phosphatase).

From the results it should be noted that we detected in most burned soils an increased of bacterial and fungal biomass and respiratory activity relative to control soils. With respect to the enzyme activities tested, we could not establish a common pattern of behavior in the different samples studied, except in the case of the phosphatase activity, for the highest levels was detected in the burned soils.

The study of the effects of fire on the microbial diversity of soils was performed by analyzing DNA band fingerprints corresponding to the domains *Bacteria* and *Archaea*, obtained by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and by analyzing the sequences of the clones obtained from cloning 16S rRNA gene for *Bacteria*. Both approaches required tuning of molecular techniques employed. From the DGGE fingerprint obtained, we calculated Shannon diversity index and did a hierarchical analysis. The Shannon index obtained showed a greater diversity in *Bacteria* than in *Archaea* in all soils analyzed. Aznalcóllar's burned soils had slightly higher rates of diversity in both domains (*Bacteria* and *Archaea*). In Cazorla, in which there were three consecutive analyzes in different years in two different location areas, the results reflect Shannon index greater or lesser microbial diversity depending on the year of sampling and the area sampled. From the cluster analysis performed, we concluded that the effect of fire was more significant on microbial communities of *Archaea* than *Bacteria* domain. From the results for the Shannon index and cluster analysis obtained in Tenerife soils samples before and after the rains, we could not derive a clear pattern of the effect of fire on microbial diversity.

From each of the soil samples genomic DNA (16S RNAr gene) was amplified through PCR and the fragments were cloned for its identification using Ribosomal Database Project (RDP). We studied 1,268 sequences with more than 95% similarity. After performing rarefaction curves of each of the libraries we concluded that in most samples it would have been required to analyze a greater number of sequences to estimate conclusively the microbial diversity present in soils. However, we found that most of the bacteria present in the soils correspond to the *phyla Proteobacteria*, *Acidobacteria* and *Actinobacteria*. Furthermore, the identification at genus level did not allow to differentiate between control and burned soil, because in most cases the same genera have been identified.

In the second part of our study we analyzed the physical, chemical and biological properties of soils from two landfills (Torrejón de Ardoz and Getafe) contaminated with hydrocarbons and heavy metals, respectively. In the Torrejón de Ardoz landfill we detected a high concentration of total hydrocarbons (aliphatic and aromatic), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs), particularly in samples T2 and T9. The results indicate a statistically significant negative correlation between the concentration of PAHs and PCBs and water retention capacity, number of viable bacteria and fungi, respiratory and enzyme activity, which is indicative of the toxic effect exerted by pollutants on soil microbial populations. This same effect was also observed after estimating

Shannon index calculated from the DGGE fingerprint and clone libraries. Thus, it was observed that samples with less pollution (T2B and T8) had higher bacterial diversity than soils with higher concentrations of pollutants (T2 and T9). In these samples we were able to identify 180 sequences with more than 95% similarity using RDP. Rarefaction curves showed that in three of the four samples studied (T2B, T8 and T9), the number of sequences analyzed was sufficient to determine the *phyla* present in these areas, having been detected as major *phyla* *Proteobacteria*, *Acidobacteria* and *Actinobacteria*.

Finally, in the Getafe landfill, we could not establish a statistically significant correlation between the concentration of heavy metals and any of the parameters analyzed. This could be justified on the basis that the microbial communities in these soils could have adapted to the concentration of heavy metals present or that the concentration does not reach the toxicity threshold necessary to cause a detectable effect on the selected indicators.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1. El suelo: funciones e importancia</b>	3
<b>1.2. Salud del suelo y biodiversidad</b>	4
<b>1.3. Indicadores de la salud del suelo</b>	5
1.3.1. Indicadores biológicos: los microorganismos como indicadores de la salud del suelo	7
1.3.2. Indicadores físico-químicos	9
<b>1.4. Técnicas moleculares aplicadas al estudio de la biodiversidad genética de comunidades microbianas</b>	10
1.4.1. Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes	12
1.4.2. Extracción y cuantificación del ADN	13
1.4.3. Electroforesis en geles de gradiente desnaturante (DGGE)	13
1.4.4. Clonación del gen codificante para ARNr 16S	15
<b>1.5. Impacto de las perturbaciones sobre la estructura y composición del suelo</b>	17
1.5.1. Incendios forestales	18
1.5.2. Efectos del fuego sobre las propiedades del suelo y factores determinantes	20
1.5.2.1. Efectos del fuego sobre las propiedades físico-químicas del suelo	21
1.5.2.2. Efectos del fuego sobre las poblaciones microbianas del suelo	25
<b>1.6. Vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU)</b>	32
<b>1.7. Planteamiento del trabajo</b>	35
<b>1.8. Objetivos del trabajo</b>	36
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	37
<b>2.1. Descripción de las zonas de muestreo</b>	39

2.1.1.	Descripción de las zonas incendiadas de las Comunidades de Andalucía y Canarias	39
2.1.2.	Descripción de los vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU) de la Comunidad de Madrid y de las zonas muestreadas	41
<b>2.2.</b>	<b>Toma de muestras</b>	<b>43</b>
<b>2.3.</b>	<b>Parámetros físico-químicos determinados en los suelos</b>	<b>46</b>
2.3.1.	pH	46
2.3.2.	Capacidad de campo, punto de marchitez permanente y agua útil del suelo	46
2.3.3.	Determinación del contenido total en materia orgánica del suelo	47
2.3.4.	Determinación del contenido en nitrógeno total	47
2.3.5.	Determinación de contaminantes	48
2.3.6.	Determinación del contenido en metales pesados biodisponibles	49
<b>2.4.</b>	<b>Parámetros biológicos determinados en los suelos</b>	<b>49</b>
2.4.1.	Valoración de la respiración inducida por sustrato	49
2.4.2.	Recuento en placa de microorganismos viables en el suelo	49
2.4.3.	Recuento total de microorganismos al microscopio de fluorescencia	50
2.4.4.	Valoración de distintas actividades enzimáticas	51
2.4.4.1.	Fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida	51
2.4.4.2.	$\beta$ -glucosidasa	51
2.4.4.3.	$\beta$ -N-acetilglucosaminidasa	52
2.4.4.4.	Celulasa	52
2.4.4.5.	Invertasa	53
2.4.4.6.	Ureasa	53
2.4.5.	Métodos utilizados para la extracción del ADN cromosómico	54
2.4.5.1.	Procedimiento 1	54
2.4.5.2.	Procedimiento 2	55
2.4.5.3.	Procedimiento 3	56
2.4.5.4.	Kit comercial "Fast DNA spin Kit for Soil" (Q· BIOgene, EEUU)	56
2.4.5.5.	Kit comercial "Power Soil DNA Isolation Kit" (MOBIO, EEUU)	56
2.4.6.	Limpieza del ADN obtenido de las muestras de suelo	57
2.4.7.	Electroforesis en gel de agarosa	57
2.4.8.	Cuantificación del ADN extraído	58


2.4.9.	Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	58
2.4.9.1.	Cebadores utilizados	58
2.4.9.2.	Mezclas de reacción	59
2.4.9.3.	Programas utilizados en el termociclador	59
2.4.10.	Purificación de los productos de PCR	60
2.4.11.	Electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE)	61
2.4.11.1.	Tinción con plata	62
2.4.11.2.	Tinción con bromuro de etidio	62
2.4.12.	Identificación de microorganismos mediante secuenciación de las bandas de ADN desarrolladas en la DGGE	62
2.4.13.	Clonación parcial del gen codificante para ARNr 16S de los dominios <i>Bacteria</i> y <i>Archaea</i>	63
2.4.14.	Análisis de las secuencias	64
<b>2.5.</b>	<b>Análisis estadístico</b>	64
<b>2.6.</b>	<b>Tampones, soluciones y medios de cultivo</b>	66
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	75
<b>3.1.</b>	<b>Caracterización física, química y biológica de los suelos quemados en comparación con los suelos control</b>	77
3.1.1.	Caracterización física	77
3.1.2.	Caracterización química	80
3.1.3.	Caracterización biológica	84
3.1.3.1.	Estimación de la biomasa microbiana	84
3.1.3.2.	Actividad microbiana	90
<b>3.2.</b>	<b>Puesta a punto de las técnicas moleculares empleadas en los estudios de biodiversidad microbiana</b>	100
3.2.1.	Optimización del método de extracción del ADN cromosómico de las muestras de suelo	100
3.2.2.	Optimización de las reacciones de PCR para el posterior análisis de los fragmentos amplificados por DGGE	102
3.2.3.	Análisis mediante DGGE de los productos de PCR correspondientes a fragmentos de ARNr 16S de <i>Bacteria</i> y <i>Archaea</i>	104
3.2.4.	Optimización del gradiente desnaturizante de las electroforesis	104
3.2.5.	Reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante DGGE	105

<b>3.3. Análisis genético de la biodiversidad microbiana de los suelos quemados en comparación con los suelos control</b>	107
3.3.1. Análisis mediante DGGE de los productos de PCR correspondientes a fragmentos de ADNr 16S de <i>Bacteria</i> y <i>Archaea</i>	107
3.3.2. Análisis de las librerías de clones obtenidos mediante clonación del gen codificante para ARNr 16 S del dominio <i>Bacteria</i>	120
3.3.2.1. Análisis de la idoneidad del número de clones estudiados. Curvas de rarefacción	122
3.3.2.2. Análisis de las secuencias obtenidas tras la clonación del gen codificante para ARNr 16S del dominio <i>Bacteria</i>	132
<b>3.4. Caracterización física, química y biológica de suelos de vertederos de residuos sólidos urbanos</b>	144
3.4.1. Análisis del suelo del vertedero de Torrejón de Ardoz	144
3.4.1.1. Caracterización físico-química	144
3.4.1.1.1. Determinación de la concentración de hidrocarburos	144
3.4.1.1.2. pH	145
3.4.1.1.3. Capacidad de campo	146
3.4.1.2. Caracterización biológica	146
3.4.1.2.1. Recuento en placa de bacterias viables	146
3.4.1.2.2. Recuento en placa de hongos viables	147
3.4.1.2.3. Respiración inducida por sustrato (SIR)	148
3.4.1.2.4. Actividades enzimáticas	148
3.4.1.3. Análisis de la biodiversidad microbiana de los suelos del VRSU de Torrejón de Ardoz mediante técnicas moleculares	150
3.4.1.3.1. Análisis mediante DGGE de los productos de PCR correspondientes a fragmentos de ADNr 16S de <i>Bacteria</i> y <i>Archaea</i>	150
3.4.1.3.2. Análisis de la librería de clones obtenidos mediante clonación del gen codificante para ARNr 16 S del dominio <i>Bacteria</i>	153
3.4.1.3.2.1. Análisis de la idoneidad del número de clones estudiados. Curvas de rarefacción	153
3.4.1.3.2.2. Análisis de las secuencias obtenidas tras la clonación del gen codificante para ARNr 16S del dominio <i>Bacteria</i>	155
3.4.2. Análisis del suelo del vertedero de Getafe	158
3.4.2.1. Caracterización físico-química	158
3.4.2.1.1. Determinación de la concentración de metales pesados asimilables	158
3.4.2.1.2. pH	159



3.4.2.2.	Caracterización biológica	160
3.4.2.2.1.	Recuento en placa de bacterias viables	160
3.4.2.2.2.	Recuento en placa de hongos viables	161
3.4.2.2.3.	Respiración inducida por sustrato (SIR)	162
3.4.2.2.4.	Actividades enzimáticas	163
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>167</b>
<b>4.1</b>	<b>Conclusiones generales</b>	<b>169</b>
<b>4.2</b>	<b>Conclusiones específicas</b>	<b>169</b>
4.2.1.	Efecto del fuego sobre distintos parámetros indicadores de la salud del suelo	169
4.2.2.	Efecto del fuego sobre la diversidad microbiana	170
4.2.3.	Efecto de los contaminantes presentes en suelos de VRSU sobre la actividad y la diversidad microbiana	171
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>173</b>
	<b>ANEXO I</b>	<b>189</b>





# 1. Introducción



## 1.1.

### **El suelo: funciones e importancia**

---

El suelo es la capa superior de la corteza terrestre. Está situado entre el lecho rocoso y la superficie y está compuesto por partículas minerales, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos. Constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere la capacidad de desempeñar funciones naturales y de uso. El suelo es uno de los recursos naturales de la Tierra menos conocidos, en comparación con el aire y el agua. Se forma a partir de las rocas mediante un proceso complejo en el que intervienen fuerzas físicas, químicas y biológicas. Es una fuente natural no renovable a corto plazo para el hombre y por consiguiente, su conservación y gestión es vital, tanto para el desarrollo sostenible de la agricultura, como para la protección de otros recursos naturales (agua, bosques, vida salvaje, etc.), cuya viabilidad se vería en peligro si el suelo se degradara o desapareciera (Lobo e Ibáñez, 2003). La importancia del suelo radica en las numerosas funciones que desempeña, tanto ambientales como económicas, sociales y culturales. Estas funciones operan por la compleja interacción de los organismos presentes en el suelo con el entorno abiótico del mismo. Entre las principales funciones del suelo destacan (Kibblewhite y col., 2008):

- i) La transformación del carbono por descomposición de los residuos vegetales y de otros materiales orgánicos, junto con la síntesis de materia orgánica por parte de la biota del suelo. La descomposición de la materia orgánica también promueve la destoxificación y eliminación de residuos. El carbono presente en el suelo juega un papel importante en la regulación de la emisión de gases de efecto invernadero, como son el metano y el dióxido de carbono.
- ii) El reciclaje de nutrientes, por ejemplo, del nitrógeno, fósforo y azufre, incluyendo la regulación de las emisiones de óxido nitroso.
- iii) El mantenimiento de un medio favorable para el enraizamiento de las plantas y para la regulación del ciclo hídrico mediante la agregación de compuestos, el transporte de partículas y la formación de bioestructuras a diferentes escalas dentro del suelo.
- iv) La regulación biológica de las poblaciones del suelo, incluidos aquellos organismos que producen plagas y enfermedades en plantas de importancia agrícola, en animales y en los seres humanos.

El suelo es un sistema vivo, y como tal, las interacciones que se establecen entre los componentes bióticos y abióticos son de extrema importancia. Mientras que las propiedades físicas y químicas del suelo proporcionan el contexto y establecen los límites dentro de los cuales existe la parte biótica del suelo, es la biota la que proporciona la capacidad al sistema para adaptarse a los cambios ambientales (Kibblewhite y col., 2008). En los últimos años se ha incrementado notablemente el interés por el estudio de los microorganismos presentes en el

suelo, puesto que, entre otras razones, la productividad de los sistemas agrícolas depende en gran medida del funcionamiento de las comunidades microbianas del mismo (Giller, 2001). Conocer, por tanto, el papel que desempeña la biodiversidad microbiana en la salud del suelo, la capacidad de los suelos para responder ante condiciones de estrés y la relación existente entre ambos factores es clave para comprender los límites de funcionamiento de los ecosistemas y la capacidad de que ecosistemas perturbados se recuperen y sustenten la actividad biológica.

## 1.2.

### **Salud del suelo y biodiversidad**

---

El suelo es un medio vivo y dinámico que permite la existencia de la vida vegetal, animal y microbiana. Es esencial para la vida del hombre, en tanto que es fuente de alimento y de materias primas. Por otra parte, el suelo es frágil, de difícil y larga recuperación y de extensión limitada. Por ello, tanto el uso inadecuado, como el cambio de uso o su sobreexplotación por actividades de diversa índole, pueden contribuir a la degradación o “pérdida de salud” de este medio natural.

Se puede definir la salud de un suelo como: “la capacidad de un suelo para funcionar como un sistema vivo dentro de un ecosistema, para sustentar la productividad biológica, promover la calidad ambiental y mantener la salud de plantas, animales y del hombre” (Doran y Safley, 1997). El concepto de salud del suelo se relaciona, por tanto, con las características biológicas, químicas y físicas del mismo, que son esenciales para una productividad agrícola sostenible a largo plazo, con un mínimo impacto ambiental. La salud del suelo es el reflejo más fiel de su funcionalidad (Arias y col., 2005).

La salud del suelo es un factor clave para el sostenimiento de la agricultura y, consecuentemente, es el hilo conductor para el desarrollo de prácticas agrícolas, para la protección del medio ambiente y para futuros desarrollos. Un suelo sano para la agricultura es un suelo que contiene una mezcla adecuada de flora, fauna y microorganismos, nutrientes y minerales disponibles (N, P, K, Mg), y que presenta propiedades físicas apropiadas (porosidad, capacidad de retención de agua e integridad estructural, entre otras). En este sentido, el concepto de “gestión integrada del suelo” (ISM) está adquiriendo una gran relevancia, considerándose de particular importancia los aspectos relacionados con el flujo de los nutrientes, el mantenimiento del contenido de la materia orgánica, la estructura del suelo y la biodiversidad del mismo.

El término biodiversidad se puede definir como la variabilidad existente entre los organismos vivos, e incluye la diversidad en especies, entre especies y entre ecosistemas. La biodiversidad del suelo hace referencia al conjunto de todas las poblaciones u organismos que viven en el suelo. Los suelos saludables

mantienen una comunidad de organismos que interactúan entre sí, dando lugar a un “tejido” con actividad biológica. Así, termitas y gusanos incrementan la porosidad del suelo; simbioses, como rizobios y micorrizas, aumentan la eficiencia de la adquisición de nutrientes por las plantas; un amplio número de bacterias, hongos y animales participan en los procesos de descomposición, mineralización e inmovilización de nutrientes, mejoran la estructura del suelo, lo que repercute positivamente en la capacidad de un suelo para retener agua y nutrientes, influyen en la capacidad de intercambio de cationes, en la reserva de N, S y P y en la eliminación de productos tóxicos de un suelo y por último, los organismos del suelo ayudan también a mejorar la producción de las cosechas (Arias y col., 2005). Por otra parte, factores ambientales, como la temperatura, humedad, acidez, composición química del suelo y factores antropogénicos, como las prácticas agrícolas y forestales, afectan a las comunidades biológicas del suelo y a su funcionamiento.

Es evidente, que el estudio de la salud de un suelo pasa por el conocimiento de las complejas interacciones que se producen entre todos los factores mencionados, de manera que éstos han de ser manejados como un sistema integrado. En este sentido, hoy día se reconoce la necesidad de considerar la salud del suelo y la gestión del mismo de manera integrada, teniendo en cuenta consideraciones biológicas, químicas y físicas.

### 1.3.

---

## Indicadores de la salud del suelo

En la actualidad, la evaluación de la salud del suelo se presenta como un reto científico y político. Existen propuestas novedosas para la evaluación del estado de los suelos, que tratan de establecer, además, un marco jurídico para su protección. Por ejemplo, la Comisión Europea ha implementado la *Estrategia temática para la protección del suelo en Europa*, la cual identifica a la erosión, la reducción de la materia orgánica, la contaminación, la compactación, la salinización, la pérdida de la diversidad biológica, el sellado del suelo, los deslizamientos de tierra y las inundaciones, como las principales amenazas para los suelos.

El debate acerca de cuáles son los métodos más apropiados para la evaluación de la salud del suelo es complejo, dado los múltiples componentes del mismo, la gran cantidad de bienes, servicios y funciones que proporciona y su variabilidad espacial. Aunque la salud de un suelo no puede medirse directamente, sí se puede inferir a partir de la determinación de propiedades específicas del suelo (por ejemplo, el contenido en materia orgánica) y por la observación de su estado (por ejemplo, la fertilidad). Un objetivo clave para determinar la salud de un suelo es pues la disponibilidad de indicadores factibles de ser utilizados en la evaluación

de su estado. Es evidente que un único indicador no puede abarcar todos los aspectos de la salud del suelo, pero tampoco sería viable, ni necesario, medir todos los indicadores posibles (Kibblewhite y col., 2008).

El término “indicador” de la salud de un suelo puede definirse como “las propiedades que miden procesos ambientales, y que, de manera global, nos proporcionan información sobre si el suelo está funcionando normalmente” (Pankhurst y col., 1997). Doran y Safley (1997) establecieron una serie de requisitos a tener en cuenta para los indicadores de salud: a) estar correlacionados con procesos de los ecosistemas; b) abarcar propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo; c) facilidad para su medida y bajo coste y d) responder a los cambios en el tiempo. En la Figura 1.1 se muestran los parámetros físico-químicos y biológicos utilizados para evaluar la salud del suelo y las técnicas que más comúnmente se emplean para analizar dichos parámetros.



**Figura 1.1.** Parámetros físico-químicos y biológicos utilizados como indicadores de salud del suelo



### 1.3.1. Indicadores biológicos: los microorganismos como indicadores de la salud del suelo

Los microorganismos son claves en la existencia de la vida, en ambientes terrestres y acuáticos, dado su papel en la mineralización y transformación de la materia orgánica. De hecho, la oxidación y reducción del azufre, la amonificación, la fijación del nitrógeno, la metanogénesis y la oxidación del metano, son todos procesos llevados a cabo por microorganismos. Además, los microorganismos también ejercen una gran influencia en las propiedades físicas del suelo. Así, la producción de polisacáridos y otras sustancias extracelulares ayudan a mantener la estructura del suelo, ya que actúan como agentes cementantes que estabilizan los agregados del mismo (Elliott y col., 1996). Por otra parte, la biodisponibilidad de compuestos químicos, por ejemplo, metales pesados o pesticidas, que es también un problema importante para la salud del suelo, está también relacionada con la actividad microbiana.

Los microorganismos proporcionan una medida integrada de la salud del suelo. En comparación con los organismos superiores, los microorganismos responden rápidamente a los cambios en el ecosistema, y se adaptan rápidamente al nuevo ambiente, por lo que los cambios en las poblaciones y en las actividades microbianas son excelentes indicadores de la salud de un suelo (Turco y col., 1994; Pankhurst y col., 1995). Además, los microorganismos responden con mayor rapidez a situaciones de estrés ambiental, ya que poseen una relación mucho más íntima con el ambiente, debido a su elevada relación superficie/volumen. Por tanto, el estudio de las comunidades microbianas permite profundizar en el conocimiento de la salud de los suelos, y por tanto, proporciona información que ayuda a intervenir más eficazmente en la restauración de los ecosistemas degradados.

Sobre la base de la definición de indicador ambiental dada por Christensen y Moller (2001), podemos definir “indicador microbiano” como un parámetro microbiano que representa propiedades del ambiente o impactos en el ambiente, y que proporciona una información que va más allá de lo que el parámetro medido representa por él mismo.

Los indicadores microbianos de la salud de un suelo son numerosos y cubren un conjunto diverso de medidas acerca de las propiedades multi-funcionales que las comunidades microbianas tienen en el ecosistema. Algunos de los más utilizados se mencionan a continuación, y se señalan las distintas técnicas que pueden aplicarse para su medida:

a) *Biomasa microbiana*: Para estimar este parámetro se utilizan distintas técnicas, entre las que cabe destacar:

- Tinción directa al microscopio con colorantes fluorescentes (por ejemplo DAPI).

- Actividad respiratoria del suelo. La biomasa microbiana activa se estima mediante la medida del CO<sub>2</sub> liberado de la oxidación microbiana de la materia orgánica del suelo.
- Respiración inducida por sustrato. Este parámetro mide el cambio en la tasa de respiración (producción de CO<sub>2</sub>) al añadir al suelo un sustrato fácilmente metabolizable, por ejemplo, la glucosa (Arias y col., 2005).
- Ácidos grasos fosfolipídicos (PLFA). Los PLFA, componentes esenciales de la membrana celular, se consideran, además de buenos indicadores de la existencia de biomasa viable, biomarcadores de diferentes grupos de microorganismos, por lo que también pueden ser utilizados para estimar la biodiversidad microbiana. Por tanto, el análisis de PLFA es un método rápido y fiable para detectar también, posibles cambios en la estructura de las comunidades microbianas del suelo, que pudieran relacionarse con cambios en el uso y manejo del suelo (Frostegard y Baath, 1996; Bossio y col., 1998).
- Cuantificación de la cantidad de ADN del suelo. *A priori*, la cuantificación del ADN, subsiguiente a su extracción del suelo, es un método simple y práctico para estimar la biomasa del suelo.

*b) Actividad microbiana.* La actividad de los microorganismos en el suelo puede determinarse de varias maneras, entre las que cabe mencionar: síntesis de ADN y síntesis proteica (Baath, 1998), actividad respiratoria del suelo, descomposición de la materia orgánica (Verhoef, 1995) y valoración de la actividad de diferentes enzimas, tales como: celulasas, ureasas, fosfatasas y fenol oxidasas (Dick y col., 1996). Pueden también utilizarse técnicas moleculares para la determinación de este indicador. Así, la actividad de los microorganismos del suelo puede estimarse mediante la medida del ARNm utilizando RT-PCR (transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa) (Duineveld y col., 2001) y también PCR a tiempo real (RT-PCR) (Pfaffl y Hageleit, 2001).

*c) Biodiversidad microbiana: genética y funcional.* Muchos estudios han demostrado que cuanto mayor sea la biodiversidad microbiana del suelo mayor es su capacidad de resistencia frente a factores de estrés.

Son múltiples las técnicas que pueden utilizarse para evaluar la diversidad genética y funcional de las comunidades microbianas de un suelo. Entre las técnicas clásicas se encuentran: i) aislamiento de microorganismos, utilizando medios de cultivo que satisfagan los requerimientos nutricionales del mayor número posible de microorganismos; ii) recuento directo al microscopio; iii) análisis de PLFA; iv) patrones de utilización de fuentes de carbono y nitrógeno y producción extracelular de enzimas (Arias y col., 2005). Además, en los últimos años, se han aplicado técnicas moleculares que aportan información complementaria y valiosa sobre la biodiversidad genética de una comunidad microbiana. Entre estas técnicas cabe mencionar: hibridación *in situ* mediante sondas fluorescentes (FISH), electroforesis en gel de gradiente desnaturante

(DGGE), electroforesis en gel de gradiente de temperatura desnaturalizante (TGGE) y clonación de genes ARNr 16S. Por otra parte, la diversidad funcional de una población microbiana puede evaluarse mediante la utilización del sistema denominado BIOLOG<sup>TM</sup> (Girvan y col., 2003). Este sistema permite conocer la dinámica de las comunidades microbianas en distintos tipos de suelos, mediante el estudio de los perfiles enzimáticos y de utilización de fuentes de carbono.

### 1.3.2. Indicadores físico-químicos

Como se ha mencionado con anterioridad, los indicadores de salud de un suelo deben también reflejar las propiedades físicas y químicas del mismo. La interpretación de estos indicadores dependerá del uso específico del suelo. Entre estos indicadores, Arias y colaboradores (2005) destacan los siguientes:

*a) Capacidad de infiltración hídrica.* Este parámetro hace referencia a la cantidad máxima de agua que puede absorber un suelo en determinadas condiciones. La tasa de infiltración se ve afectada, entre otros factores, por el tipo de suelo, la porosidad, la vegetación y por la cantidad de materia orgánica presente en el mismo. Por otra parte, la tasa de infiltración está sujeta a cambios significativos como consecuencia del uso y manejo que se le dé al suelo.

*b) Densidad del suelo.* Depende en gran medida del tipo de partículas presentes en el suelo y de la manera en que estén empaquetadas. Las capas de suelo muy compactas restringen el crecimiento de las raíces e impiden el movimiento de aire y de agua a través del suelo.

*c) pH.* El pH del suelo afecta a la solubilidad de ciertos minerales, a la disponibilidad de nutrientes para las plantas y a la actividad de los microorganismos. Generalmente, un pH bajo se relaciona con suelos muy húmedos, mientras que en suelos más secos se observan pHs más altos. Se consideran óptimos para el cultivo valores de pH entre 6 y 7,5.

*d) Conductividad eléctrica.* Es un indicador de la cantidad de iones (sales disueltas) presentes en un suelo (disueltos en el suelo). El crecimiento de plantas y de microorganismos y el balance hídrico, entre otros, se ven seriamente afectados por un exceso en el contenido de sales de un suelo. Esto puede ocurrir de manera natural o como consecuencia de un uso y manejo inapropiado del suelo.

*e) Capacidad de intercambio iónico.* Indica la capacidad del suelo para suministrar nutrientes a las plantas, principalmente calcio, magnesio y potasio. Específicamente, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) está relacionada con la cantidad de coloides, materia orgánica y arcilla, los cuales tienen una carga eléctrica negativa y por tanto hacen que el suelo retenga cationes.

f) *Estabilidad de los agregados*. Los agregados juegan un papel fundamental en diversos aspectos de la salud del suelo, como el movimiento y almacenamiento de agua, aireación del suelo, protección física de la materia orgánica, prevención de la erosión, desarrollo de las raíces y la actividad de la comunidad microbiana.

g) *Otros indicadores*. El espesor de la capa superior del suelo, el crecimiento de las raíces y la resistencia a la penetración, son también indicadores importantes de la salud del suelo. Los cambios en el espesor de la capa superior del suelo son, normalmente, consecuencia de procesos de erosión acelerados, quemadas y otras prácticas, que logran eliminar esta capa vegetal protectora. Estos cambios llevan a la pérdida de la capa más fértil del suelo, y a la disminución de la capacidad de retención hídrica, de la cantidad de materia orgánica y de la productividad de los suelos.

## 1.4.

### **Técnicas moleculares aplicadas al estudio de la biodiversidad genética de comunidades microbianas**

Durante siglos los científicos han estudiado la diversidad de plantas y animales a escala continental. Sin embargo, y a pesar de la importancia de los microorganismos en los procesos naturales, los estudios sobre la diversidad microbiana y la distribución de ésta en la Tierra han sido muy escasos.

Tradicionalmente, la identificación de los microorganismos de un sistema dependía de la obtención de cultivos puros mediante las técnicas habituales de aislamiento y purificación. Así, la biodiversidad microbiana de un ecosistema se estudiaba a partir de los cultivos obtenidos y de los parámetros físico-químicos medidos *in situ*. Para aislar un microorganismo se necesita conocer, al menos parcialmente, sus necesidades fisiológicas, por lo tanto, resulta muy difícil aislar todos los microorganismos presentes en un sistema. Por otro lado, en la naturaleza existen numerosas asociaciones simbióticas que resultan imposibles de reproducir en el laboratorio. Como consecuencia de esto, sólo conocemos una parte minoritaria de los microorganismos que componen las diversas comunidades. Este problema se ha podido abordar en gran medida, con el uso de técnicas de genética y de biología molecular. Así, es posible caracterizar la mayoría de los microorganismos que componen un sistema partiendo de su ADN, sin necesidad de cultivarlos previamente.

En los últimos 25 años la ecología microbiana ha experimentado una gran evolución debido a la utilización de técnicas moleculares en sus investigaciones. El desarrollo de métodos para aislar el ADN directamente de las muestras ambientales y la amplificación génica utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han permitido, no solo la obtención de “perfiles” característicos de las poblaciones

microbianas presentes en un ecosistema, sino también la secuenciación de los microorganismos presentes en el mismo (Felske y Osborn, 2005).

Aunque hace más de 30 años que Torsvik (1980) publicó el primer protocolo para la extracción de ADN del suelo, la identificación de los microorganismos presentes en las muestras ambientales centrada en el estudio del ADN extraído directamente, no se produjo hasta finales de los años 80 y principios de los 90, cuando la hibridación de ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la polimerasa y la clonación y secuenciación del ADN pasaron a ser técnicas habituales en los laboratorios de investigación. Obviamente, el análisis de los ácidos nucleicos extraídos directamente de las muestras ambientales permite estudiar en mayor profundidad las comunidades microbianas, al evitar las limitaciones de las técnicas de cultivo (Milling y col., 2005). Además, el análisis del ADN puede proporcionar información sobre la diversidad estructural de las muestras ambientales y sobre la presencia o ausencia de ciertos genes funcionales, por ejemplo, genes que confieren capacidades para la biodegradación de compuestos xenobióticos o de resistencia a los antibióticos; sin embargo, hay que tener en cuenta que, en general, el análisis de ADN no permite obtener conclusiones sobre la actividad metabólica de los miembros de la comunidad bacteriana o fúngica (Röling y Head, 2005).

A finales de la década de 1980, se lograron importantes avances en la identificación de microorganismos y en el establecimiento de relaciones filogenéticas entre ellos, mediante la secuenciación de los genes ribosomales. El trabajo de Woese y colaboradores (Woese, 1987) fue pionero en establecer estos genes como “cronómetros moleculares” debido a sus características de universalidad, su papel en varias actividades celulares y a que presentan una estructura muy conservada. En un comienzo, los estudios sobre diversidad microbiana se realizaron utilizando la subunidad 5S a partir de ADN de muestras ambientales (Lane y col., 1985, Stahl y col., 1985). Sin embargo, dada la corta longitud de la secuencia, su utilidad resultó limitada a efectos de clasificación taxonómica. Aunque la subunidad 23S es de mayor tamaño que la 16S, es esta última la que se ha utilizado como estándar para los estudios taxonómicos, debido a que su secuenciación se obtiene de manera fácil y rápida (Spiegelman y col., 2005). El gen codificante del ARNr 16S está formado por ocho regiones muy conservadas (U-U8) en todo el dominio *Bacteria* y nueve regiones variables (Jonasson y col., 2002). Debido a que no ocurre transferencia horizontal entre genes del 16S y a la presencia de regiones, tanto conservadas (a nivel de dominio, orden, género...) como variables que han evolucionado de manera diferente, la relación entre estos genes refleja la relación evolutiva entre los organismos. Así, la comparación de secuencias de ARNr16S se ha convertido en el estándar para la identificación taxonómica a nivel de especie (Armougnom y Raoult, 2008). Aunque los rangos son arbitrarios, lo común suele ser que se tome un rango entre el 0,5 -1 % de divergencia para determinar que dos secuencias pertenecen a la misma especie (Clarridge, III, 2004).

Como resultado de sus propiedades filogenéticas y de la gran cantidad de secuencias disponibles para realizar estudios comparativos, la secuenciación del gen 16S es actualmente el método más utilizado para realizar estudios de clasificación microbiana (Armougnom y Raoult, 2008). Sin embargo, el abordaje molecular de la biodiversidad de las comunidades microbianas requiere de la utilización de diversas técnicas moleculares, que proporcionen datos completos y fiables de un sistema. Entre estas técnicas se encuentran, además de la clonación del gen que codifica para el ARNr 16S, la electroforesis en geles de gradiente desnaturante (DGGE), que permite analizar la variación de las poblaciones en el tiempo y el espacio con mucha facilidad, y la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH), que permite realizar una cuantificación de microorganismos de forma específica (González, 2005).

En resumen, las técnicas de biología molecular aportan datos muy útiles sobre la estructura y diversidad de las comunidades microbianas del suelo. Los trabajos realizados en los últimos años han puesto de manifiesto que la diversidad microbiana del suelo es inmensa y que la composición de las poblaciones microbianas está influenciada por una amplia gama de factores bióticos y abióticos (Fierer y Jackson, 2006).

### 1.4.1. Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes

La hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) permite identificar específicamente microorganismos y además cuantificarlos. Consiste en una hibridación ADN-ARN en la que se utilizan sondas de ADN de unos 18 nucleótidos que tienen su diana en el ARNr 16S. Las sondas se marcan con un fluorocromo en el extremo 5'. Las células en las que se establezca la hibridación serán detectadas utilizando el microscopio de fluorescencia. Las sondas pueden ser diseñadas para detectar los microorganismos a nivel de dominio, orden, género, especie e incluso de poblaciones dentro de una misma especie. El FISH requiere un método de fijación de la muestra en el que no se produzca la lisis celular ni la destrucción de los ribosomas. Los compuestos químicos más utilizados en la fijación son los aldehídos (*p*-formaldehído, formaldehído o glutaraldehído) y algunos alcoholes (metanol o etanol). La ventaja principal de la técnica de FISH frente a otras cuantitativas como NMP (Número Más Probable) es su mayor especificidad. Además, se detectan sólo aquellas células que tienen un porcentaje suficiente de ribosomas en el citoplasma para que la hibridación sea significativa. Así sólo se van a contabilizar las células que son activas en el sistema. La desventaja de la hibridación *in situ* es que previamente se necesita conocer las secuencias de los microorganismos que componen un sistema, por lo que es conveniente combinarla con otras técnicas moleculares como DGGE o clonación del gen de ARNr 16S.

### 1.4.2. Extracción y cuantificación del ADN

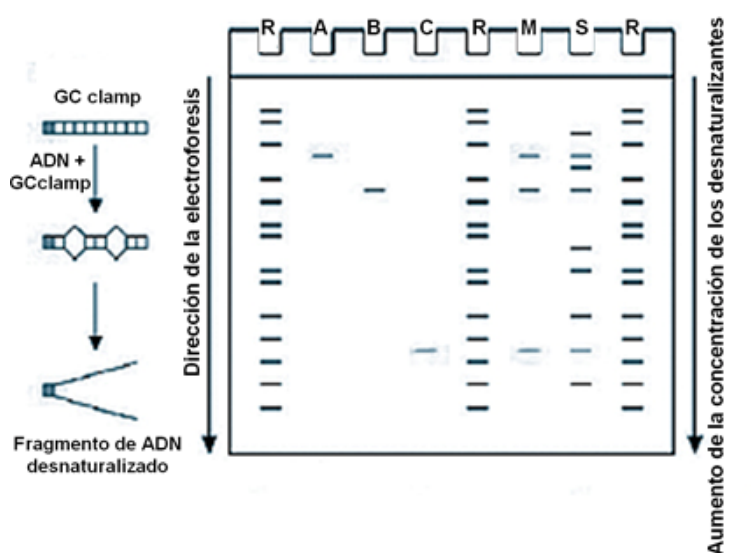
Para la estimación de la biomasa microbiana utilizando el ADN del suelo es necesario, en primer lugar, su extracción de las muestras de suelo. La extracción de los ácidos nucleicos (ADN o ARN) es una etapa crítica, tanto para la cuantificación como para estudios posteriores de biodiversidad genética. Existen diversos procedimientos para extraer el ADN de las muestras de suelo. Unos métodos se basan en la separación de las células bacterianas de las partículas del suelo mediante centrifugación, seguido de la lisis de dichas células, para recuperar el ADN liberado. Este método suele ser muy laborioso y exige grandes cantidades de muestra (alrededor de unos 100 gramos). Otros autores utilizan la lisis directa, obteniendo el ADN sin realizar la separación de las células de las partículas del suelo. El ADN se libera mediante una extracción con SDS y después de precipitar el ADN, éste se purifica. Aunque este método suele proporcionar un mayor rendimiento, la pureza del ADN obtenido no suele ser suficiente para posteriormente analizar la muestra con técnicas moleculares. Es muy común que las muestras tengan una alta concentración de inhibidores enzimáticos, como los ácidos húmicos, inhibidores de la reacción de PCR (Cho y col., 1996). Es por tanto de gran importancia optimizar el proceso de extracción y purificación de los ácidos nucleicos del suelo, de cara al desarrollo satisfactorio de las reacciones de amplificación de los fragmentos de ARNr 16S.

Recientemente se encuentran disponibles kits comerciales para la extracción de ADN de los suelos, los cuales representan un avance importante desde el punto de vista de la simplificación del proceso y la calidad de las preparaciones de ADN obtenidas. Los kits comerciales para la extracción del ADN se pueden utilizar en presencia de la matriz ambiental, como por ejemplo el suelo, y/o a partir de un precipitado celular (Milling y col., 2005).

### 1.4.3. Electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE)

La electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE) permite separar moléculas de ADN de doble hebra de igual tamaño, según su temperatura de fusión ( $T_m$ ), la cual está directamente relacionada con la secuencia (Muyzer y Smalla, 1998). Esta técnica permite separar dos fragmentos de ADN que difieran en tan sólo la posición de una base. En primer lugar, a partir del ADN genómico extraído del suelo, se realiza la amplificación del fragmento de ARNr 16S elegido, utilizando cebadores correspondientes a los dominios *Bacteria* o *Archaea*. El fragmento de ADN amplificado es sometido a un gradiente de urea y formamida en un gel de poliacrilamida. Cada molécula se va a detener cuando la concentración de urea-formamida sea suficiente para producir su desnaturización, de modo que al cambiar su estructura y dejar de ser soluble no podrá seguir avanzando a través de los poros del gel. Generalmente esta electroforesis se lleva a cabo a una temperatura constante entre 50 y 65 °C. Todas las moléculas de ADN deben llevar

en uno de sus extremos una región rica en G-C (GC clamp) para evitar la separación total de las dos hebras de ADN (Figura 1.2). A partir del DGGE, se puede eluir el ADN de las bandas obtenidas para lograr identificar los microorganismos de interés (González, 2005).



**Figura 1.2.** Electroforesis en gels de gradiente desnaturalizante (DGGE): R= patrón de referencia; A= organismo 1; B= organismo 2; C= organismo 3; M= mezcla de organismos 1,2 y 3; S= muestra desconocida

El análisis de una comunidad microbiana utilizando librerías de clones es un proceso muy largo y no resulta viable cuando se han de analizar muchas muestras. Es el caso, por ejemplo, de tratar de analizar los posibles cambios de una comunidad microbiana que ha sido expuesta a perturbaciones ambientales o si se pretende estudiar cómo cambia la composición microbiana en diferentes ambientes. Para este tipo de estudios se necesitan técnicas que permitan el procesamiento de muchas muestras al mismo tiempo, como es el caso de la DGGE. La técnica de la DGGE se considera una de las mejores técnicas moleculares para obtener un patrón de la comunidad microbiana, debido a su efectividad para la predicción de la diversidad, riqueza y distribución de los microorganismos presentes en las muestras. Adicionalmente, como se mencionó anteriormente, mediante la DGGE se puede realizar la identificación de los microorganismos, ya que las bandas de ADN pueden ser recuperadas y secuenciadas (Yu y Morrison, 2004). Sin embargo, diversos autores han señalado algunas objeciones. Así, al realizar la PCR algunos filotipos pueden ser amplificados preferentemente debido a una mayor complementariedad de los cebadores o a diferencias en la elongación de los diferentes amplicones. También puede ocurrir que al aplicar un gran número de ciclos durante la PCR algunos amplicones puedan verse favorecidos sobre otros. Todos estos factores pueden alterar la concentración de los productos de la PCR,



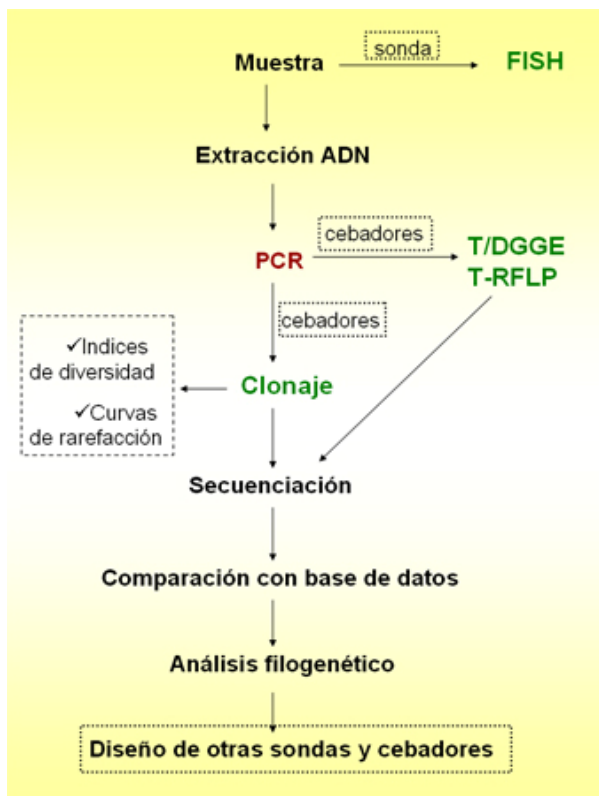
provocando que la concentración final no sea un reflejo fiel de la composición en la muestra original (Díez y col., 2001). Para Heur y colaboradores (1997), las muestras que tienen especies notablemente dominantes presentan patrones más pobres que las que no presentan grupos dominantes. Según estos autores, las especies que están presentes en menos de un 1 % no están representadas en los patrones de bandas obtenidos.

#### **1.4.4. Clonación del gen codificante para ARNr 16S**

La secuenciación del ARNr 16S para el estudio de las poblaciones microbianas proporciona información sobre la biodiversidad de un sistema y la filogenia de los microorganismos que lo componen.

La clonación del gen codificante para ARNr 16S se realiza a partir del ADN genómico y se utilizan cebadores universales pertenecientes a los dominios *Bacteria* o *Archaea*. El producto de esta amplificación es clonado en células competentes y, de esta forma, se pueden obtener separadamente los genes correspondientes a los distintos microorganismos de la muestra. Mediante la recuperación de los plásmidos y la secuenciación del inserto se puede construir una librería de genes codificantes para ARNr 16S de los microorganismos presentes en la muestra. Las secuencias obtenidas pueden ser utilizadas para realizar estudios filogenéticos y para el diseño de sondas (Amann y col., 1995; Pace y col., 1986). La ventaja que presenta esta técnica frente al DGGE es que se obtiene la secuencia del gen completo, lo cual da una mayor precisión (González, 2005).

El esquema de la Figura 1.3 muestra los diferentes pasos que se siguen y las técnicas que se aplican durante un análisis filogenético.



**Figura 1.3.** Etapas y técnicas moleculares que se aplican en un estudio filogenético de muestras ambientales (Röling y Head, 2005)

La fiabilidad de la identificación de los organismos mediante el análisis comparativo de secuencias de genes 16S depende en gran medida de la base de datos utilizada. El *Proyecto de Base de Datos Ribosomales* (RDP, por sus siglas en inglés, Ribosomal Database Project) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) contiene 623.174 secuencias de ARN ribosomal de bacterias y arqueas. Cabe destacar que entre las herramientas que ofrece esta página web el “clasificador” ha demostrado una alta eficacia en la clasificación taxonómica de secuencias cortas de ARNr 16S obtenidas a través de diferentes técnicas. Otras bases de datos utilizadas son: la Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/>), que ofrece una herramienta muy útil para diseñar *microarrays* y el Proyecto Silva (<http://www.arb-silva.de>) que, además de tener secuencias de ARNr 16S, también tiene secuencias de la subunidad grande de los dominios *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya*, en un formato que es completamente compatible con el paquete ARB ([www.arb-home.de](http://www.arb-home.de)). Este paquete se ha utilizado mucho en la construcción de árboles filogenéticos mediante la inserción de secuencias casi completas dentro de árboles pre-establecidos (Armougnom y Raoult, 2009).

El estudio de la diversidad microbiana comprende dos aspectos: la riqueza de especies (número de especies presentes en la muestra) y la distribución de la abundancia relativa de las especies (Magurran, 2005). Para estimar la riqueza de una muestra se suelen agrupar las diferentes secuencias de 16S en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU, por sus siglas en inglés, Operational Taxonomic Units). El criterio utilizado para definir un OTU es el porcentaje de variación de los nucleótidos de una secuencia con respecto a otra. Estos valores suelen variar entre el 1 y el 5 %, dependiendo del estudio. Como resultado de estas inconsistencias, las comparaciones estadísticas fiables de la riqueza son limitadas (Martin, 2002). La diversidad de una muestra suele representarse mediante curvas de rarefacción. En estas curvas se representan el número de OTU (o secuencias) observados en función del total de clones estudiados o esfuerzo de muestreo. Además también se suelen utilizar métodos cuantitativos como los índices de diversidad de Shannon o de Simpson.

## 1.5.

### **Impacto de las perturbaciones sobre la estructura y composición del suelo**

Una perturbación es un suceso discreto en el tiempo (puntual, no habitual) que altera la estructura de los ecosistemas, de las comunidades o de las poblaciones y cambia los recursos, la disponibilidad de habitats aptos y/o el medio físico. El efecto de las perturbaciones sobre los ecosistemas depende de la magnitud del agente perturbador y de la susceptibilidad del ecosistema. Después de una perturbación, los ecosistemas pueden volver a la situación anterior o pueden iniciar un cambio irreversible (distinta estructura y composición). Hasta hace unos años, las perturbaciones eran consideradas como unos sucesos catastróficos que afectaban gravemente a los ecosistemas, pero que no tenían ninguna relación con ellos. En la actualidad se consideran una parte integrante de los ecosistemas terrestres que, por su acción continuada a lo largo de la historia de los mismos, han provocado la adaptación de las especies y han generado parte de la diversidad del planeta. Juegan además un papel muy importante en los ciclos biogeoquímicos de la materia. Ejemplos de perturbaciones naturales son, el fuego, las avalanchas de nieve, fenómenos meteorológicos extremos, inundaciones y deposición de partículas, plagas de insectos, etc. También se pueden considerar las perturbaciones antrópicas (generadas por el hombre) y entre éstas, la contaminación (aire, agua y suelo), la introducción y extinción de especies, etc. (Mataix-Solera y Cerdá, 2009b).

El fuego es la perturbación más importante en los ecosistemas mediterráneos por la elevada acumulación de biomasa seca. El fuego afecta a casi todas las regiones del planeta, con distinta intensidad y recurrencia según el clima, tipo de vegetación y fuentes de ignición. Para que ocurra un incendio es necesario

que concurren tres condiciones: i) que haya suficiente biomasa con cierta continuidad espacial para que pueda propagarse, ii) que la biomasa esté lo suficientemente seca para que pueda arder (combustible) y iii) que haya una fuente de ignición (rayo, erupciones volcánicas, choque entre rocas, hombre, etc.). En los desiertos, los incendios son muy improbables por la falta de continuidad de la vegetación. En las selvas tropicales húmedas, aunque existe suficiente biomasa, suele estar demasiado húmeda, por lo que los incendios solo pueden ocurrir en determinados períodos (Mataix-Solera y Cerdá, 2009a).

### 1.5.1. Incendios forestales

El fuego es un factor ecológico natural en los ecosistemas terrestres. Desde las sabanas y las praderas, donde su frecuencia es anual, hasta las taigas y pluvisilvas donde pasan siglos sin incendios, los fuegos han dado forma a los biomas del planeta. Además, el fuego es un agente fundamental en los procesos de sedimentación y, por lo tanto, en el ciclo geológico de las rocas. Así, el fuego debe ser entendido, sobretodo, como uno de los procesos planetarios clave, junto al clima, que ha condicionado la evolución y la dispersión de las plantas y el desarrollo de los biomas, la formación de suelos y el ciclo hidrológico y erosivo.

Los incendios forestales suelen ser una de las principales perturbaciones que sufren los bosques. Su papel en la alteración de la composición florística promoviendo la regeneración de los árboles y la mejora en la producción de madera está ampliamente estudiado (Mataix-Solera y Cerdá, 2009a). Además, la presencia del fuego en los ecosistemas terrestres ha dado lugar a adaptaciones bien conocidas como el rebrote, estrategias de liberación de semillas y germinación, y cortezas resistentes. En el caso de los ecosistemas mediterráneos, aún con incendios de alta intensidad, la vegetación se suele recuperar con facilidad. Además de las hierbas que cubren el suelo el año posterior al incendio, la mayoría de las plantas bien rebrotan o bien germinan con gran facilidad. En algunos casos se comprueba que sin fuego desaparecerían algunas especies, como es el caso de los brezales, ya que los cambios provocados por el fuego en las propiedades del suelo son imprescindibles para su mantenimiento. En este sentido, los ecosistemas mediterráneos han tenido al fuego como uno de los factores que ha contribuido a su formación y estabilidad.

A pesar de que el fuego es un factor ecológico natural del ecosistema mediterráneo, la evolución socioeconómica de los últimos 50 años ha llevado a una recurrencia inusitada de los incendios (Mataix-Solera y Cerdá, 2009b). La industrialización de las sociedades modernas y el uso de combustibles fósiles han provocado una reducción del uso de biomasa. Por otra parte, la migración de los habitantes de zonas rurales a las grandes urbes ha contribuido al evidente abandono de la agricultura y de los campos, lo que también favorece los incendios. Otra de las claves para entender la situación actual en cuanto a los incendios y la política

forestal radica en el establecimiento de una estrategia de supresión total del fuego tras el abandono del campo. Esta situación lleva a que los incendios puedan ser devastadores, creando zonas de gran riesgo cuando hay población asentada en zonas forestales. Incendios no controlados como los de Australia en 1983 y 2009, EEUU en 2002, Grecia en 2007 y 2009, o en la península ibérica de forma reiterada, tienen su origen en el abandono del campo. A ello hay que sumar otros factores como la política forestal, las condiciones climáticas, y la evolución socioeconómica (Mataix-Solera y Cerdá, 2009b).

Existen dos tipos de incendios forestales: los fuegos prescritos (controlados) y los incendios “salvajes”. La quema prescrita de los bosques es una práctica frecuente. Su objetivo es reducir materiales potencialmente combustibles, minimizándose así el alcance y severidad de los incendios, en caso de producirse éstos de manera descontrolada, y también facilitar la germinación de alguna especie de interés. Normalmente este tipo de incendio se programa cuando el suelo está moderadamente húmedo, de manera que muestran una severidad baja y, por lo tanto, un impacto casi nulo en las propiedades del suelo. En contraste con los incendios controlados, los incendios salvajes ocurren generalmente cuando hay una acumulación de material combustible y seco, y por lo tanto suelen ser muy severos. Sin embargo, debido a que esta severidad suele ocurrir de manera poco homogénea, el área incendiada la convierte en una mezcla de pequeñas parcelas muy poco afectadas y otras que sufren un mayor impacto (Certini, 2005).

No se pueden sacar conclusiones generalizadas sobre los efectos del fuego en el suelo, ya que éstos son muy variables debido a los diversos factores que intervienen. En algunos casos, el suelo sufre alteraciones muy fuertes que lo dejan en muy malas condiciones para su funcionamiento y por tanto, para poder asumir una revegetación. Sin embargo, en otros casos, el efecto no pasará de un leve quemado de las partes aéreas de la vegetación, produciéndose una “fertilización” del suelo y un cambio en la situación trófica de ciertos elementos, secuestrados en la vegetación. En algunos casos se ha observado un descenso en la productividad de ciertos ecosistemas tras la supresión total de los ciclos naturales de fuegos. Esta supresión lleva a la inmovilización biológica de ciertos nutrientes, especialmente de nitrógeno, limitando la productividad y funcionamiento habitual del ecosistema (Mataix-Solera y Cerdá, 2009b).

Conocer, por tanto, los efectos que tienen fuegos de distintas características sobre suelos de diferente naturaleza, es esencial para actuar adecuadamente tras la perturbación. La evaluación de las zonas afectadas por incendios es una labor indispensable, si queremos ayudar a la recuperación de la zona afectada. Después de un incendio forestal nos encontraremos con un escenario heterogéneo, que tras ser evaluado, requerirá, muy probablemente, la actuación humana dependiendo de la gravedad de los efectos del fuego sobre el suelo, sobre la vegetación o por el riesgo potencial de erosión (Mataix-Solera y Cerdá, 2009b).

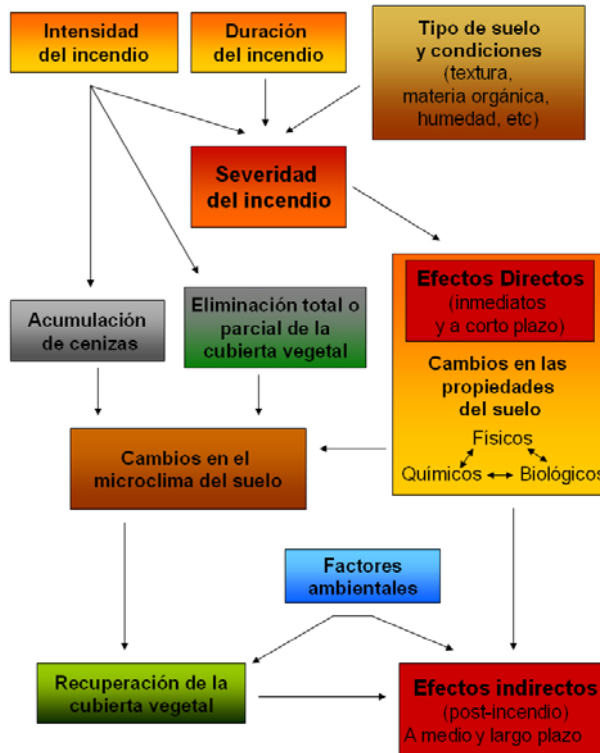
### **1.5.2. Efectos del fuego sobre las propiedades del suelo y factores determinantes**

El fuego influye en los sistemas edáficos al modificar sus características físicas, químicas y biológicas y con ello la respuesta hidrológica y erosiva ante las lluvias. Tanto de una manera inmediata, por efecto del calor recibido, como de manera indirecta, por la alteración posterior, los suelos presentan cambios espaciales y temporales en sus propiedades tras los incendios forestales. La magnitud de esos cambios dependerá de varios factores, siendo la intensidad del fuego y la severidad con la que afecte al suelo factores clave. También es de suma importancia el tipo de suelo y sus propiedades. No todos los tipos de suelo responden de la misma manera ante esta perturbación (Mataix-Solera y Cerdá, 2009b).

El alcance y la duración de los efectos del fuego dependen de la severidad del mismo, que a su vez está controlada por factores tales como la cantidad, naturaleza y humedad de los combustibles vivos y muertos, la temperatura y humedad del aire, la velocidad del viento y la topografía del lugar (Certini, 2005). La severidad del fuego se estudia sobre la base de dos componentes: intensidad y duración. La intensidad es la velocidad a la que el fuego produce energía térmica. A pesar de que el calor en el suelo húmedo penetra profunda y rápidamente, el calor latente de evaporización impide que la temperatura del suelo rebase los 95 °C. A continuación, cuando el agua se evapora por completo, la temperatura se eleva normalmente hasta los 200-300 °C. En presencia de combustibles pesados, se pueden alcanzar los 500-700 °C en la superficie del suelo e incluso se pueden alcanzar valores instantáneos de hasta 850 °C. La combinación de la combustión y la transferencia de calor producen gradientes de temperatura en el suelo. A una profundidad de 5 cm rara vez se superan los 150 °C y a menudo el calor no penetra más allá de los 20-30 cm (Certini, 2005). Por otra parte, la duración es quizás el componente que provoca el mayor daño en los suelos. De hecho, en los incendios intensos, pero cortos, apenas hay transferencia de calor al suelo. Por otra parte, dependiendo de la duración del incendio, la temperatura del suelo puede permanecer alta desde unos pocos minutos hasta varios días (Certini, 2005).

Algunas de las características del suelo, como el contenido de materia orgánica y la textura del suelo, pueden desempeñar un papel importante en la transferencia de calor a través del perfil del suelo durante el incendio. También la humedad del suelo es fundamental. La transferencia de calor es menor en suelos secos debido a que éstos son malos conductores de calor. En el caso de los microorganismos, el impacto del fuego depende en gran medida de la humedad del suelo, sin embargo, la humedad, aunque aumenta la conducción de calor, impide que se alcancen en el suelo temperaturas superiores a 95 °C. Por otra parte, se ha observado una mayor supervivencia de las bacterias heterotróficas en suelos secos que en suelos húmedos. Ello es debido a una mayor presencia de formas latentes cuando el suelo está seco (Mataix-Solera y col., 2009b).

En la Figura 1.4 se muestra un esquema de los factores que determinan los efectos directos e indirectos de los incendios en el suelo.



**Figura 1.4.** Factores que determinan los efectos directos e indirectos del fuego sobre el suelo

### 1.5.2.1. Efectos del fuego sobre las propiedades físico-químicas del suelo

En este apartado se presenta una descripción de los efectos del fuego sobre distintos parámetros físico-químicos característicos del suelo.

**pH.** Generalmente, en cualquier incendio, se produce un incremento en el pH del suelo, debido al aporte de cationes (Ca, Mg, K, etc.), óxidos y carbonatos presentes en la capa de cenizas. Dicho incremento variará dependiendo de la cantidad y la composición de las cenizas (que están en relación con el tipo de vegetación y el grado de combustión de la materia vegetal), así como de la capacidad del suelo para amortiguar los cambios de pH (Smith y col., 2008). Además, el aumento de pH se hace más notorio cuando se alcanzan temperaturas superiores a 450 °C (Certini, 2005). Ulery y colaboradores (1993) detectaron un aumento del pH en la capa superficial del suelo de hasta 3 unidades

inmediatamente después del incendio, debido principalmente a la producción de óxidos de K y N, hidróxidos y carbonatos, cuya concentración disminuyó al comenzar la época de lluvias.

Los suelos calcáreos presentan una mayor capacidad tampón, por lo que las variaciones en el pH que se registran debido al aporte de cenizas, suelen ser inferiores a las registradas en suelos de pH ácido. Pero este incremento de pH no persiste en el tiempo, debido a la formación de nuevo humus y al lavado de los cationes, si bien, en algunos casos se han necesitado años para recuperar el pH inicial. En ocasiones, las recuperaciones relativamente rápidas de parámetros, como el pH, son producto simplemente de la desaparición de las cenizas por efecto del viento (Mataix-Solera y col., 2009a).

**Conductividad eléctrica.** Como se mencionó anteriormente, la conductividad eléctrica del suelo indica la concentración de sales solubles en el mismo. Al igual que el pH, ésta suele aumentar como consecuencia de la solubilización de compuestos procedentes de las cenizas acumuladas. Con el paso del tiempo (1 ó 2 años) suelen reestablecerse los valores que existían antes del incendio, debido, principalmente, al lavado de las cenizas y a la incorporación de nutrientes por parte de la vegetación que coloniza de nuevo el área afectada (Mataix-Solera y col., 2009a).

**Contenido de carbono y materia orgánica.** La materia orgánica es un componente esencial del suelo, ya que mejora sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

Los cambios en el contenido de carbono de los suelos vienen dados por la intensidad del fuego (velocidad de liberación de energía) y por la severidad del mismo (el grado de afectación depende de las temperaturas alcanzadas en el suelo y del tiempo de residencia de determinadas temperaturas). En incendios de baja intensidad se ha observado un incremento del carbono orgánico procedente de la vegetación semipirolizada, mientras que en incendios de alta intensidad se reduce el contenido de carbono orgánico en los horizontes más superficiales del suelo (Mataix-Solera y col., 2009a). La materia orgánica comienza a degradarse cuando se alcanzan entre 200-250 °C; alrededor de los 460 °C, la materia orgánica desaparece (Certini, 2005). A medida que se incrementa la temperatura, el humus sufre modificaciones que le confieren características más resistentes a la degradación microbiana. Es frecuente observar incrementos en la concentración de carbono soluble tras el paso del fuego, procedente tanto de microorganismos muertos como de la solubilización de otros compuestos (Mataix-Solera y col., 2009a).

González-Pérez y colaboradores (2004) describieron los siguientes efectos principales de los incendios en la materia orgánica del suelo: i) la mayoría de los grupos oxígeno externos son eliminados, lo que conlleva a la aparición de



compuestos de solubilidad reducida; ii) grupos como los alcanos, ácidos grasos y alcoholes sufren una reducción en la longitud de su cadena; iii) los azúcares y lípidos sufren una aromatización; iv) se produce una condensación de las sustancias húmicas; v) se forman compuestos heterocíclicos nitrogenados, y vi) tiene lugar la aparición de carbón o carbono negro (*black carbon*).

El carbón se genera a partir de la combustión de materiales orgánicos. Su estructura aromática policíclica lo hace muy estable, lo que permite su persistencia en el suelo a largo plazo. Algunos estudios han descrito que el carbón aumenta la productividad del suelo debido a que aumenta la capacidad de éste para retener agua y nutrientes. Con respecto a la influencia del carbón sobre los parámetros biológicos, se ha observado que no afecta a la actividad microbiana pero sí a la diversidad promoviendo, por ejemplo, los grupos de bacterias nitrificantes (Hart y col., 2005).

Hay otra serie de propiedades edáficas que se ven alteradas como consecuencia de las modificaciones sufridas en el contenido en carbono y materia orgánica. La materia orgánica actúa como un agente cementante de las partículas del suelo, aumentando la estabilidad estructural del mismo. Por tanto, la pérdida de materia orgánica provoca un aumento de la erosionabilidad. Al desaparecer la materia orgánica, se produce una pérdida de los complejos arcillo-húmicos, vitales para la resistencia del suelo a la erosión y al transporte. Además, se ha observado que cuando ocurre una disminución de la materia orgánica, suele descender también la capacidad de campo, así como la capacidad de intercambio catiónico (Mataix-Solera y col., 2009a).

La recuperación de la materia orgánica del suelo tras un incendio comienza con la introducción (natural o artificial) de la cubierta vegetal, y generalmente es un proceso rápido (Certini, 2005). Jonhson y Curtis (2001) observaron un aumento del 8 % en el contenido de carbono en suelos que habían sufrido incendios hacía 10 años. Estos investigadores sugieren 3 razones para explicar este incremento: i) la incorporación al suelo de residuos no quemados, los cuales están más protegidos frente a la descomposición bioquímica; ii) la transformación de material orgánico en formas más recalcitrantes; y iii) el crecimiento en las zonas quemadas de especies fijadoras de nitrógeno, las cuales son capaces de aumentar de forma significativa el carbono del suelo.

**Contenido en nitrógeno.** Los cambios en el contenido en nitrógeno están, nuevamente, relacionados con las temperaturas alcanzadas en el incendio, debido a que éste se pierde a 200 °C; así, el contenido en nitrógeno total suele disminuir de forma proporcional a las temperaturas alcanzadas. En fuegos de baja intensidad se han observado incrementos de nitrógeno orgánico por la incorporación de materiales semipirolizados del suelo, pero en incendios de elevada intensidad, lo más frecuente es observar pérdidas. En incendios de alta intensidad, el contenido en nitrógeno inorgánico suele aumentar, debido a la gran cantidad de nitrógeno que

es susceptible de ser mineralizado por efecto del fuego (de la vegetación, de la materia orgánica del suelo, de los microorganismos, etc.) (Certini, 2005). Sin embargo, posteriormente suelen producirse grandes pérdidas de nitrógeno inorgánico por lixiviación, que pueden incluso afectar a la calidad de las aguas de ríos y lagos (Mataix-Solera y col., 2009a). Weston y Attiwill (1990) detectaron un aumento de 3 veces de la concentración original de nitrógeno inorgánico en los primeros 205 días ( $\approx 7$  meses) después del incendio; sin embargo, a los 485 días ( $\approx 16$  meses) la concentración de N inorgánico era igual que la observada antes del incendio.

Las formas inorgánicas que se producen durante un incendio son el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). El amonio es un producto directo de la combustión, mientras que el nitrato se produce a partir del amonio, semanas o meses después del incendio como resultado de varias reacciones bioquímicas. Este proceso se denomina nitrificación. Ambos compuestos ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ ) estarán a disposición de la biota del suelo; sin embargo, si no son utilizados a corto plazo, tendrán destinos diferentes: el nitrato tenderá a perderse por lixiviación a través del perfil del suelo, mientras que el amonio será absorbido por compuestos orgánicos y por minerales cargados negativamente, por lo que se mantendrá en el suelo (Certini, 2005).

**Concentración de otros elementos.** La concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  suele aumentar después del incendio, ya que la temperatura del mismo no suele alcanzar la temperatura de volatilización de dichos iones ( $>1240$  °C and  $>1107$  °C, respectivamente). El potasio, fósforo y azufre se evaporan a temperaturas menores ( $>760$ ,  $>774$  and  $>800$  °C, respectivamente) y sí pueden llegar a volatilizarse en incendios de mucha intensidad; en incendios menos intensos se acumulan en las cenizas (Murphy y col., 2006). Por otra parte, debido al aumento en el pH del suelo después del incendio, también se puede incrementar la disponibilidad de algunos iones, como es el caso del fósforo, calcio, magnesio y potasio (Smith y col., 2008).

El fuego puede causar la liberación de P inorgánico contenido en la materia orgánica del suelo. Sin embargo, los efectos del fuego sobre la disponibilidad de P en el suelo son complejos, ya ésta puede verse disminuida por adsorción a hidróxidos de hierro o aluminio o por su precipitación con calcio.

Por otro lado, la disponibilidad de P podría aumentar por la degradación y la combustión parcial de la materia orgánica del suelo y el aumento en el pH. Por lo tanto, no es sorprendente que los efectos del fuego sobre la disponibilidad de este elemento varíen en distintos estudios.

Los escasos estudios que aportan datos sobre los efectos del fuego sobre el  $\text{SO}_4^{2-}$  del suelo han puesto de manifiesto un aumento en la disponibilidad del mismo. Este incremento podría deberse a la combustión del azufre presente en la materia orgánica del suelo (Murphy y col., 2006).

**Estabilidad de agregados.** La respuesta de los agregados al paso del fuego es compleja de evaluar. En principio, la combustión de la materia orgánica llevaría a la destrucción de los agregados, teniendo en cuenta el importante papel de ésta en la agregación. Sin embargo, en muchos casos se han observado valores de estabilidad mayores en los suelos quemados. Por ejemplo, en los incendios de copas, donde el fuego no afecta directamente al suelo, se suele producir un aumento del contenido en materia orgánica (debido a la incorporación de materia orgánica proveniente de la vegetación destruida) y por ende un aumento en la estabilidad de los agregados, a medio y a largo plazo. Por otra parte, la mineralogía de la fracción arcillosa del suelo puede modificarse por el calentamiento, formando agregados más estables físicamente; también la presencia de compuestos hidrofóbicos puede aumentar la estabilidad de los agregados (Mataix-Solera y col., 2009a).

**Hidrofobicidad** inducida por el fuego. En determinadas circunstancias, algunos suelos pueden presentar repelencia al agua (hidrofobicidad). En los suelos hidrofóbicos la infiltración puede verse retardada o impedida, es decir, en los suelos que presentan esta característica, el agua no se absorbe fácilmente. Dependiendo de la persistencia de la hidrofobicidad, el agua penetrará en la superficie después de un período de tiempo (desde algunos segundos o incluso días). En general, se asume que un suelo es hidrofóbico cuando una gota de agua tarda más de 5 segundos en ser absorbida completamente por el suelo (Mataix-Solera y col., 2009a). En un estudio realizado por Everett y colaboradores (1995) se observó una gran variabilidad de este parámetro, variando desde 0 segundos hasta 270 segundos. La profundidad a la que ocurre el fenómeno de la hidrofobicidad depende en gran medida de la severidad del incendio, pero también de ciertas características del suelo como la humedad y el tamaño de partícula. En cualquier caso no suele sobrepasar los 6-8 cm de profundidad. Debido a la variabilidad en la severidad del fuego en un mismo incendio, es frecuente que la zona quemada resulte en un mosaico de zonas hidrofóbicas con zonas que mantienen su permeabilidad (Certini, 2005).

La hidrofobicidad tiene grandes implicaciones en el suelo. El hecho de que se retarde la infiltración puede aumentar la escorrentía superficial y acelerar la erosión hídrica, aumentar la transferencia de contaminantes y filtrado de nutrientes por la formación de flujos preferenciales, disminuir la producción de determinados cultivos, así como de la actividad microbiana y germinación de semillas (Mataix-Solera y col., 2009a).

### **1.5.2.2. Efectos del fuego sobre las poblaciones microbianas del suelo**

La microbiología del suelo después de los incendios ha sido menos estudiada que las alteraciones de las propiedades químicas y físicas del suelo

(Mataix-Solera y col., 2009b). Como se ha mencionado anteriormente, los incendios forestales provocan cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, pero son especialmente las propiedades bioquímicas y microbiológicas las que muestran una mayor sensibilidad a las perturbaciones originadas por el fuego; por tanto, su uso puede ser muy útil para evaluar el estado de los suelos afectados por un incendio (Mataix-Solera y col., 2009a).

Debido a que los microorganismos tienen funciones claves para el correcto funcionamiento de los ecosistemas, la reducción de la biodiversidad microbiana de un ecosistema no sólo disminuye los recursos genéticos, sino que también reduce su productividad y altera su capacidad de amortiguación frente a las perturbaciones. La comunidad microbiana del suelo, además de mediar en la descomposición de la materia orgánica y en el ciclo de nutrientes, desempeña un papel importante en los procesos de regeneración de ecosistemas degradados.

Los efectos del fuego sobre los microorganismos del suelo pueden variar ampliamente y dependen tanto de la severidad del fuego, como de las condiciones del suelo antes y después del incendio. En la mayoría de los casos, la biomasa microbiana suele disminuir después de un incendio, pudiendo mantenerse así por muchos años. Además, durante los incendios se producen compuestos tóxicos como las dioxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, hidrocarburos y bifenilos policlorados, que suelen inhibir el crecimiento y la supervivencia de los organismos que habitan el suelo (Kim y col., 2004).

El fuego puede generar una gran variabilidad en la respuesta microbiana, debido al elevado número de factores que se ven alterados por el fuego y que a su vez repercuten en los microorganismos. Este hecho hace que la interpretación de dichos estudios resulte compleja, a causa fundamentalmente, de la dificultad que entraña identificar cual de los múltiples condicionantes del comportamiento microbiano es el que tiene más peso en cada momento. Numerosos autores han encontrado una rápida recuperación de las poblaciones microbianas, especialmente bacterias heterótrofas, poco después del incendio. Esta recuperación se puede deber al aumento de carbono soluble y/o al aumento del pH. También se han propuesto las interacciones hongo-bacteria como otra posibilidad a tener en cuenta en la colonización del suelo tras el incendio, ya que el aumento del crecimiento bacteriano podría generar fenómenos de competencia con los hongos, condicionando una lenta recuperación de los mismos. En ciertas ocasiones, los hongos han igualado o superado los valores del control, quizás por la dispersión de esporas tras el shock térmico. En otros estudios se han observado efectos negativos, a corto plazo, en cianobacterias y algas, pero a medio plazo pueden recuperarse bien, viendo favorecido su crecimiento por la mayor cantidad de luz que puede llegar al suelo (Mataix-Solera y col., 2009a).

Debido a la co-evolución de las especies vegetales y las comunidades microbianas de la rizosfera, la pérdida temporal de la cubierta vegetal tras un

incendio tiene un impacto significativo en las comunidades microbianas del suelo, y la recolonización de zonas quemadas por los microorganismos dependerá de la recuperación de la capa vegetal (Mataix-Solera y col., 2009a). Hart y col. (2005) propusieron que son los fuertes vínculos existentes entre algunas especies de plantas y los microorganismos del suelo el factor dominante que dirige el comportamiento y la composición de la microflora del suelo tras un incendio. Además, la susceptibilidad del suelo a la erosión después del fuego es normalmente mayor, debido a la disminución de la cubierta vegetal. Las condiciones ambientales durante los meses posteriores al incendio son de una importancia crucial en la evolución de la restauración natural. Después de un incendio, y hasta que se recupere la cubierta vegetal, tanto las lluvias, como los períodos de sequía, llevan a una mayor erosión del suelo (Mataix-Solera y col., 2009a).

**a) Efecto sobre la biomasa microbiana.** El fuego puede tener numerosos y diversos efectos en los diferentes grupos de bacterias, algas y hongos presentes en el suelo. El efecto inmediato del fuego en la biomasa microbiana del suelo depende de la intensidad y la duración del incendio, y puede ir desde un efecto casi nulo hasta la esterilización completa del suelo. Sin embargo, se ha observado la rápida recolonización de determinados grupos microbianos, e incluso en algunos casos, el fuego ha estimulado la actividad microbiana, posiblemente por la liberación de carbono y nitrógeno más fácilmente utilizable (Yeager y col., 2005).

En la mayoría de los casos, los datos obtenidos de muestreos realizados inmediatamente después del incendio o pocos días después (y antes de cualquier lluvia) mostraron un efecto negativo sobre la biomasa y la diversidad de las comunidades microbianas. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que se produce una recuperación parcial de la biomasa microbiana a los pocos días del incendio. Por ejemplo, Guerrero y col. (2005) encontraron que después de 8 días de incubación, las muestras de suelo expuestas a 400 °C presentaban una mayor cantidad de biomasa microbiana que las muestras expuestas a 200 °C y 300 °C, debido a que en las primeras existía una mayor abundancia de carbono orgánico soluble. Sin embargo, este aumento de la biomasa es efímero debido a que el carbono disponible se mineraliza y agota rápidamente por los mismos microorganismos. Así, la materia orgánica restante no es suficiente para mantener altas las cantidades de bacterias heterotróficas (Mataix-Solera y col., 2009b).

En la bibliografía, por tanto, se encuentra una amplia gama de resultados con respecto a la recuperación de la biomasa microbiana después de los incendios. Esta variabilidad, se debe a diversos factores, como el tiempo de la toma de muestras después del incendio y la profundidad a la que se tomaron las mismas. Además, también influyen las variables ambientales de cada sitio estudiado, como el clima, el tipo de suelo, etc. Esto da como resultado que en algunos estudios se observe una disminución de la biomasa, mientras que en otros, no se detecte ninguna variación en la misma o incluso un ligero aumento (Mataix-Solera y col., 2009b).

En la tabla 1.1 se resumen los resultados obtenidos por varios autores con respecto al efecto del fuego sobre la biomasa microbiana de suelos quemados. Los tiempos a los que fueron recolectadas las muestras varían entre los estudios, siendo el menor, 1 día y el mayor, 50 años. Se observa que existe una alta variabilidad en los resultados obtenidos. El 19 % de los casos corresponden a una mayor biomasa de los suelos quemados, mientras que el caso contrario (menor biomasa en los suelos quemados) representa el 61 % de los casos estudiados. Los estudios restantes observaron una biomasa similar en ambos tipos de suelo. A simple vista no se puede establecer una correlación entre la biomasa de los suelos quemados y el tiempo de muestreo.

**Tabla 1.1.** Efecto del fuego sobre la biomasa del suelo según varios estudios (Mataix-Solera y col., 2009b)

Ref	Biomasa Suelo Q <sup>1</sup>	Tiempo muestreo	Tipo Incendio <sup>2</sup>
1	A	12 d	E
2	B	1 año	E
3	A	7 meses	S
4	B	1 mes / 2 años	P
5	B	1 mes / 2 años	S
6	A	7 d	E
7	B	15 meses	S
8	S	15 meses	S
9	A	7-84 días	E
10	A	1 año	S
11	B	6-12 años	S
12	S	50 años	S
13	B	12 años	P
14	B	6 años	S
15	B	4 meses - 4 años	S
16	B	9 meses	S
17	B	1 año	S
18	B	25 años	S
19	S	1 día / 1 año	E
20	B	11 años	S

**Tabla 1.1. (Continuación).** Efecto del fuego sobre la biomasa del suelo según varios estudios (Mataix-Solera y col., 2009b)

Ref	Biomasa Suelo Q <sup>1</sup>	Tiempo muestreo	Tipo Incendio <sup>2</sup>
21	A	2 años	E
22	B	2 años	E
23	B	12-18 meses	E
24	S	1 día / 1 año	E
25	B	2 años	E
26	B	2 años	P
27	B	1 año	P
28	B	1 día / 13 años	S
29	S	4,5 - 6,5 años	S
30	S	3,5 años	S
31	B	1 - 6 años	S

<sup>1</sup> Biomasa del suelo quemado en comparación con el suelo control: alto (A); bajo (B); similar (S).

<sup>2</sup> Tipo de incendio: incendio experimental (E); incendio salvaje (S); incendio prescrito (P).

**b) Efecto sobre la actividad microbiana.** El efecto de los incendios en la actividad microbiana, cuantificada como actividad respiratoria, también presenta disparidad de resultados. En muchos casos se ha observado un incremento inicial en la respiración, que se asocia a la solubilización de compuestos orgánicos por el calor. En otras ocasiones, se produce una reducción poco tiempo después del incendio, que puede llegar a mantenerse durante varios meses e incluso años (Mataix-Solera y col., 2009b).

En cuanto a las actividades enzimáticas presentes en el suelo, por su naturaleza proteica se ven muy afectadas por el calor. La actividad de muchas enzimas del suelo aumenta en presencia de temperaturas entre 60-70 °C, y luego disminuye debido a la desnaturalización térmica. La completa inactivación de las enzimas se produce a 180 °C (Skujins, 1967; Tabatabai y Bremner, 1970).

En algunos estudios se ha observado que la actividad fosfatasa está correlacionada negativamente con la severidad de los incendios. Otras enzimas también se ven afectadas negativamente, pero no por los efectos directos del fuego, sino por los cambios sufridos por las propiedades del suelo. Diversos estudios han puesto de manifiesto una disminución de la actividad fosfatasa hasta 4 años después de un incendio debido al aumento del pH del suelo (Staddon y col., 1998).

También se ha observado que al producirse un aumento de la cantidad de fósforo en el suelo, se produce una disminución de la actividad fosfatasa ya que

éste actúa como inhibidor. Por otra parte, la actividad celulasa disminuye en los suelos quemados debido a que, como consecuencia directa del calentamiento del suelo, disminuyen las poblaciones de hongos, los cuales suelen tener un papel fundamental en la degradación de la celulosa en los suelos forestales. También se ha descrito una disminución de la actividad de ureasa y  $\beta$ -glucosidasa en suelos mediterráneos hasta 6 años después de ocurrido el incendio (Mataix-Solera y col., 2009b). En otro estudio, Hernández y col. (1997) detectaron una disminución de la actividad de varias enzimas como la deshidrogenasa, ureasa, fosfatasa alcalina y arilsulfatasa. Boerner y Brinkman (2003) observaron una disminución de entre el 15-50 % en la actividad fosfatasa ácida y del 5-50 % en la actividad  $\beta$ -glucosidasa, mientras que no se observaron cambios en la actividad quitinasa. Incluso en zonas sometidas a incendios prescritos, se han observado aumentos del 20 al 80 % en la actividad fenol-oxidasa.

**c) Efecto sobre la diversidad microbiana.** La diversidad microbiana varía tras un incendio por diversas razones: a) debido a las diferentes sensibilidades de cada grupo frente al calor; b) por sus estrategias de supervivencia o colonización; c) por la sensibilidad que presenten ante los cambios de las propiedades físico-químicas del suelo (sobre todo el aumento del pH y la cantidad de materia orgánica disponible); d) por los cambios en la humedad y la temperatura del suelo; e) por la destrucción y creación de nuevos nichos ecológicos y f) por los cambios en la biomasa y composición de la cubierta vegetal (Mataix-Solera y col., 2009b).

Se ha descrito que la disminución de las poblaciones bacterianas tiene lugar solamente en la capa superficial del suelo (0-2 cm). Como se mencionó anteriormente, la humedad del suelo evita que se alcancen altas temperaturas pero favorece la transferencia de calor a través del perfil de suelo, lo cual puede afectar a la actividad fisiológica de los microorganismos. Se ha observado que las bacterias gram-negativas son más sensibles a los efectos del fuego que las gram-positivas (Mataix-Solera y col., 2009b). Theodorou and Bowen (1982) observaron que los microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* (phylum *Proteobacteria*) eran muy sensibles al fuego, mientras que otros géneros, como *Bacillus* o *Clostridium* (phylum *Firmicutes*) producen formas de resistencia que les permiten sobrevivir a temperaturas entre 100-120 °C.

Smith y colaboradores (2008), en un estudio sobre la diversidad microbiana de suelos quemados y no quemados, observaron que existen más diferencias a niveles taxonómicos bajos (especie, cepa) que a niveles taxonómicos más altos (phylum, clase, orden). De igual modo que ocurría en el estudio realizado por Theodorou and Bowen (1982), estos autores observaron una mayor presencia de *Firmicutes* en suelos quemados, debido a la mayor supervivencia de las esporas producidas por este grupo de microorganismos. Por otra parte, encontraron una mayor proporción de  $\beta$ -*Proteobacteria* en los suelos quemados, en comparación con los controles, y los *phyla Chlamydia* y *Nitrospira* solamente se detectaron en



los suelos quemados. Por último, obtuvieron un gran número de secuencias que no estaban asociadas con especies descritas en las bases de datos.

En estudios realizados sobre el efecto del fuego en las poblaciones del *phylum Actinobacteria*, se han observado resultados contradictorios. Así, en algunos casos, se producía una disminución significativa de este grupo en la capa superficial del suelo, inmediatamente después del incendio (Meiklejohn, 1955; Deka y Mishra, 1983), mientras que en otros, no observó ningún efecto del fuego sobre estas poblaciones. El aumento del pH y la temperatura (con la subsiguiente pérdida de humedad) de los suelos después de un incendio, favorece la proliferación de actinobacterias, debido a que estos microorganismos son abundantes en suelos alcalinos y sus esporas les permiten sobrevivir en ambientes calientes y secos (Mataix-Solera y col., 2009b).

En relación a los microorganismos fotoautótrofos, se ha descrito que, inmediatamente después del incendio, la abundancia de estos microorganismos tiende a disminuir, sobre todo en el caso de las bacterias pertenecientes al *phylum Cyanobacteria*. Sin embargo, las cianobacterias y las algas suelen ser los grupos pioneros en la recuperación de los sistemas degradados. Dado que el hábitat natural de este tipo de microorganismos se caracteriza por amplias fluctuaciones en factores ambientales como pH, contenido y disponibilidad de nutrientes, luz, aireación, textura, temperatura y humedad, la mayoría de las condiciones que suceden tras el incendio, favorecen su crecimiento. Un factor importante es la ausencia de competidores por la luz, lo que facilita la colonización de los microorganismos fotoautótrofos. La proliferación de cianobacterias y algas promueve la colonización de otros microorganismos y mejora la estabilidad del suelo mediante la formación de costras biológicas. Cuando la cubierta vegetal está muy dañada por el incendio, la actividad bioquímica de los organismos fotoautótrofos proporciona insumos de carbono y nitrógeno al ecosistema del suelo. A largo plazo, una vez que la cubierta vegetal se recupera, las poblaciones de cianobacterias y algas disminuyen, dando paso a la proliferación de otros microorganismos (Mataix-Solera y col., 2009b).

Los hongos filamentosos parecen ser los microorganismos más afectados por el fuego, y suelen ser más susceptibles que las bacterias. Esto es probablemente debido a su mayor sensibilidad a la temperatura. En estudios en los que la severidad del incendio fue baja, algunos autores han encontrado pocos cambios en las poblaciones de hongos. Es evidente que el fuego causa una pérdida significativa de la biomasa de hongos en los horizontes orgánicos del suelo (Jonsson y col., 1999), de ahí que la abundancia de micorrizas en este nivel disminuya drásticamente. Sin embargo, las micorrizas que se desarrollan en sustratos más profundos están más protegidas contra las altas temperaturas. Cabe señalar que en ambientes semiáridos o secos las micorrizas se encuentran a una mayor profundidad que en los ecosistemas templados o húmedos y por lo tanto, los

efectos del fuego sobre las micorrizas son menores en ambientes secos (Mataix-Solera y col., 2009b).

En general, los efectos directos del fuego en las poblaciones de invertebrados son menos marcadas que en las de microorganismos, debido a que éstos tienen una mayor movilidad a través del perfil del suelo lo que aumenta el potencial de los invertebrados de escapar del calor (Certini 2005). Varios estudios han puesto de manifiesto una disminución en la abundancia de microartrópodos inmediatamente después de fuego. Sin embargo, la mayoría de estos resultados corresponden a estudios en los que la severidad del incendio fue alta. Por el contrario, otros estudios no han encontrado efecto alguno del fuego en la abundancia de microartrópodos (Mataix-Solera y col., 2009b).

En conclusión, se puede deducir que el efecto de los incendios sobre las comunidades microbianas del suelo es limitado, debido a que la mayoría de los estudios en este área se han hecho partiendo de suelos que han sufrido fuegos controlados, los cuales, como se mencionó anteriormente, no alcanzan la severidad de los incendios “salvajes” (Smith y col., 2008). Además, muchos de estos estudios se han realizado a partir de recuentos en placas, lo cual subestima significativamente la población microbiana del suelo. Aunque hasta el momento, hay pocos estudios basados en el análisis del ADN extraído de los suelos quemados (Kim y col., 2004), las técnicas moleculares proporcionarán, sin duda, un conocimiento amplio y valioso sobre los efectos del fuego en la composición de las comunidades microbianas de suelos degradados.

## 1.6.

### **Vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU)**

---

En España, una de las prácticas más habituales para la eliminación de los residuos generados como consecuencia de la actividad doméstica y comercial de ciudades y pueblos, ha sido y sigue siendo su almacenamiento en vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU), situados en las proximidades de las poblaciones generadoras (Pérez-Leblic y col., 2010). En la Comunidad de Madrid, el depósito de residuos urbanos en vertederos supera el 84 %, mientras que la incineración representa un 14 %, y otros sistemas de eliminación, orientados hacia el reciclado, todavía se encuentran en cifras testimoniales (García-Álvarez, 2010).

Entre los desechos que se acumulan en los vertederos figuran, tanto residuos domésticos (basuras, muebles, electrodomésticos...), como residuos industriales (metales, disolventes, pinturas, etc.), que dan lugar a la acumulación en el suelo de compuestos nitro-aromáticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, pesticidas y metales pesados, entre otros. Estos compuestos, aunque se encuentran en bajas concentraciones, producen graves efectos biológicos, dado que muchos de

ellos son tóxicos y/o cancerígenos (Baun y col., 2000). Además, debido a los procesos químicos y biológicos que tienen lugar en los vertederos, aparecen compuestos orgánicos e inorgánicos solubles, que, dependiendo de la composición y de las características del suelo, pueden originar cambios muy drásticos en la geoquímica y microbiología del vertedero (Röling y col., 2001; Sastre y col., 2003). En la mayoría de los casos, la presencia de compuestos peligrosos no se limita a la capa superior del suelo, sino que se filtra al subsuelo, donde constituyen una amenaza potencial para la calidad de las aguas subterráneas.

Existe, pues, una gran preocupación por parte de la opinión pública y de los investigadores sobre el impacto ambiental que estos vertederos ejercen sobre el suelo, y en este sentido, muchos grupos de investigación, tanto a nivel nacional, como internacional, están tratando de encontrar nuevas estrategias para descontaminar el medio ambiente.

En los últimos años ha aumentado sensiblemente el interés por conocer la salud del suelo, debido a que esta aproximación, podría contribuir al conocimiento de la capacidad de recuperación de un suelo dañado por distintos agentes. En este sentido, el conocimiento de las poblaciones microbianas presentes en un ecosistema contaminado, como es el caso de un VRSU incontrolado o de un acuífero contaminado, podría ser usado como una herramienta para predecir y monitorizar la posible degradación natural de los contaminantes presentes en el mismo (Jain y col., 2005); de hecho, las bacterias juegan un papel central en la biorremediación de contaminantes, junto con otros microorganismos tales como hongos y protozoos (Demmerová y col., 2005). La composición de las comunidades microbianas es pues indicativa del potencial de un entorno contaminado para que ocurra un proceso de biorremediación intrínseca (Tian y col., 2005).

Actualmente se utilizan tres tipos de biorremediación: i) la atenuación natural; ii) la bioestimulación y iii) la bioaumentación.

El método más simple de biorremediación es la atenuación natural. En este caso, en los lugares contaminados sólo se realiza un seguimiento, con el fin de asegurarse de que los procesos naturales de degradación de contaminantes están activos. La bioestimulación consiste en proveer a las comunidades microbianas autóctonas de los nutrientes necesarios y de un ambiente favorable en el que puedan llevar a cabo el proceso de degradación de los compuestos xenobióticos. Cuando los nutrientes se encuentran en bajas concentraciones y la velocidad de degradación de los contaminantes es un problema, la adición de nitrógeno y fósforo, así como la aireación del suelo, acelerará el proceso de biorremediación. Por último, la bioaumentación se aplica en los casos en que las comunidades naturales de bacterias degradadoras presenten bajos niveles o no estén presentes. Se adicionan microorganismos degradadores de compuestos xenobióticos para llevar a cabo el proceso de biorremediación. Aunque existen diversos estudios sobre la

bioaumentación, este proceso suele utilizarse en muy pocas ocasiones ya que, por lo general, las bacterias introducidas no pueden competir con las bacterias autóctonas que suelen estar mejor adaptadas (Kaplan y Kitts, 2004).

Aunque se conoce relativamente poco sobre los factores que más condicionan el desarrollo de las poblaciones microbianas presentes en suelos contaminados con hidrocarburos, probablemente, los más influyentes son: (i) el tipo de mezcla de contaminantes, (ii) el tipo de suelo (es decir, las propiedades físicas, químicas, y biológicas de los suelos), y (iii) el tiempo transcurrido desde que ocurrió la contaminación. Las mezclas complejas de hidrocarburos, incluyendo el petróleo, el combustible diesel y la creosota, están compuestas por alcanos, cicloalcanos, compuestos fenólicos, compuestos aromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos. A pesar de que estas mezclas contienen componentes similares, la abundancia relativa de cada uno y de los compuestos tóxicos (como los heterocíclicos, clorofenoles) varían considerablemente, siendo estas variaciones potencialmente importantes en la determinación de la estructura de las poblaciones microbianas que intervienen en la biodegradación (Hamamura y col., 2006). Por otra parte, es necesario tener en cuenta que en ambientes contaminados, los componentes de la mezcla de hidrocarburos van sufriendo cambios a través del tiempo, tanto por efecto de procesos abióticos (absorción, retención), como por efecto de procesos microbianos. A su vez, los cambios sufridos por la mezcla de hidrocarburos afectan a las poblaciones microbianas.

Para entender el impacto de la perturbación de una mezcla de hidrocarburos sobre las comunidades microbianas del suelo, es importante determinar si las respuestas de la población microbiana varían según el tipo de suelo o si, por el contrario, se observan patrones similares en las poblaciones microbianas de diversos ambientes. En un intento por analizar esta situación, Hamamura y colaboradores (2006) estudiaron las poblaciones microbianas de diferentes tipos de suelos, todos ellos contaminados con hidrocarburos. En su estudio observaron que el grupo de las actinobacterias se encontraba presente en la mayor parte de las muestras, cosa que no ocurría, por ejemplo, con el grupo de las pseudomonas. Hay que tener en cuenta que numerosos estudios previos destacan la presencia de *Pseudomonas* spp (perteneciente a las  $\gamma$ -Proteobacterias) en muchos ambientes contaminados con hidrocarburos. Además de bacterias, otros autores destacan que muchos hongos son también capaces de degradar aeróbicamente hidrocarburos. Estos microorganismos juegan un papel importante en el ataque primario de estos compuestos, haciéndolos más susceptibles a la degradación bacteriana (Björklöf y col., 2009).

Al igual que en los suelos quemados, la caracterización de las poblaciones microbianas presentes en los VRSU se puede llevar a cabo utilizando técnicas clásicas, como: cuantificación de la biomasa viable, medida de la actividad respiratoria y de las actividades enzimáticas, y mediante técnicas moleculares, como DGGE y clonación del gen de ADNr 16S, etc., técnicas, estas últimas que

nos permiten obtener patrones en el tiempo y en el espacio de las comunidades microbianas de un ecosistema, así como la identificación y el establecimiento de relaciones filogenéticas de los microorganismos presentes en el mismo. La detección directa de microorganismos utilizando técnicas moleculares, resulta también una herramienta muy útil para estudiar la estructura y función de las comunidades microbianas presentes en ecosistemas diversos.

## 1.7.

### Planteamiento del trabajo

---

En el trabajo que se presenta se han estudiado los efectos de dos fenómenos perturbadores de la salud de un suelo: el fuego y la contaminación con compuestos tóxicos, fundamentalmente hidrocarburos. Ambos fenómenos afectan a las comunidades microbianas del suelo y a su estructura trófica, lo que modifica los procesos de reciclaje de la materia orgánica y provoca la pérdida de la estructura del suelo y cambios en sus propiedades físicas y biológicas. Sin embargo, en muchos casos, los efectos sobre las comunidades microbianas son reversibles. 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. Así, el objetivo principal del trabajo que se presenta es el estudio de la diversidad y de la actividad microbiana presente en suelos afectados por incendios y en suelos de VRSU contaminados, así como la relación de la actividad microbiana y la biodiversidad con factores abióticos característicos de cada tipo de suelo.

En relación a los incendios forestales, nuestro estudio se ha centrado en suelos de las Comunidades Autónomas de Andalucía y Canarias que sufrieron incendios “salvajes”. En Andalucía se han estudiado dos zonas incendiadas: Aznalcóllar y Cazorla. La zona de Aznalcóllar sufrió incendios forestales en los años 1997 y 2004, mientras que el incendio de Cazorla fue en el año 2005. En Canarias se han estudiado cuatro zonas diferentes que sufrieron incendios en el año 2007.

Por otra parte, se estudiaron suelos provenientes de 2 vertederos de residuos sólidos urbanos situados en la Comunidad Autónoma de Madrid, concretamente en las localidades de Torrejón de Ardoz y de Getafe. Estos vertederos se sellaron hace 20 años con objeto de minimizar su impacto ambiental y de lograr la integración de estas zonas en el medio ambiente. Sin embargo, tanto la población, como las industrias de la zona, han seguido depositando residuos, habiéndose detectado en los suelos metales pesados, sales y compuestos orgánicos de origen no agrícola, y fundamentalmente hidrocarburos aromáticos y alifáticos.

En el estudio que se presenta, se tratará de caracterizar la biodiversidad, tanto genética como funcional, de las comunidades microbianas de estos suelos utilizando técnicas convencionales (biomasa total viable, perfiles enzimáticos, tasa de respiración, SIR, etc.), y técnicas moleculares (DGGE y clonaje del gen codificante para ARNr 16S), con el fin de establecer los indicadores más representativos de la salud de un suelo. Se pretende conocer el efecto del fuego y de determinados contaminantes sobre la biodiversidad microbiana, dada la relación directa de este parámetro con la salud del suelo.

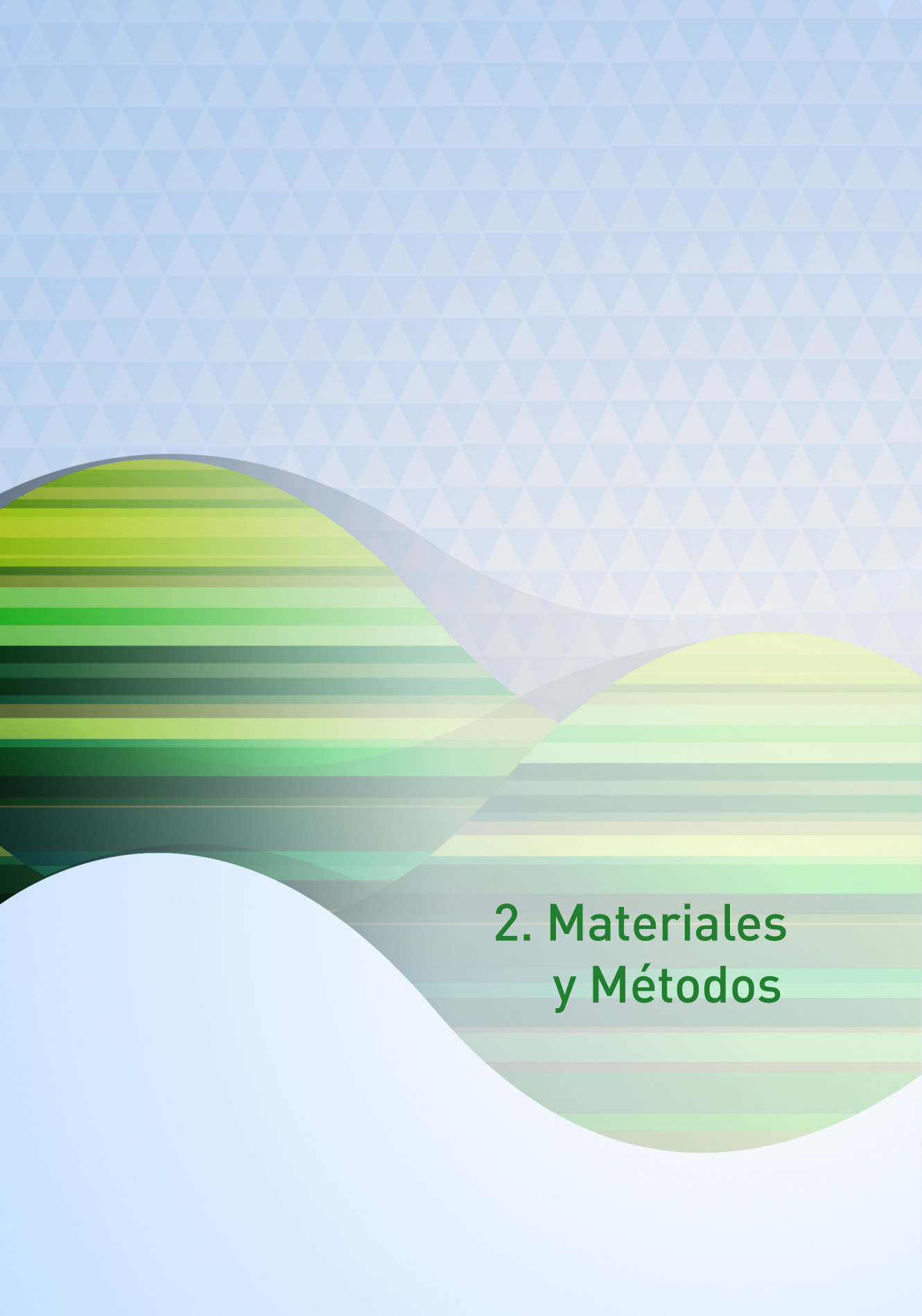
## **1.8.**

---

### **Objetivos del trabajo**

En el trabajo que se presenta, que está basado en el planteamiento anteriormente descrito, se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Caracterizar física y químicamente los suelos control y los suelos quemados procedentes de las áreas seleccionadas, así como los suelos contaminados procedentes de vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU).
2. Estimar la biomasa y la actividad microbiana en los suelos quemados y en los suelos contaminados, en comparación con suelos control.
3. Puesta a punto de las técnicas moleculares necesarias para el análisis de la biodiversidad microbiana de los suelos seleccionados.
4. Analizar el efecto causado por el fuego y por la presencia de contaminantes sobre la biodiversidad microbiana.



## 2. Materiales y Métodos





## 2.1.

### Descripción de las zonas de muestreo

En este trabajo se ha realizado un estudio de los suelos correspondientes a diversas zonas incendiadas pertenecientes a las Comunidades Autónomas de Andalucía y de Canarias y de los suelos de dos vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU) situados en la Comunidad de Madrid.

A continuación se expone una breve descripción de dichos lugares:

#### 2.1.1. Descripción de las zonas incendiadas de las Comunidades de Andalucía y Canarias

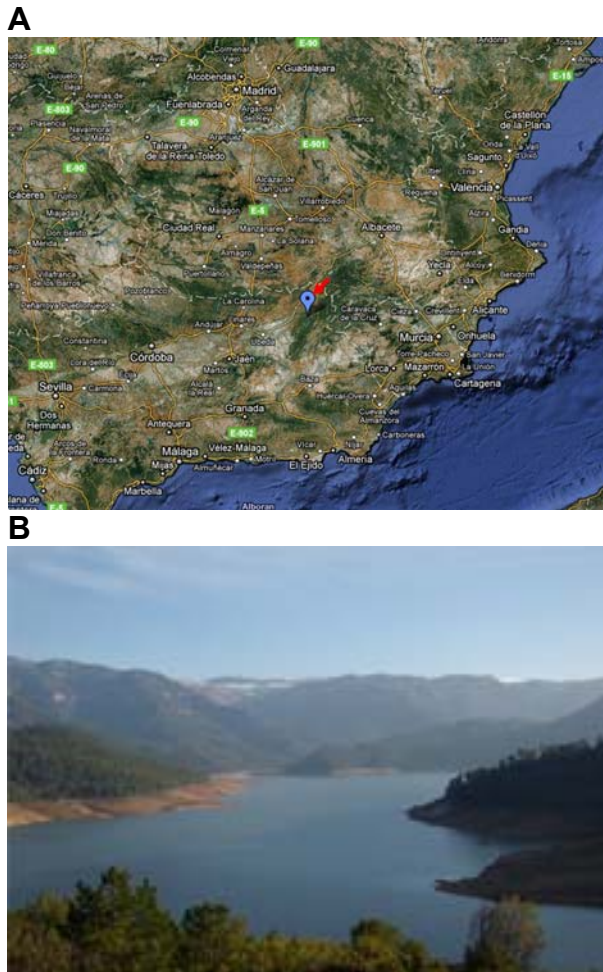
a) **Aznalcóllar**: la zona estudiada corresponde a un bosque de alcornoques con escasa vegetación arbustiva. Las zonas denominadas *Arroyo de las Cañadas* y *Casa de las Cañadas* (muestras QQ1 y QQ2) sufrieron incendios en los años 1997 y 2004, mientras que la zona conocida como *Carril de la Osa* (muestra Q3) sólo se incendió en el año 2004. Estas muestras se utilizaron para la puesta a punto de las técnicas moleculares utilizadas para el análisis de la diversidad microbiana.



**Figura 2.1.** Mapa de la ubicación geográfica de la zona muestreada en Aznalcóllar

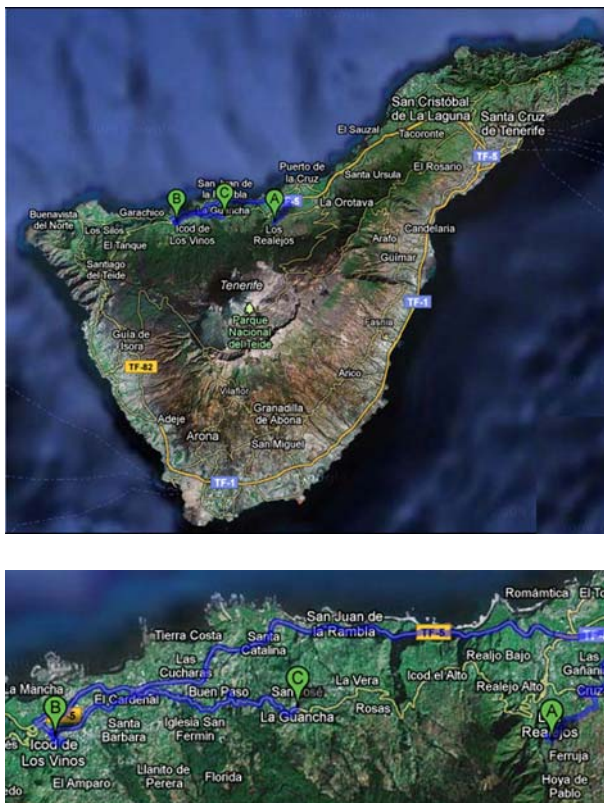
b) **Cazorla**: el muestreo se llevó a cabo en la Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas, concretamente a ambos lados del denominado Embalse del Tranco. Esta zona está constituida principalmente por pinos, junto con vegetación arbustiva de

baja densidad. El incendio ocurrió en agosto de 2005, y ardieron más de 5000 ha. En esta zona se realizaron 3 muestreos, con objeto de estudiar los cambios ocurridos en los suelos a lo largo de 3 años. Los muestreos se realizaron en septiembre de 2005, enero de 2007 y septiembre de 2008 a ambos lados de la carretera.



**Figura 2.2.** A: Mapa de la ubicación geográfica de la Sierra de Cazorla, Segura y las Villas. B: Fotografía del Embalse del Tranco

**c) Tenerife:** se tomaron muestras en 4 zonas incendiadas de la isla de Tenerife: zona 1, *Cruz del Cura*; zona 2, *Los Castillos*; zona 3, *Los Areneros* y zona 4, *La Guancha*. El incendio ocurrió en agosto de 2007. Las primeras muestras se recogieron en octubre del mismo año, antes de que se produjeran las primeras lluvias (antes de las lluvias) y el segundo muestreo se llevó a cabo en febrero de 2008 (después de las lluvias), es decir, 6 meses después del incendio.

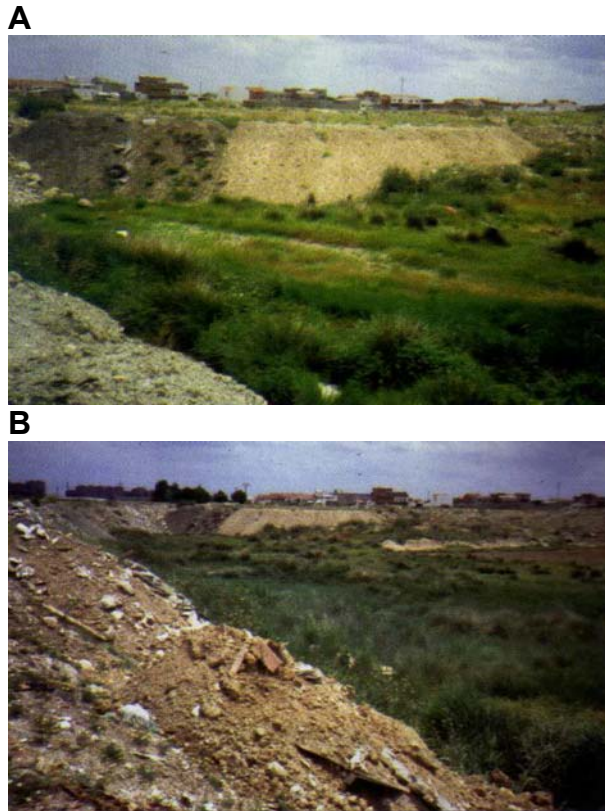


**Figura 2.3.** Mapa de las zonas de muestreo de Canarias (Tenerife): Cruz del Cura (Los Realejos) (A). Los Castillos y Los Areneros (Icod de los Vinos) (B) y La Guancha (C)

### 2.1.2. Descripción de los vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU) de la Comunidad de Madrid y de las zonas muestreadas

Los vertederos estudiados, situados en los municipios de Torrejón de Ardoz y de Getafe, están localizados en la región central española, que se caracteriza por presentar un clima mediterráneo continental de carácter semiárido, con precipitaciones medias anuales entre 400 y 600 mm y una evapotranspiración potencial media anual de 750 mm.

**a) Vertedero de Torrejón de Ardoz:** se encuentra ubicado al sur del término municipal de Torrejón de Ardoz (Madrid), sobre un sustrato de caliza y margas. Fue sellado en 1982 con un espesor de 20 a 50 cm de tierras y escombros y, posteriormente, se sembraron pinos. Los residuos depositados en el vertedero son de carácter mixto: residuos sólidos urbanos, industriales e inertes, habiéndose detectado en este vertedero niveles importantes de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y bifenilos policlorados (PCBs) (Pastor y Hernández, 2010). Se muestrearon 4 zonas, denominadas T2, T2B, T8 y T9.



**Figura 2.4.** Fotografías del VRSU de Torrejón de Ardoz (Madrid). A: 1990; B: 1993

**b) Vertedero de Getafe:** este vertedero también se encuentra sobre un sustrato de calizas y margas y fue sellado en 1986. Ha sido reutilizado para nuevos vertidos de inertes y de escombros industriales. En este vertedero se han detectado altos niveles de metales pesados, en especial, zinc, cobre, plomo y níquel (Pastor y Hernández, 2010). En este caso también se muestrearon 4 zonas, denominadas G1, G2, G3 y G4.



**Figura 2.5.** Fotografía del VRSU de Getafe (Madrid) en 2007

## 2.2.

### Toma de muestras

---

Las muestras de suelo (2 kg) de las diferentes zonas de estudio se recogieron mediante azada en la capa de suelo comprendida entre 0-10 cm, retirando la hojarasca o residuos antes de tomar la muestra. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento.

Una vez en el laboratorio, una parte de la muestra se secó a temperatura ambiente y otra mediante corriente de aire en campana de flujo laminar, con el fin de mantener la esterilidad necesaria para la valoración de los parámetros biológicos. Una vez secas, las muestras se tamizaron para conseguir un tamaño de partícula menor de 2 mm. Para los análisis físico-químicos se guardó una parte de la muestra a temperatura ambiente. Para la determinación enzimática se mantuvo otra parte a 4 °C y para los estudios genéticos se guardó otra parte a -20 °C.

En la Tabla 2.1 se presenta un resumen de algunas de las características de las muestras recogidas en cada punto de muestreo. En la zona de Aznalcóllar se recolectaron 4 muestras; en Cazorla 12 muestras (4 cada año); en Tenerife 16, 8 antes de las lluvias (antes) y 8 después de las lluvias (después) y en cada vertedero (Torrejón y Getafe) 4 muestras.

**Tabla 2.1.** Resumen de las muestras recolectadas para el estudio

Región	Zona	Nombre muestra	Coordenadas	Fecha de muestreo	Observaciones
Aznalcóllar	Barranco de los Laureles	C	N 37° 34'12.9'' W 006° 23'34.1''	Noviembre de 2005	Muestra control
	Arroyo de las Cañadas	QQ1	N 37° 34'21.0'' W 006° 22'20.3''		Quemada en ambos incendios (97 y 04)
	Casa de las Cañadas	QQ2	N 37° 35'32.9'' W 006° 22'20.3''		Quemada en ambos incendios (97 y 04)
	Carril de la Osa	Q3	N 37° 34'18.3'' W 006° 18'30.3''		Quemada sólo en el 2004
Cazorla 2005	Margen derecho de la carretera	Q1.05	N 38° 09'10.3'' W 002° 47'18.3''	Septiembre de 2005	Quemado zona 1
	Margen derecho de la carretera	C1.05	N 38° 09'01.1'' W 002° 47'15.9''		Control zona 1
	Margen izquierdo de la carretera	Q2.05	N 38° 09'43.7'' W 002° 47'05.3''		Quemado zona 2
	Margen izquierdo de la carretera	C2.05	N 38° 10'00.2'' W 002° 47'38.7''		Control zona 2
Cazorla 2007	Margen derecho de la carretera	Q1.07	N 38° 09'10.3'' W 002° 47'18.3''	Enero de 2007	Quemado zona 1
	Margen derecho de la carretera	C1.07	N 38° 09'01.1'' W 002° 47'15.9''		Control zona 1
	Margen izquierdo de la carretera	Q2.07	N 38° 09'43.7'' W 002° 47'05.3''		Quemado zona 2
	Margen izquierdo de la carretera	C2.07	N 38° 10'00.2'' W 002° 47'38.7''		Control zona 2
Cazorla 2008	Margen derecho de la carretera	Q1.08	N 38° 09'10.3'' W 002° 47'18.3''	Septiembre de 2008	Quemado zona 1
	Margen derecho de la carretera	C1.08	N 38° 09'01.1'' W 002° 47'15.9''		Control zona 1
	Margen izquierdo de la carretera	Q2.08	N 38° 09'43.7'' W 002° 47'05.3''		Quemado zona 2
	Margen izquierdo de la carretera	C2.08	N 38° 10'00.2'' W 002° 47'38.7''		Control zona 2

Tabla 2.1. (Continuación). Resumen de las muestras recolectadas para el estudio

Región	Zona	Nombre muestra	Coordenadas	Fecha de muestreo	Observaciones
Tenerife	Cruz del Cura	Q1.A*	342446/3135333	Noviembre de 2007	Quemado zona 1
	Cruz del Cura	C1. A*	342446/3135333		Control zona 1
	Los Castillos	Q2. A*	338289/3133471		Quemado zona 2
	Los Castillos	C2. A*	338289/3133471		Control zona 2
	Los Areneros	Q3. A*	335403/3130315		Quemado zona 3
	Los Areneros	C3. A*	335403/3130315		Control zona 3
	La Guancha	Q4. A*	337586/3138543		Quemado zona 4
	La Guancha	C4. A*	337586/3138543		Control zona 4
	Cruz del Cura	Q1.D**	342446/3135333	Febrero de 2008	Quemado zona 1
	Cruz del Cura	C1.D**	342446/3135333		Control zona 1
	Los Castillos	Q2.D**	338289/3133471		Quemado zona 2
	Los Castillos	C2.D**	338289/3133471		Control zona 2
	Los Areneros	Q3.D**	335403/3130315		Quemado zona 3
	Los Areneros	C3.D**	335403/3130315		Control zona 3
	La Guancha	Q4.D**	337586/3138543		Quemado zona 4
	La Guancha	C4.D**	337586/3138543		Control zona 4
VRSU Torrejón de Ardoz		T2	N 40° 26,31' W 003° 28.1'	Febrero de 2007	
		T2B	N 40° 26.11' W 003° 28.63'		
		T8	N 40° 26.28' W 003° 28.60'		
		T9	N 40° 26.29' W 003° 28.57'		
VRSU Getafe		G1	N 40°17' 3,3547" W 003°40' 26,5118"	Mayo de 2006	
		G2	N 40°17' 2,7787" W 003°40' 27,6638"		
		G3	N 40°16' 58,962" W 003°40' 29,6439"		
		G4	N 40°16,933' W 003°40,654'		

\*A: antes de las lluvias; \*\*D: después de las lluvias

## 2.3

### Parámetros físico-químicos determinados en los suelos

---

#### 2.3.1. pH

Para la determinación del pH de los suelos se realizó, en primer lugar, una suspensión acuosa suelo:agua destilada en una relación 1:2,5. La mezcla se dejó reposar durante 30 minutos y a continuación, se midió el pH en un pH-metro digital Orion 720 A, previamente calibrado a temperatura ambiente con dos soluciones salinas, una de pH 4 y otra de pH 7.

#### 2.3.2. Capacidad de campo, punto de marchitez permanente y agua útil del suelo

La capacidad de campo (CC) de un suelo hace referencia a la cantidad de agua que puede contener un suelo cuando se pierde el agua gravitacional de flujo rápido. La fuerza de retención del agua variará para cada suelo, pero se admite, generalmente, una fuerza de succión de 1/3 de atmósfera (pF 2,5). El punto de marchitez permanente (PMP) representa el agua que queda retenida en el suelo en poros de muy pequeño tamaño y que solo puede ser absorbida desarrollando una presión de 15 atmósferas (pF 4,2). Esta presión se corresponde con el valor máximo de presión osmótica en el que las raíces de las plantas pueden absorber el agua del suelo.

La determinación de la CC y del PMP se basa en aplicar una presión determinada (1/3 de atmósfera para la CC y 15 atmósferas para el PMP) a una muestra de suelo. La muestra, previamente humedecida por aspersión y escurrida, se coloca sobre una membrana de celulosa permeable, determinando, posteriormente, el contenido de humedad de la misma por desecación en la estufa, una vez que el suelo, a la presión correspondiente, no expulsa más agua (Gutián y Carballas, 1976). El procedimiento seguido fue el siguiente: se pesó una determinada cantidad de muestra y se procedió a la saturación de la misma, para lo cual se colocó sobre una membrana de celulosa y se humedeció durante 12 horas. A continuación, la muestra se introdujo en un extractor de presión-membrana de Richards, y se aplicó presión de forma progresiva, hasta obtener los valores de pF utilizados en este estudio, pF 2,5 y pF 4,2. Una vez alcanzada la presión requerida, la muestra se sacó cuidadosamente del extractor a presión, se secó en estufa y se pesó en una balanza.

Los valores correspondientes a la capacidad de campo de las muestras y al punto de marchitez permanente se calcularon por diferencia entre el peso de la muestra saturada de agua y el peso de la muestra tras ser aplicada la presión



correspondiente y multiplicado por cien, es decir, los valores se expresaron en porcentaje (%).

La diferencia entre la capacidad de campo y el punto de marchitez permanente permite conocer el agua útil de la que disponen las plantas para su desarrollo.

### 2.3.3. Determinación del contenido total en materia orgánica del suelo

Para la determinación de la materia orgánica se empleó el método de oxidación parcial de la muestra de suelo con dicromato potásico en medio ácido. El contenido de carbono orgánico se calculó valorando el exceso de dicromato potásico con la sal de Mohr y utilizando difenilamina como reactivo indicador.

La muestra (0,5-1 g) se depositó en un matraz de 500 mL, junto con 10 mL de una solución de dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$ ) 1 N y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Después de agitar suavemente y esperar 30 minutos, se añadieron 200 mL de agua destilada y 10 mL de ácido fosfórico. Se dejó enfriar y se añadió 1 mL de una solución de difenilamina. El dicromato potásico que no hubiera reaccionado se valoró con sal de Mohr [ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ] 0,5 N de factor conocido. Este factor debe ser 1, a no ser que la sal de Mohr esté mal preparada o se haya oxidado con el tiempo y en presencia de luz. Para calcular el factor de la sal de Mohr, se añadieron a un matraz de 500 mL 5 mL de la sal de Mohr, 250 mL de  $H_2O$  destilada y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, e inmediatamente se midió el volumen de permanganato potásico ( $KMnO_4$ ) 0,1 N que reacciona con un volumen conocido de sal de Mohr. El factor de la sal de Mohr se calculó como  $F=M/25$ , donde M corresponde al volumen de ( $KMnO_4$ ) gastado. Para el cálculo del porcentaje en carbono y el de materia orgánica de la muestra se aplicó la siguiente ecuación:

$C (\%) = [(V-V') \times 0,195 \times f] / p$ <p>V= mL de sal de Mohr consumidos en el blanco (sin suelo)  V'= mL de sal de Mohr consumidos en cada muestra de suelo  p = peso de cada muestra de suelo en gramos  f= factor de la sal de Mohr que corrige su normalidad</p>
--

El porcentaje de materia orgánica se calculó multiplicando el porcentaje de carbono total por el factor empírico 1,724 propuesto por Walkley (1947).

### 2.3.4. Determinación del contenido en nitrógeno total

Para la determinación del contenido total de nitrógeno se siguió el método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883), que comprende tres fases: digestión, destilación y valoración. Para la digestión se pesaron 0,5 gramos de muestra, se transfirieron a

un matraz Kjeldahl de 500 mL y se añadieron 50 mL de  $H_2SO_4$ , y una punta de espátula del catalizador de Kjeldahl. La mezcla se calentó paulatinamente hasta que el digerido se puso de color claro, continuando la digestión durante 2 horas más. Una vez transcurrido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 200 mL de agua destilada con agitación continua. Para la destilación se añadieron 40 mL de una disolución de  $H_3BO_3$  al 4 %, unas gotas de indicador, agua destilada hasta 100 mL y piedra pómez para regular la ebullición. Se conectó el aparato de destilación y se añadieron 80 mL de una disolución de NaOH al 50 % sobre el matraz Kjeldahl. El proceso de destilación continuó hasta recoger aproximadamente 300 mL de destilado. El destilado se valoró con HCl 0,1 N. A partir del volumen de ácido gastado se calculó el contenido en nitrógeno de la muestra. El porcentaje de proteína bruta se calculó multiplicando el porcentaje de nitrógeno total por el factor 6,25.

### 2.3.5. Determinación de contaminantes

En las muestras de suelo correspondientes al vertedero de Torrejón de Ardoz se determinó la concentración de hidrocarburos totales, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y de bifenilos policlorados (PCBs).

Para la determinación de los hidrocarburos totales (UNE 77307), las muestras de suelo se extrajeron con 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano (CFE) y los compuestos polares presentes en la muestra se eliminaron mediante agitación de la disolución con Florisil. La cuantificación de los hidrocarburos presentes en el extracto de suelo se realizó mediante espectrofotometría infrarroja (Shimadzu 8400 FTIR) a partir de las absorbancias de las bandas de 2.925, 2.958 y 3.030  $cm^{-1}$ , utilizando coeficientes de absorción definidos empíricamente.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se determinaron siguiendo la norma ISO 18287. Su extracción del suelo se realizó con acetona y éter de petróleo. Tras la concentración del extracto obtenido, se eliminaron los compuestos polares haciendo pasar el extracto concentrado a través de una columna rellena de sílice. A continuación, se concentró el eluato, y el extracto final se analizó por cromatografía de gases (cromatógrafo Hewlett Packard 5890). Los diversos compuestos se separaron mediante una columna capilar con una fase estacionaria de baja polaridad (5 % fenil metilsilicona). La detección se realizó mediante un detector de fotoionización (PID), un detector de ionización de llama (FID) o un detector selectivo de masas.

La cuantificación de los bifenilos policlorados se llevó a cabo por cromatografía de gases siguiendo la norma ISO 10382. Los PCBs se extrajeron de la muestra de suelo con una mezcla de disolvente hidrocarbonado y acetona. Tras la concentración del extracto, los compuestos polares se eliminaron haciendo pasar el extracto concentrado a través de una columna rellena de óxido de aluminio. Los

diversos compuestos del extracto final se separan por cromatografía de gases mediante una columna capilar con una fase estacionaria de baja polaridad (5 % fenil metilsilicona). La detección se realiza mediante un sistema de detección de captura electrónica (ECD) o detector selectivo de masas.

### **2.3.6. Determinación del contenido en metales pesados biodisponibles**

En las muestras del vertedero de Getafe se llevó a cabo la determinación del cobre, níquel, plomo y zinc asimilables o biodisponibles, siguiendo el método descrito por Lakanen y Ervio, 1971.

Los citados metales se extrajeron de las muestras de suelo utilizando una mezcla de EDTA (Tritiplex III) y acetato amónico 0,5 M, pH 4,5. El análisis se realizó mediante Absorción Atómica en un espectrómetro de emisión por plasma en el Centro de Ciencias Medio Ambientales del CSIC.

## **2.4.**

---

### **Parámetros biológicos determinados en los suelos**

#### **2.4.1. Valoración de la respiración inducida por sustrato**

Para la medida de la respiración inducida por sustrato (SIR) se siguió el método de Jenkinson y Powlson (1976), modificado de la siguiente manera: tres muestras de 5 g cada una se hidrataron al 50 % y se incubaron con glucosa (0,45 mg g<sup>-1</sup> de suelo) durante 48 horas a 30 °C en frascos sellados. La concentración de CO<sub>2</sub> se midió utilizando el método automatizado BacTrac, el cual mide los cambios de impedancia de una solución de KOH al 2 % en un analizador µ-Trac 4200. El resultado se expresó en mg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> 100 g<sup>-1</sup> de suelo.

La respiración inducida por sustrato de las muestras de las zonas de Aznalcóllar fue determinada utilizando el método que a continuación se describe: A matraces que contenían 15 g de suelo se les añadieron 15 mL de agua destilada estéril, 0,35 g de talco y glucosa a razón de 4 mg/g de suelo. El CO<sub>2</sub> desprendido se midió en un detector de CO<sub>2</sub> 1440 Gas Analyser a las 0, 3 y 6 horas. Los resultados obtenidos se expresaron como % CO<sub>2</sub> /h / 100 g de suelo.

#### **2.4.2. Recuento en placa de microorganismos viables en el suelo**

Se tomaron 10 g de suelo y se resuspendieron en 95 mL de tampón fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,4, incubando dicha mezcla (10<sup>-1</sup>) en agitación, a 28 °C y durante

30 minutos. A continuación, se realizaron diluciones decimales seriadas, hasta la dilución  $10^{-6}$ , en el mismo tampón.

El recuento de bacterias viables se llevó a cabo sembrando 100  $\mu\text{l}$  de las diluciones correspondientes en placas que contenían el medio Agar triptona de Soja (TSA) (Scharlau España) diluido 1:10. Las placas se incubaron durante 1 semana a 15, 28 y 37 °C, realizando el recuento de las colonias cada 24 horas.

Para el recuento de mohos y levaduras, las diluciones correspondientes se sembraron en placas que contenían el medio Agar Sabouraud (Merck) con Oxitetracina (100 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). Las placas se incubaron a 28 °C, y los recuentos se realizaron diariamente durante una semana.

Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo ( $\text{ufc g}^{-1}$ ).

### **2.4.3. Recuento total de microorganismos al microscopio de fluorescencia**

El recuento total directo de microorganismos se llevó a cabo en un microscopio de epifluorescencia Nikon (modelo Diaphot-200), utilizando el colorante fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorohidrato) para teñir las células, que aparecen de color azul brillante.

Las muestras antes de su observación al microscopio, se sometieron a un proceso de fijación con PBS-formaldehído y centrifugación en gradiente de densidad Nycodenz [solución de: 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis(2,3 dihidroxiopropil isoftalamida)]. El procedimiento seguido fue el siguiente: 1 gramo de suelo se incubó con 11,6 mL de medio basal (MB) a 30 °C durante 18 horas. Pasado este tiempo, la muestra se centrifugó a 10.000 g durante 6 minutos a 4 °C, y al sedimento obtenido se le añadieron 9 mL de PBS-Formaldehído al 2 % y 0,1 % (v/v) de Tween 20. Después de incubar a temperatura ambiente durante 1 hora, las muestras se agitaron durante 10-15 minutos. Se tomaron 3 mL de esta mezcla y se colocaron en un tubo de centrifugación junto con 3 mL de solución de Nycodenz. Se centrifugó a 12.000 g durante 90 minutos a 4 °C, y con una jeringuilla se extrajo la fase en la que se encontraban los microorganismos (fase intermedia del gradiente, aprox. 700  $\mu\text{L}$ ), que se guardó a 4 °C hasta su filtración.

Para la filtración se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de esta fase y se filtraron a través de membranas GTTP de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Las membranas se mantuvieron guardadas a -20 °C hasta su tinción con el colorante DAPI. Para la visualización de las células al microscopio de fluorescencia, se recortaron pequeños trozos de los filtros y se tiñeron con 15  $\mu\text{L}$  de DAPI + Vectashield.

#### 2.4.4. Valoración de distintas actividades enzimáticas

En todas las muestras de suelos se determinaron las siguientes actividades enzimáticas: fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina,  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa,  $\beta$ -glucosidasa, celulasa, invertasa y ureasa.

##### 2.4.4.1. Fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida

La valoración de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida (EC 3.1.3.1) y fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.2) se realizó utilizando el sustrato cromogénico *p*-nitrofenil fosfato y siguiendo el método descrito por Tabatabai y Bremner (1969). El fundamento de la valoración es la liberación de una molécula orgánica coloreada o que puede ser coloreada mediante alguna reacción simple tras la hidrólisis enzimática del sustrato cromogénico artificial. El producto generado (*p*-nitrofenol) se detecta mediante determinación de la absorbancia a 400 nm.

El procedimiento seguido para la valoración fue el siguiente: 0,5 g de suelo se incubaron con 0,5 mL de *p*-nitrofenil fosfato 25 mM y 2 mL de tampón MUB 0,1 M (pH 6,5 para la enzima fosfatasa ácida y pH 11 para la fosfatasa alcalina) durante 30 minutos, a 37 °C y en agitación a 130 g. Pasado este tiempo, se colocaron los matraces en hielo para detener la reacción, añadiendo a los mismos 0,5 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 M y 2 mL de NaOH 0,5 M. Se centrifugaron durante 2 minutos a 10.000 g, se tomó el sobrenadante y se midió la intensidad del color en un espectrofotómetro Hitachi model U-2001 (Japón) a 400 nm. Las lecturas obtenidas se refirieron a una curva patrón de *p*-nitrofenol realizada previamente en las mismas condiciones. Se realizaron controles para cada uno de los suelos analizados con objeto de sustraer la absorbancia debida a la posible hidrólisis no enzimática del sustrato y la debida al color de los componentes orgánicos extraídos con el hidróxido sódico.

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por hora y por gramo de suelo.

##### 2.4.4.2. $\beta$ -glucosidasa

Para la valoración de la actividad  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) se siguió el método de Tabatabai (1982). El método se basa en la determinación colorimétrica del *p*-nitrofenol obtenido por la acción de la  $\beta$ -glucosidasa después de incubar el suelo con el sustrato  $\beta$ -D-glucopiranosido en medio tamponado a pH 6.

El procedimiento empleado en la valoración es el mismo que para las actividades fosfatasa alcalina y ácida, pero en este caso el pH del tampón MUB fue

6 y el sustrato *p*-nitrofenil-  $\beta$ -D-glucopiranosido (25 mM). Al igual que para las actividades enzimáticas fosfatasa ácida y alcalina, se realizaron controles para cada uno de los suelos analizados, con objeto de sustraer la absorbancia debida a la posible hidrólisis no enzimática del sustrato y la debida al color de los componentes orgánicos extraídos con NaOH.

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por hora y por gramo de suelo.

#### 2.4.4.3. $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa

La valoración en las muestras de suelo de la actividad  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.52) se llevó a cabo siguiendo el método de Tabatabai (1982). Para ello, se midió espectrofotométricamente el *p*-nitrofenol liberado por la acción enzimática, utilizando como sustrato *p*-nitrofenil-2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido 0,125 mM disuelto en tampón MUB 0,1 M, pH 6,5.

Se utilizó el procedimiento descrito anteriormente para la valoración de las actividades fosfatasa alcalina y ácida y  $\beta$ -glucosidasa. También en este caso, se realizaron controles para cada uno de los suelos analizados con objeto de sustraer la absorbancia debida a la posible hidrólisis no enzimática del sustrato y la debida al color de los componentes orgánicos extraídos con NaOH.

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por hora y por gramo de suelo.

#### 2.4.4.4. Celulasa

La determinación de la actividad celulasa (E.C. 3.2.1.4.) se llevó a cabo siguiendo el método de Pancholy y Rice (1973) modificado por García-Álvarez e Ibáñez (1994). Este método se basa en la valoración de los azúcares reductores generados por la acción de la enzima sobre el sustrato carboximetilcelulosa. La determinación de los azúcares reductores se realizó siguiendo el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945).

El procedimiento utilizado en la determinación de esta actividad enzimática fue el siguiente: a 1 g de suelo se le añadieron 2 mL de carboximetilcelulosa al 0,2 % disuelta en tampón fosfato 100 mM, pH 6, incubando la mezcla 24 horas a 37 °C. Tras el tiempo de incubación, se añadieron 4 mL de agua en dos veces sucesivas y se centrifugó la muestra 5 minutos a 10.000

g. El sobrenadante se recogió en matraces erlenmeyer de volumen apropiado. Se tomaron 0,2 mL del sobrenadante y se añadieron 0,2 mL de reactivo de Somogyi, calentando a 100 °C durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se enfriaron las muestras en hielo y se agregaron 0,2 mL del reactivo de Nelson, se agitó y se dejó reposar 3 minutos. Se añadieron 2,4 mL de agua y se midió la intensidad de color a una longitud de onda de 540 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se refirieron a una curva patrón de glucosa realizada previamente siguiendo el mismo procedimiento. Los protocolos para la preparación de los reactivos de Somogyi y Nelson pueden consultarse en el apartado de soluciones y tampones.

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por hora y por gramo de suelo.

#### 2.4.4.5. Invertasa

La determinación de la actividad invertasa (EC 3.2.1.26) se llevó a cabo siguiendo el método de Hoffmann y Pallauf (1965) modificado por García-Álvarez e Ibáñez (1994). Este método se basa, al igual que para la actividad celulasa, en la valoración de los azúcares reductores formados por hidrólisis enzimática, cuando una muestra de suelo, a la que se añade una solución de sacarosa, es incubada bajo determinadas condiciones.

El procedimiento utilizado es muy similar al seguido para la actividad celulasa. 1 g de suelo se incubó con 2 mL de sacarosa al 0,5 % disuelta en tampón fosfato, pH 5,5, durante 30 minutos a 37 °C. Finalizada la incubación, se añadieron 4 mL de agua (2 mL, 2 veces) centrifugando a 10.000 g durante 5 minutos. Del sobrenadante se tomaron 0,2 mL y se mezclaron con 0,2 mL de reactivo de Somogyi, calentando a 100 °C, 15 minutos. Pasado este tiempo, se enfriaron las muestras en hielo y se agregaron 0,2 mL del reactivo de Nelson, se agitó y se dejó reposar 3 minutos. Se añadieron 2,4 mL de agua y se midió la intensidad de color a una longitud de onda de 540 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se refirieron a una curva patrón de glucosa realizada previamente.

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por hora y por gramo de suelo.

#### 2.4.4.6. Ureasa

Para la determinación de la actividad ureasa (EC 3.5.1.5) se siguió el método de Kandeler y Gerber (1988). El principio del método se basa en la determinación colorimétrica del amonio liberado en la incubación de una solución de suelo y urea a 37 °C durante 2 horas. El amonio producido por la actividad ureasa reacciona con salicilato y dicloro-isocianida para dar un color verde

azulado. La absorbancia a 690 nm es directamente proporcional a la concentración de nitrógeno amoniacal.

El procedimiento seguido para la determinación de la actividad ureasa fue el siguiente: a 1 g de suelo se le añadieron 4 mL de agua destilada y 0,5 mL de una solución de urea al 0,48 %. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 2 horas. A continuación, se añadieron 6 mL de KCl al 7,4 %, se agitó durante 30 minutos y se centrifugó a 3.000 g durante 10 minutos. Se tomaron 0,5 mL del sobrenadante y se añadieron 4,5 mL de agua. Después de agitar se añadieron 2,5 mL de una solución combinada de salicilato de sodio/nitroprusiato de sodio con NaOH 0,3M y 1 mL de solución de dicloro-isocianida de sodio 0,1 %, se agitó y se dejó en reposo en oscuridad por 30 minutos. Se midió la absorbancia a 690 nm. Las lecturas obtenidas se refirieron a una curva patrón de cloruro amónico realizada siguiendo el mismo procedimiento.

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de amonio por hora y por gramo de suelo.

### 2.4.5. Métodos utilizados para la extracción del ADN cromosómico

Para la extracción del ADN a partir de las diferentes muestras de suelo se utilizaron distintos procedimientos descritos en la bibliografía, así como diferentes kits comerciales.

#### 2.4.5.1. Procedimiento 1

La extracción del ADN se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Girvan y colaboradores (2003). En un tubo de 2 mL se mezclaron 0,5 g de suelo, 0,5 g de bolitas de cristal, 0,5 mL de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,5, 0,5 mL de fenol (80 %) y 100  $\mu$ l de polivinil pirrolidona (PVP) al 15 %. Esta mezcla se agitó en el vórtex durante 5 minutos y se dejó en hielo el mismo tiempo. Este paso se repitió dos veces. Se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se recuperó la capa superior acuosa. A esta fase se le agregó un volumen equivalente de fenol. Después de agitarlo en el vórtex se centrifugó a 12.000 x g durante 2 minutos a 4 °C y de nuevo se recuperó la fase acuosa. A esta fase se le agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Se tomó de nuevo la fase acuosa, llevando a cabo la precipitación de ADN con distintos compuestos.

*Precipitación con acetato sódico-etanol:* se añadió 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y dos volúmenes de etanol puro frío. Se dejó precipitar el ADN durante al menos 30 minutos. Se centrifugó a 13.000 x g durante 10 minutos.



*Precipitación con isopropanol:* se añadió un volumen igual de isopropanol puro que de fase acuosa, se mezcló por inversión y se dejó precipitar durante una hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó a  $16.000 \times g$  durante 15 minutos.

*Precipitación con polietilén glicol (PEG) 6000 y 8000:* se añadió un volumen igual de PEG (13 % PEG en NaCl 1,6 %) que de fase acuosa. Se dejó precipitar a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Se centrifugó a  $12.000 \times g$  durante 15 minutos.

Después de llevar a cabo las precipitaciones, el sedimento se lavó con etanol al 70 % y se centrifugó a  $12.000 \times g$  durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se dejó secar al aire para eliminar los restos de etanol. El ADN se resuspendió en  $100 \mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril.

#### 2.4.5.2. Procedimiento 2

Se utilizó el método de extracción de ADN descrito por Fortin y colaboradores (2004). Para ello, se tomaron 5 g de suelo y se lavaron dos veces con 10 mL de una solución de Tris-HCl 50 mM pH 8,3, NaCl 200 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  5 mM y Tritón X-100 al 0,05 %. Se agitó durante 2 minutos y se centrifugó durante 3 minutos a  $3.000 \times g$ . El sedimento obtenido se lavó una vez con 10 mL de la misma solución sin Tritón X-100, se agitó y se centrifugó en las condiciones anteriormente mencionadas. El sobrenadante obtenido se lavó dos veces con otros 10 mL de una solución de Tris-HCl 10 mM pH 8,3 y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1 mM, se agitó y se centrifugó también en las mismas condiciones. Al sobrenadante se le añadieron  $500 \mu\text{L}$  de Tris-HCl 250 mM pH 8 y  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  de lisozima. La mezcla se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos en agitación; se incubó otros 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y se le añadió proteinasa K hasta una concentración final de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , incubando, posteriormente, a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora. A continuación, se añadieron  $500 \mu\text{L}$  de SDS al 20 % y se incubó a  $85^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Se centrifugó a temperatura ambiente a  $16.000 \times g$  durante 10 minutos. Al sobrenadante se le añadió medio volumen de acetato de amonio 7,5 M y se incubó en hielo durante 15 minutos, con la finalidad de precipitar las proteínas y los ácidos húmicos. A continuación, se centrifugó a  $16.000 \times g$  durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se descartó el sobrenadante. El ADN se precipitó durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  con un volumen de 2-propanol puro frío. Se centrifugó a  $16.000 \times g$  durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante obtenido se lavó con etanol al 70 % y luego se dejó secar al aire. El ADN se resuspendió en  $300 \mu\text{L}$  de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1 mM.

Además de la precipitación con acetato de amonio, también se realizó este mismo protocolo pero utilizando para la precipitación bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) de la siguiente manera: después del tratamiento con SDS al 20 %, se añadió NaCl 5 M hasta una concentración final de 0,7 M. Posteriormente, se le agregó CTAB (10 % de CTAB en NaCl 0,7 M) hasta una

concentración final de 1 % de CTAB. Se incubó a 65 °C durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se realizó una extracción con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 4.000 x g durante 10 minutos. Se realizó una extracción con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. El ADN se precipitó con 2-propanol puro frío a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó durante 20 minutos a 16.000 x g a 4 °C, se lavó con etanol al 70 % y se dejó secar al aire. Por último se resuspendió en 300 µl de tampón Tris-HCl (10mM) y EDTA 0,1 mM pH 8 (TE).

#### **2.4.5.3. Procedimiento 3**

Para la extracción del ADN también se siguió el método descrito por Costa y colaboradores (2004). Se mezclaron 0,5 gramos de suelo, 0,2 gramos de bolitas de cristal y 500 µl de etanol puro. Se agitó dos veces durante 30 segundos, manteniendo la suspensión en hielo en el intervalo. Se centrifugó a 16.000 x g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 1,2 mL de una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM pH 7,0, Tris-HCl 100 mM pH 7,0, EDTA pH 8,0, NaCl 1,5 M y bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 1 %. La mezcla se incubó a 65 °C durante 30 minutos y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. El sobrenadante se recuperó y se realizó una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó y se volvió a centrifugar. Se recuperó la fase acuosa y se incubó con isopropanol puro durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 16.000 x g por 20 minutos. El sedimento obtenido se lavó dos veces con etanol al 70 % frío. El precipitado se dejó secar al aire y luego se resuspendió en 200 µl de agua bidestilada estéril.

#### **2.4.5.4. Kit comercial "Fast DNA spin Kit for Soil" (Q· BIOgene, EEUU)**

Para la extracción del ADN se partió de 0,5 g de suelo, siguiendo, a continuación, las instrucciones dadas por el fabricante. Con el fin de mejorar el proceso de extracción, se realizaron también algunas variaciones del protocolo original, modificando tanto la velocidad de agitación de las muestras en el "Fastprep instrument", como el tiempo de agitación.

#### **2.4.5.5. Kit comercial "Power Soil DNA Isolation Kit" (MO BIO, EEUU)**

La extracción del ADN se llevó a cabo a partir de 0,5 gramos de muestra, siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante. La extracción del ADN se realizó por duplicado para cada una de las muestras analizadas.



**Figura 2.6.** Kit comercial “Power Soil DNA Isolation kit” de la casa comercial MO BIO

#### 2.4.6. Limpieza del ADN obtenido de las muestras de suelo

Para la limpieza del ADN extraído por los procedimientos anteriormente mencionados, se probaron los Kits comerciales: “Agarose gel DNA extraction Kit” (Roche, Suiza) y “GeneClean Spin Kit” (Q-BIOgene, EEUU), siguiendo siempre las indicaciones especificadas por el fabricante. También, la limpieza del ADN se llevó a cabo cortando las bandas del gel de agarosa, y depositándolas en un eppendorf con lana de vidrio en el fondo, al que se le había hecho un orificio. Todo ello se introdujo en el interior de otro eppendorff vacío. Se centrifugó dos veces a  $13.000 \times g$  durante 2 minutos, recuperando el ADN ya limpio en el eppendorff vacío.

#### 2.4.7. Electroforesis en gel de agarosa

Todas las preparaciones de ADN fueron analizadas en geles de agarosa, variando su porcentaje en función del tamaño de los fragmentos a analizar: 0,8 % para el ADN cromosómico y 1,2 % para los fragmentos amplificados por PCR. Los geles se prepararon en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X. Las electroforesis se realizaron normalmente a un voltaje de 100 V, utilizando los sistemas de electroforesis “Mini-Sub Cell GT” o Sub-Cell GT DNA Electrophoresis Gel” de Bio-Rad, y la fuente de alimentación “Consort E 425” (Consort NV, Bélgica). Una vez desarrolladas las electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de ultravioleta Gel Doc 2000 Bio Rad (EEUU). Las imágenes se obtuvieron utilizando el programa Quantity One.

### 2.4.8. Cuantificación del ADN extraído

Se realizó utilizando 1 µL de muestra (extracto de ADN o producto de PCR) en un espectrofotómetro ND-100 Nanodrop de la casa comercial Thermo Fisher Scientific (EEUU).

### 2.4.9. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de las distintas muestras de ADN se amplificaron por PCR, tanto fragmentos del gen codificante para ARNr 16S, como la práctica totalidad del gen de ARNr 16S. Para ello, se utilizaron cebadores pertenecientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea*.

#### 2.4.9.1. Cebadores utilizados

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores para las reacciones de PCR se muestran en la Tabla 2.2.

Cuando las amplificaciones se llevaron a cabo para la posterior realización de la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), los cebadores F utilizados portaban en su extremo 5´ una secuencia rica en Guanina-Citosina (GC) de 40 nucleótidos, denominada GC-clamp.

Para la verificación de las colonias positivas en el clonaje del gen codificante para ARNr 16S se utilizaron los cebadores M13F y M13R.

**Tabla 2.2.** Secuencias de los cebadores utilizados en las PCR

		Secuencia
<i>Bacteria</i>	341 F	5´ CCT ACG GGA GGC AGC AG 3´
(DGGE)	907 R	5´ CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3´
<i>Bacteria</i>	27 F	5´ AGA GTT TGA TCM(AC) TGG CTC AG 3´
(Clonaje)	1492 R	5´TAC GGT(CT) TAC CTT GTT ACG ACT T 3´
<i>Archaea</i>	340 F	5´ CCT ACG GGG G(CT)G CAG CAG GCG CGA 3´
(DGGE)	915 R	5´ GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT 3´
<i>Archaea</i>	21F	5´TTC CGG TTG ATC C(CT)G CCG GA3´
(Clonaje)	915R	5´GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT 3´
GC-clamp		CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G
M13F		5´GTA AAA CGA CGG CCA G 3´
M13R		5´ CAG GAA ACA GCT ATG AC 3´

### 2.4.9.2. Mezclas de reacción

Para la amplificación de los fragmentos del gen codificante para ARNr 16S del Dominio *Bacteria*, el ADN se diluyó 1:10. En el caso del dominio *Archaea* se utilizó el ADN sin diluir. Se realizaron controles negativos que contenían todos los reactivos de reacción, con excepción del ADN, y controles positivos utilizando los microorganismos: *Escherichia coli* CECT 101 para el dominio *Bacteria* y *Halococcus morrhuae* CECT 393 para el dominio *Archaea*.

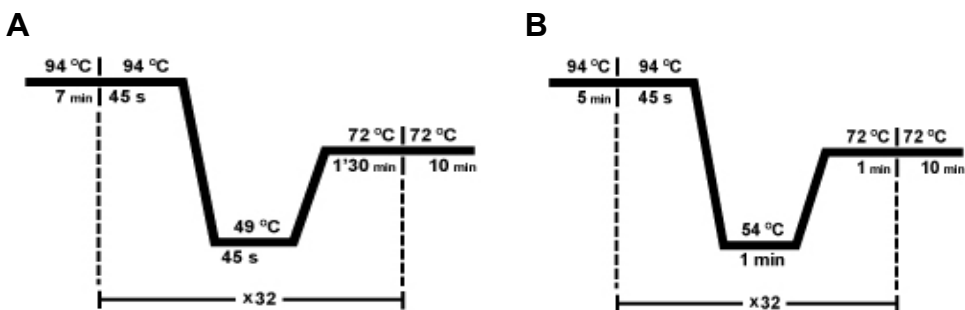
Debido a la dificultad inicial para lograr con éxito las amplificaciones, se añadieron distintos reactivos a la reacción de PCR. Estos fueron: dimetilsulfóxido, albúmina bovina (BSA) al 5 %, y Betaine al 10 %. Además, se utilizaron Taq polimerasas de distintas casas comerciales: Roche (Alemania), Eppendorff (Alemania), Biotools (EEUU) y USB (EEUU); algunas de ellas, como la Taq polimerasa de la casa comercial Eppendorff, recomendadas ante la sospecha de contaminación de las muestras de ADN con ácidos húmicos.

Finalmente, las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la enzima FideiTaq PCR Master Mix de la casa comercial USB, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

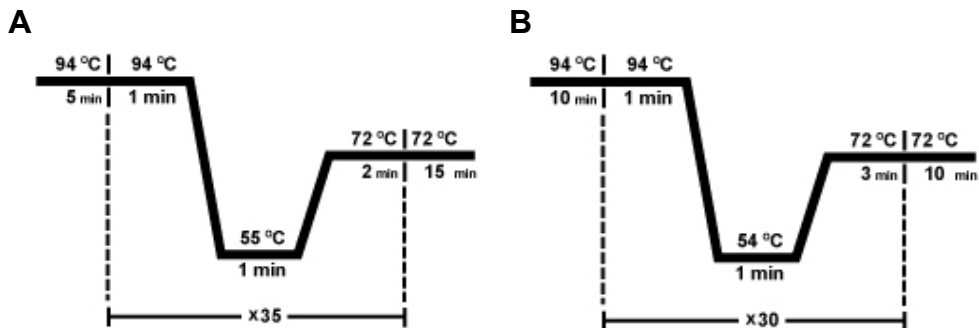
### 2.4.9.3. Programas utilizados en el termociclador

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorff, Alemania). Los programas utilizados para las distintas amplificaciones se presentan en las Figuras 2.2 a 2.5.

En el caso de las amplificaciones correspondientes al dominio *Archaea* fue necesaria la realización de una doble amplificación para obtener mayor cantidad del producto de amplificación.



**Figura 2.7.** Programa de PCR utilizado para la amplificación del fragmento V3-V5 codificante para ARNr 16S. A: Dominio *Bacteria*; B: Dominio *Archaea*



**Figura 2.8.** A: Programa de PCR utilizado para la clonación parcial del gen codificante para ARNr 16S de los dominios *Bacteria* y *Archaea*. B: Programa utilizado para la confirmación de las colonias de *E. coli* portadoras del plásmido con el inserto del gen codificante para ARNr 16S de los dominios *Bacteria* y *Archaea*

#### 2.4.10. Purificación de los productos de PCR

Una vez comprobado que el tamaño de los fragmentos amplificados era el deseado, en todos los casos, la purificación de los amplicones se llevó a cabo utilizando el kit comercial “Ultra-Clean PCR Clean up” siguiendo las instrucciones de la casa comercial MO BIO (EEUU) (Figura 2.9).



**Figura 2.9.** Kit comercial “Ultra Clean PCR clean up”

### 2.4.11. Electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE)

Para separar los distintos fragmentos de ADNr 16S amplificados en la reacción de PCR se realizó una electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante de urea-formamida, según las condiciones descritas por Muyzer y colaboradores (1993). Para ello, se prepararon geles de poliacrilamida al 6 % y se utilizaron diferentes concentraciones desnaturalizantes de urea-formamida (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3.** Composición de las soluciones desnaturalizantes para la DGGE

Solución desnaturalizante	Formamida (mL)	Urea (g)
10 %	4	4,2
20 %	8	8,4
30 %	12	12,6
40 %	16	16,8
50 %	20	21
60 %	24	25,2
70 %	28	29,4
80 %	32	33,6
90 %	36	37,8
100 %	40	42

Para la realización de los distintos gradientes de urea-formamida y para el desarrollo de la DGGE se siguieron las instrucciones dadas por la casa comercial Bio-Rad. Después de aplicar las muestras en los geles de electroforesis, éstos se desarrollaron en un aparato “DC Code Universal Mutation Detection System” (Figura 2.10), a 60 V durante 18 horas, a una temperatura constante de 60 °C. El tampón utilizado para el desarrollo de la electroforesis fue Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. Una vez realizada la electroforesis, las bandas de ADN se tiñeron con plata y también con bromuro de etidio.



**Figura 2.10.** DC Code Universal Mutation Detection System para la realización de la DGGE

#### **2.4.11.1. Tinción con plata**

Los geles se mantuvieron durante 2 horas en una solución de etanol puro-ácido acético glacial (89,5 %) 10:0,5 y a continuación, 20 minutos en una solución de nitrato de plata (0,1 %). Posteriormente, 20 minutos en la solución III (hidróxido sódico al 1,5 %, borohidruro sódico al 0,01 % y formaldehído al 0,4 %), y finalmente, 10 minutos en una solución de carbonato sódico (0,75 %). Los geles se almacenaron en una solución de etanol (25 %) y glicerol (10 %). Las imágenes se obtuvieron realizando una fotografía digital del gel.

#### **2.4.11.2. Tinción con bromuro de etidio**

Los geles se colocaron en una solución de bromuro de etidio ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 20 minutos y se lavaron con agua destilada durante 40 minutos. Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de ultravioleta Gel Doc 2000 Bio Rad (EEUU) y las imágenes se obtuvieron utilizando el programa Quantity One.

#### **2.4.12. Identificación de microorganismos mediante secuenciación de las bandas de ADN desarrolladas en la DGGE**

Las bandas de ADN de interés se recortaron de los geles de la DGGE teñidos con bromuro de etidio y se colocaron en un eppendorf con 5  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada estéril para mantenerlas hidratadas. Para la extracción del ADN de las bandas se siguieron dos procedimientos.



*Procedimiento 1.* Las bandas cortadas se colocaron en los distintos pocillos de un gel de agarosa al 1,5 % y se realizó de nuevo una electroforesis según lo descrito en el apartado 2.4.8. Después de teñir el gel con bromuro de etidio, se recortaron las bandas y se limpiaron colocándolas en un tubo eppendorf que contenía lana de vidrio, al que se le había hecho un orificio en el fondo. Todo ello se introdujo en el interior de otro tubo eppendorf vacío. Se centrifugó dos veces a 13.000 x g durante 2 minutos, recuperando el ADN ya limpio en el eppendorf vacío. El ADN resultante fue reamplificado con los cebadores (sin GC clamp) y en las condiciones de PCR descritas en el apartado 2.4.9.3, con el fin de obtener ADN suficiente para una reacción de secuenciación.

*Procedimiento 2.* Las bandas cortadas se mantuvieron en 40 µl de agua bidestilada a 4 °C durante 12 horas. El ADN eluido fue reamplificado con los mismos cebadores (sin GC clamp) y en las mismas condiciones de PCR descritas en el procedimiento anterior.

### **2.4.13. Clonación parcial del gen codificante para ARNr 16S de los dominios *Bacteria* y *Archaea***

En primer lugar, se procedió a la extracción de ADN del suelo, utilizando para ello el procedimiento descrito en el apartado 2.4.5.5. A continuación, mediante PCR, se llevó a cabo la amplificación del gen codificante para el ARNr 16S correspondiente a los dominios *Bacteria* y *Archaea*, utilizando los cebadores y los programas de amplificación descritos anteriormente en los apartados 2.4.9.1. y 2.4.9.3.

El producto de reacción de la amplificación por PCR (mezcla de los genes ADNr 16S de los distintos microorganismos presentes en la muestra) se clonó en células competentes de *E. coli* utilizando el kit de clonación “TOPO TA Cloning Kit” (Invitrogen). Para ello, se siguieron cuidadosamente las instrucciones dadas por la casa comercial. En este kit, se utiliza el plásmido pCR- 2.1.-TOPO (3,9 kb) como vector de clonación.

La selección de los clones que contenían el plásmido con el inserto se realizó en el medio Luria Bertani (LB) que contenía isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,1 mM, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) 0,08 mM y ampicilina 50 µg mL<sup>-1</sup>. Estas placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

De cada muestra se tomaron aproximadamente 100 colonias presuntamente positivas (blancas) y se sembraron en el mismo medio de cultivo. Para confirmar las colonias positivas se realizó una reacción de PCR con los cebadores M13F y M13R. Los clones positivos se purificaron utilizando el kit “Ultra-Clean-up” de

MO BIO (EEUU) y, finalmente, se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Alcalá.

#### 2.4.14. Análisis de las secuencias

Una vez obtenidas las secuencias, se utilizó la herramienta “Pipeline Tool” del Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) la cual procesa automáticamente librerías enteras a partir de las secuencias 16S obtenidas de la secuenciación tanto de *Bacteria* como de *Archaea*. Este proceso incluye la eliminación de la secuencia del vector y la obtención del fragmento de mejor calidad de cada una de ellas. Una vez “limpia” la secuencia, el programa procede a la identificación de la misma con la herramienta “Seqmatch” comparándola con las secuencias de la base de datos del RDP.

## 2.5.

### Análisis estadístico

---

Se realizaron correlaciones entre los distintos parámetros estudiados utilizando el programa SPSS Statistics Data Editor (versión 17.0). En todos los casos se tomó el valor  $p \leq 0,05$  para determinar si la correlación era significativa o no.

Para analizar los patrones de bandas obtenidos a partir de la DGGE se realizó un análisis de conglomerados (*cluster*). Éste análisis es una técnica multivariante que busca agrupar variables tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos. El dendrograma es la representación gráfica que mejor ayuda a interpretar este tipo de análisis. El algoritmo utilizado fue el denominado “Unweighted pair-group average” (UPGMA) en el cual los *clusters* son agrupados basados en la distancia media de los miembros del grupo. El índice de similitud utilizado para la realización de estos *clusters* fue el de Jaccard. Éste índice es comúnmente utilizado en el caso de variables binarias, como es el caso de la DGGE donde se estudian la presencia o ausencia de bandas (Greenacre, 2008).

Con el fin de comparar los resultados obtenidos en las diferentes DGGE se calculó el índice de Shannon de cada muestra basándonos en la matriz presencia/ausencia obtenida a partir de los patrones de bandas. Éste índice contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio (*riqueza de especies*), y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (*abundancia*). Normalmente se expresa como  $H'$  y se expresa con un número positivo, que en la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 1 y 5. La fórmula del índice de Shannon es la siguiente:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Donde  $S$  es el número de especies;  $p_i$  es la proporción de individuos de la especie  $i$  respecto al total de individuos;  $n_i$  es el número de individuos de la especie  $i$  y  $N$  es el número de todos los individuos de todas las especies

Tanto los dendrogramas de los análisis de conglomerados obtenidos a partir de los patrones de bandas de las DGGE como el cálculo del índice de Shannon se realizaron con el programa de libre acceso PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

Para el análisis de las librerías génicas obtenidas a partir de la clonación parcial del gen codificante para ARNr 16 S se realizaron curvas de rarefacción con el objetivo de determinar si el número de clones estudiados es representativo de la diversidad presente en cada muestra. Esta curva es una gráfica que representa el número de grupos taxonómicos en función del número de individuos muestreados. Si la curva se estabiliza a la derecha, significa que se ha muestreado un número razonable de grupos, es decir, si se continua el muestreo no se encontrarán nuevos grupos taxonómicos. Estas curvas también se obtuvieron utilizando el programa PAST. Asimismo, se calculó el índice de Shannon y se realizaron análisis de *cluster* con la información obtenida a partir de las librerías génicas de cada muestra utilizando el mismo programa. A diferencia de los dendrogramas obtenidos a partir del análisis de las DGGE, para los dendrogramas correspondientes a las librerías se utilizó el índice de similitud de Bray-Curtis, debido a que es uno de los índices más utilizados en ecología para estimar la abundancia de una muestra (Greenacre, 2008).

## 2.6.

### Tampones, soluciones y medios de cultivo

#### Acetato de amonio ( $C_2H_3O_2NH_4$ ) 7,5 M

Componente	Cantidad
$C_2H_3O_2NH_4$	57,81g
Enrasar hasta 100 mL con agua destilada	

#### Acetato de sodio ( $C_2H_3NaO_2$ ) 3 M pH 7,5

Componente	Cantidad
$C_2H_3NaO_2$	12,3 g
Enrasar hasta 50 mL con agua destilada	

#### Ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N

Componente	Cantidad
HCl	3,65 mL
Enrasar hasta 100 mL con agua destilada	

#### Ácido trioxobórico (III) ( $H_3BO_3$ ) 4 %

Componente	Cantidad
$H_3BO_3$	40 g
Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada	

#### Agar Sabouraud

Componente	Cantidad
Peptona de caseína	5 g
Peptona de carne	5 g
D(+) Glucosa	40 g
Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada	

**Agar de triptona y soja (TSA) 1:10**

Componente	Cantidad
Medio TSA	1,38 g
Agar-agar	7,5 g
Enrasar hasta 500 mL con agua destilada	

**Agarosa**

Componente	Cantidad
Agarosa 0,8 %	0,8 g
Agarosa 1,2 %	1,2 g
Agarosa 1,5 %	1,5 g
<u>En TAE:</u> TAE 50X	2 mL
- Enrasar hasta 100 mL con agua destilada	
- <u>En TBE:</u> Disolver en 100 mL de TBE 5X	

**Cloruro de amonio (disolución madre)**

Componente	Cantidad
NH <sub>4</sub> Cl	3,82 g
Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada	

**Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) 0,5 M**

Componente	Cantidad
CaCl <sub>2</sub>	55,495 g
Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada	

**Cloruro de potasio (KCl) 7,4 %**

Componente	Cantidad
KCl	74,6 g
HCl 1M	10 mL
Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada	

**Cloruro de sodio (NaCl)**

Componente	Cantidad
5 M de NaCl	292,2 g
1,5 M de NaCl	87,66 g

Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada

**EDTA 0,5 M pH 8**

Componente	Cantidad
EDTA	93,05 g

- Disolver en 300 mL de agua destilada
- Ajustar el pH a 8 con NaOH
- Enrasar hasta 500 mL con agua destilada

**Heptaoxidocromato (VI) de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 1 N**

Componente	Cantidad
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	49,04 g

Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada

**Hidróxido de sodio (NaOH)**

Componente	Cantidad
1 M NaOH	40 g
0,5 M NaOH	20 g
0,3 M NaOH	12 g

Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada

**Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,1 M**

Componente	Cantidad
<u>Solución stock (0,83 mM)</u>	
IPTG	2 g

- Disolver en 10 mL de agua destilada
- Añadir 4 µL en cada placa para obtener una concentración de 0,1M

**Medio Basal Salino (MBS)**

Componente	Cantidad
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,6 g
NaCl	0,2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Solución de oligoelementos	1 mL

Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada

**Medio Luria Bertani (LB)**

Componente	Cantidad
Triptona	5 g
Extracto de levadura	2,5 g
NaCl	2,5 g
Glucosa	0,5 g
Agar	7,5 g

Enrasar hasta 500 mL con agua destilada

**Permangato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) 0,1 N**

Componente	Cantidad
$\text{KMnO}_4$	3,2 g

Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada

***p*-nitrofenil fosfato 0,025 M**

Componente	Cantidad
<i>p</i> -nitrofenil fosfato	0,232 g

Enrasar hasta 25 mL con tampón MUB correspondiente (pH 6,5 o pH 11)

***p*-nitrofenil-  $\beta$ -D-glucopiranosido 0,025 M**

Componente	Cantidad
<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido	0,1883 g

Enrasar hasta 25 mL con tampón MUB pH 6

**Poliacrilamida 6 %**

Componente	Cantidad
40 % Bis/Acrilamida	15 mL
TAE 50X	2 mL

Enrasar hasta 100 mL con agua bidestilada

**Reactivo de Nelson**

Se disolvieron 25 g de molibdato amónico tetrahidratado en 450 mL de agua destilada. A esta solución se le añadieron 21 mL de ácido sulfúrico concentrado. En otro envase, se disolvieron 3 g de arseniato disódico en 25 mL de agua destilada. Se mezclaron ambas soluciones y se guardó en una estufa a 37 °C durante 24 horas. Finalizado este tiempo, se guardó el reactivo en un frasco topacio a temperatura ambiente

**Reactivo de Somogyi**

Se disolvieron 24 g de carbonato de sodio y 12 g de tartrato sódico potásico (sal de Rochelle) en 250 mL de agua destilada. Aparte se disolvieron 4 g de CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O en 40 mL de agua y se añadió esta solución a la anterior. Posteriormente, se añadieron 16 g de NaHCO<sub>3</sub>. En otro matraz se disolvieron 180 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro en 500 mL de agua caliente. Al enfriar se mezcló con la solución anterior y se enrasó a un volumen final de 1.000 mL. El preparado se dejó en una estufa en total oscuridad a 30 °C durante 1 semana. Transcurrido este tiempo, se filtró y se guardó la solución a temperatura ambiente en un lugar oscuro y seco.

**Sal de Mohr [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] 0,5 N**

Componente	Cantidad
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	196,07 g
SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	0,15 mL

Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada



**Salicilato/nitroprusiato y NaOH 0,3 M**

Componente	Cantidad
<u>Solución A:</u>	
Salicilato	85 g
Nitroprusiato	600 mg
Enrasar hasta 500 mL de agua destilada	
<u>Solución B:</u>	
NaOH	12 g
- Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada	
- Mezclar volúmenes iguales de la solución A , solución B y agua destilada	

**Solución III (tinción de plata)**

Componente	Cantidad
NaBH <sub>4</sub>	0,02 g
CH <sub>2</sub> O	0,8 mL
Enrasar hasta 200 mL con NaOH al 1,5 %	

**Solución de conservación para DGGE**

Componente	Cantidad
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	25 mL
C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	10 mL
Enrasar hasta 100 mL con agua destilada	

**Tampón fosfato 0,1 M pH 5,5**

Componente	Cantidad
<u>Solución A: fosfato sódico monobásico 0,2 M</u>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	15,06 g
- Enrasar hasta 500 mL de agua destilada	
<u>Solución B: fosfato sódico dibásico 0,2 M</u>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	35,814 g
- Enrasar hasta 500 mL con agua destilada	
- Para preparar 200 mL de tampón mezclar 95,7 mL de A y 4,3 mL de B con 100 mL de agua destilada.	

**Tampón borato 0,075 M pH 10**

Componente	Cantidad
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	30 g
- Disolver en 1500 mL de agua destilada templada - Ajustar pH con NaOH al 20 %. - Enrasar hasta 2000 mL de agua destilada	

**Tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7**

Componente	Cantidad
<u>Solución A:</u>	
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H	21,3 g
- Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada	
<u>Solución B:</u>	
K PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	20,4 g
- Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada	
<u>Solución C:</u>	
NaCl	8,5 g
- Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada	
- Mezclar <b>380 mL</b> de solución <b>A</b> con <b>120 mL</b> de solución <b>B</b> y <b>500 mL</b> de solución <b>C</b>	

**Tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,5**

Componente	Cantidad
<u>Solución A:</u>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	31,2 g
Disolver en 1000 mL de agua destilada	
<u>Solución B:</u>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28,39 g
- Disolver en 1000 mL de agua destilada	
- Mezclar <b>9,5 mL</b> de la solución <b>A</b> con <b>40,5 mL</b> de la solución <b>B</b>	
- Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada	

**Tampón MUB (solución stock) 0,1 M**

Componente	Cantidad
Tris	12,2 g
C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	11,6 g
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	14 g
B(OH) <sub>3</sub>	6,26 g
NaOH 1M	488 mL

Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada

**Tampón MUB 0,02 M pH 6**

Componente	Cantidad
Tampón MUB stock	200 mL

- Ajustar al pH deseado (6 ó 6,5) con HCl 0,1M.
- Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada

**Tampón MUB 0,02M pH 11**

Componente	Cantidad
Tampón MUB stock	200 mL

- Ajustar el pH a 11 con NaOH 0,1M.
- Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada

**Tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X**

Componente	Cantidad
(HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	242 g
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	57,1 mL
Na <sub>2</sub> EDTA pH 8	100 mL

- Ajustar el pH a 7,2.
- Enrasar a 1000 mL con agua destilada

### Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X

Componente	Cantidad
(HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	54 g
B(OH) <sub>3</sub>	27,5 g
EDTA pH 0,5M	20 mL

Enrasar hasta 1000 mL con agua destilada

### Tampón Tris-HCl 0,25 M

Componente	Cantidad
Tris-HCl	0,785 g

Enrasar hasta 100 mL con agua destilada

### 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (XGal) 0,08 mM

Componente	Cantidad
<u>Solución stock (50 mM)</u>	
X-gal	20 mg

- Enrasar hasta 1 mL de dimetilformamida  
 - Añadir 40 µL de solución stock a cada placa para obtener una concentración final de 0,08 M



## 3. Resultados y Discusión



### 3.1.

## Caracterización física, química y biológica de los suelos quemados en comparación con los suelos control

Con objeto de evaluar el efecto del fuego sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, se analizaron muestras control y muestras afectadas por incendios de las zonas de Aznalcóllar (4 muestras), Cazorla (12 muestras) y Tenerife (16 muestras).

### 3.1.1. Caracterización física

En las Tablas 3.1 y 3.2 se muestran los valores de los parámetros físicos determinados en los suelos quemados (representados por la/s letra/s Q) y en sus respectivos controles (letra C).

#### a) pH

Respecto del pH, se observaron diferencias en los valores de este parámetro correspondientes a las distintas zonas estudiadas. Mientras que en **Aznalcóllar** el pH de los suelos quemados fue más elevado que en el suelo control, en **Cazorla** y **Tenerife** no se observó un patrón regular de comportamiento de este parámetro (Tabla 3.1).

En el primer muestreo realizado en **Cazorla** se observó un aumento del pH en los suelos quemados de la zona 1 (margen derecho) y una disminución en los suelos de la zona 2 (margen izquierdo), mientras que en el segundo y tercer muestreo se produjo una disminución del pH de los suelos quemados de la zona 1 y un aumento en los de la zona 2.

En el primer muestreo realizado en **Tenerife**, con excepción de la zona 1 (Cruz del Cura), el pH de los suelos quemados resultó más elevado que su respectivo control. Durante el segundo muestreo se observó un incremento de pH en los suelos quemados de las zonas 2 (Los Castillos) y 3 (Los Areneros) y una disminución en el de las zonas 1 (Cruz del Cura) y 4 (La Guancha), respecto de sus respectivos controles.

**Tabla 3.1.** pH de los suelos control y de los suelos afectados por incendios en las zonas de Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife

Muestra	pH		
	Aznalcóllar		
C	4,81 ±0,23		
QQ1	6,16 ±0,17		
QQ2	6,01 ±0,25		
Q3	5,67 ±0,21		
Cazorla			
	2005	2007	2008
C1	8,16 ±0,32	7,77 ±0,25	8,24 ±0,41
Q1	8,30 ±0,34	7,69 ±0,37	7,92 ±0,10
C2	7,88 ±0,32	7,39 ±0,32	6,93 ±0,34
Q2	7,44 ±0,29	7,59 ±0,21	7,59 ±0,10
Tenerife			
	Antes llluvias	Después llluvias	
C1	7,10 ±0,30	6,80 ±0,20	
Q1	6,80 ±0,35	6,50 ±0,30	
C2	7,00 ±0,17	7,50 ±0,10	
Q2	8,00 ±0,25	7,10 ±0,30	
C3	6,60 ±0,26	6,90 ±0,30	
Q3	7,10 ±0,19	7,10 ±0,10	
C4	6,50 ±0,30	6,90 ±0,20	
Q4	7,60 ±0,10	6,50 ±0,20	

De acuerdo a la bibliografía consultada, en general, el fuego provoca un aumento del pH del suelo debido a la formación, en la capa de cenizas procedentes de la vegetación quemada, de óxidos, hidróxidos y carbonatos de los cationes Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> (Viro, 1974; Khanna y Raison, 1986; Etiégni y Campbell, 1991; Khanna y col., 1994). Por otra parte, el incremento del pH de los suelos quemados será tanto más significativo cuanto mayor sea la temperatura alcanzada en el incendio (>450 °C), ya que las altas temperaturas favorecen, también, la formación de óxidos.

Son varias las causas que podrían dar lugar al diferente patrón de comportamiento del pH observado en las distintas zonas analizadas, entre las que cabe señalar las siguientes: diferencias en las características edáficas de los suelos de dichas zonas, la presencia de diferentes especies vegetales en cada área, así



como las características (tipo, intensidad, duración) del incendio que tuvo lugar en las zonas estudiadas.

Además del tipo de vegetación y de la intensidad del fuego, ha de tenerse en cuenta que los suelos ácidos poseen menor capacidad amortiguadora que los alcalinos (González-Vázquez, 2011), lo que explicaría que en la zona de Aznalcóllar las diferencias de pH entre los suelos control y los quemados sean mayores que en Cazorla o Tenerife.

## b) Capacidad de campo

Los resultados correspondientes a los parámetros que determinan el estado hídrico de los suelos, como son, la capacidad de campo y el punto de marchitez permanente, se muestran en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Capacidad de campo y punto de marchitez permanente de los suelos control y quemados de Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife

Muestra	Capacidad de Campo (%)			Punto de marchitez		
	2005	2007	2008	2005	2007	2008
<b>Aznalcóllar</b>						
<b>C</b>	26,92 ±1,38			12 ±0,49		
<b>QQ1</b>	25,64 ±1,11			11 ±0,37		
<b>QQ2</b>	30,40 ±1,25			13,8 ±0,54		
<b>Q3</b>	27,98 ±1,05			12,2 ±0,51		
<b>Cazorla</b>						
	2005	2007	2008	2005	2007	2008
<b>C1</b>	21,27 ±1,40	17,28 ±0,88	15,57 ±0,63	11,53 ±0,58	7,52 ±0,38	*n.d.
<b>Q1</b>	29,00 ±0,78	39,73 ±1,79	34,77 ±1,26	16,34 ±0,81	20,92 ±0,63	*n.d.
<b>C2</b>	28,67 ±0,72	31,66 ±1,42	23,53 ±0,85	15,51 ±0,47	10,98 ±0,55	*n.d.
<b>Q2</b>	33,04 ±1,12	54,19 ±0,53	49,20 ±1,53	18,93 ±0,76	31,76 ±0,95	*n.d.

**Tabla 3.2. (Continuación).** Capacidad de campo y punto de marchitez permanente de los suelos control y quemados de Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife

Muestra	Capacidad de Campo (%)		Punto de marchitez	
	Antes Iluvias	Después Iluvias	Antes Iluvias	Después Iluvias
	<b>Tenerife</b>			
<b>C1</b>	34,26 ±1,61	36,58 ±1,51	*n.d	*n.d
<b>Q1</b>	39,68 ±1,32	36,17±0,98	*n.d	*n.d
<b>C2</b>	30,22 ±1,35	36,48 ±1,69	*n.d	*n.d
<b>Q2</b>	50,25 ±1,93	38,17 ±1,23	*n.d	*n.d
<b>C3</b>	32,92 ±1,78	35,01 ±0,87	*n.d	*n.d
<b>Q3</b>	27,05 ±1,45	30,00 ±1,45	*n.d	*n.d
<b>C4</b>	66,82 ±2,08	35,36 ±1,84	*n.d	*n.d
<b>Q4</b>	54,01 ±1,96	48,22 ±0,62	*n.d	*n.d

\*n.d.: No determinado

En las muestras de **Aznalcóllar** y de **Tenerife** los valores obtenidos para ambos parámetros en las distintas áreas quemadas no presentaron un patrón común de comportamiento, respecto a sus respectivos controles, si bien la capacidad de campo alcanzó valores más elevados en la mayoría de los suelos quemados. En la zona de **Cazorla**, los suelos afectados por incendios presentaron una mayor capacidad de retención de agua que los suelos control en los tres muestreos realizados.

La capacidad de un suelo para retener agua es una propiedad que depende de numerosos factores. Mataix-Solera y col. (2009a) han descrito que un aumento en la materia orgánica de un suelo, suele también aumentar la capacidad de campo. Nuestros resultados corroborarían, en términos generales, este resultado; así por ejemplo, en los suelos de Cazorla, se observó un incremento en la capacidad de campo y en la materia orgánica en los suelos incendiados, respecto de sus respectivos controles. Se podría inferir que, en esta zona, los incendios podrían haber mejorado la estabilidad estructural por “consolidación” de los agregados al formarse puentes de hidrógeno irreversibles durante el calentamiento.

### 3.1.2. Caracterización química

En la Tabla 3.3 se presentan los porcentajes de carbono total oxidable (CO) y de materia orgánica total (MOT) correspondientes a los suelos control y quemados de los diferentes lugares estudiados.

**Tabla 3.3.** Contenido en carbono total oxidable y en materia orgánica total de los suelos control y quemados

Muestra	Carbono total oxidable (%)			Materia orgánica total (%)		
	Aznaalcóllar					
<b>C</b>	2,3 ± 0,1			3,91 ± 0,16		
<b>QQ1</b>	2,0 ± 0,1			3,44 ± 0,17		
<b>QQ2</b>	1,9 ± 0,0			3,33 ± 0,07		
<b>Q3</b>	2,0 ± 0,1			3,5 ± 0,09		
Cazorla						
	2005	2007	2008	2005	2007	2008
<b>C1</b>	0,84 ±0,10	1,23 ±0,18	2,47 ±0,11	1,45 ±0,06	2,13 ±0,10	4,25 ±0,21
<b>Q1</b>	2,99 ±0,09	2,97 ±0,16	8,54 ±0,42	5,15 ±0,21	5,12 ±0,35	14,73 ±0,58
<b>C2</b>	2,30 ±0,02	2,63 ±0,03	3,83 ±0,15	3,99 ±0,20	4,53 ±0,33	6,61 ±0,29
<b>Q2</b>	2,23 ±0,10	4,39 ±0,18	10,24 ±0,31	3,84 ±0,15	7,56 ± 0,26	17,66 ±0,60
Tenerife						
	Antes lluvias	Después lluvias	Antes lluvias	Después lluvias		
<b>C1</b>	2,60 ± 0,35	1,99 ± 0,18	4,48 ± 0,41	3,43 ± 0,29		
<b>Q1</b>	7,01 ± 0,13	3,98 ± 0,09	12,08 ± 0,20	6,86 ± 0,12		
<b>C2</b>	2,09 ± 0,24	3,34 ± 0,12	3,60 ± 0,29	5,75 ± 0,19		
<b>Q2</b>	3,93 ± 0,18	2,46 ± 0,15	6,77 ± 0,19	4,24 ± 0,27		
<b>C3</b>	1,18 ± 0,15	0,50 ± 0,03	2,03 ± 0,23	0,86 ± 0,06		
<b>Q3</b>	2,51 ± 0,09	0,77 ± 0,02	4,32 ± 0,17	1,33 ± 0,03		
<b>C4</b>	11,77 ± 0,30	6,04 ± 0,31	20,29 ± 0,66	10,41 ± 0,50		
<b>Q4</b>	7,76 ± 0,35	7,98 ± 0,18	13,37 ± 0,81	13,76 ± 0,31		

Los resultados obtenidos no siguen una pauta uniforme. En este sentido, mientras que en **Aznaalcóllar** se observa una disminución en el porcentaje de carbono y materia orgánica total de los suelos quemados respecto al control, en los de **Cazorla** y en la mayoría de los de **Tenerife**, los valores correspondientes a dichos parámetros resultaron más elevados en los suelos quemados. El aumento en el porcentaje de carbono y materia orgánica en los suelos quemados de **Cazorla**, respecto de sus respectivos controles, se mantuvo a lo largo de los tres muestreos realizados, y fue especialmente importante en el segundo y tercer muestreo.

Además, es importante mencionar que en los suelos de **Tenerife** se obtuvieron valores más bajos de carbono total y materia orgánica total en el muestreo realizado después de las lluvias que en el de antes de las lluvias, siendo esta disminución mayor en los suelos quemados que en sus respectivos controles. Este resultado se podría explicar sobre la base de que la destrucción de la cubierta vegetal que produce el fuego podría potenciar el efecto de la lluvia y acelerar su velocidad de deslizamiento por la superficie. El resultado final se traduciría en un aumento de la escorrentía y la erosión, así como una pérdida de materia orgánica, tal como han descrito Mataix-Solera y col. (2009a).

La disminución en carbono oxidable detectada en **Azncóllar** podría atribuirse a las características del incendio. De hecho, el efecto del fuego sobre este parámetro suele estar relacionado con la intensidad y la severidad del incendio (Mataix-Solera y col., 2009a). El comportamiento observado en los suelos de Azncóllar responde a tipos de suelo que han experimentado incendios de gran intensidad o que han sufrido incendios sucesivos, como es el caso.

Por otra parte, el aumento de los valores de carbono oxidable y materia orgánica observado en los suelos quemados de **Cazorla** y en la mayoría de los de **Tenerife**, podría ser debido a la incorporación al suelo de materia orgánica procedente de las cenizas del material vegetal parcial o totalmente quemado y/o de las hojas de las plantas que mueren por efecto del fuego y caen al suelo. El incremento en CO y en MOT observado en el 2º y 3º muestreo en Cazorla podría atribuirse al hecho ya descrito por otros autores que observaron que con cierta frecuencia hay vegetación afectada por el fuego que pierde su follaje algún tiempo después del incendio, evidenciándose por tanto los efectos de su incorporación al suelo no inmediatamente, sino en muestreos posteriores (Knicker y col., 2005).

Los resultados correspondientes al contenido en nitrógeno total y a la relación carbono/nitrógeno de los suelos control y los afectados por incendios se presentan en la Tabla 3.4.

Con excepción de las muestras tomadas antes de las lluvias correspondientes a la zona 4 de Tenerife (La Guancha), en todas las demás muestras (Azncóllar, Cazorla y el resto de las muestras de Tenerife) se obtuvo un mayor porcentaje de nitrógeno total en los suelos quemados que en sus respectivos controles.

**Tabla 3.4.** Contenido en nitrógeno total y relación C/N de los suelos control y quemados de Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife

Muestra	Contenido de Nitrógeno (%)			Relación C/N		
	Aznalcóllar					
C	0,14 ±0,01			16,20		
QQ1	0,17 ±0,01			11,70		
QQ2	0,15 ±0,01			12,90		
Q3	0,19 ±0,01			11,28		
Cazorla						
	2005	2007	2008	2005	2007	2008
C1	0,06 ±0,01	0,10 ±0,01	0,14 ±0,01	14,00	12,30	17,64
Q1	0,20 ±0,01	0,35 ±0,02	0,47 ±0,01	12,92	8,48	17,05
C2	0,22 ±0,01	0,14 ±0,01	0,20 ±0,01	10,45	18,78	19,15
Q2	0,33 ±0,01	0,62 ±0,01	0,70 ±0,02	6,75	7,00	14,63
Tenerife						
	Antes llluvias	Después llluvias	Antes llluvias	Después llluvias		
C1	0,42 ±0,02	0,05 ±0,01	6,04	39,80		
Q1	0,73 ±0,02	0,15 ±0,02	9,60	26,53		
C2	0,05 ±0,01	0,05±0,01	41,80	66,80		
Q2	0,13 ±0,01	0,33 ±0,01	28,07	7,45		
C3	0,05 ±0,02	0,05 ±0,01	23,06	10,00		
Q3	0,21 ±0,01	0,05 ±0,02	11,95	15,40		
C4	0,58 ±0,02	0,28 ±0,02	19,95	20,83		
Q4	0,38 ±0,01	0,63 ±0,02	19,89	12,47		

Los resultados obtenidos en relación al contenido de carbono y nitrógeno apoyan la idea de que los incendios ocurridos en Cazorla y Tenerife fueron de baja intensidad; es probable que las temperaturas alcanzadas en los primeros 10 cm del suelo no superaran los 200 °C y que el aumento de nitrógeno en las muestras de suelos quemados se deba a la incorporación de materiales semipirólizados (Mataix-Solera y col., 2009a).

El valor de la relación C/N (Tabla 3.4) resultó menor en los suelos quemados que en los suelos control, en la mayoría de las zonas estudiadas. Este mismo resultado había sido descrito anteriormente por diversos autores (Viro, 1974, Almendros y col., 1984a, 1984b, 2003; Vega, 1986). Almendros y col. (2003), Knicker y col. (2005) y De la Rosa y col. (2007) comprobaron que la disminución de la relación C/N se debe a la formación y acumulación de nuevas formas de N heterocíclicas recalcitrantes y a la volatilización más rápida de los compuestos de carbono.

El análisis de los resultados de la caracterización química de los suelos seleccionados pone de manifiesto, la gran influencia que ejercen sobre los resultados las condiciones inherentes a los escenarios seleccionados, tales como: diferentes tipos de suelo, grado de intensidad o severidad de los incendios, tipo de cobertura vegetal, incendios consecutivos en la misma área, índice de pluviosidad, etc. Todos estos factores impiden obtener del análisis comparativo de los resultados conclusiones extrapolables a todas las áreas incendiadas. No obstante, dado que estas áreas presentan un interés ecológico *per se* los datos obtenidos en cada caso complementan otros estudios analíticos realizados por otros autores en las mismas zonas (Knicker y col., 2005; González-Pérez y col., 2008), y que en su conjunto contribuyen a conocer el estado de recuperación de los suelos afectados por incendios.

### 3.1.3. Caracterización biológica

Con objeto de conocer las alteraciones provocadas por el fuego sobre las poblaciones microbianas del suelo, se analizaron los siguientes parámetros considerados indicadores de la salud del suelo: biomasa microbiana, actividad microbiana y diversidad microbiana (Arias y col., 2005).

#### 3.1.3.1. Estimación de la biomasa microbiana

Para la estimación de la **biomasa microbiana** se realizaron recuentos en placa de bacterias y hongos viables presentes en las distintas muestras de suelo, así como recuentos directos al microscopio de fluorescencia.

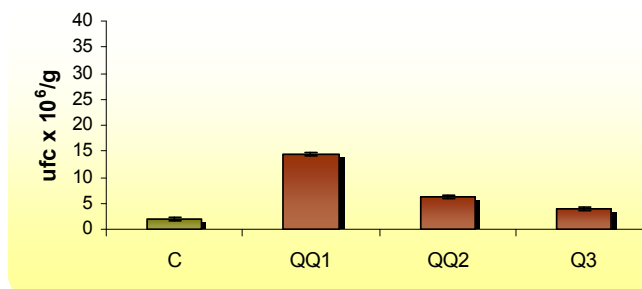
##### a) Recuento en placa de bacterias

En la Figura 3.1 se muestran los resultados del recuento de las bacterias viables en el medio TSA.

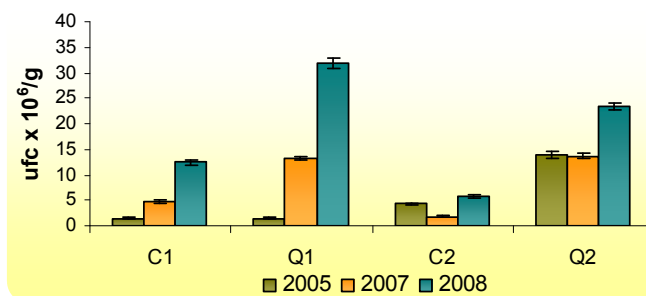
Tanto en las muestras correspondientes a la zona de **Aznalcóllar** como en las de **Cazorla**, se observó que todos los suelos quemados presentan mayor número de bacterias viables que sus correspondientes controles. Además, en los suelos de

**Cazorla**, se detectó un aumento en el número de bacterias viables a lo largo de los tres años estudiados, tanto en los suelos control como en los quemados, si bien el incremento fue más notable en los suelos afectados por el incendio.

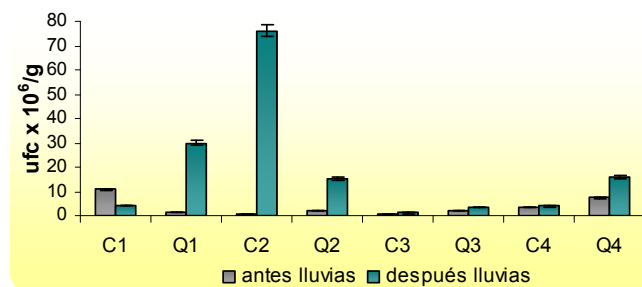
### Aznalcóllar



### Cazorla



### Tenerife



**Figura 3.1.** Recuento de bacterias viables (ufc/g de suelo) presentes en los diferentes suelos

En el caso de los suelos de **Tenerife**, los resultados de los recuentos presentaron variaciones en función del área muestreada y del tiempo de muestreo. Así, los resultados del muestreo realizado inmediatamente después del incendio pusieron de manifiesto que en tres de las zonas (Zona 2- Los Castillos, Zona 3- Los Areneros y Zona 4- La Guancha) se obtuvo un aumento del número de bacterias

viabiles en los suelos afectados por el fuego, en relación a los respectivos controles. Por el contrario, en el segundo muestreo (realizado después de las primeras lluvias) los suelos quemados de las zonas de Cruz del Cura (zona 1), Los Areneros (zona 3) y La Guancha (zona 4) proporcionaron el mayor número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo.

A pesar de las diferencias observadas en las distintas zonas, se puede afirmar que, en general, se detectó un número de bacterias viabiles mayoritariamente superior en los suelos quemados que en los suelos control.

#### **b) Recuento en placa de mohos y levaduras**

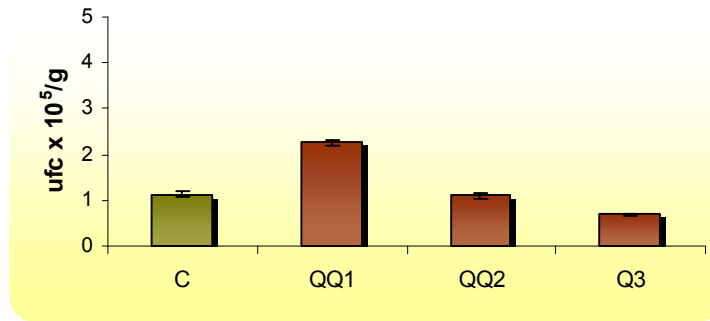
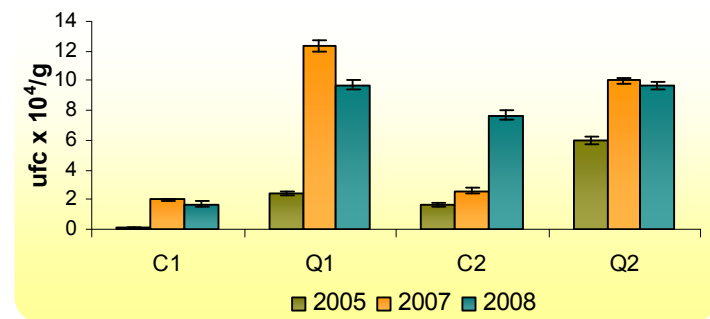
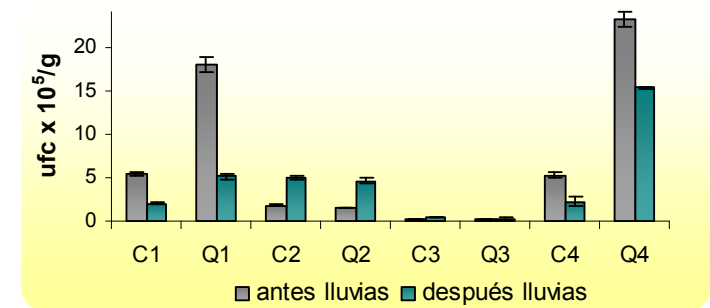
En la Figura 3.2 se muestran los resultados correspondientes a los recuentos de mohos y levaduras. De estos resultados se puede deducir en primer lugar, la presencia de un menor número de mohos y levaduras viabiles que de bacterias, en todas las muestras analizadas.

En los recuentos realizados en los suelos de **Aznalcóllar**, únicamente se detectó un mayor número de hongos viabiles, respecto del control, en los suelos quemados de la zona QQ1 (Arroyo de las Cañadas), zona que como se menciona en la sección de Materiales y Métodos ha sufrido varios incendios.

Del mismo modo, en los tres muestreos realizados en la Sierra de **Cazorla**, se observó un mayor número de hongos viabiles en los suelos quemados que en los suelos control. Sin embargo, en los muestreos correspondientes a **Tenerife**, solamente las zonas quemadas 1 (Cruz del Cura) y 4 (La Guancha) presentaron un mayor número de hongos viabiles que los controles, en los dos muestreos realizados (antes y después de las lluvias). En las zonas 2 (Los Castillos) y 3 (Los Areneros) no se observaron diferencias significativas entre los suelos control y los quemados.

De nuevo, en la mayoría de los suelos quemados se observa una mayor biomasa fúngica que en sus respectivos controles.



**Aznalcóllar****Cazorla****Tenerife**

**Figura 3.2.** Recuento de hongos viables (ufc/g de suelo) presentes en los diferentes suelos

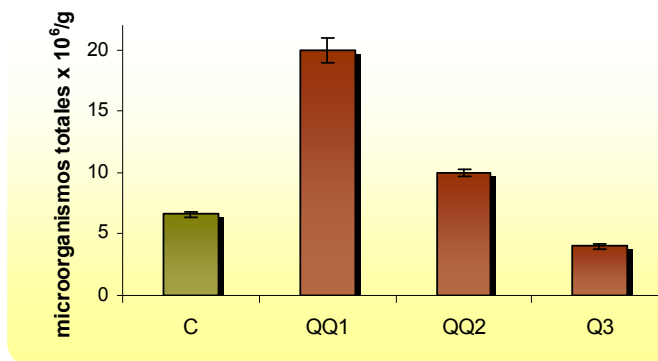
### c) Recuento total directo al microscopio de fluorescencia

Para la realización del recuento directo al microscopio fue necesario poner a punto la etapa de fijación de la muestra de suelo. Es importante destacar que solamente se logró visualizar las bacterias al microscopio cuando las muestras se fijaron con PBS-formaldehído y se concentraron utilizando la centrifugación en gradiente de densidad Nycodenz, antes de su filtración a través de las membranas

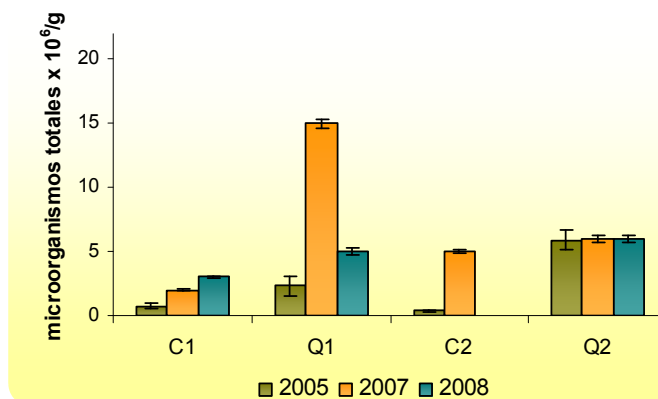
GTTP. Cuando las muestras únicamente se fijaron con PBS-formaldehído, no se pudieron distinguir los microorganismos de los restos de partículas del suelo, a pesar de haber realizado distintas diluciones de la muestra.

En la Figura 3.3 se muestran los resultados del recuento directo de células al microscopio utilizando DAPI como colorante fluorescente.

### Aznalcóllar



### Cazorla



**Figura 3.3.** Recuento de microorganismos totales por gramo de suelo obtenido mediante tinción fluorescente con DAPI.

Se puede observar, que, en general, tanto en la zona de **Aznalcóllar** como en la de **Cazorla**, los resultados del recuento de microorganismos totales fueron similares a los obtenidos con la técnica de recuento de viables. Así, en **Aznalcóllar**, los suelos quemados QQ1 y QQ2 presentaron mayor número de microorganismos totales que el control. Del mismo modo, en la zona de **Cazorla**, durante los tres muestreos realizados, fueron también los suelos incendiados los que presentaron mayor número de microorganismos totales. En la muestra Q1 se observó una mayor cantidad de microorganismos en el segundo muestreo, mientras

que en la Q2 la cantidad de microorganismos se mantuvo estable a través del tiempo.

Puesto que con esta técnica se contabilizan tanto los microorganismos viables como los no viables, el número de microorganismos obtenido debería haber sido superior al correspondiente a la técnica de recuento de viables. Sin embargo, los resultados obtenidos con ambas técnicas, aunque estuvieron dentro del mismo orden de magnitud, variaron en función de la zona. Así, en **Aznácollar**, el recuento de microorganismos totales fue superior al de viables, sin embargo, en **Cazorla** se obtuvo el resultado contrario.

Este hecho podría ser debido a que la técnica de recuento directo al microscopio requiere que el procesamiento de las muestras, es decir, la fijación, concentración y filtración a través de membrana, se realice en las primeras 24 horas de llegada de éstas al laboratorio, lo que no siempre fue posible en el estudio realizado.

Cabe señalar, no obstante, que la utilización del gradiente de Nycodenz se ha descrito como una técnica efectiva para el recuento total de microorganismos del suelo (Maron y col., 2006); en nuestro caso, probablemente, el retraso en el procesamiento de las muestras impidió demostrar su efectividad.

En resumen, todas las técnicas de recuento utilizadas en este trabajo permiten concluir que en la mayoría de los suelos afectados por el fuego se produce un aumento de la biomasa microbiana, en relación a los suelos control. Este resultado podría ser atribuido al aumento en el contenido de carbono, materia orgánica y/o nitrógeno también detectado en la mayoría de los suelos quemados, consecuencia de la acumulación de material vegetal (Mataix-Solera y col., 2009a; Weston y Attiwill, 1990).

En el caso concreto de los hongos, el incremento observado en el número de viables en los suelos quemados podría atribuirse a la dispersión de las esporas que se ha descrito puede ocurrir tras el shock térmico (Mataix-Solera y col., 2009a).

No existe uniformidad en los resultados obtenidos por diferentes autores sobre el efecto del fuego sobre la biomasa microbiana. Así, Mataix-Solera y colaboradores (2009b) en una revisión realizada de estudios similares, describen una variación muy significativa en los resultados obtenidos, encontrándose casos en los que el fuego provoca un aumento de la biomasa, otros en los que se produce una disminución de la misma y un tercer grupo de estudios en los que no se observan variaciones significativas de este parámetro. Del mismo modo, Choromanska y Deluca (2002) y Bárcenas-Moreno y col. (2011) y Xu Yinghua y col. (2012) observaron una disminución de la biomasa en suelos quemados respecto al control, mientras que García-Villaraco Velasco y col. (2009) no

observaron cambios significativos en la biomasa bacteriana de suelos quemados. La diferencia de estos resultados podría explicarse sobre la base de la intensidad y la severidad de los incendios; así, diversos estudios han puesto de manifiesto que los incendios de baja intensidad no causan ningún efecto deletéreo sobre la cantidad y la actividad de los microorganismos del suelo (Xu Yinghua y col., 2012), por lo que podríamos deducir que la mayor parte de los incendios de las zonas estudiadas habrían sido de baja intensidad.

### 3.1.3.2. Actividad microbiana

La actividad de los microorganismos presentes en los suelos afectados por el fuego, respecto de los suelos control, se determinó mediante la valoración de la respiración inducida por sustrato (SIR) y de la actividad de diversas enzimas en las muestras de suelo.

#### a) Respiración inducida por sustrato (SIR)

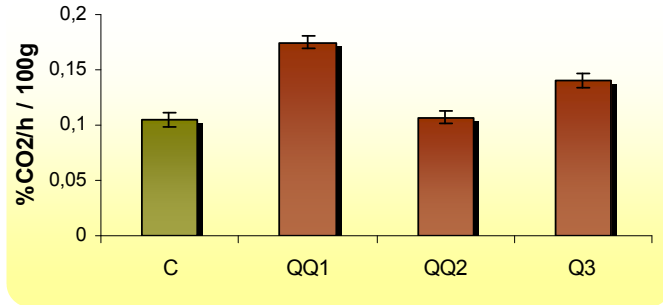
En la Figura 3.4 se muestran los resultados de la respiración inducida por sustrato en las diferentes muestras analizadas. Los resultados de las muestras de Aznalcollar están representados como % de CO<sub>2</sub> liberado por los microorganismos del suelo en presencia de un sustrato fácilmente metabolizable, como es la glucosa. Para el resto de las muestras se utilizó el método BacTrac y los resultados están representados como los mg de CO<sub>2</sub>/100g/h.

Con independencia del método utilizado, la mayoría de los suelos quemados presentaron una mayor actividad respiratoria que sus respectivos controles. Por otro lado, en las muestras de **Tenerife**, se observó una mayor actividad respiratoria en los suelos muestreados antes de las lluvias, que en los correspondientes al muestreo realizado después de las lluvias.

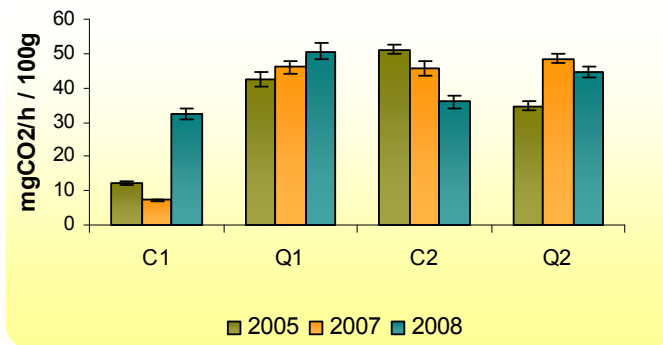
El aumento de la actividad respiratoria observado en los suelos afectados por el fuego, respecto de los suelos control, podría ser atribuido al aumento, también detectado en nuestro estudio, de la materia orgánica de dichos suelos. La incorporación de material vegetal fácilmente biodegradable y el incremento de cationes intercambiables, consecuencia del incendio, conllevaría a un mayor crecimiento de las poblaciones microbianas del suelo y por ende a un aumento de la actividad respiratoria. En la bibliografía consultada, no se describe una pauta común del efecto del fuego sobre la actividad respiratoria del suelo. En un estudio realizado por Wüthrich y colaboradores (2002) acerca del efecto de los incendios de baja y alta intensidad sobre la actividad respiratoria y la biomasa microbiana del suelo, no se observaron diferencias significativas entre los suelos control y los quemados en el incendio de baja intensidad. Sin embargo, en el incendio de mayor intensidad, detectaron un aumento de la actividad respiratoria tanto en los suelos

tomados 20 horas después del incendio, como en los suelos muestreados varios meses después.

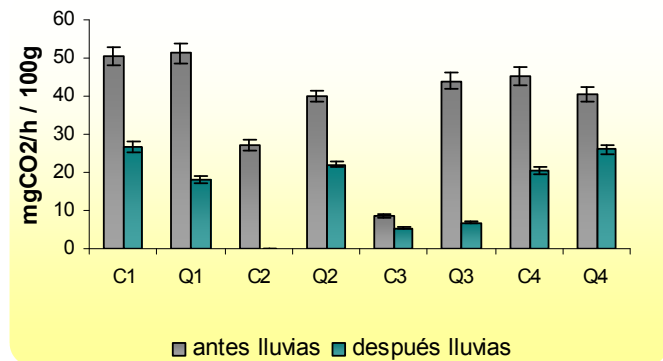
### Azalcóllar



### Cazorla



### Tenerife



**Figura 3.4.** Respiración inducida por sustrato de las diferentes muestras de suelo

Por el contrario, en un estudio realizado por Jiménez y colaboradores (2007) en el que se tomaron muestras de suelos sometidos a incendios controlados durante los años 2004 y 2005, se observó que en la mitad de las muestras, la actividad respiratoria era menor en los suelos quemados que en los suelos control. En la otra mitad de las muestras, no se observaron diferencias en la actividad respiratoria entre los suelos control y los quemados.

## **b) Actividades enzimáticas**

La estimación de la actividad microbiana de las poblaciones del suelo también se llevó a cabo mediante la determinación de distintas actividades enzimáticas relacionadas con los ciclos del carbono, nitrógeno y fósforo.

### **b.1) Fosfatasa ácida y alcalina**

En la Tabla 3.5 se muestran los resultados de la valoración de las actividades fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina de los suelos control y quemados de las zonas de Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife.

En el caso de la zona de **Aznalcóllar** se observaron niveles más elevados de la actividad fosfatasa alcalina en los suelos quemados que en el control. Respecto a la actividad fosfatasa ácida, los niveles fueron más elevados únicamente en la zona Q3, respecto del control.

Los resultados obtenidos en la zona de **Cazorla** (Tabla 3.5) se podrían resumir del siguiente modo:

a) En todos los suelos, tanto controles como quemados, la actividad fosfatasa alcalina fue más elevada que la fosfatasa ácida, lo que está en concordancia con el pH alcalino de todos los suelos de esta zona.

b) El patrón de comportamiento de las dos actividades enzimáticas fue el mismo: mayores niveles de actividad en los suelos quemados que en los suelos control, excepto para la muestra Q1 tomada en el muestreo de 2007.

c) No se observó un patrón definido cuando se evaluaron estas actividades enzimáticas en la cronosecuencia de los tres muestreos.

En las muestras provenientes de **Tenerife**, los niveles de actividad fosfatasa ácida fueron mayores que los de fosfatasa alcalina, lo que también, como en la zona de Cazorla, se corresponde con el pH de los suelos, en este caso pH ácido. También se observó, al igual que ocurre en los suelos de la sierra de Cazorla, que el patrón de las dos actividades enzimáticas resultó ser el mismo. Así, durante el primer muestreo (después del incendio y antes de las lluvias) los niveles de ambas actividades fueron mayores en los suelos quemados de las zonas Q1 (Cruz del Cura) y Q3 (Los Areneros) que en los suelos control (C1 y C3), mientras que ocurrió al revés en las zonas Q2 (Los Castillos) y Q4 (La Guancha) (Tabla 3.5). Por el contrario, los resultados del segundo muestreo (después de las primeras

lluvias) evidenciaron un incremento de ambas actividades enzimáticas en los suelos quemados respecto de los suelos control.

**Tabla 3.5.** Valoración de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida y alcalina en los suelos control y quemados de Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife

Muestra	Fosfatasa ácida (U/g)			Fosfatasa alcalina (U/g)		
	Aznalcóllar					
C	3,03 ±0,14			0,44 ±0,01		
QQ1	2,01 ±0,10			0,85 ±0,04		
QQ2	2,95 ±0,10			0,80 ±0,04		
Q3	3,16 ±0,13			0,70 ±0,04		
Cazorla						
	2005	2007	2008	2005	2007	2008
C1	0,72 ±0,01	1,76 ±0,06	1,16 ±0,08	1,75 ±0,09	5,70 ±0,19	3,37 ±0,20
Q1	1,63 ±0,05	1,11 ±0,03	1,67 ±0,08	3,65 ±0,12	2,26 ±0,08	4,22 ±0,21
C2	2,32 ±0,08	1,99 ±0,07	1,80 ±0,09	4,70 ±0,17	4,79 ±0,17	3,56 ±0,20
Q2	2,96 ±0,09	2,82 ±0,09	2,16 ±0,07	5,01 ±0,18	6,93 ±0,25	6,29 ±0,30
Tenerife						
	Antes lluvias	Después lluvias	Antes lluvias	Después lluvias		
C1	0,58 ±0,05	1,27 ±0,01	0,49 ±0,02	0,51 ±0,03		
Q1	1,90 ±0,08	1,81 ±0,02	0,58 ±0,01	1,90 ±0,02		
C2	0,46 ±0,01	*n.d.	1,26 ±0,07	*n.d.		
Q2	0,28 ±0,01	1,44 ±0,02	0,28 ±0,01	0,46 ±0,03		
C3	0,35 ±0,01	0,30 ±0,01	0,17 ±0,01	0,10 ±0,08		
Q3	0,62 ±0,01	0,57 ±0,04	0,62 ±0,02	0,35 ±0,01		
C4	6,06 ±0,08	5,42 ±0,14	1,60 ±0,09	1,42 ±0,07		
Q4	0,87 ±0,07	5,24 ±0,20	0,87 ±0,06	6,06 ±0,30		

Si realizamos un análisis comparativo entre los resultados obtenidos en Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife se observa que, en la mayoría de las muestras, las actividades fosfatasa presentaron valores más elevados en los suelos quemados que en sus respectivos controles. Aunque resultados similares han sido descritos por otros autores, la bibliografía consultada al respecto no pone de manifiesto una

relación clara entre la actividad fosfatasa y los incendios. Así, mientras que Eivasi y Bayan (1996) y Boerner y Brinkman (2003) encontraron una disminución de la actividad fosfatasa ácida en suelos quemados respecto de los suelos control, Aiwa y colaboradores (1999) y Boerner y colaboradores (2005) detectaron aumentos de la actividad fosfatasa ácida en suelos quemados en relación a suelos control. Por otra parte, se ha descrito que la actividad fosfatasa se correlaciona negativamente con la severidad del incendio. Así pues, fuegos de gran intensidad y severidad producirían una mayor incorporación de fósforo al suelo, elemento inhibidor de las actividades fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina (Adams, 1992). En nuestro caso, el haberse detectado valores más elevados de actividad fosfatasa en los suelos quemados apuntaría, al igual que ocurría con otros parámetros, a una moderada severidad de los incendios.

### **b.2) $\beta$ -glucosidasa y $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa**

En la Tabla 3.6 se muestran los resultados de la valoración de las actividades enzimáticas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa en todos los suelos.

En los suelos de **Aznalcóllar**, al contrario de lo que ocurría en las actividades relacionadas con el ciclo de P, los valores de actividad  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa fueron menores en los suelos quemados que en el control, con una única excepción, la actividad  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de la muestra Q3.

Respecto a las muestras de **Cazorla**, el análisis de los resultados obtenidos permite destacar los siguientes aspectos:

a) Los niveles de actividad enzimática resultaron más elevados en la zona 2 (margen izquierdo de la carretera) que en la zona 1 (margen derecho de la carretera), lo que está en concordancia con los resultados obtenidos para otros parámetros químicos y biológicos, tales como contenido en carbono, recuento de viables y recuento directo al microscopio.

b) Los niveles de actividad  $\beta$ -glucosidasa fueron siempre más elevados que los de actividad  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, lo cual parece lógico, ya que esta última actividad enzimática es principalmente atribuible a los hongos, y, como se ha comentado, el recuento de hongos resultó menor que el de bacterias, en todas las muestras.

c) No se puede concluir que en los suelos quemados la actividad enzimática sea mayor que en sus respectivos controles, ya que el patrón de comportamiento de estas enzimas depende del año y de la zona de muestreo (Q1 y Q2).



**Tabla 3.6.** Valoración de las actividades enzimáticas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa en los suelos control y quemados de Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife

Muestra	$\beta$ -glucosidasa (U/g)			$\beta$ -N-acetilglucosaminidasa (U/g)		
	Aznalcóllar					
<b>C</b>	1,14 $\pm$ 0,03			0,65 $\pm$ 0,01		
<b>QQ1</b>	1,03 $\pm$ 0,03			0,47 $\pm$ 0,02		
<b>QQ2</b>	0,73 $\pm$ 0,01			0,56 $\pm$ 0,01		
<b>Q3</b>	0,73 $\pm$ 0,01			1,01 $\pm$ 0,034		
Cazorla						
	2005	2007	2008	2005	2007	2008
<b>C1</b>	0,56 $\pm$ 0,01	3,99 $\pm$ 0,09	2,82 $\pm$ 0,11	0,09 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01
<b>Q1</b>	1,70 $\pm$ 0,07	1,13 $\pm$ 0,11	1,51 $\pm$ 0,09	0,34 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01
<b>C2</b>	2,20 $\pm$ 0,07	1,63 $\pm$ 0,10	1,66 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,01
<b>Q2</b>	1,40 $\pm$ 0,05	1,78 $\pm$ 0,10	1,80 $\pm$ 0,09	0,59 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01
Tenerife						
	Antes llluvias	Después llluvias	Antes llluvias	Después llluvias		
<b>C1</b>	1,12 $\pm$ 0,06	0,57 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,02		
<b>Q1</b>	0,44 $\pm$ 0,03	1,52 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,08	0,53 $\pm$ 0,02		
<b>C2</b>	0,12 $\pm$ 0,01	*n.d.	*n.d.	*n.d.		
<b>Q2</b>	0,21 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,02		
<b>C3</b>	0,13 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01		
<b>Q3</b>	0,24 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01		
<b>C4</b>	1,32 $\pm$ 0,01	1,08 $\pm$ 0,03	1,11 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,04		
<b>Q4</b>	0,79 $\pm$ 0,01	1,13 $\pm$ 0,06	0,69 $\pm$ 0,06	1,78 $\pm$ 0,10		

\*n.d.: no determinado

Los resultados de la valoración de las actividades enzimáticas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa en los suelos de **Tenerife** (Tabla 3.6) se podrían resumir del siguiente modo:

a) En el primer muestreo realizado (en el primer mes después del incendio) no se observó un patrón definido para ninguna de las dos actividades enzimáticas, es decir, los niveles de actividad para ambas enzimas resultaron característicos de

la zona muestreada, independientemente de si se trata de suelos control o quemados.

b) Por el contrario, en el segundo muestreo, la actividad de ambas enzimas resultó más elevada en los suelos afectados por el incendio que en los suelos control. Este resultado se puede relacionar con el mayor contenido en carbono detectado en estos suelos.

c) Si comparamos los datos de la actividad  $\beta$ -glucosidasa detectada en los suelos del primer muestreo con los del segundo, se puede observar que los niveles de actividad de esta enzima fueron más elevados en los suelos quemados del segundo muestreo que en los del primero. Por el contrario, en los suelos control, los niveles de actividad  $\beta$ -glucosidasa fueron menores en el segundo muestreo que en el primero.

En estudios enzimáticos realizados por Gutknecht y colaboradores (2010) se describe una disminución de las actividades enzimáticas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, además de la actividad fosfatasa ácida, de entre un 50-75% en suelos quemados con respecto a la detectada en los suelos control.

Por otra parte, Boerner y colaboradores (2000) también describieron una disminución de la actividad fosfatasa ácida, pero no observaron diferencias en la actividad de  $\beta$ -glucosidasa de los suelos quemados con respecto a los controles. Sin embargo, en un estudio posterior realizado por los mismos autores (Boerner y col., 2005) la actividad fosfatasa ácida en los suelos quemados fue superior a la de los suelos control. Los autores explican los distintos resultados obtenidos sobre la base de diferencias en la intensidad y severidad de los incendios (el primero fue de mayor intensidad). Eivasi y Bryan (1996) estudiaron la actividad de varias enzimas en suelos que habían sufrido incendios controlados durante 45 años, y observaron una disminución en las actividades fosfatasa y  $\beta$ -glucosidasa, así como en la biomasa microbiana, pero no en el contenido de materia orgánica. Según los mismos autores, esta disminución se debe a cambios en la calidad de la materia orgánica. En contraste, Aiwa y colaboradores (1999) describieron una disminución en la biomasa microbiana y en la actividad  $\beta$ -glucosidasa de suelos incendiados y un aumento en la actividad de la fosfatasa ácida.

### **b.3) Celulasa e Invertasa**

Los resultados de la valoración de estas actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo del carbono en los distintos suelos se muestran en la Tabla 3.7.

En **Aznalcóllar**, los niveles de estas actividades enzimáticas en la muestra Q3 resultaron más elevados que en el control (C). Por el contrario, en los suelos que sufrieron dos incendios (QQ1 y QQ2) los niveles de actividad invertasa y celulasa fueron menores que los detectados en la muestra control.

**Tabla 3.7.** Actividades celulasa e invertasa en los suelos control y quemados de Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife

Muestra	Celulasa (U/g)			Invertasa (U/g)		
	<b>Aznalcóllar</b>					
<b>C</b>	0,15 ±0,01			24,06 ±0,90		
<b>QQ1</b>	0,10 ±0,01			17,86 ±0,50		
<b>QQ2</b>	0,10 ±0,01			11,80 ±0,30		
<b>Q3</b>	0,23 ±0,01			26,12 ±0,99		
<b>Cazorla</b>						
	<b>2005</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2005</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>
<b>C1</b>	0,09 ±0,01	0,23 ±0,01	0,28 ±0,01	13,31 ±0,50	17,31 ±0,42	12,97 ±0,51
<b>Q1</b>	0,08 ±0,01	0,12 ±0,01	0,39 ±0,01	26,37 ±0,90	4,64 ±0,10	7,16 ±0,35
<b>C2</b>	0,13 ±0,01	0,21 ±0,01	0,17 ±0,01	17,60 ±0,06	6,85 ±0,20	12,55 ±0,62
<b>Q2</b>	0,11 ±0,01	0,31 ±0,02	0,33 ±0,01	21,85 ±0,70	4,80 ±0,10	5,71 ±0,28
<b>Tenerife</b>						
	<b>Antes llluvias</b>	<b>Después llluvias</b>	<b>Antes llluvias</b>	<b>Después llluvias</b>		
<b>C1</b>	0,10 ±0,01	0,17 ±0,01	29,75 ±2,56	16,80 ±0,50		
<b>Q1</b>	0,35 ±0,02	0,83 ±0,02	20,20 ±1,84	25,50 ±0,82		
<b>C2</b>	0,10 ±0,01	n.d.*	2,85 ±0,73	7,53 ±0,73		
<b>Q2</b>	0,17 ±0,01	0,04 ±0,01	23,91 ±2,76	11,11 ±0,46		
<b>C3</b>	0,06 ±0,01	0,11 ±0,01	2,47 ±0,18	1,193 ±0,40		
<b>Q3</b>	0,25 ±0,01	0,01 ±0,01	16,07 ±1,84	20,38 ±0,92		
<b>C4</b>	0,42 ±0,01	0,31 ±0,03	14,87 ±1,87	21,39 ±01,47		
<b>Q4</b>	0,34 ±0,01	0,18 ±0,01	17,81 ±0,64	25,71 ±0,92		

\*n.d.: No determinado

En los suelos de **Cazorla**, se observó un incremento de actividad celulasa a lo largo del tiempo, tanto en los suelos control como en los afectados por el fuego. En este sentido, si bien en el primer muestreo, tanto en la zona 1 como en la 2, los valores de actividad de los suelos control y quemados fueron similares, en el último año de muestreo los suelos quemados presentaron niveles más elevados de esta actividad que sus respectivos controles, lo que podría ser indicativo de una recuperación paulatina de las poblaciones fúngicas. De hecho, los resultados

obtenidos en el recuento de mohos y levaduras, mostraron un incremento en el número de viables a lo largo del tiempo.

En relación a la actividad invertasa, tanto en la zona 1 (margen derecho) como en la 2 (margen izquierdo) se observó una mayor actividad en los suelos quemados que en los suelos control durante el primer muestreo, mientras que en los dos muestreos siguientes la actividad de los suelos quemados fue menor que la de los suelos control.

En cuanto a las actividades celulasa e invertasa de los suelos de la zona de **Tenerife** (Tabla 3.7), se observó que en general, los niveles detectados fueron más elevados en los suelos quemados que en sus respectivos controles.

#### b.4) Ureasa

En la Tabla 3.8 se muestran los resultados de la valoración de la actividad ureasa de los suelos control y quemados de Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife.

En **Aznalcóllar**, es de destacar la elevada actividad detectada en la muestra QQ1, con niveles que duplican la actividad del suelo control. Sin embargo, en los suelos quemados QQ2 y Q3, los valores de dicha actividad fueron muy similares en ambos tipos de suelos.

**Tabla 3.8.** Actividad ureasa en los suelos control y quemados de Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife

Muestra	Ureasa (U/g)		
	Aznalcóllar		
C	0,93 ±0,03		
QQ1	1,92 ±0,07		
QQ2	0,77 ±0,04		
Q3	0,92 ±0,05		
	Cazorla		
	2005	2007	2008
C1	0,58 ±0,02	6,78 ±0,24	8,03 ±0,40
Q1	2,40 ±0,10	1,04 ±0,05	2,83 ±0,10
C2	2,70 ±0,10	2,74 ±0,13	3,07 ±0,15
Q2	2,30 ±0,10	2,03 ±0,13	3,18 ±0,15

**Tabla 3.8. (Continuación)** Actividad ureasa en los suelos control y quemados de Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife

Muestra	Ureasa (U/g)	
	Tenerife	
	Antes lluvias	Después lluvias
<b>C1</b>	0,58 ±0,01	1,20 ±0,07
<b>Q1</b>	0,55 ±0,03	1,60 ±0,20
<b>C2</b>	0,43 ±0,04	2,70 ±0,10
<b>Q2</b>	0,41 ±0,01	0,85 ±0,04
<b>C3</b>	0,30 ±0,03	0,18 ±0,02
<b>Q3</b>	0,49 ±0,01	0,40 ±0,03
<b>C4</b>	1,56 ±0,08	1,50 ±0,10
<b>Q4</b>	1,40 ±0,08	1,38 ±0,08

En las muestras de **Cazorla** se observa que, en general, los suelos control presentaron niveles más elevados de actividad que los suelos afectados por el incendio, si bien, en el primer muestreo, el suelo Q1, y en el último muestreo, el suelo Q2, presentaron niveles más elevados que sus respectivos controles.

En los suelos de **Tenerife**, durante el primer muestreo, los niveles de actividad ureasa fueron similares o ligeramente inferiores en los suelos quemados que en los suelos control. Asimismo, se puede deducir que en el muestreo realizado después de las primeras lluvias no se observa un patrón definido, ya que en las zonas 1 (Cruz del Cura) y 3 (Los Areneros) la actividad ureasa fue mayor en los suelos afectados por el incendio, mientras que en las 2 (Los Castillos) y 4 (La Guancha) fue más elevado en los suelos control.

En resumen, de los resultados obtenidos se podría deducir que, mayoritariamente, los niveles de actividad ureasa son menores en los suelos quemados que en los suelos control. Este mismo efecto del fuego sobre la actividad ureasa ha sido descrito por Hernández y col. (1997), Boerner y Brinkman (2003) y por Ekinci (2006) en suelos de bosque mediterráneo.

## 3.2.

### **Puesta a punto de las técnicas moleculares empleadas en los estudios de biodiversidad microbiana**

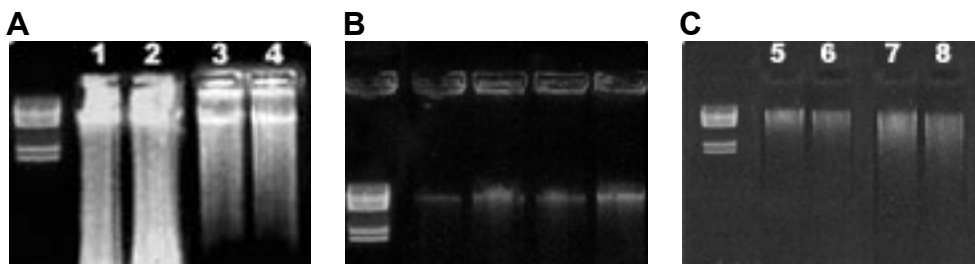
Para el estudio de la diversidad microbiana de las muestras de suelo seleccionadas se utilizaron dos estrategias distintas: 1) análisis del patrón de bandas de DNA obtenido tras la aplicación de la técnica DGGE; y 2) clonación parcial del gen codificante para ARNr 16S. Nuestro objetivo era obtener resultados complementarios que nos proporcionaran información representativa de la biodiversidad presente en las muestras de suelo.

Es importante señalar que ambos abordajes necesitaron la puesta a punto de las técnicas moleculares empleadas en los estudios de biodiversidad, tales como: 1) método de extracción del ADN cromosómico; 2) condiciones de la PCR y 3) gradiente de urea:formamida para la DGGE de cada grupo de muestras, etapas clave para la realización posterior de la DGGE y del clonaje. El proceso de optimización se llevó a cabo con las muestras correspondientes a los suelos de Aznalcóllar.

#### **3.2.1. Optimización del método de extracción del ADN cromosómico de las muestras de suelo**

Tal y como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos de este trabajo, se utilizaron distintas técnicas para extraer el ADN de las muestras de suelo. Las fotografías correspondientes al ADN obtenido utilizando los diferentes métodos (kits comerciales y protocolos de extracción descritos en la bibliografía) se muestran en la Figura 3.5.

Cuando se utilizó el método de extracción descrito por Fortin y col. (2004) se obtuvo un ADN muy degradado, tal y como se pone de manifiesto en la Figura 3.5 (A), en la que se puede observar la aparición de un “smear” (mancha) a lo largo de todo el gel de agarosa. Siguiendo el método descrito por Girvan y col. (2003) tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios. A pesar de utilizar diferentes tipos de precipitación (etanol, isopropanol, PEG-6000 y PEG-8000), se consiguió extraer muy poca cantidad de ADN, tal y como puede observarse en la fotografía de la Figura 3.5 (B). Resultados similares se obtuvieron con los kits comerciales de extracción de ADN “Ultra clean” (MO BIO) y “Fast DNA spin kit” (Q-BIOgene), es decir, poca cantidad de ADN y muy degradado (Figura 3.5 C).



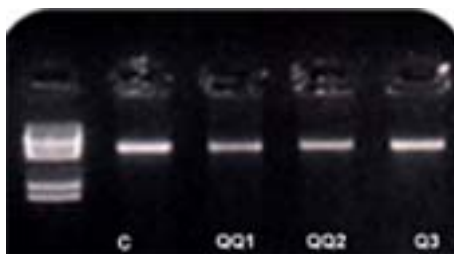
**Figura 3.5.** A: ADN extraído con el protocolo de Fortin y col. (2004) (1 y 2). ADN extraído con el protocolo de Fortin y col. (2004) y tratado con el kit de limpieza “GeneClean Spin Kit” (3 y 4). B: ADN extraído directamente de las muestras de suelo con el protocolo de Girvan y col. (2003) con diferentes precipitaciones. C: ADN extraído con el kit “Ultraclean” de MO BIO (5 y 6). ADN extraído con el kit Fast DNA spin kit de Q·BIOgene (7 y 8). Marcador de peso molecular II de Roche (0,12-23,1 kpb)

Un inconveniente añadido a la pequeña cantidad de ADN obtenido y a la degradación observada en las preparaciones de ADN, fue la contaminación del ADN con sustancias del suelo, hecho que se ponía de manifiesto por la coloración amarillenta que tenían los extractos de ADN obtenidos, especialmente cuando se utilizaban los métodos descritos por Fortin y colaboradores y Girvan y colaboradores. Se ha descrito que uno de los problemas que implica la extracción del ADN de las muestras de suelo es que, junto al ADN, se extraen diversos contaminantes, entre los que destacan las sustancias húmicas. Los ácidos húmicos son mezclas de polifenoles que se producen durante el proceso de descomposición de la materia orgánica y son muy abundantes en el suelo. Estas impurezas suelen adherirse al ADN cuando se realiza la extracción del mismo y afectan a los análisis subsiguientes que se quieran realizar a partir de los ácidos nucleicos extraídos. Concretamente, se ha descrito que los ácidos húmicos son inhibidores de la reacción de PCR (Cho y col., 1996), por lo que se hace necesario ajustar los protocolos de extracción y purificación de ADN al tipo de suelo que se esté estudiando (Frostegard y col., 1999). De hecho, es importante mencionar que con ninguna de las preparaciones de ADN obtenidas por los métodos descritos hasta el momento se consiguió la amplificación del fragmento V3-V5 de ARNr 16S, a pesar de haber llevado a cabo la PCR en distintas condiciones.

Para intentar solventar el problema de la contaminación con ácidos húmicos, los extractos de ADN obtenidos se purificaron utilizando distintos kits comerciales: Agarose gel DNA Extraction Kit (Roche) y GeneClean Spin Kit” (Q·BIOgene), no obteniendo resultados satisfactorios, puesto que tampoco se consiguieron las amplificaciones deseadas.

Sin embargo, hemos de destacar que cuando se utilizó el Kit comercial “Power Soil DNA Isolation kit” (MO BIO), se obtuvieron preparaciones de ADN de buena calidad, tal y como puede observarse en la Figura 3.6, consiguiéndose, además, la amplificación del fragmento V3-V5 de ADNr 16S. Concluimos, por

tanto, que la utilización de este kit es el método más idóneo para la extracción del ADN cromosómico de las muestras de suelo y, por tanto, el que utilizamos para la extracción del ADN de todas las muestras analizadas en este trabajo.



**Figura 3.6.** Fotografía correspondiente a las preparaciones de ADN obtenidas a partir de las muestras de suelo tras utilizar el kit comercial “Power Soil DNA Isolation KIT” (MO BIO)

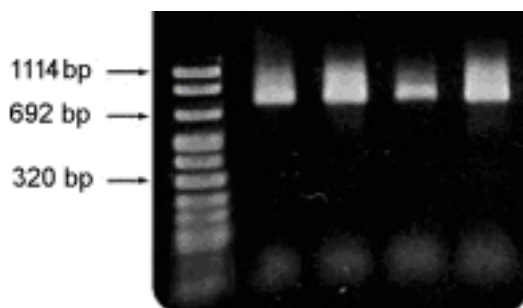
### 3.2.2. Optimización de las reacciones de PCR para el posterior análisis de los fragmentos amplificados por DGGE

#### A) Amplificación del fragmento V3-V5 del gen codificante para el ARNr 16S del dominio Bacteria

En primer lugar, y con el fin de analizar la diversidad microbiana de las muestras de suelo mediante la técnica de DGGE, nos propusimos la amplificación del fragmento V3-V5 del ADNr 16S, utilizando los cebadores 341F+GC y 907R, correspondientes al dominio *Bacteria*. Se probaron varios programas de amplificación, en los que se variaron la cantidad de ciclos y la temperatura de *annealing*, obteniéndose resultados positivos con el programa descrito en la Figura 2.2 de la sección de Materiales y Métodos.

En paralelo a la optimización del programa de amplificación, se añadieron distintos reactivos a la reacción de PCR como el DMSO, albúmina bovina y betaína, descrito en la bibliografía como inhibidor de los ácidos húmicos (Frackman y col., 1998), pero al utilizar estos compuestos no se obtuvieron resultados positivos en las reacciones de PCR. Además, se utilizaron distintas polimerasas, algunas de las cuales como la “Master Taq” de la casa Eppendorf estaba recomendada para la realización de la PCR con muestras de ADN que pudieran estar contaminadas con ácidos húmicos; sin embargo, se eligió la enzima FidelityTaq de USB por ser la enzima con la que se producían menos amplificaciones inespecíficas. En la Figura 3.7 se muestra la fotografía correspondiente a los productos de amplificación del fragmento V3-V5 de ADNr 16S de los microorganismos pertenecientes al dominio *Bacteria*, de los suelos de Aznacóllar.



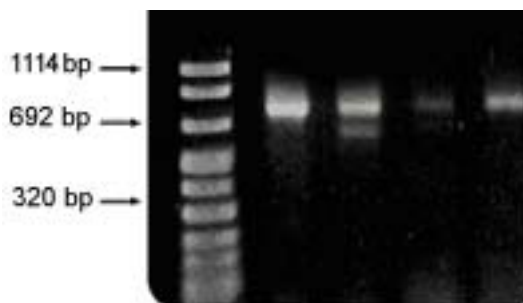


**Figura 3.7.** Fotografía de los productos de amplificación del fragmento V3-V5 de ADNr 16S de microorganismos del dominio *Bacteria*. Marcador de peso molecular VIII de Roche (19-1114 pb)

*B) Amplificación de un fragmento del gen codificante para el ARNr 16S del dominio Archaea*

Del mismo modo que en el caso anterior, nos propusimos analizar la biodiversidad de microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea* utilizando la técnica de DGGE. Los cebadores (ARC 340F+GC y 915R) y las condiciones de la PCR se encuentran descritos en la secciones 2.4.9.1 y 2.4.9.3, respectivamente, de la sección de Materiales y Métodos.

En el caso de las arqueas, la obtención de productos de amplificación fue más laboriosa, y necesitó de la realización de reamplificaciones en la mayoría de las muestras de suelo. En la Figura 3.8 se muestra la fotografía de los productos de amplificación de ADNr 16S de los microorganismos del dominio *Archaea*, presentes en los distintos suelos de Aznalcóllar.



**Figura 3.8.** Productos de amplificación del ADNr 16S de los microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea*. Marcador de peso molecular VIII de Roche (19-1114 pb)

### 3.2.3. Análisis mediante DGGE de los productos de PCR correspondientes a fragmentos de ADNr 16S de *Bacteria* y *Archaea*

La electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) es una de las técnicas más idóneas para establecer “huellas moleculares” (fingerprinting) de las comunidades microbianas de diversos hábitats. Además, esta técnica permite la identificación de microorganismos específicos, ya que los productos de amplificación pueden ser recuperados y secuenciados (Yu y Morrison, 2004).

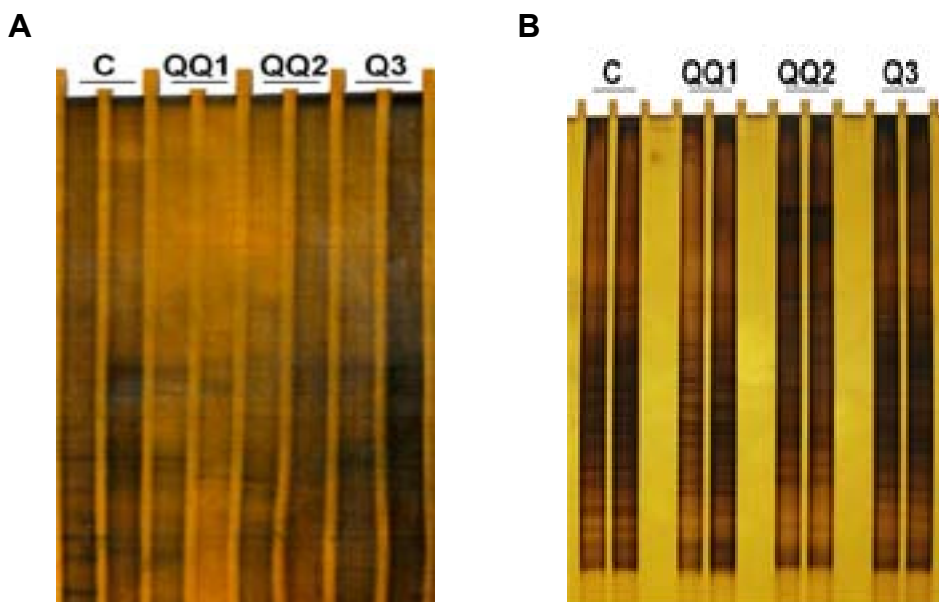
En nuestro estudio hemos utilizado esta técnica para analizar la biodiversidad de las comunidades microbianas de los distintos suelos, mediante: 1) el análisis de las diferencias y/o similitudes de las “huellas moleculares” obtenidas mediante la utilización de esta técnica, y 2) secuenciación de productos de amplificación extraídos de los geles de gradiente desnaturante.

Como se ha comentado en el apartado anterior, los fragmentos de ADNr 16S elegidos para su amplificación y posterior análisis por DGGE fueron: el fragmento correspondiente a la región V3-V5, para el dominio *Bacteria* y el fragmento amplificado utilizando los cebadores 340F y 915R, para el dominio *Archaea*. Ambos fragmentos corresponden a una región amplificada de alrededor de 600 pares de bases. Esta elección se hizo teniendo en cuenta la bibliografía existente al respecto (Nakatsu y col., 2000; Yu y Morrison, 2004; Baker y col., 2003). Aunque no existen muchas referencias acerca de la influencia de los cebadores y del tamaño de la región amplificada en los resultados del análisis de biodiversidad, se ha descrito que cuanto más pequeño sea el tamaño del fragmento amplificado con el que se realiza el DGGE, menor número de bandas aparecerán en los geles, ya que hay una menor variabilidad dentro del fragmento y, además se dificulta la posterior secuenciación de los productos de amplificación extraídos de los geles (Díez y col., 2001).

### 3.2.4. Optimización del gradiente desnaturante de las electroforesis

Elegido el fragmento a amplificar, el siguiente paso fue encontrar las condiciones óptimas de desarrollo de la técnica DGGE. En primer lugar y con el fin de conocer cuál era el gradiente óptimo de urea-formamida que permitía la mejor separación de la mezcla de fragmentos amplificados por PCR, se probaron distintas concentraciones de esta mezcla. En la Figura 3.9 se muestran las fotografías correspondientes a los patrones de bandas de ADN (teñidas con plata) obtenidos por DGGE del fragmento amplificado de ADNr 16S, utilizando un gradiente desnaturante del 20-70 % (A) y del 50-70% (B). Como se puede observar, cuando se utilizó el gradiente del 20 al 70 %, los primeros fragmentos de DNA aparecieron a partir de aproximadamente el 40 % de desnaturación, por lo que la mayor parte de los fragmentos se desarrollaron en la mitad inferior del gel, quedando la parte superior vacía. Por ello, se probaron los distintos gradientes,

obteniéndose mejor resolución de las bandas de ADN amplificadas cuando se utilizó el gradiente del 50-70% (Figura 3.9 B).



**Figura 3.9.** Fotografías correspondientes a los patrones de bandas de ADN obtenidos por DGGE de las muestras de suelo de Aznalcóllar. A: gradiente de urea-formamida del 20-70%. B: gradiente de urea-formamida del 50-70%. Tinción con plata

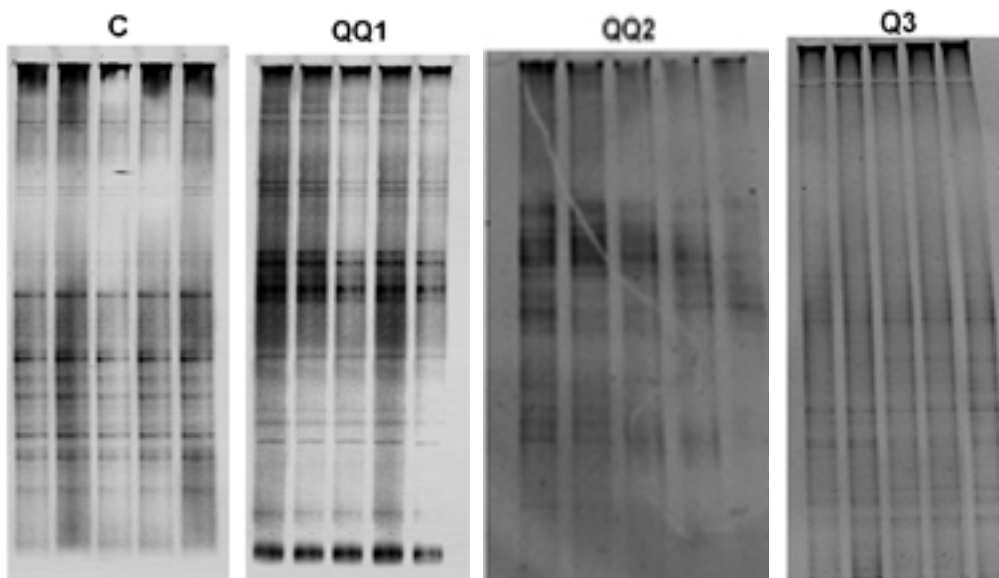
### 3.2.5. Reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante DGGE

Por último, nos propusimos comprobar si el patrón de bandas obtenido en cada muestra de suelo mediante DGGE se mantenía constante, independientemente de la porción de suelo utilizada para la extracción del ADN.

Para ello, de cada una de las muestras de suelo de Aznalcóllar se realizaron 5 extracciones de ADN con el kit comercial MO BIO “Power Soil DNA Isolation kit”. A partir de cada una de estas extracciones se realizó una amplificación del ADN utilizando los cebadores 341F+GC y 907R correspondientes al dominio *Bacteria* y posteriormente se llevó a cabo la DGGE.

En este caso, los gels de la DGGE se tiñeron con bromuro de etidio en lugar de con plata. Cabe señalar que la tinción con bromuro de etidio es la más utilizada en la bibliografía consultada y se realiza en menos tiempo que la tinción con plata, por lo que a la hora de analizar gran número de muestras también supone una ventaja. Se decidió, por tanto, utilizar la tinción con bromuro de etidio para el resto de las muestras.

En la Figura 3.10 se muestran las fotografías (en negativo) de las DGGE teñidas con bromuro de etidio de las 5 réplicas correspondientes a las distintas zonas de Aznalcóllar: muestra control (C) y muestras de suelos quemados (QQ1, QQ2 y Q3). Tal y como puede observarse en la figura, el patrón correspondiente a cada una de las cinco réplicas de cada muestra es el mismo. De este resultado podemos concluir que siempre que se utilice el mismo método de extracción de ADN y los mismos cebadores, el patrón de bandas obtenido en la DGGE será similar.



**Figura 3.10.** Fotografías correspondientes a los patrones de bandas de ADN obtenidas por DGGE a partir de 5 extracciones diferentes de ADN de cada una de las muestras de Aznalcóllar

### 3.3.

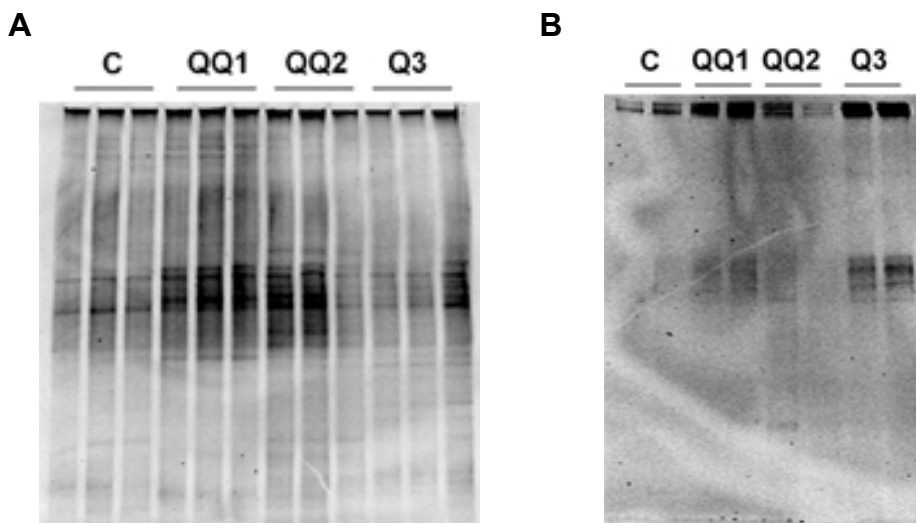
## Análisis genético de la biodiversidad microbiana de los suelos quemados en comparación con los suelos control

### 3.3.1. Análisis mediante DGGE de los productos de PCR correspondientes a fragmentos de ADNr 16S de *Bacteria* y *Archaea*

Una vez optimizadas las condiciones de desarrollo de la DGGE, se procedió al análisis mediante esta técnica de los productos de amplificación de los fragmentos que codifican para el ARNr 16 S de los dominios *Bacteria* y *Archaea*, tanto en los suelos control como en los afectados por incendios.

#### a) Aznalcóllar

En la Figura 3.11 se muestran las fotografías de los patrones de bandas de ADN obtenidos por DGGE de los suelos control y quemados de Aznalcóllar para los dominios *Bacteria* (A) y *Archaea* (B). Para estos suelos, el gradiente desnaturizante de urea-formamida idóneo para la separación de los distintos fragmentos fue del 55 al 60 % para el dominio *Bacteria* y del 50 al 65 % para el dominio *Archaea*. Tras el análisis pormenorizado del gel se detectaron 21 bandas correspondientes al dominio *Bacteria* y 7 bandas del dominio *Archaea*. En ambos dominios, la muestra del suelo control presentó el menor número de bandas (11 para bacterias y 3 para arqueas) mientras que la muestra Q3 presentó el mayor número de bandas (15 para bacterias y 7 para arqueas).



**Figura 3.11.** Fotografías (en negativo) correspondientes a los patrones de bandas de ADN obtenidos por DGGE de los suelos control y quemados de Aznalcóllar. Dominios A: *Bacteria* y B: *Archaea*

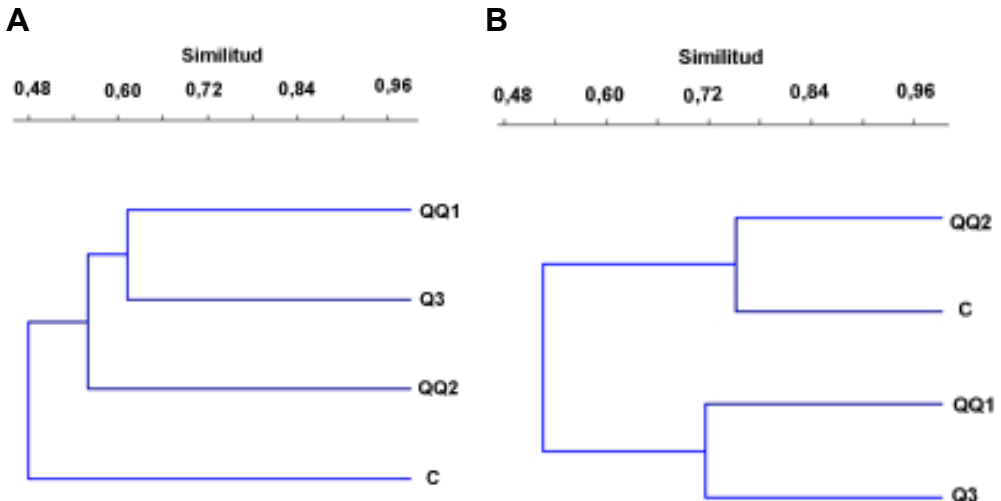
A partir de los patrones de bandas de ADN obtenidos mediante DGGE se calculó el índice de Shannon, índice que, como ya se ha comentado en la Introducción, es un indicador de la biodiversidad de una muestra. Para el cálculo de este índice se han tenido en cuenta el número de bandas y la intensidad de las mismas; de esta manera a las bandas que presentan mayor intensidad se les asigna el valor “2”, a las bandas de menor intensidad el valor “1” y la ausencia de bandas el “0”. Respecto al dominio *Bacteria* (Tabla 3.9) el menor índice de diversidad correspondió a la muestra control (2,40) mientras que el valor más elevado de dicho índice correspondió a la muestra Q3 (2,71). El mismo resultado se obtuvo para el dominio *Archaea* (Tabla 3.9), siendo la muestra control la que presentó el valor más bajo (1,04) y la Q3 el valor más alto del índice de diversidad (1,89).

**Tabla 3.9.** Índices de Shannon calculados a partir de los patrones de bandas de ADN obtenidos de la DGGE de los suelos de Aznalcóllar

Zona de muestreo	Índice de Shannon	
	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>
C	2,40	1,04
QQ1	2,59	1,56
QQ2	2,43	1,35
Q3	2,71	1,89

Para establecer las similitudes entre los patrones de bandas de ADN obtenidos mediante DGGE de los distintos suelos, se llevó a cabo un análisis jerárquico de grupos o conglomerados (“cluster analyses”). Dicho análisis se realizó utilizando el método UPGMA (“Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages”) y el índice de Jaccard como índice de similitud (índice comúnmente utilizado para datos cualitativos de presencia/ausencia).

En la Figura 3.12 se muestran los dendrogramas de las muestras de **Aznalcóllar** obtenidos a partir del análisis de conglomerados de los patrones de bandas de ADN obtenidos por DGGE correspondientes a los dominios *Bacteria* (A) y *Archaea* (B). En el caso del dominio *Bacteria*, los suelos se distribuyen en dos grupos o conglomerados, uno que corresponde al suelo control y el otro en el que se encuentran los tres suelos afectados por los incendios. Se observó que el suelo control tiene una similitud de 0,5 con respecto al grupo de los suelos quemados. Los suelos quemados que presentaron una mayor similitud (0,6) fueron el QQ1 y el Q3. Los resultados obtenidos parecen indicar que el fuego ha condicionado el patrón de bandas obtenido, ya que la similitud estimada entre los patrones de bandas de ADN del suelo control y los suelos quemados es baja.



**Figura 3.12.** Dendrogramas obtenidos a partir del análisis de conglomerados de los perfiles de bandas de ADN obtenidos mediante DGGE utilizando el índice de similitud de Jaccard. A: Dominio *Bacteria* y B: Dominio *Archaea*.

En el caso del dominio *Archaea*, las muestras se distribuyen en dos conglomerados, con una similitud de 0,5 entre ellos. Uno de los conglomerados, formado por el suelo control y el suelo quemado QQ2 (con una similitud entre ellos de 0,75) y el otro, en el que se encuentran los suelos quemados QQ1 y Q3 (con una similitud de 0,7).

### b) Cazorla

En la Figura 3.13 se muestran las fotografías de los patrones de bandas de ADN obtenidos mediante DGGE de las muestras de la zona de Cazorla, tomadas durante los tres muestreos realizados.

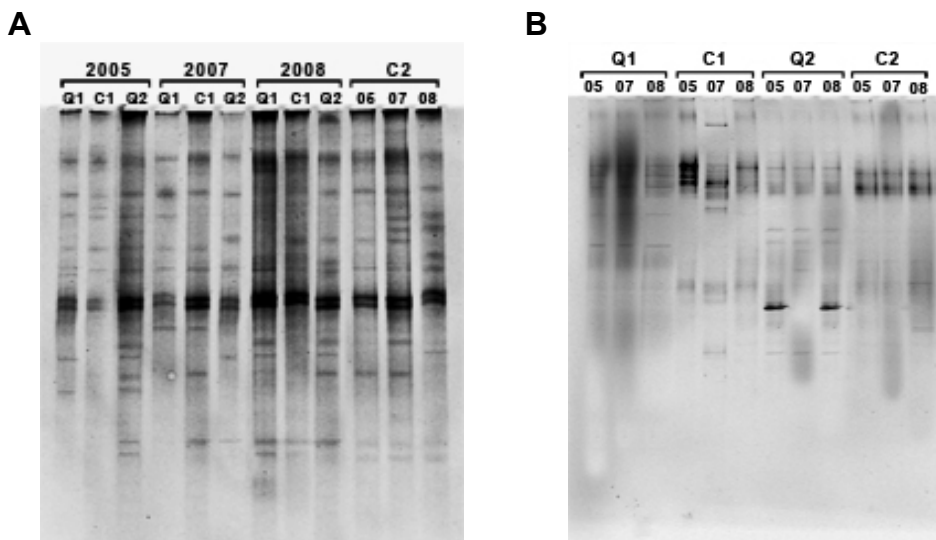
En estos suelos, el gradiente desnaturante urea-formamida idóneo para la separación de las bandas correspondientes al dominio *Bacteria* resultó ser del 55 al 60% y del 50 al 60% para el dominio *Archaea*.

En relación al **dominio *Bacteria***, los resultados obtenidos tras el análisis de los perfiles de bandas obtenidos tras la DGGE se pueden resumir en los siguientes:

- 1) Se detectaron un total de 21 bandas.
- 2) El menor número de bandas corresponde a la muestra C1 del muestreo realizado en 2005 (8 bandas).
- 3) La muestra C2 de los dos últimos muestreos presentó el mayor número de bandas (17 bandas).

- 4) La zona 2 (margen izquierdo de la carretera) presentó mayor número de bandas que la zona 1 (margen derecho de la carretera), tanto en los suelos quemados como en los controles.

Respecto del dominio *Archaea*, se observaron un total de 20 bandas en las distintas muestras de suelo analizadas. El número de bandas observado en cada una de las muestras analizadas fue similar (entre 8 y 9 bandas, como media). En la muestra C1 se observaron, dependiendo del año de muestreo, el menor número (7 en el año 2008) y el mayor número de bandas (11 en el año 2007).



**Figura 3.13.** Fotografías (en negativo) correspondientes a los patrones de bandas de ADN obtenidos por DGGE de los suelos control y quemados de Cazorla. Dominios *Bacteria* (A) y *Archaea* (B)

Al calcular los índices de Shannon a partir de los patrones de bandas de ADN obtenidos de las electroforesis (Tabla 3.10) se obtuvieron valores comprendidos entre 2,02 y 2,78 para *Bacteria*, mientras que en el caso de *Archaea*, este número fue ligeramente menor oscilando entre 1,95 y 2,37, lo que implica una mayor diversidad de bacterias que de arqueas.

En la zona 1 (margen derecho), en el primer muestreo (2005) se observó una mayor diversidad de *Bacteria* en el suelo quemado (Q1), mientras que en el segundo año de muestreo (2007), la mayor diversidad se observó en el suelo control (C1). En el último muestreo, el índice de Shannon resultó el mismo en ambas muestras. Respecto a las arqueas, la diversidad resultó mayor en los suelos quemados correspondientes a los muestreos de los años 2005 y 2008; en el 2007 fue la muestra control la que presentó mayor diversidad. En todos los muestreos realizados en la zona 2 (margen izquierdo), el suelo control ofreció mayor



diversidad de bacteriana que el suelo quemado, mientras que en el caso de las arqueas esta diversidad fue mayor en las muestras correspondientes a los años 2005 y 2008.

Si se compara la diversidad de *Bacteria* entre las dos zonas, ésta fue ligeramente superior en la zona 2 que en la 1, tanto en los suelos control como en los afectados por el fuego; en el caso de *Archaea* los resultados obtenidos no mostraron un patrón definido.

**Tabla 3.10.** Índices de Shannon calculados a partir de los patrones de bandas de ADN obtenidos de la DGGE

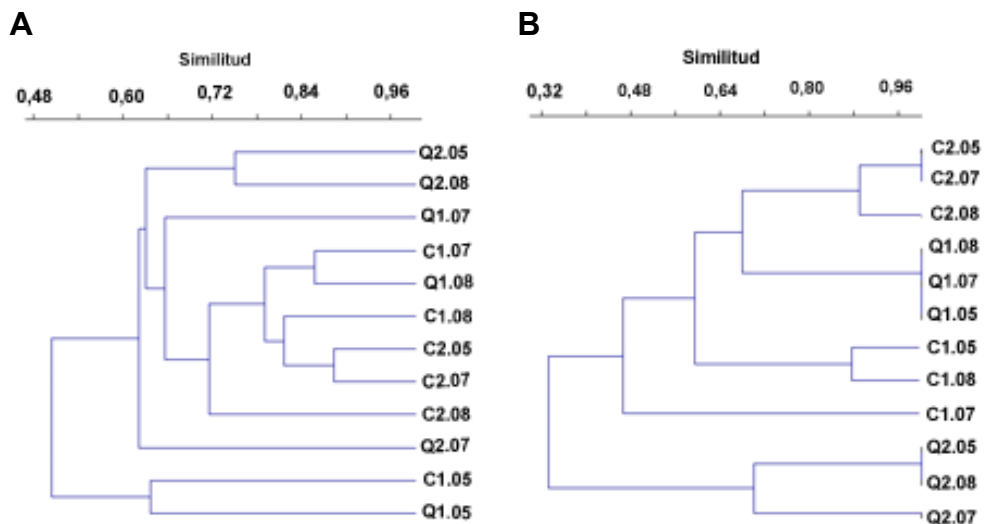
Zona de muestreo	Cazorla					
	<i>Bacteria</i>			<i>Archaea</i>		
	2005	2007	2008	2005	2007	2008
<b>C1</b>	2,02	2,51	2,51	2,02	2,37	1,95
<b>Q1</b>	2,25	2,25	2,51	2,20	2,20	2,20
<b>C2</b>	2,65	2,78	2,78	2,08	2,08	2,20
<b>Q2</b>	2,58	2,34	2,58	2,04	2,20	2,04

Los dendrogramas obtenidos a partir del análisis de conglomerados de los patrones de bandas de ADN obtenidos por DGGE correspondientes a los dominios *Bacteria* (A) y *Archaea* (B) se presentan en la Figura 3.14.

En el caso del dominio *Bacteria* no se observó ninguna agrupación de las muestras, bien sea por zona, año de muestreo o condición quemado/control. Las muestras que presentaron mayor similitud (85%) en su patrón de bandas fueron las correspondientes al suelo control de la zona 2 de los dos primeros muestreos. Por el contrario, las muestras que presentaron una menor similitud con el resto (50%) fueron las pertenecientes al primer muestreo de la zona 1 (tanto control como quemada).

En el caso del dominio *Archaea* (Figura 3.14 B) las muestras se agrupan claramente por la condición control/quemado y por zona. Las muestras que presentaron perfiles de bandas más parecidos fueron las correspondientes a suelos quemados de la zona 1, que mostraron un patrón de bandas prácticamente idéntico en los tres muestreos. Por el contrario, los perfiles de bandas de los suelos quemados de la zona 2 son los que presentaron menor similitud con los perfiles del resto de los suelos analizados, tanto si se trata de suelos control como quemados. En general, se observó una menor variación de los perfiles en cada muestra a lo

largo de los años de muestreo, en comparación a lo observado en el Dominio *Bacteria*.



**Figura 3.14.** Dendrogramas obtenidos a partir del análisis de conglomerados de los perfiles de bandas de ADN obtenidos mediante DGGE utilizando el índice de similitud de Jaccard. A: Dominio *Bacteria* y B: Dominio *Archaea*

En el caso de la zona de Cazorla, del análisis de los dendrogramas se puede deducir que, solo en el caso del dominio *Archaea*, los patrones de bandas de ADN de los suelos quemados son significativamente diferentes a los de los suelos control, por lo tanto, el fuego habría afectado más a las comunidades microbianas del dominio *Archaea* que a las del dominio *Bacteria*.

**C) Tenerife**

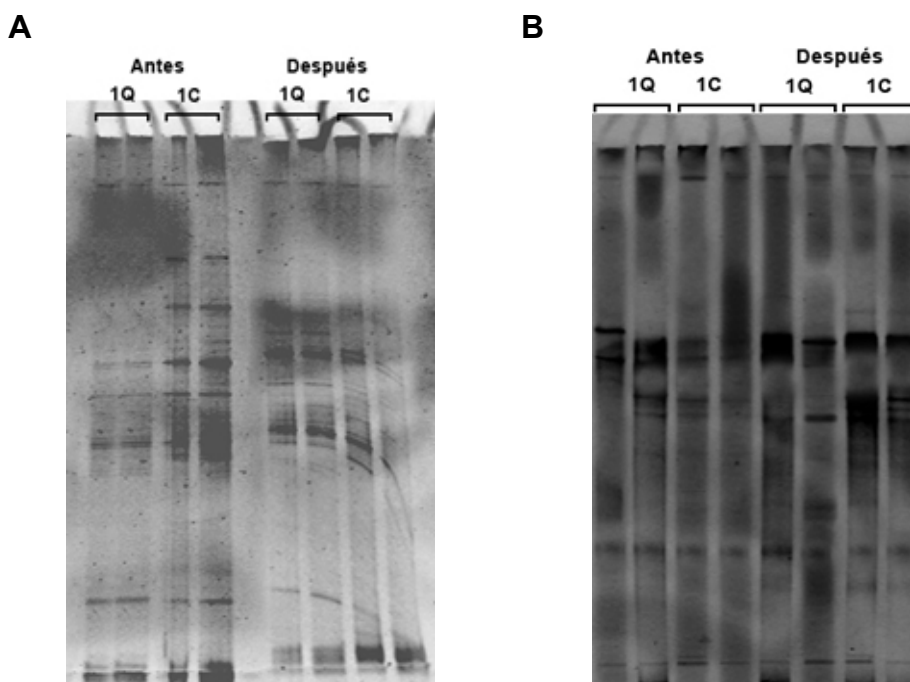
Para las muestras de Tenerife se realizó una DGGE por punto de muestreo y dominio. El gradiente utilizado fue el mismo que para las muestras de Cazorla: 55-60% para el dominio *Bacteria* y del 50-60% para el dominio *Archaea*.

En la Figura 3.15 se muestran fotografías de los patrones de bandas de ADN obtenidos mediante DGGE de los suelos control (C) y quemados (Q) del punto 1 (Cruz del Cura), antes y después de las lluvias.

En la DGGE correspondiente al dominio *Bacteria* (A) realizada en ambos suelos, antes y después de las lluvias, se contabilizaron un total de 21 bandas. En la muestra del suelo quemado se observaron 12 bandas en el primer muestreo (antes de las lluvias) y 15 en el segundo (después de las lluvias). En la muestra control, por el contrario, se observó un menor número de bandas en las muestras tomadas

después de las lluvias (15), respecto a las muestras recolectadas antes de las lluvias (17). Si se realiza una comparación de los patrones de bandas de ADN de las muestras de suelo control con las de suelos quemados se observa que, en el primer muestreo, el suelo quemado presentó un menor número de bandas que el control, mientras que en el segundo el número de bandas fue el mismo.

El análisis de los patrones de bandas de ADN correspondientes al dominio *Archaea* (B) de los suelos control y quemado proporcionó un total de 12 bandas. En la muestra del suelo quemado se detectaron 9 bandas en ambos muestreos, mientras que en el suelo control se observó un mayor número de bandas en el muestreo realizado después de las lluvias (9) que en el realizado antes de las lluvias (7).

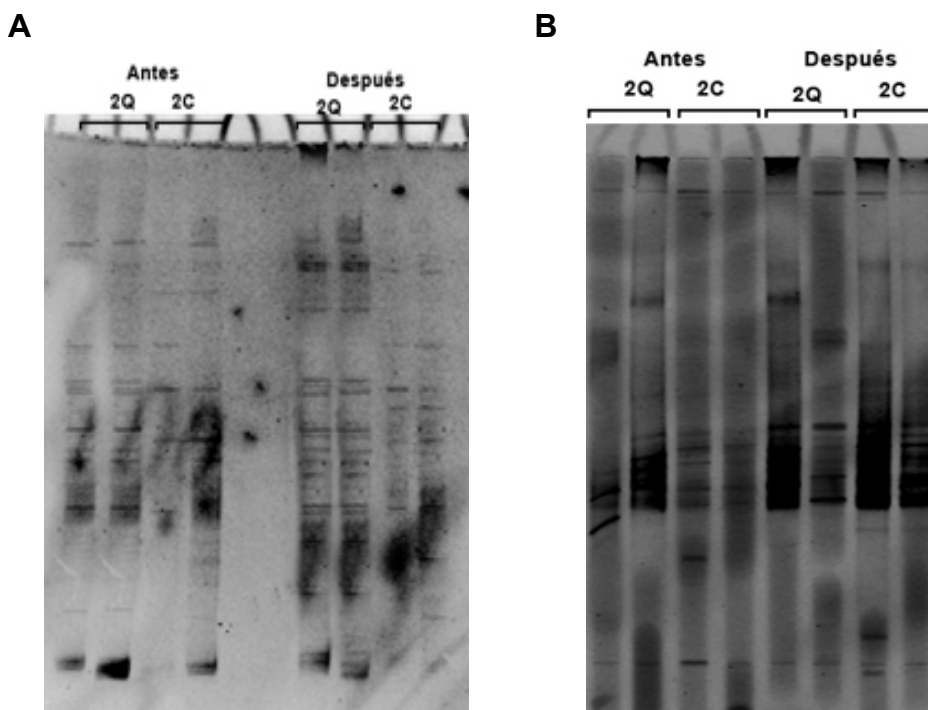


**Figura 3.15.** Fotografías (en negativo) de los patrones de bandas de ADN obtenidos por DGGE de los suelos de la zona Cruz del Cura (Tenerife) Dominio *Bacteria* (A) y *Archaea* (B); primer muestreo (antes de las lluvias); segundo muestreo (después de las lluvias)

En las DGGE correspondientes al dominio *Bacteria* de los suelos control y quemados de la zona 2 (Los Castillos) (Figura 3.16 A) se detectaron un total de 22 bandas. Al igual que en el punto 1, durante el segundo muestreo se observó un mayor número de bandas en las muestras del suelo quemado (18) respecto del primer muestreo (12). En el suelo control, el número de bandas fue el mismo en ambos muestreos (14 bandas). De este análisis se puede concluir que en el muestreo realizado antes de las lluvias, el mayor número de bandas correspondió al

suelo control, mientras que después de las lluvias, fueron las muestras del suelo quemado las que presentaron mayor número de bandas.

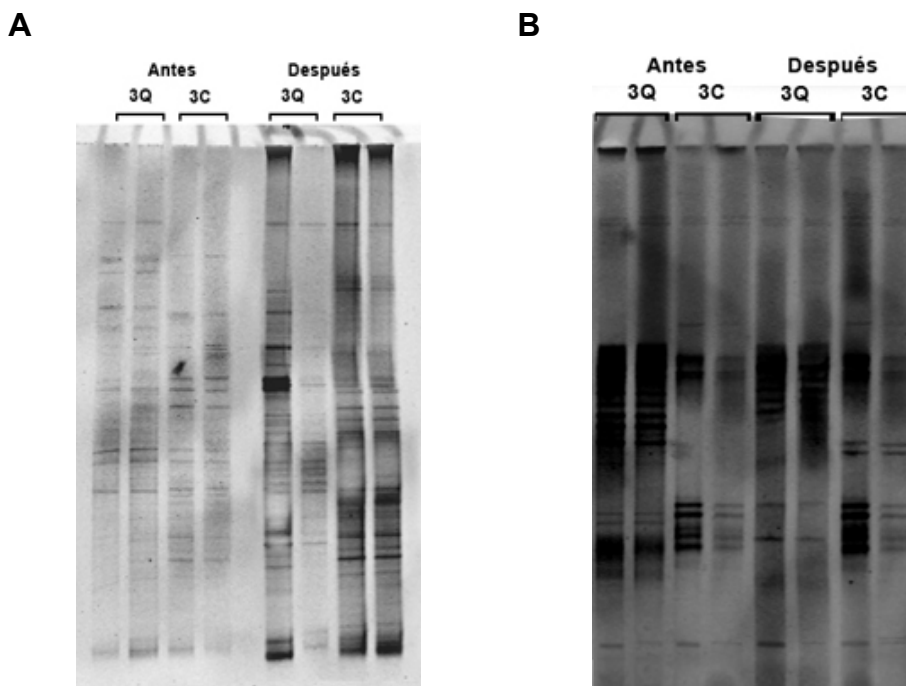
En la Figura 3.16 B se muestra una fotografía del patrón de bandas correspondiente al dominio *Archaea* de las muestras del suelo del punto 2 (Los Castillos). En este caso se observó un menor número de bandas (16) que en el caso de *Bacteria* (22), al comparar el perfil de bandas del primer muestreo con el muestreo realizado después de las lluvias, tanto en las muestras de suelos control como en las de los quemados. Así, en la muestra del suelo quemado correspondiente al segundo muestreo se detectaron 11 bandas, dos más que en el primer muestreo. En el suelo control, se detectaron 13 bandas en el muestreo realizado después de las lluvias y 9 en el realizado antes de las lluvias. En resumen, se puede deducir que en el muestreo realizado antes de las lluvias las dos muestras analizadas presentaron el mismo número de bandas, mientras que en el muestreo realizado después de las lluvias el suelo control presentó menor número de bandas que el suelo quemado.



**Figura 3.16.** Fotografías (en negativo) de los patrones de bandas de ADN obtenidos por DGGE de los suelos de la zona de Los Castillos (Tenerife). Dominios *Bacteria* (A) y *Archaea* (B); primer muestreo (antes de las lluvias); segundo muestreo (después de las lluvias)

En la DGGE correspondiente al dominio *Bacteria* de los suelos control y quemado del punto 3 (Los Areneros) de Tenerife (Figura 3.17 A), se contabilizaron 40 bandas. Al igual que en los dos puntos anteriores, el suelo quemado del punto 3 después de las lluvias presentó el mayor número de bandas (31) en comparación con el muestreo realizado antes de las lluvias (22), tal como se muestra en la Figura 3.17. En el suelo control se observó el mismo comportamiento (19 bandas antes de las lluvias y 29 bandas después). En resumen, tanto antes como después de las lluvias, el suelo quemado presentó un mayor número de bandas que el suelo control.

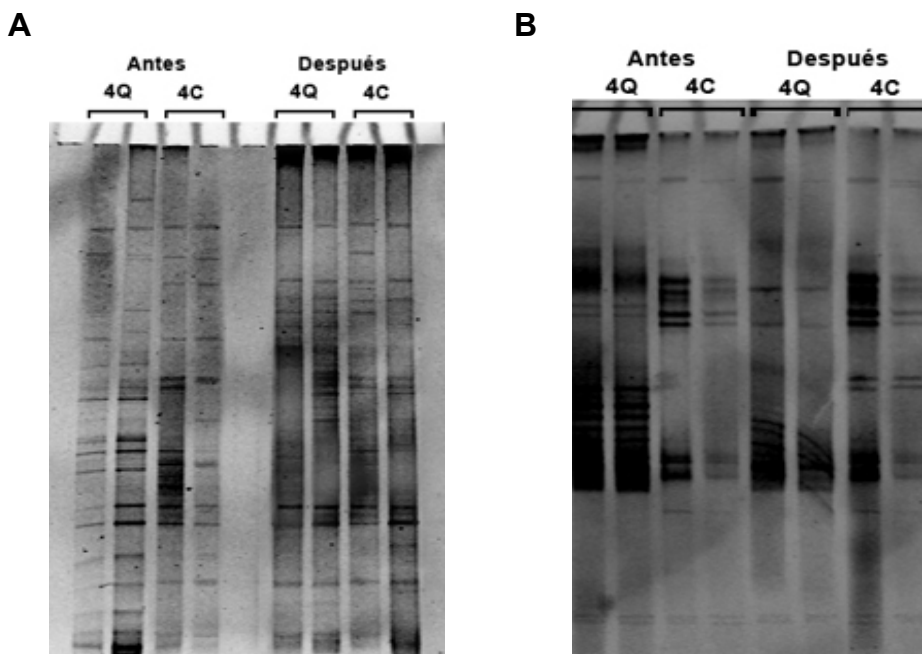
En la electroforesis correspondiente al dominio *Archaea* de los mismos suelos (Figura 3.17 B), se observaron un total de 18 bandas. A diferencia de los puntos anteriores, en la muestra del suelo quemado se observó un menor número de bandas en el muestreo después de las lluvias (13) que en el realizado antes de las lluvias (15). Sin embargo, en la muestra control se repite lo observado en los dos puntos anteriores, en donde la muestra tomada después de las lluvias presentó un mayor número de bandas (11), en comparación con la muestra tomada antes de las lluvias (9). En resumen, en este punto, se puede deducir que tanto en el primer como en el segundo muestreo el suelo quemado presentó mayor número de bandas que el suelo control.



**Figura 3.17.** Fotografías (en negativo) de los patrones de bandas de ADN obtenidos por DGGE de los suelos de la zona de Los Areneros (Tenerife) correspondientes a los Dominios *Bacteria* (A) y *Archaea* (B); primer muestreo (antes de las lluvias); segundo muestreo (después de las lluvias)

El perfil de bandas del dominio *Bacteria* correspondiente a los suelos control y quemado del punto 4 (La Guancha) se muestra en la Figura 3.18, en el que se puede observar un total de 29 bandas. A diferencia de los tres puntos anteriores, la muestra de suelo quemado correspondiente al muestreo realizado antes de las lluvias presentó un mayor número de bandas (25) que la correspondiente al muestreo realizado después las lluvias (18), mientras que en el suelo control el perfil de bandas obtenido fue similar en ambos muestreos (15 y 16 antes y después de la lluvias, respectivamente). En resumen, en este punto, se observó un mayor número de bandas en el suelo quemado que en el control, tanto antes como después de las lluvias.

En la electroforesis correspondiente al dominio *Archaea* de los suelos control y quemado del punto 4 de muestreo se detectaron un total de 19 bandas. De nuevo, se observó un menor número de bandas en el suelo quemado en el segundo muestreo (15) que en el primer muestreo (16). En la muestra control se observó un mayor número de bandas en el segundo muestreo (13) que en el primero (11). Al igual que en el caso del dominio *Bacteria* se observó un mayor número de bandas en el suelo quemado, en los dos muestreos realizados. En resumen, el análisis comparativo de los resultados obtenidos pone de manifiesto que en el suelo quemado se observó un mayor número de bandas que en el suelo control, tanto en las muestras tomadas antes como después de las lluvias.



**Figura 3.18.** Fotografías (en negativo) de los patrones de bandas de ADN obtenidos por DGGE de los suelos de la zona de La Guancha (Tenerife) correspondientes a los Dominios *Bacteria* (A) y *Archaea* (B); primer muestreo (antes de las lluvias); segundo muestreo (después de las lluvias)

Del estudio realizado resulta difícil extraer conclusiones acerca de la influencia del incendio sobre la biodiversidad microbiana a efectos comparativos. De hecho, se ha podido constatar que en algunos casos las consecuencias del incendio se reflejan en un aumento del número de bandas de ADN detectadas mediante la técnica de DGGE, lo que se traduce en una mayor biodiversidad, mientras que en otros, el efecto se traduce o bien en una disminución de las mismas o no parece afectar a este parámetro. Además, la comparación con los resultados obtenidos por otros autores también resulta difícil, dado que se han utilizado métodos de extracción del ADN diferentes, cebadores distintos, suelos de diferente naturaleza y composición, tiempos diferentes de muestreo en relación al momento del incendio, severidad del mismo etc. En este sentido, Inoçoğlu y colaboradores (2010) observaron que el método de extracción de ADN influye en gran medida en los patrones de bandas de ADN obtenidos por DGGE y también en la diversidad obtenida del análisis de secuencias, lo que, como se ha mencionado anteriormente, dificulta la comparación de los resultados.

En la Tabla 3.11 se muestran los valores de los índices de Shannon calculados a partir de los perfiles de bandas obtenidos mediante DGGE. Para su cálculo se han tenido en cuenta el número y la intensidad de las bandas obtenidas. Respecto al dominio *Bacteria*, observamos que, antes de las lluvias (primer muestreo), el índice de Shannon de los suelos quemados de Los Areneros (zona 3) y La Guancha (zona 4) resultó mayor que en sus respectivos controles. Sin embargo, en las muestras correspondientes a las zonas de Cruz de Cura y Los Castillos (zonas 1 y 2), el índice de Shannon fue menor en los suelos quemados que en los suelos control. En el segundo muestreo se observó que en todas las áreas muestreadas el índice de Shannon fue mayor en los suelos afectados por el incendio que en los suelos control.

**Tabla 3.11.** Índices de Shannon calculados para los Dominios *Bacteria* y *Archaea* a partir de los patrones de bandas de ADN obtenidos de la DGGE

Zona de muestreo	Tenerife			
	<i>Bacteria</i>		<i>Archaea</i>	
	Antes lluvias	Después lluvias	Antes lluvias	Después lluvias
<b>C1</b>	2,79	2,66	1,91	2,20
<b>Q1</b>	2,49	2,67	2,15	2,14
<b>C2</b>	2,64	2,62	2,20	2,57
<b>Q2</b>	2,46	2,87	2,14	2,40
<b>C3</b>	2,91	3,31	2,15	2,34
<b>Q3</b>	3,09	3,40	2,65	2,51
<b>C4</b>	2,65	2,74	2,34	2,40
<b>Q4</b>	3,16	2,85	2,72	2,65

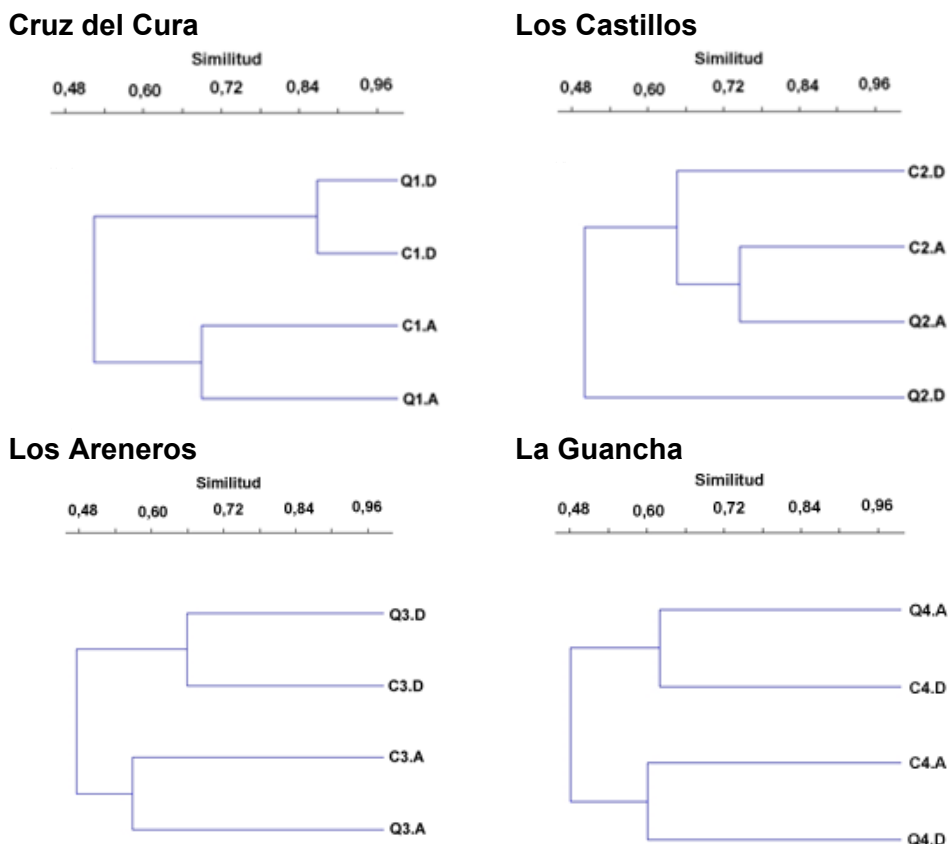
En relación al dominio *Archaea*, los índices de Shannon obtenidos (Tabla 3.11) resultaron inferiores a los observados para el dominio *Bacteria*, lo que indica una menor diversidad dentro de este Dominio. Si se comparan los resultados de los índices de Shannon correspondientes a los suelos quemados con los de los suelos control, se puede observar que en los suelos quemados muestreados antes de las lluvias, se obtuvieron valores más altos en todas las zonas, con excepción de los suelos de la zona de Los Castillos. En el muestreo realizado después de las lluvias, los suelos quemados presentaron valores de índice de Shannon más altos que sus respectivos controles en las zonas 3 y 4, mientras que en las zonas 1 y 2, los valores de este índice fueron más bajos que en los controles.

A continuación, a partir de los patrones de bandas de ADN obtenidos en la DGGE se realizó un análisis de conglomerados, análisis que permite agrupar las muestras según su similitud. Los dendrogramas correspondientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea* se presentan en la Figuras 3.19 y 3.20, respectivamente.

Respecto al dominio *Bacteria* (Figura 3.19) se puede observar, que las muestras correspondientes a las zonas de Cruz del Cura y Los Areneros (zonas 1 y 3, respectivamente) (antes y después de las lluvias) se relacionan en función del tiempo de muestreo y no según su condición de suelo quemado o control. En la zona 2 (Los Castillos) presentaron mayor índice de similitud las muestras correspondientes a los muestreos realizados antes de las lluvias (0,75); sin embargo, en el muestreo realizado después de las lluvias, se obtuvo un índice de similitud muy bajo entre la muestra del suelo control y la del suelo quemado (0,48). Por último, las muestras de la zona de La Guancha (zona 4) no se pudieron agrupar ni por el momento de muestreo ni por su condición de control o quemado.

Del análisis de los dendrogramas correspondientes al dominio *Bacteria* se podría deducir que, sólo en el muestreo realizado después de las lluvias en la zona de Los Castillos, se encontraron diferencias significativas entre el patrón de bandas del suelo quemado y del control.



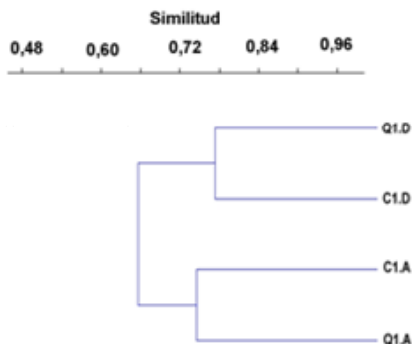


**Figura 3.19.** Dendrogramas obtenidos a partir del análisis de conglomerados de los perfiles de bandas de ADN obtenidos mediante DGGE utilizando el índice de similitud de Jaccard para el Dominio *Bacteria*

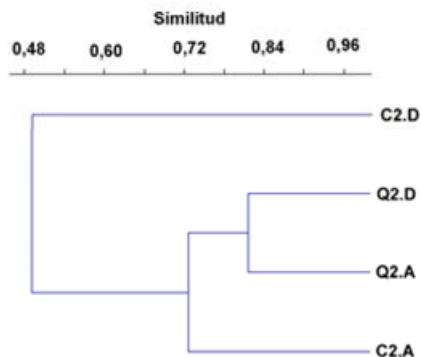
Al igual que se hizo para el dominio *Bacteria*, se realizó un análisis de conglomerados de los patrones de bandas de ADN obtenidos mediante DGGE del dominio *Archaea* de todas las zonas de muestreo de Tenerife (Figura 3.20). Las muestras de la zona 1 (Cruz del Cura) se agruparon en función del tiempo de muestreo (antes o después de las lluvias) y no según la condición del suelo (quemado o control). En las muestras de Los Castillos se puede observar que la correspondiente al control del segundo muestreo (C2.D) presentó la menor similitud con el resto de las muestras de la zona (0,50), mientras que las dos muestras de suelos quemados fueron las que presentaron mayor similitud (0,80). Las muestras de Los Areneros y La Guancha (zonas 3 y 4) se agruparon en función de la condición del tipo de suelo (quemado o control), independientemente del momento del muestreo.

En el caso del dominio *Archaea*, los resultados de los dendrogramas parecen indicar que en las zonas de Los Areneros y La Guancha el fuego ha producido diferencias en el patrón de bandas de los suelos quemados y control.

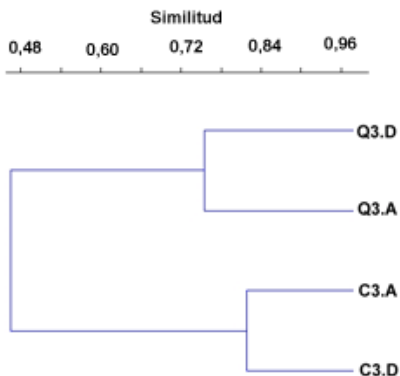
**Cruz del Cura**



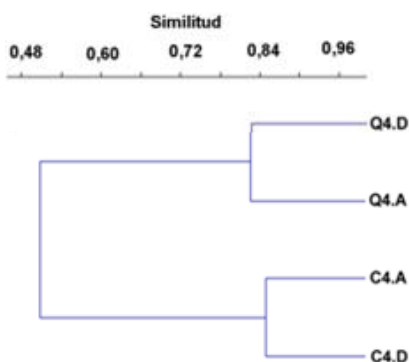
**Los Castillos**



**Los Areneros**



**La Guancha**



**Figura 3.20.** Dendrogramas obtenidos a partir del análisis de conglomerados de los perfiles de bandas de ADN obtenidos mediante DGGE utilizando el índice de similitud de Jaccard para el Dominio *Archaea*

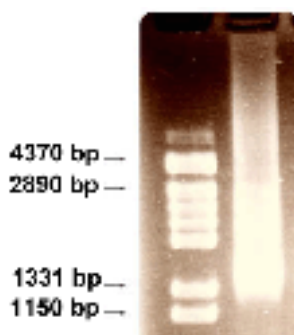
**3.3.2. Análisis de las librerías de clones obtenidos mediante clonación del gen codificante para ARNr 16 S del dominio *Bacteria***

Para la caracterización de la diversidad microbiana, además de obtener los perfiles de las poblaciones microbianas de los suelos control y de los suelos afectados por los incendios, se llevó a cabo la clonación parcial del gen codificante para ARNr 16S de los dominios *Bacteria* y *Archaea*.

A partir del ADN genómico de cada una de las muestras de suelo que sirvieron de base al estudio que se presenta, se amplificó mediante PCR el gen que codifica para el ARN ribosómico 16S, usando la combinación de cebadores universales para el dominio *Bacteria* 27F/1492R y para el dominio *Archaea*

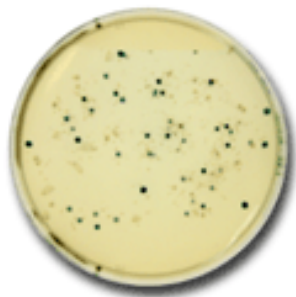
21F/915R. Los fragmentos amplificados fueron posteriormente insertada y clonada y a partir de los clones obtenidos se realizó la identificación de los fragmentos. En el caso de las arqueas se obtuvo siempre la misma identificación (*phylum Crenarchaeota*; clase *Thermoprotei*), por lo que no se continuó el estudio con dicho dominio.

En la Figura 3.21 se muestran los productos de amplificación por PCR obtenidos a partir del suelo control de Aznalcóllar. Este mismo procedimiento se repitió con todos los suelos de Cazorla, Tenerife (antes de las lluvias) y las correspondientes al VRSU de Torrejón de Ardoz.



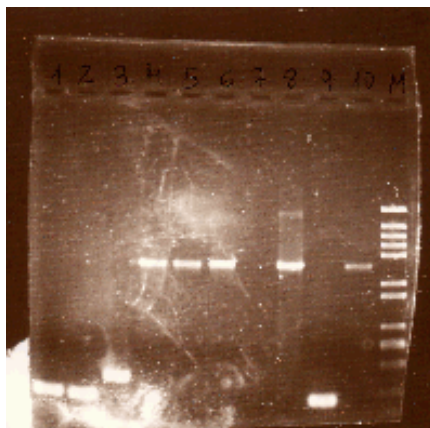
**Figura 3.21.** Productos de amplificación de la reacción de PCR utilizando los cebadores 27F y 1492R a partir del ADN aislado de las muestras de suelos de Aznalcóllar

Los fragmentos amplificados se insertaron en un vector plasmídico, utilizando el Kit TOPO 2.1 (Invitrogen). La construcción de vector/inserto fue clonada en una cepa de *E.coli* competente. En la Figura 3.22 se muestra una fotografía de una placa de LB+ampicilina+Xgal+IPTG tras el crecimiento de la cepa transformada. La coloración blanca de las colonias indicó que la transformación se realizó con éxito, mientras que las colonias azules fueron indicativas de lo contrario.



**Figura 3.22.** Células transformadas de *E.coli* con inserto (colonias blancas) y sin inserto (colonias azules)

De los transformantes que contenían el inserto se seleccionaron 100 colonias que se sembraron en una nueva placa con el mismo medio. Para reconfirmar la presencia del inserto se realizó una PCR con los cebadores M13 F+R. En la Figura 3.23 se muestra el gel resultante de la electroforesis de los productos de amplificación, en donde se puede observar que la mayoría de los clones contenían el inserto del tamaño esperado (aproximadamente 1500 pb) y un escaso número de ellos presentaron un fragmento de menor tamaño que corresponde al vector sin el inserto.



**Figura 3.23.** Productos de amplificación de la PCR confirmativa de los clones

### 3.3.2.1. Análisis de la idoneidad del número de clones estudiados. Curvas de rarefacción

En la Tabla 3.12 se muestra el número de clones del Dominio Bacteria que presuntamente contenían el inserto (colonias blancas) y el número de clones positivos confirmados, utilizando los cebadores M13, de todas las muestras de los suelos quemados y sus controles del dominio *Bacteria*. Se sembraron un total de 2344 colonias blancas, de las cuales se confirmaron como positivos 1873 (79,90 %).

**Tabla 3.12.** Número total de clones ensayados y número de clones confirmados en cada una de las muestras de suelo para el dominio *Bacteria*

Muestra	Clones	
	Totales	Confirmados
	Aznaicóllar	
C	100	83
QQ1	100	73
QQ2	100	86
Q3	100	85
Cazorla		
C1.05	100	84
Q1.05	100	80
C2.05	100	72
Q2.05	88	80
C1.07	93	72
Q1.07	100	93
C2.07	100	73
Q2.07	100	87
C1.08	100	59
Q1.08	100	72
C2.08	100	57
Q2.08	100	77
Tenerife		
C1.A	97	72
Q1.A	82	71
C2.A	85	75
Q2.A	99	74
C3.A	100	70
Q3.A	100	100
C4.A	100	98
Q4.A	100	80
<b>TOTAL</b>	<b>2344</b>	<b>1873</b>
<b>MEDIA</b>	<b>97,66</b>	<b>78,04</b>

Los clones una vez confirmados, se purificaron y se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Alcalá. Una vez obtenidas las secuencias, se eliminó el fragmento correspondiente al vector (M13) y se seleccionó el segmento de mejor calidad de cada secuencia utilizando la herramienta del RDP para este fin. En la Tabla 3.13 se muestra el número de clones que se lograron secuenciar (1680 clones) y el número de secuencias válidas para la identificación (1510 secuencias). También se presenta en la tabla el número correspondiente a las secuencias clasificadas como de “baja calidad”, es decir, que no tienen la calidad necesaria o la cantidad de bases necesarias para su identificación (281 secuencias, es decir, el 16,72 % de las secuencias recibidas).

**Tabla 3.13.** Número de secuencias analizadas y número de secuencias válidas utilizadas para su identificación en la base de datos para el dominio *Bacteria*

Muestra	Secuencias	
	Analizadas	Válidas
	Aznalcóllar	
C	83	70
QQ1	73	69
QQ2	86	75
Q3	57	43
Cazorla		
C1.05	84	80
Q1.05	70	63
C2.05	72	66
Q2.05	79	54
C1.07	58	53
Q1.07	93	85
C2.07	73	62
Q2.07	80	77
C1.08	55	49
Q1.08	72	64
C2.08	55	45
Q2.08	77	71

**Tabla 3.13. (Continuación).** Número de secuencias analizadas y número de secuencias válidas utilizadas para su identificación en la base de datos para el dominio *Bacteria*

Muestra	Secuencias	
	Analizadas	Válidas
Tenerife		
C1.A	58	58
Q1.A	64	64
C2.A	55	55
Q2.A	45	45
C3.A	54	54
Q3.A	75	87
C4.A	98	76
Q4.A	64	45
<b>TOTAL</b>	<b>1680</b>	<b>1510</b>
<b>MEDIA</b>	<b>70</b>	<b>62,92</b>

Utilizando la herramienta de clasificación del RDP, se compararon todos los clones con la base de datos y se clasificaron, creando grupos de diferente afiliación filogenética. Para determinar si una secuencia pertenece a un determinado grupo, se estableció un mínimo del 95% de semejanza con las de las bases de datos. En la mayoría de los casos, sólo se pudo atribuir con más del 95% de semejanza la afiliación de las secuencias a determinados *phyla*, por lo que la comparación filogenética de las muestras se llevó a cabo a este nivel taxonómico. En algunos de los *phyla*, como en el caso del *phylum Proteobacteria*, se pudo hacer un análisis a nivel de los grupo filogenéticos ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - y  $\epsilon$ -) que componen dicho *phylum*. En la Tabla 3.14 se muestra el número de secuencias de cada muestra que se identificaron con el mencionado 95% de similitud. Así mismo, se muestra el número de secuencias que presentaron entre el 80 al 94% de similitud con las correspondientes a las bases de datos, y por último las que presentaron menos del 80% de similitud con dichas secuencias. Siendo 1510 el número total secuencias válidas para su identificación se puede resumir que el 84 % de las secuencias válidas pudieron ser identificadas con un mínimo del 95 % de similitud, mientras que el 10,46 % de las secuencias totales estudiadas presentaron menos del 80 % de similitud. Se observa asimismo, que sólo el 5,56 % de las secuencias encajan dentro de un porcentaje de similitud entre el 80-94 %, por lo tanto, no merece la pena disminuir el porcentaje de similitud del umbral establecido (95 %), ya que sólo se lograrían incluir un número escaso secuencias al estudio, a costa de disminuir notablemente el grado de confianza establecido para la identificación de nuestras secuencias.

**Tabla 3.14.** Número de secuencias identificadas según el porcentaje de similitud establecido para el dominio *Bacteria*

Muestra	Número de secuencias		
	≥95%	94%-80%	≤80%
<b>Aznalcóllar</b>			
C	58	5	7
QQ1	60	7	2
QQ2	57	4	14
Q3	39	0	4
<b>Cazorla</b>			
C1.05	71	2	7
Q1.05	59	3	1
C2.05	56	5	5
Q2.05	45	3	6
<b>Cazorla</b>			
C1.07	46	1	6
Q1.07	73	4	8
C2.07	54	0	8
Q2.07	67	4	6
C1.08	36	3	10
Q1.08	51	5	8
C2.08	32	4	9
Q2.08	51	4	16
<b>Tenerife</b>			
C1.A	57	1	0
Q1.A	58	3	3
C2.A	44	4	7
Q2.A	43	1	1
C3.A	48	1	5
Q3.A	69	9	9
C4.A	52	11	13
Q4.A	42	0	3
<b>TOTAL</b>	<b>1268</b>	<b>84</b>	<b>158</b>



En un estudio realizado por Sun y colaboradores (2004) se estudiaron muestras de suelos agrícolas que habían estado sometidas a diferentes tratamientos de fertilización (estiércol, cal y abonos químicos) utilizando DGGE y librerías de clones de ARNr 16S. Estos autores describieron que de 99 secuencias analizadas (obtenidas a partir de la clonación parcial del gen que codifica para el ARNr16S), sólo 2 coincidieron en un 100% con secuencias de la base de datos y sólo el 17,5 % de las secuencias tuvieron una similitud mayor del 98 %. En dicho estudio también se llevó a cabo la secuenciación de las bandas obtenidas tras aplicar la DGGE, y observaron que 7 de 11 bandas analizadas no pudieron ser identificadas. Este estudio pone de manifiesto la dificultad que entraña el estudio completo de las comunidades microbianas presentes en un ecosistema y la función que desempeñan en el mismo.

Otro parámetro que se debe tener en cuenta a la hora de construir una librería génica es la longitud de las secuencias estudiadas. En teoría, la secuencia amplificada e insertada en el plásmido en nuestro estudio era de cerca de 1500 nucleótidos, sin embargo esta longitud se vio notablemente disminuida una vez que las secuencias fueron revisadas. En la Tabla 3.15 se muestra el número de nucleótidos promedio obtenido en cada uno de los grupos muestreados; se observa que, en general, el fragmento útil para la debida identificación de las secuencias debe de ser de alrededor de 582 nucleótidos. La obtención de fragmentos de esta longitud hace imposible la construcción de árboles filogenéticos de las librerías, para lo cual se necesitarían secuencias de una longitud de al menos 1200 pb.

**Tabla 3.15.** Longitud media del número de pares de bases (nº de pb) de las secuencias del dominio *Bacteria* identificadas en las distintas muestras de suelo

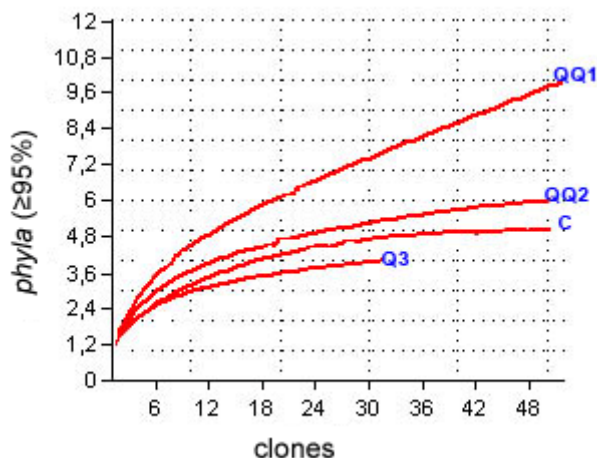
Muestra	Media del nº de pb de las secuencias
	Aznalcóllar
C	535,51
QQ1	683,02
QQ2	669,40
Q3	680,11
	Cazorla
C1.05	730,52
Q1.05	635,72
C2.05	705,12
Q2.05	634,96
C1.07	646,30
Q1.07	683,81
C2.07	680,72
Q2.07	694,35

**Tabla 3.15. (Continuación).** Longitud media del número de pares de bases (nº de pb) de las secuencias del dominio *Bacteria* identificadas en las distintas muestras de suelo

Muestra	Media del nº de pb de las secuencias
	Cazorla
C1.08	696,24
Q1.08	691,76
C2.08	723,33
Q2.08	700,18
	Tenerife
C1.A	432,80
Q1.A	580,00
C2.A	344,60
Q2.A	432,00
C3.A	493,50
Q3.A	592,80
C4.A	393,60
Q4.A	436,5
<b>MEDIA</b>	<b>582,28</b>

De los resultados anteriores se puede concluir que de las 2344 colonias blancas con las que se comenzó el estudio, se lograron identificar con más del 95% de similitud 1268 secuencias, es decir, el 54%. Para poder valorar si esta cantidad de secuencias estudiadas era suficiente para determinar la diversidad microbiana de cada una de las muestras (a nivel de *phyla*), se realizaron las curvas de rarefacción de cada librería. Debido a que todas las comunidades contienen un número finito de especies, a medida que se continúen estudiando secuencias, las curvas tenderán a estabilizarse cuando se hayan detectado todos los grupos presentes. De esta manera se puede comparar la diversidad taxonómica de muestras de tamaño diferente.

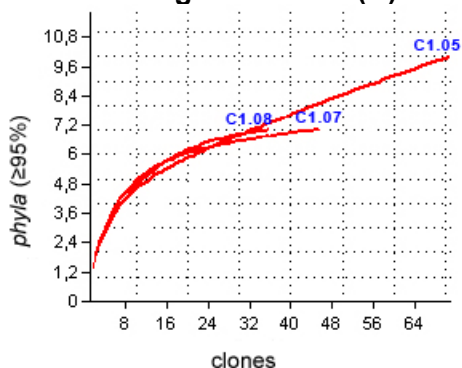
En la Figura 3.24 se muestran las curvas de rarefacción correspondientes a las cuatro muestras de **Aznalcóllar**. Se puede observar que la curva correspondiente a la muestra QQ1 no se estabiliza, lo que indica que se debería haber estudiado un mayor número de secuencias para poder estimar el número total de *phyla* presentes en la muestra. Por el contrario, las curvas de las muestras C, QQ2 y Q3 sí se estabilizan, lo cual implica que aunque se hubiesen estudiado un mayor número de secuencias, no se hubiesen podido identificar nuevos *phyla*.



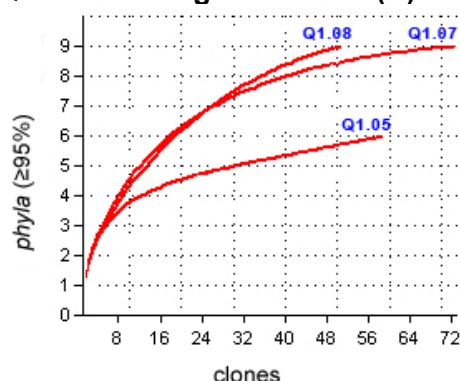
**Figura 3.24.** Curvas de rarefacción construidas a partir de las librerías de clones de los suelos de Aznalcóllar correspondiente al dominio *Bacteria*

En la Figura 3.25 se muestran las curvas de rarefacción de las librerías de clones correspondientes a las muestras de **Cazorla**. En el apartado A de esta figura se pueden observar las curvas correspondientes al suelo C1; el perfil de la curva correspondiente al muestreo del año 2005, indica que se deberían haber estudiado más secuencias de esta muestra, mientras que el perfil de las curvas de los años 2007 y 2008, pone de manifiesto que se estudiaron un número suficiente de secuencias. En el suelo Q1 (Figura 3.25 B), se puede observar que las tres curvas (correspondientes a los tres muestreos) tienden a estabilizarse, por lo que se puede inferir que se estudiaron suficientes clones de estas muestras. En el suelo C2 (C), ninguna de las tres curvas se estabilizan y en el suelo Q2 (D), sólo la curva del 2005 se estabiliza. Por lo tanto, del estudio de los suelos de Cazorla se puede concluir que en la mayoría de los suelos no se estudiaron las secuencias necesarias para lograr identificar todos los *phyla* presentes en dichos suelos.

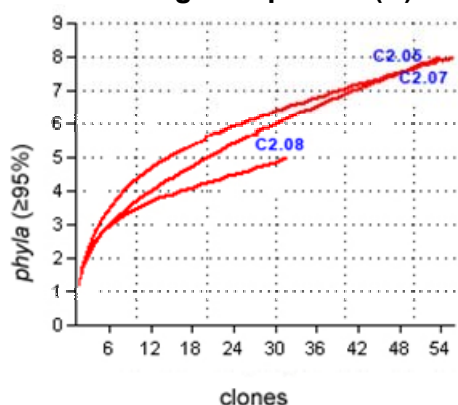
**Control- Margen derecho (A)**



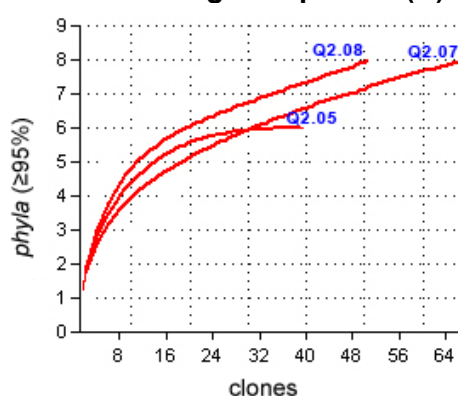
**Quemado-Margen derecho (B)**



**Control- Margen izquierdo (C)**



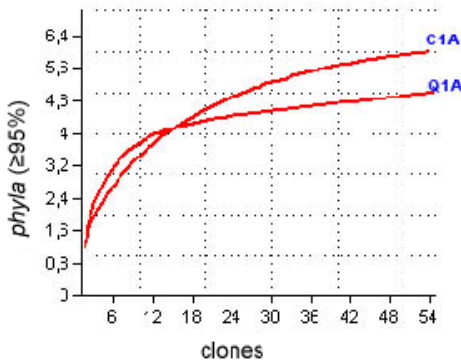
**Quemado- Margen izquierdo (D)**



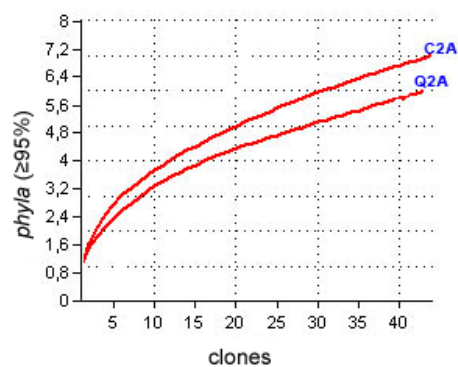
**Figura 3.25.** Curvas de rarefacción construidas a partir de las librerías de clones de los suelos de Cazorla correspondiente al dominio *Bacteria*

En las curvas de rarefacción de las muestras de suelo de **Tenerife** que se muestran en la Figura 3.26, se puede observar que las correspondientes a la zona de Cruz del Cura (A), tanto la muestra del control como la del suelo quemado, se estabilizan, mientras que las correspondientes a Los Castillos (B) no se estabilizan en ninguno de los casos. En las curvas de rarefacción correspondientes a las muestras de los Areneros (C), se puede observar que la del suelo control se estabiliza, mientras que no lo hace la del suelo quemado. Por último, se puede observar, que las curvas correspondientes a las muestras de la zona de La Guancha (D) no se estabilizan, y por lo tanto, se deberían haber estudiado más clones de estas muestras.

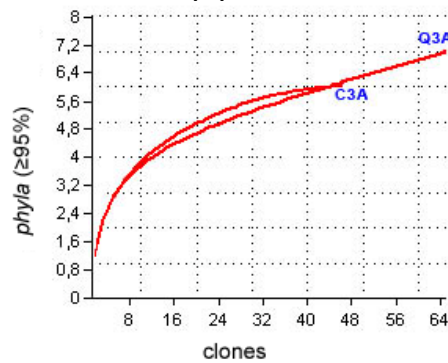
Cruz del Cura (A)



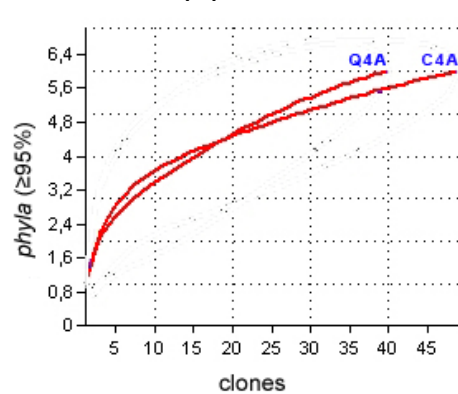
Los Castillos (B)



Los Areneros (C)



La Guancha (D)

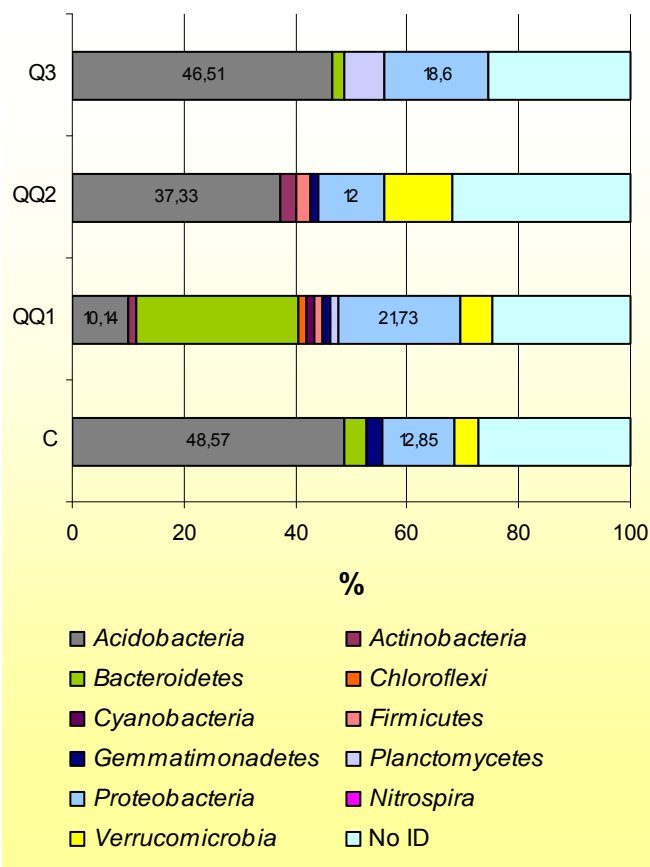


**Figura 3.26.** Curvas de rarefacción construidas a partir de las librerías de clones de los suelos de Tenerife correspondiente al dominio *Bacteria*

Realmente, la realización de curvas de rarefacción resulta de utilidad para poder estimar con cierto nivel de seguridad la diversidad microbiana presente en los suelos, ya que nos informa, en función del perfil de las mismas, de la adecuación o no del número de secuencias analizadas. Como se ha demostrado en el estudio realizado, en algunas de las zonas de muestreo estudiadas se hubiera necesitado analizar un mayor número de secuencias para poder estimar de modo concluyente la diversidad microbiana presente en los mismos. Brons y colaboradores (2008) encontraron el mismo problema al realizar un estudio de estimación de la diversidad microbiana presente en los suelos de una pradera. Tras analizar 100 clones por muestra y realizar las correspondientes curvas de rarefacción se percataron que el número de secuencias estudiadas no había sido suficiente para determinar la verdadera extensión de la diversidad microbiana presente en los suelos estudiados, en base a lo cual recomendaron la necesidad de incrementar el número de secuencias a analizar.

### 3.3.2.2. Análisis de las secuencias obtenidas tras la clonación del gen codificante para ARNr 16S del dominio *Bacteria*

En la Figura 3.27 se muestra la distribución porcentual de la diversidad de los *phyla* observados en las diferentes zonas muestreadas en **Aznalcóllar**. Se puede observar que el menor número de *phyla* corresponde al control (5 *phyla*) y a la zona Q3 (4 *phyla*) mientras que en la zona QQ1 se identificaron 10 *phyla*. Además de ser la zona QQ1 la que presentó mayor diversidad, es la única en la que el *phylum Acidobacteria* no es el mayoritario, siendo el *phylum Bacteroidete* el dominante. Por otro lado, los *phyla Chloroflexi* y *Cyanobacteria* sólo se detectaron en la zona QQ1. Cabe señalar, que el recuento en placa de bacterias y de hongos de la zona QQ1 fue superior al del resto de las zonas muestreadas, al igual que el recuento directo al microscopio y la actividad respiratoria, por lo que se trata de la única zona de Aznalcóllar en la que se ha puesto de manifiesto que existe correlación entre biomasa, actividad microbiana y biodiversidad.



**Figura 3.27.** Distribución porcentual de los *phyla* identificados en las muestras de Aznalcóllar

En los suelos de **Cazorla** (Figura 3.28) se pudo observar que en el primer muestreo en las dos zonas muestreadas, el suelo quemado presentó menor número de *phyla* que el suelo control, mientras que en los muestreos posteriores el suelo quemado igualó o superó el número de *phyla*, con respecto a su control. Asimismo, se observó un aumento progresivo en el número de *phyla* de ambos suelos quemados (Q1 y Q2) en los sucesivos muestreos, mientras que en los suelos control se produjo una disminución en el número de *phyla*. En la zona Q1 (margen derecho de la carretera), el grupo mayoritario en los tres muestreos correspondió al *phylum Proteobacteria*. En su respectivo control (C1) se observó asimismo, en los muestreos del 2005 y 2008, que el grupo mayoritario fue el *phylum Proteobacteria*, mientras que en el 2007 predominó el *phylum Acidobacteria*. En los suelos del margen izquierdo de la carretera se obtuvieron resultados similares. La única muestra en la que se identificó una secuencia perteneciente al *phylum Nitrospira* fue en la zona Q1 en el muestreo de 2008. En la zona Q2 fue la única en la que no se identificaron miembros del *phylum Chloroflexi* en ninguno de los tres muestreos.

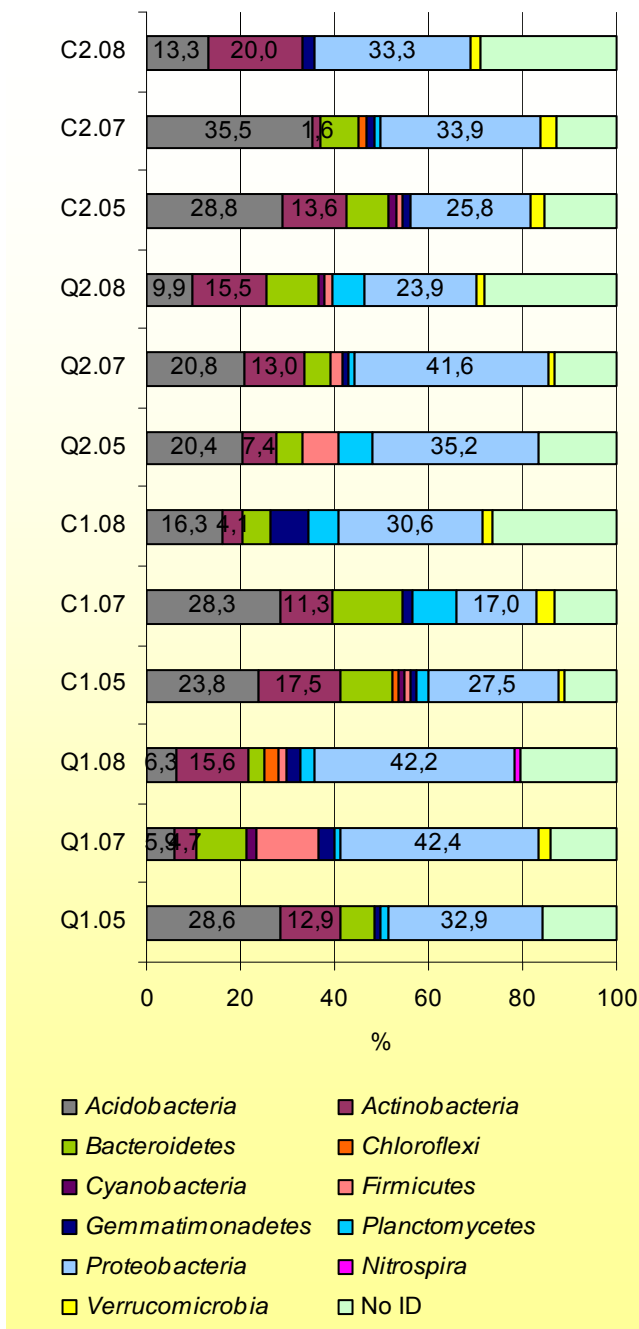
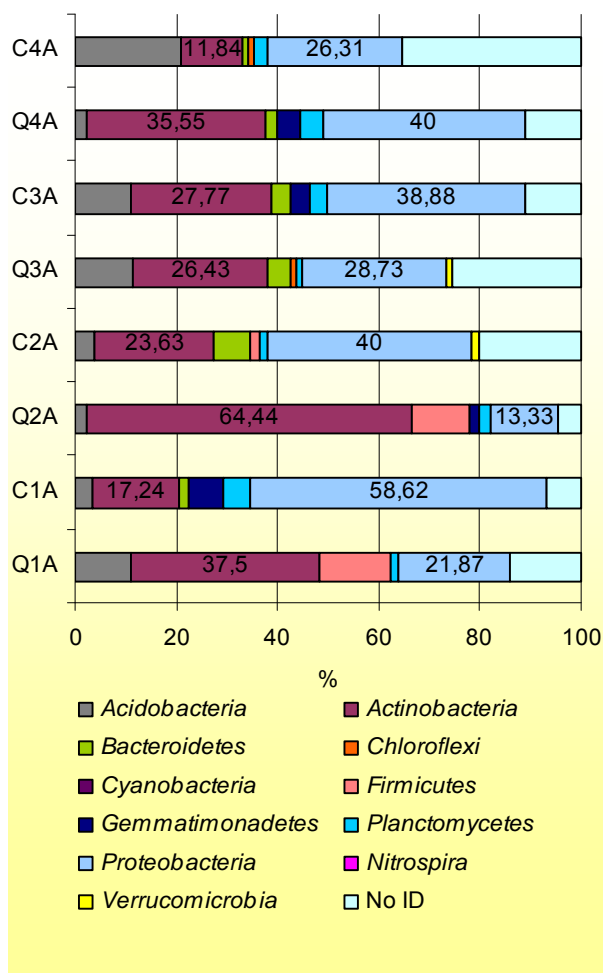


Figura 3.28. Distribución porcentual de los *phyla* identificados en las muestras de Cazorra



En la Figura 3.29 se muestran los resultados de la distribución porcentual de los *phyla* identificados en las distintas zonas muestreadas de **Tenerife**. En todas las muestras el número de *phyla* identificados osciló entre 5 y 7. Tanto en la zona de Cruz del Cura (zona 1) como en la zona de Los Castillos (zona 2), el número de *phyla* identificados fue mayor en los suelos control que en los quemados.

De nuevo se observó que en la mayoría de las zonas muestreadas predomina el *phylum Proteobacteria*, a excepción de los suelos quemados de la zona 1 (Q1.A) y de la zona 2 (Q2.A), donde predomina el *phylum Actinobacteria*. En ninguna de las muestras de Tenerife se encontraron secuencias pertenecientes a los *phyla Cyanobacteria* ni *Nitrospira*. Los suelos quemados de la zona 3 (Q3.A) y el control de la zona 4 (C4.A) fueron los únicos en los que se identificaron secuencias correspondientes al *phylum Chloroflexi*.



**Figura 3.29.** Distribución porcentual de los *phyla* identificados en las muestras de Tenerife

Como resumen a este estudio se puede concluir que en la zona de Aznalcóllar predomina el *phylum Acidobacteria*, lo cual concordaría con el pH inicial del suelo. En los suelos de Cazorla, el grupo predominante es el *phylum Proteobacteria* y dependiendo del año de muestreo le siguen en abundancia los *phyla Acidobacteria* o *Actinobacteria*. En los suelos quemados de Tenerife, se ha encontrado que, en general, predomina el *phylum Actinobacteria*, lo cual podría ser atribuido a la mayor adaptación de este grupo de bacterias a las condiciones que impone el fuego en los suelos volcánicos analizados. Le siguen en abundancia el *phylum Proteobacteria* que, en general, constituyen el grupo dominante en los suelos control.

En la bibliografía consultada, cabe señalar el estudio de las comunidades microbianas realizado por Norris y colaboradores (2002) en el parque de Yellowstone, tras haber experimentado un aumento brusco de la temperatura debido a la actividad geotérmica. La diversidad observada en las librerías no mostró una diferencia notable entre los suelos sometidos a mayores temperaturas y los suelos control. De los 39 clones estudiados, el 51% presentó una similitud mayor a 89% con miembros del *phylum Acidobacteria*. Este grupo ha sido descrito recientemente, habiéndose encontrado miembros de dicho grupo en una gran variedad de ambientes como océanos, aguas termales y suelos altamente ácidos. Cabe señalar que en las bases de datos, la mayoría de las secuencias publicadas de este grupo pertenecen a bacterias del suelo. Estos autores consideran que debido al amplio abanico de hábitats en los que se han encontrado las acidobacterias es probable que resulte un grupo tan diverso metabólicamente como las proteobacterias. Considerando la gran proporción de acidobacterias que presentan las muestras de suelo de Aznalcóllar y Cazorla, se podría inferir que este grupo juega un papel ecológico importante en estos ecosistemas, aunque aún no haya sido descrito.

Como se mencionó en el apartado 2.5 de Materiales y Métodos, el índice de Shannon es uno de los índices más frecuentemente utilizados para estimar la diversidad. Para el cálculo de este índice se tiene en cuenta tanto el número de grupos observados como la distribución de las secuencias en dichos grupos. En la Tabla 3.16 se muestran los índices de Shannon calculados a partir del número de *phyla* detectados en cada una de las muestras de los suelos quemados. Se ha podido observar que los valores de este índice van desde 0,970 (en el suelo Q3 de Aznacóllar) hasta 1,719 (en el suelo Q1.08 de Carozla).

Entre las muestras analizadas, fueron los suelos de Aznalcóllar el grupo de muestras que presentó una mayor variación entre los índices de diversidad, donde el menor índice corresponde al suelo Q3 (0,970) y el mayor al suelo QQ1 (1,649).

En los suelos de Cazorla no se observaron diferencias notables al comparar los suelos quemados con sus respectivos controles. En la zona 1 de Cazorla, ambos suelos (Q y C) presentaron mayor diversidad en el muestreo de 2007 en

comparación con los otros dos muestreos (2005 y 2008). En la zona 2, por el contrario, el suelo quemado presentó menor diversidad en el 2007, mientras que el suelo control experimentó un descenso en la diversidad a lo largo del tiempo.

**Tabla 3.16.** Índices de Shannon calculados a partir de las librerías de clones de las muestras de suelos de Aznalcóllar, Cazorla y Tenerife

<b>Muestra</b>	<b>Índice de Shannon</b>
<b>Aznalcóllar</b>	
C	1,04
QQ1	1,65
QQ2	1,27
Q3	0,97
<b>Cazorla</b>	
C1.05	1,62
Q1.05	1,37
C2.05	1,70
Q2.05	1,52
C1.07	1,62
Q1.07	1,72
C2.07	1,44
Q2.07	1,53
C1.08	1,60
Q1.08	1,72
C2.08	1,24
Q2.08	1,37
<b>Tenerife</b>	
C1.A	1,15
Q1.A	1,34
C2.A	1,32
Q2.A	1,05
C3.A	1,38
Q3.A	1,39
C4.A	1,38
Q4.A	1,21

En las muestras de Tenerife cabe señalar que en las correspondientes a la zona Cruz del Cura (zona 1) el suelo quemado presentó mayor diversidad que el

suelo control mientras que en Los Castillos (zona 2) ocurre lo contrario, el suelo control presentó mayor diversidad. En Los Areneros (zona 3) ambos valores resultaron iguales y en La Guancha (zona 4) el suelo control presentó un índice ligeramente superior que el del suelo quemado.

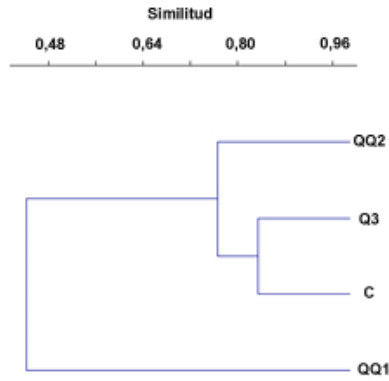
A partir de los datos obtenidos de las librerías también se puede realizar un análisis de conglomerados para verificar si las muestras se pueden agrupar según su diversidad microbiana. En la Figura 3.30 se muestran los dendrogramas obtenidos de cada zona de muestreo. Estos dendrogramas están hechos con el índice de similitud de Bray-Curtis, que es uno de los más utilizados en ecología para estudiar la diferencia en abundancia entre muestras (a diferencia del índice de Jaccard que se utiliza en caso de datos binarios).

En el dendrograma correspondiente a la zona de **Aznalcóllar (A)** se observa que la muestra QQ1 es la que presenta mayor diferencia con el resto, mientras que las muestras Q3 y C son las que más se asemejan.

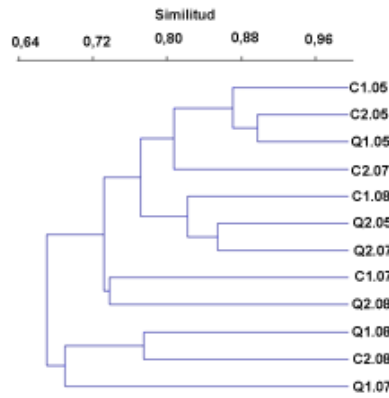
En el dendrograma de **Cazorla (B)** las muestras no se agrupan bajo ningún criterio específico, ni por su condición de quemado o control, por la zona de muestreo o por el año de muestreo. Los suelos con mayor similitud entre sí son el Q1 y C2 del año 2005 (90 % de similitud).

En el de **Tenerife (C)** tampoco se observó la formación de subconjuntos que obedezcan a la condición de quemado/control. De este grupo las muestras con mayor similitud son la C3.A y Q4.A con 88 %.

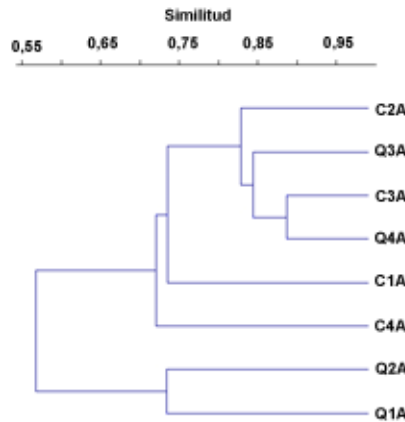
**A**



**B**



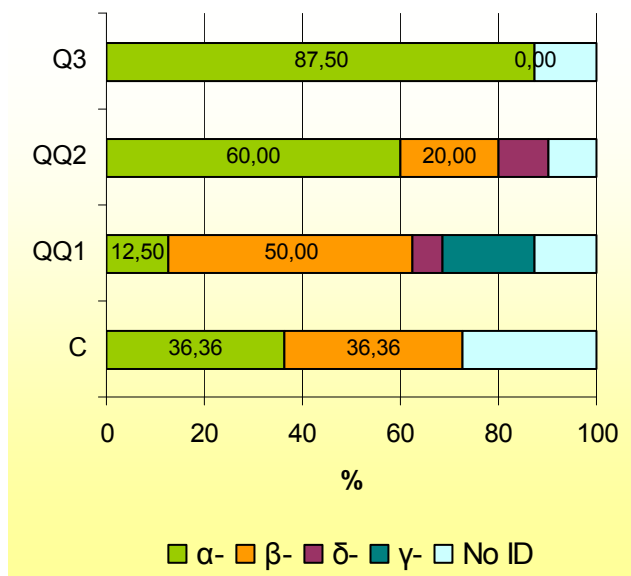
**C**



**Figura 3.30.** Dendrogramas obtenidos a partir del análisis de conglomerados de las librerías de clones utilizando el índice de similitud de Bray Curtis. Aznalcóllar (A); Cazorla (B) y Tenerife (C)

Una vez analizada la distribución porcentual de los distintas *phyla* en los suelos estudiados, y comprobado que las proteobacterias eran uno de los *phylum* dominantes en todas las muestras, se trató de clasificar en los grupos taxonómicos que lo componen ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - y  $\epsilon$ -), siempre y cuando las secuencias tuvieran  $\geq 95\%$  de similitud con las secuencias de las bases de datos.

En la Figura 3.31 se muestra la distribución de los grupos de proteobacterias presentes en las muestras de **Aznalcóllar**. En el suelo control se encontró que los grupos  $\alpha$ - y  $\beta$ -, están igualmente representadas (36,36 %). En el suelo de la zona QQ1 predominan las  $\beta$ -proteobacterias (50 %), aunque también se identificaron secuencias pertenecientes a los grupos  $\delta$ -proteobacterias y  $\gamma$ -proteobacterias. En el suelo de la zona QQ2 el grupo predominante fue la de las  $\alpha$ -proteobacterias (60 %), detectándose también secuencias pertenecientes al grupo  $\delta$ -proteobacterias. En el suelo de la zona Q3 sólo se identificaron  $\alpha$ -proteobacterias.

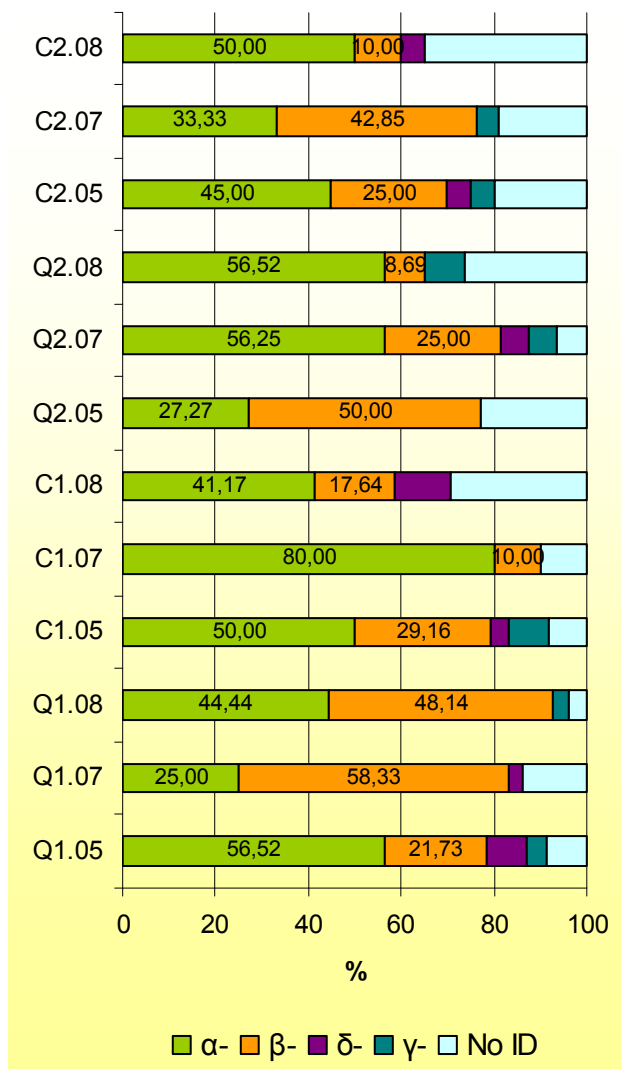


**Figura 3.31.** Distribución porcentual de los grupos filogenéticos del *phylum Proteobacteria* en los suelos de Aznalcóllar

En una fase posterior partiendo de las mismas secuencias y en aquellos casos en los que el porcentaje de similitud de las mismas con las publicadas en las bases de datos era superior al 85%, se identificaron algunos géneros. Cabe destacar que en el **suelo control de Aznalcóllar** se identificó el género *Sphingomonas* perteneciente al *phylum Proteobacteria* y el género *Mucilaginibacter* del *phylum Bacteroidete*. En los **suelos quemados**, en el *phylum Proteobacteria* se identificaron los géneros *Massilia*, *Dokdonella*, *Bradyrhizobium*, *Pseudolabrys* y

entre los bacteroidetes, los géneros *Flavisolibacter*, *Niastella*, *Parasegetibacter*, *Segetibacter*, *Mucilaginitibacter*, *Fluviicola* y *Flavobacterium*.

En los suelos de **Cazorla** (Figura 3.32), al igual que en los suelos de Aznalcóllar, las  $\alpha$ -proteobacterias y las  $\beta$ -proteobacterias son los grupos mayoritarios. Los grupos  $\gamma$ - y  $\delta$ - representan únicamente alrededor del 3 % de todo el conjunto del *phylum Proteobacteria*. En el 16 % de las secuencias no se logró el porcentaje de similitud establecido para poder incluirlas en los grupos filogenéticos descritos.



**Figura 3.32.** Distribución porcentual de los grupos filogenéticos del *phylum Proteobacteria* en los suelos de Cazorla

De las secuencias correspondientes a los **suelos control de Cazorla** se identificaron los siguientes géneros con más del 85% de similitud pertenecientes a los siguientes *phyla*:

- **Proteobacteria:** *Pedomicrobium*, *Rhizobium*, *Rubellimicrobium*, *Leptothrix*, *Massilia*, *Acinetobacter*, *Lysobacter*, *Caulobacter*, *Mesorhizobium*, *Rhodofera*, *Anaeromyxobacter*.

- **Actinobacteria:** *Acidimicrobium*, *Rubrobacter*, *Conexibacter*, *Arthrobacter*, *Friedmanniella*, *Solirubrobacter*.

- **Bacteroidetes:** *Terrimonas*, *Hymenobacter*, *Niastella*.

En los **suelos quemados** se identificaron los siguientes géneros con más del 85% de similitud pertenecientes a los *phyla* que se describen a continuación:

- **Proteobacteria:** *Aminobacter*, *Rhodoplanes*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, *Massilia*, *Phenylobacterium*, *Devosia*, *Acidovorax*, *Ramlibacter*, *Caulobacter*, *Bradyrhizobium*, *Microvirga*, *Rhodobium*, *Blastococcus*, *Rhizobium*, *Sphingobium*, *Hydrogenophaga*

- **Actinobacteria:** *Rubrobacter*, *Conexibacter*, *Arthrobacter*, *Streptosporangium*, *Acidimicrobium*, *Mycobacterium*, *Actinoplanes*, *Patulibacter*

- **Bacteroidetes:** *Dyadobacter*, *Niastella*, *Chitinophaga*, *Pedobacter*, *Adhaeribacter*, *Sphingobacterium*

En la Figura 3.33 se muestra la distribución porcentual de los grupos del *phylum Proteobacteria* correspondiente a los suelos de **Tenerife**. Al igual que en los suelos de Cazorla el grupo predominante fue la de las  $\alpha$ -proteobacterias, con excepción del suelo quemado de la zona 4 en el que predominan las  $\beta$ -proteobacterias. En algunas muestras se detectaron secuencias pertenecientes al grupo de las  $\delta$ -Proteobacterias y de las  $\gamma$ -Proteobacterias.

En los **suelos control de Tenerife** se identificaron los siguientes géneros pertenecientes a los *phyla* que a continuación se detallan:

**Proteobacteria:** *Bradyrhizobium*, *Phenylobacterium*, *Nitrobacter*, *Hyphomicrobium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Variovorax*, *Massilia*, *Methylobacterium*, *Roseomonas*, *Burkholderia*

**Actinobacteria:** *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Blastococcus*, *Arthrobacter*, *Solirubrobacter*

**Bacteroidetes:** *Flavisolibacter*, *Segetibacter*, *Terrimonas*

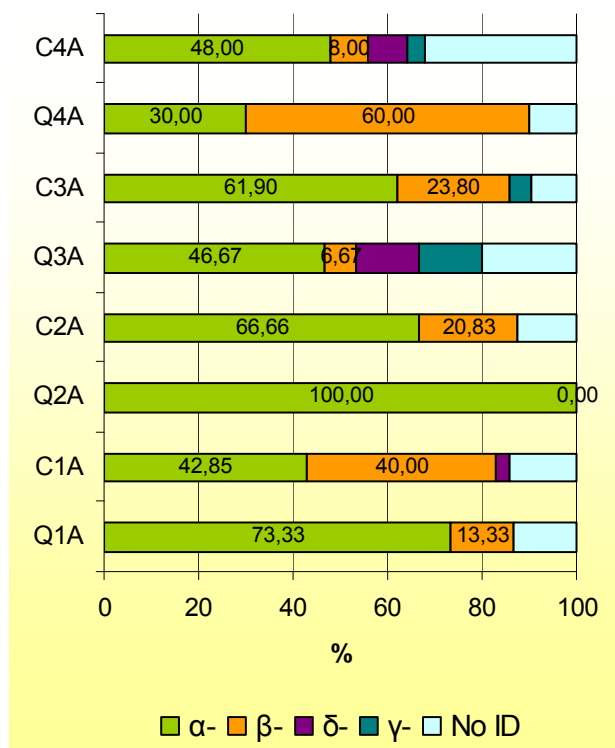
En los **suelos quemados de Tenerife** se identificaron los siguientes géneros pertenecientes a los *phyla* que se describen a continuación:

**Proteobacteria:** *Phenylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Massilia*, *Methylobacterium*, *Anaeromyxobacter*, *Pigmentiphaga*

**Actinobacteria:** *Pseudonocardia*, *Crossiella*, *Streptomyces*, *Actinoallomurus*, *Planosporangium*, *Amycolatopsis*, *Mycobacterium*, *Conexibacter*

**Bacteroidetes:** *Terrimonas*





**Figura 3.33.** Distribución porcentual de los grupos filogenéticos del *phylum Proteobacteria* en los suelos de Tenerife

A pesar de la dificultad que conlleva la interpretación de los resultados obtenidos, las variaciones detectadas en los *phyla* y géneros bacterianos presentes en los suelos quemados y en sus respectivos controles, parece indicar que el efecto del fuego sobre la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas no resulta significativo, probablemente debido a la rápida recuperación de las poblaciones microbianas por la aportación de nutrientes (C y N principalmente) que tuvo lugar como consecuencia del efecto del incendio sobre la cubierta vegetal existente. No obstante del estudio preliminar realizado se puede deducir que en algunos suelos sería necesario analizar un mayor número de clones para alcanzar un mayor umbral de discriminación entre los grupos bacterianos presentes en ambos tipos de suelo. Por otro lado, sería interesante poder realizar la secuenciación de los clones que contenían el inserto correspondiente al gen codificante para el ARNr 16S a partir de ambos extremos, con el fin de conseguir un mayor número de secuencias identificables, lo que proporcionaría una información más representativa de los distintos taxones presentes en los distintos suelos. Hay que tener en cuenta que un significativo porcentaje de secuencias no han podido ser identificadas por no haber alcanzado el porcentaje de similitud del 95% prefijado.

### 3.4

## **Caracterización física, química y biológica de suelos de vertederos de residuos sólidos urbanos**

Con el fin de conocer en qué medida la presencia de compuestos tóxicos afecta a la actividad y la diversidad de los microorganismos del suelo, se analizaron muestras de suelo de dos vertederos de residuos sólidos urbanos, uno situado en Torrejón de Ardoz, en el que se había detectado previamente la presencia de hidrocarburos alifáticos y aromáticos y el otro en Getafe, contaminado, fundamentalmente, con metales pesados (Pastor y Hernández, 2010). En este estudio, como en el de los suelos incendiados, se analizaron diferentes parámetros físicos, químicos y biológicos.

### **3.4.1. Análisis del suelo del vertedero de Torrejón de Ardoz**

#### **3.4.1.1. Caracterización físico-química**

En el vertedero de Torrejón de Ardoz se estudiaron cuatro zonas, denominadas T2, T2B, T8 y T9. Los resultados de los parámetros físico-químicos determinados en las muestras de suelo se presentan en la Tabla 3.17 y en las Figuras 3.38 y 3.39.

##### **3.4.1.1.1. Determinación de la concentración de hidrocarburos**

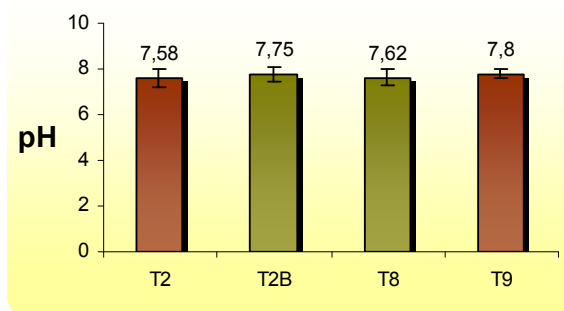
Los resultados correspondientes a la concentración de hidrocarburos totales (alifáticos y aromáticos), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y bifenilos policlorados (PCBs) se muestran en la Tabla 3.17. Como se puede observar, aunque los contaminantes están presentes en todas las zonas del vertedero analizadas, los valores más elevados de hidrocarburos totales y PCBs se detectaron en las zonas T9 (189,91 ppm y 4,14 ppm, respectivamente) y T2 (165,6 ppm y 0,22 ppm, respectivamente). Es importante destacar la elevada concentración de PAHs determinada en la zona T9 (11,06 ppm), en la que se identificaron compuestos como: pireno (1,33 ppm), fluoranteno (1,55 ppm), benzo[b]fluoranteno (1,69 ppm) y benzo[a]pireno (2,23 ppm). En la zona T8, se detectaron las concentraciones más bajas de hidrocarburos totales y de PCBs, si bien también se detectó la presencia de benzo[b]fluoranteno (0,062 ppm) y benzo[a]pireno (0,059 ppm).

**Tabla 3.17.** Concentración de contaminantes orgánicos presentes en las muestras de suelo del vertedero de Torrejón de Ardoz

Zona de muestreo	Contaminantes (ppm)		
	Hidrocarburos totales	PAHs	PCBs
T2	165,60 ±4,28	0,21 ±0,01	0,22 ±0,01
T2B	84,52 ±1,80	0,16 0,01	0,057 ±0,01
T8	54,48 ±1,34	0,20 ±0,01	≤0,04
T9	189,91 ±4,11	11,06 ± 0,20	4,14 ± 0,12

### 3.4.1.1.2. pH

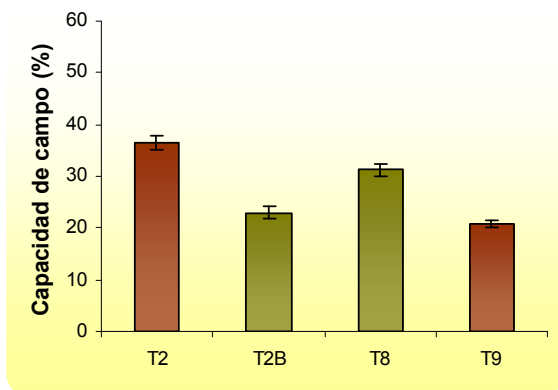
Los resultados de la medida del pH en las distintas zonas del vertedero de Torrejón de Ardoz se muestran en la Figura 3.34. Como se puede observar, los valores de pH de todos los suelos resultaron ligeramente alcalinos (entre 7,58 y 7,8), mostrando una gran homogeneidad espacial el pH de la cubierta edáfica del vertedero de Torrejón de Ardoz.

**Figura 3.34.** Valores de pH de los suelos de los vertederos de Torrejón de Ardoz

No se hallaron correlaciones estadísticamente significativas entre el pH y la concentración de hidrocarburos totales ( $r=0,123$ ;  $p=0,703$ ), el pH y la concentración de PAHs ( $r=0,246$ ;  $p=0,440$ ) y el pH y la concentración de PCBs ( $r=0,246$ ;  $p=0,440$ ).

### 3.4.1.1.3. Capacidad de campo

En la Figura 3.35 se presentan los valores correspondientes a la capacidad de campo ( $pF\ 2,5$ ) de las muestras de suelo del vertedero de Torrejón de Ardoz. Como se puede observar, se detecta una gran heterogeneidad en los valores de este parámetro en las distintas zonas analizadas. El valor más bajo de capacidad de campo correspondió a la muestra T9 (20,91 %) y el valor más alto a la muestra T2 (36,4 %).



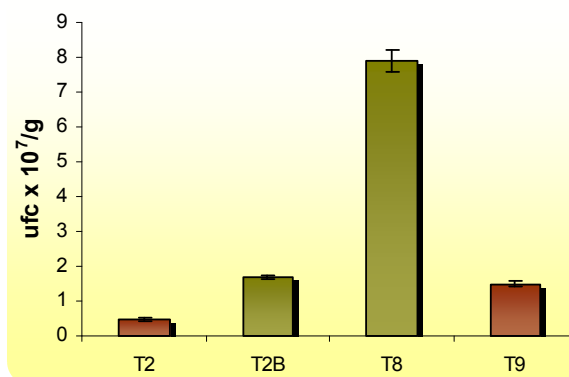
**Figura 3.35.** Capacidad de campo (%) de los suelos del vertedero de Torrejón de Ardoz

Al realizar los análisis estadísticos se observó una correlación negativa estadísticamente significativa entre la capacidad de campo y la concentración de PAHs ( $r = -0,63$ ;  $p = 0,03$ ) y PCBs ( $r = -0,61$ ;  $p = 0,03$ ), lo que pone de manifiesto que la presencia de hidrocarburos aromáticos en el suelo incide, junto con otros factores, en la disminución de la cantidad de agua del suelo disponible para las plantas y otros organismos vivos.

### 3.4.1.2. Caracterización biológica

#### 3.4.1.2.1. Recuento en placa de bacterias viables

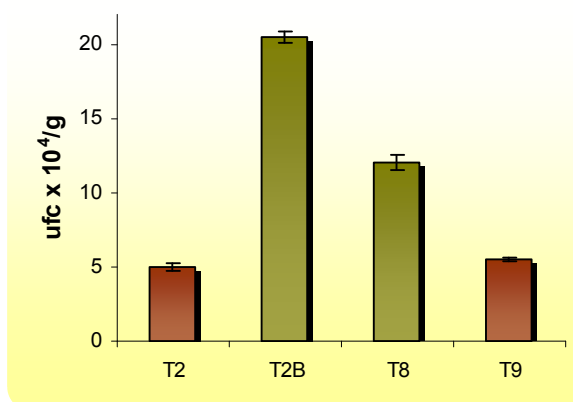
En la Figura 3.36 se presentan los resultados del recuento de bacterias viables a  $28\ ^\circ C$  de las distintas zonas del vertedero de Torrejón de Ardoz. Tal como se refleja en la figura, las zonas con mayor concentración de hidrocarburos (T2 y T9) presentaron un menor número de bacterias viables que las áreas con menor concentración de contaminantes (T2B y T8). Este resultado se pudo corroborar mediante análisis estadísticos, en los que se obtuvo una correlación negativa estadísticamente significativa entre el número de bacterias vivas del suelo y la concentración de hidrocarburos totales ( $r = -0,75$ ,  $p = 0,03$ ).



**Figura 3.36.** Recuento de bacterias viables (ufc/g de suelo) de las muestras de suelo del vertedero de Torrejón de Ardoz

### 3.4.1.2.2. Recuento en placa de hongos viables

Los resultados del recuento en placa de agar Sabouraud de los mohos y levaduras de las distintas zonas del vertedero de Torrejón de Ardoz se muestran en la Figura 3.37. Al igual que se observó en el caso de las bacterias viables, las zonas con menor nivel de hidrocarburos (T2B y T8) fueron las que presentaron un mayor número de hongos viables. También mediante análisis estadístico se puso de manifiesto una correlación negativa, estadísticamente significativa, entre el número de hongos viables y la concentración de contaminantes ( $r=-0,76$ ,  $p=0,03$ ), lo que demuestra, nuevamente, el efecto negativo de los hidrocarburos sobre la microbiota del suelo.



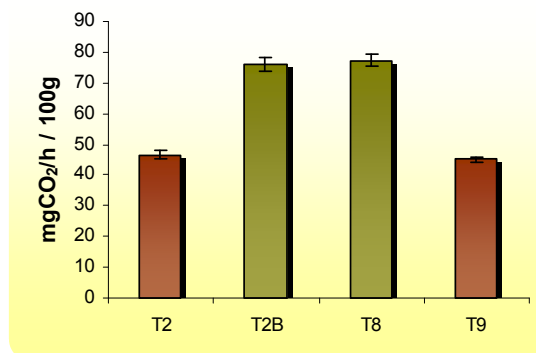
**Figura 3.37.** Recuento de hongos viables (ufc/g de suelo) de las muestras de suelo del vertedero de Torrejón de Ardoz

### 3.4.1.2.3. Respiración inducida por sustrato (SIR)

En la Figura 3.38 se muestran los resultados obtenidos de la valoración de la respiración inducida por sustrato (SIR) de las distintas zonas del vertedero de Torrejón de Ardoz.

Las zonas con mayor grado de contaminación fueron las que presentaron los valores más bajos de actividad respiratoria (T2, 46,55 y T9, 45,05 mg CO<sub>2</sub>/h/100 g), mientras que en las que se detectó menor concentración de contaminantes se obtuvieron los valores más altos de SIR (T2B, 76,19 y T8, 77,33 mg CO<sub>2</sub>/h/100 g de suelo). Los resultados del análisis estadístico confirmaron la existencia de una relación inversa entre la presencia de hidrocarburos en el suelo y la biomasa y/o actividad de los microorganismos presentes en el mismo, ya que se obtuvo una correlación negativa estadísticamente significativa entre la concentración de hidrocarburos totales del suelo y SIR ( $r=-0,96$ ;  $p=0,00$ ).

Es importante señalar la existencia de una relación directa entre el recuento de bacterias viables, el de hongos viables y la respiración inducida por sustrato. De hecho, las zonas T8 y T2B con menor concentración de contaminantes, fueron las que presentaron los valores más elevados de todos estos parámetros. Los análisis estadísticos demostraron la existencia de una correlación positiva estadísticamente significativa entre el SIR y el recuento de hongos totales ( $r=0,88$ ,  $p=0,01$ ). En el caso del SIR también se puso de manifiesto la existencia de una correlación positiva, si bien no estadísticamente significativa ( $r=0,65$ ,  $p=0,08$ ).



**Figura 3.38.** Respiración inducida por sustrato (mg CO<sub>2</sub>/h/100 g) de las muestras de suelo del vertedero de Torrejón de Ardoz

### 3.4.1.2.4. Actividades enzimáticas

Para completar el estudio, se llevó a cabo en los suelos procedentes de ambos vertederos la valoración de diferentes actividades enzimáticas relacionadas con los ciclos del C, N y P.

En la Tabla 3.18 se muestran los resultados de la valoración de las actividades enzimáticas: fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa,  $\beta$ -glucosidasa, celulasa, invertasa y ureasa determinadas en las distintas zonas del vertedero de Torrejón de Ardoz. Con excepción del caso de la actividad celulasa, los valores más elevados de actividad enzimática se detectaron en la zona T8, y correspondieron a las enzimas invertasa, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -glucosidasa y ureasa. Asimismo, es importante mencionar que, al igual que ocurrió con el recuento de bacterias y hongos y la determinación del SIR, los valores de actividad de todas las enzimas estudiadas fueron más elevados en las zonas con menor concentración de compuestos tóxicos (T2B y T8). Además, el descenso de actividad enzimática detectado en las zonas más contaminadas fue estadísticamente significativo para la mayoría de las enzimas estudiadas. Así, se encontraron correlaciones negativas estadísticamente significativas entre la concentración de hidrocarburos del suelo y las actividades enzimáticas: fosfatasa ácida ( $r=-0,73$ ,  $p=0,04$ ), fosfatasa alcalina ( $r=-0,85$ ,  $p=0,01$ ),  $\beta$ -glucosidasa ( $r=-0,71$ ;  $p=0,05$ ),  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa ( $r=-0,86$ ;  $p=0,01$ ), invertasa ( $r=-0,92$ ;  $p=0,001$ ) y ureasa ( $r=-0,94$ ;  $p=0,001$ ). De estos resultados se puede deducir que la actividad microbiana del suelo, estimada mediante la medida de diferentes actividades enzimáticas presentes en el mismo, se relaciona de manera inversa con la concentración de hidrocarburos detectados en las distintas zonas.

**Tabla 3.18.** Valoración de distintas actividades enzimáticas en los suelos del vertedero de Torrejón de Ardoz

Enzima (U/g)	Muestra			
	T2	T2B	T8	T9
<b>Fosfatasa ácida</b>	0,61 $\pm 0,01$	0,76 $\pm 0,01$	2,47 $\pm 0,05$	0,7 $\pm 0,02$
<b>Fosfatasa alcalina</b>	1,35 $\pm 0,08$	4,85 $\pm 0,24$	9,72 $\pm 0,39$	2,90 $\pm 0,18$
<b><math>\beta</math>-glucosidasa</b>	0,59 $\pm 0,07$	1,70 $\pm 0,08$	6,66 $\pm 0,20$	1,94 $\pm 0,09$
<b><math>\beta</math>-N-acetilglucosaminidasa</b>	0,07 $\pm 0,01$	0,17 $\pm 0,01$	0,32 $\pm 0,01$	0,11 $\pm 0,01$
<b>Celulasa</b>	0,08 $\pm 0,00$	0,34 $\pm 0,01$	0,18 $\pm 0,01$	0,18 $\pm 0,01$
<b>Invertasa</b>	7,15 $\pm 0,35$	44,02 $\pm 2,20$	53,75 $\pm 1,55$	18,49 $\pm 0,75$
<b>Ureasa</b>	0,8 $\pm 0,08$	1,9 $\pm 0,10$	2,77 $\pm 0,20$	1,03 $\pm 0,10$

Asimismo, se realizaron análisis estadísticos de correlación entre los distintos parámetros biológicos estudiados, es decir, recuento de bacterias y hongos viables, SIR y actividades enzimáticas. Se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa entre el SIR y las actividades enzimáticas fosfatasa alcalina ( $r=0,81$ ;  $p=0,02$ ),  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa ( $r=0,82$ ;  $p=0,01$ ), invertasa ( $r=0,95$ ;  $p=0,001$ ) y ureasa ( $r=0,91$ ;  $p=0,001$ ). De la misma manera, se observó una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el recuento de bacterias viables y las actividades fosfatasa ácida ( $r=0,99$ ;  $p<0,001$ ), fosfatasa alcalina ( $r=0,96$ ;  $p<0,001$ );  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa ( $r=0,96$ ;  $p<0,001$ );  $\beta$ -glucosidasa ( $r=0,99$ ;  $p=0,001$ ), invertasa ( $r=0,78$ ;  $p=0,02$ ) y ureasa ( $r=0,90$ ;  $p=0,002$ ) y también entre el recuento de hongos viables y las actividades celulasa ( $r=0,91$ ;  $p=0,002$ ) e invertasa ( $r=0,76$ ;  $p=0,03$ ).

Todos estos resultados ponen de manifiesto la existencia de una correlación positiva entre el recuento de microorganismos viables (bacterias y hongos), la respiración inducida por sustrato y la actividad enzimática del suelo. Resultados similares fueron obtenidos para otros suelos por Taylor y col. (2002).

Por último, teniendo en cuenta que las actividades enzimáticas y otros parámetros biológicos, tales como el recuento de viables y la actividad respiratoria, han sido propuestos como biomarcadores de recuperación de suelos afectados por diversas perturbaciones (García y col., 1997; Pascual y col., 2000; Trasar-Cepeda y col., 2000), se podría considerar que las zonas T9 y T2 son las más degradadas del vertedero de Torrejón de Ardoz en el momento estudiado.

### **3.4.1.3. Análisis de la biodiversidad microbiana de los suelos del VRSU de Torrejón de Ardoz mediante técnicas moleculares**

Para la caracterización de la biodiversidad microbiana presente en los suelos de los vertederos se utilizaron las siguientes técnicas: DGGE y clonación del gen codificante para ARNr 16S.

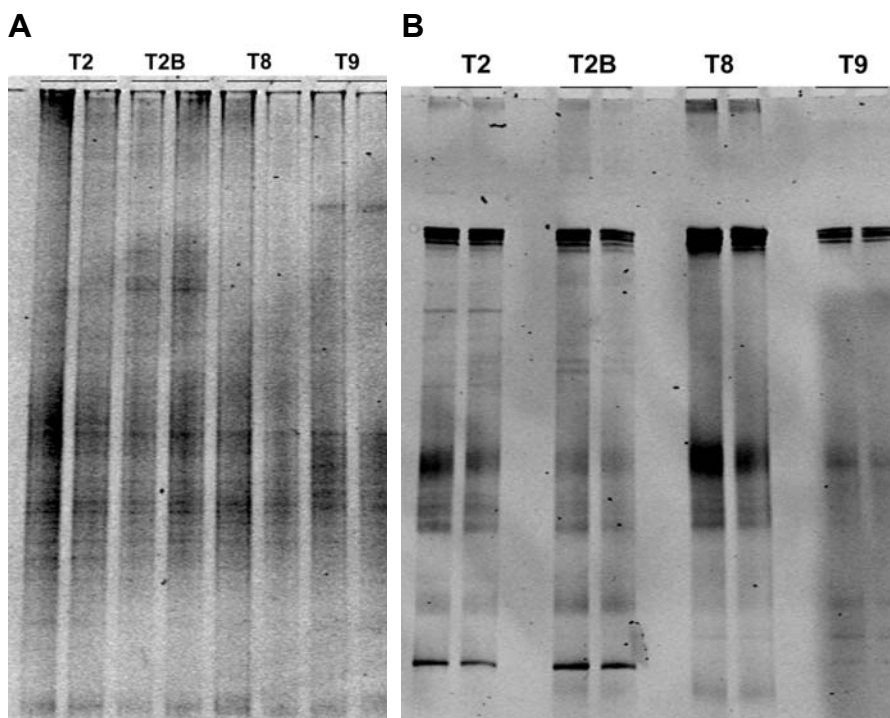
Hemos de señalar que este estudio sólo se llevó a cabo en el vertedero de Torrejón de Ardoz, ya que en el vertedero de Getafe no se pudo demostrar relación alguna entre la concentración de metales pesados asimilables presentes en el suelo, la biomasa y la actividad de los microorganismos del mismo (ver apartados 3.4.2.2).

#### **3.4.1.3.1. Análisis mediante DGGE de los productos de PCR correspondientes a fragmentos de ADNr 16S de *Bacteria* y *Archaea***

En la Figura 3.39 se muestran las fotografías de los perfiles de bandas de las comunidades microbianas pertenecientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea* obtenidos mediante DGGE. Respecto al dominio *Bacteria* (A), se obtuvieron

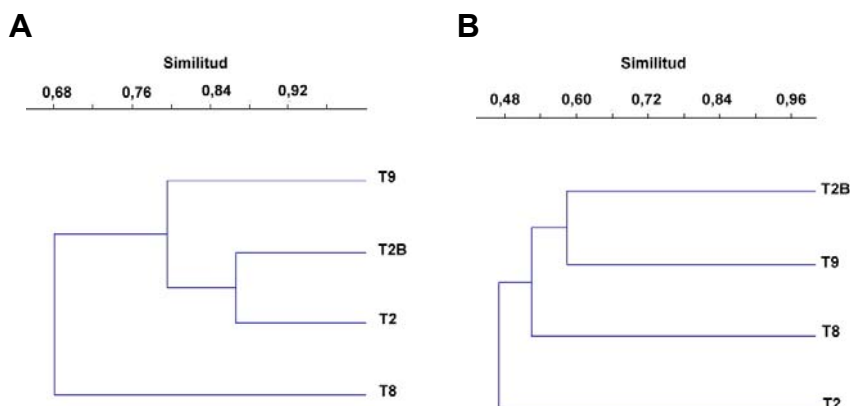


patrones de bandas de ADN diferentes en cada muestra analizada. Podemos observar que la muestra T9 presentó el menor número de bandas, mientras que el mayor número se obtuvo en la muestra T2B. En la fotografía correspondiente al DGGE del dominio *Archaea* (B) se observó el mayor número de bandas en la muestra T8 y el menor en las muestras T2 y T9. Una vez más se pone de manifiesto el efecto negativo de la presencia de contaminantes sobre las poblaciones microbianas presentes en los suelos.



**Figura 3.39.** Fotografías (invertidas) de los perfiles de bandas de ADN correspondientes al dominio *Bacteria* (A) y *Archaea* (B) obtenidos mediante DGGE

Con objeto de poder establecer similitudes entre los patrones de bandas de ADN de las distintas zonas obtenidos mediante DGGE, se realizó un análisis jerárquico de grupos o conglomerados utilizando el coeficiente de Jaccard como índice de similitud. En la Figura 3.40 (A) se muestran los dendrogramas obtenidos a partir del análisis jerárquico de los patrones de bandas de ADN correspondientes al dominio *Bacteria* obtenidos mediante DGGE. Se pueden observar dos grupos: un grupo en el que se incluye la muestra T9 y otro formado por las muestras T2, T2B y T8, siendo las muestras en las que se detectaron los niveles más bajos de hidrocarburos (T2B y T8) las que presentaron mayor similitud (índice de similitud 0,85). La muestra T9 presentó un patrón más diferenciado, determinándose un índice de similitud de 0,7 con las demás muestras.



**Figura 3.40.** Dendrogramas obtenidos a partir del análisis de conglomerados de los perfiles de bandas de ADN obtenidos mediante DGGE utilizando el índice de similitud de Jaccard para los Dominios *Bacteria* y *Archaea* (B)

Además de realizar un análisis jerárquico, se calculó el índice de Shannon de las distintas muestras, como indicador de la biodiversidad de las mismas. En la Tabla 3.19 se muestran los índices de Shannon correspondientes al dominio *Bacteria* calculados mediante el programa PAST. En relación al dominio *Bacteria*, el índice de Shannon más elevado se alcanzó en las muestras T2B y T8 (2,64). Cuando se calculó si existía correlación entre los parámetros índice de Shannon y concentración total de hidrocarburos, se puso de manifiesto una correlación negativa estadísticamente significativa entre dichos parámetros ( $r = -0,79$ ;  $p = 0,02$ ), corroborándose el efecto negativo de la contaminación sobre la diversidad bacteriana del suelo.

**Tabla 3.19:** Índices de Shannon calculados a partir de los patrones de bandas de ADN obtenidos mediante DGGE para los dominios *Bacteria* y *Archaea*

Zona de muestreo	Índice de Shannon	
	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>
T2	2,485	2,079
T2B	2,639	2,709
T8	2,639	2,398
T9	2,565	2,398

En el dendrograma correspondiente al dominio *Archaea* presente en la Figura 3.42 (B), se pueden observar tres grupos. En este caso se comprobó que, a pesar de las diferencias en la concentración de hidrocarburos, las muestras que presentaron mayor similitud fueron la T8 y la T2, si bien el coeficiente de similitud

fue bajo (0,6). La muestra T2B fue la que presentó el patrón de bandas más diferenciado.

Los índices de Shannon correspondientes al dominio *Archaea* se muestran en la Tabla 3.19. En este caso no se observó una correlación estadísticamente significativa entre los índices de Shannon y la concentración de hidrocarburos ( $r=-5,08$ ;  $p=0,20$ ). Por tanto, los resultados obtenidos indican que no existe correlación entre la concentración de contaminantes y la diversidad microbiana correspondiente al dominio *Archaea*.

### 3.4.1.3.2. Análisis de la librería de clones obtenidos mediante clonación del gen codificante para ARNr 16 S del dominio *Bacteria*

#### 3.4.1.3.2.1. Análisis de la idoneidad del número de clones estudiados. Curvas de rarefacción

La caracterización de las comunidades microbianas del dominio *Bacteria* presentes en las distintas zonas del vertedero de Torrejón de Ardoz se llevó a cabo mediante la secuenciación de los clones obtenidos por clonación parcial del gen codificante para ARNr 16S. Estos análisis permiten obtener información complementaria sobre los microorganismos presentes en las muestras estudiadas.

Tras la amplificación por PCR de la región deseada utilizando los cebadores 27F-1492R y la aplicación del protocolo de clonaje, se seleccionaron 100 clones positivos (células transformadas de *E.coli* -colonias blancas-) de cada una de las zonas de muestreo. De estos 400 transformantes, solo en 340 de ellos (85,26 %) se confirmó, mediante PCR, la presencia del inserto (Tabla 3.20).

**Tabla 3.20.** Número de clones seleccionados y confirmados mediante PCR correspondientes a las distintas zonas del VRSU de Torrejón de Ardoz

Zonas	Clones	
	Seleccionados	Confirmados
T2	100	89
T2B	100	71
T8	100	94
T9	100	86
<b>TOTAL</b>	<b>400</b>	<b>340</b>

Los clones positivos se procesaron en el servicio de secuenciación de la Universidad, siendo solo posible la secuenciación de 267, de los cuales únicamente

se obtuvieron 214 secuencias válidas para su identificación, es decir, el 63% de los clones confirmados (340) (Tabla 3.21).

**Tabla 3.21.** Número de secuencias analizadas y número de secuencias válidas utilizadas para su identificación en la base de datos para el dominio *Bacteria*

Zonas	Secuencias	
	Analizadas	Válidas
T2	69	60
T2B	95	59
T8	51	48
T9	52	47
<b>TOTAL</b>	<b>267</b>	<b>214</b>

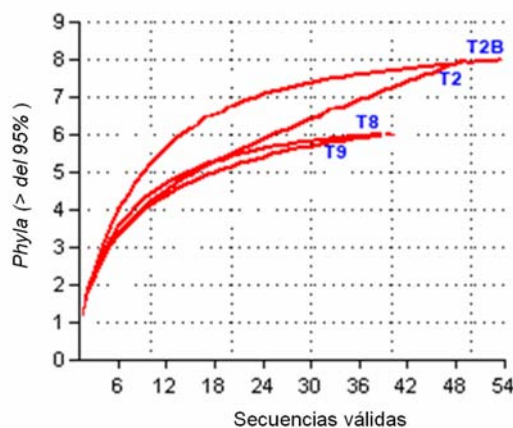
Las secuencias válidas se compararon con las secuencias de la base de datos Ribosomal Data Project. De nuevo, al igual que en el caso de los suelos quemados, para determinar la afiliación filogenética, se estableció un mínimo del 95 % de semejanza de nuestras secuencias con las de la base de datos. En la Tabla 3.22 se muestra el número de secuencias de cada muestra que presentaron porcentajes de similitud > 95 %, entre 94-80 % y < del 80 %. Como se puede observar en la tabla, de las 214 secuencias válidas, 180 (84 %) presentaron porcentajes de similitud > del 95% a nivel de *phyla*. De nuevo se observó que el porcentaje de secuencias que presentaron entre el 94 y 80 % de similitud fue muy bajo (3,73 %) por lo que no se consideró necesario disminuir el porcentaje de similitud.

**Tabla 3.22.** Número de secuencias identificadas según el porcentaje de similitud establecido para el dominio *Bacteria*

Zona de muestreo	Nº de secuencias		
	≥95%	≥94%-80%≤	≤80%
T2	50	2	8
T2B	51	2	6
T8	40	1	7
T9	39	3	5
<b>TOTAL</b>	<b>180</b>	<b>8</b>	<b>26</b>

Al igual que en el caso de los suelos quemados, se construyeron las curvas de rarefacción, lo cual nos permite determinar si el número de secuencias identificadas en cada muestra es suficiente para estudiar la diversidad de dicha muestra. En la Figura 3.41 se muestran las curvas de rarefacción construidas a

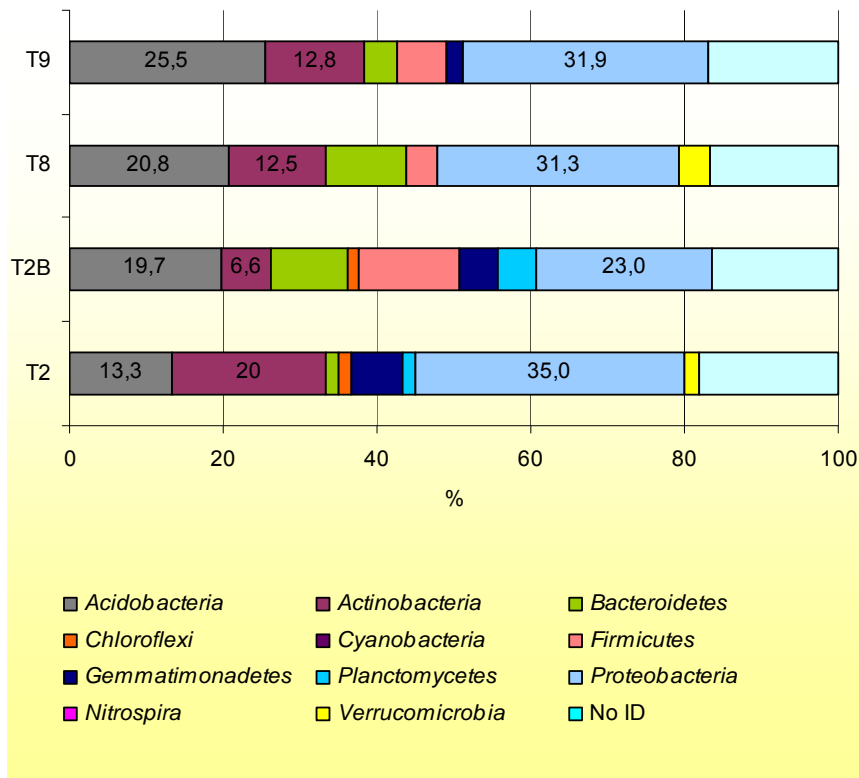
partir de las librerías de clones. Como se puede observar en la figura, las curvas correspondientes a las muestras T2B, T8 y T9 tienden a estabilizarse, lo cual permite deducir que se estudió un número suficiente de secuencias para poder determinar todos los *phyla* presentes en dichas zonas. Por el contrario, en la zona T2 la curva no alcanzó la asíntota, lo que apunta a que la diversidad de esta muestra podría haber sido mayor si hubiéramos analizado mayor número de clones.



**Figura 3.41.** Curvas de rarefacción construidas a partir de las librerías de clones de los suelos del vertedero de Torrejón de Ardoz correspondiente al dominio *Bacteria*

#### 3.4.1.3.2.2. Análisis de las secuencias obtenidas tras la clonación del gen codificante para ARNr 16S del dominio *Bacteria*

En la Figura 3.42 se muestran los *phyla* identificados en cada una de las zonas del vertedero de Torrejón de Ardoz. Se puede comprobar que en todas las muestras los *phyla* mayoritarios fueron: *Proteobacteria* (23-35 %), *Acidobacteria* (13,3-25,5 %) y *Actinobacteria* (6,6-20 %). En la muestra T9 (zona con mayor concentración de hidrocarburos) se identificaron 6 *phyla*, siendo las Proteobacterias (31,9 %) y las Acidobacterias (25,5 %) los grupos más representativos.



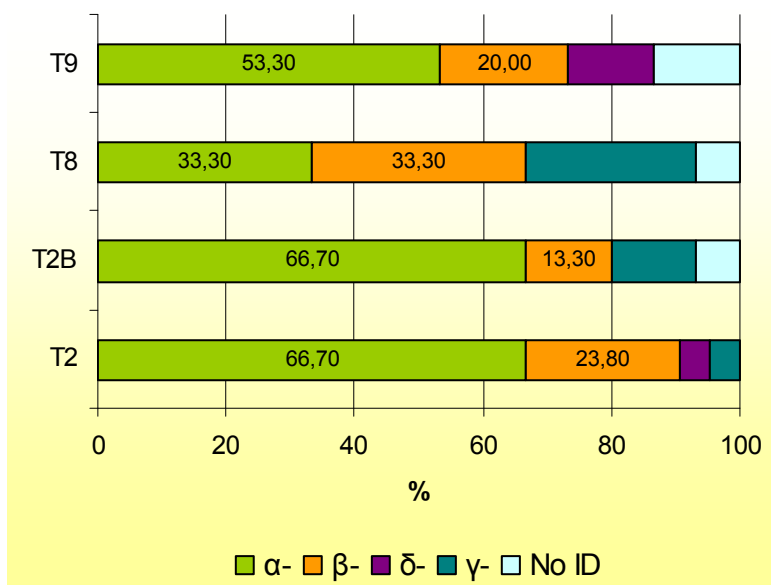
**Figura 3.42.** Distribución porcentual de los *phyla* identificados en las muestras de suelo del VRSU de Torrejón de Ardoz

Los valores del índice de Shannon calculados a partir de las librerías de clones de las distintas zonas se muestran en la Tabla 3.23. Como se puede observar, el suelo T2B presentó el mayor índice de biodiversidad (1,87), mientras que los valores más bajos correspondieron a las zonas T9 y T2 (1,481 y 1,558, respectivamente).

**Tabla 3.23.** Índices de Shannon calculados a partir de las librerías de clones de las muestras de suelo del VRSU de Torrejón de Ardoz

Zona de muestreo	Índice de Shannon
T2	1,558
T2B	1,870
T8	1,579
T9	1,481

Como se ha mencionado anteriormente, el grupo predominante en todas las muestras fue el *phylum Proteobacteria*. De hecho, se identificaron  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -*Proteobacteria*, siendo las  $\alpha$ -*Proteobacteria* el grupo taxonómico más abundante en todas las muestras (T2: 66,70 %; T2B: 66,70 %; T8: 33,33 %; T9: 53,30 %). En la muestra T8 se observó la misma proporción de  $\beta$ -*Proteobacteria* que de  $\alpha$ -*Proteobacteria* (33,33%). Sólo en la muestra T9 se observó una alta presencia de bacterias pertenecientes al grupo taxonómico  $\delta$ -*Proteobacteria* (13,33 %) (Figura 3.43). En el grupo de las  $\alpha$ -*Proteobacteria*, los órdenes *Rhizobiales* y *Sphingomonadales* fueron los más abundantes.



**Figura 3.43.** Distribución porcentual de los grupos filogenéticos del *phylum Proteobacteria* en los suelos del VRSU de Torrejón de Ardoz

Una vez caracterizados los *phyla* se pudieron identificar algunos géneros a partir de las secuencias analizadas (con más del 85% de similitud):

-*Proteobacteria*: *Sphingosinicella*, *Rhizobium*, *Microvirga*, *Mesorhizobium* y *Hermiimonas* (en T2); *Microvirga*, *Devosia* y *Herbaspirillum* (en T9); *Amaricoccus*, *Skermanella* y *Massilia* (en T8) y *Devosia* y *Skermanella* (en T2B).

-*Actinobacteria*: *Conexibacter*, *Arthrobacter*, *Modestobacter*, *Couchioplanes* y *Criobacterium* (en T2); *Marmoricola* y *Conexibacter* (en T9); *Pseudonocardia* y *Microbacterium* (en T8) y *Arthrobacter* y *Rubrobacter* (T2B).

En las 4 muestras analizadas, todas las secuencias pertenecientes al *phylum Acidobacteria* pertenecen a la familia *Acidobacteriaceae*. A pesar de que algunas secuencias no podían asignarse a un género específico, se observó una mayor abundancia de algunos de ellos en muestras específicas. Así, Gp4, Gp6 y Gp10 se encontraron en mayor proporción en las muestras T2 y T9, mientras que Gp6, Gp7

y Gp10 en T8 y T2B. En las muestras T8 y T2B no se observaron secuencias pertenecientes a Gp4, mientras que en la muestra T9 no se detectó Gp7.

Los resultados obtenidos demuestran que en todas las muestras de suelo del vertedero de Torrejón de Ardoz se detectó la presencia de grupos microbianos descritos en la bibliografía como degradadores de hidrocarburos alifáticos y aromáticos (i.e. *Mesorhizobium*, *Pseudonocardia*, *Arthrobacter*) (Jain y col., 2005; Seo y col., 2007; Kostka y col., 2011). Sin embargo, en el estudio realizado no es posible concluir que los microorganismos detectados estén involucrados en la degradación de los hidrocarburos presentes en las distintas zonas del vertedero. A partir de los resultados obtenidos, sería recomendable realizar cultivos específicos de las cepas identificadas para estudiar sus capacidades metabólicas.

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren una clara relación entre la presencia de contaminantes y la actividad y diversidad microbianas. De hecho, los valores más bajos de biomasa y de actividad enzimática se observaron en las muestras con una mayor concentración de componentes tóxicos (muestras T9 y T2). Sin embargo, a partir de estos resultados, no se puede establecer una relación clara entre los *phyla* y los géneros identificados y la concentración de contaminantes.

### **3.4.2. Análisis del suelo del vertedero de Getafe**

#### **3.4.2.1. Caracterización físico-química**

Los resultados de la determinación de los parámetros físico-químicos correspondientes a las muestras de suelo del vertedero de Getafe se muestran en la Tabla 3.24 y en la Figura 3.46.

##### **3.4.2.1.1. Determinación de la concentración de metales pesados asimilables**

La concentración total de metales pesados en el suelo es un valor útil como índice global de contaminación, pero no proporciona información con respecto a su movilidad y biodisponibilidad. Sin embargo, la presencia de metales pesados asimilables o biodisponibles en el suelo proporciona una información más valiosa respecto a su comportamiento en el suelo (riesgo de contaminación del agua y riesgo para la salud, vía la cadena alimentaria). Puesto que se tenía constancia de la presencia de metales pesados en los suelos del vertedero de Getafe, se llevó a cabo la determinación del contenido en metales pesados asimilables en 4 zonas del vertedero: G1, G2, G3 y G4. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.24. Las concentraciones más elevadas se detectaron en la zona G4 y correspondieron a los metales Cu (32,19 ppm), Zn (11,06 ppm) y Pb (4,3 ppm). Estos valores se encuentran por encima del valor de fitotoxicidad (5 ppm para el



Cu y 2 ppm para el Zn) descrito por Rojo y colaboradores (2002). Destaca, además, la elevada concentración de Zn detectada en las zonas G1 (5,50 ppm) y G2 (8,87 ppm), así como las concentraciones de Pb, cercanas al valor de fitotoxicidad (5 ppm), detectadas en las zonas G2 (4,21 ppm) y G4 (4,30 ppm).

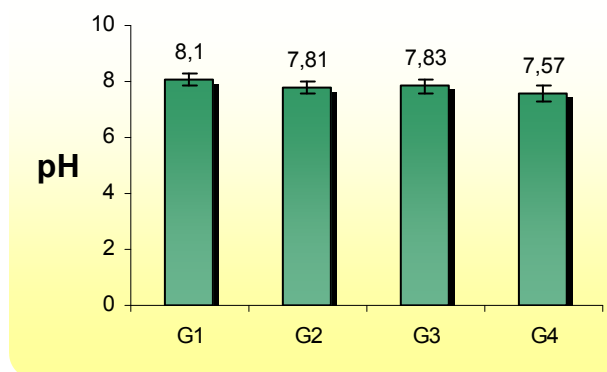
**Tabla 3.24.** Contenido en metales pesados asimilables (ppm) en las muestras de suelo del vertedero de Getafe. Desviación estándar  $\pm 5\%$

Zona de muestreo	Metales pesados asimilables (ppm)			
	Cu	Ni	Pb	Zn
G1	0,60	0,04	2,47	5,50
G2	0,97	0,04	4,21	8,87
G3	0,19	0,05	1,09	0,32
G4	32,19	0,32	4,30	11,06

### 3.4.2.1.2. pH

Los valores de pH correspondientes a las distintas zonas del vertedero de Getafe se muestran en la Figura 3.44. Como se puede observar, los valores de pH detectados fueron ligeramente alcalinos, si bien, en este vertedero, se observó un mayor margen de variación de los mismos que en el vertedero de Torrejón de Ardoz.

Mediante la realización de los análisis estadísticos, no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre el pH y la concentración de ninguno de los metales pesados (Cu:  $r=-0,530$ ;  $p=0,76$ ; Ni:  $r=-0,518$ ;  $p=0,085$ ; Pb:  $r=0,-279$ ;  $p=0,380$ ; Zn:  $r=-0,292$ ;  $p=0,358$ ).



**Figura 3.44.** Valores de pH de los suelos del vertedero de Getafe

Se ha descrito que el pH del suelo puede influir en la solubilidad de los metales y que la presencia de metales pesados condiciona el valor del pH. Así, en

algunos estudios se ha observado una disminución del pH en suelos contaminados con metales pesados (Speir y col., 1999; Boivin y col., 2006); sin embargo, en suelos contaminados con metales específicos, tales como cobre y cinc, se detectó un aumento del pH de suelo en presencia de dichos metales (Klimek, 2012).

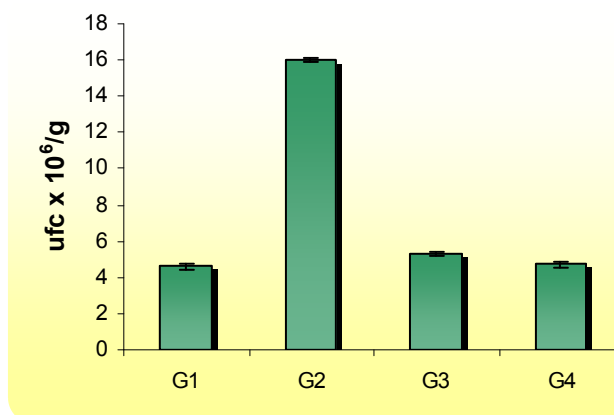
### **3.4.2.2. Caracterización biológica**

#### **3.4.2.2.1. Recuento en placa de bacterias viables**

Los resultados correspondientes al recuento de bacterias viables a 28 °C presentes en las distintas zonas del vertedero de Getafe se muestran en el Figura 3.45.

Como se puede observar, se determinó un mayor número de bacterias viables en la muestra correspondiente a la zona G2 del vertedero que en el resto de las zonas estudiadas, a pesar de que la concentración de Zn asimilable encontrada en esta zona es relativamente elevada (8,87 ppm). Este resultado podría ser atribuido a que la zona G2 presentó los niveles más elevados de carbono total (4,06 %) y nitrógeno total (0,33 %), (datos no mostrados), macronutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos, y también de materia orgánica (7,01%), factores que podrían estar ejerciendo un efecto protector frente a los distintos metales pesados, tal como ha sido descrito por Babich y Stotzky (1982).

A pesar de que las concentraciones de Cu (32,19 ppm) y Zn (11,06 ppm) asimilables detectadas en la zona G4 superan los límites fitotóxicos establecidos y que la de Pb (4,30 ppm) se encuentra muy cercana al límite, el recuento de bacterias viables de esta zona no parece diferir significativamente del correspondiente a las zonas G1 y G3, donde la concentración de metales descritos era mucho más baja.



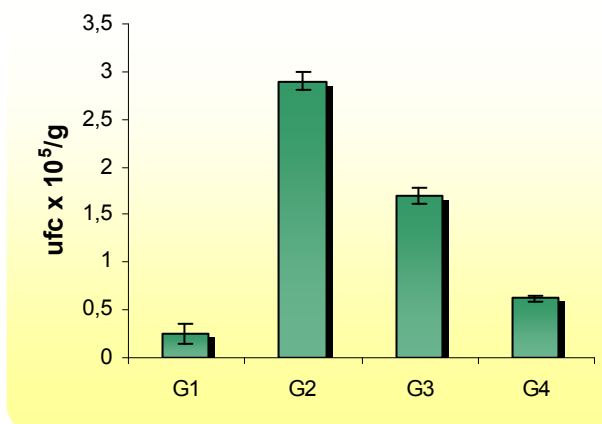
**Figura 3.45.** Recuento de bacterias viables (ufc/g de suelo) de las muestras de suelo del vertedero de Getafe

En este caso, los análisis estadísticos realizados no mostraron correlaciones estadísticamente significativas entre el número de bacterias viables y la concentración de ninguno de los metales analizados presentes en el suelo.

#### 3.4.2.2.2. Recuento en placa de hongos viables

Los resultados correspondientes al recuento de hongos viables presentes en las distintas zonas del vertedero de Getafe se muestran en la Figura 3.46. Al igual que se observó en el recuento de bacterias viables, es también la muestra G2 en la que se detectaron los recuentos más elevados de hongos viables. Además, del mismo modo que en el caso del recuento de bacterias viables, no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre el número de ufc g<sup>-1</sup> de hongos y la concentración de ninguno de los metales pesados analizados.

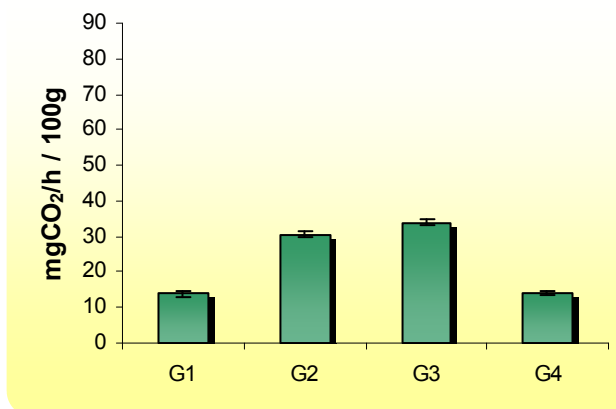
Como ya se ha discutido en el apartado anterior, es probable que la mayor concentración de carbono, nitrógeno y materia orgánica presentes en la zona G2 facilite el crecimiento de las poblaciones de hongos presentes en esa zona, en comparación con lo que ocurre en las zonas G1, G3 y G4.



**Figura 3.46.** Recuento de hongos viables (ufc/g de suelo) de las muestras de suelo del vertedero de Getafe

### 3.4.2.2.3. Respiración inducida por sustrato (SIR)

En la Figura 3.47 se muestran los resultados de la determinación de la respiración inducida por sustrato correspondiente a las diferentes zonas estudiadas.



**Figura 3.47.** Respiración inducida por sustrato (mg CO<sub>2</sub>/h/100 g) de los suelos del vertedero de Getafe

Como se puede observar, al igual que ocurrió con el recuento de bacterias y hongos viables, fueron las muestras G2 y G3 las que presentaron los valores más elevados de este parámetro (30,6 y 34 mg CO<sub>2</sub>/h/100 g, respectivamente), encontrándose una correlación positiva estadísticamente significativa entre los parámetros SIR y el recuento de hongos viables ( $r=0,84$ ;  $p=0,001$ ). En este

vertedero no se ha podido demostrar la influencia de la presencia de los metales pesados analizados sobre la biomasa y/o actividad de los microorganismos del suelo. Del mismo modo, los análisis estadísticos no mostraron correlación estadísticamente significativa entre el SIR y la concentración de ninguno de los metales pesados analizados (Cu:  $r=-0,567$ ,  $p= 0,06$ ; Ni:  $-0,544$ ,  $p= 0,068$ ; Pb:  $r= -0,368$ ,  $p= 0,239$ ; Zn:  $-0,537$ ,  $p= 0,072$ ).

#### 3.4.2.2.4. Actividades enzimáticas

En la Tabla 3.25 se presentan los resultados correspondientes a las actividades enzimáticas valoradas en las diferentes zonas del vertedero de Getafe. Los valores más elevados de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -glucosidasa y ureasa correspondieron a la zona G2, mientras que los valores más elevados de actividad  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa e invertasa se detectaron en la zona G3. Por el contrario, las muestras G1 y G4 presentaron los niveles de actividad más bajos de las enzimas fosfatasa alcalina,  $\beta$ -glucosidasa, invertasa y ureasa.

Es importante mencionar, que fue también en estas zonas, principalmente en la zona G4, donde se detectaron los niveles más elevados de metales pesados (Tabla 3.24). Estos resultados estarían en consonancia con lo descrito por Sastre y colaboradores (1996) para las actividades  $\beta$ -glucosidasa e invertasa, actividades que se muestran especialmente sensibles a la presencia de agroquímicos y metales pesados. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico de correlaciones entre las actividades enzimáticas y cada uno de los metales pesados, únicamente se encontraron correlaciones negativas estadísticamente significativas entre la actividad  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa y los metales cobre ( $r= -0,70$ ;  $p= 0,01$ ), níquel ( $r=-0,66$ ;  $p= 0,02$ ), plomo ( $r=-0,91$ ;  $p<0,001$ ) y zinc ( $r=-0,97$ ;  $p<0,001$ ). La actividad invertasa presentó una correlación negativa y significativa con los metales cobre ( $r=-0,61$ ;  $p=0,04$ ), níquel ( $r=-0,58$ ;  $p=0,05$ ) y zinc ( $r=-0,67$ ;  $p=0,02$ ). No se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas entre las actividades enzimáticas fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -glucosidasa y ureasa y los metales pesados estudiados. En el caso de la actividad celulasa se encontró una correlación positiva y significativa con el cobre ( $r=0,88$ ;  $p<0,001$ ) y el níquel ( $r=0,89$ ;  $p<0,001$ ).

**Tabla 3.25.** Valoración de distintas actividades enzimáticas en los suelos del vertedero de Getafe

Enzima (U/g)	Muestra			
	G1	G2	G3	G4
<b>Fosfatasa ácida</b>	0,37 ±0,02	1,71 ±0,09	0,54 ±0,02	0,54 ±0,02
<b>Fosfatasa alcalina</b>	1,37 ±0,07	3,88 ±0,12	3,34 ±0,08	2,26 ±0,09
<b>β-glucosidasa</b>	0,46 ±0,03	3,90 ±0,11	2,61 ±0,10	1,13 ±0,04
<b>β-N-acetilglucosaminidasa</b>	0,20 ±0,01	0,17 ±0,01	0,31 ±0,02	0,11 ±0,01
<b>Celulasa</b>	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,00
<b>Invertasa</b>	20,25 ±0,81	42,97 ±1,07	55,69 ±1,67	17,45 ±0,87
<b>Ureasa</b>	0,82 ±0,04	1,23 ±0,05	1,03 ±0,06	1,00 ±0,05

Los resultados obtenidos permiten concluir que en el caso del vertedero de Getafe no se ha encontrado una relación inversa entre la presencia de metales pesados y la actividad enzimática de los microorganismos. En este vertedero, por tanto, no se ha podido demostrar la influencia de los metales pesados estudiados ni sobre la biomasa ni sobre la actividad de los microorganismos del suelo.

En la bibliografía consultada no queda bien definido el comportamiento de los microorganismos frente a la presencia de metales pesados. Así en un estudio realizado por Liu y colaboradores (2012) en campos de arroz contaminados con metales pesados, principalmente Cd, Pb, Cu y Zn, no se observaron diferencias significativas en cuanto al contenido en carbono, nitrógeno o bacterias viables, detectando, sin embargo, una disminución significativa en el recuento de hongos y un aumento en la respiración basal en los suelos contaminados. En otro estudio realizado por Nordgren y colaboradores (1983) se describen resultados similares en cuanto al efecto de los metales pesados sobre el recuento de hongos, sin que aparentemente se hubieran producido cambios en la abundancia y diversidad de la comunidad bacteriana. Estos estudios ponen de manifiesto la diferente sensibilidad de ambos grupos de microorganismos al tipo y concentración de metales pesados presentes en el suelo. En contraste, en el estudio realizado por nosotros, los análisis de los resultados obtenidos no mostraron una correlación estadística significativa,

lo cual pone de manifiesto que no existe una relación directa entre la presencia y concentración de metales pesados y la microbiota presente en los suelos del vertedero de Getafe.

Por otro lado, se ha descrito que la presencia de metales pesados produce una disminución de la biomasa y la actividad microbiana del suelo, así como cambios en la estructura de la comunidad microbiana; sin embargo, en suelos considerados crónicamente contaminados con metales pesados, se ha observado que los microorganismos llegan a adaptarse a estas condiciones mediante diversos mecanismos. Entre éstos, cabe destacar el fenómeno denominado tolerancia comunitaria inducida por contaminación (PICT, pollution-induced community tolerance), lo cual significa que las poblaciones microbianas del suelo pueden adaptarse a altas concentraciones de metales pesados mediante selección de los organismos más resistentes, aclimatación fisiológica y adaptación genética (Klimek, 2012).

Por último, al igual que en el vertedero de Torrejón de Ardoz, se realizaron análisis estadísticos de correlación entre los parámetros biológicos estudiados, es decir, recuento de bacterias, recuento de hongos, SIR y actividades enzimáticas. En este sentido se han encontrado correlaciones positivas estadísticamente significativas entre el número de bacterias viables y las actividades enzimáticas fosfatasa ácida ( $r=0,99$ ;  $p<0,001$ ), fosfatasa alcalina ( $r=0,73$ ;  $p=0,01$ ),  $\beta$ -glucosidasa ( $r=0,84$ ;  $p<0,001$ ) y ureasa ( $r=0,83$ ;  $p<0,001$ ). Una situación muy similar se observa en las correlaciones encontradas entre el número de hongos viables y las actividades enzimáticas fosfatasa ácida ( $r=0,90$ ;  $p=0,00$ ), fosfatasa alcalina ( $r=0,96$ ;  $p<0,001$ ),  $\beta$ -glucosidasa ( $r=0,99$ ;  $p<0,001$ ), invertasa ( $r=0,74$ ;  $p=0,01$ ) y ureasa ( $r=0,92$ ;  $p<0,001$ ).

Por otra parte, también se obtuvieron correlaciones positivas y significativas entre el SIR y las actividades enzimáticas fosfatasa alcalina ( $r=0,90$ ;  $p<0,001$ ),  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa ( $r=0,87$ ;  $p<0,001$ ),  $\beta$ -glucosidasa ( $r=0,87$ ;  $p<0,001$ ), invertasa ( $r=0,99$ ;  $p<0,001$ ) y ureasa ( $r=0,68$ ;  $p=0,02$ ).

Se demuestra nuevamente la existencia de una relación directa entre los parámetros: recuento de microorganismos viables (bacterias y hongos), respiración inducida por sustrato y la mayoría de las actividades enzimáticas estudiadas, lo que permite deducir que estos parámetros pueden ser utilizados como biomarcadores de degradación de un suelo.







## 4. Conclusiones



## 4.1

---

### Conclusiones generales

1. El análisis detallado de los resultados obtenidos de las distintas áreas incendiadas permite concluir que el efecto del fuego sobre la actividad microbiana del suelo está condicionado por factores de partida tan importantes como: tipo de suelo y cubierta vegetal, intensidad y/o severidad del incendio, tiempo de muestreo, pluviosidad registrada en la zona, situación de las áreas de muestreo, número de incendios registrados, etc. Debido a estos condicionantes resulta difícil establecer, a partir de los datos obtenidos, resultados extrapolables a todos los escenarios analizados, siendo necesario restringir el número de variables en cada zona seleccionada para poder obtener resultados de utilidad a efectos comparativos.
2. El estudio del efecto de los dos factores potencialmente perturbadores del equilibrio del ecosistema suelo (incendios forestales y contaminantes químicos) sobre la actividad y diversidad microbiana, no permite extraer resultados concluyentes para ambos factores, ya que únicamente en el caso de los suelos de VRSU de Torrejón de Ardoz, en los que la única variable considerada fue la concentración de hidrocarburos, el efecto del agente perturbador se mostró determinante sobre la actividad y biodiversidad microbiana.

## 4.2

---

### Conclusiones específicas

#### 4.2.1. Efecto del fuego sobre distintos parámetros indicadores de la salud del suelo

3. Del estudio realizado se puede deducir que en la mayoría de los suelos se produce por efecto del fuego un aumento de la biomasa microbiana y de la actividad respiratoria, lo que puede ser una consecuencia del impacto del incendio sobre la cubierta vegetal, que a su vez produjo un enriquecimiento de carbono total oxidable y/o de nitrógeno total, según se pudo comprobar en los análisis efectuados.
4. La pauta de comportamiento de las enzimas analizadas frente al fuego, pone de manifiesto que no existe un patrón uniforme en los distintos escenarios estudiados, particularmente en el caso de las actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo del carbono. Cabe señalar no

obstante, que la actividad fosfatasa en los suelos quemados analizados fue siempre más elevada que en los respectivos controles, mientras que en el caso de la actividad ureasa, el comportamiento fue el contrario.

#### 4.2.2. Efecto del fuego sobre la diversidad microbiana

5. En los suelos de la zona de Aznalcóllar los valores de índice de Shannon obtenidos a partir de los resultados de la DGGE ponen de manifiesto una mayor diversidad, tanto del dominio *Bacteria* como del dominio *Archaea* en los suelos quemados, en comparación con los controles. Asimismo, el análisis de los dendrogramas obtenidos refleja que el incendio ha condicionado únicamente el patrón de bandas de ADN obtenido mediante DGGE del dominio *Bacteria*, ya que la similitud encontrada entre los patrones de bandas del suelo control y los suelos quemados fue baja.
6. En el caso de los suelos correspondientes al área de Cazorla, en los que se realizaron tres análisis consecutivos en diferentes años en cada una de las zonas muestreadas, los resultados del índice de Shannon reflejan una mayor o menor diversidad microbiana dependiendo del año de muestreo y del área muestreada. Los dendrogramas obtenidos a partir del análisis de conglomerados de los patrones de bandas de ADN, obtenidos mediante DGGE, indican que el fuego ejerció un efecto más directo sobre el dominio *Archaea* que sobre el dominio *Bacteria*, ya que en el caso de las arqueas, las muestras se agruparon en función de su procedencia (suelo control o quemado), en las dos zonas analizadas.
7. En los suelos de Tenerife correspondientes a cuatro áreas diferentes y a dos épocas de muestreo (antes y después de las lluvias) resulta difícil extraer conclusiones acerca de la influencia del incendio sobre la biodiversidad microbiana analizada por DGGE. De hecho, se ha podido constatar que en algunas de las zonas muestreadas afectadas por el incendio el número de bandas de ADN resultó mayor que en el control, lo que refleja una mayor diversidad, mientras que en otras, el efecto del fuego se traduce en una disminución de la misma o no parece afectar a este parámetro. Del mismo modo, en los dendrogramas obtenidos a partir del análisis de conglomerados de los patrones de bandas de ADN obtenidos mediante DGGE, tampoco se observa una influencia clara del efecto del fuego sobre el agrupamiento de las muestras, ya que los índices de similitud de Jaccard no mostraron diferencias entre los suelos control y quemados.
8. Los perfiles de las curvas de rarefacción correspondientes a las librerías de clones obtenidos tras la clonación del gen codificante para ARNr 16S del dominio *Bacteria*, ponen de manifiesto que no en todas las muestras se secuenció el número de clones suficiente para poder identificar todos los

*phyla* presentes en las mismas. No obstante, el estudio realizado permitió identificar en cada una de las muestras diferentes *phyla* e incluso géneros específicos, siempre y cuando presentaran más de un 85% de similitud en su secuencia con las publicadas en las bases de datos.

9. El análisis de las secuencias correspondientes a los clones obtenidos a partir de la amplificación del gen codificante para el ARNr 16S permite deducir que existe una amplia variación en el número de *phyla* en las diferentes muestras de suelo control y quemados analizados, si bien en todas las zonas estudiadas los grupos mayoritarios se corresponden con los *phyla* *Proteobacteria*, *Acidobacteria* y *Actinobacteria*.
10. La identificación a nivel de género a la que se ha podido llegar por comparación de las secuencias analizadas con las publicadas en la base de datos RDP, no permite establecer diferencias entre los suelos control y quemados, ya que en la mayor parte de los casos se identificaron los mismos géneros.

#### **4.2.3. Efecto de los contaminantes presentes en suelos de VRSU sobre la actividad y la diversidad microbiana**

11. Los resultados obtenidos sobre el efecto de los hidrocarburos presentes en el suelo del VRSU de Torrejón de Ardoz ponen de manifiesto que existe una relación directa entre la concentración de contaminantes y la actividad y biodiversidad microbiana. De hecho, los valores más bajos de biomasa y de actividad enzimática corresponden a las zonas con mayor concentración de hidrocarburos (muestras T9 y T2). Sin embargo, del estudio realizado, no se ha podido establecer una relación clara entre los *phyla* y géneros identificados en las distintas muestras de suelo y la concentración de contaminantes presente en las mismas.
12. En el análisis de los suelos procedentes del VRSU de Getafe no se ha podido demostrar la influencia de la presencia de metales pesados sobre la biomasa y/o actividad de los microorganismos del suelo, posiblemente debido a que su concentración no alcanza el umbral de toxicidad necesario para ser efectiva o a que los microorganismos se hayan adaptado y sobrevivan en presencia de los metales pesados de dichos suelos.





## 5. Bibliografía





## 5

**Bibliografía**

---

1. Adams, M.A. (1992). Phosphatase activity and phosphorus fractions in Karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) forest soils. *Biol. Fertil. Soils*. 14, 200–204.
2. Aiwa, J.A., Dell, C.J. y Rice, C.W. (1999). Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soils as related to burning and nitrogen fertilization. *Soil Biol. Biochem.* 31, 769–777.
3. Almendros, G., Polo, A., Ibáñez, J.J. y Lobo, M.C. (1984a). Contribución al estudio de la influencia de los incendios forestales en las características de la materia orgánica del suelo. I: Transformaciones del humus en un bosque de *Pinus pinea* del centro de España. *Rev Écol Biol Sol.* 21:7–20.
4. Almendros, G., Polo, A., Lobo, M.C. e Ibáñez, J.J. (1984b). Contribución al estudio de la influencia de los incendios forestales en las características de la materia orgánica del suelo: II. Transformaciones del humus por ignición en condiciones controladas de laboratorio. *Rev Ecol Biol Sol.* 21:154–60.
5. Almendros, G., Knicker, H. y González-Vila, F.J. (2003). Rearrangement of carbon and nitrogen forms in peat after progressive thermal oxidation as determined by solid-state <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-NMR spectroscopy. *Org. Geochem.* 34, 1559–1568.
6. Arias, M.E., Gonzalez-Perez, J.A., Gonzalez-Vila, F.J. y Ball, A.S. (2005). Soil health -- a new challenge for microbiologists and chemists. *Int. Microbiol.* 8, 13–21.
7. Armougom, F. y Raoult, D. (2008). Use of pyrosequencing and DNA barcodes to monitor variations in Firmicutes and Bacteroidetes communities in the gut microbiota of obese humans. *BMC Genomics.* 9, 576.
8. Babich, H. y Stotzky, G. (1982). Nickel toxicity to fungi: influence of environmental factors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 6, 577–589.
9. Bárcenas-Moreno, G., García-Orenes, F., Mataix-Solera, J., Mataix Beneyto, J. y Bååth, E. (2011). Soil microbial recolonisation after fire in a Mediterranean forest. *Biol Fert Soils.* 47:261-272.

10. Bååth, E. (1998). Growth Rates of Bacterial Communities in Soils at Varying pH: A Comparison of the Thymidine y Leucine Incorporation Techniques. *Microb Ecol.* 36, 316–327.
11. Baker, G.C., Smith, J.J. y Cowan, D.A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods.* 55: 541-555.
12. Baun, A., Jensen, S.D., Bjerg, P.L., Christensen, T.H. y Nyholm, N. (2000). Toxicity of organic chemical pollution in ground-water downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Sci. Technol.* 34:1647-1652.
13. Bjorklof, K., Karlsson, S., Frostegard, A. y Jørgensen, K.S. (2009). Presence of Actinobacterial and Fungal Communities in Clean and Petroleum Hydrocarbon Contaminated Subsurface Soil. *Open Microbiol. J.* 3, 75–86.
14. Boerner, R.E.J., Decker, K.L.M. y Sutherland, E.K. (2000). Prescribed burning effects on soil enzyme activity in a southern Ohio hardwood forest: a landscape-scale analysis. *Soil Biol. Biochem.* 32, 899–908.
15. Boerner, R.E.J. y Brinkman, J.A. (2003). Fire frequency and soil enzyme activity in southern Ohio oak–hickory forests. *Appl. Soil Ecol.* 23, 137–146.
16. Boerner, R.E.J., Brinkman, J.A. y Smith, A. (2005). Seasonal variations in enzyme activity and organic carbon in soil of a burned and unburned hardwood forest. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1419–1426.
17. Bossio, D.A., Scow, K.M., Gunapala, N. y Graham, K.J. (1998). Determinants of Soil Microbial Communities: Effects of Agricultural Management, Season, and Soil Type on Phospholipid Fatty Acid Profiles. *Microb Ecol.* 36, 1–12.
18. Brons, J.K. y van Elsas, J.D. (2008). Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2717–2727.
19. Certini, G. (2005). Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia.* 143, 1–10.

20. Cho, J.C., Lee D.H., Cho, Y.C., Cho, J.C. y Kim, S.J. (1996). Direct extraction of DNA from soil for amplification of 16S rRNA gene sequences by polymerase chain reaction. *J. Microbiol.* 34(3): 229-235.
21. Choromanska, U. y DeLuca, T.H. (2002). Microbial activity and nitrogen mineralization in forest mineral soils following heating: evaluation of post-fire effects. *Soil Biol. Biochem.* 34, 263–271.
22. Clarridge, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 840–862.
23. Costa, R., Gomes, N.C.M., Milling, A. y Smalla, K. (2004). An optimized protocol for simultaneous extraction of DNA and RNA from soils. *Braz. J. Microbiol.* 35, 230–234.
24. De la Rosa, D.A., Teutli, M.M. y Ramírez M.E. (2007). Electrorremediación de suelos contaminados, una revisión técnica para su aplicación en campo. *Rev. Int. Contam.Ambient.* 23(3):129-138.
25. Deka, H.K. y Mishra, R.R. (1983). The effect of slash burning on soil microflora. *Plant Soil.* 73, 167–175.
26. Demmerová, K., Mackova, M., Speváková, V., Beranová, K., Kochánková, L., Lovecká, P., Ryslavá, E. y Macek, T. (2005). Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics-characterization of microbial populations. *International Microbiology.* 8(3): 1-12.
27. Dick R.P., Breakwell, D.P. y Turco, R.F. (1996). Soil enzyme activities y biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. En: *Methods for assesing soil quality.* Doran J.W. y Jones, A.J. (eds.). Soil Sci Soc Am. pp 107- 121.
28. Díez, B; Pédroso-Alió,C; Marsh, T. y Massana, R. (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparisson of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(7): 2942-2951.
29. Doran, J.W. y Safley, M. (1997). Defining and assesing soil health and sustainable productivity. En: *Biological indicators of soil health.* Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (eds.). CAB International. pp. 1-28.

30. Duineveld, B.M., Kowalchuk, G.A., Keijzer, A., Van Elsas, J.D. y Van Veen, J.A. (2001). Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 172–178.
31. Eivasi, F. y Bayan, M.R. (1996). Effects of long-term prescribed burning on the activity of selected soil enzymes in an oak-hickory forest. *Can. J. For. Res.* 26, 1799–1804.
32. Ekinci, H. (2006). Effect of forest fire on some physical, chemical and biological Properties of soil in Canakkale, Turkey. *Int. J. Agric. Biol.* 8(1):102-106.
33. Elliot, L.F., Lynch, J.M. y Papendick, R.I. (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.
34. Etiégni, L. y Campbell, A.G. (1991). Physical and chemical characteristics of wood ash. *Bioresour. Technol.* 37, 173–178.
35. Everett, R.L., Java-Sharpe, B.J., Scherer, G.R., Wilt, F.M. y Ottmar, R.D. (1995). Co-Occurrence of Hydrophobicity and Allelopathy in Sand Pits under Burned Slash. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59, 1176–1183.
36. Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R., Robeson, M., Edwards, R.A., Felts, B., Rayhawk, S. (2007). Metagenomic and Small-Subunit rRNA Analyses Reveal the Genetic Diversity of *Bacteria*, *Archaea*, Fungi, and Viruses in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7059–7066.
37. Fortin, N., Beaumier, D., Lee, K. y Greer, C. (2004). Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *J Microbiol Methods.* 56, 181–191.
38. Frackman, S., Kobs, G., Simpson, D. y Storts, D. (1998). Betaine and DMSO: Enhancing agents for PCR. *Promega Notes.* 65: 27-30).
39. Frostegård, A. y Bååth, E. (1996). The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol Fert Soils.* 22, 59–65.

40. García, C., Hernández, T. y Costa, F. (1997). Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 28, 123-134.
41. García Álvarez, A. e Ibáñez, J.J., 1994. Seasonal fluctuations and crop influence on microbiota and enzyme activity in fully developed soils of central Spain *Arid Soil. Res. Rehabil.* 8, 161-178.
42. Giller, K.E. y Wilson, K.J. (1991). Nitrogen fixation in tropical cropping systems (C.A.B. International).
43. Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M. y Ball, A.S. (2003). Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1800–1809.
44. González, E. (2005). Ecología microbiana molecular. En: Marín, I., Sanz, J.L. y Amils, R. (eds.) *Biocología y medioambiente*. Editorial ephemera. Madrid, España.
45. González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Almendros, G. y Knicker, H. (2004). The effect of fire on soil organic matter--a review. *Environ. Int.* 30, 855–870.
46. González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., González-Vázquez, R., Arias, M.E., Rodríguez, J. y Knicker, H. (2008). Use of multiple biogeochemical parameters to monitor the recovery of soils after forest fires. *Org. Geochem.* 39, 940–944.
47. González-Vázquez, R. (2011). Impacto de los incendios forestales en la materia orgánica de los suelos. La composición de la fracción lipídica como índice del grado de recuperación de suelos quemados. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
48. Greenacre, M. (2008). *La práctica del análisis de correspondencias*. Fundación BBVA. Bilbao, España. 373 pp.
49. Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Gómez, I., García-Orenes, F. y Jordán, M.M. (2005). Microbial recolonization and chemical changes in a soil heated at different temperatures. *Int. J. Wildland Fire.* 14, 385–400.
50. Guitán, F. y Carballas, T. (1976). Técnicas de análisis de suelos. Volumen 70 de *Monografías de ciencia moderna*. Ed. Pico Sacro. 288 pp.

51. Gutknecht, J.L.M., Henry, H.A.L. y Balsler, T.C. (2010). Inter-annual variation in soil extra-cellular enzyme activity in response to simulated global change and fire disturbance. *Pedobiologia* 53. 283–293.
52. Hamamura, N., Olson, S.H., Ward, D.M. y Inskeep, W.P. (2006). Microbial Population Dynamics Associated with Crude-Oil Biodegradation in Diverse Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72. 6316–6324.
53. Hart, S.C., DeLuca, T.H., Newman, G.S., MacKenzie, M.D. y Boyle, S.I. (2005). Post-fire vegetative dynamics as drivers of microbial community structure and function in forest soils. *For. Ecol. Manag.* 220, 166–184.
54. Hernández, I., Christmas, M. yelloly, J.M. y Whitton, B.A. (1997). Factors Affecting Surface Alkaline Phosphatase Activity in the Brown Alga *Fucus Spiralis* at a North Sea Intertidal Site (tyne Sands, Scotland)1. *J. Phycol.* 33, 569–575.
55. Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. y Wellington, E.M. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3233–3241.
56. Hoffmann, G. y Pallauf, J. (1965). A colorimetric method for determining saccharase activity in soils. *Z. Pflanz.Düng. Bodenk.* 110, 193-201.
57. Inceoglu, Ö., Hoogwout, E.F., Hill, P. y Elsas, J.D. van (2010). Effect of DNA Extraction Method on the Apparent Microbial Diversity of Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3378–3382.
58. ISO 10382. Soil Quality. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls. Gas chromatographic method with electron capture detection.
59. ISO 18287. Soil Quality. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)- Gas chromatographic method with mass spectrometric detection (GC-MS).
60. Jain, R.K., Kapur, M., Labana, S., Lal, B., Sarma, P.M., Bhattacharya, D. y Thakur, S. (2005). Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Current Science.* 89(1): 101-112.
61. Jenkinson, D. y Powlson, D. (1976). The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-I. Fumigation with chloroform. *Soil Biology and Biochem.* 8(3):167-177.

62. Jiménez, M.N., Fernández-Ondoño, E., Ripoll, M.A., Navarro, F.B., Gallego, E., Simón, E.D. y Lallena, A.M. (2007). Influence of different post-planting treatments on the development in Holm oak afforestation. *Trees*. 21, 443–455.
63. Jonasson, J., Olofsson, M. y Monstein, H.-J. (2002). Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments. *APMIS* 110, 263–272.
64. Jonsson, L., Dahlberg, A., Nilsson, M.C., Zarickrisson, O. y Karen, O. 1999. Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests and composition following wildfire. *Mol. Ecol.* 8, 205-217.
65. Kandeler, E. y Gerber, H. (1988). Short term assays of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils*. 5, 68-72.
66. Kaplan, C.W. y Kitts, C.L. (2004). Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1777–1786.
67. Khanna, P. y Raison, R. (1986). Effect of fire intensity on solution chemistry of surface soil under a *Eucalyptus pauciflora* forest. *Soil Res.* 24, 423–434.
68. Khanna, P.K., Raison, R.J. y Falkiner, R.A. (1994). Chemical properties of ash derived from *Eucalyptus* litter and its effects on forest soils. *For. Ecol. Manag.* 66, 107–125.
69. Kibblewhite, M.G., Ritz, K. y Swift, M.J. (2008). Soil health in agricultural systems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 363, 685–701.
70. Kim, S.W., Kaplan, L.A., Benner, R. y Hatcher, P.G. (2004). Hydrogen-deficient molecules in natural riverine water samples - evidence for the existence of black carbon in DOM. *Mar. Chem.* 92(1-4), 225–234.
71. Kjeldahl, J. (1883). A method for determining nitrogen in inorganic materials. *Z. Anal. Chem.* 22: 366.
72. Klimek, B. (2012). Effect of long-term zinc pollution on soil microbial community resistance to repeated contamination. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 617–622.

73. Knicker, H., González-Vila, F.J., Polvillo, O., González, J.A. y Almendros, G. (2005). Fire-induced transformation of C- and N- forms in different organic soil fractions from a Dystric Cambisol under a Mediterranean pine forest (*Pinus pinaster*). *Soil Biol. Biochem.* 37, 701–718.
74. Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A., Delgado, J., Norton, N., Hazen, T.C. y Huettel, M. (2011). Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7962–7974.
75. Lakanen, E. y R. Erviö. (1971) A comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils. *Acta Agr. Fenn.* 123, 223-232.
76. Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. y Pace, N.R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *PNAS* 82, 6955–6959.
77. Liu, Y., Zhou, T., Crowley, D., Li, L., Liu, D., Zheng, J. yu, X., Pan, G., Hussain, Q., Zhang, X. y Zheng, J.(2012). Decline in topsoil microbial quotient, fungal abundance and C utilization efficiency of rice paddies under heavy metal pollution across South China. *Plos One* 7, e38858.
78. Lobo, M.C. y Ibañez, J.J. (2003). Preserving soil quality y soil biodiversity: the role of surrogate indicators (Madrid: Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria: Consejería de Economía e Innovación Tecnológica).
79. Magurran, A.E. (2005). Biological diversity. *Curr. Biol.* 15, R116–R118.
80. Maron, P.-A., Schimann, H., Ranjard, L., Brothier, E., Domenach, A.-M., Lensi, R. y Nazaret, S. (2006). Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. *Eur. J. Soil Biol.* 42, 65–73.
81. Martin, A.P. (2002). Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3673–3682.
82. Mataix-Solera, J., Cerdá, A. (2009a). Incendios forestales en España. Ecosistemas terrestres y suelos. En: Efectos de los incendios forestales



- sobre los suelos en España. Cerdá, A. y Mataix-Solera, J.(eds). Cátedra Divulgación de la Ciencia. Universitat de Valencia. Valencia, España. pp.23-54
83. Mataix-Solera, J., Cerdá,A. (2009b).Los efectos de los incendios forestales en los suelos. Síntesis y conclusiones. Nuevos retos en la investigación y en la gestión. En: Efectos de los incendios forestales sobre los suelos en España. Cerdá, A. y Mataix-Solera, J.(eds). Cátedra Divulgación de la Ciencia. Universitat de Valencia. Valencia, España. pp.491-529
  84. Mataix-Solera ,J., Guerrero, C., Arcenegui, V., Bárcenas, G., Zornoza, R., Pérez-Bejarano, A., Boda,M., Mataix-Beneyto,J., Gómez, I., García-Orenes, F., Navarro-Pedreño, J., Jordán, M., Cerdà, A., Doerr, S., Úbeda, X., Outeiro, L., Pereira, P., Jordán, A. y Zavala, L. (2009a). Los incendios forestales y el suelo: un resumen de la investigación realizada por el Grupo de Edafología Ambiental de la UMH en colaboración con otros grupos. En: Efectos de los incendios forestales sobre los suelos en España. Cerdá, A. y Mataix-Solera, J.(eds). Cátedra Divulgación de la Ciencia. Universitat de Valencia. Valencia, España. pp.185-217
  85. Mataix-Solera, J., Guerrero,C., García-Orenes, F., Bárcenas.,G., Torres,M. (2009b). Forest fire effects on soil microbiology. En: Fire Effects on Soils and Restoration Strategies. Cerdá, A. y Robichaud, P. (eds). Science Publishers Inc, New Hampshire, EEUU. pp 133-175.
  86. Meiklejohn, J. (1955). The Effect of Bush Burning on the Microflora of a Kenya Upland Soil. *J. Soil Sci.* 6, 111–118.
  87. Milling, A., Smalla, K., Maidl, F.X., Schloter, M. y Munch, J.C. (2005). Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. *Plant Soil.* 266, 23–39.
  88. Mummey, D., Holben, W., Six, J. y Stahl, P. (2006). Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils. *Microb. Ecol.* 51, 404–411.
  89. Murphy, J.D., Johnson, D.W., Miller, W.W., Walker, R.F., Carroll, E.F. y Blank, R.R. (2006). Wildfire effects on soil nutrients and leaching in a tahoe basin watershed. *J. Environ. Qual.* 35, 479–489.
  90. Muyzer, G., De Waal, E.C. y 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.

91. Muyzer, G. y Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 73, 127–141.
92. Nakatsu, C., Torsvik, V. y Ovreas, L. (2000). Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64:1382-1388.
93. Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375–380.
94. Nordgren, A., Bååth, E. y Söderström, B. (1983). Microfungi and microbial activity along a heavy metal gradient. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1829–1837.
95. Norris, T.B., Wraith, J.M., Castenholz, R.W. y McDermott, T.R. (2002). Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6300–6309.
96. Pace, N.R., Sthal, D.A., Lane, D.J. y Olsen, G.J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology*. 9: 1-55.
97. Pancholy, S. y Rice, E. (1973). Soil enzymes in relation to old field succession: Amylase, cellulase, invertase, dehydrogenase and urease. *Soil Science Society American Proceedings*. 37:47-50.
98. Pankhurst, C., Hawke, B., McDonald, H., Kirkby, C., Buckerfield, J., Michelsen, P., O'Brien, K., Gupta, V. y Doube, B. (1995). Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Aust. J. Exp. Agric.* 35, 1015–1028.
99. Pascual, J.A., García, C., Hernández, T., Moreno, J.L. y Ros, M. (2000). Soil microbial activity as a biomarker of degradation and reclamation processes. *Soil Biol. Biochem.* 32 (13), 1877-1883.
100. Pastor, J. y Hernández, A.J. (2007). Evaluación de la complejidad de vertederos-cubierta edáfica y suelos de las áreas de descarga en relación a la revegetación y la fitorremediación. En: *Tendencias actuales de la ciencia del suelo*. Bellifante, N. y Jordán, A. (eds): 947-953. Junta de Andalucía, Sevilla, España.

101. Pastor, J. y Hernández, A.J. (2010). Descripción de Vertederos sellados de la Comunidad de Madrid. En: Estudio multidisciplinar de vertederos sellados. Caracterización y pautas de recuperación. Hernández, A.J. y Bartolomé, C. (eds). Universidad de Alcalá. Madrid. España.
102. Pérez-Leblic, M.I., Turmero, A., Hernández, M., Hernández, A.J., Pastor, J., Ball, A.S., Rodríguez, J. y Arias, M.E. (2012). Influence of xenobiotic contaminants on landfill soil microbial activity and diversity. *J. Environ. Manage.* 95 Suppl. S285–290.
103. Pfaffl, M.W. y Hageleit, M. (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters.* 23, 275–282.
104. Röling, W.F.M., van Breukelen, B.M., Braster, M., Lin, B. y van Verseveld, H.W. (2001). Relationships between Microbial Community Structure and Hydrochemistry in a Landfill Leachate-Polluted Aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4619–4629.
105. Sastre, I., Vicente, M.A. y Lobo, M.C. (1996). Influence of the application of sewage sludges on soil microbial activity. *Bioresour. Technol.* 57, 19–23.
106. Sastre, I., Vicente, M.A. y Lobo, M.C. (2003). Contamination and environmental impact on soil biological activity. En: M.C. Lobo and J.J. Ibáñez, Eds. *Preserving soil quality and soil biodiversity.* Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA). pp- 99-117.
107. Seo, Y., Jo, S.-H., Ryu, C.K. y Yi, C.-K. (2007). Effects of water vapor pretreatment time and reaction temperature on CO<sub>2</sub> capture characteristics of a sodium-based solid sorbent in a bubbling fluidized-bed reactor. *Chemosphere.* 69, 712–718.
108. Skujins, J.J. (1967). Enzymes in soil. En: *Soil Biochemistry*. McLaren, A. y Peterson, G. (eds). Marcel Dekker Inc. New York, USA. pp 371-414.
109. Smith, N.R., Kishchuk, B.E. y Mohn, W.W. (2008). Effects of Wildfire and Harvest Disturbances on Forest Soil Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 216–224.
110. Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160, 61–68.

111. Spiegelman, D., Whissell, G. y Greer, C.W. (2005). A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Can. J. Microbiol.* 51, 355–386.
112. Staddon, W.J., Duchesne, L.C. y Trevors, J.T. (1998). Acid phosphatase, alkaline phosphatase and arylsulfatase activities in soils from a jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) ecosystem after clear-cutting, prescribed burning, and scarification. *Biol. Fertil. Soils.* 27, 1–4.
113. Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J. y Pace, N.R. (1985). Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1379–1384.
114. Sun, H.Y., Deng, S.P. y Raun, W.R. (2004). Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5868–5874.
115. Tabatabai, M. y Bremner, J. (1969). Use of p-nitrophenyl for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1:301-307.
116. Tabatabai, M.A. y Bremner, J.M. (1970). Arylsulfatase Activity of Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 34, 225–229.
117. Tabatabai, M. A. (1982). En: *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties*. Page, A., Miller, R. y Keeney, D. (eds). Soil Science Society of America, Inc. Madison, EEUU. pp. 903-947.
118. Taylor, J., Wilson, B., Mills, M. y Burns, R.. (2002). Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol. Biochem.* 34, 387–401.
119. Theodorou C. y Bowen GD (1982). Effects of a bush fire on the microbiology of a South Australian low open (dry sclerophyll) forest soil. *Aust. For.* 12, 317–327.
120. Tian, Y. yang, H., Wu, X. y Li, D. (2005). Molecular analysis of microbial community in a groundwater sample polluted by landfill leachate and seawater. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 6, 165–170.
121. Torsvik, V.L. (1980). Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biology and Biochemistry.* 12, 15–21.
122. Trasar-Cepeda, C., Leirós de la Peña, M.C., García Fernández, F. y Gil Sotres, F. (2000). *Propiedades Bioquímicas de los suelos gallegos: su*

- utilización como indicadores de la calidad del suelo. En: Investigación y Perspectivas de Enzimología de Suelos en España. García, C., Hernández, M.T. (eds.), C.S.I.C., Madrid, pp. 146-206.
123. Ulery, A., Graham, R. y Amrhein, C. (1993). Wood-ash composition and soil pH following intense burning. *Soil Sci.* 156, 358–364.
  124. Vega, J.A. (1986). La investigación sobre incendios forestales en España. Revisión bibliográfica. Proceedings Symposium. Bases Ecologicas para la Gestión Ambiental (Diputación de Barcelona). pp17–24.
  125. Verhoef, HA. (1995). Litter bag method En: Alef K, Nannipieri, P (eds). *Methods in applied soil microbiology y bichemistry*. Academic Press, New York. EEUU. pp 485- 487.
  126. Viro, P.J. (1974). Effects of forest fire on soil. En: *Fire and Ecosystem*. Kozlowski, T.T. y Ahlgren, C.E. (eds).Academic Press, New York, EEUU. pp. 7-45.
  127. Walkley, A. (1947). A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils: effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Sci.* 63:251-263.
  128. Weston, C.J. y Attiwill, P.M. (1990). Effects of fire and harvesting on nitrogen transformations and ionic mobility in soils of *Eucalyptus regnans* forests of south-eastern Australia. *Oecologia.* 83, 20–26.
  129. Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221–271.
  130. Wüthrich, C., Schaub, D., Weber, M., Marxer, P. y Conedera, M. (2002). Soil respiration and soil microbial biomass after fire in a sweet chestnut forest in southern Switzerland. *CATENA.* 48, 201–215.
  131. Xu, Y., Sun, J., Lin, Q., Ma, J., Shi, Y. y Lou, K. (2012). Effects of a surface wildfire on soil nutrient and microbial functional diversity in a shrubbery. *Acta Ecol. Sin.* 32, 258–264.
  132. Yeager, C.M., Northup, D.E., Grow, C.C., Barns, S.M. y Kuske, C.R. (2005). Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2713–2722.
  133. Yu, Z. y Morrison, M. (2004). Comparisons of Different Hypervariable Regions of *rrs* Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities

## Bibliografia

by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4800–4806.



**ANEXO I**







## Influence of xenobiotic contaminants on landfill soil microbial activity and diversity

M.I. Pérez-Leblic<sup>a</sup>, A. Turmero<sup>a</sup>, M. Hernández<sup>a</sup>, A.J. Hernández<sup>b</sup>, J. Pastor<sup>c</sup>, A.S. Ball<sup>d</sup>, J. Rodríguez<sup>a</sup>, M.E. Arias<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dpto. de Microbiología y Parasitología, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Dpto. de Ecología, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>c</sup> CCMA-CSIC, 28006 Madrid, Spain

<sup>d</sup> School of Biological Sciences, Flinders University, GPO Box 2100, Adelaide, SA 5001, Australia

### article info

#### Article history:

Received 30 September 2009

Received in revised form

13 May 2010

Accepted 12 July 2010

Available online 17 August 2010

#### Keywords:

Landfill pollutants

Microbial activity

DGGE profiles

Phylogenetic analysis

### abstract

Landfills are often the final recipient of a range of environmentally important contaminants such as hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). In this study the influence of these contaminants on microbial activity and diversity was assessed in a municipal solid waste (MSW) landfill placed in Torrejón de Ardoz (Madrid, Spain).

Soil samples were collected from four selected areas (T2, T2B, T8 and T9) in which the amount of total hydrocarbons, PAHs and PCBs were measured. Soil biomass, substrate induced respiration (SIR) and physiological profiles of soil samples were also determined and used as indicators of total microbial activity.

Highest concentration of total hydrocarbons was detected in T2 and T9 samples, with both PCBs and benzo[a]pyrene being detected in T9 sample. Results corresponding to microbial estimation (viable bacteria and fungi, and SIR) and microbiological enzyme activities showed that highest values corresponded to areas with the lowest concentration of hydrocarbons (T2B and T8). It is noticeable that in such areas was detected the lowest concentration of the pollutants PAHs and PCBs. A negative significant correlation between soil hydrocarbons concentration and SIR, total bacteria and fungi counts and most of the enzyme activities determined was established. DGGE analysis was also carried out to determine the microbial communities' structure in the soil samples, establishing different profiles of Bacteria and Archaea communities in each analysed area. Through the statistical analysis a significant negative correlation was only found for Bacteria domain when Shannon index and hydrocarbon concentration were correlated. In addition, a bacterial 16S rRNA gene based clone library was prepared from each soil. From the clones analysed in the samples, the majority corresponded to Proteobacteria, followed by Acidobacteria and Actinobacteria. It is important to remark that the most polluted sample (T9) showed the lowest microbial diversity only formed by six phyla being Proteobacteria and Acidobacteria the most representative.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

In Spain the most habitual practice for elimination of urban solid wastes has been its storage in municipal solid waste landfills. Although many old landfills are now sealed, these landfills continue to be potentially sources of significant environmental contamination. Moreover, the generation of contaminated leachate remains as inevitable consequence of the practice of waste disposal in landfills

(Banar et al., 2006), with groundwater pollution being the most significant concern arising from leachate migration (El-Fadel et al., 1997). Degradation of the old landfill material is a slow process, lasting over 30 years.

Among the most hazardous compounds accumulated in soil and leachate, heavy metals, nitroaromatic compounds (NACs), polycyclic aromatics (PAHs), and pesticides are the most dangerous. These compounds originated from household and industrial wastes can be found in most municipal landfills. Depending on their composition and on soil characteristics, these products may cause dramatic changes in aquifer geochemistry and landfill microbiology (Röling et al., 2001; Sastre et al., 2003).

\* Corresponding author. Tel.: +34 918854633; fax: +34 918854663.  
E-mail address: [enriqueta.arias@uah.es](mailto:enriqueta.arias@uah.es) (M.E. Arias).

**Table 1**  
Concentration of total (aliphatic and aromatic) hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in soil samples of Torrejón de Ardoz land fill.

Sample	Total hydrocarbons (ppm)	PAHs (ppm)	PCBs (ppm)
T2	165.60 ± 4.28	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01
T2B	84.52 ± 1.80	0.16 ± 0.01	0.057 ± 0.01
T8	54.48 ± 1.34	0.20 ± 0.01	< 0.04
T9	189.91 ± 4.11	11.06 ± 0.2	4.14 ± 0.12

Through knowledge of microbial community structure in polluted land fills, the capabilities of the microbial populations and their effect on the environment may be used as tools for predicting and monitoring natural degradation (Jain et al., 2005). Although bacteria capable of degrading pollutants usually play central roles in bioremediation, other organisms (i.e. fungi, protozoa and plants) can also affect the process (Demmerová et al., 2005). Techniques used to study land fill microbiology include traditional and emerging genetic molecular tools (Arias et al., 2005). The genetic diversity of microbial communities may now be monitored using profiling techniques such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). This technique allows the analysis of many samples simultaneously, and provides information relating to microbial communities. The construction of clone libraries and the sequencing of 16S rRNA gene sequences is another molecular technique frequently used to obtain phylogenetic information of the microorganisms present in a sample.

The aim of the present work was to study how the presence of different pollutants, including hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) affect the microbial activity and diversity in a municipal solid waste land fill at Torrejón de Ardoz (Madrid), Spain.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Municipal land fill characteristics

Samples were taken from a municipal solid waste (MSW) land fill placed in Torrejón de Ardoz (Madrid), a city located in the Spanish central region. The original land fill received urban and industrial wastes and was capped in 1982. Over the past 10 years new residues have been stored on the site, constituting solid urban, industrial and inert wastes which have not undergone any pre-treatment prior to dumping.

### 2.2. Soil sampling and processing

Four samples, T2 (40° 26' 18.72" N, 3° 28' 30.66" W), T2B (40° 26' 12.60" N, 3° 28' 37.80" W), T8 (40° 26' 17.34" N, 3° 28' 36.00" W) and T9 (40° 26' 17.76" N, 3° 28' 34.56" W) were taken from the landfill. All soil samples (2 Kg) were collected from upper layer (0–15 cm) in plastic bags and transported to the laboratory on ice. Then, soils were dried at room temperature and sieved at 2 mm mesh size. For physical and chemical analysis one sub-sample of

each soil was maintained at room temperature, another was stored at 4 °C for enzyme analysis and the last one was frozen at –20 °C for genetic analysis.

### 2.3. Physical and chemical analysis

Soil pH was measured in H<sub>2</sub>O slurry (1:2.5 solid:liquid ratio). Soil water holding capacity (WHC) was determined following the standard methods described by Hernández and Pastor (1989). Total hydrocarbons (UNE 77307), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs, ISO 18287) and polychlorinated biphenyls (PCBs, ISO 10382) were also determined.

### 2.4. Biological analysis

#### 2.4.1. Bacterial and fungal viable counts

Microorganisms were isolated from soil by blending soil samples (10 g dry weight) with 95 ml of phosphate buffer 0.1 M, pH 7. The number of colony-forming units (cfu) was determined on Tryptic Soy Agar (TSA) for bacteria and on Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract (OGYE) for filamentous fungi after 7 days of incubation at 28 °C. Three plates were inoculated per dilution, and plates with 30–300 colonies were counted. Counts were calculated as the means of three determinations and expressed as colony-forming units per gram of dry soil (cfu/g dwt).

#### 2.4.2. Microbial activity

Substrate induced respiration (SIR) was measured using the method described by Jenkinson and Powlson (1976) with some modifications. Three soil samples (5 g each) were adjusted to 50% WHC and incubated with glucose (0.45 mg/g soil) for 2 days at 30 °C in sealed flasks. CO<sub>2</sub> concentration was measured by an automated method (Bac-Trac) based on the changes of the impedance of a KOH solution (2%) in a mTrac 4200 analyser.

#### 2.4.3. Enzyme determinations

Acid and alkaline phosphatases, β-glucosidase and β-N-acetylglucosaminidase activities were analysed following the methods developed by Tabatabai (1982). Invertase and cellulase (Hoffmann and Pallauf, 1965 modified by García Álvarez and Ibáñez, 1994) and urease activities (Kandeler and Gerber, 1988) were also determined in the soil samples.

#### 2.4.4. Genetic analysis

2.4.4.1. DNA extraction. DNA was extracted from 0.5 g of soil samples using a soil DNA extraction kit (Power Soil DNA Isolation kit, MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Purified DNA samples were resolved by electrophoresis in a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide and observed under UV light (λ 254 nm). DNA extraction was performed in triplicate for each soil sample.

2.4.4.2. Bacteria and Archaea communities fingerprinting by DGGE. Bacteria and Archaea 16S rRNA genes were amplified from DNA samples by PCR and then subjected to analysis by DGGE. Primers 341f (β GC clamp and 907r and 344f (β GC clamp and 915r

**Table 2**  
Physical and biological parameters determined in Torrejón de Ardoz land fill.

Sample	pH	WHC (%)	Bacteria (cfu/g)	Fungi (cfu/g)	SIR <sup>a</sup>
T2	7.58 ± 0.37	36.4 ± 1.82	4.6 × 10 <sup>6</sup> ± 2.3 × 10 <sup>5</sup>	5.0 × 10 <sup>4</sup> ± 2.5 × 10 <sup>3</sup>	46.55 ± 2.32
T2B	7.75 ± 0.31	23.01 ± 1.03	1.68 × 10 <sup>7</sup> ± 7.56 × 10 <sup>5</sup>	2.05 × 10 <sup>5</sup> ± 4.10 × 10 <sup>3</sup>	76.19 ± 3.04
T8	7.62 ± 0.34	31.30 ± 1.25	7.9 × 10 <sup>7</sup> ± 3.16 × 10 <sup>6</sup>	1.2 × 10 <sup>5</sup> ± 4.8 × 10 <sup>3</sup>	77.33 ± 3.47
T9	7.8 ± 0.39	20.91 ± 1.04	1.5 × 10 <sup>7</sup> ± 6.0 × 10 <sup>5</sup>	5.5 × 10 <sup>4</sup> ± 1.65 × 10 <sup>3</sup>	45.05 ± 2.11

<sup>a</sup> SIR: Substrate induced respiration (mg CO<sub>2</sub>/h/100 g dry soil).

Table 3  
Enzyme activities determined in soil samples of Torrejón de Ardoz land fill. One enzymatic unit (U) = 1 μmoles/h.

	Acid Phosphatase (U/g)	Alkaline Phosphatase (U/g)	β-glucosidase (U/g)	Invertase (U/g)	Cellulase (U/g)	β-N-acetylglucosaminidase (U/g)	Urease (U/g)
T2	0.61 ± 0.01	1.35 ± 0.07	0.59 ± 0.02	7.15 ± 0.25	0.08 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.80 ± 0.04
T2B	0.76 ± 0.04	4.85 ± 0.16	1.70 ± 0.05	44.02 ± 1.10	0.34 ± 0.02	0.17 ± 0.01	1.90 ± 0.10
T8	2.47 ± 0.05	9.72 ± 0.38	6.66 ± 0.17	53.75 ± 2.15	0.18 ± 0.01	0.32 ± 0.01	2.77 ± 0.10
T9	0.70 ± 0.03	2.90 ± 0.15	1.94 ± 0.10	18.49 ± 0.54	0.18 ± 0.01	0.11 ± 0.01	1.03 ± 0.10

were used to study Bacteria and Archaea community profiles, respectively. Taq polymerase (FideliTaq PCR Master Mix) from Invitrogen (USA) was used in all PCR amplifications.

DGGE was performed with a D-code Universal Mutation Detection System (Bio Rad laboratories, Hercules, CA, USA). PCR products (between 800 and 1000 ng) were loaded onto 6% polyacrylamide gels containing a formamide urea linear denaturing gradient of 55 and 60% for Bacteria and Archaea, respectively. The 100% denaturant gradient was defined as 7 M urea and 40% (v/v) deionized formamide. Gels were run in 1 × TAE at a constant voltage of 60 V for 18 h at 60 °C. Bands were visualized by staining the gels with ethidium bromide (50 μg/ml) for 20 min and destaining in deionized water for 40 min. The gels were exposed to UV light to visualize the bands and digitalized in a Gel Doc 2000 (BioRad laboratories, Hercules, CA, USA).

With the obtained DGGE banding profiles a UPGM cluster analysis using the PAST program (<http://folk.uio.no/ohammer/past>) was performed taking into account the Jaccard's similarity measure obtained from absence and presence of bands. Similarities between the banding profiles were also displayed graphically as a dendrogram. Shannon indexes of general diversity were also calculated using the same program.

2.4.4.3. 16S rRNA gene clone library and sequence analysis. The phylogenetic affiliation of the Bacteria present in the samples was examined by partially sequencing the 16S rRNA gene. Bacteria 16S rRNA genes were amplified from soil DNA by PCR using the primers

27f and 1492r. The PCR-amplified DNA fragments were cloned into the pCR 2.1 vector of the Topo TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Then, competent E. coli cells were transformed and plated. White colonies were screened for inserts of the expected size by using primers M13f and M13r. Clones were purified with Ultraclean PCR clean-up Kit (MO BIO, USA) and selected for sequencing at the Molecular Biology Service of the University of Alcalá de Henares (Madrid, Spain). The sequences obtained were compared to available database sequences using the Ribosomal Database Project for phylogenetic assignment (<http://rdp.cme.msu.edu>). Sequences with similarities >95% were considered to represent the same taxonomic group. Rarefaction curves (Simberloff, 1972) and Shannon index of general diversity was determined using PAST program.

## 2.5. Statistical analysis

Analysis of the data was performed using SPSS version 17.0 for Windows (SPSS, 2005). Linear correlation coefficients were determined between the physical, chemical, biological and genetic parameters previously determined. The significance of all statistical analysis was accepted at  $p < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Physical, chemical and biological analysis

Soil samples were collected in situ at four different zones of a solid waste land fill in which toxic compounds were detected. Organic pollutants were measured in the samples. The concentrations of total hydrocarbons, PAHs and PCBs determined in the T2, T2B, T8 and T9 soil areas are shown in Table 1. As can be observed in the table, although pollutants have been found in the four zones of the land fill, the highest values for hydrocarbons and PCBs were detected in the areas T9 (189.91 ppm and 4.14 ppm respectively) and T2 (165.6 ppm and 0.22 ppm respectively). A high concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) was detected in the T9 area (11.06 ppm), consisting mainly of pyrene (1.33 ppm), fluoranthene (1.55 ppm), benzo[b]fluoranthene (1.69 ppm) and benzo[a]pyrene (2.23 ppm) (data not shown). Although the lowest concentration values of hydrocarbons and PCBs were detected in the area T8, low amounts of benzo[b]fluoranthene (0.062 ppm) and benzo[a]pyrene (0.059 ppm) were also found in this sample (data not shown).

Physical (pH and WHC) and biological parameters (total viable bacteria and fungi and SIR) were estimated in the soil samples, and the results are shown in Table 2. Results corresponding to the estimation of microbial biomass by both counting of viable microorganisms and measuring the SIR showed the highest number of microorganisms and the more intensive microbial activity in the zones T8 and T2B, which correspond to the areas less contaminated. From statistical analysis of the data above mentioned we observed that the parameters SIR and total bacteria and fungi counts were significantly negatively correlated with soil hydrocarbon concentration. The correlation coefficients were:

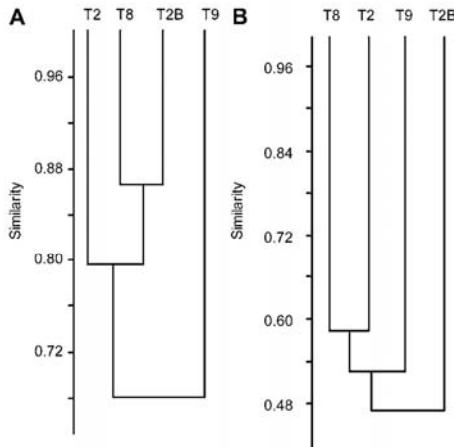


Fig. 1. A dendrogram representation of a hierarchical cluster analysis of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles using Jaccard's similarity measure. A: Bacteria; B: Archaea.

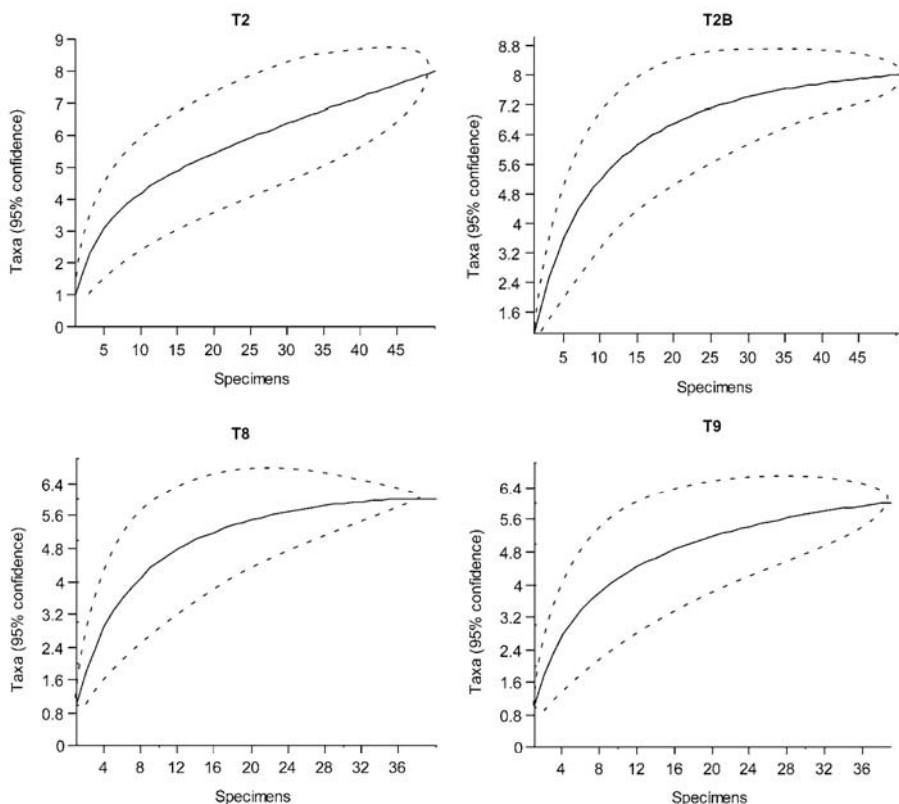


Fig. 2. Rarefaction curves of clone libraries from the soil samples of Torrejón de Ardoz land fill (95% confidence).

$r = -0.957$ ,  $p < 0.001$ ,  $r = -0.745$ ,  $p = 0.034$  and  $r = -0.756$ ,  $p = 0.030$ , respectively. On the contrary, a positive significant correlation was found between SIR and total fungi count ( $r = 0.857$ ,  $p = 0.007$ ). SIR and total bacteria count also showed a positive correlation ( $r = 0.652$ ), but it was not significant ( $p = 0.08$ ).

The activity of different enzymes related with C, N and P cycles was also measured in soil samples and the results are shown in (Table 3). It can be observed that the enzymatic activities were also lower in the more polluted areas (T2 and T9) than in the areas where the pollutants were in a lesser concentration (T2B and T8). In addition, a significant decrease in the activity of the most of enzymes studied was detected when the total hydrocarbon concentration increased. The analysis of soil enzymes showed a significant negative correlation between soil hydrocarbon concentration and the activities acid phosphatase ( $r = -0.734$ ,  $p = 0.038$ ), alkaline phosphatase ( $r = -0.850$ ,  $p = 0.008$ ), b-glucosidase ( $r = -0.708$ ,  $p = 0.049$ ), B-N-acetylglucosaminidase ( $r = -0.864$ ,  $p = 0.006$ ), invertase ( $r = -0.924$ ,  $p = 0.001$ ) and urease ( $r = -0.938$ ,  $p = 0.001$ ). From these results, it could be concluded that microbial activity (SIR) and enzyme activities were

lower when the concentration of the pollutants detected in the land fill was higher. In contrast, SIR showed significantly positive correlations with the activities of alkaline phosphatase ( $r = 0.809$ ,  $p = 0.015$ ), B-N-acetylglucosaminidase ( $r = 0.824$ ,  $p = 0.012$ ), invertase ( $r = 0.954$ ,  $p = 0.001$ ), and urease ( $r = 0.914$ ,  $p = 0.001$ ) activities. In the same way, positive and significant statistically correlations were found between viable bacteria and acid phosphatase ( $r = 0.990$ ,  $p = 0.000$ ), alkaline phosphatase ( $r = 0.964$ ,  $p = 0.000$ ), B-N-acetylglucosaminidase ( $r = 0.957$ ,  $p = 0.000$ ), b-glucosidase ( $r = 0.992$ ,  $p = 0.000$ ), invertase ( $r = 0.781$ ,  $p = 0.022$ ), and urease ( $r = 0.898$ ,  $p = 0.002$ ) activities, and between total viable fungi and activities cellulase ( $r = 0.910$ ,  $p = 0.002$ ) and invertase ( $r = 0.762$ ,  $p = 0.028$ ) activities. From these results a positive correlation between enzyme activities, viable microorganisms and SIR could be established in accordance with that previously reported for other soils (Taylor et al., 2002). Taking into account that enzyme activities and other biological parameters such as microbial biomass and respiration have been suggested as biomarkers in degraded soils (García et al., 1997; Pascual et al., 2000; Trasar Cepeda et al., 2000), T9 and T2 areas can be considered the most stressed and degraded zones into the land fill.

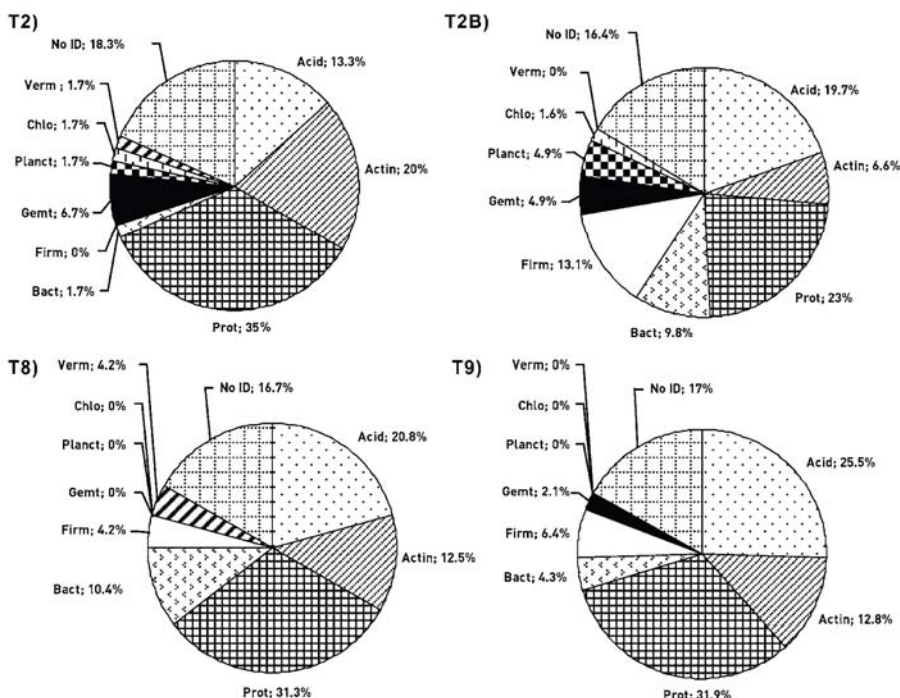


Fig. 3. Distribution (%) of bacterial clones related to phylogenetic groups in clone libraries. Acidobacteria (Acid) ; Actinobacteria (Actin) ; Proteobacteria (Prot) ; Bacteroidetes (Bact) ; Firmicutes (Firm) ; Gemmatimonadetes (Gemt) ; Planctomycetes (Planct) ; Chloroflexi (Chlo) ; Verrucomicrobia (Verm) ; Not identified (No ID).

### 3.2. Microbial community profiles

Bacteria and Archaea communities in each land fill sample were profiled by DGGE of amplified 16S rDNA fragments. The DGGE patterns for Bacteria seem to be slightly different for each sample. T9 sample showed the lowest number of bands while T2B showed the highest (data not shown). Cluster analysis was done to study similarities between the banding patterns generated by PCR-DGGE of the soil samples. From the dendrogram representation ( Fig.1) we observed that the land fill soils could be divided in two parts. T9 area seems to be separated from the T2, T8 and T2B areas, being T2B and T8 areas (sample soils with lesser amount of total hydrocarbons) grouped together. Shannon indexes of each soil (T2, 2.485; T2B, 2.639; T8, 2.639; T9, 2.565) were also calculated using PAST program. A significant negative correlation was found between Shannon index and total hydrocarbon (  $r = -0.792$ ,  $p = 0.019$ ). Once again, it could be observed the negative impact of the pollutants on the diversity of microbial communities.

In the Archaea profiles, T8 sample presented the highest number of bands and T2 and T9 the lowest (data not shown). On the contrary that occurred with Bacteria domain, Shannon indexes of the samples (T2, 2.079; T2B, 2.709; T8, 2.398; T9, 2.398) were not significantly correlated with the total hydrocarbon concentration (  $r = -5.08$ ,  $p = 0.198$ ). The dendrogram of these samples shows the presence of three clusters. Samples T8 and T2 are

grouped together, in spite of their difference in hydrocarbon concentration. Results seem to indicate that there was no straight correlation between the Archaea diversity and the hydrocarbon content of the soils.

### 3.3. Clone library analysis

Analysis of clone library was used to characterise the microbial communities of soil land fill samples. This analysis allows getting more detailed phylogenetic information on the microorganisms contained in the samples. DNA was extracted from the four samples and PCR amplifications using 16S rRNA gene primers were carried out only for Bacteria domain. Clone libraries of bacterial 16S rRNA genes were constructed. In total, 340 clones were subjected to sequence analysis followed by online homology searches using the Ribosomal Database Project. From those only 214 were valid sequences. Only the sequences that shared more than 95% of identity with the database sequences (T2, 50 clones; T2B, 51 clones; T8, 40 clones; T9, 39 clones) were used for the phylogenetic analysis. For the phyla obtained, rarefaction curves were constructed to determine whether a sufficient number of clones were screened in order to estimate the total diversity in each clone library ( Fig. 2). Rarefaction curve of sample T2 showed very little saturation in the curve, suggesting that the diversity in the sample would be higher if more clones were analysed. In contrast, T2B, T8 and T9 curves

showed saturation indicating that in these cases the number of clones were representative enough.

From the bacterial 16S rRNA gene sequences, 9 different phyla were identified. In all the samples analysed, the most of bacterial sequences were classified as Proteobacteria (23 e 35%), followed by Acidobacteria (13.3 e 25.5%) and Actinobacteria (6.6 e 20%). Only 6 phyla were found in T9 area, being Proteobacteria (31.9%) and Acidobacteria (25.5%) the most representative groups (Fig. 3).

Shannon diversity index was calculated for all communities on the basis of the phyla observed. The diversity indexes were between 1.87 and 1.481 values, corresponding the lowest values to T9 and T2 samples (1.481 and 1.558) and the highest to T2B and T8 (1.87 and 1.579).

As above mentioned, the predominant group in all samples was Proteobacteria. Thus,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -Proteobacteria were found, being  $\alpha$ -Proteobacteria the most abundant sub-group in all areas (T2: 66.7%; T2B: 66.7%; T8: 33.3%; T9 53.3%). In T8 area, the  $\beta$ -Proteobacteria was as abundant as the alpha sub-group (33.3%). T9 area showed a strong presence of bacteria belonging to the  $\delta$ -Proteobacteria sub-group (13.3%) unlike the other studied samples.

Once determined the phyla some genera could be identified from the sequences analysis. The most abundant genera corresponding to Proteobacteria phylum in the studied areas were: Sphingosinicella, Rhizobium, Microvirga, Mesorhizobium and Herminiimonas (T2); Microvirga, Dervosia and Herbaspirillum (T9); Amaricoccus, Skermanella and Masilia (T8) and Dervosia and Skermanella (T2B). In Actinobacteria phylum, the following genera were identified: Conexibacter, Arthrobacter Modestobacter Couchioplanes and Cryobacterium (T2); Marmoricola and Conexibacter (with a 93% of identity in T9); Pseudonocardina and Microbacterium (94% of identity in T8), and Arthrobacter and Rubrobacter (T2B). In the four samples analysed, all the clones corresponding to Acidobacteria phylum belong to Acidobacteriaceae family. Although the sequences obtained could not be assigned to any defined genus, some of them were more abundant in some specific samples. Thus, Gp4, Gp6 and Gp10 were most abundant in T2 and T9 samples; Gp6, Gp7 and Gp10 in T8 and T2B samples; Gp4 sequence was not found in T8 and T2B samples, and Gp7 sequence was not detected in T9.

Although hydrocarbon-degrading strains are phylogenetically related to  $\gamma$ - and  $\delta$ -Proteobacteria (Powell et al., 2003), the data obtained through the 16S sequence analysis did not allow concluding that these clones were precisely involved in the degradation of hydrocarbons. Specific cultures of these strains will be required to determine their metabolic capabilities.

In conclusion, our findings suggest a clear relationship between the presence of pollutants and the microbial activity and diversity (Shannon index). In fact we observed that in the presence of the highest concentration of toxic compounds (T9 and T2 areas), the lowest values of microbial biomass and enzymatic activities were found. However, from this study a clear relation between both

phyla and genera identified and pollutant concentration could not be established.

#### Acknowledgments

This work has been supported by the Comunidad de Madrid EIADES project (S-0505/AMB/0296) and the CICYT project (CGL2006-12730-C03-02).

#### References

- Arias, M.E., González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Ball, A.S., 2005. Soil health: a new challenge for microbiologists and chemists. *Int. Microbiol.* 8, 13–21.
- Baner, M., Ozkan, A., Kırkçüoğlu, M., 2006. Characterization of the leachate in an urban land fill by physicochemical analysis and solid phase microextraction-GC/MS. *Environ. Monit. Assess.* 121, 439–459.
- Demmerová, K., Macková, M., Špeváková, V., Beranová, K., Kochánková, L., Lovecká, P., Ryslavá, E., Macek, T., 2005. Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics-characterization of microbial populations. *Int. Microbiol.* 8 (3), 1–12.
- El-Fadel, M., Findikakis, A.N., Leckie, J.O., 1997. Modelling leachate generation and transport in solid waste land fills. *Environ. Technol.* 18, 669–686.
- García Álvarez, A., Ibáñez, J.J., 1994. Seasonal fluctuations and crop influence on microbiota and enzyme activity in fully developed soils of central Spain. *Arid Soil Res. Rehabil.* 8, 161–178.
- García, C., Hernández, T., Costa, F., 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 14(2), 123–134.
- Hernández, A.J., Pastor, J., 1989. Técnicas analíticas para el estudio de las interacciones suelo-planta. *Rev. Geol.* 3, 67–102. Henares.
- Hoffmann, G., Pallauf, J., 1965. A colorimetric method for determining saccharase activity in soils. *Z. Pflanz.Düng. Bodenk.* 110, 193–201.
- Jain, R.K., Kapur, M., Labana, S., Lal, B., Sarma, P.M., Bhattacharya, D., Thakur, S., 2005. Microbial diversity: application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Curr. Sci.* 89 (1), 101–112.
- Jenkinson, D.S., Powelson, D.S., 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. I. Fumigation with chloroform. *Soil Biol. Biochem.* 8 (3), 167–177.
- Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short term assays of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 5, 68–72.
- Pascual, J.A., García, C., Hernández, T., Moreno, J.L., Ros, M., 2000. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and reclamation processes. *Soil Biol. Biochem.* 32 (13), 1877–1883.
- Powell, S.M., Bowman, J.P., Snape, I., Stark, J.S., 2003. Microbial community variation in pristine and polluted nearshore Antarctic sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45 (2), 135–145.
- Röling, W.F.M., van Breukelen, B.M., Braster, M., Lin, B., van Verseveld, H.W., 2001. Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a land fill leachate-polluted aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (10), 4619–4629.
- Sastre, I., Vicente, M.A., Lobo, M.C., 2003. Contamination and environmental impact on soil biological activity. In: Lobo, M.C., Ibáñez, J.J. (Eds.), *Preserving Soil Quality and Soil Biodiversity*. Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA), Madrid, pp. 99–117.
- Simberloff, D.S., 1972. Properties of the rarefaction diversity measurement. *Am. Natur.* 106, 414–418.
- Tabatabai, M.A., 1982. Soil enzymes. In: Page, A.L., Miller, E.M., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Soil Science Society of America, Inc., Madison, pp. 903–947.
- Taylor, J.P., Wilson, B., Mills, M.S., Burns, R.G., 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsols using various techniques. *Soil Biol. Biochem.* 34, 387–401.
- Trasar Cepeda, C., Leirós de la Peña, M.C., García Fernández, F., Gil Sotres, F., 2000. Propiedades Bioquímicas de los suelos gallegos: su utilización como indicadores de la calidad del suelo. In: García, C., Hernández, M.T. (Eds.), *Investigación y Perspectivas de Enzimología de Suelos en España*. C.S.I.C., Madrid, pp. 146–206.

# ESTUDIO MULTIDISCIPLINAR DE VERTEDEROS SELLADOS

Caracterización y pautas de recuperación



Ana Jesús Hernández  
Carmen Bartolomé  
(Editoras)

# ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA EN SUELOS DE VERTEDEROS DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS

Pérez-Leblic, M. I.<sup>1</sup>, Rodríguez, J.<sup>1</sup>, Turmero, A.<sup>1</sup>, Hernández, M.<sup>1</sup>, Blánquez, A.<sup>1</sup>, Pastor, J.<sup>2</sup> y Arias, M. E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. de Microbiología y Parasitología. Alcalá de Henares. Madrid. Spain.

<sup>2</sup> CCMA-CSIC. Madrid.

## INTRODUCCIÓN

En España, una de las prácticas más habituales para la eliminación de los residuos generados como consecuencia de la actividad doméstica y comercial de ciudades y pueblos, ha sido y sigue siendo, su almacenamiento en vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU). Entre los desechos que se acumulan en los mismos figuran, tanto residuos domésticos (basuras, muebles, electrodomésticos...), como residuos industriales (metales, disolventes, pinturas...), que dan lugar a la acumulación, tanto en el suelo, como en las aguas subterráneas, de compuestos nitro-aromáticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, pesticidas y metales pesados, entre otros. Estos compuestos, aunque se encuentran en bajas concentraciones, producen graves efectos biológicos, dado que muchos de ellos son tóxicos y/o cancerígenos (Baun *et al.*, 2000). Además, debido a los procesos químicos y biológicos que tienen lugar en los vertederos, aparecen compuestos orgánicos e inorgánicos solubles, que, dependiendo de la composición y de las características del suelo, pueden originar cambios muy drásticos en la geoquímica y microbiología del vertedero (Röling *et al.*, 2001; Sastre *et al.*, 2003). Existe, pues, una gran preocupación por parte de la opinión pública y de los investigadores sobre el impacto ambiental que estos vertederos ejercen sobre el suelo, y en este sentido, muchos grupos de investigación, tanto a nivel nacional, como internacional, están tratando de encontrar nuevas estrategias para descontaminar los emplazamientos donde estos se sitúan.

También en los últimos años ha aumentado sensiblemente el interés por conocer la salud del suelo, debido a que esta aproximación, podría contribuir a predecir la capacidad de recuperación del suelo dañado por distintos agentes. El concepto de salud del suelo hace referencia a diferentes atributos, relacionados con aspectos físicos, químicos y biológicos, tales como: pH, retención hídrica, mineralogía, contenido en materia orgá-



nica, incluyendo los microorganismos, que juegan un importante papel en la capacidad del suelo para funcionar como un sistema vital (Arias *et al.*, 2005). En este sentido, el conocimiento de las poblaciones microbianas presentes en un ecosistema contaminado, como es el caso de un VRSU incontrolado, podría ser usado como una herramienta para predecir y monitorizar la posible degradación natural de los contaminantes presentes en el mismo (Jain *et al.*, 2005); de hecho, las bacterias juegan un papel central en la biorremediación de contaminantes, junto con otros organismos tales como hongos, protozoos y plantas (Demmerová *et al.*, 2005).

Las técnicas que se aplican para el estudio de la microbiota del suelo son variadas e incluyen, técnicas clásicas y técnicas moleculares. Así, la biodiversidad genética de las comunidades microbianas puede ser determinada utilizando técnicas tales como, la electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) y el clonaje y secuenciación del gen de ADNr 16S. La técnica DGGE permite el análisis de muchas muestras al mismo tiempo, proporcionando información sobre los patrones de las comunidades microbianas presentes en una muestra. Por otra parte, la secuenciación del gen que codifica para ARNs 16S permite identificar y establecer las relaciones filogenéticas de los microorganismos de una muestra.

El trabajo que se presenta, se ha realizado en dos vertederos urbanos de la Comunidad de Madrid, situados en las localidades de Torrejón de Ardoz y Getafe, zonas que han experimentado un gran desarrollo industrial y urbano en los últimos años. Estos vertederos fueron sellados por primera vez hace unos 20 años, pero a lo largo de los diez últimos se han depositado nuevos residuos, que han ido aumentando, tanto el área de vertido, como la contaminación química de los suelos.

Este trabajo se centra en un estudio de la biodiversidad microbiana presente en los vertederos citados, con el objeto de determinar las poblaciones microbianas presentes en suelos con distintas concentraciones de contaminantes orgánicos, tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHAs) y bifenilos policlorados (PCBs), así como de metales pesados.

Para determinar la actividad microbiana de los vertederos se han medido parámetros tales como, biomasa, actividad respiratoria inducida por sustrato y perfiles enzimáticos. La caracterización de las comunidades microbianas presentes en los vertederos se ha llevado a cabo, mediante técnicas moleculares, tales como electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) y clonaje y secuenciación del gen de ADNr 16S.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Características de los vertederos**

A los vertederos situados en los municipios de Torrejón de Ardoz y Getafe corresponden los análisis efectuados en este trabajo; han sido descritos en sus aspectos generales en Pastor y Hernández (2002 y 2007), así como en el primer capítulo de este libro. Diremos, no obstante, que están localizados en la región central española, que se caracteriza por presentar un clima mediterráneo continental de carácter semiárido (con precipitaciones medias anuales entre 400 y 600 mm y una evapotranspiración potencial media anual de 750 mm). Los vertederos estudiados están ubicados en un entorno de importante actividad industrial, por lo que los residuos sólidos urbanos almacenados en

estos vertederos aparecen mezclados con otros procedentes de industrias de muy diversa índole.

## 2.2. Muestreo y procesado de las muestras

En cada uno de los vertederos estudiados se muestrearon 4 zonas, denominadas T2, T2B, T8 y T9, en el caso del vertedero de Torrejón de Ardoz, y G1, G2, G3 y G4, en el caso del vertedero de Getafe. Las muestras de suelo de las diferentes zonas (2 kg) se recogieron mediante azada en la capa superficial del suelo comprendida entre 0 y 15 cm, retirando la hojarasca antes de tomar la muestra. Las muestras se guardaron en bolsas de plástico y se transportaron en frío al laboratorio. Allí, una parte de cada muestra se secó a temperatura ambiente y otra en campana de flujo laminar, con el fin de mantener la esterilidad necesaria para la valoración de los parámetros biológicos. Una vez secas, las muestras se tamizaron para conseguir un tamaño de partícula menor de 2 mm. Para la realización de los análisis físico-químicos, se guardó una parte de las muestras a temperatura ambiente. Para la determinación de las actividades enzimáticas se mantuvo otra parte a 4 °C y para los estudios genéticos a -20 °C.

## 2.3. Análisis físico-químicos

En las muestras analizadas se determinaron los siguientes parámetros:

1. pH: para la determinación del pH se realizó una suspensión acuosa 1: 2,5 suelo:agua. Posteriormente, el pH se midió en un pH-metro digital Orion 720 A.
2. Capacidad de campo (CC): su determinación se llevó a cabo en un aparato de presión-membrana de Richard. La capacidad de campo de una muestra se estimó por gravimetría, pesando la muestra antes y después de someterla a una presión de 1/3 de atmósfera ( $pF = 2,5$ ).
3. Hidrocarburos totales: se determinaron por espectrofotometría infrarroja siguiendo la Norma UNE 77307.
4. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs): su determinación se llevó a cabo por cromatografía de gases, y se siguió la Norma ISO 18287.
5. Bifenilos policlorados (PCBs): se determinaron por cromatografía de gases, de acuerdo a la Norma ISO 10382.
6. Metales pesados: se determinaron por espectroscopía de emisión de plasma ICP (Allen, 1989).

## 2.4. Análisis biológicos

### 2.4.1. Recuento en placa de microorganismos viables del suelo

Se tomaron 10 g de suelo y se resuspendieron en 95 mL de tampón fosfato (PBS) pH 7,4, 0,1 M, incubando dicha mezcla a 28 °C durante 30 minutos. A continuación, se realizaron diluciones decimales seriadas en el mismo tampón.

El recuento de bacterias viables se llevó a cabo tras inocular 100 ml de las diluciones correspondientes en placas que contenían el medio TSA (Agar Triptona de Soja) diluido 1:10. Las placas se incubaron durante 1 semana a 28 °C, realizando el recuento de las colonias cada 24 horas.

Para recuento de mohos y levaduras se sembraron las diluciones correspondientes en placas que contenían el medio Agar Sabouraud con Oxitetracina (100 mg/ml). Las placas se incubaron a 28 °C y los recuentos se realizaron diariamente durante una semana.

Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias/gramo de suelo (ufc/g).

#### 2.4.2. *Actividad microbiana: Respiración Inducida por Sustrato (SIR)*

Para la determinación de la respiración inducida por sustrato (SIR) se siguió el método de Jenkinson y Powlson (1976) modificado. Para ello, tres muestras de suelo fresco (5 g cada una) se incubaron con una solución de glucosa (0,45 mg/g de suelo) durante dos días, a 30 °C en frascos con tapón de rosca. La concentración de CO<sub>2</sub> se determinó en un analizador  $\mu$ -Trac 4200 siguiendo el método automatizado Bac-Trac, método basado en la medición de los cambios de impedancia de una solución de KOH al 2%.

#### 2.4.3. *Valoración de las actividades enzimáticas*

Las actividades enzimáticas determinadas en las muestras de suelo fueron:

1. Fosfatasas ácida y alcalina (Tabatabai y Bremner, 1969).
2.  $\beta$ -glucosidasa (Tabatabai, 1982).
3.  $\beta$ -N acetilglucosaminidasa (Tabatabai, 1982).
4. Celulasa (Pancholy y Rice, 1973, modificado por García-Alvárez e Ibáñez, 1994).
5. Invertasa (Hoffmann y Pallauf, 1965, modificado por García-Alvárez e Ibáñez, 1994).
6. Ureasa (Kandeler y Gerber, 1988).

#### 2.4.4. *Análisis moleculares*

##### 2.4.4.1. Extracción del ADN cromosómico de las muestras de suelo

Para la extracción de ADN se partió de 0,5 g de muestra de suelo y se usó el Kit comercial «Power Soil DNA Isolation Kit» (MoBio, Carlsbad, CA, USA). Las muestras de ADN obtenidas se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, y el ADN se visualizó a la luz ultravioleta ( $\lambda$ , 254 nm). La extracción del ADN se realizó por triplicado para cada suelo.

##### 2.4.4.2. Condiciones de desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

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 1492R) y del dominio *Archaea* (340F + GC clamp y 915R). Para todas las amplificaciones se utilizó la Taq polimerasa «FideliTaq PCR Master MIX», de la casa comercial General Electric.

### 2.4.4.3. Condiciones de desarrollo de la electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (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 los cebadores 340F + GC clamp y 915R para el dominio *Archaea* (Nakatsu *et al.*, 2000; Yu y Morrison, 2004).

La DGGE se realizó en un sistema de detección DCode Mutación Universal (Bio Rad, Hércules, CA, USA). Para separar los distintos fragmentos de ADNr 16S amplificados en la reacción de PCR, se prepararon geles de poliacrilamida al 6 % con diferentes gradientes desnaturalizantes de urea-formamida, con el fin de conocer cuál era el gradiente óptimo de separación de los fragmentos amplificados. La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 60 V durante 18 h, a 60 °C. Para visualizar las bandas de ADN, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (50 µg/mL) durante 20 minutos y se destiñeron con agua desionizada durante 40 minutos. Las bandas de ADN se visualizaron con luz UV y se digitalizaron en un Gel Doc 2000 (BioRad, Hércules, CA, USA).

### 2.4.4.4. Clonaje del gen codificante para ARNr 16S y análisis de las secuencias

Para el clonaje del gen de ADNr 16S del dominio *Bacteria* 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, Carsbad, USA) utilizando el protocolo descrito por el fabricante. Los clones positivos (aproximadamente 100 por muestra), se purificaron utilizando el Kit Ultraclean (MoBio, USA) y se analizaron en el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá. Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en la base de datos Ribosomal Data Project.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Vertedero de Torrejón de Ardoz

En el vertedero de Torrejón de Ardoz se han estudiado cuatro zonas: T2, T2B, T8 y T9 en las que se ha detectado la presencia de diferentes compuestos tóxicos, tales como, hidrocarburos (alifáticos y aromáticos), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y bifenilos policlorados (PCBs). Los resultados correspondientes a la concentración de estos compuestos se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1. Concentración de contaminantes orgánicos presentes en las muestras de suelo del vertedero de Torrejón de Ardoz**

Muestras	Hidrocarburos		
	totales (mg Kg <sup>-1</sup> )	PAHs (mg Kg <sup>-1</sup> )	PCBs (mg Kg <sup>-1</sup> )
T2	165,60	0,21	0,22
T2B	84,52	0,16	0,057
T8	54,48	0,20	< 0,04
T9	189,91	11,06	4,14

Como puede observarse en esta tabla, aunque los contaminantes están presentes en todas las zonas del vertedero analizadas, los valores más elevados de hidrocarburos totales y PCBs se encontraron en las zonas T9 (189,91 mg/kg y 4,14 mg/kg, respectivamente) y T2 (165,6 mg/kg y 0,22 mg/kg, respectivamente). Es importante destacar la elevada concentración de PAHs detectada en la zona T9 (11,06 ppm), en la que se detectaron compuestos como: pireno (1,33 ppm), fluoranteno (1,55 ppm), benzo[b]fluoranteno (1,69 ppm) y benzo[a]pireno (2,23 ppm). En la zona T8, se detectaron las concentraciones más bajas de hidrocarburos totales y de PCBs, si bien también se determinó la presencia de benzo[b]fluoranteno (0,062 ppm) y benzo[a]pireno (0,059 ppm).

Los resultados correspondientes a los parámetros físicos (pH y capacidad de campo) y biológicos (biomasa microbiana) determinados en las distintas zonas del vertedero figuran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Parámetros físicos y biológicos determinados en el vertedero de Torrejón de Ardoz**

Muestras	pH	CC (%)	Bacterias viables (ufc g <sup>-1</sup> )	Hongos viables (ufc g <sup>-1</sup> )	SIR*
T2	7,58	36,4	4,6 × 10 <sup>6</sup>	5,0 × 10 <sup>4</sup>	46,55
T2B	7,75	23,0	1,68 × 10 <sup>7</sup>	2,0 × 10 <sup>5</sup>	76,19
T8	7,62	31,3	7,9 × 10 <sup>7</sup>	1,2 × 10 <sup>5</sup>	77,33
T9	7,8	20,9	1,5 × 10 <sup>7</sup>	5,5 × 10 <sup>4</sup>	45,05

\* SIR (mg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> 100 g<sup>-1</sup> suelo seco)

Los resultados correspondientes a la biomasa microbiana, estimada mediante el recuento de bacterias y hongos viables y mediante la respiración inducida por sustrato (SIR), ponen de manifiesto una mayor actividad microbiana en las zonas T8 y T2B, zonas en las que se detectaron las concentraciones más bajas de los contaminantes orgánicos. En las distintas zonas estudiadas del vertedero, se han valorado, además, distintas actividades enzimáticas relacionadas con los ciclos del C, N y P. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Actividades enzimáticas determinadas en las muestras de suelo del vertedero de Torrejón de Ardoz**

	Fosfatasa ácida (U g <sup>-1</sup> )	Fosfatasa alcalina (U g <sup>-1</sup> )	β-glucosidasa (U g <sup>-1</sup> )	Invertasa (U g <sup>-1</sup> )	Celulasa (U g <sup>-1</sup> )	β-N-acetil-glucosaminidasa (U g <sup>-1</sup> )	Ureasa (U g <sup>-1</sup> )
T2	0,61	1,35	0,59	7,15	0,08	0,07	0,80
T2B	0,76	4,85	1,70	44,02	0,34	0,17	1,90
T8	2,47	9,72	6,66	53,75	0,18	0,32	2,77
T9	0,70	2,90	1,94	18,49	0,18	0,11	1,03

Las actividades fosfatasas, β-glucosidasa y β-N-acetilglucosaminidasa se expresan en μmoles de *p*-nitrofenol/h. Las actividades invertasa y celulasa en μmoles de glucosa/h. La actividad ureasa en μmoles de NH<sub>4</sub>/h.

Como se puede observar en la Tabla 3, los valores de actividad enzimática más altos se detectaron en la zona T8 y correspondieron a las enzimas invertasa, fosfatasa alcalina, β-glucosidasa y ureasa. Asimismo, es importante mencionar que, al igual que ocurrió

con el recuento de bacterias y hongos y la determinación de SIR, los valores de actividad de todas las enzimas estudiadas fueron más elevados en las zonas con menor concentración de compuestos tóxicos (T8 y T2B). Estos resultados, por tanto, ponen de manifiesto la existencia de una relación lineal entre la actividad enzimática, el recuento de viables y el SIR. Resultados similares fueron obtenidos para otros suelos analizados por Taylor *et al.* (2002). Además, y teniendo en cuenta que los parámetros biológicos arriba mencionados han sido propuestos como biomarcadores de recuperación de suelos afectados por diversas perturbaciones (García *et al.*, 1997; Pascual y *et al.*, 2000; Trasar-Cepeda *et al.*, 2000), las zonas T9 y T2 pueden ser consideradas como las más degradadas del vertedero de Torrejón de Ardoz en el momento actual.

La diversidad genética de las poblaciones microbianas pertenecientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea* se estudió mediante la técnica de DGGE y los resultados obtenidos aparecen representados en la Figura 1.

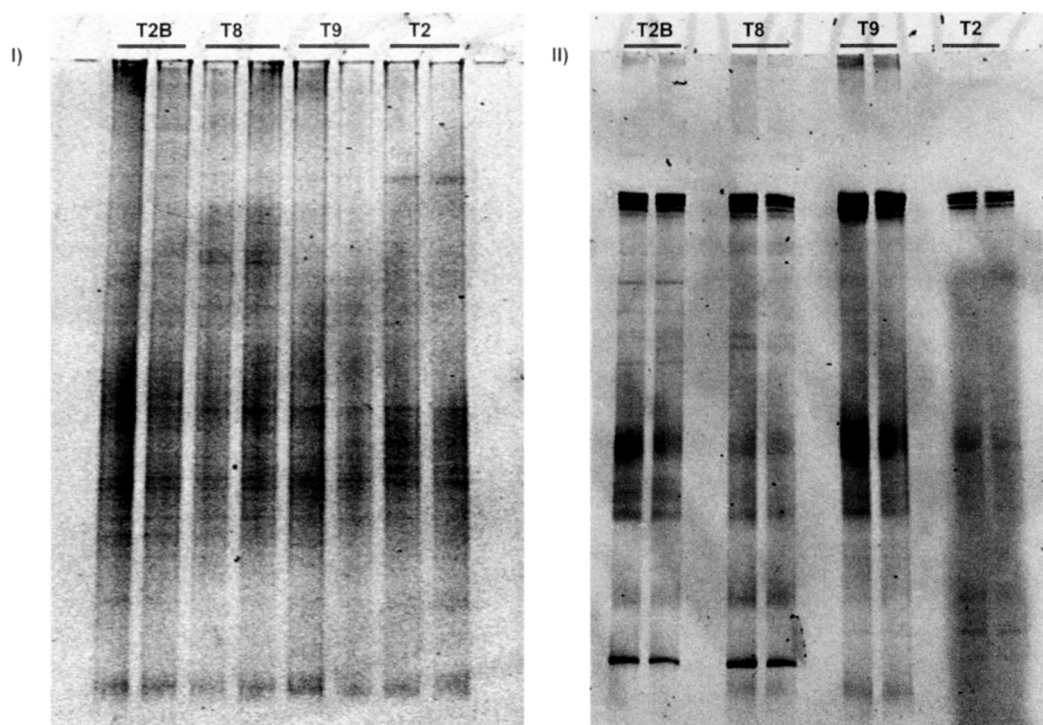


Figura 1. Patrones de bandas correspondientes a los dominios *Bacteria* (I) y *Archaea* (II) (fotografía invertida) obtenidos mediante DGGE

Respecto al dominio *Bacteria*, se obtuvieron patrones de bandas diferentes en cada muestra analizada. Podemos observar, que la muestra T9 presentó el menor número de bandas, mientras que el más alto se obtuvo en la muestra T2B. En la fotografía correspondiente al DGGE del dominio *Archaea*, se observa el mayor número de bandas en la muestra T8 y el menor en las muestras T2 y T9. Una vez más se pone de manifiesto el efecto negativo de los contaminantes estudiados sobre las poblaciones microbianas presentes en los suelos.

La caracterización de las poblaciones microbianas presentes en las muestras de suelo de las diferentes zonas del vertedero, se llevó a cabo mediante el clonaje del gen codificante para ARNr 16S. Esta técnica permite, no sólo la identificación de los grupos microbianos presentes en las muestras, sino también el establecimiento de sus relaciones filogenéticas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. Las secuencias de los genes que muestran un valor de similitud mayor o igual al 95% se considera que pertenecen al mismo filotipo.

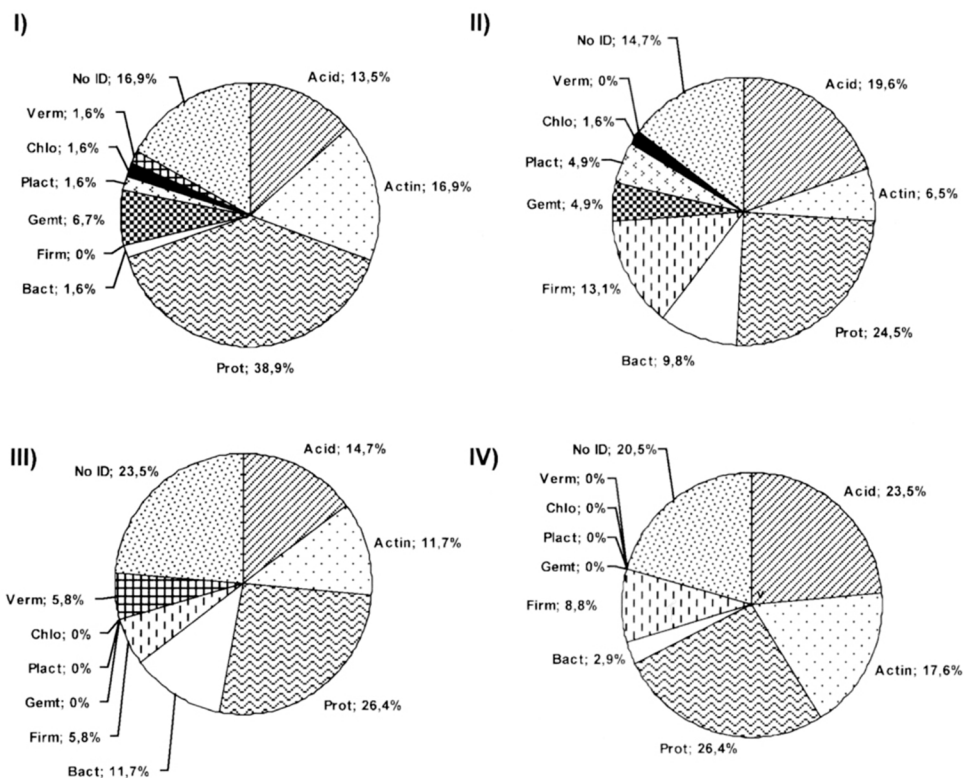


Figura 2. Grupos filogenéticos (%) presentes en las distintas zonas del vertedero de Torrejón de Ardoz. Zonas: T2 (I); T2B (II); T8 (III); T9 (IV). Grupos filogenéticos: Acidobacteria (Acid); Actinobacteria (Actin); Proteobacteria (Prot); Bacteroidetes (Bact); Firmicutes (Firm); Gemmatimonadetes (Gemt); Planctomycetes (Plact); Chloroflexi (Chlo); Verrucomicrobia (Verm); No identificadas (No ID).

En todas las muestras analizadas el phylum mayoritario fue el de *Proteobacteria* (24,5 – 38,9), seguido de los phyla *Acidobacteria* (13,5 – 23,5) y *Actinobacteria* (6,5 – 17,6). Es importante resaltar que la muestra T9 presentó la menor diversidad microbiana, puesto que sólo se detectaron 5 phyla, siendo las proteobacterias (26,4) y las acidobacterias (23,5) los grupos más representativos. En todas las muestras estudiadas se calculó el índice de biodiversidad de Shannon utilizando el programa PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past>). Este índice osciló entre valores comprendidos entre 1,89 y 1,44, correspondiendo los valores más bajos a las muestras T9 y T2 (1,44 y 1,52, respectivamente) y los más altos a T2B y T8 (1,89 y 1,69, respectivamente).

Como ya se ha mencionado, el phylum predominante en todas las muestras fue el de *Proteobacteria*. Se han identificado  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -*Proteobacteria*, siendo el sub-grupo  $\alpha$ -*Proteobacteria* el más abundante en todas las áreas. En el área T8, las  $\beta$ -proteobacterias fueron tan abundantes como las  $\alpha$ -proteobacterias (44,4 %), mientras en el área T9, destaca, a diferencia de otras áreas estudiadas, el sub-grupo  $\delta$ -proteobacterias (33,3 %). Aunque entre las  $\delta$ -proteobacterias y  $\gamma$ -proteobacterias se han descrito cepas microbianas degradadoras de hidrocarburos (Powell *et al.*, 2003), serán necesarios estudios más exhaustivos para determinar si los grupos microbianos identificados pudieran estar implicados en la degradación natural de los hidrocarburos presentes en los suelos.

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren una clara relación inversa entre la presencia de contaminantes en el suelo y la actividad y diversidad microbiana presente en el mismo. De hecho, en las zonas T9 y T2, zonas en las que se ha detectado la concentración más elevada de contaminantes, se han encontrado también los valores más bajos de biomasa microbiana, de actividades enzimáticas y una menor diversidad en las poblaciones microbianas.

### 3.2. Vertedero de Getafe

En el vertedero situado en la localidad de Getafe se muestrearon 4 zonas: G1, G2, G3 y G4. En todas ellas se detectó la presencia de metales pesados, cuyas concentraciones se presentan en la Tabla 4. Las concentraciones más elevadas se detectaron en la zona G4 y correspondieron a los metales Cu, Zn y Pb. Destaca, además, la presencia de elevados niveles de hidrocarburos alifáticos (854,41 mg/kg) en la zona G4 (dato no mostrado).

**Tabla 4. Concentración de metales pesados presentes en las muestras de suelo del vertedero de Getafe**

Muestras	Al mg/kg	Cu mg/kg	Fe mg/kg	Mn mg/kg	Ni mg/kg	Pb mg/kg	Zn mg/kg
G1	4,62	0,60	3,09	4,66	0,04	2,47	5,50
G2	3,98	0,97	2,52	4,09	0,04	4,21	8,87
G3	3,05	0,19	1,07	7,26	0,05	1,09	0,32
G4	3,06	32,19	4,26	5,64	0,32	4,30	11,06

**Tabla 5. Parámetros físicos y biológicos determinados en el vertedero de Getafe**

Muestras	pH	Bacterias viables (ufc g <sup>-1</sup> )	Hongos viables (ufc g <sup>-1</sup> )	SIR*
G1	8,10	4,6 × 10 <sup>6</sup>	2,6 × 10 <sup>4</sup>	13,8
G2	7,81	1,6 × 10 <sup>7</sup>	2,9 × 10 <sup>5</sup>	30,6
G3	7,83	5,3 × 10 <sup>6</sup>	1,7 × 10 <sup>5</sup>	34,0
G4	7,57	4,7 × 10 <sup>6</sup>	6,2 × 10 <sup>4</sup>	14,0

\* SIR (mg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> 100 g<sup>-1</sup> suelo seco)

En la Tabla 5 se presentan los resultados correspondientes al pH, recuento de bacterias y hongos viables y SIR. Podemos observar que en todas las muestras analizadas mediante la técnica de recuento en placa, el número de bacterias fue siempre mayor que



el de hongos viables (mohos y levaduras). Cabe destacar asimismo, que en las muestras correspondientes a las zonas G2 y G3 se estimó un número mayor de microorganismos viables (bacterias y hongos). Del mismo modo, fue en estas zonas donde se detectaron los niveles más elevados de respiración inducida por sustrato (SIR).

En la Tabla 6 se presentan los resultados correspondientes a las actividades enzimáticas valoradas en las diferentes zonas del vertedero. Como se puede observar, las zonas G1 y G4 presentaron los niveles más bajos de actividad enzimática, especialmente en lo que se refiere a las enzimas fosfatasa alcalina,  $\beta$ -glucosidasa e invertasa. Es importante mencionar, que fue también en estas zonas, principalmente en la zona G4, donde se detectaron los niveles más elevados de metales pesados (Tabla 4). Estos resultados están de acuerdo con lo descrito para las actividades invertasa y  $\beta$ -glucosidasa, que se muestran especialmente sensibles a la presencia de agroquímicos y metales pesados (Sastre *et al.*, 1996).

**Tabla 6. Actividades enzimáticas determinadas en las distintas zonas del vertedero de Getafe**

	Fosfatasa ácida (U g <sup>-1</sup> )	Fosfatasa alcalina (U g <sup>-1</sup> )	$\beta$ -glucosidasa (U g <sup>-1</sup> )	Invertasa (U g <sup>-1</sup> )	Celulasa (U g <sup>-1</sup> )	$\beta$ -N-acetil- glucosaminidasa (U g <sup>-1</sup> )	Ureasa (U g <sup>-1</sup> )
<b>G1</b>	0,37	1,37	0,46	20,25	0,05	0,20	0,82
<b>G2</b>	1,71	3,88	3,90	42,97	0,03	0,17	1,23
<b>G3</b>	0,54	3,34	2,61	55,69	0,05	0,31	1,03
<b>G4</b>	0,54	2,26	1,13	17,45	0,08	0,11	1,00

Las actividades fosfatasas,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa se expresan en  $\mu$ moles de *p*-nitrofenol/h. Las actividades invertasa y celulasa en  $\mu$ moles de glucosa/h. La actividad ureasa en  $\mu$ moles de NH<sub>4</sub>/h.

Por otra parte, al igual que en el vertedero de Torrejón, los resultados obtenidos en estas muestras de suelo, indican una relación directa entre los parámetros, biomasa microbiana, SIR y actividad enzimática.

En el vertedero de Getafe se estudió asimismo, la diversidad genética de las poblaciones microbianas de *Bacteria* y *Archaea* mediante la técnica de DGGE. En este caso, los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas entre los patrones de bandas de las distintas zonas del vertedero estudiadas. Este hecho podría ser debido a las bajas concentraciones de metales pesados detectadas en las zonas analizadas. Sin embargo, a altas concentraciones de metales pesados, se ha demostrado una clara influencia sobre la actividad y diversidad microbianas (Wang *et al.*, 2007).

En la Figura 3 se muestran los resultados del análisis de la librería de clones de la zona G4., que es la que se detectó una mayor concentración de metales pesados.

En esta zona se identificaron 6 filotipos, siendo el mayoritario el correspondiente al phylum *Proteobacteria* (54%), seguido de los phyla *Acidobacteria* y *Bacteroidete* (12%) y *Actinobacteria* (6%). Dentro del phylum *Proteobacteria*, se han encontrado los subgrupos  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -*Proteobacteria*, siendo el sub-grupo  $\alpha$ -*Proteobacteria* el más abundante. Dentro de este grupo, los órdenes *Rhizobiales* y *Sphingomonadales* fueron los más abundantes.

En estudios posteriores se intentará comprobar el potencial de estos grupos bacterianos encontrados para poder ser utilizados, en la biorremediación de estos ecosistemas contaminados.

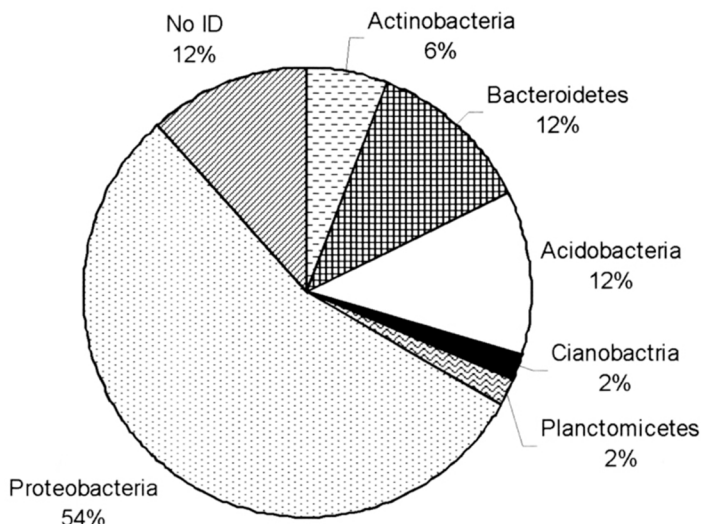


Figura 3. Grupos filogenéticos (%) identificados en la zona G4 del vertedero de Getafe

*Agradecimientos:* Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación del proyecto EIADES S-0505/AMB/0296 subvencionado por la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) y del proyecto CICYT CGL2006-12730-C03-02. Además, al Proyecto CTM 2008-04827/TECNO del Ministerio de Ciencia e Innovación.

## 5. Referencias bibliográficas

- ALLEN, S. E. (1989). «Chemical Analysis of Ecological Materials». Second Edition. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford.
- ARIAS, M. E.; GONZÁLEZ-PÉREZ, J. A.; GONZÁLEZ-VILA, F. J., y BALL, A. S. (2005). *Soil Health- a new challenge for microbiologists and chemists*. *International Microbiology*, 8: 13-21.
- BAUN, A.; JENSEN, S. D.; BJERG, P. L.; CHRISTENSEN, T. H., y NYHOLM, N. (2000). *Toxicity of organic chemical pollution in ground-water downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark)*. *Environ. Sci.Technol.*, 34:1647-1652.
- DEMNEROVÁ, K.; MACKOVA, M.; SPEVÁKOVÁ, V.; BERANOVÁ, K.; KOCHÁNKOVA, L.; LOVECKÁ, P.; RYSLAVÁ, E., y MACEK, T. (2005). *Two approaches to biological decontamination of ground-water and soil polluted by aromatics-characterization of microbial populations*. *International Microbiology*, 8(3): 1-12.
- GARCÍA ÁLVAREZ, A. e 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.
- GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, T., y COSTA, F. (1997). *Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils*. *Com. Soil Sc. and Plant Analysis*, 1-2: 123-134.
- HOFFMANN, G. y PALLAUF, J. (1965). *A colorimetric method for determining saccharase activity in soils*. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, und Bodenkunde*, 110: 193-201.
- ISO 10382. *Soil Quality. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls. Gas chromatographic method with electron capture detection*.
- ISO 18287. *Soil Quality. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)- Gas chromatographic method with mass spectrometric detection (GC-MS)*.

- JAIN, R. K.; KAPUR, M.; LABANA, S.; LAL, B.; SARMA, P. M.; BHATTACHARYA, D., y THAKUR, S. (2005). *Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics*. *Current Science*, 89(1): 101-112.
- JENKINSON, D. S. y POWLSON, D. S. (1976). *The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—I. Fumigation with chloroform*. *Soil Biology and Biochem.*, 8(3):167-177.
- KANDELER, E. y GERBER, H. (1988). *Short term assays of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium*. *Biology and Fertility of Soils*, 5: 68-72.
- NAKATSU, C.; TORSVIK, V., y OVREAS, L. (2000). *Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase Chain reaction products*. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64: 1382-1388.
- PANCHOLY, S. K. y RICE, E. L. (1973). *Soil enzymes in relation to old field succession: Amylase, cellulose, invertase, deshydrogenase and urease*. *Soil Science Society American Proceedings*, 37: 47-50.
- PASCUAL, J. A.; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, T.; MORENO, J. L., y ROS, M. (2000). *Soil microbial activity as a biomarker of degradation and reclamation processes*. *Soil Biol. Biochem.*, 32(13):1877-1883.
- PASTOR, J. y HERNÁNDEZ, A. J. (2002). *Estudio de suelos de vertederos sellados y de sus especies vegetales espontáneas para la fitorrestauración de suelos degradados y contaminados del centro de España*. *Anales de Biología*, 24: 145-153.
- PASTOR, J. y HERNÁNDEZ, A. J. (2007). *Evaluación de la complejidad de vertederos-cubierta edáfica y suelos de las áreas de descarga en relación a la revegetación y la fitorremediación*. *Tendencias Actuales de la Ciencia del Suelo*; BELLINFANTE, N. y JORDÁN, A. (eds.): 947-953. Junta de Andalucía, Sevilla. ISBN 978-84-690-4129-1.
- POWELL, S. M.; BOWMAN, J. P.; SNAPE, I., y STARK, J. S. (2003). *Microbial community variation in pristine and polluted nearshor*. *Antarctic sediments*, 45: 135-145.
- RÖLING, W. F. M.; VAN BREUKELEN, B. M.; BRASTER, M.; LIN, B., y VAN VERSEVELD, H. W. (2001). *Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(10): 4619-4629.
- SASTRE, I.; VICENTE, M. A., y LOBO, M. C. (1996). *Influence of the application of sewage sludge on soil microbial activity*. *Bioresource Technology*, 57: 19-23.
- SASTRE, I.; VICENTE, M. A., y LOBO, M. C. (2003). *Contamination and environmental impact on soil biological activity*. En: M. C. LOBO y J. J. IBÁÑEZ (eds.), *Preserving soil quality and soil biodiversity*. Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA), pp. 99-117.
- TABATABAI, M. A. (1982). En: *Methods of Soil Analysis Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Soil Science Society of America, Inc. Madison. A. L. MILLER y E. M., KEENEY, D. R. (eds.), pp. 903-947.
- TABATABAI, M. A. y BREMNER, J. M. (1969). *Use of p-nitrophenyl for assay of soil phosphatase activity*. *Soil Biol. Biochem.*, 1: 301-307
- TAYLOR, J. P.; WILSON, B.; MILLS, M. S., y BURNS, R. G. (2002). *Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques*. *Soil. Biol. Biochem.*, 34: 387-401.
- TRASAR CEPEDA, C.; LEIRÓS DE LA PEÑA, M. C.; GARCÍA FERNÁNDEZ, F., y GIL SOTRES, F. (2000). *Propiedades Bioquímicas de los suelos gallegos: su utilización como indicadores de la calidad del suelo*. En: GARCÍA, C. y HERNÁNDEZ, M. T., *Investigación y Perspectivas de Enzimología de Suelos en España*. CSIC, pp. 146-206.
- UNE 77307. *Calidad del suelo. Determinación del contenido de aceite mineral. Método de espectrometría infrarroja y método de cromatografía de gases*.
- WANG, Y.; SHI, J.; WANG, H.; LIN, Q.; CHEN, X., y CHEN Y. (2007). *The influence of soil heavy metals pollutin on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 75-81.
- YU, Z. y MORRISON, M. (2004). *Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(8): 4800-4806.