

**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

**ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**



**POTENCIAL PARA EL SECUESTRO DE CARBONO Y LA  
PROTECCIÓN DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA DE  
PRÁCTICAS AGRÍCOLAS SOSTENIBLES EN SUELOS DE  
OLIVAR. DISEÑO Y APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS  
“ÓMICAS”.**

**TESIS DOCTORAL**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Rosa Cañizares González  
D.L.: GR 1175-2012  
ISBN: 978-84-695-1181-7



**Rosa Cañizares González**

**Granada, 2011**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**

**POTENCIAL PARA EL SECUESTRO DE CARBONO Y LA  
PROTECCIÓN DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA DE  
PRÁCTICAS AGRÍCOLAS SOSTENIBLES EN SUELOS DE OLIVAR.  
DISEÑO Y APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS “ÓMICAS”.**

**Memoria presentada por la Licenciada en Ciencias Ambientales Rosa  
Cañizares González para optar al grado de Doctor por la Universidad de  
Granada.**

**Fdo: Rosa Cañizares González**

**VºBº de los Directores de la Tesis Doctoral**

**Fdo.: Emilio Benítez León  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Investigador Científico del CSIC**

**Fdo.: Beatriz Moreno Sánchez  
Doctora en Biotecnología**

**Universidad de Granada  
2011**



Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Protección Ambiental (Grupo de investigación "Relaciones Planta-Suelo") de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada). El presente estudio se encuadró dentro de los objetivos científicos-técnicos propuestos en los Proyectos de Investigación cofinanciados por el Ministerio de Innovación y Ciencia de España y fondos FEDER, "Biodiversidad bacteriana, actividad bioquímica y calidad de la materia orgánica del suelo: bioindicadores de sostenibilidad agrícola en agroecosistemas mediterráneos de olivar (CGL2006-05437)" y "Capacidad para el sequestro de carbono atmosférico en suelos de olivar andaluces. Relación con los procesos de humificación y mineralización valuados mediante metodologías "ómicas" (CGL2009-07907)". Para la realización del presente trabajo la Lda. Rosa Cañizares González disfrutó de una Beca Predoctoral de JAE-CSIC.

Los resultados presentados en esta tesis doctoral se encuentran en revisión o ya han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., **Cañizares, R.**, Castro, J., Benítez, E., 2009. Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment** **131**, 333-339

**Cañizares, R.**, Moreno, B., Benitez, B., 2011. Bacterial  $\beta$ -glucosidase function and metabolic activity depend on soil management in semiarid rainfed agriculture. **Ecology and Evolution** **(En revisión)**

**Cañizares, R.**, Moreno, B., Benitez, B., 2011. Transcriptional response of soil bacteria to land management in a highly vulnerable agroecosystem. **Biology and Fertility of soil** **(En revisión)**

**Cañizares, R.**, Moreno, B., Nuñez, R., Benitez, B., 2011. Consequences of soil management for molecular diversity and expression of bacterial  $\beta$ -glucosidase genes. **Soil Biology & Biochemistry** **(En revisión)**

**Cañizares, R.**, Benitez, E., Ogunseitan, O.A., 2011. Molecular analyses of  $\beta$ -glucosidase diversity and function in soil. **European Journal of Soil Biology** **47**, 1-8.



## Agradecimientos

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido fruto de varios años de trabajo y dedicación en el que muchas personas de una forma u otra han estado presentes. Por ello, a continuación quiero expresar mi más sincera gratitud a todas ellas, sin las cuales, no hubiese sido posible afrontar con éxito la elaboración de este proyecto, en el que tanta ilusión he puesto.

En primer lugar, agradecer a mis directores, el Dr. Emilio Benítez León y la Dra. Beatriz Moreno Sánchez, por su absoluta confianza y apoyo depositados en mí a lo largo de todo este tiempo. Esta Tesis es tan mía como vuestra.

Emilio, muchas gracias por todo tu apoyo, confianza y por tus buenas ideas enmarcadas siempre en la orientación y desarrollo de esta Tesis Doctoral. Considero que han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos. Te agradezco también todas las horas que hemos pasado delante del ordenador, sin ellas y sin tu dedicación generosa y meticulosa, no hubiese sido posible este trabajo. Gracias por el todo el respeto y cariño que me has brindado durante estos años.

Bea, quiero agradecerte la disponibilidad y paciencia que has tenido conmigo, enseñándome y explicándome todo lo que sabes con el máximo cariño. No hay duda de que tu participación y experiencia ha enriquecido el trabajo realizado. Nuestras conversaciones y a veces diferentes puntos de vista han sido beneficiosos tanto a nivel científico como a nivel personal.

Quiero extender mi sincero agradecimiento al Dr. Rogelio Nogales Vargas-Machuca, director del grupo de investigación, gracias a él comencé mi andadura en la EEZ durante los tres meses de duración de la beca “de la bicicleta”. Gracias por tu paciencia, disponibilidad y generosidad, gracias también por dejarme en las buenas manos de Emilio durante mis siguientes años en el grupo.

Al Dr. Manuel Sánchez Marañón, con quién di mis primeros pasos en la investigación en mi etapa de estudiante, al Dr. Rafael Delgado Calvo-Flores y al Dr. Gabriel Delgado Calvo-Flores, quiero expresarles mi sincera gratitud por acogerme en el Departamento de Edafología de la Facultad de Farmacia durante mis dos últimos años de carrera y por orientarme y aconsejarme sobre el inicio de mi trabajo predoctoral en el CSIC.

A la Dra. Esperanza Romero y Dra. Mercedes Campos por el afectuoso trato que me han mostrado en todo momento y por compartir conmigo sus experiencias de tipo profesional y personal que han sido de gran valor para mí.

Al Dr. Oladele Ogunseitan de la Universidad de California, Irvine, agradezco con especial recuerdo su acogida y su aceptación, para que pudiese trabajar durante mis dos estancias en su grupo de investigación. Durante esos meses conté con su amabilidad, disponibilidad y apoyo tanto personal como logístico para llevar a cabo el trabajo. Muchas gracias por concederme la oportunidad de esa experiencia tan bonita e importante para mi formación. Gracias por creer en mí.

Al Dr. Juan Castro, investigador del IFAPA, gran profesional y buena persona donde las haya, por estar siempre dispuesto a resolver las dudas que me han surgido y por interesarse en la evolución de este trabajo. Gracias.



Al Dr. Antonio Luis Extremera, tutor del presente trabajo, gracias por ayudarme cuando lo he necesitado.

Al Dr. Rafael Núñez, por su ayuda y explicaciones sobre los análisis de ácidos grasos de suelos.

A Sonia, millón de gracias por permitirme ser tu sombra y aprender de ti durante los dos años que trabajamos juntas, por enseñarme todo, todo y todo lo que estaba en tu mano. Tus valiosas explicaciones fueron para mí de gran ayuda en los inicios de este trabajo. Sé que aunque no nos veamos estas ahí para lo que necesite.

A Astrid, por los consejos, conversaciones y el cariño que siempre me has mostrado.

A Celia Cifuentes, a ti te debo todo lo que sé sobre actividades enzimáticas gracias por introducirme en este campo. Y gracias también por introducirme a la gente, no olvidaré que fuiste tú quien comenzó a presentarme a todos y cada uno de los integrantes del grupo y de la EEZ en general, me abriste camino y todo fue así más fácil. Eres una maravillosa persona y gran amiga a la que le deseo lo mejor en esta vida. Gracias por haber estado cuando lo he necesitado, por animarme, valórame y consolado en más de una ocasión.

A Amparo, gracias por tus consejos, interesarte por mí y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A Jesús, por ser un gran amigo, por apoyarme cuando lo he necesitado, porque aunque ya no estés por aquí, el Skype o nuestras conversaciones telefónicas siempre me indican que te interesas por mí.

A Luisa, Herminia, Dani, Celia, Jean, Fer, Belén, Mar, Sol, Manu, Mariu, Estefi, Sonia, Lourdes, Mario y Rafa, por ser como sois, por hacer que los desayunos sean un descanso agradable que cargan las pilas para volver al “lab” con fuerzas. Gracias también por escucharme siempre. Rafa, tú has sido el último en incorporarte al grupo y he de decirte que admiro tu forma de ser, eres una persona constante y trabajadora con la que da gusto estar al lado. Manu y Mario, con vosotros he vivido simultáneamente este último periodo de tesis y sólo tengo palabras de agradecimiento de lo pendientes que habéis estado de mí.

A Lele, por hacer que trabajar y disfrutar vayan de la mano, por enseñarme palabritas en italiano y por inventar el juego “gara de puntas” así era más divertido cargar las puntas cuando se vaciaban las cajas. ;)

A Sergio Saia, otra gran persona que pasó por el laboratorio y siempre estaba dispuesto a ayudar y explicarme las cosas con mucho cariño.

A Chon y Jacob, de la casa roja, por sus infinitos consejos sobre el mundo de la PCR cuantitativa y por estar siempre que os he necesitado.

A los de “arriba”, Cris y Hortensia por ser tan bellas personas tanto personal como profesionalmente. Y a los de aún más “arriba”, Alejo, Moha, Patri, Pacheco, Sofie, Agueda, Anuska y Adela por brindarme vuestra ayuda siempre que me ha hecho falta.

A Javi y Cesar, los informáticos, por prestarme su ayuda siempre que ha surgido algún problemilla con el ordenador.

A la Dra. Betty Olson y Dra. Sunny Jiang de la Universidad de California Irvine, y mis compis de los laboratorios de al lado Phill, Pity Porn, Sam, Marilou, Cheng-Yao, Linda. Gracias por ser tan generosos y ayudarme tanto como lo hicisteis.

A los de California que no estuvieron conmigo en el laboratorio, Nayssan y Alejandra, siempre agradeceré que fuisteis las primeras personas que conocí, gracias por recogerme del aeropuerto, ayudarme a llenar el frigorífico los primeros días y a introducirme en el maravilloso mundo del “Frozen Yogurt”. A los españoles, Marc, Fernán, David, Carlos, Papió, Alex y Pep, por hacerme vivir momentos tan bonitos allí.

A Antonio y Laura, por ser una pareja ejemplo a seguir, trabajadora, respetuosa y divertida. Raras veces he visto a gente con tantas ganas de superación como la vuestra, conoceros es de uno de los mejores regalos que me llevo de estos años. Gracias por como os portasteis conmigo en California, por ese viaje a San Francisco, por las tantas veces que me habéis escuchado y aconsejado. Os aprecio y os quiero.

A los que empezamos siendo el grupito de la EEZ, aunque algunos ya no estéis aquí nos seguimos viendo fuera de ésta, no todo es trabajar! Gracias Carol, Regi, Sisi, Hector, Mario, Dani, Pilar, 6d, Jesús, Gloria, Belén, Carlos, Germán y Paloma, por todos los momentos que hemos vivido y compartido juntos, las excursiones al monte, la playa, la alpujarra, por nuestros viajes con la “cani friqui Flago” a los San Fermines, los carnavales... Especialmente a Carol y Regi por ser dos buenas amigas, por compartir junto a mí no sólo estos momentos, sino otros aún mucho más cercanos y profundos como nuestras quedadas de los viernes con helaito y palmerita de choco en mano. Os quiero mucho.

A mis siempre amigas de la infancia, Gloria, Isa y Marta. Y a ti también Leiva por ser amigos y apoyo moral durante todo este tiempo.

A mis niñas de la carrera, Mercedes, Marina, Mariado, Rocio, Bea, Ana y Ori por interesaros siempre en cómo iban saliendo los experimentos y escucharme cuando necesitaba desahogarme. Especialmente a vosotras, Bea y Mer que estáis compartiendo este camino de ser futuras doctoras y sabéis lo duro que es, por vuestras palabras de ánimo y a ti Mer gracias por los mapitas ;)

A Diego, Elena, Belén e Inma, quienes un día compartisteis conmigo ser monitores en el Parque de las Ciencias y me impulsasteis a tener interés por seguir avanzando en mi carrera investigadora y en lo bonito que es aprender, gracias por vuestro interés durante estos años.

A los del “gym”, Efa, Cris, Clarita, Santi y Carmenxu por todos los buenos momentos y risas que hemos compartido juntos.

A Concha Mediano, por su escucharme, apoyarme y animarme. Gracias.

A mi Blankita, quien es para mí un gran apoyo, una buena, muy buena amiga, sabes que para mí eres como una hermana. Gracias por contagiarme de alegrías y buenos momentos. Gracias por tus dotes artísticas en el diseño de la portada de la tesis y en definitiva gracias por ser como eres.

A mi familia, mis tíos y abuelas que me han estado acompañando y apoyando en todo, por valorar todo lo que hago. En especial a ti Nona, porque tú también eres doctora y has pasado por lo mismo que yo, gracias por tu disposición y ayuda en todo momento, espero poder seguir contando contigo

muchos años más. A mis abuelos Antonio y Pepe, porque sé que desde allí arriba me estaréis mirando y os sentiréis muy orgullosos de mi.

A mi otra familia Josep, Teresa y Gemma, soy muy afortunada de poder compartir mi día a día con personas de tanta calidad humana como sois vosotros. Gracias por vuestro apoyo incondicional durante esta última etapa de la tesis. Gemma aunque a ti te haya visto menos estos últimos meses, se que estas al meu costat, T'estimo molt maca!

Y por último agradecer a los que más quiero y llenan mi vida de alegría e ilusión: Papá, Mamá, Javi y Pep. Se me hace un nudo en la garganta cuando intento expresar mi gratitud hacia vosotros, así que hacerlo en pocas palabras es complicado, pero ya sabéis lo importante que es tener a mi lado a todos y a cada uno de vosotros. Esta Tesis os la dedico a vosotros.

Papá y Mamá, gracias por todo el esfuerzo que habéis dedicado en mi educación durante mis 26 años, espero que estéis orgullosos de hasta donde he llegado y no haberos defraudado nunca. Nadie mejor que vosotros, mis dos doctores de casa, sabéis lo que alcanzar un doctorado supone. Gracias por vuestras palabras de ánimo, apoyarme, quererme, creer incondicionalmente en mí, y por ser un hombro en el que apoyarme. Todo lo que soy os lo debo a vosotros. Sabéis que os quiero mucho y que el día que marche de casa me resultará muy difícil, porque no sólo habéis sido padres sino unos grandes amigos en los que confié más que en nadie. A pesar de algunos puntos de vista diferentes siempre me habéis respetado y escuchado, sois sin duda los padres perfectos.

A mi hermanito Javi, aquí estoy “poniéndote en los créditos” como tú dices. Cómo iba a olvidarme de ti. Eres todo para mí. Ahora que estas lejos de casa me doy cuenta de lo mucho que te echo de menos. Aunque estés pasando frío por Noruega, eres capaz de hacerme llegar desde tan lejos el cariño más cálido. Lo que me hace más feliz en un día como hoy es que estés aquí para verme.

Y a ti Pep, nadie me dijo que irme de estancia a California además de una muy buena experiencia a nivel laboral iba a ser lo mejor que me pasará en la vida. Allí estabas tú, desde que te conocí has estado a mi lado tanto en los buenos momentos, como en los no tan buenos, dándome un apoyo incondicional y animándome a seguir adelante cuando estaba dándome por vencida. Tuviste todo preparado para que la segunda estancia en Irvine fuese perfecta, para que mi rendimiento en el laboratorio fuese del 100%. Estuviste a mi lado día tras día facilitando que este trabajo haya sido posible. Gracias de todo corazón por creer en mí. Por hacerme reír y sobre todo por hacerme tan feliz. A pesar de que la distancia no es algo sencillo, gracias por hacer que todo sea más fácil. No sabía que estar enamorada y querer a alguien fuese así de bonito. Te quiero mucho.

*A mis padres, mi hermano Javi y a Pep.*

*“Estar preparado es importante, saber esperar lo es aún más, pero  
aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida”  
(Arthur Schinitzler).*



## ÍNDICE





<b>Introducción</b>	<b>Página</b>
<b>1. Cambio climático y ecosistemas vulnerables</b> .....	3
1.1. Cambio climático y sistemas agrarios .....	5
<b>2. Agroecosistema mediterráneo del olivar</b> .....	7
2.1. Sistemas de gestión del olivar .....	8
2.2. Sistemas de manejo del suelo .....	10
2.2.1. El laboreo .....	11
2.2.2. No-laboreo con suelo desnudo .....	12
2.2.3. Semilaboreo .....	13
2.2.4. Cubiertas .....	13
<b>3. Producción y sostenibilidad agrícola</b> .....	15
3.1. Ciclo global del carbono .....	16
3.2. Secuestro de carbono .....	17
3.3. Dinámica del carbono en el suelo .....	17
<b>4. Calidad del suelo</b> .....	19
<b>5. Bioindicadores de la calidad del suelo</b> .....	21
5.1. Enzimas del suelo .....	21
5.2. Microorganismos del suelo .....	24
5.2.1. Biomasa microbiana .....	25
5.2.2. Diversidad microbiana .....	25
<b>6. Tecnologías “ómicas” aplicadas al estudio del suelo</b> .....	28
6.1. Genómica y transcriptómica .....	29
6.2. Proteómica .....	31
6.2.1. Separación de proteínas mediante electroforesis de una dimensión .....	34
6.2.2. Separación de proteínas mediante electroforesis de dos dimensión .....	35
6.2.3. Identificación de proteínas .....	36
<b>Interés del trabajo. Objetivos</b> .....	39
<b>Materiales</b>	
1. Localización .....	45
2. Características de la zona de estudio y descripción del perfil del suelo .....	45
3. Descripción del experimento .....	46
4. Caracterización textural del suelo .....	50
5. Materiales utilizados para estudios de metaproteómica de suelos .....	51



5.1. Zona de estudio y toma de muestras .....	51
5.2. Características de la zona de estudio .....	52
5.3. Experimento de incubación de suelos .....	52

## **Resultados**

### **Capítulo 1.** Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality

Resumen .....	57
Introduction .....	59
Material and methods .....	60
Results .....	62
Discussion .....	62
Conclusions .....	65

### **Capítulo 2.** Bacterial $\beta$ -glucosidase function and metabolic activity depend on soil management in semiarid rainfed agriculture.

Resumen .....	69
Introduction .....	71
Material and methods .....	72
Results and discussion .....	73

### **Capítulo 3.** Transcriptional response of soil bacteria to land management in a highly vulnerable agroecosystem.

Resumen .....	79
Introduction .....	81
Material and methods .....	82
Results .....	84
Discussion .....	87

### **Capítulo 4.** Consequences of soil management for molecular diversity and expression of bacterial $\beta$ -glucosidase genes.

Resumen .....	97
Introduction .....	99
Material and methods .....	100
Results .....	102
Discussion .....	107

### **Capítulo 5.** Molecular analyses of $\beta$ -glucosidase diversity and function in soil.

Resumen .....	115
Introduction .....	117

Material and methods .....	118
Results .....	120
Discussion .....	121
<b>Discusión general</b> .....	129
<b>Conclusiones</b> .....	145
<b>Bibliografía</b> .....	149
<b>Apéndice</b> .....	171
Índice de abreviaturas .....	171
Índice de tablas y figuras .....	174



# INTRODUCCIÓN





## INTRODUCCIÓN

### 1. Cambio climático y ecosistemas vulnerables

La Convención de las Naciones Unidas para la Lucha Contra la Desertificación (UNCCD, United Nations Convention to Combat Desertification) define la desertificación como “la degradación del suelo en zonas áridas y semiáridas, resultante de factores tales como variaciones climáticas y actividades humanas”. Asimismo, considera la degradación de los suelos como uno de los mayores riesgos para la seguridad y soberanía alimentaria de los países, y la define como “una reducción o pérdida de la productividad biológica o económica de los suelos agrícolas en las zonas áridas y semiáridas, como resultado del uso del suelo o de procesos naturales o antrópicos tales como (i) erosión del suelo, (ii) deterioro de las propiedades físicas, químicas, biológicas o económicas del suelo, (iii) pérdida prolongada de la vegetación natural”.

Los ecosistemas mediterráneos, caracterizados por estar sometidos a condiciones climáticas adversas, largos periodos de explotación de la tierra y una tasa de población relativamente alta respecto a la capacidad de producción del suelo, han sido calificados como los ecosistemas con más riesgo de degradación de la Unión Europea (Metzger et al., 2006). Asimismo, en el último informe del Departamento para la Conservación de Recursos Naturales y Agricultura de Estados Unidos, puede apreciarse la calificación de “vulnerabilidad alta” para el al sur de España (WMO, 2005) (Fig. 1).

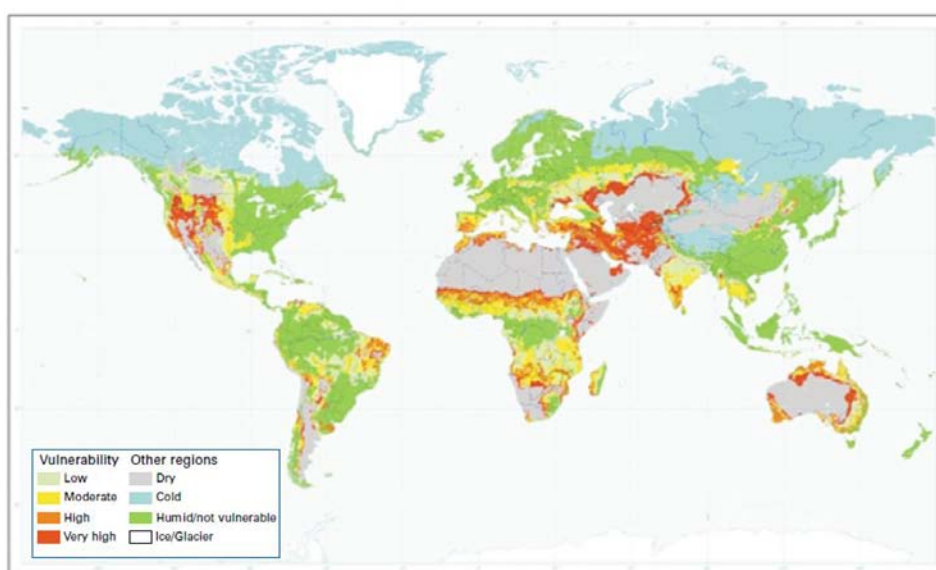


Figura.1. Riesgo de vulnerabilidad a la degradación del suelo.

En este escenario, y con objeto de minimizar los riesgos de degradación del suelo, se requieren prácticas de manejo agrícola que sean sostenibles o poco agresivas con el medio ambiente. Los procesos de degradación de suelos, físicos (p. ej. deterioro de la estructura, compactación), químicos (p. ej. acidificación, lixiviación, salinización, disminución o pérdida de fertilidad) y biológicos (p. ej. reducción de la biomasa, el contenido de carbono y biodiversidad), están relacionados en gran medida con actividades antrópicas no sostenibles, incluidas aquellas derivadas de los diferentes manejos agrícolas (Lal, 2011). Por tanto, se requieren políticas y prácticas agrícolas que determinen una gestión racional del uso del suelo, con el fin de alcanzar sistemas agrícolas sostenibles. En este sentido, han sido propuestos una serie de principios básicos cuya aplicación implicaría la actuación conjunta de varios sectores sociales, incluyendo políticos, investigadores, técnicos y agricultores, dirigidos a la consecución de una agricultura sostenible en el tiempo, respetuosa con el medioambiente, y económicamente viable (Fig. 2, Lal, 2009).

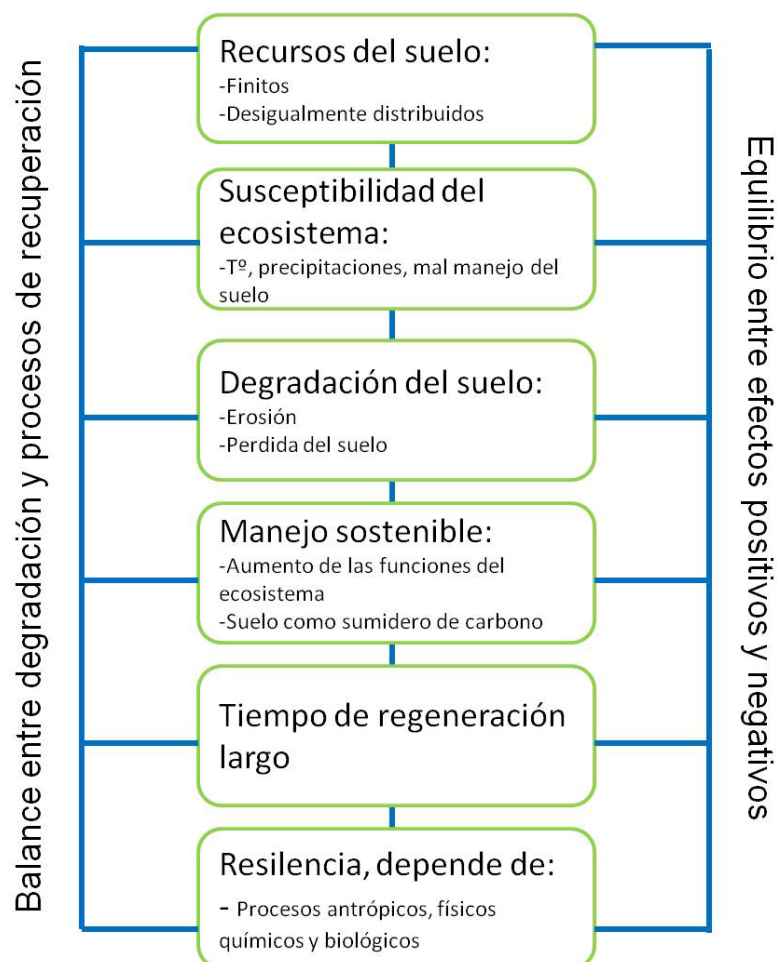


Figura. 2 Propiedades, procesos y prácticas agrícolas que rigen la degradación o resistencia de un suelo y manejos sostenibles.

## 1.1 Cambio Climático y Sistemas agrarios

La agricultura es uno de los sectores más vulnerables a los impactos del cambio climático. La producción agraria tiene una estrecha relación con las variaciones climáticas, entre otras cosas, por los efectos de éstas sobre la calidad del suelo (Jenny, 1980). Por lo tanto, cualquier cambio climático debe implicar una adaptación a las nuevas condiciones y asimismo, el desarrollo de nuevos sistemas de producción científicamente contrastados (Reilly, 1999), puesto que la preocupación social sobre el calentamiento global debido al incremento atmosférico de gases de efecto invernadero (GEI), ha traspasado el ámbito científico, provocando una creciente preocupación y alarma en casi todos los sectores sociales.

Las emisiones de GEI tienen un origen antropogénico y natural. En este sentido, su concentración ha ido incrementando en la atmósfera de forma vertiginosa durante los últimos años, principalmente desde la revolución industrial (1770) y como consecuencia del uso de combustibles fósiles como fuente de energía, (Friedli et al., 1986; Ramanathan et al., 2008). Este hecho se ha visto acentuado con la destrucción de bosques, la transformación del uso del territorio, aplicación de fertilizantes y fuegos forestales entre otros aspectos (Intergovernmental Panel of Climate Change IPCC, 2007).

De los gases implicados en el efecto invernadero, el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) es el más abundante (cerca del 60%). Además se incluyen gases como el metano (CH<sub>4</sub>), el óxido nitroso (NO<sub>2</sub>), los clorofluorocarbonados (CFCs) y el ozono (O<sub>3</sub>). La concentración de CO<sub>2</sub>, ha aumentado en 100 ppm (un 36%) desde el inicio del desarrollo industrial hasta el 2006, la mayor parte debido a la actividad humana (IPCC, 2007). El aumento de los GEI en general, y la magnitud de emisiones de CO<sub>2</sub> en particular, ha motivado la toma de conciencia del problema por diferentes foros de carácter político y social, así como la búsqueda de soluciones. Cabe destacar la **Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático** (UNFCCC), creada en 1992, cuyo objetivo es “*la estabilización de la conservación de gases de efecto invernadero en la atmósfera a un nivel en el que se impida una interferencia antropogénica peligrosa con el sistema climático*”; el **Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático** (IPCC), agencia especializada de Naciones Unidas creada en 1988 en respuesta al reconocimiento internacional del problema del cambio climático y de la necesidad de disponer de un conocimiento profundo que permitiese diseñar respuestas adecuadas; y el **Protocolo de Kioto** que nació en 1997 como acuerdo que compromete, a los países desarrollados y a los países en transición hacia una economía de mercado, a reducir durante el periodo 2008-



2012 su emisión colectiva de seis gases de efecto invernadero, como mínimo un 5% por debajo de los niveles de emisión de 1990.

La **Comisión de las Comunidades Europeas**, en su Estrategia Temática para la Protección del Suelo, reconoce la necesidad de fomentar la investigación en torno a una serie de grupos prioritarios entre los que se encuentran los “procesos que sustentan las funciones del suelo, su papel en la contabilidad global del CO<sub>2</sub> y en la protección de la biodiversidad” (COM, 2006). El grupo de trabajo del Programa Europeo sobre Cambio Climático, ha estimado que el potencial de los suelos agrícolas para el secuestro de carbono, representa un equivalente que oscila entre el 1,5 % y el 1,7 % de las emisiones antropogénicas de CO<sub>2</sub> de la UE durante el primer período de compromiso del Protocolo de Kioto ([http://ec.europa.eu/comm/environment/climat/pdf/finalreport\\_agricsoils.pdf](http://ec.europa.eu/comm/environment/climat/pdf/finalreport_agricsoils.pdf)).

El artículo 3.3 del protocolo de Kioto hace referencia a las variaciones netas de las emisiones por parte de las fuentes y la absorción por los sumideros de GEIs en relación con cambios en el uso del suelo y silvicultura, contemplando la forestación, reforestación y deforestación desde 1990. Dicho Protocolo subraya, en su artículo 3.4, que el suelo constituye un importante almacén de carbono que ha de protegerse y reforzarse en la medida de lo posible, y contempla actividades adicionales a las anteriores como: gestión agrícola, gestión forestal, gestión de pastos y restablecimiento de la vegetación.

La captación de carbono por los suelos agrícolas en función de determinadas prácticas de gestión, podría contribuir a atenuar el cambio climático. De esta forma, a través del Protocolo de Kioto, la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) se propone determinar, elaborar y promover ciertas prácticas agrícolas sostenibles, capaces de reducir las emisiones de carbono de la agricultura, así como de almacenar el carbono en la biomasa de las plantas y en los suelos, a la vez que se incrementa la producción. Entre dichas prácticas se incluyen, por ejemplo, un mayor uso de maquinaria que utilice biocombustibles, aplicación más racional de fertilizantes, herbicidas y plaguicidas químicos, no arar las tierras, cubrir el suelo con material vegetal, sembrar directamente y practicar la rotación de cultivos diversificados. La política agraria común (PAC) pretende también mitigar las prácticas agrícolas para reducir el cambio climático y las emisiones de GEIs (European Commission resolution on the CAP “Health Check”, European Council 2008). Solamente considerando el uso de prácticas agrícolas respetuosas con el medioambiente, el potencial biológico de los suelos europeos rondaría las 45 Mt de fijación de C por año (Smith, 2004). Sin embargo, son escasos los estudios científicos enfocados a determinar el potencial de los suelos agrícolas como sumidero de carbono atmosférico

(Freibauer et al., 2004), y aún menos los referidos a España (Vleeshouwers & Verhagen, 2002) y concretamente en olivar (Castro et al., 2008; Medina and Iglesias, 2010).

## **2. Agroecosistema mediterráneo del olivar**

Las evidencias arqueológicas sitúan los inicios del cultivo del olivo (*Olea europea*) al norte del Mar Muerto, en torno al IV milenio a.C, no obstante, hay datos previos referentes a su origen que se remontan al XII milenio a.C. El cultivo se inicia con el aprendizaje de la propagación vegetativa y desde entonces se expande hacia Occidente, convirtiéndose en la planta oleaginosa por antonomasia en todo el Mediterráneo. El cultivo del olivo se introduce en España con los fenicios pero no será hasta la llegada del Imperio romano cuando éste adquiera un gran desarrollo, y será en esta misma época cuando el olivar se establecerá sólidamente en la Bética, siendo el aceite de esta región objeto de un intenso comercio con otras provincias del Imperio. Asimismo, la selección de variedades de olivo irá acompañando el proceso de expansión de su cultivo. Sin embargo, hasta el siglo XIX no se logra una catalogación de las mismas. Durante el siglo XX se establecen las primeras colecciones y se inicia el estudio de sus características, se aplican diferentes métodos y técnicas de evaluación de interés agronómico y oleotécnico, se establecen ensayos comparativos de las diferentes variedades y en la última década se empiezan a establecer las bases biotecnológicas en el olivar.

Se estima que existen en todo el mundo aproximadamente 1000 millones de olivos, lo que supone una ocupación de unos 10.000.000 de hectáreas. El 98% del total se sitúa en los países de la cuenca Mediterránea, el 1.2 % en el continente Americano, el 0.4 % en Asia oriental y otro 0.4 % en Oceanía. Por tanto, el olivo se ha distribuido fundamentalmente en regiones con clima Mediterráneo, situadas entre los 30° y 45° de latitud, caracterizadas por inviernos templados y veranos secos y calurosos, con escasas precipitaciones durante la primavera y el invierno que oscilan entre los 400 y los 1000 mm anuales, dependiendo de las zonas.

En España el olivar ocupa casi todo su territorio y es el cultivo más importante en términos tanto sociales como económicos (Taguas et al., 2009). En muchas regiones de Andalucía la olivicultura es una de las principales actividades económicas y de generación de empleo, además de conformar el principal elemento del paisaje (Pajarón, 2000). Los últimos datos relativos a la superficie del olivar en España indican que de un total de 2.572.195 hectáreas, el 60% de las cuales se sitúan en Andalucía (<http://www.marm.es/es/estadistica/temas/encuesta-sobre-superficies-y-rendimientos-de-cultivos-esyrce/>).

Solo unos 75 millones de olivos a nivel mundial se consideran de regadío por lo que la mayoría se cultivan en secano. En este sentido podemos destacar que el olivo tiene una gran facilidad para adaptarse a casi todos los tipos de suelo, gracias a su comportamiento fisiológico (Sofo et al., 2007), soportando condiciones climáticas extremas, como sequías, altas temperaturas y heladas. Por tanto, en la mayoría de las zonas olivareras mediterráneas la lluvia es el único aporte hídrico para el olivar. La disponibilidad de agua es pues el principal factor limitante que tiene el olivo, debido a la escasez de agua de lluvia y a su elevada tasa de evapotranspiración. Ante la limitación de agua, el agricultor de secano ha pretendido cubrir las necesidades del olivo mediante dos técnicas: la elección de amplios marcos de plantación y el laboreo del suelo. La primera pretende que el olivo disponga de un amplio volumen de suelo para así cubrir sus necesidades de agua y la segunda persigue la máxima obtención de agua del suelo por parte del olivo, eliminando el consumo competitivo de vegetación espontánea (Martínez Raya et al., 2007).

Pero una de las características más relevantes del olivar mediterráneo es que constituye la menor alteración, desde el punto de vista agrícola, del bosque mediterráneo. El olivar constituye un modelo de sistema agrario, definido éste como “un modo de aprovechamiento del medio ambiente, históricamente constituido y adaptado a las condiciones bioclimáticas de un espacio dado y que corresponde a las situaciones y necesidades del momento” (Mazoyer, 1985). Además de ello, y considerando el alto nivel de interrelaciones tróficas presentes entre los estratos vegetales, mamíferos, aves, insectos, mesofauna (Muñoz-Cobo et al., 2001; Gliessman, 2002; Cotes et al., 2009), podemos definir este sistema agrario como un auténtico agroecosistema.

### **2.1. Sistemas de gestión del olivar**

El olivar mediterráneo viene siendo gestionado mediante diversos sistemas: convencional, ecológico e integrado.

**Convencional.** Generalmente como monocultivo y mediante el uso de técnicas de manejo y el uso de productos químicos de síntesis destinados a la obtención de la máxima producción por unidad de superficie (Parra López et al., 2004).

**Ecológico.** Tanto la olivicultura ecológica como la integrada se caracterizan por la utilización racional de prácticas agrícolas compatibles con la protección y la mejora del medio ambiente, los recursos naturales, la conservación de los suelos, la diversidad genética y el paisaje. Sus objetivos son la obtención de productos de alta calidad y la conservación del medio ambiente. Esta práctica excluye el uso de productos químicos de síntesis procurando un desarrollo agrario sostenible. En España, el Reglamento CEE 2092/

91, del Consejo de 24 de junio regula la producción ecológica en olivar. En Andalucía, el Comité Andaluz de Agricultura Ecológica (CAAE) (<http://www.caae.es>), es un referente de cara a potenciar la agricultura ecológica en general y particularmente en el olivar.

**Integrado.** La Producción Integrada se fundamenta en el empleo óptimo de insumos (combustibles fósiles, fitosanitarios, medicamentos veterinarios, piensos y fertilizantes), que son sustituidos, siempre que sea posible, por prácticas y tecnologías sostenibles más respetuosas con el medio ambiente (lucha biológica, abonado orgánico, umbrales de tratamientos, etc.). Parte del presupuesto de la producción debe basarse en un uso eficiente de los medios y factores de producción (suelo, pastos, variedades de cultivo, disponibilidades del agua, medios de lucha contra las plagas y enfermedades, etc.), siempre teniendo como meta final la conservación de los recursos, la economía de las explotaciones y las exigencias sociales en materia de calidad y seguridad alimentaria. No existe una normativa reguladora de la Producción Integrada a nivel de la UE, aunque sí un Reglamento Específico de Producción Integrada de Olivar (BOJA de 25 de Abril, 2008).

Compartiendo algunas de las características fundamentales de los tres sistemas señalados, se encuentra un tipo de sistema denominado **Agricultura de Conservación**. Éste es considerado como un sistema agrícola sostenible que adopta ciertas prácticas agronómicas en función del tipo de cultivo y su localización geográfica. Propone un determinado manejo del suelo, que disminuya los riesgos de degradación y erosión, mediante el uso de residuos vegetales, restos de poda y cubiertas vegetales, así como la mejora de la biodiversidad y calidad del suelo. Pretende usar técnicas apropiadas para alcanzar una adecuada producción agrícola de tal forma que se capture la máxima cantidad de C posible, con el consiguiente efecto sobre el calentamiento global y la consecución del protocolo de Kioto. La Sociedad de Conservación de suelos, creada en 1945, fue responsable del inicio de una mayor sensibilidad por parte del sector agrario hacia los problemas derivados del laboreo excesivo (Fernández-Quintanilla, 1997).

Estos sistemas de gestión están asociados a diferentes formas de explotación del olivar, dependiendo en gran medida de la localización geográfica del mismo, así como de los recursos disponibles en cada caso. Destacan fundamentalmente tres: olivar extensivo (secano), olivar intensivo (regadío) y olivar marginal.

**Olivar extensivo.** Éste tipo de olivar suele ofrecer un paisaje parcelado en el que se entremezclan agrupaciones de vegetación natural, arbolado y matorral, con marcos de plantación muy amplios entre 70-100 olivos por ha (Navarro & Parra, 1997), siendo su único aporte hídrico el procedente de las precipitaciones. Este tipo de cultivo es el habitual en zonas de gran tradición olivarera provincias como Jaén, Córdoba, Granada o Sevilla y en a

países como España, Italia, Grecia, Turquía, Siria, Túnez, etc. En Andalucía los olivares extensivos tienen una productividad media entre 1500-4000 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup>, siendo la variedad predominante hojiblanca y picual.

**Olivar Intensivo.** Se caracteriza por integrar en torno a 200 y 600 olivos por ha, suele situarse en zonas con suelos profundos bajo buenas condiciones, orográficas y climáticas, la copa del árbol es normalmente un poco mayor, que en el caso anterior, debido al riego por goteo. Este tipo de cultivo recibe aportes fitosanitarios, herbicidas y frecuentes prácticas de laboreo. El objetivo de este cultivo es una mayor producción relacionada con una mayor eficiencia del agua (Palese et al., 2010). Los olivares intensivos abarcan centenares de miles de hectáreas en la actualidad, el funcionamiento de la Política Agraria Común (PAC) ha tenido mucho que ver en esta expansión, pues ha favorecido la superficie de regadío tras la incorporación del olivar a la CEE. La producción oscila de 5.000 a 6.000 ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> en secano y de 8.000 a 12.000 Kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> en riego. Comparativamente este tipo de olivar, es más efectivo que el anterior, por razones de competitividad (los costes son más bajos, en torno al 50%, especialmente el de recolección) y productividad (la producción es superior en intervalos de 20 a 40%).

**Olivar marginal.** El Olivar marginal o de bajo rendimiento, presenta rentabilidades muy bajas, por lo que es susceptible de abandono. Dentro de esta clasificación consideramos el olivar de montaña en pendientes pronunciadas, altitud superior a 1.000 metros y aquel que por circunstancias orográficas o climáticas hacen que resulte difícilmente mecanizable. Se trata de explotaciones dispersas que en ocasiones no superan la hectárea, con árboles de más de 50 - 60 años, y habitualmente de entre 3 y 5 pies (AEMO, 2003; Vilar & Velasco, 2007).

## **2.2. Sistemas de manejo del suelo**

La figura 3 muestra de forma esquemática los distintos sistemas de manejo del suelo en el olivar. El debate acerca de las ventajas y desventajas de cada uno de ellos se mantiene vivo desde hace varias décadas. La elección de un buen sistema de manejo puede derivar en la mejora de la estructura de un suelo, un incremento en los niveles de materia orgánica y en la disminución del riesgo de erosión. Según Pastor (2008), un adecuado sistema de manejo del suelo debe cumplir los siguientes objetivos:

- Optimizar el aprovechamiento del agua de lluvia
- Permitir al cultivo el total aprovechamiento del suelo
- Conservar el suelo, defendiéndolo de la degradación

- Facilitar la realización de todas las demás prácticas de cultivo, en especial la recolección.



Figura 3. Esquema de las diferentes alternativas de cultivo que pueden emplearse en olivar (adaptado de Pastor, 2008).

### 2.2.1. Laboreo

Tradicionalmente, el cultivo del olivar se ha caracterizado por estar manejado bajo sistemas de laboreo. Los sistemas de laboreo se clasifican en dos tipos: laboreo convencional y laboreo de conservación (Köller, 2003).

- **Laboreo convencional:** Es aquel que deja menos del 15% de residuos vegetales sobre la superficie del suelo, cuando se voltea el mismo (20-35 cm) mediante arado de vertedera o de discos.
- **Laboreo de conservación:** Incluye aquellas técnicas que mantienen más del 30% de la superficie cubierta con residuos vegetales.

El **laboreo convencional** pretende la eliminación de la vegetación espontánea y la descompactación del suelo. Su principal objetivo es preparar la superficie del suelo para que el agua de lluvia pueda penetrar en él, evitando al máximo las pérdidas de evapotranspiración y el consumo de la misma por parte de la vegetación espontánea. En la actualidad se ha podido comprobar que muchos de los beneficios tradicionalmente considerados fruto del laboreo en realidad no son tales sino que por el contrario, pueden

resultar inconvenientes. Así, este sistema de cultivo aumenta la disponibilidad de agua para el olivar, mejora las condiciones de producción y proporciona una estructura granular, pero sólo ocurre a corto plazo y a medida que transcurre el tiempo tiene lugar una compactación del suelo en profundidad, formándose suelas de labor que pueden limitar la infiltración de agua de lluvia. El laboreo también contribuye a la oxidación de los elementos minerales y orgánicos, hecho obviamente beneficioso para el cultivo, aunque la oxidación acelerada de la materia orgánica provoca a largo plazo la desestructuración del suelo, es decir, la pérdida de estructura granular.

El **laboreo de conservación**, al dejar restos orgánicos sobre la superficie del terreno favorece una reducción de la escorrentía, un aumento del contenido en materia orgánica y una mayor estabilidad, y por lo tanto una reducción de la erosión (Franzluebbers, 2002). Otros aspectos positivos de esta técnica es que mantiene la humedad del suelo (Holland, 2004), mejora la fertilidad y la calidad del mismo (Peigné et al., 2007) y favorece su porosidad (Hangen et al., 2002; Kay & VandenBygaert 2002).

### **2.2.2. No-laboreo con suelo desnudo**

Un sistema alternativo al laboreo aplicable al cultivo del olivo es el **no-laboreo con suelo desnudo**, también denominado *cultivo sin labranza*, que se caracteriza por prescindir totalmente del laboreo aplicando herbicidas de bajo impacto ambiental para eliminar la vegetación adventicia. Se emplean herbicidas de preemergencia para impedir el nacimiento de cualquier tipo de vegetación o bien se hace uso de herbicidas de postemergencia para eliminar la vegetación una vez presente en el suelo. Inicialmente, los herbicidas de preemergencia más comúnmente utilizados fueron del tipo bipiridilos, tales como diquat y paraquat, herbicidas de contacto no selectivos. Estos fueron sustituidos por herbicidas selectivos y sistémicos del grupo de los triazínicos, tales como la simazina, que en la actualidad ha desplazado al resto de los herbicidas gracias a su tolerancia por el olivo. En primavera, cuando la vegetación que ha sido capaz de tolerar el anterior herbicida están en su máximo crecimiento, se suelen utilizar herbicidas de postemergencia del grupo de los aminofosfatos, tales como el glifosato (Guerrero, 2003).

Algunos estudios sobre cultivo de olivar en Andalucía atribuyen a este sistema de manejo un aumento del 16 % en la producción con respecto al laboreo convencional (Pastor & Guerrero, 1990).

### **2.2.3. Semilaboreo**

Este sistema consiste en la aplicación de herbicida residual bajo la copa de los olivos o en la línea de árboles y laboreo en el centro de las calles. Esta práctica agrícola es recomendable en suelos con una marcada tendencia a la formación de costra superficial.

### **2.2.4. Cubiertas**

Se pueden distinguir dos tipos, cubierta inerte y cubierta viva.

Como **cubiertas inertes** se utilizan plásticos, pajas, mantas porosas sintéticas y restos de poda, con éstas se pretende atenuar el impacto que ejercen las gotas de lluvia al caer al suelo. Los residuos generados de la propia explotación, como los restos de poda, pueden ser aprovechados siempre que el aporte de éstos no sea muy elevado e interfiera con una posible cubierta vegetal viva. Los restos de poda antes de incorporarse al suelo deben triturarse para evitar que algunas plagas como el barrenillo completen su ciclo reproductor (Pastor, 2008). Este tipo de cubiertas son muy persistentes y ofrecen al suelo una protección adecuada y prolongada frente a la erosión (Castro, 2000). Asimismo, favorecen positivamente las propiedades físico-químicas del suelo (Ordonez-Fernandez et al., 2007) y mejoran el balance hídrico. Los restos de poda tienen un efecto herbicida, limitando la germinación y el desarrollo de las poblaciones de flora adventicia (Pastor, 2008). Además, la presencia de estos restos de poda en suelo reduce las pérdidas del mismo en comparación con las pérdidas ocasionadas cuando se lleva a cabo un laboreo tradicional (Rodríguez-Liziana et al., 2008).

Las **cubiertas vivas** se pueden clasificar en dos tipos en función de la forma de implantación de la vegetación.

- Cubierta vegetal espontánea: la forman las hierbas procedentes del banco de semillas del suelo. Puede ser seleccionada hacia un grupo de especies, dejando crecer la vegetación y posteriormente seleccionando las que interesen, gramíneas, leguminosas, crucíferas, etc., mediante la utilización de productos fitosanitarios selectivos.

- Cubierta vegetal sembrada: consiste en la siembra de vegetación, gramíneas (cebada, ballico), leguminosas (veza), crucíferas o mezclas, teniendo en cuenta su ciclo reproductivo para que cubran el suelo en otoño lo antes posible, y así aprovechar las primeras lluvias. El objetivo es que se autosiembren en años sucesivos.

Posteriormente, las cubiertas se eliminan en primavera, mediante siega química (herbicidas), mecánica o pastoreo, para evitar que ocasionen problemas de competencia por el agua con el olivo. Si se elimina la cubierta introduciendo ganado, se utilizará una carga



ganadera capaz de consumir las cubiertas antes de que éstas compitan por el agua con el olivo (Pastor et al., 1997).

El empleo de cubiertas vegetales provoca un aumento en el contenido de materia orgánica en las capas superficiales del suelo, así como la mejora de la infiltración del agua y la estructura del suelo con respecto al suelo desnudo, al aumentar la porosidad y disminuir la densidad aparente por acción de los sistemas radiculares herbáceos (Vanderlinden et al., 1998; Ordoñez et al., 2001). Las ventajas del uso de cubiertas vegetales han sido puestas de manifiesto por numerosos autores durante las últimas décadas (Castro et al., 2008; Cotes et al., 2009; Campos et al., 2011), No obstante, también han sido descritos algunos inconvenientes. En la tabla 2 se resumen las ventajas e inconvenientes del uso cubiertas vegetales.

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes del uso de la cubierta vegetal (*Fuente: Guzmán Casado & Alonso Mielgo, 2004*).

VENTAJAS	INCONVENIENTES
Menor erosión hídrica	Competencia de la cubierta con el olivo por el agua y los nutrientes
Mejora de la estructura del suelo	Dificultad en la recolección si la cubierta ha alcanzado un porte alto
Menor compactación del suelo	Riesgo de incendio en verano
Aumenta la infiltración del agua de lluvia	Pueden incrementar el riesgo de heladas
Incremento de la biomasa y de la actividad biológica	Capacidad de rebrote al ser eliminadas mediante siega mecánica o pastoreo
Aumento de la disponibilidad de nutrientes	
Fijación de nitrógeno (caso de leguminosas)	
Mejoran el paisaje	
Favorece el control de plagas	
Proporcionan alimento para el ganado	
Reducen el gasto en fertilizantes	

En la Figura 4 se aprecia la distribución por superficie del olivar en España y su correspondiente en Andalucía según el tipo de manejo de suelos. En ella puede observarse

que el olivar bajo laboreo mínimo presenta la mayor superficie tanto a nivel nacional como autonómico.



Figura. 4. Distribución de la superficie de olivar por comunidad autónoma. (Fuente: [http://www.marm.es/es/estadistica/temas/encuesta-sobre-superficies-y-rendimientos-de-cultivos-esyrce-/](http://www.marm.es/es/estadistica/temas/encuesta-sobre-superficies-y-rendimientos-de-cultivos-esyrce/))

### 3. Producción y sostenibilidad agrícola

Tanto los diferentes sistemas de gestión del olivar, como los distintos manejos de suelo empleados, han ido históricamente encaminados a conseguir el máximo rendimiento de los cultivos, mayor productividad (output) por unidad de energía (input) empleada, dentro de las posibilidades de cada terreno. Pero lo que caracteriza a todos los sistemas descritos, sean más o menos sostenibles o viables, es la vulnerabilidad a la que están sometidos en un escenario mediterráneo de ambiente semiárido y cambio climático global.

La relación entre vulnerabilidad de agroecosistemas, prácticas agrícolas, y degradación de suelos ha sido ampliamente descrita y fundamentalmente asociada a la pérdida de materia orgánica de los mismos (p.ej. Kay & Vanderbygaard, 2002; Gómez et al., 2003; Jandl et al., 2007; Milgroom et al., 2007). La conclusión fundamental es que la calidad del suelo y sus funciones ecológicas dependen sobre todo del contenido y de la calidad de la materia orgánica del mismo.

La materia orgánica es el componente más importante de los suelos, ya que juega un papel clave en la determinación de los procesos físicos, químicos y biológicos, ejerciendo un papel muy importante en la producción de cultivos.

El aporte fundamental de materia orgánica a los suelos deriva de la fijación vegetal de CO<sub>2</sub> atmosférico mediante la fotosíntesis. Las plantas incorporan materia orgánica al suelo, tales como raíces y partes leñosas al morir, y hojas y exudados radicales a lo largo de su periodo vegetativo. Una vez incorporada, la materia orgánica está sujeta a procesos de

descomposición y mineralización por parte de los invertebrados y microorganismos. Por otra parte, la materia orgánica puede transformarse en compuestos orgánicos más recalcitrantes, conocidos como humus, lo que permite la estabilización de carbono en la matriz del suelo.

La materia orgánica del suelo está constituida por un grupo amplio de compuestos que varían considerablemente en su composición química. Por lo general, está constituida por un conjunto de residuos orgánicos de origen animal, vegetal y microbiano, generalmente lábiles, sustancias no húmicas, y por moléculas de lenta degradación conocidas como sustancias húmicas, extraíbles o coloidales (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas) (Stevenson, 1994).

### **3.1. Ciclo global del carbono**

El papel determinante de los suelos en el ciclo global del carbono ha sido ampliamente estudiado en las últimas décadas.

El carbono es el cuarto elemento de mayor abundancia en el universo y constituye el 18% de la materia viva de la Tierra. Es esencial para la formación de moléculas orgánicas, carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La capacidad de los átomos de carbono para unirse con otros proporciona la base de la diversidad molecular, sin los cuales la vida, tal como la conocemos, no podría existir.

El carbono está en continuo movimiento entre los depósitos existentes en el mar, la tierra y la atmósfera, donde se encuentra principalmente como dióxido de carbono. Los ecosistemas terrestres se caracterizan por capturar carbono de la atmósfera mediante la fotosíntesis e incorporación de éste al suelo mediante respiración y descomposición. Los ecosistemas terrestres, en especial los suelos, contienen el mayor reservorio de carbono en la tierra, por lo que actúan como sumideros de CO<sub>2</sub> antropogénico, aunque también actúan como fuente de CO<sub>2</sub>, proceso relacionado con la respiración del suelo. La estabilización y la movilización de carbono en el suelo están íntimamente relacionadas con el cambio climático.

El carbono orgánico del suelo es un componente importante del ciclo global del carbono, ocupando un 69,8 % del carbono orgánico de la biosfera (FAO, 2001). El contenido de materia orgánica del suelo constituye aproximadamente dos tercios del carbono inmovilizado en los ecosistemas terrestres, con un contenido global del 1500 Pg C (Batjes, 1996).

Lal (2004) define cinco sumideros principales de carbono: oceánico, geológico, suelo, biótico y atmosférico, interactuando todos entre sí, siendo el carbono retenido en el suelo

cuatro veces más que el existente en el sumidero biótico y tres veces que en el atmosférico (Fig. 5).

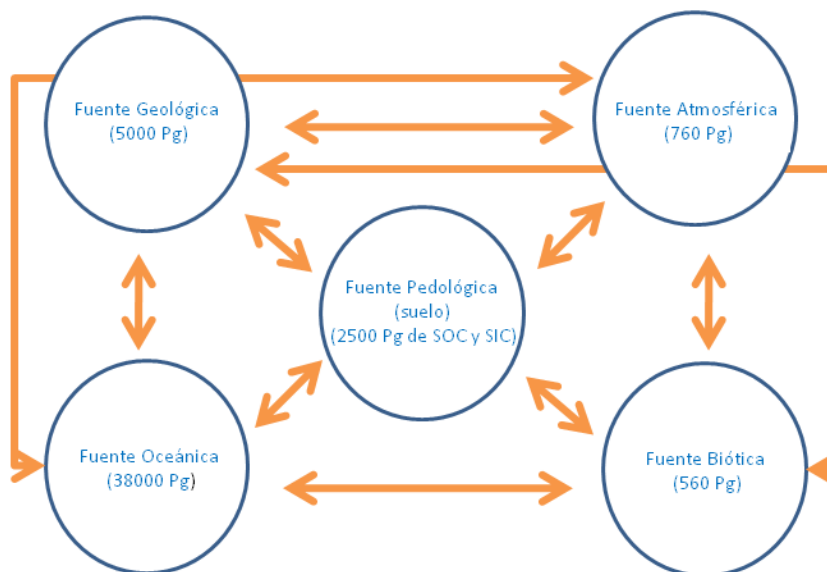


Figura 5. Principales sumideros de carbono

### 3.2. Secuestro de carbono.

El término secuestro de carbono se refiere al almacenamiento de carbono en el suelo en una forma sólida estable. Dicho secuestro tiene lugar a través de la fijación directa e indirecta del  $\text{CO}_2$  atmosférico. El secuestro directo de C por el suelo sucede mediante reacciones químicas inorgánicas que transforman el  $\text{CO}_2$  atmosférico en carbono inorgánico en el suelo. El secuestro indirecto de C comienza en el proceso de fotosíntesis transformando el  $\text{CO}_2$  atmosférico en biomasa vegetal.

### 3.3. Dinámica del carbono en el suelo

La evaluación, tanto de las fuentes como de los sumideros de carbono, no es una tarea fácil debido fundamentalmente a la compleja **dinámica de la materia orgánica** en el suelo. Actuales líneas de investigación consideran que los factores que definen la dinámica de los compuestos de la materia orgánica están determinados no solo por la recalcitrancia de los mismos sino también por las interacciones entre los compuestos orgánicos y minerales, así como por la accesibilidad de los materiales orgánicos a los organismos y enzimas (Kögel-Knabner et al., 2008).

En relación con los estudios sobre el secuestro de carbono, Freibauer et al. (2004) menciona la importancia de evaluar el tiempo de permanencia de carbono en el suelo. Los nuevos modelos definen además la capacidad de saturación por carbono de un suelo o el

máximo potencial de almacenaje determinado por las propiedades físico-químicas del mismo (Six et al., 2002; West & Six, 2007).

En este sentido es importante contemplar diversas fracciones que muestran un comportamiento de saturación de carbono diferente:

1. Carbono protegido por la asociación con las partículas del limo y de la arcilla
2. Carbono protegido por los microagregados
3. Carbono químicamente protegido
4. Carbono desprotegido y determinado por el equilibrio entre las entradas de carbono y la descomposición (Fig. 6).

Cuando la materia orgánica queda protegida químicamente se reduce su biodisponibilidad y la accesibilidad para los microorganismos y enzimas, mientras que cuando la protección es física, se retardan los procesos de descomposición de la materia tanto lábil como recalcitrante (Marschner et al., 2008).

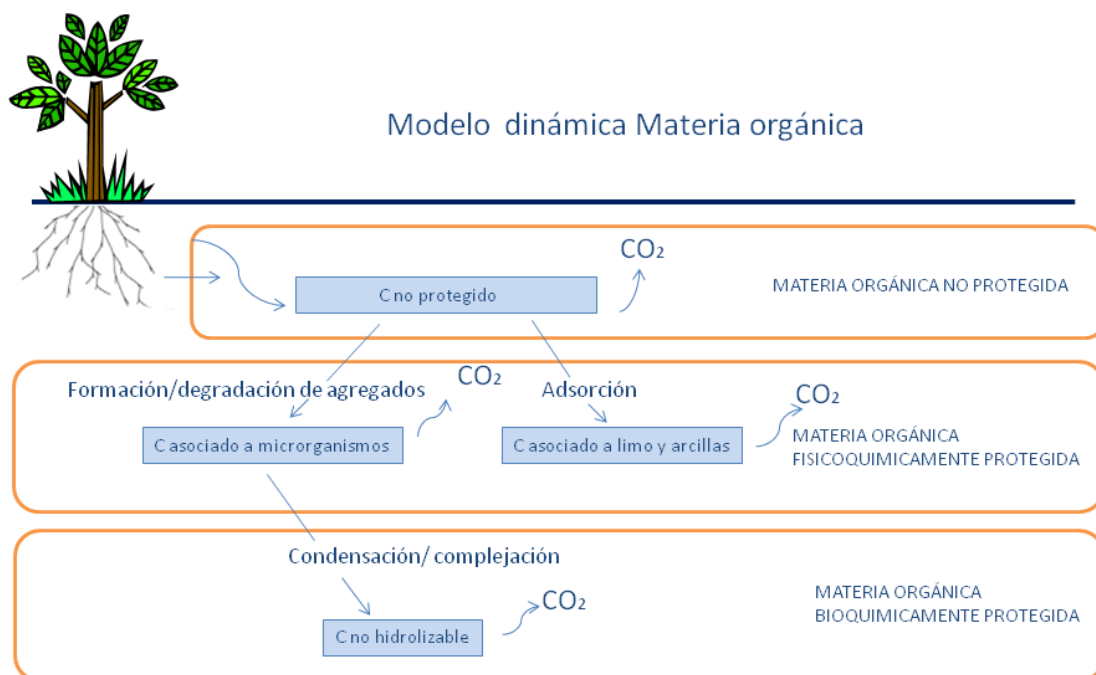


Figura 6. Modelo de la dinámica de la materia orgánica.

Por tanto, a la hora de estimar el potencial de un suelo como sumidero de C se debe tener en cuenta: el tipo de carbono (activo/lábil vs. recalcitrante/pasivo) (Six et al., 2001; Gleixner et al., 2002), su forma de estabilización (bioquímica/química/física) (Kaiser et al., 2002) y su localización física (inter/intra-agregados vs. libre) (Balesdent et al., 2000; Six et al., 2001).

Desde un punto de vista bioquímico, la dinámica del carbono en el suelo está mediatizada por dos procesos fundamentales, mineralización y humificación (Fig. 7). La **mineralización** se refiere a la transformación de un elemento desde su forma orgánica a una inorgánica, como resultado de la actividad de los microorganismos, siendo opuesto al proceso de humificación. La **humificación** implica cambios en la complejidad química de la materia orgánica y confiere estabilidad a los compuestos húmicos. Ambas rutas bioquímicas, mineralización y humificación, son procesos mediados por sistemas enzimáticos, por lo que su estudio es esencial a la hora de evaluar los procesos que las regulan, los efectos del manejo, la capacidad de secuestro de carbono de un suelo, etc., en definitiva, la calidad del mismo



Figura 7. Dinámica del carbono en el suelo.

#### 4. Calidad del suelo

Asociado a la cantidad y calidad de la materia orgánica ha sido propuesto y, ampliamente discutido, el concepto de "calidad del suelo". La evaluación de la calidad del suelo agrícola es una cuestión compleja, por lo que también es complicado enunciar una definición adecuada. (Bastida et al., 2008). En este sentido se han propuesto múltiples definiciones de la misma (Parr et al., 1992; Doran & Parkin., 1994; Acton & Gregorich., 1995; Harris et al., 1996; Karlen et al., 1997; Doran & Saffley, 1997). Según Doran et al. (2000) la calidad de un suelo es la "capacidad que tiene éste para funcionar como un sistema vivo y mantener la productividad biológica, promoviendo la calidad ambiental y manteniendo la salud animal y vegetal".

El concepto de “calidad del suelo” se ha intentado diferenciar del concepto de “salud del suelo”, aunque esta cuestión no está del todo clara. Generalmente se acepta que el término calidad se refiere a la aptitud de un suelo para llevar a cabo una función específica, mientras que el término salud se refiere al suelo como un ser vivo y dinámico, cuyas funciones están mediadas por organismos vivos que requieren del manejo y de la conservación del mismo (Doran & Saffley, 1997; Doran et al., 2000). Gil-Sotres et al. (2005) determinan que se alcanza la máxima calidad de un suelo cuando están en equilibrio todos los componentes del ambiente y éste es capaz de mantener una alta productividad causando una mínima distorsión.

El concepto de calidad del suelo debe ser evaluado no sólo desde la perspectiva de productividad y fertilidad del mismo, sino de la capacidad que tiene éste para llevar a cabo sus funciones (Moreno et al., 2008), destacando que:

- Participa en la retención de agua y en el transporte de solutos.
- Actúa como un soporte físico adecuado.
- Funciona como un medio donde circulan los nutrientes para microorganismos y plantas.
- Tiene la capacidad de fijar los contaminantes potencialmente tóxicos.
- Contribuye con el mantenimiento de la biodiversidad.

Son numerosos los parámetros asociados a las propiedades físicas, químicas, biológicas y bioquímicas que se han empleado como indicadores de la calidad de un suelo, y que han determinado el impacto que las prácticas agrícolas ejercen en el mismo (Schoenholtz et al., 2000; Anderson, 2003).

La calidad física de un suelo se refiere a la organización de las partículas minerales, porosidad, contenido y movimiento del agua, infiltración, profundidad del suelo, densidad aparente, estabilidad de agregados, textura, y formación de costras. El término calidad química del suelo está relacionado con el reciclaje de la materia orgánica, almacenamiento de nutrientes y elementos tóxicos etc. Estas funciones normalmente regulan el movimiento cíclico de los nutrientes a través de la solución del suelo hasta que son asimilados por las plantas y microorganismos. Las características de los procesos físicos y químicos que tienen lugar en el suelo se han considerado suficientes para valorar los cambios de la calidad del mismo debido al manejo de éste. Pero por lo general muestran poca información, ya que los parámetros físicos en concreto cambian únicamente ante variaciones bruscas en el suelo (Filip, 2002) y pueden ser indicadores de calidad solo a largo plazo. Por ello es necesario combinar estos análisis con otros biológicos y bioquímicos que sean más

sensibles a las pequeñas modificaciones del suelo ante cualquier agente (Karaca et al., 2011) y presenten una rápida respuesta a las perturbaciones antrópicas o naturales.

## **5. Bioindicadores de la calidad del suelo**

### **5.1. Enzimas del suelo**

Uno de los indicadores que han sido utilizados ampliamente para evaluar la calidad del suelo es la actividad enzimática. Las enzimas juegan un papel importante en la biología del suelo y en su ciclo de nutrientes (Burns, 1982) ya que catalizan cientos de reacciones bioquímicas imprescindibles para la vida de los microorganismos y plantas, controlan la liberación de nutrientes para el crecimiento de éstos, intervienen tanto en la descomposición de residuos orgánicos y en el intercambio de gases entre el suelo y la atmósfera como en la formación de la estructura del suelo (Gregorich et al., 1994). Son unos indicadores muy sensibles a los cambios que ocurren en el suelo debidos al uso y manejo del mismo, variaciones climáticas, contaminación etc. Además, debido a su relación con la actividad biológica, su fácil determinación y rápida respuesta a dichos cambios, han sido propuestas como indicadores potenciales de la calidad del suelo (Dick, 1994; Dick et al., 1996; Nannipieri et al., 2002; Benitez et al., 2004; Benitez et al., 2006).

La actividad enzimática del suelo por lo general suele estar directamente relacionada con el contenido de materia orgánica. Esto quiere decir que los suelos en los que se haya llevado a cabo un adecuado manejo (reduciendo el laboreo, usando enmiendas orgánicas, haciendo uso de la cubierta vegetal, etc.) tienen normalmente una mayor actividad enzimática fruto de una mayor actividad biológica (García-Orenes et al, 2010; Laudon et al, 2011; Wang et al., 2011). Asimismo, se ha relacionado el aumento de la biomasa y actividad microbiana con algunos efectos beneficiosos en el suelo (Carpenter-Boggs et al., 2003) al favorecer:

- a) La formación y estabilización de los agregados del suelo.
- b) El aumento de la descomposición de los restos vegetales.
- c) El aumento de la transformación y reciclaje de los nutrientes.
- d) La liberación paulatina de nutrientes.
- e) El control de patógenos.

Muchas son las actividades enzimáticas del suelo que han sido determinadas en las últimas tres décadas, y muchas de ellas utilizadas como indicadores de la calidad del suelo, aunque principalmente destacan las pertenecientes a los grupos de las oxidoreductasas



(deshidrogenasa, catalasa, peroxidasa, difenoloxidasa) y las hidrolasas ( $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa, ureasa, proteasa, arilsulfatasa) (Makoi & Ndakidemi, 2008).

La medida de la actividad **deshidrogenasa** en suelos se ha utilizado como estima de la actividad microbiana ya que está relacionada con la oxidación de compuestos orgánicos (Skujins, 1976). Esta actividad está implicada en el ciclo de Krebs y se encuentra dentro de las células vivas, por lo que se ha relacionado también con la biomasa microbiana (Aon et al., 2001), además de ser indicativa del potencial redox del suelo y de la capacidad oxidativa del mismo. Estudios previos han demostrado que ésta enzima es sensible a los distintos cambios de manejo del suelo y ha sido propuesta como un indicador de la actividad microbiana en suelos semiáridos mediterráneos (García et al., 1997). Asimismo, se ha detectado que suelos con mayor cantidad de materia orgánica y uso de cubiertas vegetales presentan una actividad deshidrogenasa superior a los suelos que no reciben este tipo de manejo (Caravaca et al., 2002; Benítez et al., 2006).

La enzima **o-difenoloxidasa** cataliza la oxidación de compuestos fenólicos hasta quinonas y participa en procesos de formación de sustancias húmicas por lo que se utiliza para estimar la capacidad de un suelo para degradar compuestos orgánicos recalcitrantes (Perucci et al., 2000).

La enzima  **$\beta$ -glucosidasa** es una enzima predominante en el suelo implicada en el ciclo del carbono, catalizando procesos hidrolíticos durante la degradación de la materia orgánica (Tabatabai, 1994; García et al., 1995; Eivazi & Tabatabai, 1988). Por ello las  $\beta$ -glucosidasas han sido las más utilizadas en el estudio del ciclo del carbono (Busto & Pérez-Mateos, 2000). Esta enzima participa en la degradación de celulosa hasta glucosa mediante la ruptura del enlace glucosídico  $\beta$  1-4 (Turner et al., 2002). Se ha establecido una estrecha relación entre actividad  $\beta$ -glucosidasa y disponibilidad de carbono (Stott et al., 2010) y cambios en el sistema de manejo de suelos agrícolas (Knight & Dick, 2004).

La descomposición de la materia orgánica está mediatizada por un amplio grupo de microorganismos tanto eucariotas como procariotas, aunque el papel principal lo ejercen los hongos y las bacterias (Deng et al., 1996). Son numerosos los estudios enfocados a determinar la actividad  $\beta$ -glucosidasa en muestras ambientales en muy diversas condiciones, pero son escasos aquellos enfocados al estudio del enzima o a la regulación de los genes que la codifican en microorganismos cultivables (Kim et al., 2007; Krogh et al., 2010; Barrera-Islas et al., 2007; Cristobal et al., 2009). Sin embargo, la capacidad de producir glucosidasa o su regulación *in situ* en muestras ambientales permanece aún casi inexplorada (Klose & Tabatabai, 2002).

La enzima **fosfatasa** cataliza la hidrólisis de ésteres orgánicos, liberando fosfato y anhídros del ácido fosfórico. La actividad de esta enzima es considerada un indicador del suelo para estimar la mineralización potencial de fosfato orgánico. La enzima **arilsulfatasa** cataliza la hidrólisis de esterés aromáticos de sulfato en fenoles y sulfato (Elsgaard et al., 2002). Los fosfatos y sulfatos que se obtienen de estas reacciones son las principales formas de fósforo y sulfuro asimilables por los microorganismos y plantas (Nannipieri et al., 2002). Ambas enzimas están correlacionadas con la cantidad de materia orgánica en el suelo y su actividad es mayor cuando el suelo está sometido a un sistema de manejo con cubierta vegetal (García et al., 1994; Klose et al., 1999). Algunos estudios revelan asimismo una mayor actividad de estas enzimas en las primeras profundidades de suelo bajo condiciones de no-laboreo, que en sistemas convencionales de manejo (Dick, 1984).

La enzima **ureasa** que cataliza la hidrólisis de enlaces no peptídicos, está implicada en la mineralización de nitrógeno hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  (Tabatabai, 1982; Alef & Nannipieri, 1995). Esta enzima ha sido ampliamente estudiada en los últimos años debido a su relación con el ciclo del nitrógeno, ya que su actividad puede indicar pérdidas de nitrógeno en forma de amoníaco, conllevando a efectos económicos negativos.

Además de las actividades enzimáticas, se emplean otros métodos para estimar la calidad del suelo dentro del contexto de la actividad microbiana, entendiendo como tal un amplio rango de actividades llevadas a cabo por los microorganismos del suelo que pueden estimar el grado de evolución de sus procesos metabólicos. Entre estos métodos podríamos citar el uso de **fluoresceína diacetato hidrolasa** (FDAH), que cataliza la hidrólisis de fluoresceína diacetato a fluoresceína mediante esterasas, proteasas y lipasas, todas ellas implicadas en la descomposición de la materia orgánica del suelo (Adam & Duncan, 2001; Sánchez-Monedero et al., 2008); los ensayos **Biolog** que se basan en el uso de diferentes fuentes de carbono proporcionando un perfil fisiológico cualitativo de las funciones potenciales que pueden ser llevadas a cabo por la comunidad bacteriana del suelo (Garland & Mills, 1991); la **respiración del suelo**, que es llevada a cabo por microorganismos bajo condiciones aeróbicas (Nannipieri et al., 1990) es un índice útil para conocer la cantidad de sustratos fácilmente mineralizables en el suelo (Anderson, 1982), mediante la determinación de la cantidad de  $\text{CO}_2$  desprendido (como función de la actividad biológica y del contenido del suelo en carbono orgánico fácilmente mineralizable) (Alef & Nannipieri, 1995). Alguno de estos métodos permiten evaluar el tipo de manejo al que está sometido un suelo puesto que llevan a cabo una estimación de la respiración microbiana en el mismo, la cual está directamente relacionada con la cantidad de  $\text{CO}_2$  emitida a la atmósfera por la actividad biológica de dicho suelo (Jandl et al., 2007).

La combinación de varias propiedades bioquímicas permite un mejor entendimiento de la complejidad del suelo, haciendo más fácil la evaluación de la calidad del mismo. Dilly & Brume (1998) consideraron que para que un índice se considere adecuado, debe contener al menos diez propiedades bioquímicas básicas relacionadas con la biomasa microbiana y la actividad microbiana general (actividad deshidrogenasa, respiración del suelo, etc.) y específica (actividades  $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa, ureasa, etc.) Otros índices utilizados que agrupan propiedades biológicas y bioquímicas evidencian la alta relación existente entre éstas y el contenido total de carbono de los suelos (Trasar-Cepeda et al., 1997). El diseño de “sun ray plots” o “star plot”, conocidos en español como diagramas de “rayo de sol” o diagramas de “estrella” combinan diferentes propiedades bioquímicas del suelo. En ellos, la forma de la estrella refleja la abundancia o diversidad de los microorganismos y el área se relaciona con la actividad de los mismos (Dilly & Brume, 1998).

Sin embargo, estos parámetros presentan limitaciones ya que, como se comentó anteriormente, los métodos tradicionales de estimación de actividad enzimática expresan la actividad potencial en condiciones óptimas de  $T^a$ , sustrato, etc., y no actividades reales en condiciones *in situ*. La actividad enzimática de una enzima en el suelo está controlada por interacciones complejas entre disponibilidad de sustrato, concentración del enzima, las propiedades físicas y termodinámicas del suelo (Wallenstein & Weintraub, 2008). Por ello, se requieren nuevas aproximaciones metodológicas basadas en el estudio de ácidos nucleicos y proteínas en suelo para obtener una imagen más real de las funciones del ecosistema en diferentes condiciones ambientales.

### **5.2. Microorganismos del suelo**

Los microorganismos desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la calidad del suelo ya que intervienen en la mayoría de los procesos bioquímicos que ocurren en él, y, además, son muy sensibles a cambios ambientales y perturbaciones (Nielsen et al., 2002). El ser capaces de modificar rápidamente su grado de actividad y rendimiento energético, les permite adaptarse rápidamente a situaciones de estrés ambiental (Schloter et al., 2003), lo cual los hace buenos candidatos como indicadores de la calidad del suelo.

Las medidas de *biomasa* y *diversidad microbiana* permiten conocer la abundancia y estructura poblacional de los microorganismos existentes en el suelo. Estos parámetros microbiológicos han sido utilizados con éxito no sólo como indicadores del efecto que ejercen diferentes prácticas agrícolas (McCaig, et al., 2001), y agentes contaminantes (Malik et al., 2008; Moreno et al 2009) sobre la calidad del suelo, o como indicadores del restablecimiento de las relaciones entre la biota y la restauración de sistemas degradados (Harris, 2003).

### **5.2.1 Biomasa microbiana**

La biomasa microbiana constituye el componente biológico de la materia orgánica del suelo, y representa el tamaño de la comunidad microbiana presente en el mismo. La estimación de éste parámetro se considera importante para conocer el estado de la calidad y fertilidad del suelo, así como el mantenimiento de estas propiedades en el tiempo (Powlson, 1994; Fliebbach & Mäder, 2000).

El tamaño de la comunidad microbiana del suelo se puede determinar mediante métodos indirectos (biomasa microbiana asociada al carbono) o directos. Éstos últimos pueden ser cultivo-dependientes (densidad de bacterias cultivables) o independientes (uso de técnicas moleculares).

- El estudio de la biomasa microbiana asociada al carbono puede llevarse a cabo mediante los siguientes métodos: la incubación-fumigación (FI), respiración inducida por sustrato (SIR), extracción-fumigación (FE) y el contenido en ATP (Jenkinson & Powlson, 1976; Anderson & Domsch, 1978; Jenkinson & Ladd, 1981; Vance et al., 1987).

- La densidad de bacterias cultivables puede determinarse mediante el recuento en placa de unidades formadoras de colonias (CFU) o por análisis de turbidez mediante el método del número más probable (MPN) (Bakken, 1997). La desventaja que presentan estos métodos a la hora de estimar la población bacteriana total es que sólo entre el 1 y 10 % de los organismos procariotas presentes en el suelo son capaces de crecer en medios de cultivo (Roszak & Colwell 1987; Torsvik et al., 1990).

- A partir de la década de los ochenta se incorporaron nuevas técnicas que no requerían el cultivo previo de los microorganismos (Insam, 2001). Los análisis de marcadores moleculares como ácidos grasos de fosfolípidos de membrana (PLFA) han sido utilizados como indicadores de la biomasa microbiana activa (Frostegar & Baath, 1996). La estimación de la biomasa microbiana mediante la extracción directa o indirecta de ácidos nucleicos (ADN y ARN) del suelo y su posterior estudio a través de técnicas de biología molecular tal como la PCR cuantitativa (en inglés *quantitative polymerase chain reaction*) o PCR en tiempo real (en inglés *real time polymerase chain reaction*) (qPCR), ha sido empleada con éxito en las últimas décadas. Esta técnica es capaz de discriminar entre biomasa bacteriana y fúngica, en función de cebadores específicos diseñados a partir del gen 16S ADNr y del 18S ADNr, respectivamente.

### **5.2.2 Diversidad microbiana**

El estudio de la diversidad microbiana representa una buena aproximación para evaluar la abundancia, riqueza y diversidad de especies presentes en la comunidad microbiana, permitiendo conocer las alteraciones que se producen en la estructura de dicha comunidad

como consecuencia de fluctuaciones en las condiciones ambientales (temperatura, contenido en agua, disponibilidad de nutrientes, humedad), manejo del suelo, contaminaciones, alteraciones de pH, aireación, etc. (Ovreas, 2000; Torsvik & Ovreas, 2002). Durante mucho tiempo se ha sugerido una dependencia entre diversidad microbiana y funciones del suelo, pero ésta no ha sido evidenciada de forma general en la mayoría de los casos. Se asume que la comunidad microbiana se ve influenciada por la estabilidad del ecosistema haciendo frente a las diversas situaciones de estrés a las que están sometidas (Torsvik & Ovreas, 2002, Schimel et al., 2007). Algunos estudios sobre diversidad microbiana en suelos han indicado la relación entre calidad del suelo y funcionalidad (Arias et al., 2005).

La medida de la diversidad microbiana puede llevarse a cabo mediante técnicas tradicionales tales como recuento en placa o técnicas del número más probable de microorganismos cultivables, o mediante el uso de técnicas moleculares que proporcionan el perfil de la diversidad genética de una comunidad microbiana. En lo referente a estas últimas podemos destacar: el análisis del ADN polimórfico amplificado al azar (RADP) (Nei & Li, 1985; Yang et al., 2000), el análisis del espacio inter-ribosomal (RISA) (Torsvik & Ovreas, 2002), el análisis de restricción ADNr amplificado (ARDRA) (Tiedje et al., 1999), el análisis de fluorescencia in-situ (FISH) (Hill et al., 2000), el análisis de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP) (Marsh et al., 1999; Perez-Piqueres et al., 2006; Benitez et al., 2007), el análisis de ácidos grasos fosfolipídicos (PLFA) (Zelles, 1999; Hill et al., 2000; Widmer et al., 2001), el análisis de los espacios intergénicos ribosomales automatizados (ARISA) (Kovacs et al., 2010) y el análisis mediante electroforesis en gel con gradiente térmico (TGGE) (Muyzer & Smalla, 1998) o desnaturalizante (DGGE). Este último ha sido uno de los métodos más utilizados para la estimación de la diversidad microbiana en suelos (Muyzer & Smalla, 1998, Fromin et al., 2002; Yu & Morrison, 2004; Brons & van Elsas, 2008).

La electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante (**DGGE**) es una técnica molecular que permite analizar comunidades microbianas procedentes de diferentes tipos de muestras ambientales, mediante el estudio de genes constitutivos, es decir genes que continuamente están expresándose en la célula porque mantienen su viabilidad y la actividad normal de la misma. En el caso de las bacterias hay dos subunidades ribosomales que llevan a cabo estas funciones, la subunidad 30S y la 50S; la primera está integrada por la unidad ribosomal 16S mientras que la segunda está formada por la 23S y la 5S. Actualmente para evaluar la diversidad, los estudios se centran en el 16S.

El 16S ribosomal, presenta una serie de características en base a las cuales fue considerado como marcador molecular definitivo (Woese, 1987): a) Está presente en todos los organismos y tiene la misma función en todos ellos, b) diferentes regiones de la molécula presentan secuencias altamente conservadas, es decir que se encuentran en todos los organismos, y con distinto grado de variabilidad, lo cual posibilita la identificación de un organismo a nivel de especie, c) no está sujeta a transferencia génica horizontal entre microorganismos, d) la longitud de su secuencia posibilita la obtención de información suficiente, e) el análisis de secuencias ofrece la posibilidad de realizar reconstrucciones filogenéticas de microorganismos.

La DGGE fue introducida por Muyzer et al., (1993) como una herramienta para el estudio de la diversidad de ecosistemas microbianos complejos, ya que permite comparar grupos, tratamientos y/o microorganismos predominantes en un ambiente, y visualizar la diversidad bacteriana como huellas del ADN/ARN extraído de las muestra. Hasta la fecha, se ha demostrado la ventaja de llevar a cabo determinaciones basadas en genes transcritos (ARN) sobre genes totales (ADN) (Hoshino et al., 2007; Reeve et al., 2010; Wallis et al., 2010), debido a que los primeros señalan la población metabólicamente activa. La técnica de la DGGE consiste en la separación de los productos de PCR de doble cadena de longitud similar, pero con diferente composición de secuencia, mediante la migración de los fragmentos de ADN/ADNc a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida que tienen un gradiente lineal con agentes químicos desnaturizantes (normalmente urea y formamida) (Muyzer, 1999; Muyzer & Smalla, 1998). Los fragmentos migran a lo largo del gel hasta que debido a una alta concentración de los agentes desnaturizantes, el ADN/ADNc se desnaturaliza y detiene su migración, separándose las dos cadenas. La diferencia en composición en las bases de las secuencias de ADN/ADNc hace que éstas tengan distinto punto de desnaturalización y migren a una altura diferente a lo largo del gel. Para la optimización de esta técnica se añade a uno de los cebadores una cola de GC (Myers et al., 1985; Sheffield et al., 1989) para así evitar que el ADN/ADNc ya desnaturizado migre fuera del gel, así como para mejorar la separación y resolución de los amplicones en el gel. Las bandas obtenidas se pueden cortar y secuenciar, permitiendo así la identificación de las bacterias. El 16S ribosomal está formado aproximadamente por 1540 nucleótidos, y en él se encuentran zonas muy conservadas que están presentes en todas las bacterias y zonas altamente variables que varían a nivel de especie. Está formado por nueve regiones hipervariables y cualquiera de ellas se podría utilizar para realizar estudios de biodiversidad, no obstante a la hora de amplificar una única región hipervariable, estudios previos han demostrado que la que mejor patrón de bandas genera es la región hipervariable V3 (Yu & Morrison, 2004), ofreciéndonos datos fiables a la hora de evaluar la

biodiversidad bacteriana presente en una muestra. En cambio cuando lo que interesa es amplificar un mayor amplicón, hay estudios comparativos que demuestran que la regiones V3-V5 es la que mejor patrón de bandas generan y la que permite una mejor identificación del organismo a nivel de especie (Yu & Morrison, 2004, Vivas et al., 2009).

Entre las aplicaciones más frecuentes de la DGGE caben señalar, la identificación de poblaciones microbianas (Murray et al., 1996), la detección de cambios poblacionales debido al manejo del suelo (Wallis et al., 2010) y las alteraciones en la estructura microbiana debido a contaminaciones (Vivas et al., 2008; Di Gennaro et al., 2009; Moreno, 2009).

Como se ha venido comentando hasta ahora, el estudio del ADN del suelo permite obtener información sobre la estructura de la comunidad en lo referente a la presencia y a la abundancia de especies (McCaig et al., 2001), en cambio el ARN, involucrado en la síntesis de proteínas, nos permite un conocimiento del estado de la transcripción de la comunidad microbiana (Sofo et al., 2010). Pero los análisis basados en el ARN están sujetos a los mismos sesgos que los análisis basados en el ADN (Norris et al., 2002; Griffiths et al., 2003) debido a que la previa PCR produce una amplificación selectiva del gen objeto de estudio (Muyzer et al., 1996), lo cual deriva en que las diferentes bandas de un gel DGGE representa la población bacteriana predominante de la muestra (Ibekwe & Grieve, 2004). Asimismo, las bandas que ocupan la misma posición no representan en todos los casos una única especie o grupo de especies pertenecientes al mismo género, ya que es posible que en una misma banda existan amplicones de ADN/ADNc con diferentes secuencias que correspondan a más de un microorganismo (Sekiguchi et al., 2001). Se asume que la intensidad de la banda está directamente relacionada con la densidad de los filotipos bacterianos en una muestra (Fromin et al., 2002).

## **6. Tecnologías “ómicas” aplicadas al estudio del suelo**

Los avances en el conocimiento de la genética y en especial de la biología molecular han abierto paso a la nueva era de las “ómicas”: genómica, transcriptómica y proteómica, que facilitan el conocimiento de la estructura, organización y función de los genes y sus productos, así como de los mecanismos involucrados en la regulación de su expresión y la manera en que unos genes interactúan con otros.

La información genética codificada en el ADN se expresa a través de la síntesis de otro ácido nucleico. La síntesis de ARN, dependiente del ADN, se denomina transcripción, mientras que la síntesis de las proteínas a partir del ARN se llama traducción. La dirección del flujo de información entre estas moléculas está definida por el dogma de la biología molecular. (Fig. 8)

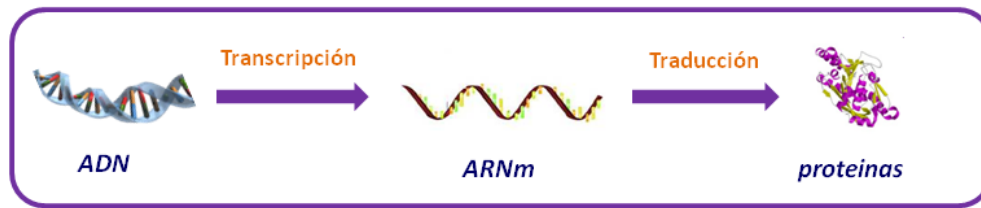


Figura 8. Dogma central de la biología molecular

## 6.1 Genómica y transcriptómica

El término **genómica** hace referencia al estudio no sólo de los genes, sino también de sus funciones, relaciones entre sí y con el medio ambiente. Su estudio posibilita conocer el contenido de genes de microorganismos que pueden ser esenciales en procesos relacionados con la calidad del suelo y útiles para un mejor entendimiento de una ecología microbiana global.

Los estudios de metagenómica dirigidos a genes funcionales, aquellos que se expresan codificando una determinada enzima capaz de llevar a cabo una función en concreto, proporcionan una información potencial de la producción de dichas enzimas en las comunidades microbianas del suelo, permitiendo conocer la capacidad de la comunidad microbiana para participar en diversos procesos biológicos. Pero existe un inconveniente respecto al estudio de genes que codifican para enzimas funcionales, y es que sólo un pequeño número de dichos genes han sido secuenciados (Wallenstein & Weintraub, 2008). Esto se debe a la dificultad metodológica de realizar un buen diseño de cebadores que representen a un amplio grupo de microorganismos capaces de codificar el gen de interés. Aún así, son varios los estudios existentes en la amplificación de genes que codifican enzimas implicadas en la descomposición de la materia orgánica, como las quitinasas (Metcalfe et al., 2002), lacasas (Blackwood et al., 2007).

Sin embargo, el estudio de genes funcionales a partir del ADN del suelo, proporciona información sobre el potencial genético para producir un determinado enzima. De ahí la importancia de los estudios basados en el ARN, los cuales permiten obtener una información “más” real del estado biológico del suelo, al centrarse en los genes que se están transcribiendo y son metabólicamente activos, y por tanto esenciales en el papel ecológico que juegan los microorganismos dentro del ecosistema en unas condiciones ambientales determinadas (ciclos biogeoquímicos, reciclaje de nutrientes, biorremediación etc.) (Crecchio et al., 2007; Reeve et al., 2010; Sofo et al., 2010)



El término **transcriptómica** se refiere al estudio de la expresión de los genes presentes en el genoma, aportando información acerca del funcionamiento de los mismos. El ARN es una molécula altamente inestable, por lo que es necesario convertirla en ADN complementario (ADNc) mediante una reacción bioquímica denominada retrotranscripción catalizada por la enzima reverso transcriptasa, con objeto de poder ser utilizado en determinadas técnicas como la qPCR.

La aplicación de estas técnicas a muestras ambientales implica la consideración de una serie de circunstancias que no habría que tener en cuenta en cultivos celulares puros. En concreto, para la amplificación por PCR de ácidos nucleicos extraídos del suelo, se deben eliminar previamente algunas sustancias inhibitoras tales como los ácidos húmicos, que se extraen conjuntamente con el ADN y ARN e interfieren en análisis moleculares posteriores (O' Donnell & Görres, 1999). A la hora de eliminar estos compuestos, conocidos como inhibidores de la enzima Taq polimerasa, se debe tener en cuenta que el tratamiento de purificación puede reducir drásticamente la eficiencia de la extracción de ADN/ARN (Johnston et al., 1996).

La cuantificación por qPCR, que proporciona valores exactos del número de copias del gen o gen transcrito por gramo de suelo (Sharma et al., 2007), puede llevarse a cabo mediante cuantificación absoluta o relativa.

La cuantificación absoluta compara la señal obtenida de las muestras respecto al número de copias de un estándar conocido. Para ello es necesario generar una curva estándar a partir de diluciones seriadas de un plásmido que contenga el gen de interés. Esta curva, se obtiene representando el logaritmo de la cantidad de muestra frente al valor de Ct (ciclo de la PCR en el que la muestra alcanza un nivel de detección al cual la reacción logra una intensidad de fluorescencia superior al "background") obtenido durante la amplificación en cada dilución. La técnica puede llevarse a cabo haciendo uso de fluoróforos inespecíficos o sondas que se unen específicamente al ADN/ADNc diana (las más comunes son las sondas taqman o sondas beacon). El fluoróforo más utilizado en PCR cuantitativa es el SyberGreen, que es un agente intercalante que se une de forma no específica a la doble cadena de ADN/ADNc. La ventaja de su uso es que se añade junto a los demás reactivos de la PCR y puede detectar cualquier producto amplificado, independientemente de su secuencia. El inconveniente es que tanto los productos específicos como los no específicos producen señal, por lo que cuando un cebador se une a una secuencia no diana se generará un falso positivo debido a la unión del fluoróforo a los productos generados. Algo similar sucede cuando se producen dímeros de cebadores durante la reacción de amplificación.

La cuantificación relativa, a diferencia de la cuantificación absoluta no requiere la realización de una curva estándar. Esta técnica se emplea para determinar los niveles de expresión génica del gen de interés (funcional) respecto a uno o más genes de referencia, conocidos en inglés como “housekeeping”, cuyo nivel de expresión es constante durante todo el estudio (gen constitutivo) Esta estrategia es útil para cuantificar genes que codifiquen enzimas implicados en una determinada reacción enzimática, y de este modo poder llegar a comprender un proceso determinado (Sharma et al., 2007). Para la determinación de la expresión génica, se debe tener en cuenta que la eficiencia de los amplicones debe ser similar para su análisis y se pueden utilizar distintos métodos: Método de Livak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001), método  $\Delta Ct$  usando un gen de referencia y el método de Pfaffl (Pfaffl et al., 2002).

Con el fin de conseguir resultados reproducibles en los distintos tipos de ensayos, es necesario un buen diseño de cebadores para evitar uniones inespecíficas o formación de dímeros entre cebadores. Por ello, es recomendable seleccionar un fragmento (amplicón) con un tamaño comprendido entre 50 y 200pb, ya que los amplicones pequeños ofrecen una mayor eficiencia del ensayo, dando lugar a una mejor sensibilidad y precisión técnica. La longitud de la secuencia debe ser como mínimo de 18 nucleótidos. Los cebadores deben tener un contenido en guanina/ citosina (G/C) entre un 40 y 60% como máximo ya que contenidos superiores pueden dar lugar a interacciones no específicas, reduciendo por tanto la eficiencia de la reacción. La temperatura de fusión (en inglés melting temperature,  $T_m$ ) debe estar comprendida entre 50°C y 60°C, y ser lo más similar posible entre la pareja de cebadores.

## 6.2. Proteómica

Los estudios de **proteómica** permiten resolver las discrepancias entre potencial genético y las funciones asociadas a la producción de enzimas, aportando una información más completa sobre la actividad microbiológica que la obtenida a partir de los estudios con ácidos nucleicos (Wilmes & Bond, 2006; Benndorf et al., 2007). La metaproteómica se caracteriza por el estudio sistemático y a gran escala de las proteínas, con el fin de proporcionar información especialmente de sus interacciones, modificaciones, localización, estructura, función y regulación de los sistemas biológicos (Solaiman & Kashem, 2007). Por lo tanto, los estudios de metaproteómica de suelos ofrecen una nueva perspectiva al proporcionar una información más concreta sobre la actividad microbiana en suelos en tiempo real, ya que permitiría relacionar la transcripción con la traducción de genes funcionales, así como el origen filogenético de las proteínas implicadas (Wilmes & Bond, 2006; Benndorf et al., 2007). En lo referente a muestras ambientales, concretamente de

suelo, estos estudios se encuentran en sus primeras etapas de desarrollo, por lo que sin duda alguna son necesarias mejoras para poder estudiar las proteínas del suelo en condiciones *in situ* (Ogunseitan, 2006).

Por tanto, el desarrollo de la proteómica puede tener importancia al permitir relacionar calidad y funcionalidad del suelo, proporcionando información acerca de cuál es el papel específico de los microorganismos y sus enzimas en procesos clave (Ogunseitan, 2006; Bastida et al., 2009). Hasta el momento, técnicas de proteómica se ha aplicado en suelos para la detección de enzimas responsables de la degradación de la materia orgánica (Schulze et al., 2005) y la biodegradación de contaminantes (Benndorf et al., 2007).

La relación entre expresión génica y cantidad de proteínas no es siempre directa debido a posibles modificaciones post-transcripcionales (Pradet-Balade et al., 2001), por lo tanto es necesario combinar estudios de metaproteómica con la caracterización de los ácidos nucleicos mediante metodologías metagenómicas y metatranscriptómicas para obtener una mejor comprensión de las funciones del suelo (Nannipieri et al., 2003).

El pool de proteínas del suelo es amplio y complejo. Pueden ser exoenzimas o proteínas intracelulares. Las primeras pueden estar en forma libre o inmovilizadas en coloides como arcilla o humus. Las segundas están presentes en el interior de células microbianas, animales y vegetales del suelo.

Generalmente, las metodologías para el estudio de las proteínas del suelo han ido enfocadas a la recuperación exhaustiva de las moléculas de proteínas sin preservar su actividad o estructura. No obstante, en la actualidad se optimizan métodos de extracción menos agresivos cuyo objetivo es evitar la desnaturalización de la proteína, con el fin de no alterar su configuración estructural, aunque, hasta la fecha, estos métodos no logran obtener una adecuada resolución molecular cuando se aplican a muestras de suelo. La mayoría de las moléculas de proteínas existen en la naturaleza formando complejos con otros tipos de moléculas, incluyendo coloides, nucleoproteínas, glicoproteínas, y metaloproteínas. En algunos casos, estos complejos interfieren en la detección de proteínas, especialmente cuando el objetivo es detectar la función de éstas (Ogunseitan, 2006).

El primer paso para extraer proteínas es conseguir la lisis celular mediante el uso de un buffer adecuado. El método de lisis a utilizar depende de las características de la muestra y de la localización de la proteína de interés. Entre los distintos métodos destacan:

- Lisis celular mediante la suspensión de las células en una solución hipotónica. Debido a la diferencia osmótica el agua difunde al interior de la célula causando su hinchamiento y rotura.

- Destrucción mecánica. Mediante homogenización, mortero con arena, molino con perlas de vidrio, la prensa de French o sonicación.
- Congelación-descongelación. La ruptura se produce al someter las células a un cambio brusco de temperatura.

La sonicación es uno de los métodos más efectivos para conseguir la ruptura de agregados de las partículas del suelo y la lisis de las células y así liberar las moléculas de proteínas. Sin embargo, la sonicación también puede causar la desnaturalización de las proteínas en determinados casos, por ello es importante trabajar a una energía de sonicación baja pero lo suficientemente eficaz para romper las células. Además, la muestra debe conservarse siempre en frío para evitar su desnaturalización. Después de la sonicación, la centrifugación se utiliza normalmente para recuperar las proteínas, que pueden ser purificadas mediante precipitación o diálisis (Ogunseitan & LeBlanc, 2004).

Existen diferentes estrategias a la hora de extraer proteínas del suelo, éstas se basan y diferencian principalmente en el tipo de buffer usado en la extracción, bien haciendo uso de detergentes para liberar las proteínas de los componentes orgánicos e inorgánicos de la matriz del suelo (Rigou et al., 2006) o haciendo uso de una solución que contenga fluoruro de hidrógeno (Schulze et al., 2005). Existen detergentes fuertes (SDS, tiourea, urea) y detergentes no-iónicos o suaves (DDM, diaginina y Triton X-100). Los primeros alteran las condiciones nativas de las proteínas desnaturalizándolas, mientras que los segundos preservan la configuración estructural y funcional de la enzima. Por lo tanto, dependiendo del tipo de análisis el uso de dichos detergentes deberá ser uno u otro. Se ha observado que algunos desnaturalizantes aplicados a concentración adecuada consiguen la no desnaturalización de la muestra (D' Amici et al., 2008).

La correcta extracción de proteínas del suelo es un requisito fundamental para su estudio (Nannipieri, 2006; Ogunseitan, 2006; Benndorf et al., 2007), dado que la gran cantidad de proteínas sintetizadas por los microorganismos hace que su purificación e identificación sea una tarea compleja (Blom et al, 1992; Ogunseitan et al., 2001).

Existen, hasta la fecha diferentes aproximaciones al estudio de la metaproteómica. Unas están relacionadas con el aislamiento de proteínas, basadas en la separación de la proteína en función de su tamaño molecular y su punto isoeléctrico a través de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) de una o dos dimensiones. Posteriormente, para su identificación se utilizan diversos tipos de análisis (por ejemplo, MALDI-TOF o ESI, etc.).

### 6.2.1 Separación de proteínas mediante electroforesis de una dimensión

La separación por electroforesis de una sola dimensión (1D) consiste en la separación de la proteína únicamente en función de su peso molecular o su carga. Existen diferentes variantes de esta técnica, (Clear Native-PAGE “CNE”, Blue Native-PAGE “BNE” y High resolution clear native PAGE “hr-CNE”) que tienen como objetivo común no desnaturalizar la proteína y difieren en el tipo de buffer usado en el cátodo.

Estas se llevan a cabo bajo condiciones nativas o no-desnaturalizantes, tanto durante la extracción como durante electroforesis de la muestra. Para ello se trabaja a pH neutro, baja concentración de sales, se evita el uso de agentes desnaturalizantes como el dodecil sulfato sódico (SDS) y urea, se manipula en todo momento la muestra a 4°C (ya que un cambio brusco en la temperatura puede dar lugar a la formación de agregados artificiales y ruptura de los complejos proteicos existentes) (Reisinger & Eichacker, 2006); se usan detergentes no-iónicos como el n-dodecil-  $\beta$ -D-maltosido (DDM), digitonina o Tritón X-100, siendo los dos primeros los más aconsejables (Krause, 2006) ya que dan lugar a una disociación menor que la inducida por el SDS permitiendo la separación de complejos intactos y/o subcomplejos específicos (D’Amici et al., 2008).

La **CNE** permite la identificación de proteínas marcadas con fluorescencia y la detección de la actividad catalítica de las mismas (Schägger et al., 1994). Sin embargo, presenta la desventaja de que es posible observar un “smear” (borrosidad vertical) en el gel que no permite ver nítidamente la proteína. Esta técnica electroforética es la menos agresiva para aislar proteínas supramoleculares (Wittig & Schägger, 2009).

La técnica **BNE** (Schägger & von Jagow, 1991) fue inicialmente utilizada en complejos proteicos mitocondriales. Este método es útil para estudiar las interacciones de proteína de membrana, proteínas citoplasmáticas, hidrofóbicas y acomplejadas (Dresler et al., 2011). Es capaz de separar proteínas con una alta resolución, las cuales mantienen su actividad enzimática funcional (Beriault et al., 2005). Se diferencia de la técnica CNE, en que la BNE hace uso de un colorante aniónico, Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250), durante la electroforesis en gel, de forma que se une a la superficie de las proteínas proporcionándole carga negativa y permitiendo la migración de los complejos proteicos hasta el ánodo. Cuando la muestra ha corrido hasta la mitad del gel, el buffer del cátodo con CBB G-250 se sustituye por otro igual pero sin CBB G-250, para así eliminar la coloración azul del gel (Saminathan et al., 2008). Una desventaja del uso del CBB G-250 es que interfiere en el ensayo de actividades enzimáticas fluorimétricas y catalíticas, recomendándose el uso de CNE y hr-CNE (Wittig et al., 2007), aunque estudios más recientes han demostrado la

efectividad de esta técnica para identificar una determinada actividad enzimática mediante fluorescencia (González-Vogel, et al., 2011).

La técnica **hr-CNE**, es una mezcla de las dos anteriores que se diseñó con la intención de conservar las ventajas de cada una de ellas y eliminar sus inconvenientes.

### **6.2.2. Separación de proteínas mediante electroforesis en dos dimensiones**

Hoy día, la técnica ampliamente más utilizada para la separación y el estudio de las proteínas es la realización de electroforesis bidimensionales en geles de poliacrilamida (2D). La técnica de electroforesis bidimensional fue introducida por el grupo de investigación de O'Farrell en 1977 (O'Farrell et al., 1997), aunque la forma de llevarla a cabo ha cambiado considerablemente con el paso de los años. Esta técnica combina una primera separación proteica en función de su punto isoeléctrico (pI) (primera dimensión) o isoelectroenfoque "IEF", con una segunda separación en función de peso molecular (MW) (segunda dimensión) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La electroforesis bidimensional permite la separación de proteínas a gran escala, ofreciendo una gran resolución en mezclas complejas de proteínas. La alta resolución de la técnica se debe a que las dos separaciones se basan en parámetros independientes. El isoelectroenfoque permite que las proteínas migren a través del gel en función de su punto isoeléctrico, gracias a un gradiente creado por unas sustancias denominadas anfólitos. No obstante, el uso de anfólitos libres a veces genera problemas como la ausencia de gradiente en algunas zonas del gel, o aparición de ruido de fondo en los geles ("streaking"). La introducción de gradientes de pH inmovilizados (Immobilized pH Gradients, IPGs) ha sido una solución a este tipo de problemas, facilitando además cargar más cantidad de proteína en el gel, aumentando así la fiabilidad de los resultados. En la actualidad se disponen de un amplio abanico de gradientes de pH para el isoelectroenfoque, comprendidos entre pH 3 y pH 12, permitiendo al usuario de la técnica incrementar la capacidad de resolución de un número elevado de proteínas presentes en la muestra. En la segunda dimensión, SDS-PAGE, el SDS confiere a las proteínas una relación carga/masa idéntica, permitiendo que éstas se separen y diferencien en función de su peso, tamaño y forma. Hay que tener en cuenta que el SDS es un agente desnaturizante y que altera la estructura de la proteína, no siendo factible un análisis funcional de ésta.

Para la eliminación de artefactos que interfieren en la visualización nítida de las proteínas, diversos autores han empleado varias electroforesis, combinando electroforesis nativas (1D) seguidas de un IEF, y otras electroforesis sucesivas, alcanzando tres dimensiones e incluso más (D' Amici et al., 2007).

Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis, es necesario aplicar un método de tinción capaz de detectar la presencia y posición de las diferentes proteínas en el gel. Este proceso es crucial y puede determinar el tipo de estudio a realizar. Los sistemas de tinción pueden ser específicos (radioactividad, anticuerpos, sustratos o aquellos asociados a modificaciones postraduccionales) o inespecíficos (azul de Coomassie, plata, etc.). La **zimografía** es una técnica de tinción específica, ampliamente utilizada para estudiar la funcionalidad de una enzima (Saminathan et al., 2008). Esta técnica consiste en la tinción del gel con un sustrato capaz de unirse al enzima de interés, mediante una reacción enzima-sustrato.

### **6.2.3. Identificación de proteínas**

Las proteínas de interés en un experimento de proteómica una vez realizada la tinción, bien específica o inespecífica, pueden analizarse directamente mediante espectrometría de masas. El primer paso consiste en recortar las bandas o spots directamente del gel dónde han sido visualizadas (“picado” de spots), seguido de una digestión de la proteína con una proteasa (normalmente tripsina porcina), dando lugar a un conjunto de péptidos que pueden estudiarse mediante dos técnicas de espectrometría de masas.

La primera es la *Espectrometría de masas* mediante *MALDI-TOF* (Matrix Assited Laser Desorption Ionization- Time Of Flight), y análisis de huellas peptídicas (PMF), permitiendo la identificación de la proteína. Sin embargo, esto no siempre es factible debido a la falta de información en bases de datos, o a la existencia de mezclas proteicas que no permiten su identificación. Ante este problema se han propuesto la utilización de una ionización tipo MALDI, consistente en una segunda fragmentación, *MS-MS/MS* (*MALDI TOF TOF*).

La segunda técnica es la espectrometría de masas en tándem por cromatografía líquida, *LC 1D trampa de iones* (separación cromatográfica de fase reversa en un nanoHPLC) o *LC 2D trampa de iones* (separación cromatográfica de intercambio catiónico fuerte (SCX) en un microHPLC). Una vez separados los péptidos mediante cromatografía, se analizan en un espectrómetro de masas tipo trampa de iones con fuente de ionización de *electrospray (ESI)* o *electronebulización*. Esta técnica permite un análisis en tiempo real de los péptidos individuales de forma más eficaz que los obtenidos por MALDI TOF TOF.

**INTERÉS DEL TRABAJO**

**OBJETIVOS**





## INTERÉS DEL TRABAJO. OBJETIVOS

La Comisión de las Comunidades Europeas, en su Estrategia Temática para la Protección del Suelo, reconoce la necesidad de fomentar la investigación en torno a una serie de grupos prioritarios, entre los que se encuentran los “procesos que sustentan las **funciones del suelo**; su papel en la **contabilidad global del CO<sub>2</sub>** y en la **protección de la biodiversidad**” (COM, 2006). De esta forma, a través del Protocolo de Kyoto, la FAO se propone determinar, elaborar y promover ciertas prácticas agrícolas sostenibles, capaces de reducir las emisiones de carbono de la agricultura y de almacenar el carbono en la biomasa de las plantas y en los suelos, a la vez que se incrementa la producción y se protege la biodiversidad ([http://ec.europa.eu/comm/environment/climat/pdf/finalreport\\_agricsoils.pdf](http://ec.europa.eu/comm/environment/climat/pdf/finalreport_agricsoils.pdf)).

Establecer relaciones entre estructura de la comunidad microbiana y las **funciones del suelo** sigue siendo un desafío para la comunidad científica, particularmente determinar si el funcionamiento de los ecosistemas está condicionado por la biodiversidad, o cómo la pérdida de grupos funcionales de microorganismos afecta al funcionamiento global del ecosistema. Por ello, urge identificar procesos, prácticas y políticas que contemplen la gestión de los recursos del suelo de una manera sostenible, que deriven en la minimización de los riesgos de degradación del suelo y la mejora de los servicios del ecosistema (Lal, 2009). Relacionado con los procesos de degradación de suelos (contaminación, desertificación, etc.), y con el uso de prácticas agrícolas medioambientalmente agresivas, se ha detectado una alarmante disminución de **biodiversidad en los suelos**, la cual no sólo abarca la diversidad de genes, especies, ecosistemas y funciones, sino también la capacidad metabólica del ecosistema (COM, 2006). El Convenio sobre la Diversidad Biológica pone de manifiesto que la biodiversidad del suelo es uno de los ámbitos que requiere una atención especial (COM, 2006). Paralelamente, se ha creado una “iniciativa internacional para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica del suelo”, partiendo de la base de que los conocimientos son aún insuficientes en lo que se refiere a la misma, y es necesario solventar este problema para comprender la función de la diversidad biológica en el medio ambiente.

La evaluación, tanto de las fuentes como de los **sumideros de carbono** en suelos agrícolas, es una tarea difícil, debido fundamentalmente a la compleja dinámica de la materia orgánica en el suelo. Desde un punto de vista bioquímico, la dinámica del carbono en el suelo está mediatizada por dos procesos fundamentales, producción primaria y descomposición. Dichas rutas bioquímicas están catalizadas por enzimas, por lo que el

estudio de las mismas se presenta pues esencial a la hora de evaluar la capacidad fijadora de C de un suelo.

Las enzimas extracelulares son la principal vía por la que los microorganismos degradan las macromoléculas que conforman la materia orgánica del suelo. Así, las  $\beta$ -glucosidasas han sido consideradas como las enzimas extracelulares más abundantes en el suelo y muy útiles para el estudio del ciclo del C (Busto & Perez-Mateos, 2000). Estas enzimas catalizan la degradación de celulosa en el suelo (Turner et al., 2002), generando fuentes de carbono soluble asimilable por los microorganismos. Es una enzima sensible a los cambios de manejo en el suelo (Knight & Dick, 2004) y ha sido propuesta como indicador de calidad de los mismos (Gil-Sotres et al., 2005).

Sin embargo, los métodos bioquímicos comúnmente utilizados para la determinación de actividades enzimáticas en suelos presentan un problema fundamental, y es que estiman actividades potenciales (Wallenstein & Weintraub, 2008). Son muy escasos o prácticamente inexistentes los estudios dedicados a la evaluación de la actividad *in situ* de un determinado enzima en condiciones naturales. En el suelo, la actividad de un enzima está controlada por complejas interacciones entre disponibilidad de sustratos, concentración del propio enzima y las propiedades físicas y termodinámicas del suelo. Por tanto, se requieren urgentemente nuevas hipótesis de trabajo. En este sentido, las tecnologías denominadas “ómicas” podrían contribuir de forma efectiva a la solución de los problemas planteados.

En este sentido, el **objetivo general** del presente trabajo de Tesis Doctoral fue determinar el impacto de cuatro diferentes manejos agrícolas sobre tres parámetros esenciales para la sostenibilidad a largo plazo del suelo y relacionados con la calidad del mismo: (1) capacidad de almacenamiento de C en el suelo, (2) estructura y diversidad de la población bacteriana de los suelos y (3) funciones esenciales del ecosistema relacionadas con el ciclo de la materia orgánica en el suelo. Para ello, se han desarrollado, y optimizado a las condiciones particulares de los suelos estudiados, metodologías del ámbito de la genómica, transcriptómica y proteómica, al mismo tiempo que se aplicaron metodologías tradicionales de bioquímica de suelos. Como modelo de estudio se utilizó un agroecosistema típico del sudeste mediterráneo, económicamente vital para la zona y de alto valor ecológico. En Andalucía, el olivar supone uno de los cultivos extensivos económica y socialmente más importantes, que ocupa de forma estable alrededor de 1,5 millones de hectáreas, emplea a más del 32% de la población activa y genera alrededor de 2000 millones de euros.

Por tanto, este objetivo general fue abordado a través de los siguientes **objetivos específicos**:

- Desarrollar y optimizar metodologías genómicas, transcriptómicas y proteómicas enfocadas al análisis global de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en suelos.
- Desarrollar y optimizar metodologías genómicas y transcriptómicas enfocadas al estudio de la comunidad bacteriana en suelos.
- Combinar las anteriores metodologías con métodos tradicionales químicos y bioquímicos para el estudio de la dinámica del carbono del suelo y la evaluación del grado de sostenibilidad de cuatro manejos agrícolas de olivar en clima mediterráneo semiárido.
- Establecer las zonas más sensibles a los efectos de los diferentes manejos agrícolas a lo largo de la capa arable.



**MATERIALES**

---



## MATERIALES

### 1. Localización

La presente Tesis Doctoral tuvo como objeto de estudio suelos de olivares localizados en una parcela experimental de la Red Andaluza de Experimentación Agraria (RAEA), perteneciente a la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. En esta finca, Finca Salido Bajo, localizada en termino municipal de Navas de San Juan (Jaén) ( $38^{\circ} 12' 36''$  N  $03^{\circ} 23' 01''$  W) (Fig.1), se realizan ensayos experimentales desde el año 1976, lo cuales continúan hasta la actualidad.

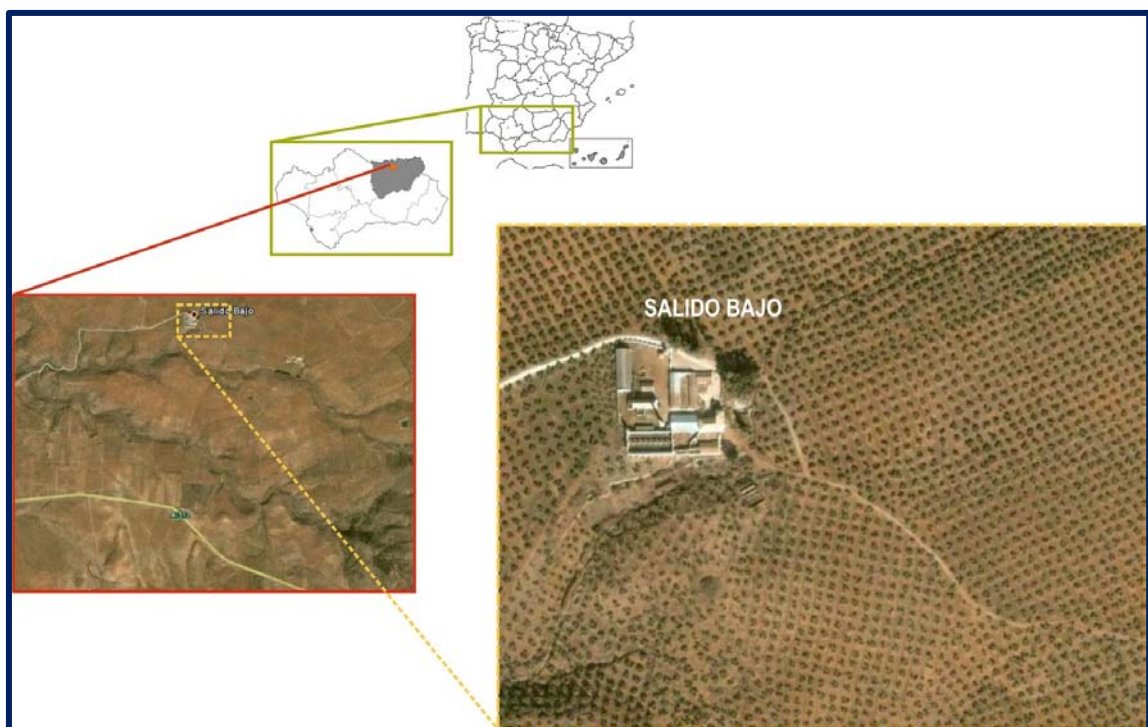


Figura 1. Localización finca Salido Bajo.

### 2. Características de la zona de estudio y descripción del perfil del suelo

- **Precipitación media:** 557 mm
- **Tº máxima:** 37.1°C
- **Tº mínima:** 2.8°C
- **Material original:** Roca clástica procedente de la facies Buntsandstein, compuesto básicamente de aluviones, areniscas, arcillas, limos y algunos conglomerados.
  - **Altitud:** 460 metros
  - **Pendiente:** 2%



- **Condiciones de humedad:** Seco en casi todo el perfil, solo recibe agua del aporte de lluvia.
- **Vegetación o uso actual:** cultivo de olivar.
- **Afloramientos rocosos:** no aparecen pero la roca madre (areniscas) en algunos sitios esta a 30 cm.
- **Erosión:** Bajo.
- **Drenaje:** Mal drenado, ya que las capas laminares de arenisca consolidada pueden en ocasiones restringir la infiltración de agua tras largos periodos de lluvia, que puede durar días o semanas dependiendo de la intensidad de ésta y de la tasa de evaporación. La presencia de nódulos de manganeso indica condiciones reductoras por encharcamiento y este se produce por una falta de drenaje en las areniscas y por la presencia de arcillas.
- **Clasificación:** Regosol Antrópico (FAO, 1998), que se caracteriza por la presencia de capas alternas de arenisca y arcilla, que se han ido modificando en gran medida por labrar el suelo a una profundidad de 40-50cm, a inicio del ensayo.

Desde 1980 hasta la fecha el olivar ha sido fertilizado por vía foliar. Los fertilizantes se aplican disueltos en agua y mediante un equipo de aplicación de fitosanitarios (atomizador). No se lleva a cabo la aplicación directa de fertilizantes en el suelo. Según la normativa específica de Producción Integrada del Olivar, la fertilización llevada a cabo es la más efectiva y recomendada en las condiciones de cultivo de esta finca.

### **3. Descripción del experimento**

La plantación la forman olivos adultos de la variedad picual, bajo condiciones de secano en un marco de plantación de 11m x 11m. El diseño experimental se basa en un sistema de bloques al azar con cuatro tratamientos y cuatro parcelas por cada tratamiento. Cada tratamiento consta en 16 olivos, siendo los cuatro centrales los olivos control y el resto olivos barrera. En la figura 2 se muestra la distribución del experimento.

En cada uno de las parcelas se tomaron dos muestras en el centro de ellas (olivos control) a profundidades 0-2, 2-5, 5-10 y 10-20 cm, así como una muestra conjunta de 0-20 cm (Fig. 3). La capa de briofitas se eliminó cuando estaba presente, es decir en los tratamientos con cubierta vegetal. Para los análisis de los ácidos nucleicos submuestras de suelo fueron etiquetadas e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido. Las muestras fueron transportadas en hielo seco y una vez en el laboratorio se procedió a un tamizado de las mismas, a través de una luz de malla de 2 mm. Las muestras se almacenaron a 4°C y -80°C hasta que se llevaron a cabo los análisis bioquímicos y moleculares, respectivamente.

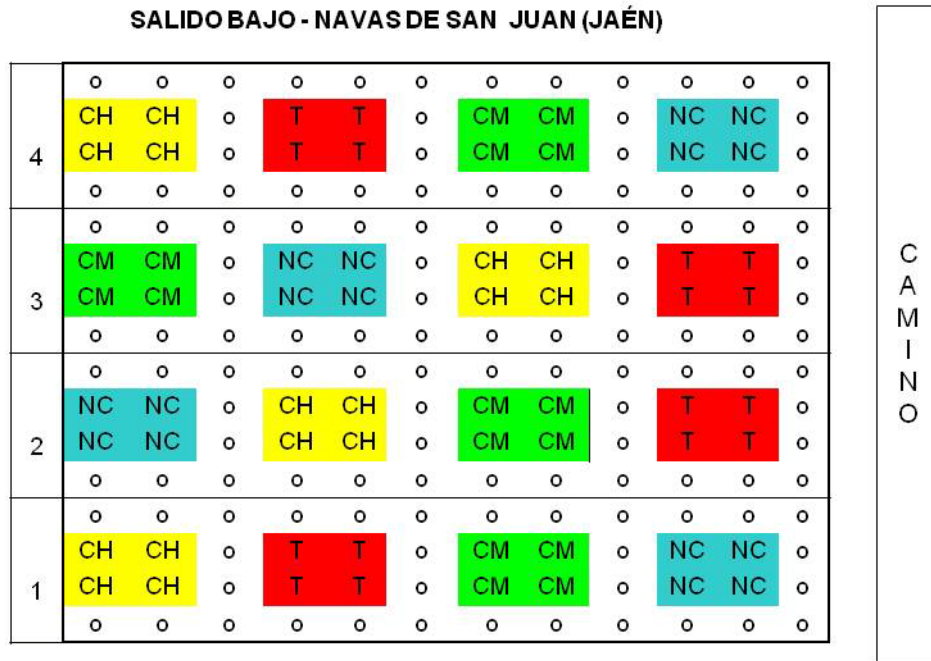


Figura 2. Diseño experimental



Figura 3. Toma de muestras de suelo

Los tratamientos evaluados fueron:

- Laboreo (**T**): sistema con suelo desnudo considerado como tradicional. La vegetación espontánea se eliminaba tradicionalmente mediante varios pases al año de grada de discos y cultivador. Desde 1985, las gradas de discos han sido sustituidas por pases de cultivador, dependiendo el número de pases de la pluviometría y el estado vegetativo de las malas hierbas. Anualmente suelen ser 3-4, necesiéndose en algunas ocasiones pases adicionales con gradas de púas (rastras) para alisar el terreno. La profundidad de las labores suele ser de 20-30 cm. Se produce un enterrado de toda la vegetación de malas hierbas (Figura 4).

- No-laboreo y suelo desnudo (**NC**): sistema donde el suelo permanece sin vegetación durante todo el ciclo anual. La vegetación de malas hierbas se elimina aplicando a toda la superficie de la parcela herbicidas de tipo pre-emergencia como simazina y diuron en el otoño, previa a la germinación de las malas hierbas tras las primeras lluvias otoñales. Posteriormente éstos se sustituyeron por oxifluorfen. Algunos años durante la primavera es necesario realizar aplicaciones localizadas de glifosato (Figura 5).

- Cubierta vegetal controlada con herbicidas (**CH**): sistema de manejo donde el suelo está cubierto por una cobertura vegetal de vegetación espontánea que se desarrollan hasta mediados del mes de marzo, momento en que son sometidas a una siega química con herbicidas de tipo post-emergencia. Inicialmente se utilizaron compuestos a base de diaquat-paraquat, posteriormente reemplazados por glifosato (Figura 6).

- Cubierta vegetal controlada con desbrozadora (**CM**): sistema de manejo en que la vegetación espontánea es controlada con varios pases de desbrozadora a finales de primavera, por lo general cuando las plantas están próximas a completar su ciclo vegetativo. El número de pases anuales se realiza en función de la pluviometría, por lo general, dos al año. Este tipo de cubierta permanece más tiempo viva sobre la superficie del suelo, genera más biomasa y más protección al suelo, sin embargo suele consumir más agua del perfil y los suelos suelen estar más secos en verano (Figura 7).

En los tratamientos NC y CH, la aplicación de herbicidas se realizó mediante un equipo de pulverización hidráulico de chorro proyectado, compuesto por una cuba de 400 L y una barra distribuidora de herbicidas. Los tratamientos herbicidas y dosis se realizaron de acuerdo con las prescripciones del Registro de Productos Fitosanitarios ([www.marm.es](http://www.marm.es)). Para la totalidad del ensayo se aplican herbicidas de pre-emergencia en la zona bajo la copa del árbol, en el caso del tratamiento de no-laboreo con suelo desnudo (NC) esta aplicación tiene lugar en la totalidad del ensayo.



Figura 4. Laboreo (T)



Figura 5. No laboreo (NC)



Figura 6. Cubierta vegetal +herbicida (CH)



Figura 7. Cubierta vegetal + desbrozadora (CM)

#### 4. Caracterización textural del suelo

En la Tabla 1 se muestra la proporción de grava, arena, lino y arcilla de los diferentes tratamientos y profundidades. Estos análisis fueron realizados en el Laboratorio Agroalimentario de Granada. Atarfe. CAP, Junta de Andalucía, siguiendo la normativa oficial

Tabla1. Caracterización textural del suelo

Tratamiento	% Grava	% Arena	% Limo	% Arcilla
T <sub>0-2</sub>	11,41	58,00	17,22	24,77
T <sub>2-5</sub>	11,33	65,45	14,98	18,86
T <sub>5-10</sub>	10,39	59,64	14,80	25,56
T <sub>10-20</sub>	11,39	60,08	16,98	22,94
NC <sub>0-2</sub>	12,15	67,53	17,04	15,42
NC <sub>2-5</sub>	13,15	72,55	12,94	14,51
NC <sub>5-10</sub>	11,03	69,46	14,26	16,28
NC <sub>10-20</sub>	9,71	63,38	18,19	18,44
CH <sub>0-2</sub>	11,04	69,09	18,28	12,63
CH <sub>2-5</sub>	13,93	71,62	14,94	13,44
CH <sub>5-10</sub>	11,81	70,82	13,97	15,17
CH <sub>10-20</sub>	10,17	67,80	14,53	17,67
CM <sub>0-2</sub>	16,09	61,34	21,46	17,20
CM <sub>2-5</sub>	12,82	67,23	16,12	16,65
CM <sub>5-10</sub>	10,96	68,36	14,71	16,94
CM <sub>10-20</sub>	13,77	62,61	15,36	22,02

## 5. Materiales utilizados para estudios de metaproteómica de suelos

### 5.1 Zona de estudio y toma de muestras

Los estudios de metaproteómica de suelos (capítulo 5) se realizaron fundamentalmente en la Universidad de California de Irvine (EE.UU.). Para ello, se seleccionaron suelos localizados en el centro de experimentación de dicha Universidad denominado Arboretum Research Facilities (Fig. 8) de 12,5 ha de superficie ( $33^{\circ} 40' 47''$  N  $117^{\circ} 50' 50''$  W). En ella se tomaron muestras de un mismo tipo de suelo en dos condiciones diferentes, suelo desprovisto de vegetación y suelo con cubierta vegetal (Fig 9). La profundidad de muestreo fue de 50 cm, las muestras se transportaron al laboratorio donde fueron tamizadas ( $< 2$  mm) e inmediatamente conservadas a  $4^{\circ}\text{C}$ .



Figura 8. Localización toma de muestras

No cubierta



Cubierta vegetal



Figura 9. Suelos muestreados

### 5.2. Características de la zona de estudio

California se caracteriza por tener un clima mediterráneo con algunas lluvias en invierno y veranos secos. El invierno es templado ( $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) debido a la influencia del océano que modera las temperaturas extremas y los veranos son cálidos con un promedio de  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las precipitaciones tienen lugar principalmente durante los meses de invierno y primavera, siendo el promedio de 381 mm anuales.

### 5.3. Experimento de incubación de suelos

El suelo se distribuyó en diferentes microcosmos de 500 ml de capacidad fabricados de teflón y con dos orificios de ventilación (Fig.10). El suelo se enmendó con celobiosa y glucosa a una concentración de 420 mg/g de suelo (Steinweg et al., 2008) en un volumen total de 4.2 ml de agua destilada, cantidad calculada en base a la retención de agua del suelo para alcanzar el 80 % de la capacidad de campo. Al suelo control se le añadió la misma cantidad de agua destilada.



Figura 10. Microcosmos

**RESULTADOS**

---





## **CAPÍTULO 1**

---

**Rainfed olive farming in south-eastern  
Spain: Long-term effect of soil management  
on biological indicators of soil quality**



## **Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality**

### **Resumen**

El deterioro de la calidad del suelo en las zonas áridas está relacionado principalmente con técnicas inadecuadas de cultivo. Algunas prácticas de agricultura sostenible han demostrado ser eficaces en la restauración o la mejora de suelos, así como en la mejora de la calidad y la salud de los mismos. En este estudio, se evaluó, a través de indicadores biológicos de la calidad del suelo, el efecto a largo plazo de cuatro manejos agrícolas caracterizados por la presencia/ausencia de dos factores principales: cubiertas vegetales y control químico de la vegetación adventicia. El tamaño y la estructura de la comunidad bacteriana se estimaron mediante ensayos de PCR cuantitativa sobre genes 16S ARNr y PCR-electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) de fragmentos del 16S ARNr, respectivamente. Asimismo se determinó la actividad de seis enzimas (deshidrogenasa, diphenoloxidase,  $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa, ureasa y arilsulfatasa) implicadas en los ciclos de C, P, N y S. Los suelos con cubierta mostraron mayor biomasa y diversidad bacteriana, así como una mayor diversidad funcional microbiana que los suelos sin cubierta. La eliminación de la vegetación espontánea mediante herbicidas redujo la diversidad funcional microbiana en suelos con cubierta, pero no afectó a los otros parámetros microbiológicos. Cuando se compararon los suelos sin cubierta, se encontraron valores de actividad microbiana y diversidad bacteriana más bajos cuando las hierbas fueron controladas con métodos químicos. Los resultados de este estudio revelan que los suelos con cubierta en cultivos de olivo suponen una mejor alternativa en condiciones de secano.

Este artículo ha sido publicado en la revista **Agriculture, Ecosystems and Environment** **131 (2009) 333–339**





Contents list available at Science Direct

# Agriculture, Ecosystem and Environment

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/agee](http://www.elsevier.com/locate/agee)

## Original article

### Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality

B. Moreno<sup>a</sup>, S. Garcia-Rodriguez<sup>a</sup>, R. Cañizares<sup>a</sup>, J. Castro<sup>b</sup>, E. Benítez<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín (EEZ), CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain.<sup>b</sup>Area de Producción Agraria, IFAPA, Camino Purchil s/n, 18080 Granada, Spain

#### ARTICLE INFO

Article history:  
 Received 18 November 2008  
 Received in revised form 16 February 2009  
 Accepted 17 February 2009  
 Available online 24 March 2009

Keywords:  
 Bacterial diversity  
 Bacterial population size  
 Cover crops  
 DGGE  
 Enzyme activities  
 Olive orchard

#### ABSTRACT

Deteriorating soil quality in arid areas is related primarily to inappropriate farming techniques. The use of environmentally friendly agriculture practices has proven to be effective in restoring or improving soil quality and health in these areas. In this study, four long-term approaches to olive-orchard management, categorized by the presence/absence of two main factors -cover crops and chemical weed control- were evaluated using biological indicators of soil quality. Soil bacterial population size and community structure were estimated by real-time PCR assays targeting 16S rRNA genes and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA fragments (PCR-DGGE), respectively, and the activity of six enzymes (dehydrogenase, *o*-diphenoloxidase,  $\beta$ -glucosidase, phosphatase, urease and arylsulphatase) representative of the C, P, N, and S cycles were determined. Covered soils exhibited greater bacterial biomass and diversity, as well as higher microbial functional diversity than non-covered soils. The elimination of weeds with herbicides reduced the microbial functional diversity in covered soil but did not affect the other microbiological parameters, revealing that the effect of the cover crop predominated. When non-covered soil was considered, the lowest values of microbial activity and diversity were found when weeds were controlled with chemical methods. The results of this study reveal that covered soils are the best option when olive orchards are managed under rainfed conditions.

2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The economic and social importance of olive cultivation in Spain is immense. There are more than 2500 oil mills that produce more than 30% of the world production of olive oil, generating 2,000,000,000 € in Spain. The ecological impact of this crop is also enormous, as the olive orchard constitutes the landscape – or a fundamental part thereof – throughout vast tracts of land in the Mediterranean Basin (Pajaron, 2000). About 80% of the olive crops are concentrated in Andalusia, the biggest olive-growing area on the planet. Within Andalusia, the most important olive oil-producing areas are in the province of Jaen (south-eastern Spain). In these areas, dry climatic conditions determine the viability of any crop.

E-mail address: [emilio.benitez@eez.csic.es](mailto:emilio.benitez@eez.csic.es) (E. Benítez).

The success of olive farming under rainfed conditions is due mainly to the physiological behaviour of the olive tree (*Olea europaea* L.), a species which has developed a series of physiological mechanisms to tolerate drought stress and grow under adverse climatic conditions (Sofa et al., 2007). Nevertheless, arid regions are particularly susceptible to soil degradation. Deteriorating soil quality in these areas is related primarily to inappropriate farming techniques (Eitzinger et al., 2007). Conventional tillage in olive-production systems typically include primary tillage with a mouldboard or chisel plough in the fall, spring disking or harrowing, and inter-row cultivation for weed control during the crop-growing season. These operations promote soil erosion and rapid depletion of soil organic

\*Corresponding author. Tel.: +34 958181600; fax: +34 958129600.

matter (Fleskens and Stroosnijder, 2007.). The use of environmentally friendly agriculture practices has proven to be effective in restoring or improving soil quality and health in these areas by reducing the mechanical disturbance of soil, protecting the soil surface with mulch cover, and adding organic matter to the soil (Balkcom et al., 2007; Castro et al., 2008).

Evaluation of agricultural soil quality is a very complex task, beginning with the difficulty of providing a definition (Bastida et al., 2008). However, it is generally assumed that the first step to estimate soil quality should be to identify critical functions (Karlen et al., 2003). The difficulty is that soil functions are affected not only by soil properties, but also by climate, landscape, and management, and the relations among these variables are complex. In any case, selected parameters such as enzyme activities give helpful information concerning functionality and productivity because of their central role in nutrient cycling and their sensitivity to management (Nannipieri et al. 1990; Benitez et al. 2004).

Despite that elucidating the link between soil functions and microbial diversity is still a major challenge, it has been established that reductions in the diversity of soil biota reduce the stability of the soil community with possible degeneration in ecosystem functioning (Brussaard et al., 2004). Consequently, changes in soil-microbial diversity, measured in terms of microbial community structure and function, have also been included as feasible biological indicators of soil quality (Puglisi et al., 2006).

The aim of the present study was to assess the impact of four long-term management practices under rainfed conditions, on various biological indicators of soil quality. To do this, soil bacterial population size and community structure were estimated by real-time PCR assays targeting 16S rRNA genes and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA fragments (PCR-DGGE), respectively. The activity of six enzymes (dehydrogenase, *o*-diphenoloxidase,  $\beta$ -glucosidase, phosphatase, urease and arylsulphatase) representative of the C, P, N, and S cycles were also determined.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Site description, trial and sampling

The study was conducted in Jaen (south-eastern Spain). At this site, an experiment designed to study the impact of different soil-management systems on olive production began in 1976 and continues to date. The main characteristics of the experiment are fully described in Castro et al. (2008). Briefly, the average annual rainfall for the area is 557 mm, the common soil is an Anthropic Regosol (FAO, 1998) and the plantation consisted of unirrigated adult olive trees planted in a pattern of 11 m x 11 m. For our study, a random-block design of four treatments and four plots from within each treatment were selected from the overall trial (Castro et al., 2008). The elementary plot consisted of 16 olive trees: the central four were controlled and the rest constituted guard rows. The treatments tested were:

-Tillage (T): 3-4 annual passes with disk harrow (depth 30 cm) and/or cultivator in the spring, followed by a tine harrow in the summer.

-Non-tillage and no-cover (NC): vegetation was eliminated by applying the pre-emergence herbicides simazine and diuron in the autumn. These have been replaced by oxyfluorfen for five years until now. In the spring, glyphosate was applied locally.

-Cover crop + herbicides (CH): weeds were left to grow each year to be eliminated in March with herbicides. Initially, diquat/paraquat was used before being replaced at a later date by glyphosate.

-Cover crops + mower (CM): weeds were controlled with various passes of the chain mower at the end of spring, usually when the plants had completed or almost completed their vegetative cycle.

Two samples were collected in the center of each plot. We used a modified soil-sample ring kit (Eijkelkamp) which includes a cylinder of 30 cm (depth of sampling) specifically manufactured for this purpose. The bryophyte layer was eliminated (when present) in cover treatments CH and CM, and any weeds were cut to ground level. Samples were bulked to give three replicates per plot. Field-moist soil was stored at 4°C until enzymes and nucleic-acid analyses were made.

### 2.2. Soil organic carbon and enzymes activities

Soil organic-carbon content was determined using the Walkley-Black wet dichromate oxidation method (M.A.P.A., 1986).

Dehydrogenase activity was determined by the method of Von Mersi and Schinner (1991) modified by Garcia et al. (1997). One gram of soil was incubated for 20 h at 25°C with 0.2 ml of 0.4% 2-p-iodophenyl-3 *p*-nitrophenyl-5 tetrazolium chloride (INT) as a substrate. Iodonitrotetrazolium formazan (INTF) produced in the reduction of INT was extracted with a mixture of acetone:tetrachloroetene (1.5:1) and measured in a spectrophotometer at 490 nm. Assays without soil and without INT were carried out simultaneously as controls.

For the determination of urease activity, 2 ml of 0.1 M, pH 7.0 phosphate buffer and 0.5 ml 1.066 M urea were added to 1 g of soil (Nannipieri et al., 1980). Shaken incubation was carried out at 37 °C for 1.5 h. The ammonium released in the hydrolytic reaction was measured using an ammonium selective electrode (ORION Research Inc., Beverly, MA, USA) mod. 95-12. Assays without soil and without urea were made at the same time as controls.

For the determination of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase and arylsulphatase activity, 0.5 ml of 0.05 M 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucanopyranoside, 0.115 M 4-nitrophenyl phosphate and 5 mM 4-nitrophenyl sulphate were used as substrate respectively (Tabatabai and Bremner, 1969, 1970; Nannipieri et al, 1980). Soil portions (1 g) were incubated at 37°C for 1.5 h with 2 ml of maleate buffer at pH 6.5. The samples were then kept at 2°C for 15 min to stop the reaction, and the *p*-nitrophenol produced in the enzymatic reactions was extracted and determined at 398 nm. Assays without soil and without substrates were made at the same time as controls.

For the analyses of *o*-diphenol oxidase, reagent solutions of 0.1 M phosphate (pH 6.5) containing 0.2 M of catechol or 0.2 M of proline were oxygenated for 3 min and incubated for 10 min at 30 °C. Then, 1 g of soil was added to 3 ml of reagent solution (1.5 ml of catechol solution and 1.5 ml of praline solution) and 2 ml of

phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5). The mixture was incubated for 10 min at 30°C and the reaction was stopped by cooling in an ice-bath and adding 5 ml of ethanol. The mixture was centrifuged at 5000 g at 4°C for 5 min. The absorbance of the supernatant fraction was measured at 525 nm. Assays without soil and without catechol were made at the same time as controls (Perucci et al., 2000).

### 2.3. Soil-DNA extraction and PCR-DGGE analysis

The total DNA was extracted from subsamples (2 extractions per each one of the three replicates per plot) of 250 mg of soil by the bead-beating method, following the manufacturer's instructions MoBio UltraClean Soil DNA Isolation kit (MoBio Laboratories Inc., Solana Beach, CA, USA). To remove trace concentrations of PCR inhibitors, the repetition of the second step (Inhibitor Removal Solution) was carried out. The DNA samples were checked for concentration and quality using the NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware; USA).

PCR was performed with the 16S rDNA universal bacterial denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) primers (TIB®MOLBIOL, Berlin, Germany) P1, P2, and P3 to amplify the V3 hypervariable region of 16S rDNA genes (Muyzer et al. 1993).

Two successive amplifications were carried out following Muyzer et al. (1993) modified by Moreno et al. (2008). The total reaction mixture of the first PCR consisted of 25 µl with the following ingredients: 1 µl volume (approx. 10 ng) of extracted DNA, 1 µM primer P1, 1 µM primer P2, 10 µl Eppendorf® Master Mix (2.5X) and sterile Milli-Q water to a final volume. The second amplification was performed by using 1 µl of the products of the first reaction as template. In this, primers P2 and P3 were used under the same conditions described above.

DGGE analyses were conducted using 20 µl of this latter PCR product loaded into a 40 to 70% urea-formamide-polyacrylamide gel. An INGENYphorU System (Ingeny International BV, The Netherlands) was run at 75 V for 17 h at 58°C to separate the fragments. Gels were silver stained with the Bio-Rad Silver Stain according to the standard DNA-staining protocol and photographed under UV light ( $\lambda = 254$  nm) using an UVitec Gel Documentation system (UVitec Limited, Cambridge, UK).

### 2.4. Real-time PCR assay

Real-time PCR was performed to quantify the number of 16S rRNA copy in triplicate soil-DNA extracts. Universal primers specific for V3 hypervariable region of 16S rRNA of eubacteria P1 and P2 (Muyzer et al., 1993) were used. Each 21-µl PCR reaction contained from 2 to 5 ng of the DNA, 10.5 µl 2x iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany), and 400 nM each primer. For each extracted DNA, real-time PCR experiments were carried out three times with the threshold cycle (Ct) determined in triplicate. The real-time PCR program consisted of 1.5 min at 50°C for carryover prevention, 15 min at 95°C for enzyme activation, followed by 35 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C, when the fluorescence signal was measured. PCR amplification procedure was checked with a heat dissociation protocol (from 70°C to 100°C)

after the final cycle of the PCR. Quantification of the DNA copy number was performed on a iQ5 thermocycler using iQ5-Cycler software (Bio-Rad, Munich, Germany).

The standard curve was generated by using a plasmid recombinant containing one copy of 16S rRNA fragment. The curve was drawn by plotting the Ct value as a function of the log of the copy number of 10-fold dilution serial of plasmid DNA. As Ct values may vary slightly between experiments, parallel sets of the three dilution series of pure standard DNA were run in all experiments. The relationship between Ct and the target gene copy number, and the copy numbers of the real-time standard were calculated as described by Quian et al. (2007).

### 2.5. Data analyses

All biochemical results are the means of 12 replicates (three per plot). Data of the real-time PCR represent the average of three independent soil-extracts replicates. Data were subjected to analysis of variance using the program STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) and Duncan's Multiple Range Test was used to separate the means with an overall significance level of 0.05. Sun-ray plots (Dilly and Blume, 1998) were constructed to show graphically the enzyme activities of the different treatments. The star shape for each one allows a comparison of visual and numeric presentations of multivariate data and it has been proposed as an integrated fingerprinting for assessing microbial functional diversity (Nannipieri et al., 2002).

The DGGE band patterns in different lanes were compared with the UVimap Analysis software (UVitec Limited, Cambridge, UK). The lanes were normalized to contain the same amount of total signal after background subtraction and the gel images were straightened and aligned to give a densitometric curve. Band positions were converted to Rf values between 0 and 1, and profile similarity was calculated by determining Nei and Li's similarity coefficients (Nei and Li, 1979) for the total number of lane patterns from the DGGE gel. The similarity coefficients calculated were then used to construct a dendrogram using the unweighted pair-group method with arithmetical averages (UPGMA).

DGGE banding data were used to estimate two diversity indices by treating each band as an individual operational taxonomic unit (OTU). For these analyses, each band was presumed to represent the ability of that bacterial species to be amplified (Ibekwe and Grieve, 2004) and the intensity of the bands was reflected as peak heights in the densitometric curve. The Shannon index of general diversity  $H'$  (Shannon and Weaver, 1963) was calculated from the following equation:

$$H' = - \sum (P_i \log P_i)$$

where  $P_i = n_i/N$ ;  $n_i$  = height of peak,  $N$  = sum of all peak heights in the curve.

To test whether similarities observed within and between samples were stronger or weaker than would be expected by chance, band-matching data was stored as a binary matrix and analysed using Raup and Crick's probability-based index of similarity  $S_{RC}$  (Raup and Crick, 1979). The  $S_{RC}$  is the probability that the randomized similarity would be greater than or equal to the observed similarity, and  $S_{RC}$  values above 0.95 or below 0.05 signify similarity or dissimilarity,



respectively, which are not random assortments of the same species (bands or OTUs) (Rowan et al., 2003). The  $S_{RC}$  and cluster analyses were calculated using the PAST (Palaeontological statistics, version 1.82b) program (Hammer et al., 2001).

### 3. Results

#### 3.1. Soil organic carbon and enzymes activities

The treatments T, CH, and CM provided significantly more soil organic carbon concentration than did NT (Table 1).

Figure 1 shows the sun-ray diagrams plotting the assayed enzyme activities along different radial axes. No differences in the soil dehydrogenase activity were detected between T, CH and CM treatments (5.9, 6.1 and 7.4  $\mu\text{g INTF g}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectively), whereas NC provoked a 3-fold decrease in the dehydrogenase activity. Meanwhile, o-diphenoloxidase was higher in CH and CM, but no difference between the latter and T or NC was detected. The highest  $\beta$ -glucosidase activity was recorded in the CM treatment (1087  $\mu\text{g PNP g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). The replacement of the mower by the herbicides in CH significantly decreased ( $P \leq 0.05$ ) the activity to 519  $\mu\text{g PNP g}^{-1}\text{h}^{-1}$ . The T and NC treatments decreased the activity at the same magnitude. The rest of hydrolytic enzymes (phosphatase, urease and arylsulphatase) followed the same trend, i.e. highest and similar ( $P \leq 0.05$ ) values when cover crops were used.

#### 3.2. Bacterial population size and community structure

A real-time PCR standard curve was generated for bacterial 16S rRNA quantification. Serially diluted DNA originating from recombinant plasmid including 16S rRNA fragment showed the single expected amplicon of 193 bp. The equation describing the relationship between Ct and the log number of 16S rRNA copies was  $Ct = -3,329 \times \log(16S \text{ rRNA}) + 48,059$ ,  $R^2 = 0,997$ . Target molecules were linear from  $10^4$  to  $10^9$  copies. The soils under cover crops showed the highest median density of bacterial copies per gram (Table 1). Comparison of the T and NC treatments revealed a significant decrease ( $P \leq 0.05$ ) of the number of 16S rRNA copies.

**Table 1**

Soil organic carbon, bacterial population number and Shannon diversity index values for DGGE profiles for tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils. Mean values corresponding to four plots for each treatment  $\pm$  standard error. For each column, significant differences are indicated by different letters ( $P \leq 0.05$ ).

	Organic carbon (g C x kg soil <sup>-1</sup> )	Bacterial population number (copy numbers x g soil <sup>-1</sup> )	Shannon diversity index values
T	9.94 $\pm$ 1.37 a	2.33 x 10 <sup>+08</sup> $\pm$ 1.11 x 10 <sup>+07</sup> b	2.999
NC	5.36 $\pm$ 0.62 b	3.22 x 10 <sup>+07</sup> $\pm$ 1.54 x 10 <sup>+06</sup> c	2.815
CH	8.32 $\pm$ 1.78 a	1.37 x 10 <sup>+09</sup> $\pm$ 1.30 x 10 <sup>+08</sup> a	3.412
CM	9.91 $\pm$ 1.56 a	9.52 x 10 <sup>+08</sup> $\pm$ 7.47 x 10 <sup>+07</sup> a	2.933

Comparison of the bacterial communities from T, NC, CH, and CM showed markedly different profiles across the DGGE gel (Fig. 2). The generated UPGMA

dendrogram evidenced two clear groups of soils (Fig. 3a). The first one was composed by T and NC, which clustered together with a homology coefficient of 50%. The second group (38% homology) included CH and CM treatments. The diversity of the bacterial community was also examined by the Shannon ( $H'$ ) diversity index. NC and CH displayed the lowest and the highest  $H'$  from the DGGE banding patterns, respectively, while T and CM showed similar  $H'$  values (Table 1).

The SRC values found by comparing the four treatments are summarized in Figure 3b. Similarities within replicas were significant in all by-products (SRC=1 data not shown). NC was significantly dissimilar to CH and CM (SRC < 0.05). For the rest of pair compared DGGE profiles, the similarity was no greater than expected by chance ( $0.95A > SRC > 0.05$ ). Figure 3b also shows the dendrogram generated by the Raup and Crick cluster analyses.

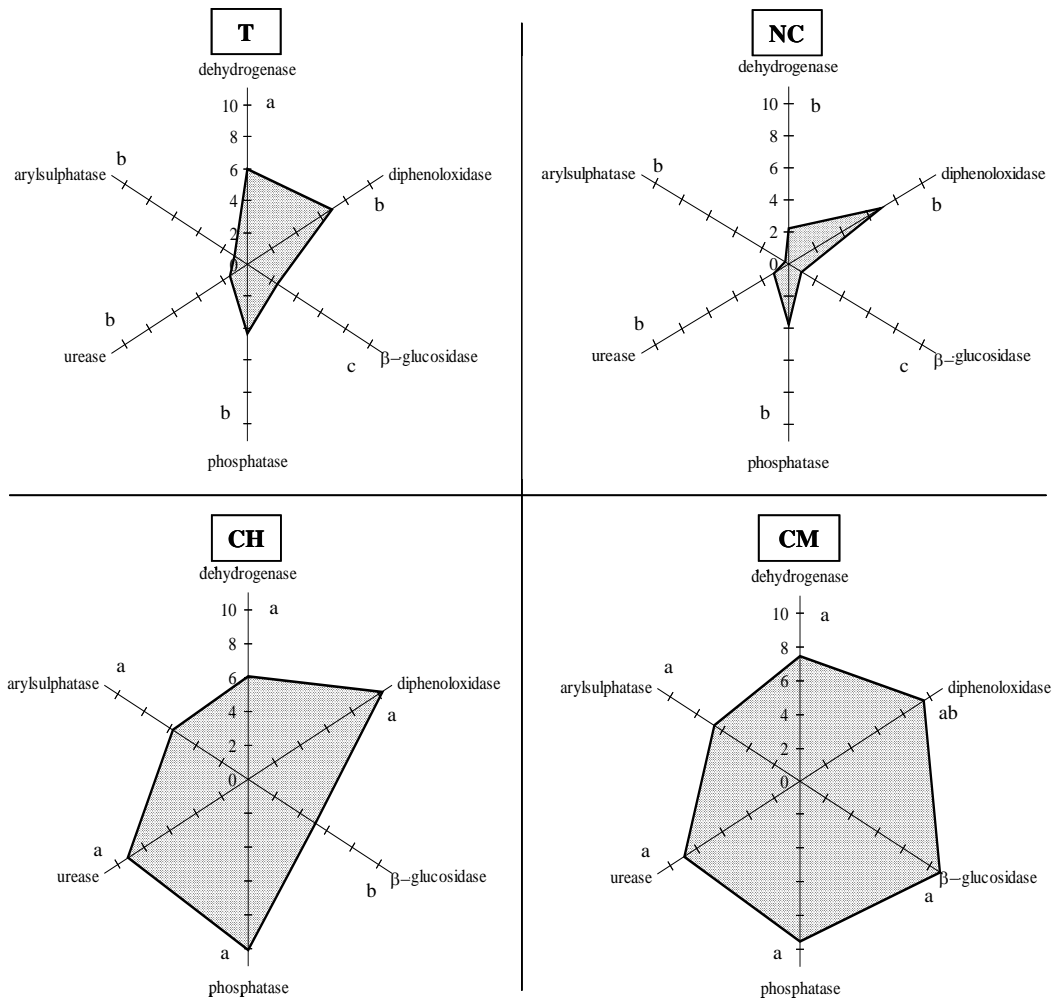
### 4. Discussion

#### 4.1. Soil enzymes activities

Dehydrogenase has been considered to be a measure of the total oxidative activity of the soil microflora and therefore of the metabolic activity of soil (Nannipieri et al., 2002). In our experiment, dehydrogenase activity did not differ between permanent arable land and plant-covered soils. Non-tillage following herbicides application lowered the activity of this enzyme in the soil. Evidence of the effect of herbicides on the soil dehydrogenase has been widely reported (Reinecke et al., 2002; Benitez et al., 2006; Garcia-Ruiz et al., 2008), but, since herbicides are not designed to inhibit soil enzymes (Speir and Ross, 2002), direct inhibition seems to be doubtful. Soils with higher levels of plant remains show greater dehydrogenase activity than do uncovered soils (Kremer and Li, 2003), this being related mainly to the additional supply of labile C to soil, which can stimulate biochemical activity (Carpenter-Boggs et al., 2000). In agreement with this, NC did not produce any biomass as the surface was kept vegetation free with herbicides (Castro et al., 2008), and a straight relation was found between SOC levels and dehydrogenase activity.

Organic matter decomposition in soil depends on multicomponent enzyme systems, in which a series of inducible enzymes act in cascade (Sinsabaugh et al., 1991). In our study, hydrolytic enzymes involved in biochemical cycles of carbon, nitrogen, phosphorus, and sulphur have been chosen to indirectly determine the impact of cover crops on nutrient release and thus on soil quality.

The  $\beta$ -glucosidase activity was significantly higher in covered soils, but a difference between herbicide treated/non-treated soils was noted, showing that  $\beta$ -glucosidase was the most sensitive enzyme to a long-term herbicide management. Previous studies show the sensitivity of the  $\beta$ -glucosidase enzyme to herbicides, because of a reduction in activity of the stabilized extracellular fraction rather than that associated with viable microbial population (Knight and Dick, 2004). Nevertheless, other authors indicate that general soil microbial properties, including those involving C transformations, are not sensitive to detect the effects of glyphosate on soil microbial activity (Means et al., 2007).



**Fig. 1.** Enzyme activities for tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils. Mean values corresponding to four plots for each treatment are presented for dehydrogenase ( $\text{mg INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )  $\times$  10, o-diphenol oxidase ( $\text{mmol catechol } 10 \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1}$ )/1.5,  $\beta$ -glucosidase ( $\text{mg PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )/100, phosphatase ( $\text{mg PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )/100, urease ( $\text{mg NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) and arylsulphatase ( $\text{mg PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). For each enzyme activity, significant differences are indicated by different letters ( $P \leq 0.05$ ).

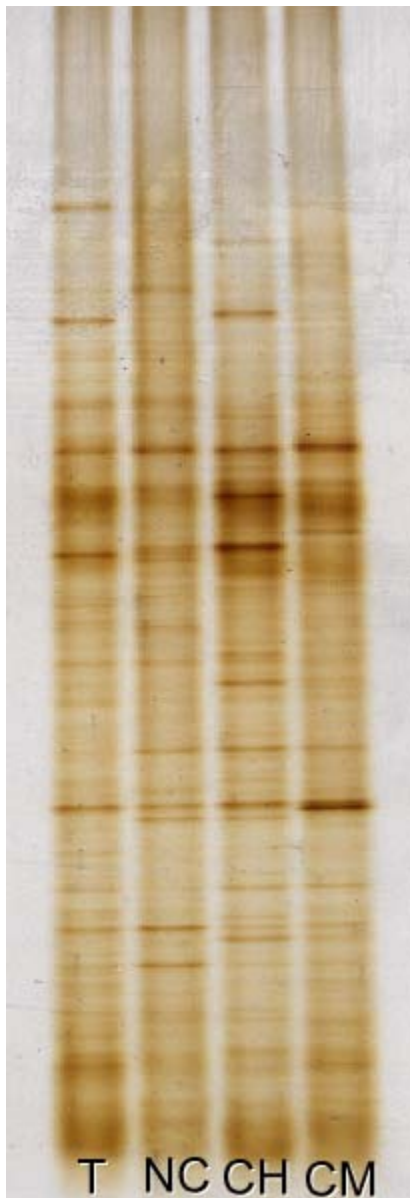
The results of our study seem to agree with the first hypothesis, since herbicides decreased the  $\beta$ -glucosidase activity and no changes in the overall microbial activity were detected. This last, estimated as dehydrogenase activity, only decreased when soils were permanently uncovered.

The o-diphenoloxidase, phosphatase, urease, and arylsulphatase activities showed similar patterns of behaviour, responding similarly to the management and land-use systems, i.e. significantly higher in covered soils, providing the evidence that cover crops increase the Sun-ray plots graphically show the enzyme activities set for uncovered and covered soils. In these diagrams, different patterns of enzyme activity are indicated by different shapes. The shapes showed different functional diversity, depending on the management. The ranking, from the higher to the lower in terms of functional diversity, was: CM > CH > T > NC. Evidence for the effect of the cover crops and the use of herbicides on soil microbiological parameters was widespread (Tu et al., 2006; Abraham and Chudek, 2008). Cover crop plus mechanical control of weeds characterized the soils with

the higher functional microbial diversity, which decreased when weeds were eliminated once a year with glyphosate. The latter finding disagrees with other experimental studies reporting increased soil-microbial activity due to herbicides (Araujo et al., 2003; Moreno et al., 2007). Our study reveals that the effect of the cover crop predominated over soil functional diversity. The absence of cover crops, due to mechanical or chemical weed suppression, decreased the soil functional diversity, the former more strongly than the latter.

#### 4.2. Bacterial population size and community structure

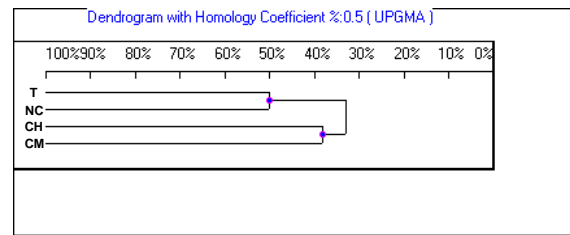
The use of glyphosate once a year did not affect the number of soil bacteria, in agreement with the findings of several authors (Haney et al., 2000; Lupwayi et al., 2009), while soils under cover crops presented the highest bacteria population, particularly under CH management. Nevertheless, uncovered soil management hardly reduced the bacterial biomass. Once more, the weight of cover crop management was higher than the use of herbicides when microbiological parameters were considered.



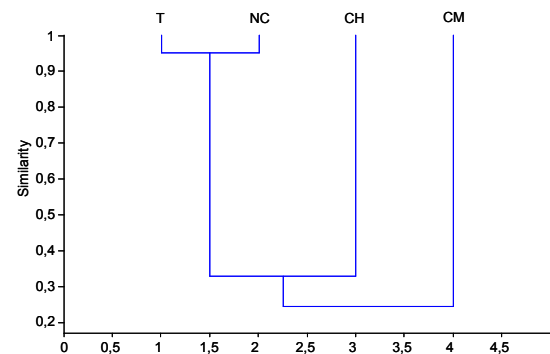
**Fig. 2.** DGGE profiles for tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils.

Bacterial DNA profiles provided by DGGE can be used as a semi-quantitative measure of bacterial diversity (Dilly et al. 2004). Although the real number of genotypes is surely underestimated, the patterns discerned in our study indicate that the structure and diversity of bacterial communities changed significantly with the soil management. The results indicated that presence/absence of cover crops was the main factor responsible for the differences in the soil-bacterial community structure. In fact, the cluster analysis (UPGMA, Nei and Li coefficient of similarity) of molecular banding patterns generated by PCR-DGGE discriminated the soils into two clear groups; covered and non-covered soils, within a range of similarity of 50%. The DGGE profiles evidenced a small number of strong signals and a large number of weak bands. This would imply that a limited number of dominant, ubiquitous, and ecologically well-adapted bacterial types, along with

a)



b)



	T	NC	CH	CM
T	1			
NC	0.94	1		
CH	0.65	0.008	1	
CM	0.58	0.04	0.12	1

**Fig. 3.** (a) Nei and Li's similarity coefficients (UPGMA dendrogram, tolerance 0.5%) and (b) Raup and Crick probability-based index of similarity cluster analyses, similarity values (SRC) between samples for DGGE profiles for tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils.

several equally abundant populations, were the common pattern of each soil (Crecchio et al., 2004).

The Shannon index of general diversity  $H'$  indicated that soils where any weed were eliminated with chemicals, permanently or once a year, exhibited the lowest and the highest bacterial diversity, respectively. On the other hand, no differences between T and CM bacterial diversity were observed. The last pattern has also been described by other authors when comparing organic from other land-management systems (conventional, continuous removal of vegetation, undisturbed lands), concluding that soils may exhibit similar bacterial diversity even though they differ in genetic composition (Wu et al., 2008). Therefore, the above assumptions must be considered carefully because most diversity indices do not reflect differences in species richness, species evenness, or simply sampling differences (Gotelli and Colwell, 2001). To test whether the similarities observed within and between samples were stronger or weaker than would be expected by chance, band-matching data was analysed using Raup and Crick's probability-based index of similarity SRC. Values of less than 0.05, which denotes differences among microbial communities and not random assortments of the same OTUs or bands (Rowan et al.,

2003; van der Gast et al., 2005), were found between NC and covered soils, but not between the first and T management. Again, the Raup and Crick cluster analyses grouped the non-covered soils, but, in this case, those covered did not cluster together. The results also indicated that soils under cover were phylogenetically distant from the rest.

It is well-known that bacterial community structure and diversity are strongly influenced by plant type (Greyston et al., 2001; Marschner et al., 2001), root zone effects (Yang and Crowley, 2000) and, particularly, by soil type (Girvan et al., 2003). In our study, these effects on community attributes were removed since similar cover crops and soils were investigated, and bulk soil instead of rhizosphere soil was examined.

## 5. Conclusions

In this study, four long-term approaches to olive-orchard management, categorized by the presence/absence of two main factors -cover crops and chemical weed control- were evaluated using biological indicators of soil quality.

Covered soils exhibited greater bacterial biomass and diversity, as well as higher microbial functional diversity than non-covered soils. The elimination of weeds with herbicides reduced the microbial functional diversity in covered soil but did not affect the other microbiological parameters, revealing that the effect of the cover crop predominated. When non-covered soil was considered, the lowest values of microbial activity and diversity were found when weeds were controlled with chemical methods.

Since these biological indicators are believed to be essential for the sustainability of low-input and organic-farming systems (Biederbeck et al., 2005), the results of this study reveal that covered soils are the best option when olive orchards are managed under rainfed conditions.

## Acknowledgements

This work has been financed by the Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía (Spain) through project CO-041 and by the Spanish Education and Science Ministry through project CGL2006-05437. We would also like to thank David Nesbitt for assisting in the translation of the original manuscript into English.

## References

- Abraham, J., Chudek, J.A., 2008. Studies on litter characterization using <sup>13</sup>C NMR and assessment of microbial activity in natural forest and plantation crops' (teak and rubber) soil ecosystems of Kerala, India. *Plant Soil* 303, 265-273.
- Araujo, A.S.F., Monteiro, R.T.R., Abarkeli, R.B., 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52, 799-804.
- Balkcom, K., Hartzog, D., Katsvairo, T., Smith, J.L., 2007. Yield and economics for peanut under two tillage systems and perennial grass vs. conventional rotation. In: Wright, D.L., Marois, J.J., Scanlon, K. (Eds.), *Proc. 29th Southern Conservation Agricultural Systems Conf.*, Quincy, Florida. 25-27 June. <http://www.ag.auburn.edu/auxiliary/nsdl/scasc/>
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernandez, T., Garcia, C., 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147, 159-171.
- Benitez, E., Melgar, R., Nogales, R., 2004. Estimating soil resilience to a toxic organic waste by measuring enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1615-1623.
- Benitez, E., Nogales, R., Campos, M., Ruano, F., 2006. Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Appl. Soil Ecol.* 32, 221-231.
- Biederbeck, V.O., Zentner, R.P., Campbell, C.A., 2005. Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1775-1784.
- Brussaard, L., Kuypers, T.W., Didden, W.A.M., de Goede, R.G.M., Bloem, J., 2004. Biological soil quality from biomass to biodiversity—importance and resilience to management stress and disturbance. In: Schjøning, P., Elmholt, S., Christensen, B.T. (Eds.), *Managing Soil Quality: challenges in Modern Agriculture*, CAB International, pp. 139-161.
- Carpenter-Boggs, C., Pikul Jr., J.L., Vigil, M.F., Riedell, W.E., 2000. Soil nitrogen mineralization influenced by rotation and N fertilization rate. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 2038-2045.
- Castro, J., Fernandez-Ondoño, E., Rodriguez, C., Lallena, A.M., Sierra, M., Aguilar, J., 2008. Effects of different olive-grove management Systems on the organic carbon and nitrogen content of the soil in Jaen (Spain). *Soil Till. Res.* 98, 56-67.
- Crecchio, C., Gelsomino, A., Ambrosoli, R., Minati, J.L., Ruggiero, P., 2004. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1873-1883.
- Dilly, O., Bloem, J., Vos, A., Munch, J.C., 2004. Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Appl. Environ. Microb.* 70, 468-474.
- Dilly, O., Blume, H.P., 1998. Indicators to assess sustainable land use with reference to soil microbiology. *Adv. GeoEcol.* 31, 121-128.
- Eitzinger, J., Utset, A., Trnka, M., Zalud, Z., Nikolaev, M., Uskov, I., 2008. Weather and climate and optimization of farm technologies at different input levels. In: Sivakumar, V. K., Motha, R.P. (Eds.), *Managing Weather and Climate Risks in Agriculture* Mannava, Springer, pp: 141-170.
- Flekens, L., Stroosnijder, L., 2007. Is soil erosion in olive groves as bad as often claimed? *Geoderma* 141, 260-271
- García, C., Hernandez, T., Costa, F., 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Commun. Soil Sci. Plan.* 28, 123-134.
- García-Ruiz, R., Ochoa, V., Hinojosa, M.B., Carreira, J.A. Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biol. Biochem.* (2008), doi:10.1016/j.soilbio.2008.03.023
- Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M., 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.
- Gotelli, N., Colwell, R.K., 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecol. Lett.* 4, 379-391.
- Greyston, S.J., Griffith, G.S., Mawdsley, C.D., Campbell, C.D., Bardgett, R.D., 2001. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 33, 533-551.
- Ha, K.V., Marschner, P., Bünemann, E.K., 2008. Dynamics of C, N, P and microbial community composition in particulate soil organic matter during residue decomposition. *Plant and Soil* 303, 253-264.

- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., Zuberer, D.A., 2000. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass, *Weed Sci.* 48, 89-93.
- Ibekwe, A.M., Grieve, C.M., 2004. Changes in developing plant microbial community structure as affected by contaminated water. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 239-248.
- Karlen, D.L., Ditzler, C.A., Andrews, S.S., 2003. Soil quality: why and how? *Geoderma* 114, 145-156.
- Knight, T.R., Dick, R.P., 2004. Differentiating microbial and stabilized  $\beta$ -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biol. Biochem.* 36, 2089-2096.
- Kremer, R.J., Li, J. 2003. Developing weed-suppressive soils through improved soil quality management. *Soil Till. Res.* 72, 193-202.
- Lupwayi, N.Z., Harker, K.N., Clayton, G.W., O'Donovan, J.T., Blackshaw, R.E., 2009. Soil microbial response to herbicides applied to glyphosate-resistant canola. *Agr. Ecosyst. Environ.* 129, 171-176.
- M.A.P.A., 1986. *Metodos oficiales de analisis. Tomo III. Plantas, productos organicos, fertilizantes, suelos, agua, fertilizantes organicos.* Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion, Madrid, 532 pp.
- Marschner, P., Yang, C.H., Lieberei, R., Crowley, D.E., 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1437-1445.
- Means, N.E., Kremer, R.J., Ramsier, C., 2007. Effects of glyphosate and foliar amendments on activity of microorganisms in the soybean rhizosphere. *J. Environ. Sci. Health, Part B* 42, 125-132.
- Moreno, B., Vivas, A., Nogales, R., Macci, C., Masciandaro, G., Benitez, E. Restoring Biochemical Activity and Bacterial Diversity in a Trichloroethylene-Contaminated Soil: The Reclamation Effect of Vermicomposted Olive Wastes. *Environ. Sci. Poll. Res. Int.* (2008) DOI 10.1007/s11356-008-0035-y
- Moreno, J.L., Aliaga, A., Navarro, S., Hernández, T., García, C., 2007. Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil. *Appl. Soil Ecol.* 35, 120-127.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- Nannipieri P, Greco S, Ceccanti B (1990) Ecological significance of the biological activity in soil. In: Bollag, J.M., Stozky, G. (Eds). *Soil biochemistry*, vol 6. Dekker, New York, pp 293-355.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Matarese, E., 1980. Extraction of phosphatase, urease, protease, organic carbon and nitrogen from soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44, 1011-1016.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.) *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Application.* Dekker Marcel, New York, pp. 1-33.
- Nei, M., Li, W., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *P. Natl. Acad. Sci. Usa* 76, 5269-5273.
- Pajaron, M., 2000. Valores agroecologicos de los sistemas agrarios actuales: el olivar. III Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica: Una alternativa para el mundo rural del tercer milenio. Valencia, 21 al 26 de Septiembre de 1988, pp. 17-30.
- Perucci, P., Casucci, C., Dumonet, D., 2000. An improved method to evaluate o-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1927-1933.
- Puglisi, E., Del Re, A.A.M., Rao, M.A., Gianfreda, L., 2006. Development and validation of numerical indexes integrating enzyme activities of soils. *Soil Biol. Biochem.*, 38, 1673-1681.
- Quian, H., Hu, B., Cao, D., Chen, W., Xu, X, Lu, Y., 2007. Bio-safety assessment of validamycin formulation on bacterial and fungal biomass in soil monitored by real-time PCR. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 78, 239-244.
- Raup, D., Crick, R.E., 1979. Measurement of faunal similarity in paleontology. *J. Paleontol.* 53, 1213-1227.
- Reinecke, A.J., Helling, B., Louw, K., Fourie, J., Reinecke, S.A., 2002. The impact of different herbicides and cover crops on soil biological activity in vineyards in the Western Cape, South Africa. *Pedobiologia* 46, 475-484.
- Rosolem, C.A., Foloni, J.S.S., Tiritan, C.S., 2002. Root growth and nutrient accumulation in cover crops as affected by soil compaction. *Soil Tillage Res.* 65, 109-115.
- Rowan, A.K., Snape, J.R., Fearnside, D., Barer, M.R., Curtis, T.P., Head, I.M., 2003. Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 195-206.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. *The Mathematical Theory of Communication* The University of Illinois Press, Urbana, Illinois.
- Sinsabaugh, R.L., Antibus, R.K., Linkins, A.E., 1991. An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agr. Ecosyst. Environ.* 34, 43-54.
- Sofo, A., Manfreda, S., Dichio, B., Fiorentino, M., Xiloyannis, C., 2007. The olive tree: a paradigm for drought tolerance in Mediterranean climates. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.*, 4, 2811-2835.
- Speir, T.W., Ross, D.J., 2002. Hydrolytic enzyme activities to assess soil degradation and recovery. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds), *Enzymes in the Environment – Activity, Ecology and Applications.* Marcel Dekker, New York, Basel, pp. 407-131.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969. Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1, 301-307.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1970. Arylsulphatase activity of soils, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 34, 225-229.
- Tu, C., Louws, F.J., Creamer, N.G., Mueller, J.P., Brownie, C., Fager, K., Bell, M., Hu, S., 2006. Responses of soil microbial biomass and N availability to transition strategies from conventional to organic farming systems. *Agr. Ecosyst. Environ.* 113, 206-215
- van der Gast, C.J., Lilley, A.K., Ager, D., Thompson, I.P., 2005. Island size and bacterial diversity in an archipelago of engineering machines. *Environ. Microbiol.* 7, 1220-1226
- Von Mersi, W., Schinner, F., 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodinitrotetrazolium chloride. *Biol Fert. Soil* 11, 216-220.
- Wu, T., Chellemi, D.O., Graham, J.M., Martin, K.J., Roskopf, E.N., 2008. Comparison of Soil Bacterial Communities Under Diverse Agricultural Land management and Crop Production Practices. *Microbiol Ecol.* 55, 293-310
- Yang, H., Crowley, D.E., 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 345-351.

## CAPÍTULO 2

---

**Bacterial  $\beta$ -glucosidase function and  
metabolic activity depend on soil  
management in semiarid rainfed agriculture**



## **Bacterial $\beta$ -glucosidase function and metabolic activity depend on soil management in semiarid rainfed agriculture**

### **Resumen**

Genómica y transcriptómica de suelos han sido utilizadas para establecer relaciones entre manejo agrícola de suelos y funciones bacterianas en un agroecosistema de olivar bajo clima semiárido. Para ello, se evaluaron cuatro sistemas de manejo establecidos hace 30 años en una parcela experimental. La respuesta de la comunidad bacteriana del suelo a condiciones de estrés relacionado con condiciones de sequía indicó un aumento de la actividad transcripcional de los genes 16S rRNA, especialmente en suelos sin cubierta vegetal. Este hecho podría indicar un mayor gasto energético bajo condiciones ambientales desfavorables. La relación entre el número de copias de genes 16S rRNA y genes transcritos confirmó esta hipótesis, indicando una mayor expresión constitutiva de operones rRNA en suelos sin cubierta, especialmente cuando la vegetación espontánea fue eliminada por métodos químicos. La transcripción potencial de genes  $\beta$ -glucosidasa no reveló la transcripción real de los mismos, observándose una mayor expresión de dicho gen en los suelos sin cubierta + herbicidas. Al no ser detectada relación entre el carbono orgánico total o soluble y la transcripción de genes  $\beta$ -glucosidasa, la afirmación anterior podría indicar que el carbono orgánico soluble no es la principal fuente de sustratos inductores de la enzima, o que la producción constitutiva de la enzima  $\beta$ -glucosidasa se incrementa cuanto más desfavorables sean las condiciones del suelo.

Este artículo está en revisión en la revista **Ecology and Evolution**





## Bacterial $\beta$ -glucosidase function and metabolic activity depend on soil management in semiarid rainfed agriculture

Rosa Cañizares, Beatriz Moreno & Emilio Benitez\*

Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín (EEZ), CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

### Keywords

$\beta$ -glucosidase  
ecosystem services  
genomics  
rainfed farming  
semiarid climate  
transcriptomics

### Correspondence

Emilio Benitez  
E-mail:  
emilio.benitez@eez.  
csic.es

### Abstract

Genomic and transcriptomic approaches were used to gain insights on the relationship between soil management and bacterial-mediated functions in an olive orchard agroecosystem. Four management practices were assessed in a 30-year trial in a semiarid Mediterranean region. Transcriptional activity of bacterial 16S rRNA genes increased in non covered soils, indicating higher microbial maintenance requirements to thrive in less favorable environmental conditions. The 16S rRNA transcript:gene copy ratio confirmed this assumption and pointed towards a much higher constitutive expression from rRNA operons in non covered soils and to even higher expression levels when spontaneous vegetation was removed chemically. As described for 16S rRNA, potential transcription did not reveal the real transcription of bacterial  $\beta$ -glucosidase genes, and higher gene expression in non covered soils + herbicides was evidenced. Since no relationship between total or soluble organic carbon and bacterial  $\beta$ -glucosidase transcription was found, the above hypothesis could indicate either that soluble organic carbon is not the main pool of enzyme-inducing substrates or that constitutive production of  $\beta$ -glucosidase enzymes increases as soil conditions worsen.

### Introduction

In rainfed agriculture, the management of spontaneous vegetation is often the only input of organic carbon into agricultural soils of the Mediterranean area. Low organic carbon pool, as a result of high mineralization rates and low biomass production during dry periods (Borken and Matzner, 2009), characterizes most of the agriculture soils of the southern Mediterranean region. The systematic use of tillage or agrochemicals under these climatic conditions intensifies soil organic carbon depletion (Masciandaro and Ceccanti, 1999; Evrendilek et al., 2004) and consequently soil physical, chemical, and biological processes (Benitez

et al., 2006; Gomez et al., 2009). In this scenario, the identification of practices to ensure sustainable management of soil resources is critical. The target should be to enhance soil resilience and to improve ecosystem services (Lal 2009). Because of their key role in many ecosystem functions (Singh et al., 2010), soil microorganisms form the basis of the ecosystems on which agriculture and food production depend. The response of the soil microbial community to different agriculture practices may therefore determine soil stability and sustainability, especially under fluctuating climatic

conditions and in fragile ecosystems, as in Mediterranean areas.

Dynamics and mineralization of organic carbon constitute one of the many microbial-mediated processes of vital importance in soils. Soil microorganisms play a central role in the global carbon cycle, participating in the sequestration of carbon in soil organic matter as well as in the release of carbon dioxide to the atmosphere. Therefore, to establish the relationship between soil management and microbial-mediated functions related to the carbon cycle is a complex task that is necessary in order to evaluate agricultural sustainability.

Molecular analyses help to determine various aspects of the microbial composition and its function in soils (Torvisk 2002). Genomic and transcriptomic approaches have provided information on the effect of management in relation to soil microbial structure and functions (Sofa et al., 2010; Hirsch et al., 2010).

In the present paper, molecular approaches are used to quantify both genetic potential and real transcription of soil bacterial ribosomal RNA and  $\beta$ -glucosidase genes with the aim of gaining insights concerning the response to the soil bacterial community after four long-term management practices in semiarid rainfed olive orchards.

## Material and methods

### Study area and soil sampling

Soil samples were collected in Jaen (south-eastern Spain). The main characteristics of the experiment and soils are described in detail in Castro et al. (2008) and Moreno et al. (2009). The study was conducted by designing a random-block of four treatments and four replicates (plots). Each plot consisted of 16 olive trees: the central four were controlled and the rest constituted guard rows. The treatments tested were:

-Tillage (T): 3–4 annual passes with a disk harrow (at 30 cm deep) and/or a cultivator in spring, followed by a tine harrow in summer.

Non-tillage and no-cover (NC): spontaneous vegetation was eliminated by applying the pre-emergence herbicides simazine and diuron in autumn. These had been replaced by oxyfluorfen for five years until the present. In the spring, glyphosate was applied locally.

Cover crop + herbicides (CH): weeds were left to grow each year to be eliminated in March with herbicides. Initially, diquat/ paraquat was used before being replaced at a later date by glyphosate.

-Cover crops + mower (CM): weeds were eliminated with various passes of a chain mower at the end of spring, usually when the plants had completed or almost completed their vegetative cycle.

Two samples were collected in the centre of each plot by a modified soil-sample ring kit (Eijkelkamp) which includes a cylinder of 20 cm (depth of sampling) specifically manufactured for this purpose and then bulked. The bryophyte layer was eliminated (when

present) in the CH and CM treatment and weeds were cut to ground level. For the isolation of nucleic acids, subsamples of fresh soil were immediately frozen in liquid nitrogen. The samples were stored at -80°C until molecular analyses were made.

### Chemical analysis

Soil organic carbon (SOC) was determined using the Walkley-Black wet dichromate oxidation method (M.A.P.A. 1986). Water-soluble carbon (WSC) was extracted and determined as described in Benitez et al. (1999).

### Nucleic acid isolation from soils and cDNA synthesis

For each soil-sample replicate, total DNA was separately extracted from four 1g subsamples by the bead-beating method, following the manufacturer's instructions for the MoBio UltraClean Soil DNA Isolation kit (MoBio laboratories, Solana Beach, CA, USA). The extracts were pooled and further concentrated at 35°C with a Savant Speedvac® concentrator to a final volume of 20  $\mu$ l.

Total RNA was extracted from four 2g subsamples of each replicate following the manufacturer's instructions MoBio RNA PowerSoil Total RNA Isolation kit (MoBio laboratories, Solana Beach, CA, USA). For the removal of residual DNA, DNase I enzyme was added using Roche RNase-Free DNase Set (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) following the manufacturer's instructions. The extracts were pooled and further concentrated at 35°C with a Savant Speedvac® concentrator to a final volume of 80  $\mu$ l. The cDNA was synthesised from 1-2  $\mu$ g of total RNA-DNase using Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). The synthesis reaction was carried out at 50°C for 30 min. The concentration and quality of the final DNA/RNA/cDNA samples were checked using Nanodrop® ND-100 spectrometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

### Real-Time PCR assays

Real-time PCR was performed to quantify 16S rRNA and  $\beta$ -glucosidase gene and transcript copy numbers both in soil DNA and in cDNA extracts. The 16S rRNA genes were determined with the universal primers for V3 hypervariable region of 16S rRNA eubacteria P1 and P2 (Muyzer et al., 1993) and the  $\beta$ -glucosidase gene copies were determined with a set of degenerated primers  $\beta$ gluF2/ $\beta$ gluR4 for conserved motifs of soil bacterial  $\beta$ -glucosidase genes (Cañizares et al., 2011). Each 2 $\mu$ l of PCR reaction contained 3-8 ng of the DNA or 70-230 ng of the cDNA, 400 nM of each primer and 10.5  $\mu$ l 2x IQ SYBER Green Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany). Both were amplified with the real-time PCR program previously described by Cañizares et al. (2011). Two different standard curves were generated using a recombinant plasmid containing one copy of the 16S

rRNA fragment and a plasmid recombinant containing one copy of  $\beta$ -glucosidase gene from soil bacteria. The curves were drawn according to Moreno et al. (2009). The relationship between Ct and the target gene copy number, and the copy numbers of the real-time standard were calculated as described Qian et al. (2007). Three real-time PCRs were carried out for each DNA/cDNA sample, with the threshold cycle (Ct) determined in triplicate. Both the 16S rRNA and  $\beta$ -glucosidase gene copy number and expression were quantified on an iQ5 thermocycler using iQ5-Cycler software (Bio-Rad, Munich, Germany).

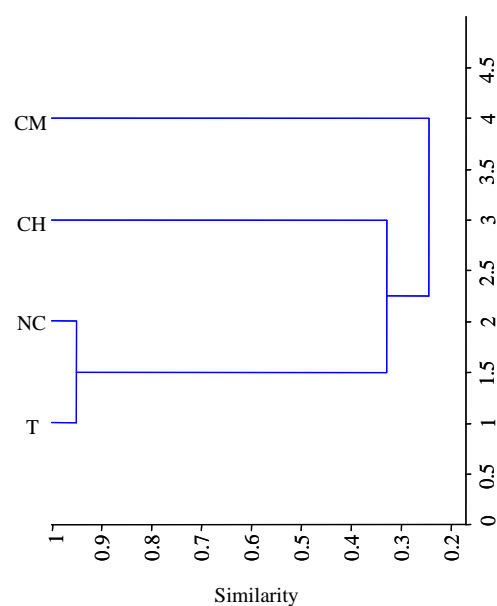
### Data analyses

Results are the means of 12 replicates (three per plot). The results were submitted to a factorial analysis of variance (ANOVA) using the program STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Post hoc Tukey's HSD tests in a one-way ANOVA were employed. P-values lower than 0.05 were considered evidence for statistical significance.

## Results and Discussion

In a previous paper, the authors reported that, after 30 years of the current experiment, the bacterial community structure and diversity are being strongly influenced by soil management (Fig. 1). The positive effects of cover crops on bacterial biomass were also evidenced (Moreno et al., 2009). However, it has been suggested that bacterial biomass should not be used as the only predictor of microbial activity when comparing soils with different community structures and levels of physiological stress, because of the influence of these factors on specific activity (Stromberger et al., 2011). To provide a valid description of metabolically active members of the soil-bacterial community, analyses of transcriptionally active genes are required (Girvan et al., 2003). In fact, a different trend was revealed when 16S rRNA transcripts were considered (Fig. 2). Covered soils displayed the lowest bacterial constitutive transcriptional activity, indicating a lack of relationship between soil bacterial activity and biomass, as previously reported for other soil conditions (Stromberger et al., 2011).

The ratio between 16S rRNA transcript to gene copies indicate a much higher constitutive expression from rRNA operons in soils without cover; even higher when weeds were eliminated by chemical methods (Table 1). It has been demonstrated that bacteria under environmental stress can maintain an elevated background pool of mRNA, providing an adaptation for rapid onset of degradation as soon as substrates again become available (Nicolaisen et al., 2008), but, why also of ribosomal RNA? This excess transcription capacity could indicate a risky metabolic expense under conditions of low nutrient availability and drought (Klappenbach et al., 2000).



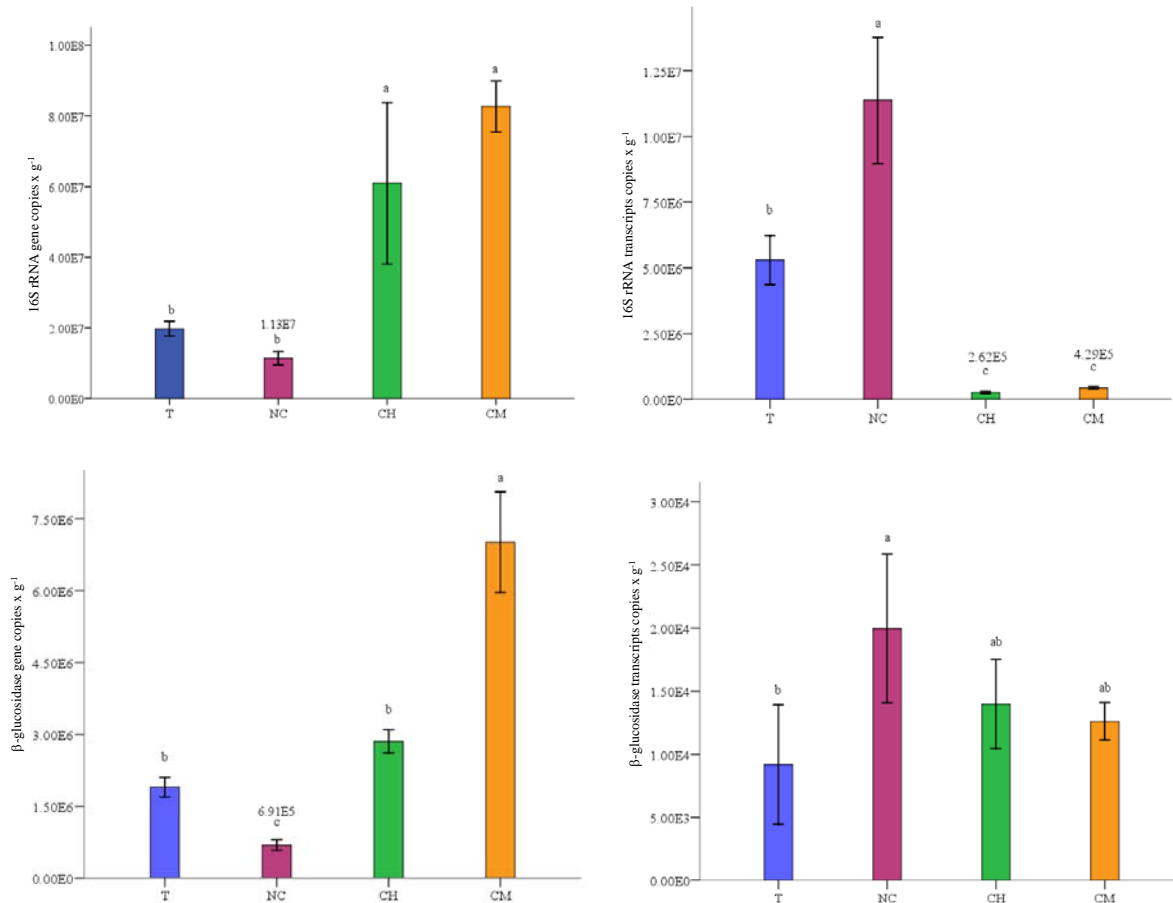
**Figure 1.** Raup and Crick probability-based index of similarity cluster analyses for DGGE profiles for tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils (adapted from Moreno et al., 2009)

**Table 1.** Soil Organic Carbon (SOC), Water Soluble Carbon (WSC) and ratios of transcript:gene copies in tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils.

	SOC (g kg <sup>-1</sup> )	WSC (μg g <sup>-1</sup> )	16S rRNA transcripts: gene	$\beta$ -glucosidase transcripts: gene
<b>T</b>	9.4 ± 3.1 a	31.3 ± 5.58 c	0.268	0.005
<b>NC</b>	4.6 ± 0.7 b	39.8 ± 6.48 c	1.002	0.029
<b>CH</b>	6.8 ± 3.2 ab	105 ± 16.5 a	0.005	0.005
<b>CM</b>	8.3 ± 2.0 a	72.6 ± 12.0 b	0.005	0.002

For each parameter, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post hoc)

Considering that the bulk of the ribosome pool is not required for protein synthesis (Fegatella et al., 1998), the continuous metabolic activity of bare-soil bacteria, even under unfavourable conditions, could suggest some mechanism of adapting to environmental stress. The ability of soil bacteria to acclimate to stress by changing their allocation resource and growth into survival has been previously reported (Schimel et al., 2007), and the high metabolic activity could therefore be a sign of the capacity of the bacterial community to respond to an ecosystem-level stressor (drought) under unfavourable soil conditions. Soils under cover crops + mower displayed the highest genetic potential to produce bacterial  $\beta$ -glucosidase enzyme (Fig. 2). Cover crops + herbicides and tillage managements shared the same number of gene copies, whereas the lowest values were detected in non covered + herbicides soils. As described above for 16S rRNA, the potential transcription did not reveal the real transcription of  $\beta$ -glucosidase genes. The ratio between  $\beta$ -glucosidase



**Figure 2.** Molecular estimates for tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils. Values are indicated when lower than the first y-chart. For each parameter, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post hoc)

transcripts to gene copies indicates higher expression in soils without cover + herbicides and similar levels for the rest of the treatments (Table 2). In addition, no relationship between available organic carbon (WSC, Table 1) and  $\beta$ -glucosidase transcription or expression was found, although  $\beta$ -glucosidase production is inducible in soils (Burns, 1982) and its activity depends on SOC and WSC availability (Pajares et al., 2011). This fact could indicate that constitutive production of  $\beta$ -glucosidase enzyme, aimed to detect the presence of a potential C substrate (Allison et al., 2011), increases as soil conditions worsen (lower organic matter content and higher metabolic expense), or maybe that WSC do not reflect the main pool of enzyme-inducing substrates.

The above assumptions could be strengthened by determining the in situ levels of  $\beta$ -glucosidase enzyme. Soil proteomics will undoubtedly help solve discrepancies in genetic potential and apparent functions associated with enzyme production, although many improvements are still needed (Nannipieri 2006; Cañizares et al., 2011).

### Acknowledgements

This work was supported by ERDF-cofinanced grant CGL2009-07907 from the Spanish Ministry of Science of

Innovation. R. Cañizares is supported by the JAE-CSIC predoctoral Program.

### References

- Allison, S.D., M.N. Weintraub, T.B. Gartner, and M.P. Waldrop. 2011. Evolutionary-Economic Principles as Regulators of Soil Enzyme Production and Ecosystem Function Soil Enzymology, in: Shukla, G., Varma, A. (Eds.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 229-243.
- Benitez, E., R. Nogales, C. Elvira, G. Masciandaro, and B. Ceccanti. 1999. Enzyme activities as indicators of the stabilization of sewage sludges composting with *Eisenia foetida*. *Bio. Technol.* 67: 297-303.
- Benitez, E., R. Nogales, M. Campos, and F. Ruano. 2006. Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Appl. Soil Ecol.* 32: 221-231.
- Borken, W., and E. Matzner. 2009. Reappraisal of drying and wetting effects on C and N mineralization and fluxes in soils. *Global Change Biol.* 15: 808-824.
- Cañizares, R., E. Benitez, and O.A. Ogunseitan. 2011. Molecular analyses of [beta]-glucosidase diversity and function in soil. *Eur. J. Soil Biol.* 47: 1-8.

- Castro, J., E. Fernández-Ondoño, C. Rodríguez, A.M. Lallena, M. Sierra, and J. Aguilar. 2008. Effects of different olive-grove management systems on the organic carbon and nitrogen content of the soil in Jaén (Spain). *Soil Till. Res.* 98: 56-67.
- Evrendilek, F., I. Celik, and S. Kilic. 2004. Changes in soil organic carbon and other physical soil properties along adjacent Mediterranean forest, grassland, and cropland ecosystems in Turkey. *J. of Arid Environ.* 59: 743-752.
- Fegatella, F., J. Lim, S. Kjelleberg, and R.Cavicchioli. 1998. Implications of rRNA Operon Copy Number and Ribosome Content in the Marine Oligotrophic Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4433-4438.
- Girvan, M.S., J. Bullimore, J.N. Pretty, A.M. Osborn, and A.S. Ball. 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.
- Gómez, J.A., S. Álvarez, and M.A. Soriano. 2009. Development of a soil degradation assessment tool for organic olive groves in southern Spain. *CATENA* 79: 9-17.
- Hirsch, P.R., T.H. Mauchline, and I.M. Clark. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biol. Biochem.* 42: 878-887.
- Klappenbach, J.A., J.M. Dunbar, and T.M. Schmidt. 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *App. Environ. Microbiol.* 66: 1328-1333.
- Lal, R., 2009. Laws of Sustainable Soil Management Sustainable Agriculture, in: Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Véronique, S., Alberola, C. (Eds.). Springer Netherlands, pp. 9-12.
- M.A.P.A. (1986) Métodos oficiales de análisis. Tomo III. Plantas, productos orgánicos, fertilizantes, suelos, agua, fertilizantes orgánicos. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Masciandaro, G., and B. Ceccanti. 1999. Assessing soil quality in different agro-ecosystems through biochemical and chemico-structural properties of humic substances. *Soil Till. Res.* 51: 129-137.
- Moreno, B., S.García-Rodríguez, R. Cañizares, J. Castro, and E. Benítez. 2009. Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agri. Ecos. Environ.* 131: 333-339.
- Muyzer, G., E.C. De Waal, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *App. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Nannipieri, P., 2006. Role of Stabilised Enzymes in Microbial Ecology and Enzyme Extraction from Soil with Potential Applications in Soil Proteomics, in: Nannipieri, P., Smalla, K. (Eds.), *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 75-94.
- Nicolaisen, M.H., J. Bælum, C.S. Jacobsen, and J. Sørensen. 2008. Transcription dynamics of the functional *tfdA* gene during MCPA herbicide degradation by *Cupriavidus necator* AEO106 (pRO101) in agricultural soil. *Environ. Microbiol.* 10: 571-579.
- Pajares, S., J.F. Gallardo, G. Masciandaro, B. Ceccanti, and J.D. Etchevers. 2011. Enzyme activity as an indicator of soil quality changes in degraded cultivated Acrisols in the Mexican Trans-volcanic Belt. *Land Degrad. Dev.* 22, 373-381.
- Qian, H., B. Hu, D. Cao, W. Chen, X. Xu, and Y. Lu. 2007. Bio-safety assessment of validamycin formulation on bacterial and fungal biomass in soil monitored by real-time PCR. *Bulletin Environ. Cont. Toxicol.* 78: 239-244.
- Schimel, J., T.C. Balser, and M. Wallenstein. 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* 88: 1386-1394.
- Singh, B.K., R.D. Bardgett, P. Smith, and D.S. Reay. 2010. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nat. Rev. Micro.* 8: 779-790.
- Sofo, A., Palese, A.M., Casacchia, T., Celano, G., Ricciuti, P., Curci, M., Crecchio, C., and C. Xiloyannis. 2010. Genetic, Functional, and Metabolic Responses of Soil Microbiota in a Sustainable Olive Orchard. *Soil Science* 175: 81-88.
- Stromberger, M.E., Z. Shah, and D.G Westfall. 2011. High specific activity in low microbial biomass soils across a no-till evapotranspiration gradient in Colorado. *Soil Biol. Biochem.* 43: 97-105.
- Torsvik, V., and L. Øvreås. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5: 240-245.



## **CAPÍTULO 3**

---

# **Transcriptional response of soil bacteria to land management in a highly vulnerable agroecosystem**





## **Transcriptional response of soil bacteria to land management in a highly vulnerable agroecosystem.**

### **Resumen**

Los agroecosistemas mediterráneos son especialmente vulnerables al cambio climático, por lo que las alteraciones en las funciones de los ecosistemas deben ser previstas mediante metodologías adecuadas. En el presente trabajo, se ha realizado una evaluación biológica integral de suelos bajo diferentes prácticas agrícolas a largo plazo en condiciones semiáridas, laboreo vs. suelos con cubierta vegetal, mediante el uso de aproximaciones bioquímicas, genómicas y transcriptómicas. La actividad bacteriana  $\beta$ -glucosidasa ha sido evaluada *in situ* mediante la cuantificación de la expresión de los genes funcionales que codifican la enzima  $\beta$ -glucosidasa, una enzima clave en el ciclo del carbono del suelo. Se determinó la abundancia y diversidad de genes del 16S rRNA potenciales y transcritos mediante análisis basados en la electroforesis en geles de g radiante desnaturizante (DGGE) tanto con ADN como con ARN. Los resultados mostraron una sobreexpresión de los genes bacterianos  $\beta$ -glucosidasa y ribosomales ARN en los suelos bajo laboreo. Este hecho no fue indicativo de un mayor tamaño de la población bacteriana, pero probablemente sí de la adaptación de la comunidad bacteriana a situaciones ambientales de estrés. Como consecuencia, podría intuirse el efecto positivo que ejerce la cubierta de vegetación espontánea, donde la actividad metabólica bacteriana fue menor proporcionando mayor estabilidad biológica del suelo. Este trabajo supone una contribución al establecimiento de indicadores apropiados para la evaluación del impacto que ejercen los distintos usos del suelo sobre las funciones bacterianas del ecosistema. La actividad bacteriana  $\beta$ -glucosidasa ha sido evaluada por primera vez *in situ* mediante la cuantificación de la expresión de los genes funcionales que codifican la enzima  $\beta$ -glucosidasa en el suelo. El presente estudio señala la importancia de los métodos basados en el ARN, ya que proporcionan información más precisa que la basada en el ADN u otros métodos bioquímicos tradicionales.

Este artículo está en revisión en la revista **Biology & Fertility of Soil**



# Transcriptional response of soil bacteria to land management in a highly vulnerable agroecosystem

Rosa Cañizares · Beatriz Moreno · Emilio Benitez\*

## Abstract

Mediterranean agroecosystems are particularly vulnerable to global change, and alterations in ecosystem services need to be predicted using appropriate approaches. In the present work, we perform an integrated biological assessment of soils under different long-term management practices –tillage vs. covered soils– under semiarid conditions by using a complementary soil biochemical, genomic, and transcriptomic approach. *In situ* bacterial  $\beta$ -glucosidase activity has been assessed by quantifying the expression of the functional genes that encode the  $\beta$ -glucosidase enzyme, a key enzyme involved in soil-carbon cycle. The abundance and diversity of 16S rRNA genes and transcripts and DNA and RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis were also carried out. The results evidenced overexpression of bacterial  $\beta$ -glucosidase and ribosomal RNA genes in tillage soils. This fact was not an indication of higher bacterial population size but probably of the bacterial community response to an ecosystem-level stressor in less favorable conditions. Consequence of this assumption would be the positive effect of spontaneous cover crops on soil biological stability, where bacterial metabolic expense was much lower. This paper contributes to the ongoing debate over the appropriate indicators to assess the impact of land use on microbial-based ecosystem services. *In situ* bacterial  $\beta$ -glucosidase activity has been assessed for the first time by quantifying the expression of the functional genes that encode the  $\beta$ -glucosidase enzyme in soil. Our work points towards RNA-based methods providing more constructive information than that of DNA-based ones, or other traditional biochemical methods.

**Keywords:** agroecosystem functioning; genomics; semiarid climate; soil enzymes; transcriptomics; vulnerable ecosystems

## Introduction

Semiarid lands in southern Mediterranean countries are especially susceptible to degradation (WMO 2005). Adverse climatic conditions, long periods of land exploitation and relatively high ratio of population to soil-production capacity are characteristic of the Mediterranean area, making these ecosystems among the most vulnerable in Europe (Metzger et al. 2006). In this area, climate change constitutes an additional pressure increasing vulnerability as a result of a decreasing supply of ecosystem services (Schröter et al. 2005).

A fundamental element in vast areas of the Mediterranean Basin is the olive orchard (Pajaron 2000), where the olive agro-industry is economically vital. This is particularly true in southern Spain, providing employment to more than 32% of the labour force in the agricultural sector and generating around 2,000,000,000 € per annum. Land degradation and consequently desertification are therefore the main risks in terms of environmental and food security in this area.

Soil productivity and quality in fragile ecosystems are directly related to the amount and quality of the organic carbon in the root zone (Lal 2011). Most soils in Mediterranean olive orchards contain a low organic carbon pool, directly related to high mineralization rate in semiarid climate regimes and low biomass-production rates during dry periods (Borken and Matzner 2009). Furthermore, management of the spontaneous vegetation is often the only input of biomass C in rainfed olive orchards (Castro et al. 2008; Moreno et al. 2009a). In this scenario, to maintain bare soils by such management techniques as frequent tillage could exacerbate soil degradation (Gomez et al. 2009), affecting farmer security as well as economic and social stability. From this perspective, the Common Agricultural Policy (CAP) called for mitigation practices in agriculture to reduce vulnerability to climate change and greenhouse-gas emissions (European Commission resolution on the CAP “Health Check”, European Council 2008). Recently, Medina and Iglesias (2010) estimated the mitigation potential of different farming practices in olive orchards with respect to climate change. The authors

\*Correspondence author. E-mail: [emilio.benitez@eez.csic.es](mailto:emilio.benitez@eez.csic.es)

conclude that the maintenance of spontaneous vegetation have excellent mitigation potential.

In this context, understanding the response of agroecosystems to management practices is vital. Microbial parameters appear useful in monitoring ecosystem response to management practices, environmental stress, and climate change because of their key role in most ecosystem services (Hirsch et al. 2010). There is overwhelming evidence for the crucial role of soil-enzyme activities in several soil biological activities as well as of their rapid response to changes in soil-management practices. Because these techniques do not measure actual field activities but potential activity under ideal conditions, DNA- and RNA-based techniques have been proposed as complementary. In fact, in recent years great advances have been achieved in analysing the soil microbial community using molecular methods. Studies on soil microbial diversity or those concerning the environmental effects on soil microbial communities pointing towards soil DNA and RNA are widespread. The trend is to combine DNA and RNA approaches to gain insight into the functional community structure. Whereas DNA analysis gives information on community structure corresponding to species presence and abundance (McCaig et al. 2001), RNA analysis provides access to the transcriptional state of the microbial community (Sofa et al. 2010). However, studies on soil genetic potential/function relationships are still in the early stages (Reeve et al. 2010). Soil proteomics will surely help solve discrepancies in genetic potential and apparent functions associated with enzyme production, but at the moment, improvements are still needed for the study of soil proteins under natural *in situ* conditions (Allison et al. 2007; Cañizares et al. 2011). Meanwhile, the old principle of macromolecular biosynthesis in bacteria -the speed of protein synthesis (translation) matches that of messenger RNA (mRNA) synthesis (transcription)- could be useful to discern actual rates of microbial-based ecosystem services.

The goal of the present study was to elucidate the response of soil bacterial community to changes in land management in a highly vulnerable -and economically vital- agroecosystem in a climate change scenario. A complementary soil biochemical, genomic, and transcriptomic approach has been developed with the aim of determining the most effective methods to use. For this, the abundance and diversity of 16S rRNA genes and transcripts as well as the transcriptional activity of bacterial genes encoding  $\beta$ -glucosidase, a key enzyme involved in soil carbon storage and sequestration, have been determined in soils under different long-term management practices, together with the activity of some soil enzymes by traditional techniques.

## Materials and methods

### Study site and soil sampling

Soil samples were taken in long-term field trials in Jaen (south-eastern Spain). At this site, an experiment designed to test the impact of different soil-management systems on olive production began in 1976 and continues to date. The main characteristics of the experiment are fully described in Castro et al. (2008) and Moreno et al. (2009a). The average annual rainfall for the area is 557 mm, the soil has been classified as an Anthropic Regosol (FAO, 1998), and the orchard consisted of unirrigated adult olive trees planted in a pattern of 11 m  $\times$  11 m. The study was designed as a random complete block with two treatments and four plots per treatment. Each plot consisted of 16 olive trees: the central four were controlled and the rest constituted guard rows. The treatments tested were:

-- Tillage (T): 3–4 annual passes with a disk harrow (at 30 cm deep) and/or a cultivator in spring, followed by a tine harrow in summer.

-- Spontaneous cover crops + mower (CM): spontaneous vegetation (wild flora) was controlled with various passes of a chain mower at the end of spring, usually when the plants had completed or almost completed their vegetative cycle.

Soil samples were taken with a modified soil-sample ring kit (Eijkelkamp) which includes a cylinder of 20 cm specifically manufactured for this purpose. The bryophyte layer was eliminated (when present) in the CM treatment and all weeds were cut to ground level. Two samples were collected in the centre of each plot at depths 0-2, 2-5, 5-10, and 10-20 cm and then bulked to give three subsamples per plot and depth. For the isolation of nucleic acids, subsamples of fresh soil were immediately frozen in liquid nitrogen. Soil samples were transported in ice-cooled boxes and subsequently passed through a 2-mm sieve and visible plant debris were removed. The samples were stored at 4°C and -80°C until biochemical and molecular analyses were made.

### Soil organic carbon and enzyme activities

Soil organic carbon (SOC) was determined using the Walkley-Black wet dichromate oxidation method (M.A.P.A. 1986). Water-soluble carbon (WSC) was extracted and determined as described in Benitez et al. (1999). Activities of dehydrogenase,  $\beta$ -glucosidase, phosphatase, arylsulphatase, and urease enzymes were determined as described in Moreno *et al.* (2009a).

### Nucleic acid isolation from soils and cDNA synthesis

For each soil-sample replicate, total DNA was separately extracted from five 0.5 g subsamples by the bead-beating method, following the manufacture's instructions for the MoBio UltraClean Soil DNA Isolation kit (MoBio laboratories, Solana Beach, CA, USA) with the modifications reported by Moreno *et al.* (2009a) to remove trace concentrations of PCR inhibitor. The extracts were pooled and further concentrated at 35°C with a Savant Speedvac® concentrator to a final volume of 20  $\mu$ l.

The total RNA was extracted from four 2-g subsamples of each replicate following the manufacturer's instructions MoBio RNA PowerSoil Total RNA Isolation kit (MoBio laboratories, Solana Beach, CA, USA). To remove residual DNA, DNase I enzyme was added using Roche RNase-Free DNase Set (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) following the manufacturer's instructions. The extracts were pooled and further concentrated at 35°C with a Savant Speedvac® concentrator to a final volume of 80 µl.

The cDNA was synthesised from 4.5 µg of total RNA-DNase using Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). The synthesis reaction was carried out at 50°C for 30 min.

The concentration and quality of the final DNA/RNA/cDNA samples were checked using Nanodrop® ND-100 spectrometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

#### Testing specificity of βgluF2/βgluR4 primers

To quantify the β-glucosidase gene-copy number in soil-DNA and cDNA extracts, the set of degenerated primers βgluF<sub>2</sub>/βgluR<sub>4</sub> for conserved motifs of soil bacterial β-glucosidase genes developed in Cañizares et al. (2011) were used. To determine whether the primers were specific for amplification and detection of β-glucosidase genes and transcripts in the soils used in the experiment, two different strategies were carried out: (1) qualitative PCR of DNA extracted from pure cultures of soil bacteria and, (2) preparation of a β-glucosidase gene clone library after PCR-DGGE of soil DNA samples.

(1) DNA was extracted from pure cultures of six different soil bacteria selected as representatives of different groups with the genomic DNA isolation kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (Zymo Research, CA, USA) from 5 ml of overnight Luria broth culture grown at 28°C according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration was determined on a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Inc., DE, USA). PCR was carried out to amplify a 219 bp region with βgluF<sub>2</sub>/R<sub>4</sub> primers as described Cañizares et al (2011). The amplified DNA was analyzed on 2% (w/v) agarose gel and the DNA of the resulting fragment was recovered from the gel matrix using the QiaEx II Extraction kit (Qiagen; Hilden, Germany), cloned and subsequently sequenced in both directions by using an automatic DNA sequencer (ABI-PRISM 310; Applied Biosystems, Inc.). Sequences longer than 200 bp were filed under GenBank accession numbers JN817696-770. DNA sequences were translated to their corresponding amino acid sequences and comparison was performed using the BLAST program and the GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequence matches were

considered to be significant for score > 50% (Newman et al. 1994).

(2) To perform the PCR-DGGE based community analysis, GC-βgluF<sub>2</sub> and βgluR<sub>4</sub> primers were used. Primer GC-βgluF<sub>2</sub> contained the same sequence as βgluF<sub>2</sub> but with an additional 40-nucleotide GC-rich sequence (GC clamp) at its 5' end. The PCR program was performed as described by Cañizares et al. (2011). Total DNA was extracted and concentrated as described above. For the DGGE analyses, 600 ng of purified PCR product was loaded into a 40-65% urea-formamide-polyacrylamide gel. An INGENYphorU System (Ingeny International BV, Netherlands) was run at 75V for 17 h at 58°C to separate the fragments. Gels were silver stained with the Bio-Rad Silver Stain according to the standard DNA-staining protocol and photographed under UV light (λ= 254 nm) using an UVitec Gel Documentation system (UVitec Limited, Cambridge, UK). Representatives of bands that were clear and had high intensity were excised from DGGE gels. DNA fragments from DGGE were isolated as described by Schweiger and Tebbe (1998) and modified by Vivas et al. (2009). This DNA isolated was checked for concentration and quality using a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. PCR was conducted using primers βgluF<sub>2</sub>/R<sub>4</sub> with 1 to 4 µl of this solution (5 to 10 ng for reaction). Thereafter, PCR fragments were purified by MBL-Agarosa Quickclean (Dominion-MBL SL, Spain), cloned, and subsequently sequenced in both directions by an automatic DNA sequencer (ABI-PRISM 310; Applied Biosystems, Inc.). Sequences longer than 200 bp were filed under GenBank accession numbers JN817686-695. Sequence identifications were performed using the BLASTX program and the GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequence matches were considered to be significant for score > 50% (Newman et al. 1994).

#### Quantitative real time PCR assays

Quantitative real time PCR (qPCR) was performed to quantify the bacterial biomass and the β-glucosidase gene-copy number in soil-DNA and cDNA extracts. The bacterial biomass and the β-glucosidase gene copies were determined with the universal primers for V3 hypervariable region of 16S rRNA eubacteria P1 and P2 (Muyzer et al. 1993) and the set of degenerated primers βgluF<sub>2</sub>/βgluR<sub>4</sub> for conserved motifs of soil bacterial β-glucosidase genes (Cañizares et al. 2011), respectively. Each 21 µl of PCR reaction contained 4-8 ng of the DNA or 50-450 ng of the /cDNA, 400 nM of each primer and 10.5 µl 2x IQ SYBER Green Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany). Both were amplified with the real-time PCR program previously described by Cañizares et al. (2011).

Two different standard curves were generated using a recombinant plasmid containing one copy of the 16S rRNA fragment and a plasmid recombinant containing one copy of β-glucosidase gene from soil bacteria. The curves

were drawn according to Moreno et al. (2009a). The relationship between Ct and the target gene copy number, and the copy numbers of the real-time standard were calculated as described Quian et al. (2007).

To estimate  $\beta$ -glucosidase gene expression, cDNA templates from the different organic samples were amplified with the set of degenerated primers  $\beta$ gluF<sub>2</sub>/ $\beta$ gluR<sub>4</sub>, and the universal primers for V3 hypervariable region of 16S rRNA eubacteria P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> were used as housekeeping genes. The real-time PCR program was run as described above. To guarantee the lack of nonspecific primer dimers, reactions with no cDNA were conducted as controls. The relative changes in  $\beta$ -glucosidase gene expression between the depths of each treatment were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method (Livak and Schmittgen 2001). Normalized  $\beta$ -glucosidase amount was expressed relative to depths with higher C<sub>T</sub>.

Three real-time PCRs were carried out for each DNA/cDNA sample, with the threshold cycle (Ct) determined in triplicate. Both the gene-copy number and the  $\beta$ -glucosidase gene expression were quantified on an iQ5 thermocycler using iQ5-Cycler software (Bio-Rad, Munich, Germany).

### PCR-DGGE analyses

Denaturing gradient gel electrophoresis-PCR was performed using the 16S rRNA gene universal bacterial primers P2 and P3 to amplify the V3 hypervariable region of 16S rRNA genes (Muyzer et al. 1993). The DNA/cDNA samples were amplified following Muyzer et al. (1993) with the modifications described in Moreno et al. (2009b).

For the DGGE analyses, 300 ng of purified PCR product was loaded into a 40–65% urea–formamide–polyacrylamide gel. An INGENYphorU System (Ingeny International BV, Netherlands) was run at 75V for 17 h at 58°C to separate the fragments. Gels were silver stained with the Bio-Rad Silver Stain according to the standard DNA-staining protocol and photographed under UV light ( $\lambda = 254$  nm) using an UVitec Gel Documentation system (UVitec Limited, Cambridge, UK).

### Data analyses

Results are the means of 12 replicates (three per plot). The results were submitted to a analysis of variance (ANOVA) and post-hoc Tukey's HSD tests using the program STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). *P*-values lower than 0.05 were considered evidence for statistical significance.

Bacterial 16S rRNA gene or transcripts PCR-DGGE band patterns in different lanes were compared with the UVImapAnalysis software (UVitec Limited, Cambridge, UK). DGGE banding data were used to estimate the Raup and Crick's probability-based similarity index ( $S_{RC}$ ). For

this analysis, each DGGE band was considered an individual operational taxonomic unit (OTU) and presumed to represent the ability of that bacterial species to be amplified (Ibekwe et al. 2004) while band intensity was expressed as peak heights in the densitometric curve. The Raup and Crick's probability method was used to test whether similarities within and between samples were stronger or weaker than expected by chance. For this, band-matching data was stored as a binary matrix and analysed using the probability-based index of Raup and Crick (1979). The  $S_{RC}$  is the probability that the randomized similarity would be greater than or equal to the observed similarity, and  $S_{RC}$  values above 0.95 or below 0.05 signify similarity or dissimilarity, respectively, which are not random assortments of the same species (bands or OTUs) (Rowan et al. 2003.) The  $S_{RC}$  and cluster analyses were calculated using the PAST (Paleontological Statistics, version 1.82b) program (Hammer et al. 2001).

## Results

### Soil organic carbon and enzyme activities

Soil organic carbon (SOC) and water soluble carbon (WSC) levels are showed in Table 3. SOC in the CM top layer was significantly different from the rest. Levels of WSC were higher in the top 5 cm of the CM soils, especially in the first 2 cm.

No effect of depth or management was detected on dehydrogenase activity (Fig. 1). Depth affected the activity of hydrolytic enzymes ( $\beta$ -glucosidase, phosphatase, urease, and arylsulphatase) only in CM treatment, where only in the top 2 cm were detected significant higher values ( $P < 0.05$ ) than in the rest of soil layers.

### Testing specificity of $\beta$ gluF<sub>2</sub>/ $\beta$ gluR<sub>4</sub> primers

The set of degenerate primers used to amplify DNA extracted from six bacterial strains was effective for amplification of target sequences. Table 1 shows the amino acid sequence identities of the  $\beta$ -glucosidase genes. All sequence matches were higher than 50%. The identity of deduced amino acid sequences ranged from 51% to 98%.

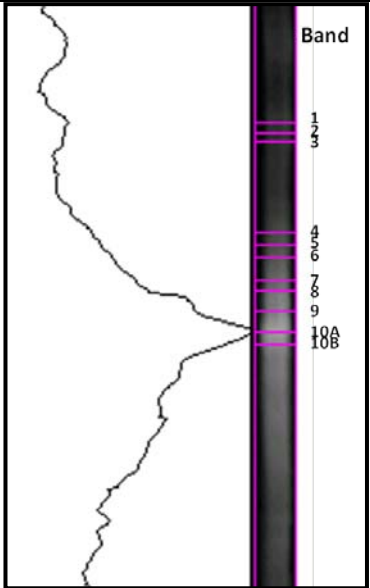
The PCR-DGGE based community analysis showed that the 100% of the sequenced clones showed significant (score >50%) similarities with  $\beta$ -glucosidase genes (Table 2). Most of the DGGE bands matched the same database entry with about 50% amino acid identity, probably indicating that the retrieved sequences represent taxa for which no  $\beta$ -glucosidase gene are still available. Nevertheless, it could be also a sign of the low quality of the sequences because short amplicons (200 bp) were retrieved. This is an inherent bias of the method since a successful determination by qPCR requires an amplicon size of about 100 bp to ensure the efficiency of *Taq* polymerase processivity (Cui et al. 2007).

**Table 1** Bacterial strains used to test specificity of primers

Species / Class	GenBank entry	Closest similarity to species in the databank		
		Species / Class	Max. Score	% amino acid identity
Microbacterium sp. / Actinobacteria	JN817696	Alteromonas sp. SN ( <a href="#">YP_004469298.1</a> ) / $\gamma$ -Proteobacteria	72.4	53
Sphingomonas sp. / $\gamma$ -Proteobacteria	JN817697	Alteromonas sp. SN2 ( <a href="#">YP_004469298.1</a> ) / $\gamma$ -Proteobacteria	65.9	51
Flavobacterium sp. / Bacteroidetes	JN817698	Sphingomonas sp. 2 ( <a href="#">ADY18331.1</a> ) / $\alpha$ -Proteobacteria	82.8	59
Variovorax sp. / $\beta$ -Proteobacteria	JN817699	Alteromonas sp. SN2 ( <a href="#">YP_004469298.1</a> ) / $\gamma$ -Proteobacteria	69.3	53
Burkholderia xenovorans / $\beta$ -Proteobacteria	*	Burkholderia xenovorans LB400 ( <a href="#">YP_553253.1</a> ) / $\beta$ -Proteobacteria	135	98
Pseudomonas sp. / $\gamma$ -Proteobacteria	JN817670	Alteromonas sp. SN2 ( <a href="#">YP_004469298.1</a> ) / $\gamma$ -Proteobacteria	70.5	51

\*see supporting information file

**Table 2** Nearest match identification of DGGE bands. The 100 % of clone sequenced showed homology with  $\beta$ -glucosidase gene.

	GenBank entry	Band	Species	Class	Max.Score	% amino acid identity
	JN817686	1	Roseiflexus castenholzii DSM 13941 ( <a href="#">YP_001430669.1</a> )	Chloroflexi	65.9	51
	JN817687	2	Alteromonas sp. SN2 ( <a href="#">YP_004469298.1</a> )	$\gamma$ -Proteobacteria	72.8	53
	JN817688	3	Alteromonas sp. SN2 ( <a href="#">YP_004469298.1</a> )	$\gamma$ -Proteobacteria	68.9	51
	JN817689	4	Alteromonas sp. SN2 ( <a href="#">YP_004469298.1</a> )	$\gamma$ -Proteobacteria	70.9	54
	*	5	Alteromonas sp. SN2 ( <a href="#">YP_004469298.1</a> )	$\gamma$ -Proteobacteria	69.3	53
	JN817690	6	Alteromonas sp. SN2 ( <a href="#">YP_004469298.1</a> )	$\gamma$ -Proteobacteria	70.5	53
	JN817691	7	Alteromonas sp. SN2 ( <a href="#">YP_004469298.1</a> )	$\gamma$ -Proteobacteria	74.3	52
	JN817692	8	Roseiflexus sp. RS-1 ( <a href="#">YP_001277919.1</a> )	Chloroflexi	69.7	53
	JN817693	9	Alteromonas sp. SN2 ( <a href="#">YP_004469298.1</a> )	$\gamma$ -Proteobacteria	71.2	54
	JN817694	10A	Sphingomonas sp. 2F2 ( <a href="#">ADY18331.1</a> )	$\gamma$ -Proteobacteria	79.3	56
	JN817695	10B	Clostridium Cellulovorans ( <a href="#">3AHX_A</a> )	Firmicutes	68.2	50

\*see supporting information file



**Table 3.** Soil Organic Carbon (SOC) and Water Soluble Carbon (WSC) in tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils. For each parameter, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc).

	SOC (%)	WSC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
T <sub>0-2</sub>	1.21 ± 0.16 b	42.3 ± 3.28 c
T <sub>2-5</sub>	1.08 ± 0.15 b	12.1 ± 1.35 d
T <sub>5-10</sub>	0.96 ± 0.13 b	12.4 ± 4.65 d
T <sub>10-20</sub>	0.84 ± 0.11 b	24.9 ± 3.16 cd
CM <sub>0-2</sub>	3.50 ± 0.55 a	235 ± 8.97 a
CM <sub>2-5</sub>	0.82 ± 0.11 b	101 ± 5.22 b
CM <sub>5-10</sub>	0.58 ± 0.11 b	48.1 ± 0.98 c
CM <sub>10-20</sub>	0.43 ± 0.06 b	18.6 ± 1.04 d

Real-time PCR assays and  $\beta$ -glucosidase gene expression

A real-time PCR standard curve was generated for bacterial 16S rRNA quantification. Serially diluted DNA originating from recombinant plasmids including the 16S rRNA fragment showed the single expected amplicon of approximately 157 bp (primer sequences excluded). The equation describing the relationship between Ct and the log number of 16S rRNA copies was  $Ct = -3,148 \times \log(16S \text{ rRNA}) + 35,830$ ,  $R^2 = 0,997$ . Target molecules were linear from  $10^4$  to  $10^9$  copies. A significant interaction between soil depth and management techniques was detected for the 16S rRNA gene-copy number ( $P < 0.05$ ). As detected for hydrolytic enzymes (Fig. 1), the median density of bacterial copies per gram was significantly higher only in the top 2 cm of soils under spontaneous vegetation (Fig 2).

Two oligonucleotide primers ( $\beta$ -gluF2 and  $\beta$ -gluR4) were used to detect and amplify sequences homologous to  $\beta$ -glucosidase encoding genes in soil. The primers were used for real-time PCR-targeting DNA templates extracted from soil. Agarose gel electrophoresis was carried out to confirm the specific PCR product, resulting in a single band of the expected size, approximately 180 bp (primer sequences excluded). A real-time PCR standard curve was generated for  $\beta$ -glucosidase gene quantification. The equation describing the relationship between Ct and the log number of  $\beta$ -glucosidase gene copies was  $Ct = -3,542 \times \log(\beta\text{-glucosidase}) + 40,849$ ,  $R^2 = 0,999$ . Target molecules were linear from  $10^5$  to  $10^9$  copies.  $\beta$ -glucosidase gene copies were consistently higher in the top 2 cm in both T and CM treatments (Fig 2), with a concomitant main effect of soil depth and a significant interaction between the main factors ( $P < 0.05$ ).

The 16S rRNA transcript copy numbers were significantly lower in soil under spontaneous cover crops, with no appreciable effect of soil depth (Fig. 2). The trend was the opposite in tillage soils, evidencing a consistent effect of depth through the ploughed layer. The number of  $\beta$ -glucosidase transcript copies was higher in soils under spontaneous vegetation, particularly in the 2

to 5 cm. For both ribosomal and messenger RNA, a significant interaction between the main factors was detected ( $P < 0.05$ ).

Beta-glucosidase gene expression was measured by determining  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  values (Fig. 3) and the  $\beta$ -glucosidase transcript to gene copies ratio (Fig. 4). Similar  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  values were detected through the soil profile in the CM treatment. Soils under tillage showed higher  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  values then higher gene expression in the top 2 cm with respect to the successive two depths. In contrast, the ratio  $\beta$ -glucosidase transcripts to gene copies evidenced a much higher gene expression from 2 cm to 20 cm in soils under the cover crops.

Bacterial Community Structure

Comparisons of overall and metabolically active bacterial communities from T and CM showed markedly different profiles across the DGGE gel (Fig. 5). The dendrogram generated by the Raup and Crick cluster analyses evidenced a diverse population structure of overall (DNA-based) and metabolically active (RNA-based) bacterial communities from T and CM soils (Fig. 6). In the DNA-based DGGE analysis, depths of T soils clustered together whereas three different clusters grouped the four soil depths of the CM treatment (Fig. 6a). The same pattern was observed for these latter clusters in RNA-based DGGE gel (Fig. 6b), while T soils showed a different behaviour: one cluster grouped depths from 0 to 10 cm while the other grouped the deeper layer to subsurface CM soils.

**Table 4.** Similarity values (SRC) between samples for profiles of DNA and cDNA- based DGGE analysis for tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils.

DNA	T <sub>0-2</sub>	T <sub>2-5</sub>	T <sub>5-10</sub>	T <sub>10-20</sub>	CM <sub>0-2</sub>	CM <sub>2-5</sub>	CM <sub>5-10</sub>
T <sub>2-5</sub>	0.999						
T <sub>5-10</sub>	0.993	0.959					
T <sub>10-20</sub>	0.999	0.941	1				
CM <sub>0-2</sub>	0.189	0.056	0.109	0.489			
CM <sub>2-5</sub>	0.434	0.701	0.757	0.983	0.804		
CM <sub>5-10</sub>	0.770	0.848	0.685	0.880	0.639	1	
CM <sub>10-20</sub>	0.121	0.122	0.054	0.352	0.028	0.154	0.222
cDNA	T <sub>0-2</sub>	T <sub>2-5</sub>	T <sub>5-10</sub>	T <sub>10-20</sub>	CM <sub>0-2</sub>	CM <sub>2-5</sub>	CM <sub>5-10</sub>
T <sub>2-5</sub>	0.983						
T <sub>5-10</sub>	0.680	0.993					
T <sub>10-20</sub>	0.871	0.948	0.985				
CM <sub>0-2</sub>	0.031	0.129	0.391	0.543			
CM <sub>2-5</sub>	0.310	0.457	0.900	0.994	0.402		
CM <sub>5-10</sub>	0.057	0.254	0.698	0.973	0.542	1	
CM <sub>10-20</sub>	0.015	0.080	0.068	0.401	0.169	0.756	0.850

The  $S_{RC}$  values found by comparing the two treatments are summarized in Table 4. Similarities within replicas were significant under all conditions (depths and treatments;  $S_{RC} > 0.95$  data not shown). For 16S rRNA genes, tillage soils proved significantly similar ( $S_{RC} > 0.95$ ) throughout the soil profile. The same occurred for the subsurface depths (2-5 and 5-10 cm) of covered soils. The uppermost and the deeper soil layers of CM significantly differed. For the rest of pairs of DNA-DGGE profiles compared, the similarity was no greater than expected by chance ( $0.95A > S_{RC} > 0.05$ ). When 16S rRNA transcripts were considered, the structure of the bacterial population was significantly similar ( $S_{RC} > 0.95$ ) from 2 to 20 cm of T soils. The deeper layer of this treatment was similar to subsurface layers of CM soils. Dissimilarity ( $S_{RC} < 0.05$ ) was detected between topsoil of both treatments. For the rest of the pairs compared in the RNA-DGGE profiles, the similarity was no greater than expected by chance ( $0.95A > S_{RC} > 0.05$ ).

## Discussion

Studies using traditional biochemical methods concerning the critical role of certain key enzymes, or those concerning the influence of management practices are widespread (Bandick and Dick, 1999; Bending et al. 2004; Benitez et al. 2006), evidencing the feasibility of some enzyme activities to be used as indicators of soil functions (Nannipieri et al. 2003). Soil dehydrogenase depends on the metabolic state of the soil biota, and therefore has been proposed as a sensitive indicator of microbial activity in soils of semiarid Mediterranean areas (Garcia et al. 1997). In contrast with most authors studying the influence of management and/or depth profile on soil dehydrogenase activity (Madejon et al. 2009; Mijangos and Garbisu 2010), we found that the activity of this enzyme was the same throughout the soil profile after a 28-year trial, regardless of the plant-debris replacement (incorporated debris in T and surface debris -cover crops- in CM). The high standard deviation of the means undoubtedly determined the lack of statistical significance. Nevertheless, diverse behaviour was observed for hydrolytic enzymes and the highest values were detected in the first 2 cm of soils under spontaneous cover crops. This is consistent with many preceding studies (Niemi et al. 2005; Novak et al. 2007; Geisseler and Horwath, 2009), evidencing again the strong dependence of hydrolytic enzymes on soil organic carbon (Benitez et al. 1999; Kandeler et al. 2001; Moreno et al. 2009a). Since hydrolytic enzymes are inducible, available organic-C, -P, -N and -S regulate the activity of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase, urease and arylsulphatase in soil (Burns 1982). In fact, the highest levels of organic carbon were found in the top layer of covered soils, directly associated with the influence of the spontaneous vegetation in the first few cm of the soil. However, current soil-enzyme methods do not

prove effective in evaluating rates of enzymatically catalysed reactions under natural *in situ* conditions; rather, they measure potential enzyme activities under optimal soil conditions (Wallenstein and Weintraub, 2008). Soil-enzyme activities are controlled by complex interactions in soil, and new approaches are therefore needed to improve our knowledge of many soil ecosystem functions. In our work, analyses of constitutive (DNA) and transcriptionally active (RNA) bacterial 16S ribosomal RNA and  $\beta$ -glucosidase genes were included in order to provide a better understanding of the role of an enzyme involved in a critical ecosystem function -soil carbon storage and sequestration (Cañizares et al. 2011)- as well as of the bacterial community behaviour in semiarid Mediterranean agricultural soils.

In our work, data on  $\beta$ -glucosidase gene-copy number provided no additional information regarding the effect of tillage, spontaneous cover crops, or profile depth on soil-bacteria behaviour that those derived from traditional methods. Thus, the highest genetic potential to produce bacterial  $\beta$ -glucosidase were found in the top 0-2 cm of soils under spontaneous cover crops, with similar values for the rest of the others soil layers.

Nevertheless, a different trend resulted when gene transcripts were considered. The highest values of transcriptionally active  $\beta$ -glucosidase corresponded to subsurface layers of soils under catch crops. After 30 years of experiment, both tillage and catch-crop management has evidenced a comparable input of C biomass into the soil (Castro et al. 2008), but the mineralization rate was probably slowed down in no-tillage soils, as a result of the highly protective effect of the plant cover (Franzluebber 2002; Peigné et al. 2007). Therefore, a higher amount of organic matter with a lower degree of degradation could characterize the CM soils, where the higher quantity of complex carbohydrates could determinate the higher expression of the  $\beta$ -glucosidase gene. However, a low number of transcript  $\beta$ -glucosidase gene copies were detected in the CM topsoil, where the higher activity and number of microorganisms (16S rRNA and  $\beta$ -glucosidase gene copies) were present. Data of WSC could help us to understand this phenomenon. The water soluble extracts contain simple carbon molecules as simple sugars (Charest et al. 2004) and as  $\beta$ -glucosidase is an inducible enzyme, the lower number of transcripts could be due to the repression of its synthesis by the presence of easily available carbon.

The ratio between  $\beta$ -glucosidase transcripts and gene copies could strengthen these assumptions. In addition, this ratio more efficiently reflected the influence of management or soil depth on the expression of  $\beta$ -glucosidase genes than did those derived from the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Despite that the latter has been used successfully

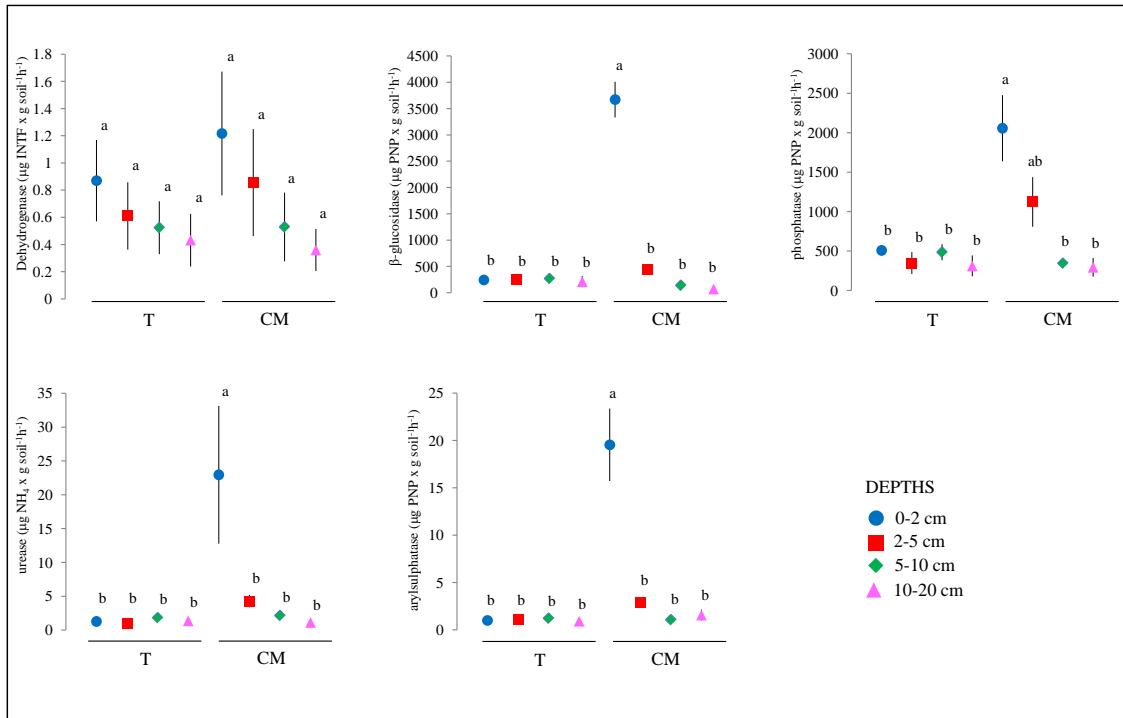


Fig. 1 Enzyme activities for tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils. Vertical bars for SE are indicated only when larger than symbols. For each enzyme activity, significant differences are indicated by different letters (P < 0.05, ANOVA, Tukey post-hoc)

in organic substrates, indicating genes involved in the degradation of pollutants (Di Gennaro et al. 2010; Monard et al. 2010), the small pool of nucleic acids in soils under semiarid conditions hampered the normalization for the qPCR reaction and the resulting error may be high, making it more difficult to offer an adequate interpretation of the data.

These results, which are based on very short-lived messenger RNA and indicate which genes are active at the time of extraction, could be strengthened with those derived from more stable ribosomal RNA (Hirsch et al. 2010). The abundance and diversity 16S rRNA transcripts have been used to indicate the dominant active population in soil, despite recognition that the number of ribosomes can differ depending on the bacterial

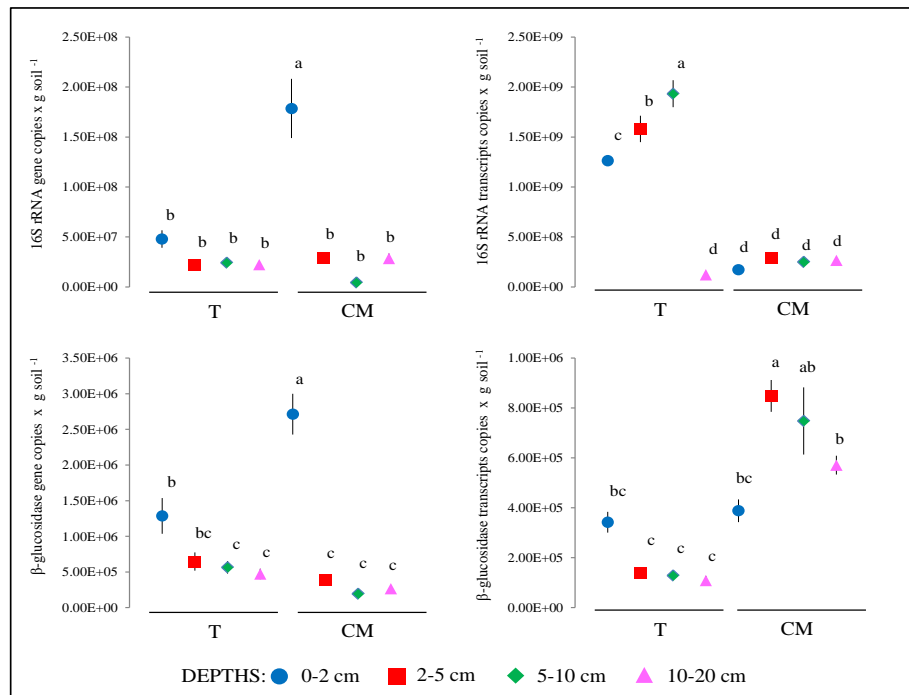
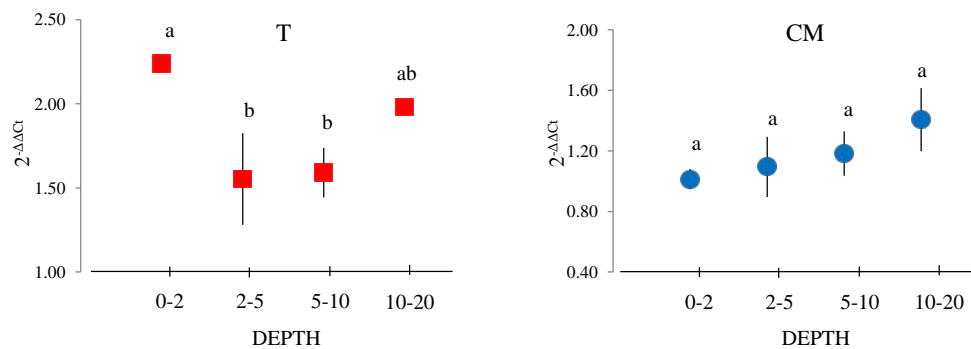


Fig. 2 Molecular estimates for tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils. Vertical bars for SE are indicated only when larger than symbols. For each parameter, significant differences are indicated by different letters (P < 0.05, ANOVA, Tukey post-hoc)

group (Janssen 2006). The results of analysing 16S rRNA gene transcripts showed higher numbers of metabolically active bacteria in tillage soils, with a strong influence of soil depth. Although the number of 16S rRNA gene copies was the same in tillage soils as in covered soils (except for the top layer), the former had a higher number of 16S rRNA transcript numbers, potentially indicating greater bacterial activity in the layers within 10 cm of T soils. This lack of a relation between soil microbial activity and biomass, as reported elsewhere (Smith et al. 2006; Stromberger et al. 2011), has often been linked to microbial maintenance requirements in stressed ecosystems. Microbial communities under physiological stress may have higher maintenance requirements, transferring energy from growth to physiological maintenance (Odum 1985). Soils under semiarid climate in the southern Mediterranean area experience regular drought and episodic dry/rewetting cycles. In this

scenario, long-term management practices could select bacterial communities with different abilities to respond to drought. The capacity of the microbial community to respond to an ecosystem-level stressor (drought) varies with the nature of microbial population, from acclimation to inherent resistance (Schimel et al. 2007), and long-term management could determine the community composition of the active bacteria. Therefore, although the number of 16S rRNA transcript copies can potentially reflect the rate at which bacteria are capable of responding to resource availability (Klappenbach et al. 2000), the differences found in bacterial growth rates under different managements could be associated with a relocation of resources from growth to protective molecules under drought soil conditions (Schimel et al. 2007).

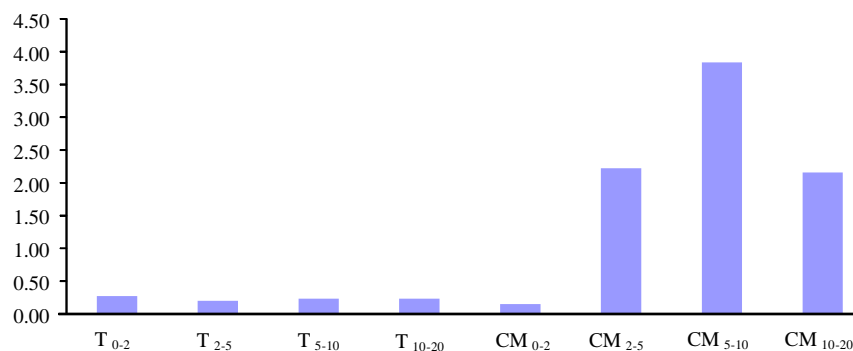


**Fig. 3**  $\beta$ -glucosidase gene expression normalized by the internal standard 16S rRNA in tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils. Vertical bars for SE are indicated only when larger than symbols. For each management, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc)

The effectiveness of molecular techniques to provide insight into the soil-bacteria community structure and function was also evidenced for PCR-DGGE techniques. The advantage of using 16S rRNA transcripts from 16S rRNA genes-based analyses has been supported by several studies (Hoshino et al. 2007; Reeve et al. 2010; Wallis et al. 2010), even though RNA-based analyses are subject to the same biases as DNA-based analyses (Norris et al. 2002; Griffiths et al. 2003).

The main shortcoming of these methods arises from the

limited number of amplicon types that can be detected and from the potential co-migration of different amplicons, then underestimating species richness and evenness (Hirsch et al. 2010). To overcome this limitation, some authors restrict their analyses to test whether similarities observed within and between DGGE-generated community profiles are stronger or weaker than would be expected by chance, using Raup and Crick's probability-based index of similarity  $S_{RC}$  (Rowan et al. 2003; Moreno et al. 2009a; Vivas et al. 2009).



**Fig. 4**  $\beta$ -glucosidase transcripts to genes ratio in tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils

Difference between community structure and transcriptional activity was noticed by comparing the DGGE profiles of community (DNA-based) to the profiles of active species (RNA-based). The two profiles shared less than 50% similarity in each treatment, as previously described (Duineveld et al. 2001; Jossi et al. 2006). In our work, differences in the PCR-DGGE profiles between managements were clearly detected at both the DNA and RNA levels. For soils under tillage, all layers were found to be similar at the DNA level but not at the RNA level, where only intermediate layers (from 2 to 10 cm) displayed similar community structure. For soils under continuous vegetation, the patterns of the overall community (DNA-based) were found to be

analogous to those of the metabolically active community (RNA-based) structures, and where intermediate layers clustered together with a high degree of similarity. It is well known that soils undergo vertical homogenization due to tillage (Six et al. 2000) and similar amounts of soil organic carbon, enzyme activities, and overall bacterial biomass and community structure were detected throughout the plough depth in tillage soils. Nevertheless, discrimination between soil layers according to their metabolically active biomass and community structure of bacteria could be detected in this management, pointing to the relevance of using RNA-related properties as sensitive indicators of bacterial physiological state in semiarid soils.

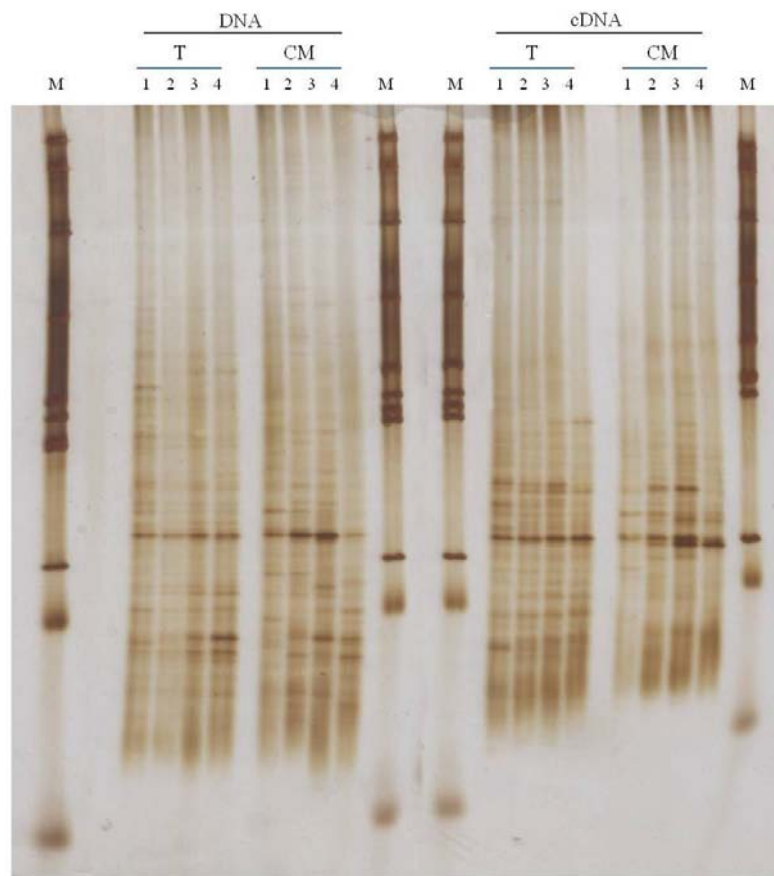
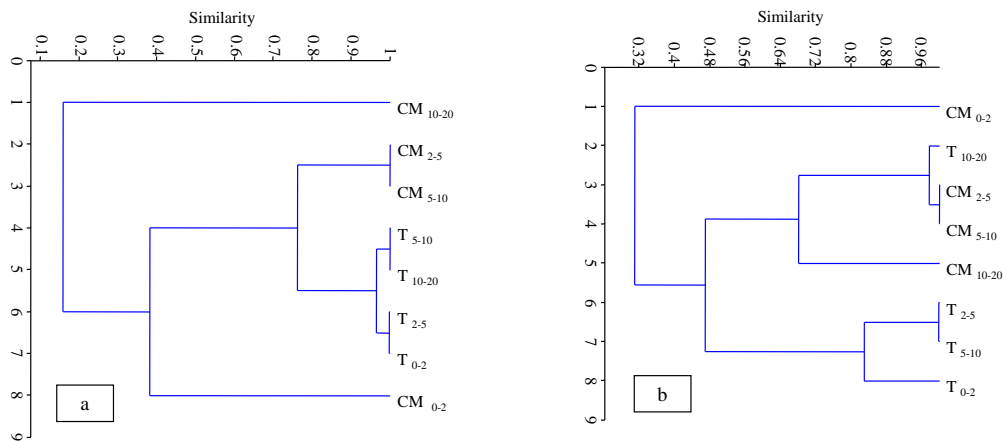


Fig. 5 DGGE profiles for tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils. 1: depth 0-2 cm, 2: depth 2-5 cm, 3: depth 5-10 cm, 4: depth 10-20 cm, M: molecular size marker (100 bp DNA ladder, Genecraft®, Germany)

This paper contributes to the ongoing debate over the appropriate indicators to assess the impact of land use on microbial-based ecosystem services. Mediterranean agroecosystems are particularly vulnerable to global changes, and alterations in ecosystem services need to be predicted using more appropriate approaches. Our work points towards RNA-based methods providing more constructive information than that of DNA-based ones, or other traditional biochemical methods.

*In situ* bacterial  $\beta$ -glucosidase activity can be assessed by quantifying the expression of the functional

genes that encode the  $\beta$ -glucosidase enzyme in soil. Quantification of both genes and gene transcripts allows calculation of transcript-to-gene ratios, giving an idea of transcript abundance per bacteria. The results evidence overexpression of bacterial  $\beta$ -glucosidase genes in tillage soils that are by no means related to carbon-nutrients availability. Similarly, tillage soils presented higher 16S rRNA transcript-to-gene ratios than non-tillage ones, which was not an indication of higher bacterial population size. This enhanced transcriptional activity in ploughed soils could point towards the capacity of the bacterial community to respond to an ecosystem-level



**Fig. 6** Raup and Crick probability-based index of similarity cluster analyses of DNA- (a) and cDNA- based DGGE analysis (b) for tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils

stressor (drought) in less favorable conditions. Consequence of this hypothesis would be the positive effect of spontaneous cover crops on soil biological stability, where bacterial metabolic expense was much lower. Efforts on linking soil functions to soil resilience or stability through proteomic, transcriptomic and genomic approaches are needed to move understanding forward.

## Acknowledgements

This work was supported by ERDF-cofinanced grant CGL2009-07907 from the Spanish Ministry of Science of Innovation. R. Cañizares is supported by the JAE-CSIC predoctoral Program. We would also like to thank David Nesbitt for the valuable English editing on the latest version of the manuscript.

## References

- Allison S, Gartner T, Holland K, Weintraub M, Sinsabaugh R (2007) Soil enzymes: linking proteomics and ecological process. *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press: Washington D.C. pp 704-711
- Bandick AK, Dick RP (1999) Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biol Biochem* 31: 1471-1479
- Bending GD, Turner MK, Rayns F, Marx M-C, Wood M (2004) Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biol Biochem* 36: 1785-1792
- Benitez E, Nogales R, Campos M, Ruano F (2006) Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Appl Soil Ecol* 32: 221-231
- Benitez E, Nogales R, Elvira C, Masciandaro G, Ceccanti B (1999) Enzyme activities as indicators of the stabilization of sewage sludges composting with *Eisenia foetida*. *Bioresource Technol* 67: 297-303
- Borken W, Matzner E (2009) Reappraisal of drying and wetting effects on C and N mineralization and fluxes in soils. *Global Chang Biol* 15: 808-824
- Burns RG (1982) Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biol Biochem* 14: 423-427
- Cañizares R, Benitez E, Ogunseitan OA (2011) Molecular analyses of [beta]-glucosidase diversity and function in soil. *Eur Soil Biol* 47: 1-8
- Castro J, Fernández-Ondoño E, Rodríguez C, Lallena AM, Sierra M, Aguilar J (2008) Effects of different olive-grove management systems on the organic carbon and nitrogen content of the soil in Jaén (Spain). *Soil Till Res* 98: 56-67
- Charest MH, Antoun H, Beauchamp CJ (2004) Dynamics of water-soluble carbon substances and microbial populations during the composting of de-inking paper sludge. *Bio Technol* 91: 53-67
- Cui W, Taub DD, Gardner K (2007) qPrimerDepot: a primer database for quantitative real time PCR. *Nucleic Acids Res* 35: D805-D809
- Di Gennaro P, Moreno B, Annoni E, García-Rodríguez S, Bestetti G, Benitez E (2009) Dynamic changes in bacterial community structure and in naphthalene dioxygenase expression in vermicompost-amended PAH-contaminated soils. *J Hazard Mater* 172: 1464-1469
- Duineveld BM, Kowalchuk GA, Keijzer A, Van Elsas JD, Van Veen JA (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
- European Council (2008) Agriculture Council Political Agreement on the Health Check, 20 November 2008, 16049/08

- FAO (1998) World Reference Base for Soil Resources. World Soil Resources Reports 84. FAO-ISRIC-ISSS, Roma
- Franzluebbers AJ (2002) Soil organic matter stratification ratio as an indicator of soil quality. *Soil Till Res* 66: 95-106
- García C, Hernandez T, Costa F (1997) Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Comm Soil Scie Plant Analy* 28: 123-134
- Geisseler D, Horwath WR (2009) Short-term dynamics of soil carbon, microbial biomass, and soil enzyme activities as compared to longer-term effects of tillage in irrigated row crops. *Biol Fert Soils* 46: 65-72
- Gómez JA, Álvarez S, Soriano M-A (2009) Development of a soil degradation assessment tool for organic olive groves in southern Spain. *CATENA* 79: 9-17
- Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ (2003) Physiological and Community Responses of Established Grassland Bacterial Populations to Water Stress. *Appl Environ Microbiol* 69: 6961-6968
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4.
- Hirsch PR, Mauchline TH, Clark IM (2010) Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biol Biochem* 42: 878-887
- Hoshino YT, Matsumoto N (2007) DNA- versus RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis profiles of a bacterial community during replenishment after soil fumigation. *Soil Biol Biochem* 39: 434-444
- Ibekwe AM, Grieve CM (2004) Changes in developing plant microbial community structure as affected by contaminated water. *FEMS Microbiol Ecol* 48: 239-248
- Janssen PH (2006) Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol* 72: 1719-1728
- Jossi M, Fromin N, Tarnawski S, Kohler F, Gillet F, Aragno M, Hamelin, J (2006) How elevated pCO<sub>2</sub> modifies total and metabolically active bacterial communities in the rhizosphere of two perennial grasses grown under field conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 55: 339-350
- Kandeler E, Tschirko D, Stemmer M, Schwarz S, Gerzabek MH (2001) Organic matter and soil microorganisms-investigations from the micro- to macro-scale. *Bodenkultur* 52: 117-131.
- Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66: 1328-1333
- Lal R (2011) Sequestering carbon in soils of agroecosystems. *Food Policy* 36: S33-S39
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25: 402-408
- M.A.P.A. (1986) *Metodos oficiales de analisis*. Tomo III. Plantas, productos organicos, fertilizantes, suelos, agua, fertilizantes organicos. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion. Madrid
- Madejón E, Murillo JM, Moreno F, López MV, Arrue JL, Alvaro-Fuentes J, Cantero, C (2009) Effect of long-term conservation tillage on soil biochemical properties in Mediterranean Spanish areas. *Soil Till Res* 105: 55-62
- McCaig AE, Glover LA, Prosser JI. (2001). Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns. *Appl Environ Microbiol* 67: 4554-4559
- Medina F, Iglesias A (2010) Agricultural practices with greenhouse mitigation potential in Mediterranean countries: Evaluation and policy implications. *Proceedings of the 9th European IFSA Symposium*; Vienna
- Metzger MJ, Rounsevell MDA, Acosta-Michlik L, Leemans R, Schröter D (2006) The vulnerability of ecosystem services to land use change. *Agr Ecosys Environ* 114: 69-85
- Mijangos I, Garbisu C (2010) Consequences of soil sampling depth during the assessment of the effects of tillage and fertilization on soil quality: a common oversight. *Soil Till Res* 109: 169-173
- Monard C, Martin-Laurent F, Devers-Lamrani M, Lima O, Vandenkoornhuyse P, Binet F (2010) atz gene expressions during atrazine degradation in the soil drilosphere. *Mol Ecol* 19: 749-759
- Moreno B, Garcia-Rodriguez S, Cañizares R, Castro J, Benítez E (2009a) Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agr Ecosys Environ* 131: 333-339
- Moreno B, Vivas A, Nogales R, Macci C, Masciandaro G, Benitez E (2009b) Restoring biochemical activity and bacterial diversity in a trichloroethylene-contaminated soil: the reclamation effect of vermicomposted olive wastes. *Environ Sci Poll Res* 16: 253-264
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G (2003) Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* 54: 655-670
- Niemi RM, Vepsäläinen M, Wallenius K, Simpanen S, Alakukku L, Pietola L (2005) Temporal and soil depth-related variation in soil enzyme activities and in root growth of red clover (*Trifolium pratense*) and

- timothy (*Phleum pratense*) in the field. *Appl Soil Ecol* 30: 113-125
- Norris TB, McDermott TR, Castenholz RW (2002) The long-term effects of UV exclusion on the microbial composition and photosynthetic competence of bacteria in hot-spring microbial mats. *FEMS Microbiol Ecol* 39: 193-209
- Novak JM, Bauer PJ, Hunt PG (2007) Carbon Dynamics under Long- Term Conservation and Disk Tillage Management in a Norfolk Loamy Sand. *Soil Sci Soc Am J* 7: 453-456
- Odum EP (1985) Trends Expected in Stressed Ecosystems. *BioScience* 35: 419-422
- Pajaron M (2000) Valores agroecológicos de los sistemas agrarios actuales: el olivar. III. Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica: Una alternativa para el mundo rural del tercer milenio.; Valencia, 21 al 26 de Septiembre de 1988, pp: 17-30
- Peigné J, Ball BC, Roger-Estrade J, David C (2007) Is conservation tillage suitable for organic farming? A review. *Soil Use Manage* 23: 129-144
- Qian H, Hu B, Cao D, Chen W, Xu X, Lu Y (2007) Biosafety assessment of validamycin formulation on bacterial and fungal biomass in soil monitored by real-time PCR. *B Environ Cont Toxicol* 78: 239-244
- Raup DM, Crick RE (1979) Measurement of Faunal Similarity in Paleontology. *J Paleontol* 53: 1213-1227
- Reeve JR, Schadt CW, Carpenter-Boggs L, Kang S, Zhou J, Reganold JP (2010) Effects of soil type and farm management on soil ecological functional genes and microbial activities. *ISME J* 4: 1099-1107
- Rowan AK, Snape JR, Fearnside D, Barer MR, Curtis TP, Head IM (2003) Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiol Ecol* 43: 195-206
- Schimel J, Balsler TC, Wallenstein M (2007) Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* 88: 1386-1394
- Schröter D, Cramer W, Leemans R, Prentice IC, Araújo MB, Arnell NW, Bondeau A, Bugmann H, Carter TR, Gracia CA, de la Vega-Leinert AC, Erhard M, Ewert F, Glendinning M, House J.I, Kankaanpää S, Klein RJT, Lavorel S, Lindner M, Metzger M.J, Meyer J, Mitchell TD, Reginster I, Rounsevell M, Sabaté S, Sitch S, Smith B, Smith J, Smith P, Sykes MT, Thonicke K, Thuiller W, Tuck G, Zaehle S, Zierl B (2005) Ecosystem Service Supply and Vulnerability to Global Change in Europe. *Science* 310: 1333-1337
- Six J, Paustian K, Elliott ET, Combrink C (2000) Soil Structure and Organic Matter. *Soil Sci Soc Am J* 64: 681-689
- Smith CJ, Nedwell DB, Dong LF, Osborn AM (2006) Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environ Microbiol* 8: 804-815
- Sofo A, Palese AM, Casacchia T, Celano G, Ricciuti P, Curci M, Crecchio C, Xiloyannis C (2010) Genetic, Functional, and Metabolic Responses of Soil Microbiota in a Sustainable Olive Orchard. *Soil Science* 175: 81-88
- Stromberger ME, Shah Z, Westfall DG (2011) High specific activity in low microbial biomass soils across a no-till evapotranspiration gradient in Colorado. *Soil Biol Biochem* 43: 97-105
- Vivas A, Moreno B, Garcia-Rodriguez S, Benitez E (2009) Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Biores Technol* 100: 1319-1326
- Wallenstein MD, Weintraub MN (2008) Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biol Biochem* 40: 2098-2106
- Wallis PD, Haynes RJ, Hunter CH, Morris CD (2010) Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. *Appl Soil Ecol* 46: 147-150
- WMO (2005) Climate and land degradation. World Meteorology Office: Geneva, Switzerland





## CAPÍTULO 4

---

**Consequences of soil management for  
molecular diversity and expression of  
bacterial  $\beta$ -glucosidase genes**



## **Consequences of soil management for molecular diversity and expression of bacterial $\beta$ -glucosidase genes**

### **Resumen**

La diversidad molecular y la expresión de genes bacterianos que codifican la enzima  $\beta$ -glucosidasa dependen del tipo de manejo al que está sometido un suelo en un escenario mediterráneo de clima semiárido. En un olivar se evaluaron dos diferentes tipos de manejo con herbicidas, aplicados una vez al año en suelos bajo cubierta vegetal o de forma permanente en suelos desnudos. El contenido en carbono orgánico total y fácilmente disponible, así como los ácidos grasos libres y sus datos isotópicos ( $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ ), indicaron que tanto la actividad microbiana como el contenido en materia orgánica fueron mayores en suelos bajo cubierta vegetal que en suelos sin cubierta. Las actividades enzimáticas del suelo relacionadas con los ciclos de C, P y N difirieron significativamente sólo en los primeros centímetros de los suelos, mayores en los suelos con vegetación espontánea. La actividad potencial de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, estimadas en condiciones óptimas del suelo, se correlacionó con el número de copias de genes que codifican tal enzima, indicando una expresión génica máxima bajo condiciones óptimas de laboratorio. Sin embargo, el número de genes  $\beta$ -glucosidasa transcripcionalmente activos mostraron una tendencia diferente, y se detectaron niveles comparables de copias de genes de  $\beta$ -glucosidasa transcritos a lo largo de los perfiles del suelo de cada tratamiento. El estudio de la diversidad molecular bacteriana del gen  $\beta$ -glucosidasa mediante análisis DGGE, discriminó dos diferentes grupos correspondientes a los dos tipos de suelo bajo diferente manejo agrícola, lo que evidenció un claro efecto del uso del suelo sobre la diversidad molecular de los genes  $\beta$ -glucosidasa. Los análisis de las secuencias de ADN de cada uno de los diferentes OTUs revelaron una diversidad similar a lo largo del perfil del suelo en cada tratamiento, así como una clara diferencia entre los suelos con cubierta y no cubierta. Estos resultados podrían reflejar una especialización bacteriana debido al tipo de manejo del suelo.

Este artículo está en revisión en la revista **Soil Biology & Biochemistry**





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Soil Biology &amp; Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/soilbio](http://www.elsevier.com/locate/soilbio)

## Consequences of soil management for molecular diversity and expression of bacterial $\beta$ -glucosidase genes

Rosa Cañizares, Beatriz Moreno, Rafael Nuñez, Emilio Benitez\*

*Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín (EEZ), CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain*

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

$\beta$ -glucosidase  
cover crops  
genomics  
soil enzymes  
transcriptomics

### ABSTRACT

Molecular diversity and expression of bacterial  $\beta$ -glucosidase genes have been found to be a function of soil management in a semiarid Mediterranean scenario. Two different soil managements –spontaneous cover crops vs. bare soils— were tested in a long-term experiment with rainfed olive orchards. Total and easily available organic carbon, as well as free fatty acids and their isotopic data ( $\delta^{13}\text{C}\%$ ) indicated that both microbial activity and organic-matter processing was higher in covered than in non-covered soils. Soil-enzyme activities related to C, P, N, and S cycles significantly differed only in the top few cm of the soils, and higher under spontaneous vegetation. Indicating the potential activity of the enzyme under optimal soil conditions,  $\beta$ -glucosidase activity was correlated with the number of copies of bacterial  $\beta$ -glucosidase genes, as a sign of maximal gene expression under optimal laboratory conditions. Nevertheless, transcriptionally active  $\beta$ -glucosidase data showed a different trend, and comparable levels of  $\beta$ -glucosidase transcripts copies were found throughout the soil profiles of each treatment. The study of bacterial  $\beta$ -glucosidase molecular diversity by DGGE fingerprinting discriminated two soil groups corresponding to the two types of soil management, evidencing a clear effect of land use on the molecular diversity of  $\beta$ -glucosidase genes. Analyses of the DNA sequences of the different OTUs revealed a similar diversity throughout the soil profile in each treatment, but a clear difference between covered and noncovered soils. These results could reflect bacterial specialization due to management.

### 1. Introduction

The consequences of climate change are expected to be even harsher in semiarid Mediterranean agroecosystems than in milder zones (European Environment Agency [EEA], 2008). Adverse environmental conditions and centuries of farming have made of the Mediterranean soils among the most vulnerable in Europe (Metzger et al., 2006). Low levels of vegetal cover as a result of dry climate and intense cultivation have resulted in a very low content of organic matter in soils. Moreover, soil wet-dry cycles often result

in remarkable organic-carbon mineralization rates (Austin et al., 2004). Development and maintenance of aboveground biomass under semiarid conditions lead to reduced soil erosion or improved soil productivity by increasing water- and nutrient-retention capacity (Duran-Zuazo and Rodriguez-Pleguezuelo, 2008); often this is the only input of biomass C in these soils (Castro et al., 2008).

The effects of soil management on soil-C dynamics have been widely investigated over recent decades. The links between soil-C dynamics and carbon sequestration (Post and Kwon, 2000, Lal, 2004), evidence that agricultural management practices are also closely related

to the potential for semiarid agroecosystems to provide ecosystem services. Within this framework, the management of agricultural soils is therefore crucial to reduce the vulnerability of Mediterranean ecosystems.

Reactions involving organic-matter transformations in soil are mainly enzyme-based. Researches focusing on the potential roles of selected soil enzymes are continually improving our understanding of their role in C dynamics and biochemical cycles (Makoi and Ndakidemi, 2008). In this context,  $\beta$ -glucosidase enzyme plays a central role in the global-scale C cycle (Knight and Dick, 2004), since it catalyses the final step in the breakdown of cellulose compounds and the subsequent release of simple glucose to microorganisms (Esen, 1993). The impact of soil management on  $\beta$ -glucosidase activity has been well documented (Stott et al., 2010), and the ability of the abiotic form of the enzyme to discriminate between field management effects has also been evidenced (Knight and Dick, 2004; Stursova and Baldrian, 2011). Despite the recognized weight of the extracellular component in the overall soil  $\beta$ -glucosidase activity, the use of the total enzyme activity as a feasible soil-quality indicator has been strongly recommended (Knight and Dick, 2004). However, little is known about the effects of land use on the biotic pool of  $\beta$ -glucosidase enzyme, although it is well known that all the size, activity, structure, and diversity of soil microbial communities are affected by land use, as it influences soil organic-matter content and quality (Degens et al., 2000).

Except for a few previous papers (Klose and Tabatabai, 2002), there is little information underlining the mechanisms of regulation, expression or molecular diversity of the biotic form of the  $\beta$ -glucosidase enzyme, and even less examining molecular non-culturable methods. New research directions in the field of soil molecular ecology are therefore needed, particularly considering that current biochemical assays reflect potential enzyme activities and do not represent true *in situ* activity levels.

In this work, real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches targeting bacterial  $\beta$ -glucosidase genes have been developed to estimate the effects of two soil-management practices on the enzyme gene expression and diversity, seeking to provide insight into how human decisions affect soil-carbon dynamics in a semiarid scenario.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study site and soil sampling

An experiment designed to test the impact of different soil-management systems on olive production under semiarid conditions (Jaen, south-eastern Spain) started in 1976 and continues up to the present. The main characteristics of the experiment are described in Castro et al. (2008) and Moreno et al. (2009). The average annual rainfall for the area is 557 mm, the soil has been classified

as an Anthropic Regosol (FAO, 1998). The orchard consisted of unirrigated adult olive trees planted on 11-m centres. The study was designed as a random complete block with two treatments and four replicates (plots). The elementary plot consisted of 16 olive trees: the central four were monitored and the rest constituted guard rows. The treatments tested were:

- No cover (NC): vegetation was eliminated by applying the pre-emergence herbicides simazine and diuron in the autumn (these being replaced by oxyfluorfen for seven years until the present). In the spring, glyphosate was applied locally.

- Spontaneous cover vegetation (CH): weeds were left to grow each year to be eliminated in March with herbicides. Initially, diquat/paraquat was used before being replaced at a later date by glyphosate.

Two samples were collected in the centre of each plot at depths 0-2, 2-5, 5-10, and 10-20 cm. We used a modified soil-sample ring kit (Eijkkelkamp) which includes a cylinder of 20 cm specifically manufactured for this purpose. The bryophyte layer was eliminated (when present) in the CH treatment and all weeds were cut to ground level. Samples were pooled to give three replicates per plot and depth. For the isolation of nucleic acids, subsamples of fresh soil were immediately frozen in liquid nitrogen. Soil samples were transported in ice-cooled boxes and subsequently passed through a 2-mm sieve, discarding visible plant debris. The samples were stored at 4°C and -80°C until biochemical and molecular analyses were conducted.

### 2.2. Soil organic carbon and enzyme activities

Soil organic carbon (SOC) was determined using the Walkley-Black wet dichromate oxidation method (M.A.P.A., 1986). Water-soluble carbon (WSC) was extracted and determined as described in Benitez et al. (1999).

Dehydrogenase activity was determined by the method of Von Mersi and Schinner (1991) modified by Garcia et al. (1997). One gram of soil was incubated for 20 h at 25°C with 0.2 ml of 0.4% 2-p-iodophenyl-3 p-nitrophenyl-5 tetrazolium chloride (INT) as a substrate. Iodonitrotetrazolium formazan (INTF) produced in the reduction of INT was extracted with a mixture of acetone:tetrachloroethene (1.5:1) and measured in a spectrophotometer at 490 nm. Assays without soil and without INT were made simultaneously as controls.

For the determination of urease activity, 2 ml of 0.1 M, pH 7.0 phosphate buffer and 0.5 ml 1.066 M urea were added to 1 g of soil (Nannipieri et al., 1980) and submitted to shaken incubation at 37°C for 1.5 h. The ammonium released in the hydrolytic reaction was measured using an ammonium selective electrode (ORION Research Inc., Beverly, MA, USA) mod. 95-12. Assays without soil and without urea were made at the same time as controls.

For the determination of  $\beta$ -glucosidase and phosphatase activity, 0.5 ml of 0.05 M 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-

glucanopyranoside, 0.115 M 4-nitrophenyl phosphate and 5 mM 4-nitrophenyl sulphate were used as substrate, respectively (Tabatabai and Bremner, 1969; Nannipieri et al., 1980). Soil portions (1 g) were incubated at 37°C for 1.5 h with 2 ml of maleate buffer at pH 6.5. The samples were then kept at 2°C for 15 min to stop the reaction, and the p-nitrophenol produced in the enzymatic reactions was extracted and determined at 398 nm. Assays without soil and without substrates were made at the same time as controls.

### 2.3. Free fatty acid analysis and isotopic data ( $\delta^{13}\text{C}\%$ ) for individuals compounds

NC and CH freeze-dried soils (5 grams) were powdered, then extracted ultrasonically using a mix of dichloromethane (DCM):methanol (1:1 v/v) to obtain free lipids (10 ml x 4 times). After centrifugation and concentration, sulphur was removed by adding copper wires, and the solvent dried by being passed over anhydrous sodium sulphate. The total extracts (around 5 ml) were split into an acid and neutral fraction by solid-phase extraction with Discovery DSC-NH2 (Supelco) cartridges. For each sample, a new column was prewashed with DCM and 2:1 DCM:isopropanol (each column quantitatively retains acids when total extracts are flushed through with 2:1 DCM:isopropanol). The acid fraction was subsequently recovered with 2% acetic acid in ether and then methylated with 10% BF<sub>3</sub>-methanol overnight at room temperature. Finally the fatty acid methyl esters were extracted with hexane and concentrated to 500  $\mu\text{l}$  of exact volume.

Gas chromatography (GC) analyses were conducted on a Varian 450-GC fitted with 1079 injector working in split/splitless mode, a CTC Analytics CombiPal refrigerated autosampler and Varian 240 Ion Trap as Mass Spectrometer detector. A Factor four VF-5ms (30m x 0.25mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ) fused silica capillary column was used. Oven temperature was 60°C 4min >> 10°C/min >> 180°C >> 3°C/min >> 250°C >> 5°C/min >> 320°C 2min with 1  $\mu\text{l}$  injected (300°C) in splitless mode (1min). He at 1ml/min was the carrier gas. Electron Impact ionization and detection in Full Scan (50 to 1000 m/z) and SIM (m/z 55, 74 and 87) modes were used. The transfer line and trap temperatures were 280°C and 250°C, respectively. Structural and quantitative information were gained by comparison of mass spectra and retention times of samples and standards (Supelco 18918-1Amp. F.A.M.E Mix C8-C24, Larodan Fime Chemicals 20-2600 Methyl hexacosanoate, 20-2800 methyl octacosanoate and 20-3000 methyl triacontanoate).

The stable-isotope analysis of carbon were performed by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS or simply GC-IRMS) using a TraceGC fitted to a stable-isotope mass spectrometer DeltaV Advantage with interface GC-Isolink (ThermoFisher Scientific). Chromatography conditions were similar to those of the previous GC-MS analysis:

column DB-5MS 30m x 0.25mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ; oven temperature ramp 60°C 2min >> 12°C/min >> 180°C >> 5°C/min >> 315°C 10min; 1  $\mu\text{l}$  injected (250°C) in splitless mode (1min); He at 1.2 ml/min as the carrier gas. Samples were concentrated so that a peak height of at least 100mv measured in cup 44 m/z was achieved for the compound of interest and without coelution. International standards gave an error lower than  $\pm 0.5\%$  for 100mv height and lower than  $\pm 0.3\%$  for 500mv or higher. All carbon isotopic ratios are expressed as ‰ relative to the VPDB standard ( $\delta^{13}\text{C}\%$  notation). The contribution of the methyl-C in the ester group after derivation was corrected by using a mass-balance relationship based on the off-line determination of  $\delta^{13}\text{C}$  of the BF<sub>3</sub>-methanol as reported by Abrajano et al., (1994) among others.

### 2.4. Nucleic acid isolation from soils and cDNA synthesis

For each soil-sample replicate, total DNA was separately extracted from five 0.5 g subsamples by the bead-beating method, following the manufacture's instructions for the MoBio UltraClean Soil DNA Isolation kit (MoBio laboratories, Solana Beach, CA, USA) with the modifications reported by Moreno et al. (2009) to remove trace concentrations of PCR inhibitor. The extracts were pooled and further concentrated at 35°C with a Savant Speedvac® concentrator to a final volume of 20  $\mu\text{l}$ .

The total RNA was extracted from four 2 g subsamples of each replicate following the manufacture's instructions MoBio RNA PowerSoil Total RNA Isolation kit (MoBio laboratories, Solana Beach, CA, USA). For the removal of the residual DNA, DNase I enzyme was added using Roche RNase-Free DNase Set (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) following the manufacturer's instructions. The extracts were pooled and further concentrated at 35°C with a Savant Speedvac® concentrator to a final volume of 80  $\mu\text{l}$ .

The cDNA was synthesised from 4.5  $\mu\text{g}$  of total RNA-DNase using Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). The synthesis reaction was carried out at 50°C for 30 min.

The concentration and quality of the final DNA/RNA/cDNA samples were checked using Nanodrop® ND-100 spectrometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

### 2.5. Real-Time quantitative PCR assays

Real-time PCR was performed to quantify the bacterial biomass and the  $\beta$ -glucosidase gene-copy number in soil-DNA and cDNA extracts. The bacterial biomass and the  $\beta$ -glucosidase gene copies were determined with the universal primers for V3 hypervariable region of 16S rRNA eubacteria P1 and P2 (Muyzer et al., 1993) and the set of degenerated primers  $\beta\text{gluF2}/\beta\text{gluR4}$  for conserved motifs of soil bacterial  $\beta$ -glucosidase genes (Cañizares et al., 2011), respectively. Each 21  $\mu\text{l}$  of PCR reaction



contained 4-8 ng of the DNA or 50-450 ng of the /cDNA, 400 nM of each primer and 10.5  $\mu$ l 2x IQ SYBER Green Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany). Both were amplified with the real-time PCR program previously described by Cañizares et al. (2011).

Two different standard curves were generated using a recombinant plasmid containing one copy of the 16S rRNA fragment and a plasmid recombinant containing one copy of  $\beta$ -glucosidase gene from soil bacteria. The curves were drawn according to Moreno et al. (2009). The relationship between Ct and the target-gene copy number, and the copy numbers of the real-time standard were calculated as described Qian et al. (2007).

Three real-time PCRs were carried out for each DNA/cDNA sample, with the threshold cycle (Ct) determined in triplicate. Both the gene-copy number and the  $\beta$ -glucosidase gene expression were quantified on an iQ5 thermocycler using iQ5-Cycler software (Bio-Rad, Munich, Germany).

### 2.6. PCR-DGGE analyses

For the PCR-DGGE based community analysis, GC- $\beta$ gluF2 and  $\beta$ gluR4 primers were used. Primer GC- $\beta$ gluF2 contained the same sequence as  $\beta$ gluF2 but with an additional 40-nucleotide GC-rich sequence (GC clamp) at its 5' end. The PCR program was performed as described by Cañizares et al. (2011). Total DNA was extracted and concentrated as described above. For the DGGE analyses, 600 ng of purified PCR product was loaded into a 40-65% urea-formamide-polyacrylamide gel. An INGENYphorU System (Ingeny International BV, Netherlands) was run at 75V for 17 h at 58°C to separate the fragments. Gels were silver stained with the Bio-Rad Silver Stain according to the standard DNA-staining protocol and photographed under UV light ( $\lambda = 254$  nm) using an UVitec Gel Documentation system (UVitec Limited, Cambridge, UK). Representatives of bands that were clear and had high intensity were excised from DGGE gels. DNA fragments from DGGE were isolated as described by Schweiger and Tebbe (1998) and modified by Vivas et al. (2009). This DNA isolated was checked for concentration and quality using a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. PCR was conducted using primers  $\beta$ gluF2/R4 with 1 to 4  $\mu$ l of this solution (5 to 10 ng for reaction). Thereafter, PCR fragments were purified by MBL-Agarosa Quickclean (Dominion-MBL SL, Spain), cloned, and subsequently sequenced in both directions by an automatic DNA sequencer (ABI-PRISM 310; Applied Biosystems, Inc.). Sequence identifications were performed using the BLASTX program and the GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequence matches were considered to be significant for score > 50% (Newman et al., 1994). The 91% of the sequenced clones showed high similarities with  $\beta$ -glucosidase genes. Sequences were processed using multiple sequence alignment ClustalW European Bioinformatics Institute World Wide Web server (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Thompson et al.,

1994). Aligned sequences were clustered by the program Mothur (Schloss et al., 2009) into operational taxonomic units (OTUs) (97% similarity cut-off) using the furthest-neighbour method.

### 2.7. Data analyses

Results are the means of 12 replicates (three per plot). The results were submitted to a factorial analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc HSD tests using the program STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). P-values lower than 0.05 were considered evidence for statistical significance.

Band patterns in different DGGE lanes were compared with the UVImap Analysis software (UVitec Limited, Cambridge, UK). The lanes were normalized to contain the same amount of total signal after background subtraction, and the gel images were straightened and aligned to give a densitometric curve. Band positions were converted to Rf values between 0 and 1, and profile similarity was calculated by determining Nei and Li's similarity coefficients (Nei and Li, 1979) for the total number of lane patterns from the DGGE gel. The similarity coefficients calculated were then used to construct a dendrogram using the unweighted pair-group method with arithmetical averages (UPGMA). DGGE banding data were also used to estimate the Raup and Crick's probability-based similarity index (SRC). The Raup and Crick's probability method was used to test whether similarities within and between samples were stronger or weaker than expected by chance. For this, band-matching data was stored as a binary matrix and analysed using the probability-based index of Raup and Crick (1979). The SRC is the probability that the randomized similarity would be greater than or equal to the observed similarity, and SRC values above 0.95 or below 0.05 signify similarity or dissimilarity, respectively, which are not random assortments of the same species (bands or OTUs; Rowan et al., 2003). The SRC and cluster analyses were calculated using the PAST (Paleontological Statistics, version 1.82b) program (Hammer et al., 2001).

Analysis of molecular variance (AMOVA) testing differences intra (FSC) and inter (FCT) treatments, and genetic diversity  $\theta(\pi)$  of sequenced  $\beta$ -glucosidase genes were calculated using the ARLEQUIN program ver 3.5 (Excoffier et al., 2005).

## 3. Results

### 3.1. Soil organic carbon and enzyme activities

Soil organic carbon (SOC), water-soluble carbon (WSC) and soil-enzyme activities are presented in Table 1. Only in the top 2 cm of soils under cover crops were values significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in the rest of soil layers.

**Table 1.** Soil organic carbon (SOC), water soluble carbon (WSC) and enzyme activities for no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils (means±SE). For each parameter, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc)

	SOC (g kg <sup>-1</sup> )	WSC (µg g <sup>-1</sup> )	dehydrogenase (µg INTF g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	β-glucosidase (µg PNP g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	phosphatase (µg PNP g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	urease (µg NH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
NC <sub>0-2</sub>	11.3 ± 1.13 b	23.6 ± 0.17 b	0.38 ± 0.04 b	233 ± 24.8 b	610 ± 3.50 b	3.50 ± 0.51 b
NC <sub>2-5</sub>	5.09 ± 0.58 b	18.1 ± 2.40 b	0.10 ± 0.01 b	95.1 ± 11.8 b	389 ± 36.2 b	0.64 ± 0.13 b
NC <sub>5-10</sub>	4.00 ± 0.60 b	11.9 ± 3.10 b	0.08 ± 0.01 b	42.8 ± 2.94 b	227 ± 27.9 b	0.06 ± 0.01 b
NC <sub>10-20</sub>	3.49 ± 0.30 b	7.24 ± 0.43 b	0.09 ± 0.01 b	21.2 ± 2.45 b	276 ± 11.2 b	0.26 ± 0.05 b
CH <sub>0-2</sub>	23.4 ± 5.01 a	91.8 ± 7.96 a	1.42 ± 0.09 a	1857 ± 133 a	1989 ± 126 a	30.0 ± 1.76 a
CH <sub>2-5</sub>	9.01 ± 2.39 b	24.8 ± 5.88 b	0.52 ± 0.08 b	139 ± 9.99 b	868 ± 99.1 b	3.62 ± 0.44 b
CH <sub>5-10</sub>	4.63 ± 1.08 b	25.5 ± 4.75 b	0.21 ± 0.03 b	33.6 ± 4.73 b	421 ± 47.3 b	1.86 ± 0.11 b
CH <sub>10-20</sub>	3.89 ± 0.75 b	16.3 ± 4.91 b	0.26 ± 0.04 b	51.3 ± 4.83 b	739 ± 166 b	1.37 ± 0.08 b

### 3.2. Free fatty acid analysis and isotopic data ( $\delta^{13}C\%$ ) for individual compounds

Table 2 shows the amounts of the different free fatty acids analysed, these ranging from C<sub>8</sub> to C<sub>32</sub> with a characteristic even over odd predominance. The distribution reflects two maxima, one for the acids C<sub>16:0</sub> and C<sub>18:0</sub> when less than 20 C were considered, and one for C<sub>30:0</sub> and C<sub>32:0</sub> when more than 20 atoms of C were considered. Some unsaturated (C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:1</sub>, C<sub>18:2</sub>, C<sub>18:3</sub>, and C<sub>22:1</sub>) and iso and anteiso branched (C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub>) acids were detected in a few samples. Overall, the CH treatment provided greater quantities of fatty acids than did NC except in the deepest layer, where similar amounts were detected. The greatest differences between treatments were found in the top 2 cm. Within each series, for the most abundant fatty acids, there was a slight increase to 10 cm followed by a decrease to 20 cm in both treatments. The CH layers exhibited higher amounts of low-molecular-weight fatty acids  $\leq$  C<sub>20</sub> than in the corresponding NC layers. The opposite was observed for fatty acids with more than 20 atoms of C, except for the top layer.

Table 3 presents the results of the analysis of stable carbon isotopes. Only a few values of  $\delta^{13}C$  were found for each depth because the GC-IRMS technique requires large amounts of material whereas the quantity obtained from our extraction was low. The values ranged from -24.0 ‰ to -33.4 ‰, all typical of C3 plants. Regarding long-chain fatty acids, only two values, -32.8 ‰ and -36.5 ‰ for C<sub>30:0</sub> in samples CH<sub>0-2</sub> and NC<sub>5-10</sub>, respectively, could be determined. The rest of  $\delta^{13}C$  values corresponded to short-chain fatty acids: series of C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub> fatty acids with an typical even-over-odd carbon-number predominance. The averages of  $\delta^{13}C$  values were several units more negative in CH than in NC (a depletion of 1-4‰)

### 3.3. Real-time PCR assays and β-glucosidase gene expression

A real-time PCR standard curve was generated for bacterial 16S rRNA quantification. Serially diluted DNA originating from recombinant plasmids including the 16S rRNA fragment showed the single expected amplicon of approximately 193 bp. The equation describing the relationship between Ct and the log number of 16S rRNA copies was  $Ct = -4,327 \times \log(16S \text{ rRNA}) + 47,218$ ,  $R^2 = 0,997$ . Target molecules were linear from 10<sup>4</sup> to 10<sup>9</sup> copies

The highest level of 16S rRNA copies of bacteria was present in soils under cover crops, particularly in the top two layers (Fig. 1), decreasing as depth increased. The effect of depth was less evident in NC soils. On the contrary, the 16S rRNA transcript copy numbers were significantly higher in the uppermost 2 cm of non-covered soils, and a sharp decrease was noted in the two following layers, increasing again from 10 cm onwards. In CH soils, the trend was similar to that described for 16S rRNA gene copies

The primer set designed by Cañizares et al. (2011) for quantitative real-time PCR of β-glucosidase encoding genes in soil was used to detect and amplify sequences homologous to β-glucosidase genes in NC and CH soils. Agarose-gel electrophoresis confirmed the specific PCR product, resulting in a single band of the expected size, approximately 219 bp. A real-time PCR standard curve was then generated for β-glucosidase gene quantification. The equation describing the relationship between Ct and the log number of β-glucosidase gene copies was  $Ct = -4,797 \times \log(\beta\text{-glucosidase}) + 54,653$ ,  $R^2 = 0,999$ . Target molecules were linear from 10<sup>5</sup> to 10<sup>9</sup> copies. β-glucosidase gene copies followed a similar trend to that of 16S rRNA gene copies through both covered and bare soil profiles (Fig. 1). The β-glucosidase transcript copies were higher in the top 2 cm of NC and CH soils, decreasing

Table 2. Free acids composition for no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils (ng g<sup>-1</sup>)

	NC <sub>0-2</sub>	NC <sub>2-5</sub>	NC <sub>5-10</sub>	NC <sub>10-20</sub>	CH <sub>0-2</sub>	CH <sub>2-5</sub>	CH <sub>5-10</sub>	CH <sub>10-20</sub>
<b>C 8:0</b>	44.4					3.8		
<b>C 10:0</b>	3.9			8.7				
<b>C12:0</b>	11.9	11.0	15.3	19.2	12.3	9.6	17.3	8.3
<b>C14:0</b>	14.6	31.8	55.8	35.6	92.0	90.3	51.8	32.0
<b>a C15:0</b>		36.7	50.9	35.5	78.0	101	54.6	32.4
<b>i C15:0</b>			53.8	28.6	46.2	58.7		
<b>C15:0</b>			42.2	80.6	48.2	63.4	41.7	
<b>C16:1</b>			64.2	98.4	208	214	321	
<b>C16:0</b>	45.0	262	305	32.3	517	532	682	126
<b>a C17:0</b>					56.3	42.7		
<b>i C17:0</b>				69.9	38.0			
<b>C17:0</b>		38.1		86.3	49.1		30.6	
<b>C18:2+C18:3</b>	34.5	444	227	24.6	310	749	490	89.0
<b>C18:1</b>	17.3	241	108		214	410	906	99.2
<b>C18:0</b>	28.7	211	63.8		155	258	558	70.2
<b>C20:0</b>	15.3	23.4			62.1	36.6	21.8	
<b>C21:0</b>					44.2			
<b>C22:1</b>					88.5			
<b>C22:0</b>	17.9	31.1	32.9		82.8	61.2		
<b>C23:0</b>					76.6			
<b>C24:0</b>		38.3	41.1		129	83.7	27.8	
<b>C25:0</b>					106			
<b>C26:0</b>		40.7	43.7		157	62.7		
<b>C27:0</b>					111			
<b>C28:0</b>		56.3	55.1		260	55.2		
<b>C29:0</b>					215			
<b>C30:0</b>		110	90.3		615			
<b>C32:0</b>		382	304		284			
<b>Total</b>	233	1576	1249	520	3771	2832	3204	457
<b>Total C<sub>≤20</sub></b>	216	1299	986	520	1886	2569	3175	457
<b>Total C<sub>&gt;20</sub></b>	18	658	567	0	2169	263	28	0

**Table 3.**  $\delta^{13}C\%$  for no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils

	NC <sub>0-2</sub>	NC <sub>2-5</sub>	NC <sub>5-10</sub>	NC <sub>10-20</sub>	NC mean	CH <sub>0-2</sub>	CH <sub>2-5</sub>	CH <sub>5-10</sub>	CH <sub>10-20</sub>	CH mean
<b>C14:0</b>			-28.3	-28.3	-28.3					
<b>C16:1</b>			-28.3	-28.7	-28.5		-31.2	-33.3		-32.3
<b>C16:0</b>		-24.0	-27.2	-27	-26.1	-30.6	-30.9	-29.3		-30.3
<b>C18:2+C18:3</b>							-33.3			
<b>C18:1</b>		-27.1	-28.9	-29.2	-28.4	-33.4	-26.2	-30.7	-32.1	-30.6
<b>C18:0</b>		-31.5	-24.8	-26.1	-27.5		-27.4	-28.7		-28.1
<b>C30:0</b>			-36.5			-32.8				

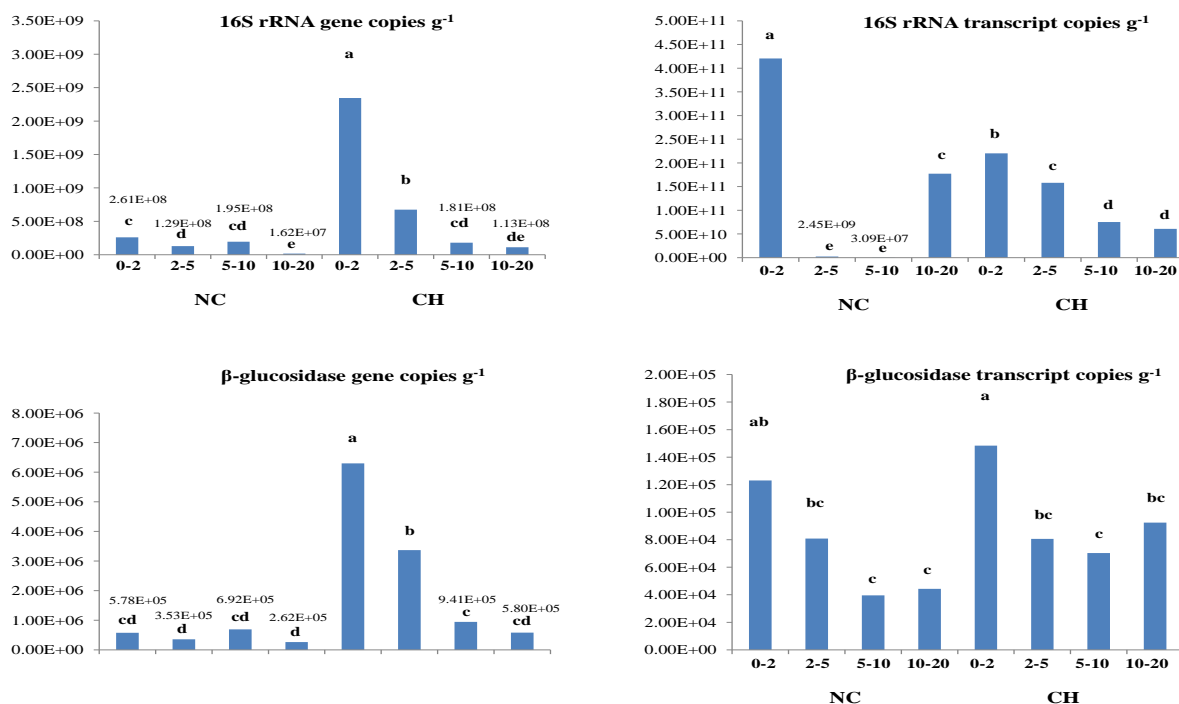
with depth. No significant differences were detected between homologous layers of the two treatments.

The highest and the lowest  $\beta$ -glucosidase transcript:gene copy ratios were found in the uppermost 5 cm of bare and covered soils, respectively (Fig. 2).

### 3.4. Molecular diversity of $\beta$ -glucosidase gene by PCR-DGGE analyses

Figure 3 shows the DGGE profiles of the soils, reflecting a much higher number of DGGE bands in soils under spontaneous vegetation. Especially poor was the stratum located between the 2 and 10 cm of NC soils.

For a comparison of the DGGE profiles, Nei and Li's indices were determined and UPGMA was used to create a dendrogram describing pattern similarities. The dendrogram generated revealed two clusters, determined by soil treatment, sharing less than 20% similarity (Fig. 4a). The structural diversity of the microbial community was also examined by Raup and Crick cluster analyses (Fig. 4b). Similarly, two clusters comprising soil layers of each treatment were distinguished. The  $S_{RC}$  values found by comparing the different soil layers showed that the surface layer of NC significantly differed from the whole stratum of CH ( $S_{RC} < 0.05$ ). Similarities between  $CH_{0-2}$  and  $CH_{2-5}$ , and between this latter and the subsequent



**Fig. 1.** Molecular estimates for no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils. Mean values are presented as copy numbers x g soil<sup>-1</sup>. Values are indicated when lower than the first y-chart. Vertical bars denote 0.95 confidence intervals. For each parameter, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc)

**Table 4.** Nearest match identification of DGGE bands for no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils

OTU	Soil layer								Nearest match identification (Genbank accession number) /Class	% Similarity
	NC <sub>0-2</sub>	NC <sub>2-5</sub>	NC <sub>5-10</sub>	NC <sub>10-20</sub>	CH <sub>0-2</sub>	CH <sub>2-5</sub>	CH <sub>5-10</sub>	CH <sub>10-20</sub>		
1	X	X	X	X	X	X	X	X	Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	51
2	X		X		X		X		Roseiflexus sp. RS-1 (YP_001277919.1) / Chloroflexi	56
3	X								Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	52
4	X								Deinococcus deserti VCD115(YP_002784606.1) / Deinococci	58
5	X					X			Roseiflexus castenholzii DSM 13941 (YP_001430669.1) / Chloroflexi	53
6	X					X			Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	54
7	X	X		X					Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	54
8	X			X	X	X	X	X	Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	53
9	X	X				X			Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	50
10	X								Micromonospora sp. ATCC 39149 (ZP_04604729.1) / Actinobacteria	53
11	X		X		X			X	Stigmatella aurantiaca DW4/3-1 (ZP_01465937.1) / $\delta$ -Proteobacteria	53
12	X	X		X					Methylococcus capsulatus str. Bath (YP_114028.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	59
13	X			X					Fervidobacterium nodosum Rt17-B1 (YP_001411030.1) / Thermotogae	52
14	X	X	X					X	Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	54
15	X		X		X		X		Roseiflexus castenholzii DSM 13941 (YP_001430669.1) / Chloroflexi	50
16	X		X		X		X		Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	51
17			X			X		X	Deinococcus deserti VCD115 (YP_002784606.1) / Deinococci	52
18			X			X		X	Thermoanaerobacter pseudethanolicus ATCC 33223 (YP_001665894.1) / Firmicutes	50
19					X			X	Sphingomonas sp. 2F2 (ADY18331.1) / $\alpha$ -Proteobacteria	63
20				X					Sulfobacillus acidophilus TPY (YP_004719852.1) / Firmicutes	52
21				X					Amycolatopsis mediterranei U32 (YP_003764642.1) / Actinobacteria	46
22				X					Methylococcus capsulatus str. Bath (YP_114028.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	51
23				X					Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	52
24					X	X		X	Herpetosiphon aurantiacus ATCC 23779 (YP_001545169.1) / Chloroflexi	50
25					X	X		X	Sphingomonas sp. 2F2 (ADY18331.1) / $\alpha$ -Proteobacteria	56
26	X		X	X	X	X	X	X	Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	53
27	X		X	X	X		X	X	Clostridium Cellulovorans (3AHX_A) / Firmicutes	53
28	X	X		X	X	X	X	X	Deinococcus deserti VCD115 (YP_002784606.1) / Deinococci	58
29	X			X	X	X	X	X	Thermosiphon melanesiensis BI429 (YP_001306867.1) / Thermotogae	50
30	X		X	X	X	X	X	X	Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	53
31	X	X				X			Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	53
32				X		X	X	X	Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	53
33			X			X			Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	53
34						X		X	Methylococcus capsulatus str. Bath (YP_114028.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	54
35					X	X	X		Sphingomonas sp. 2F2 (ADY18331.1) / $\alpha$ -Proteobacteria	54
36	X			X		X			Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	53
37					X	X	X	X	Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	53
38	X		X	X	X	X	X	X	Alteromonas sp. SN2 (YP_004469298.1) / $\gamma$ -Proteobacteria	53
39	X	X	X	X	X	X	X	X	Sphingomonas sp. 2F2 (ADY18331.1) / $\alpha$ -Proteobacteria	59

deeper layer, were also identified ( $S_{RC}>0.95$ ). The same occurred for NC<sub>5-10</sub> and the top and deeper layers of CH. For the rest of the DGGE profiles compared, the similarity was no greater than expected by chance ( $0.95A>S_{RC}>0.05$ ). Similarities between CH<sub>0-2</sub> and CH<sub>2-5</sub>, and between this latter and the subsequent deeper layer, were also identified ( $S_{RC}>0.95$ ). The same occurred for NC<sub>5-10</sub> and the top and deeper layers of CH. For the rest of the DGGE profiles compared, the similarity was no greater than expected by chance ( $0.95A>S_{RC}>0.05$ ).

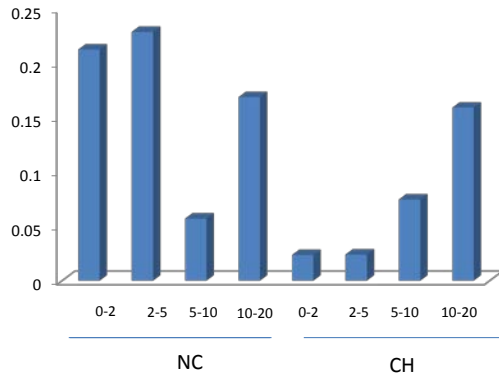


Fig. 2.  $\beta$ -glucosidase transcripts:genes ratio in no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils

Representatives of bands that were clear and had high intensity were excised from DGGE gels and sequenced. The sequences of a total of 65-DNA fragments were successfully determined (219 bp). Of 59 sequences, representing 39 OTUs, only 7 were exclusive to one treatment (Table 4). The Proteobacteria phylum clearly dominated all the soil samples, but representatives of Chloroflexi, Deinococci, Actinobacteria, Thermotogae, and Firmicutes class were also detected.

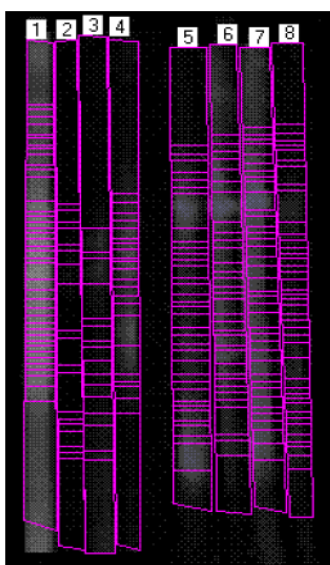


Fig. 3. DGGE profiles. 1: NC depth 0-2 cm, 2: NC depth 2-5 cm, 3: NC depth 5-10 cm, 4: NC depth 10-20 cm, 5: CH depth 0-2 cm, 6: CH depth 2-5 cm, 7: CH depth 5-10 cm, 8: CH depth 10-20 cm

Molecular diversity  $\theta(\pi)$  of sequenced clones ranged from  $114\pm 62.7$  to  $128\pm 65.2$ , and no significant differences between or within treatments were found. Nevertheless, a significant between-group (NC vs. CH populations) component of genetic variation was evidenced by the AMOVA analysis ( $F_{CT} = 0.00674$ ,  $P<0.05$ ).

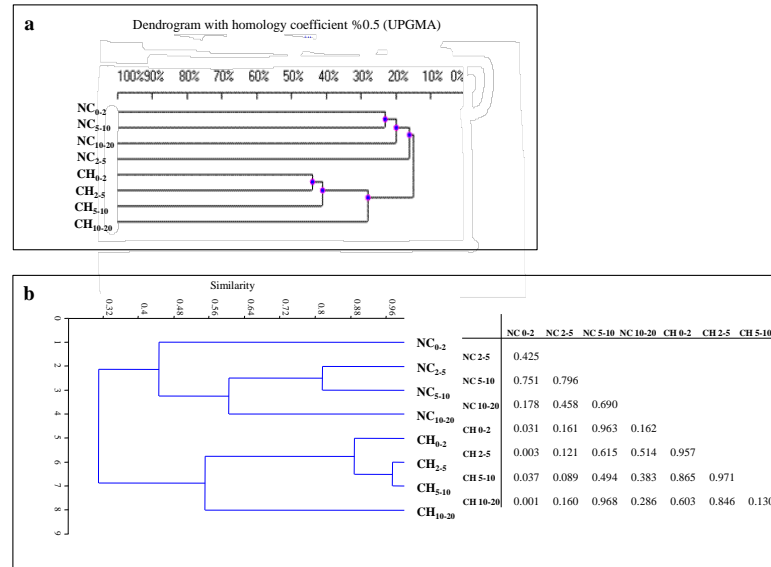


Fig. 4. UPGMA dendrogram (a) and Raup and Crick probability-based index of similarity cluster analyses and similarity values (SRC) between samples (b) for DGGE profiles for no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils

#### 4. Discussion

Organic-matter dynamics in semi-arid Mediterranean areas are strongly influenced by climatic conditions. In rainfed olive orchards, spontaneous vegetation represents the major input of biomass C into the soil. Plant biomass in CH was estimated around 2500 kg per ha per year, while no biomass was measured in NC soils, given that the surface was always kept free of vegetation with herbicides (Castro et al., 2008). Nevertheless, after more than 30 years of the experiment, SOC in both treatments proved similar throughout the soil profile, except in the first few cm, and the same was true of the readily available organic carbon. This apparent discrepancy between biomass input and SOC levels in soils may indicate a higher degree of mineralization in the subsurface of CH treatment. In fact, the lack of vegetation in NC soils tends to compact the surface, resulting in a greater bulk density (Castro et al., 2008). The C mineralization rate is considerably affected by bulk density, while the depression of C mineralization in compacted soils leads to higher organic-matter accumulation (De Neve and Hofman, 2000).

This assumption could be strengthened by considering free fatty acid soil-profile distribution. Long-chain acids ( $>C_{20}$ ) are considered typical of higher plant-leaf waxes (Zelles, 1999; Nuñez et al., 2002) and are commonly found in lipid extracts of whole soils (Quenea et al., 2006). Long-chain fatty acids are poorly soluble and highly refractory to metabolism by microorganisms

(Matsumoto et al., 2007) and they were particularly abundant in the top layer of CH soils. However, subsurface layers of NC soils presented higher levels than in the corresponding layer of CH soils. This finding could imply a higher rate of mineralization in these latter, and a protective effect of cover crops in the top 2 cm. Being hardly degradable, these could also appear as the remains of old organic matter in a minority way at almost any level, and thus explain the minor amounts found at the deeper levels in both treatments.

Short-chain fatty acids ( $\leq C_{20}$ ) are abundant in plant cells and microorganisms such as bacteria and fungi but are more difficult to assign to a specific origin and could come from prokaryotes and eukaryotes. Furthermore, being more soluble and easily metabolized by microorganisms, they could be present at different depths as debris from organic matter and the remains of microorganisms. They have even been described as root exudates characteristic of the rhizosphere (Matsumoto et al., 2007). An increase was detected between the first and the third layer of both treatments, with a sharp decrease in the deepest one. In any case, the higher levels of short-chain fatty acids in all CH layers indicate greater microbial activity throughout the upper 20 cm of soil (Fernandez et al., 2003; Rubino et al., 2009). Branched acids reflect the contribution of bacterial acids to SOM. In fact, limited soil microbial activity is frequently associated with low levels of short-chain and branched (iso and anteiso) acids (Naafs et al., 2004). The presence of branched fatty acids in the top CH and the lack of them in the top NC could reflect that a microbial reworking of higher plant components happens only in the covered soils.

Stable-isotope analysis may help to distinguish the different sources of organic matter (Glaser 2005; Medeiros and Simoneit 2007). The isotopic composition of short-chain fatty acids was several units heavier in NC soils. This trend, associated with the contribution of microbially derived organic material to short-chain acids in soil (Dilly et al., 2001; Boschker and Middelburg, 2002), could weaken the above assumption about the higher microbial activity of covered soils. Nevertheless, these results may reflect a temporal decomposition of different compounds with different  $\delta^{13}C$  (Rubino et al., 2009), and a higher proportion of vegetal vs. microbial-derived organic matter in the CH treatment could be inferred.

Soil-enzyme activities also revealed that the highest microbial (dehydrogenase) and hydrolytic enzyme activities ( $\beta$ -glucosidase, phosphatase and urease) took place on the surface of covered soils. Hydrolytic enzymes are the agents mainly responsible of soil organic-matter degradation and therefore they have been broadly used to assess soil carbon and nutrient dynamics (Shi, 2011). Soil-enzyme activities related to C, N, and P cycles correlated well with both total and easily available organic carbon in all soil samples. The water-soluble extracts contain simple organic compounds (Charest et al., 2004) able to induce hydrolytic enzyme synthesis (Nannipieri et al., 2008). The results indicated that the potential hydrolytic activity of the

different soil layers was significantly higher in the top few cm of soils under spontaneous plant cover.

However, this conjecture is difficult to accept, given that current soil-enzyme methods measure potential enzyme activities under optimal soil conditions, rather than under natural *in situ* conditions (Wallenstein and Weintraub, 2008). Besides the quantity and the quality of the soil organic matter, the activity of hydrolytic enzymes in soil is regulated by spatially and seasonally dependent variables such as pH, temperature, and moisture. (Nannipieri, 2006; Trasar-Cepeda et al., 2007; Wallenstein et al., 2011), these being environmental parameters that are not reproducible in the laboratory.

For insight into the impact of soil management on soil C-cycle, analyses of constitutive (DNA) and transcriptionally active (RNA) bacterial  $\beta$ -glucosidase genes were included. The number of copies of  $\beta$ -glucosidase genes corroborates the highest potential of top layer of the covered soils to process C polymers to energy-yielding substrates. Except for the high value found in the layer 2-5 cm in the CH treatments, the results were consistent with those for  $\beta$ -glucosidase activity, despite that these encompass the overall  $\beta$ -glucosidase activity of the microorganism, as well as a significant fraction of immobilized exoenzymes as organo-mineral-enzyme complexes (Zimmerman and Ahn, 2011). In addition, a relationship between the number of  $\beta$ -glucosidase and 16S rRNA genes was also evidenced.

Nevertheless,  $\beta$ -glucosidase transcript copies followed a different trend. Both treatments revealed the depletion of  $\beta$ -glucosidase transcription from the top to the deeper layer, with no significant differences between corresponding layers. Therefore, under current conditions of soil drought, temperature, pH, etc., the real transcription was quite different from the potential transcription of  $\beta$ -glucosidase genes. The ratio between transcripts and genes indicated the higher gene expression in the top 5 cm of bare soils with respect to covered soils, as well as comparable levels in the deeper corresponding layers. Therefore, there was no correlation between  $\beta$ -glucosidase gene expression and total, easily available organic carbon or microbially derived short-chain fatty acids. The suggestion is, consequently, that regulation of bacterial  $\beta$ -glucosidase genes was determined not only by the quantity or quality of enzyme-inducing substrates but also by the bacterial activity in our soil samples. Regulation of bacterial  $\beta$ -glucosidase biosynthesis is still unknown. There is a substantial number of studies concerning the enzyme kinetic parameters, the effect of land use, pH, temperature or availability of C-substrates on  $\beta$ -glucosidase activity (Shackle et al., 2000; Trasar-Cepeda et al., 2007; Moscatelli et al., 2011), some of these focusing on the induction of  $\beta$ -glucosidase genes in bacterial cultures (Busto et al., 1995), but the transcriptional and post-transcriptional regulations of bacterial  $\beta$ -glucosidase genes under current conditions of soils remain to be examined. Biochemical and molecular approaches to understand enzyme regulation mechanisms in soils are needed.

Molecular diversity of genes provided insights into the impact of soil management on bacterial  $\beta$ -glucosidase genes. The DGGE-generated dendrograms, both evidencing two soil groups corresponding to the two soil managements, showed a clear effect of land use on the molecular diversity of  $\beta$ -glucosidase genes. From a deeper perspective, analyses of the DNA sequences of the different OTUs revealed a similar diversity throughout the soil profile in each treatment, but also the consequences of soil management on the molecular diversity of  $\beta$ -glucosidase genes. Therefore, some type of bacterial specialization due to management may be inferred. Despite that the authors have evidenced the impact of management on the structure of the bacteria populations (Moreno et al., 2009), the above assumption should be taken with caution, since almost all of the DGGE bands had low similarity to sequences in the NCBI database, and thus it is difficult to determine whether the sequences represent taxa for which no  $\beta$ -glucosidase genes are available or are of low quality because only partial sequences could be retrieved.

This paper offers a methodological contribution to study the mechanisms of regulation of genes encoding hydrolytic enzymes under *in situ* conditions in soils. In this work, expression and molecular diversity of the biotic form of soil bacterial  $\beta$ -glucosidase enzyme have been determined and found to be a function of management under semiarid conditions.

## Acknowledgements

This work was supported by ERDF-cofinanced grant CGL2009-07907 from the Spanish Ministry of Science of Innovation. R. Cañizares is supported by the JAE-CSIC predoctoral Program. The GC-MS analyses were made at the Scientific Instrumentation Service, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain. The stable isotope analysis were carried out at the Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona - CCiTUB, Barcelona, Spain.

## References

- Abrajano Jr, T.A., Murphy, D.E., Fang, J., Comet, P., Brooks, J.M., 1994.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios in individual fatty acids of marine mytilids with and without bacterial symbionts. *Organic Geochemistry* 21, 611-617.
- Austin, A.T., Yahdjian, L., Stark, J.M., Belnap, J., Porporato, A., Norton, U., Ravetta, D.A., Schaeffer, S.M., 2004. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* 141, 221-235.
- Benitez, E., Nogales, R., Elvira, C., Masciandaro, G., Ceccanti, B., 1999. Enzyme activities as indicators of the stabilization of sewage sludges composting with *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology* 67, 297-303.
- Boschker, H.T.S., Middelburg, J.J., 2002. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 40, 85-95.
- Busto, M.D., Ortega, N., Perez-Mateos, M., 1995. Induction of  $\beta$ -glucosidase in fungal and soil bacterial cultures. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 949-954.
- Cañizares, R., Benitez, E., Ogunseitán, O.A., 2011. Molecular analyses of  $\beta$ -glucosidase diversity and function in soil. *European Journal of Soil Biology* 47, 1-8.
- Castro, J., Fernández-Ondoño, E., Rodríguez, C., Lallena, A.M., Sierra, M., Aguilar, J., 2008. Effects of different olive-grove management systems on the organic carbon and nitrogen content of the soil in Jaén (Spain). *Soil and Tillage Research* 98, 56-67.
- Charest, M.H., Antoun, H., Beauchamp, C.J., 2004. Dynamics of water-soluble carbon substances and microbial populations during the composting of deinking paper sludge. *Bioresource Technology* 91, 53-67.
- De Neve, S., Hofman, G., 2000. Influence of soil compaction on carbon and nitrogen mineralization of soil organic matter and crop residues. *Biology and Fertility of Soils* 30, 544-549.
- Degens, B.P., Schipper, L.A., Sparling, G.P., Vojvodic-Vukovic, M., 2000. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 189-196.
- Dilly, O., Bartsch, S., Rosenbrock, P., Buscot, F., Munch, J.C., 2001. Shifts in physiological capabilities of the microbiota during the decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutinosa* (Gaertn.) L.) forest. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 921-930.
- Durán Zuazo, V., Rodríguez Pleguezuelo, C., 2008. Soil-erosion and runoff prevention by plant covers. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 28, 65-86.
- European Environment Agency., 2008. Impacts of Europe's changing climate: 2008 indicator-based assessment. EEA Report No 4/2008. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 246 pp.
- Esen, A., 1993.  $\beta$ -glucosidases overview, In: Esen, A. (Ed.),  $\beta$ -glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology. American Chemical Society, Washington DC, pp. 1-14.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- FAO., 1998. World Reference Base for Soil Resources. World Soil Resources Reports 84. FAO-ISRIC-ISSS, Roma.



- Fernandez, I., Mahieu, N., Cadisch, G., 2003. Carbon isotopic fractionation during decomposition of plant materials of different quality. *Global Biogeochem. Cycles* 17, 1075.
- García, C., Hernandez, T., Costa, F., 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 28, 123-134.
- Glaser, B., 2005. Compound-specific stable-isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ) analysis in soil science. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168, 633-648.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4.
- Klose, S.K., Tabatabai, M.T., 2002. Response of glycosidases in soils to chloroform fumigation. *Biology and Fertility of Soils* 35, 262-269.
- Knight, T.R., Dick, R.P., 2004. Differentiating microbial and stabilized  $\beta$ -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 2089-2096.
- Lal, R., 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123, 1-22.
- Makoi, J.H.J.R., Ndakidemi, P.A., 2008. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology* 7, 181-191.
- M.A.P.A., 1986. Métodos oficiales de análisis. Tomo III. Plantas, productos orgánicos, fertilizantes, suelos, agua, fertilizantes orgánicos. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Matsumoto, K., Kawamura, K., Uchida, M., Shibata, Y., 2007. Radiocarbon content and stable carbon isotopic ratios of individual fatty acids in subsurface soil: Implication for selective microbial degradation and modification of soil organic matter. *Geochemical Journal* 41, 483-492.
- Medeiros, P.M., Simoneit, B.R.T., 2007. Gas chromatography coupled to mass spectrometry for analyses of organic compounds and biomarkers as tracers for geological, environmental, and forensic research. *Journal of Separation Science* 30, 1516-1536.
- Metzger, M.J., Rounsevell, M.D.A., Acosta-Michlik, L., Leemans, R., Schröter, D., 2006. The vulnerability of ecosystem services to land use change. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 114, 69-85.
- Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., Cañizares, R., Castro, J., Benítez, E., 2009. Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 131, 333-339.
- Moscatelli, M.C., Lagomarsino, A., Garzillo, A.M.V., Pignataro, A., Grego, S., 2011.  $\beta$ -Glucosidase kinetic parameters as indicators of soil quality under conventional and organic cropping systems applying two analytical approaches. *Ecological Indicators* In Press, Corrected Proof.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Naafs, D.F.W., Van Bergen, P.F., Boogert, S.J., De Leeuw, J.W., 2004. Solvent-extractable lipids in an acid andic forest soil; variations with depth and season. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 297-308.
- Nannipieri, P., 2006. Role of Stabilised Enzymes in Microbial Ecology and Enzyme Extraction from Soil with Potential Applications in Soil Proteomics, In: Nannipieri, P., Smalla, K. (Eds.), *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 75-94.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., Valori, F., 2008. Effects of Root Exudates in Microbial Diversity and Activity in Rhizosphere Soils, In: Nautiyal, C.S., Dion, P. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence*. Springer Berlin, Germany, pp. 339-365.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Matarese, E., 1980. Extraction of phosphatase, urease, protease, organic carbon and nitrogen from soil. *Soil Science Society of America Journal* 44, 1011-1016.
- Nei, M., Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 5269-5273.
- Newman, T., de Bruijn, F.J., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., McIntosh, L., Ohlroge, J., Raikhel, N., Somerville, S., Thomashow, M., Retzel, E., Somerville, C., 1994. *Genes Galore: A Summary of Methods for Accessing Results from Large-Scale Partial Sequencing of Anonymous Arabidopsis cDNA Clones*. *Plant Physiology* 106, 1241-1255.
- Núñez, R., Spiro, B., Pentecost, A., Kim, A., Coletta, P., 2002. Organo-geochemical and stable isotope indicators of environmental change in a marl lake, Malham Tarn, North Yorkshire, U.K. *Journal of Paleolimnology* 28, 403-417.
- Post, W.M., Kwon, K.C., 2000. Soil carbon sequestration and land-use change: processes and potential. *Global Change Biology* 6, 317-327.
- Qian, H., Hu, B., Cao, D., Chen, W., Xu, X., Lu, Y., 2007. Bio-safety assessment of validamycin formulation on bacterial and fungal biomass in soil monitored by real-time PCR. *Bulletin of*

- Environmental Contamination and Toxicology 78, 239-244.
- Quénéa, K., Largeau, C., Derenne, S., Spaccini, R., Bardoux, G., Mariotti, A., 2006. Molecular and isotopic study of lipids in particle size fractions of a sandy cultivated soil (Cestas cultivation sequence, southwest France): Sources, degradation, and comparison with Cestas forest soil. *Organic Geochemistry* 37, 20-44.
- Raup, D.M., Crick, R.E., 1979. Measurement of Faunal Similarity in Paleontology. *Journal of Paleontology* 53, 1213-1227.
- Rowan, A.K., Snape, J.R., Fearnside, D., Barer, M.R., Curtis, T.P., Head, I.M., 2003. Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 195-206.
- Rubino, M., Lubritto, C., D'Onofrio, A., Terrasi, F., Kramer, C., Gleixner, G., Cotrufo, M., 2009. Isotopic evidences for microbiologically mediated and direct C input to soil compounds from three different leaf litters during their decomposition. *Environmental Chemistry Letters* 7, 85-95.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537-7541.
- Schwieger, F., Tebbe, C.C., 1998. A New Approach To Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4870-4876.
- Shackle, V.J., Freeman, C., Reynolds, B., 2000. Carbon supply and the regulation of enzyme activity in constructed wetlands. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1935-1940.
- Shi, W., 2011. Agricultural and Ecological Significance of Soil Enzymes: Soil Carbon Sequestration and Nutrient Cycling, In: Shukla, G., Varma, A. (Eds.), *Soil Enzymology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 43-60.
- Stott, D.E., Andrews, S.S., Liebig, M.A., Wienhold, B.J., Karlen, D.L., 2010. Evaluation of  $\beta$ -glucosidase activity as a soil quality indicator for the Soil Management Assessment Framework. *Soil Science Society of America Journal* 74, 107-119.
- Štursová, M., Baldrian, P., 2011. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant and Soil* 338, 99-110.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1, 301-307.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F., Leirós, M.C., 2007. Thermodynamic parameters of enzymes in grassland soils from Galicia, NW Spain. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 311-319.
- Vivas, A., Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., Benitez, E., 2009. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technology* 100, 1319-1326.
- Von Mersi, W., Schinner, F., 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodinitrotetrazolium chloride. *Biology and Fertility of Soils* 11, 216-220.
- Wallenstein, M., Allison, S.D., Ernakovich, J., Steinweg, J.M., Sinsabaugh, R., 2011. Controls on the Temperature Sensitivity of Soil Enzymes: A Key Driver of In Situ Enzyme Activity Rates In: Shukla, G., Varma, A. (Eds.), *Soil Enzymology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 245-258.
- Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N., 2008. Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2098-2106.
- Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111-129.
- Zimmerman, A.R., Ahn, M.-Y., 2011. Organo-Mineral-Enzyme Interaction and Soil Enzyme Activity, In: Shukla, G., Varma, A. (Eds.), *Soil Enzymology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 271-292.



## CAPÍTULO 5

---

### **Molecular analyses of $\beta$ -glucosidase diversity and function in soil**



## Molecular analyses of $\beta$ -glucosidase diversity and function in soil

### Resumen

La incongruencia entre potencial genético y funciones asociadas a la producción de enzimas ha sido objeto de estudio para la comprensión de la influencia de las condiciones ambientales sobre las bases moleculares de la biogeoquímica del suelo. La  $\beta$ -glucosidasa es una enzima filogenéticamente conservada que juega un papel importante en el ciclo del carbono; su implicación en las últimas etapas de la degradación de la celulosa sugiere un importante papel de los procariontes del suelo en la regulación de la diversidad enzimática y funciones en determinados nichos ambientales. Por lo tanto, la evaluación de la diversidad molecular de esta enzima en los suelos es fundamental para comprender mejor la dinámica del carbono en el mismo. En este trabajo, se comprobó la hipótesis de si la disponibilidad de sustratos de carbono para la  $\beta$ -glucosidasa restringía la diversidad de grupos filogenéticos que son enzimáticamente activos en el suelo. Para ello, se elaboraron microcosmos a partir de suelos con cubierta vegetal y suelos desnudos, enmendados con celobiosa y glucosa. Posteriormente, se procedió a evaluar directamente la respuesta genómica y proteómica de la  $\beta$ -glucosidasa tras un período de incubación. Se observó la relativa densidad de la población de bacterias capaces de degradar celulosa, y exitosamente se diseñó y utilizó un conjunto de cebadores degenerados para emplearlos en PCR a tiempo real y así cuantificar el número de copias de genes  $\beta$ -glucosidasa en extractos de ADN bacteriano. También se desarrolló una estrategia de proteómica para determinar la actividad  $\beta$ -glucosidasa mediante electroforesis. Durante todo el experimento se usó como control positivo un cultivo puro de *Pseudomonas putida* capaz de degradar celobiosa que fue aislada del suelo control. Se observó que este organismo contenía tres proteínas de distinto tamaño molecular de 120, 300 y 669 kDa que mostraban actividad  $\beta$ -glucosidasa, detectándose también en ese rango de tamaño las proteínas extraídas directamente de suelo. Nuestros resultados mostraron que existe un amplio rango de bacterias capaces de procesar celobiosa en el suelo, siendo mayor la acción de dicha enzima cuando el suelo es enmendado con fuentes de carbono específicas. Este estudio contribuye a una mejor comprensión de las estrategias a nivel molecular de la diversidad y función de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en ecosistemas complejos.

Este artículo ha sido publicado en la revista **European Journal of Soil Biology** 47 (2011) 1-8





Contents list available at Science Direct

## European Journal of Soil Biology

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejsobi>



Original article

### Molecular analyses of $\beta$ -glucosidase diversity and function in soil

Rosa Cañizares<sup>a</sup>, Emilio Benitez<sup>a</sup>, Oladele A. Ogunseitan<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín (EEZ), CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

<sup>b</sup> Program in Public Health and School of Social Ecology, University of California, 1365 SE-II, Irvine, CA 92697, USA

#### article info

Article history:

Received 16 August 2010

Received in revised form

31 October 2010

Accepted 10 November 2010

Available online 27 November 2010

Handling editor: Christoph Tebbe

**Keywords:**

Bacteria

Carbon cycling

Cellobiose

Cellulose

Enzyme

Glucose

Glucosidase

Metaproteomics

Molecular

Proteomics

Real-time PCR

Zymogram

#### ABSTRACT

The incongruence of genetic potential and apparent functions associated with enzyme production has attracted research attempts to elucidate the environmental influences on the molecular underpinnings of soil biogeochemistry.  $\beta$ -glucosidase is a phylogenetically conserved enzyme that plays an important role in carbon cycling; and its involvement in the final stages cellulose degradation suggests an important role for soil prokaryotes in moderating enzymatic diversity and function in environmentally dynamic niches. Therefore, detailed assessment of the molecular diversity of this enzyme in soils is critical for refining models of terrestrial carbon fluxes. Here, we tested the hypothesis that the availability of specific carbon substrates for  $\beta$ -glucosidase constraint the diversity of phylogenetic groups that are enzymatically active in soils. To test this hypothesis, we constructed microcosms consisting of vegetation-covered and bare soils amended either with cellobiose or glucose. We then proceeded to directly assess the responses of genomic and proteomic contexts of  $\beta$ -glucosidase diversity over an incubation period. We monitored the relative population densities of bacteria capable of degrading cellulose, and we successfully designed and used a set of degenerate primers for real-time PCR to quantify genetic determinants of  $\beta$ -glucosidase in composite bacterial DNA extracts. We also developed a complementary proteomic strategy for electrophoretically resolving  $\beta$ -glucosidase activities in-gel. A pure culture of *Pseudomonas putida* capable of degrading cellobiose that we isolated from the natural soil was used as a positive control throughout the culture-independent experiments. We demonstrated that this organism contains three distinct proteins of molecular sizes 120, 300, and 669 kilodaltons exhibiting  $\beta$ -glucosidase activity, and we detected proteins in these size ranges in direct protein extracts from soil. Our results also show that there is a narrow range of bacteria capable of processing cellobiose in soil, but there is a broader versatility of enzyme action in the dominant organisms advantageously selected by amendment of soil with specific carbon sources. This study contributes to the strategies for molecular-level understanding of soil enzyme diversity and function in composite systems.

2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved

#### 1. Introduction

$\beta$ -glucosidase cleaves  $\beta$ -1,4 bonds to produce glucose from  $\beta$ -glucosides. This is an important reaction in terrestrial C cycling involving the recycling of plant cellulosic matter. The enzyme's involvement in the

degradation of cellulose to glucose suggests a tight correlation between its activity and the bioavailability of soil C [1]. However, reliance on this putative correlation for constructing numeric models of carbon cycling will require better understanding of the diversity of  $\beta$ -glucosidase-producing organisms and how their activities are influenced by environmental conditions, including the variability and bioavailability of carbon sources. Organic

\*Corresponding author. Tel.: +1 949 824 0611; fax: +1 949 824 0529. E-mail address: [Oladele.Ogunseitan@uci.edu](mailto:Oladele.Ogunseitan@uci.edu) (O.A. Ogunseitan).



matter decomposition in soil ecosystems is mediated by a phylogenetically broad group of soil organisms across the eukaryotic and prokaryotic domains, although the role of bacteria and fungi are better characterized than the others [2]. Sustained degradation of cellulose and other readily decomposable organic carbon sources is associated primarily with the activities of soil bacteria whose cellulases can be cell-bound or excreted, in contrast to the distinctively extracellular cellulases of fungi [3-5].

While the rate at which soil organic matter is metabolized is controlled by the quality of the available C [5], the extent of C limitation to microorganisms is controlled by the dynamics of extracellular enzyme activity [6]. Most of the studies on extracellular  $\beta$ -glucosidase in environmental samples have focused on fungi cultivated in the laboratory [7, 8], whereas less is known about bacterial  $\beta$ -glucosidase in this context [9, 10].

Metagenomic approaches have proven effective in exploring the diversity of indicator genes used to test hypotheses about the structural composition of soil-bacterial communities [11, 12]. However, these approaches have not been very fruitful in understanding  $\beta$ -glucosidase diversity in composite environmental samples, in part because of the paucity of information on the molecular genetics of the wide range of organisms involved. To circumvent the limitations associated with DNA-based approaches, proteomics offer a strategy to assess the outcome of the expression of genetic potential and the resulting phenotypes as influenced by environmental conditions [13]. Further, metaproteomics facilitates culture-independent analyses of the diversity of microbial community responses to external stimuli. These responses are potentially reliable biomarkers of soil health [14].

In this research we used artificial growth culture, genomic analyses, and proteomic approaches to investigate the molecular diversity and response of  $\beta$ -glucosidase to C stimulation. We followed the population densities of cellobiose-degrading bacteria, and we designed selective nucleotide primers to assess the presence of genes encoding for  $\beta$ -glucosidase in DNA extracted directly from soil. We also implemented a proteomic strategy for resolving and locating  $\beta$ -glucosidase activities in soil metaproteome directly in electrophoresis gels by detecting a fluorescent product based on methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucoside as substrate. Our results advance the understanding of the molecular underpinnings of community enzymes role in soil carbon cycling.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Soil microcosms

Soil samples representing two different environments (vegetation-cover and no cover soils) were collected from the arboretum research facility of the University of California (Irvine, CA, USA). Samples were collected up to a depth of 50 cm and then transported to the laboratory, sieved (< 2 mm) and immediately conserved at 4°C. Soil

samples were subjected to bacteria enumeration and DNA and protein extraction within 2 days after their collections.

Each type of soil (100 g) was dispensed into 500 ml capacity soil Teflon microcosm. Triplicate microcosms were amended with cellobiose (CB+) and glucose (GLU+) at a concentration of 420  $\mu$ g/g of soil, according to Steinweg et al. [15]. Unamended control microcosms (C) received 4.2 ml of distilled water, estimated on the basis of the water holding capacity, to maintain soil moisture content equivalent to the amended soils.

Soils analyses were done in triplicate at time 0 and after 15 days of incubation in the amended and control soil microcosms.

### 2.2 Total bacterial population and specific cellobiose degraders

Total bacteria and specific cellobiose degraders were evaluated through viable cell counts on Tryptic Soy Agar plates (TSA, Difco) and Cellobiose Polymyxin Colistin Agar medium plates (CPC, Fluka), respectively. One g of soil of each treatment was mixed into 10 ml of phosphate buffer saline pH 7.0 (0.14M NaCl, 0.002M KCL, 0.01M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.001M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), followed by serial dilution.

A pure culture of a bacterium was isolated from the CPC medium in the control soil and then identified through fatty acid methyl esterase (FAME) analysis. The highest FAME similarity index (0.819) matched the profile of *Pseudomonas putida*. This bacterium was used as a positive control throughout the experiments.

### 2.3 Soil DNA Analyses

#### 2.3.1. Design of Oligonucleotide Primers to Detect $\beta$ -glucosidase Genes

To identify  $\beta$ -glucosidase genes, a set of oligonucleotide primers was designed based on the evaluation of a broad spectrum of soil bacteria. Nucleotide and amino acid sequences were retrieved from the National Center for Biotechnology Institute (NCBI), European Molecular Biology Laboratory (EMBL) and PUMA2. Sequences were analysed using the BLAST program and the GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Multiple sequence alignments were conducted with Clustal W algorithm [16]. Sequences with high similarity and low E-values were selected for a final multiple sequence alignment. Two degenerate primers  $\beta$ gluF and  $\beta$ gluR2 (Table 1) were then designed around conserved motifs presents in soil-bacterial  $\beta$ -glucosidase genes, and tested for accuracy through pilot PCR amplification of soil-DNA extracts. The PCR reaction mixture (25  $\mu$ l) contained 10 ng of DNA extracted from soil, 400 mM each primer and 10  $\mu$ l Eppendorf Master Mix (2.5x) and sterile Milli-Q water to a final volume. Amplification was conducted with an initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 45 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing for 1

min at 45°C, extension for 1 min at 72°C, and a final primer extension for 7 min at 72°C.

Next, the oligonucleotide sequences were aligned to facilitate the design of a new degenerate sense primer  $\beta$ gluF2 and antisense primer  $\beta$ gluR4 (Table 1) amplifying a smaller DNA region (180 bp), in order to perform real-time PCR strategy. For this strategy, each 21  $\mu$ l PCR reaction contained 2-5 ng of the DNA, 400 nM of each primer and 10.5  $\mu$ l 2 x IQ SYBER Green Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany). The real-time PCR program employed was as follows: 2 min at 50° C for carry-over prevention, 5 min at 95°C for enzyme activation, followed by 45 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 53°C and 45s at 72°C, followed by a final extension for 7 min at 72°C. PCR amplification procedure was checked with a heat dissociation protocol (from 70°C to 100°C) after the final cycle of the PCR. For each extracted DNA, real-time experiments were carried out three times with the threshold cycle (*C<sub>t</sub>*) determined in triplicate.

Melting curve analyses and quantification of the gene copy number was performed on Eppendorf Mastercycler Eppgradient Realplex 4 version 2.2 (Westbury, NY, USA). The amplification procedure was checked with a heat dissociation protocol (from 70°C to 100°C) after the final cycle of the PCR. Curves were generated by using a recombinant plasmid containing one copy of  $\beta$ -glucosidase gene from the positive control bacterium *P. putida*. The *C<sub>t</sub>* values were plotted against the logarithmic transformation of the copy number, estimated through serial dilution plasmid DNA concentration. As *C<sub>t</sub>* values may vary slightly between experiments, three dilution series of pure standard DNA were run parallel in all experiments. The relationship between *C<sub>t</sub>* and the target gene copy number, and the copy number of the real-time standard were calculated as described by [17]. Melting curves were drawn by plotting the melting point values as a function of the  $dI/dT$ , where  $dI$  is the change in fluorescence intensity and  $dT$  is the change in temperature. As melting curve values may vary slightly between experiments, three dilution series of pure standard DNA were run parallel in all experiments.

**Table1.** Primers used for PCR amplifications in this study

Primer	Sequence (5'-3')*	Amplicon (bp)
$\beta$ -gluF	ACNYTNTAYCAYTGGG	900
$\beta$ -gluR2	GAYAAATTYGARTGG	900
$\beta$ -gluF2	TTCYTBGGYRTCAACTACTA	180
$\beta$ -gluR4	CCGTTYTCGGTBAYSWAGA	180

### 2.3.2. Subcloning and Sequencing of PCR Products

PCR products obtained with degenerate primers were resolved electrophoretically on 1.6 % agarose, and bands in the range of the expected size of the PCR product (900 pb or 180 pb) were purified from the gel using the MBL

Agarosa Quickclean kit (Dominion-MBL SL, Spain), and inserted into a cloning vector following standard protocols (Invitrogen, California, USA). Nucleotide sequences were determined by using Taq polymerase cycle sequencing and an automated DNA sequencer (Perkin-Elmer ABI Prism 373). All clones were sequenced in both strands using universal forward and reverse primers.

### 2.3.3. Soil DNA extraction

DNA was extracted from bulk soil in triplicate from subsamples of 500 mg of soil by modified bead beating methods [18] complemented with a phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) extraction [19]. The DNA samples were checked for concentration and quality using Nanodrop® ND-100 spectrometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

### 2.4 Soil Protein Analyses

Proteins were extracted from 50 g of soil and purified according to Ogunseitan [20, 21]. Briefly, soil samples were suspended in 1.5 volumes (w/v) of cold 0.3 M  $K_2HPO_4$ , plus 0.5 volume of 0.3 M EDTA (pH 8.0). The suspension was subjected to sonication using a medium-tipped (1 cm) probe using a Sonic Dismembrator® Model 550 (Fisher Scientific, Tustin, CA) at ~ 20 kHz for 60 minutes (in 10 s pulses) in an ice bucket. The samples were then agitated on a rotary shaker at 100 rpm in the cold room (0-4 °C) for 12–18 hours (overnight). Sonication was repeated in the second step. To recover the protein fraction, the samples were subjected to centrifugation at 3,000  $\times$  g for 10 minutes to remove large particles. The supernatant was collected for repeated centrifugation at 25,000  $\times$  g for 25 minutes at 4°C to completely remove all suspended particulate matter. Protein molecules were then precipitated from the supernatant by adding 60% (w/v)  $(NH_4)_2SO_4$ , adjusting the pH to 7.0 by adding 1 M  $KH_2PO_4$ , and incubating in at 0-4 °C overnight (12 – 18 hours). Precipitated proteins were then recovered by centrifugation at 25,000  $\times$  g for 25 minutes at 4°C, followed by resuspension in an appropriate volume (e.g. 10 ml) of 0.2 M  $K_2HPO_4$  per gram of wet precipitate, with adjustment of pH to 7.0. Further purification of soil protein extracts was achieved by dialysis against 0.02 M phosphate buffer overnight in the cold room (0-4 °C). The dialysate was centrifuged at 25,000  $\times$  g for 25 minutes at 4°C to collect supernatant, which is now ready for the determination of protein concentration, enzyme assays, electrophoresis, and other analytical methods. Proteins from axenic culture of *P. putida* were extracted following Ogunseitan [22] with few modifications: sonication was operated in 3 pulses of 20 seconds following a stop of 10 seconds for a total time of 30 min.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using the precast gel from Jule (Jule Inc, Milford, USA) with the

following characteristics: 1.5 mm thick, 8 % - 16% acrylamide gradient, Tris-Glycine Gels with SDS. The gel buffer, anode and cathode buffer, were prepared following the protocol from Schagger and Jagow [23] in Hoefer SE600 equipment (San Francisco, CA, USA). Protein staining was made with Coomassie Blue PhastGelR-350 Tablets following the manufacturer's instructions for the staining and de-staining of the gel.

Non-denaturing PAGE and zymogram analysis of  $\beta$ -glucosidase enzyme: Native gels were performed using the precast gel describe above without SDS. The gel buffer (10x) was 0.025M Tris base, 0.192M Glycine in 1 liter of dionized water.  $\beta$ -glucosidase activity in gels was tested with 0.5mM 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucoside (MUGlc) (MPBIO) in 50mM of succinic acid buffer [7].

2.5. Data analyses

Data were analyzed using the program SPSS 15.0 for Windows (Chicago, Ill, USA) and Least Significant Difference Test was used to separate the means with an overall significance level of 95% ( $P < 0.05$ ).

3. Results

3.1. Total and Specific Bacterial Population Densities

Similar numbers of cultivable bacteria was found in both vegetation-covered and non-covered (bare) soil at the beginning of the incubation period (Fig. 1). After the incubation period, no effect of carbon source amendment was detected except in vegetation-covered soil microcosms amended with cellobiose, which showed significantly ( $P < 0.05$ ) higher number of total cultivable bacteria than non-covered soils.

When we used CPC, a selective medium formulated to enhance the growth of bacteria able to degrade cellobiose into glucose, bacteria in the bare soils showed an initial higher population of cellobiose-degraders (Fig. 2); although a similar percentage from total cultivable bacteria (~50%) was detected in both soils. A decline in bacterial population densities was noticed in both bare and vegetation-covered soils during the incubation period. This decline was statistically significant, except in soils amended with glucose. Overall, higher numbers of cultivable bacteria were observed in vegetation-covered soils than in bare soils.

3.2. Real-time PCR assay

We developed two oligonucleotide primers ( $\beta$ -gluF2 and  $\beta$ -glucR4) to detect and amplify sequences homologous to  $\beta$ -glucosidase encoding genes in soil (Fig. 3 and Table 1). The primers were used for real-time PCR targeting DNA templates extracted from soil. DNA extracted from pure culture of soil *P. putida* and bulk soils amended with cellobiose revealed single peaks in the standard curve, with  $T_m$  of 88°C and 88.5 °C, respectively

(Fig. 4b,d). However, un-amended control soils and soils amended with glucose showed two peaks with  $T_m$  of 89 °C and 91 °C and  $T_m$  88.8 °C and 91.2 °C, respectively (Fig. 4c,e). The variation in melting points of different PCR products was postulated to be responsible for the different peaks. Therefore, we conducted agarose gel electrophoresis to confirm specific PCR product resulting a single band of the expected size, approximately 180bp (Fig. 4a).

A real-time PCR standard curve was generated for  $\beta$ -glucosidase gene quantification. Target molecules from our control *P. putida* were linear from  $10^1$  to  $10^4$ . The minimum detection limit in the control was  $1 \times 10^3$  copies per reaction for  $\beta$ -glucosidase gene.  $\beta$ -glucosidase gene copies were consistently lower in soils under vegetation cover and no significantly differences were found due to cellobiose or glucose addition to soils (Fig. 5).

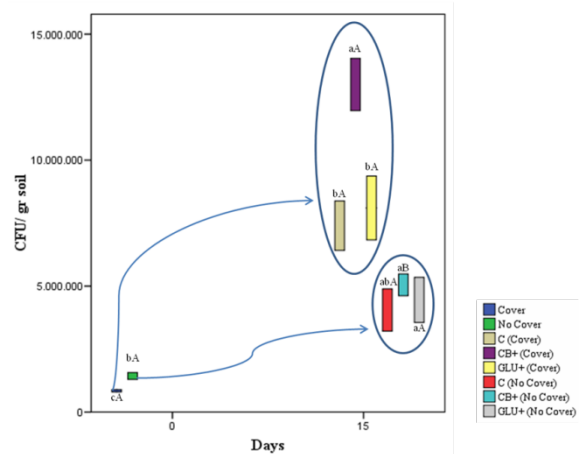


Fig. 1. Total TSA plate enumerations (means standard deviations). Different lower- case letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments of covered or non-covered soils; different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between covered and non-covered soils of any single treatment.

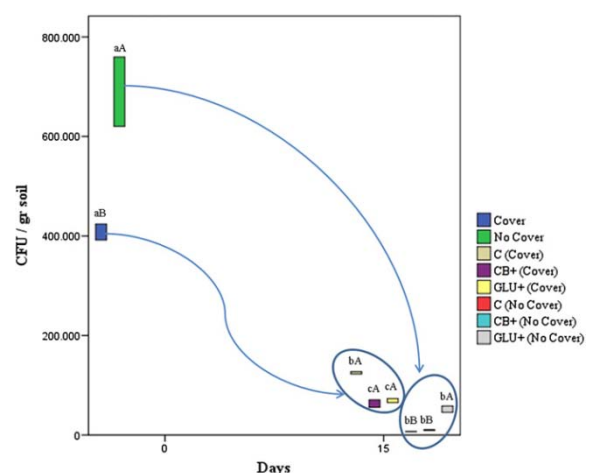


Fig. 2. Total CPC plate enumerations (means standard deviations). Different lower-case letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments of covered or non-covered soils; different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between covered and non-covered soils of any single treatment.

3.3.  $\beta$ -glucosidase Zymograms

To assess the molecular diversity of  $\beta$ -glucosidase enzymes in soils, we conducted zymogram analysis with proteins extracted directly from covered and non-covered soils, and from the positive control bacterium, *P. putida*. The product of the enzymatic reaction was evidenced by fluorescent bands due to the MUGlc [7]. The zymogram showed three fluorescent bands in *P. putida* proteome (120, 300, 669kDa) and fluorescence zone was detected in this molecular size range in every soil proteome that we assessed (Fig. 6). To further confirm the molecular sizes, we performed SDS-PAGE stained with Coomassie Blue to reveal the entire protein profile, and the molecular mass of  $\beta$ -glucosidase proteins. The position of the three activity bands correlated with three Coomassie-stained bands as expected. The 120 kDa protein showed the highest concentration. (Fig.7).

4. Discussion

The results of the three assessment protocols, including monitoring of total and specific bacterial population, genomic analyses, and proteomic assessment, all support the view that vegetation cover and bioavailability of carbon source influences the dynamics of bacteria populations in soils. The higher initial number of viable bacteria grown on CPC medium of the bare soils, as well as the subsequently higher decrease observed in covered soils indicates that bacteria in bare soils can quickly utilize cellobiose. Many factors can influence the population density of cellobiose degraders in soils, especially in an enclosed microcosm over a period of incubation.

The general decline in bacteria recovered in CPC medium across the set of microcosms may imply particular sensitivity of this sub-population to incubation conditions associated with pH changes during to carbon source depletion. This phenomenon needs to be better understood through further investigation. The proportions of cellulose degraders, with respect to total bacteria, was higher in vegetation-covered soils (1.69%) than in bare soil (0.17%), and expectedly, a higher number of cellobiose-utilizing bacteria were observed in covered soils amended with cellobiose. In soils amended with glucose, we did not observe differences in the two soil types, using selective growth medium for cellobiose-utilizers. This is probably because glucose is easily assimilated by a wide variety of organisms in soil.

The extrapolation of these results to *in situ* soil conditions must be done with caution because of the widely accepted view that less than 1% of the microorganisms in soils can be cultivated under laboratory conditions [24]. This limitation of bacterial cultivation justifies the refinement of techniques capable of resolving molecular diversity directly without the need for cultivation. Application of direct molecular assessments is particularly essential for investigating the role of bacterial enzymes that are associated with biogeochemical cycling and complex biotic interactions in soils [25].

Metcalfe et al. [26], working on chitinase, were the first to relate the presence of genes codifying enzyme and the enzyme activity of soil. In the present work, we optimized the use of a set of degenerate primers that we designed for real-time PCR. We successfully used these primers to quantify  $\beta$ -glucosidase gene copy numbers in soil samples.

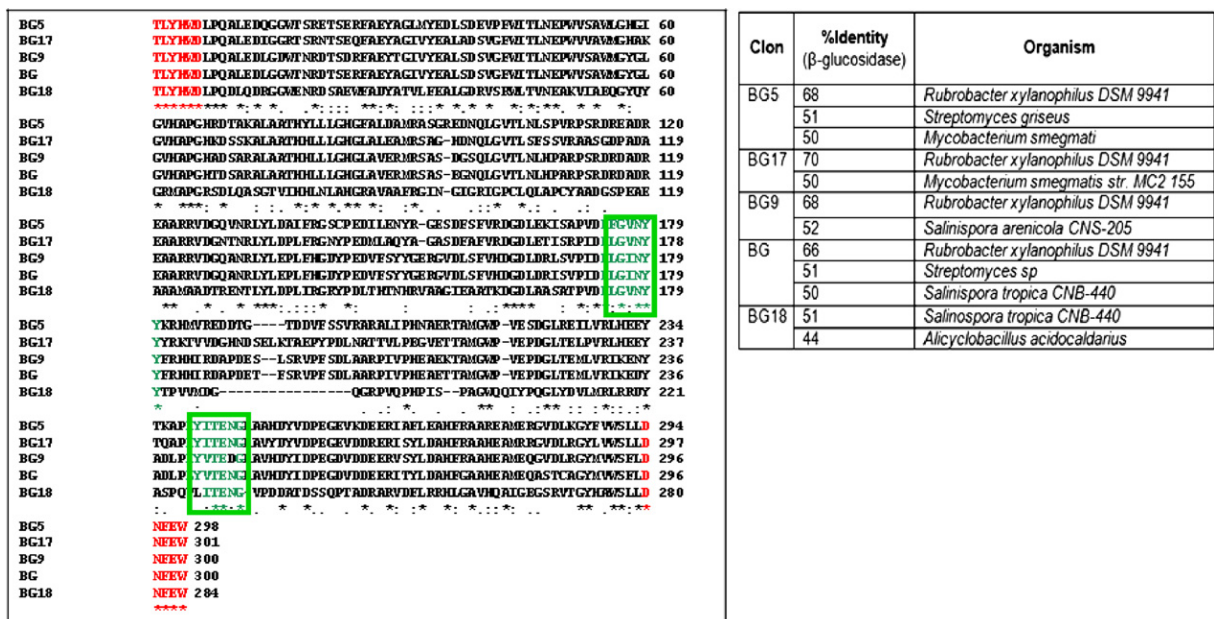


Fig. 3. Alignment of representative amino acids clones; conserved domains of oligonucleotides  $\beta$ gluF and  $\beta$ gluR2 are showed in red,  $\beta$ gluF2 y  $\beta$ gluR4 are showed in green. (For interpretation of the reference to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

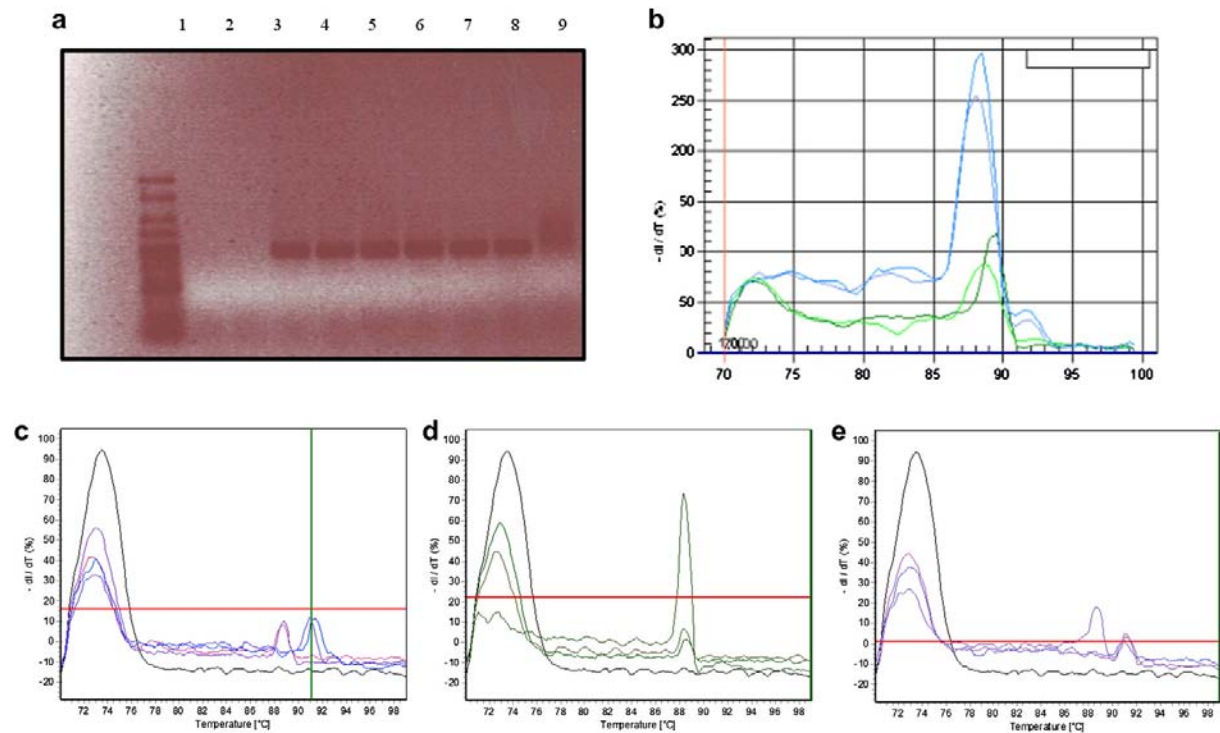


Fig. 4. a) Verification of PCR products of real-time PCR by agarose gel electrophoresis. Melting curves of b) *P. putida*, c) Control soil, d) soil amended with cellobiose, e) soil amended with glucose.

It is well known that degenerate primers and SybrGreen detection may generate some artifacts as primer-dimers, thereby affecting the quantification of genes [27]. To test if this affected our results, we conducted melting curve analysis and successive agarose gel electrophoresis specific PCR products, as recommended [28]. This strategy circumvents uncertainties associated with previous studies where different melting points were attributed to different sequences and not to artifacts in PCR reactions [27-29]. Here, a single melting point was detected in the positive control whereas two of the three soils showed two different peaks. Nevertheless, the electrophoresis agarose gel showed a single band of the expected size in every PCR product. Subsequent sequencing of the retrieved band showed a high degree of similarity with  $\beta$ -glucosidase sequences retrieved from GenBank database

The direct genomic assessment approach produced a different perspective on bacterial populations and diversity in the soils than culture-dependent methods. The numbers of  $\beta$ -glucosidase gene copies were significantly ( $P < 0.05$ ) lower in soils under cover after 15 days of incubation, and no effect of any added carbon source was detected. Previous studies have suggested the positive effect of cover crops on soil  $\beta$ -glucosidase activity [30, 31] and then related to the higher levels of available substrates in these soils. In this work, we determined the genetic potential of the soil bacteria to produce  $\beta$ -glucosidase enzyme. The results suggested that the bacterial genetic mechanisms involved in the final step of C-degradation in the soil were different depending on the presence or absence of a vegetation cover, and this effect predominated over the addition of any exogenous carbon source.

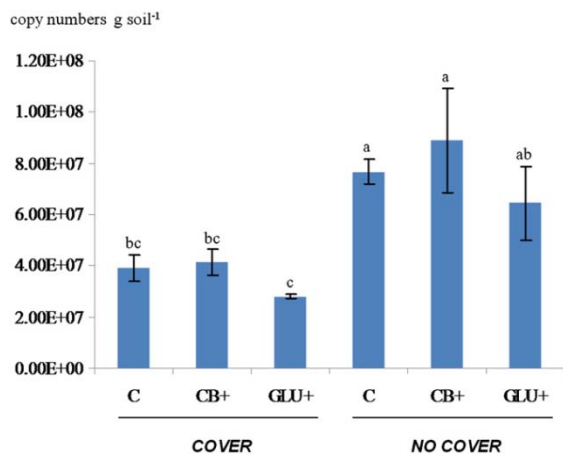
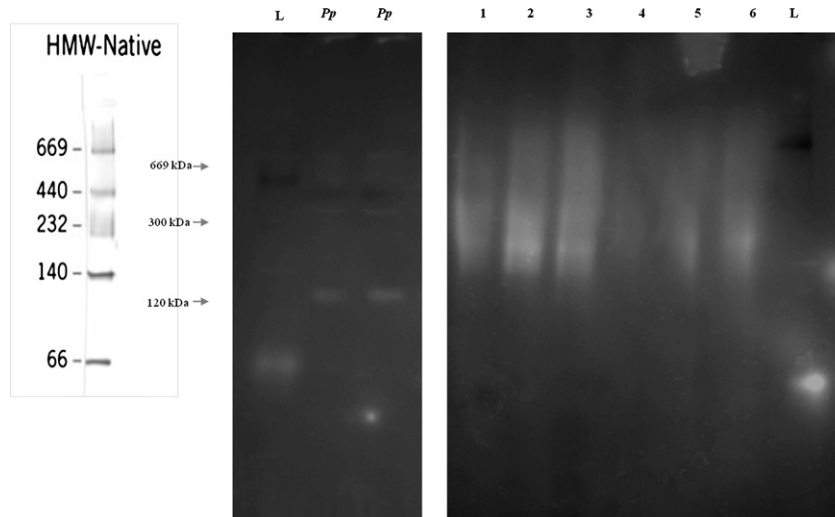
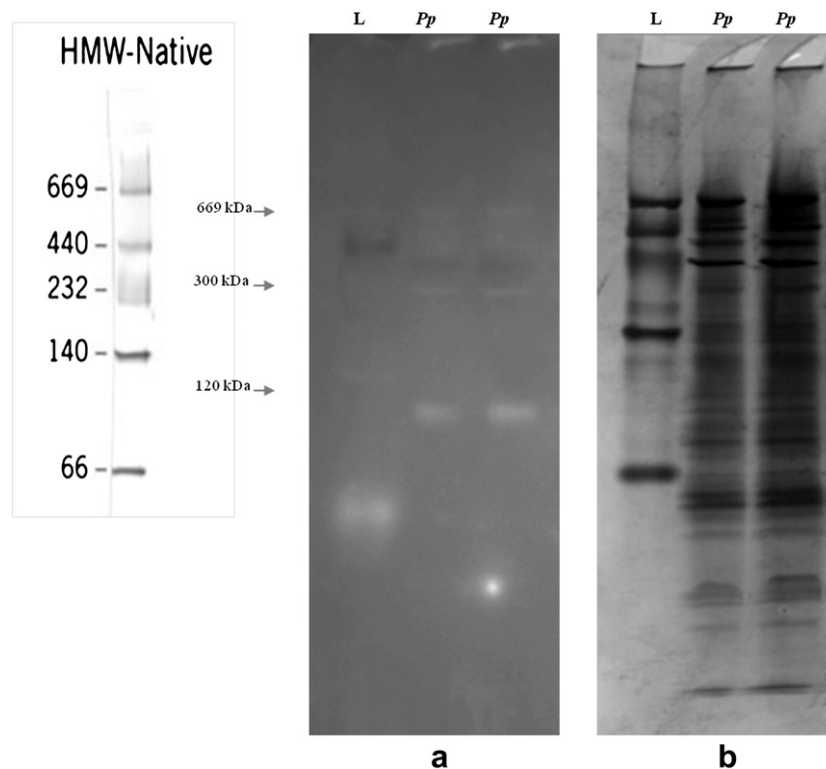


Fig. 5. Copy number of  $\beta$ -glucosidase gene.

Once in soil, the activities of bacterial hydrolytic exoenzymes are controlled by complex interactions between substrate availability, enzyme concentration, soil physics, and thermodynamics [32]. Many studies have investigated potential enzyme activities in soils, but the study of bacterial enzyme activities under natural conditions is still in premature stages [30-33]. Metaproteomics could be a useful tool in this sense, even more so when exocellular proteins are considered. Nannipieri [33] made a distinction between proteomic assessment of intracellular proteins or enzymes and assessment of stabilised extracellular enzymes in soil. The former are related to current microbial activity and gene expression whereas the latter are necessary to understand past microbial events and the mechanisms involved in the adsorption of enzyme by soil colloids.



**Fig. 6.** In-gel detection of  $\beta$ -glucosidase activities following non denatured-PAGE electrophoresis. Pp: *P. putida*; Lane 1: Control uncovered soil; Lane 2: CB+ uncovered soil; Lane 3: GLU+ uncovered soil; Lane 4: Control covered soil; Lane 5: CB+ covered soil; Lane 6: GLU+ covered soil; L: 50-bp ladder.



**Fig. 7.** Coomassie blue stained proteins extracted from *P. putida* following SDS-PAGE electrophoresis.

In this study, three bands showing  $\beta$ -glucosidase activity of molecular sizes 120, 300 and 669 kDa were demonstrated in soil *P. putida*. Published information about the molecular weight of  $\beta$ -glucosidases extracted and purified from different microorganisms is extensive. Single bands on SDS-PAGE with molecular weights of 81 and 77 kDa has been previously reported in the bacterium *Thermotoga maritima* [34] and the fungus *Aspergillus oryzae* [35], respectively. Lyman *et al.* [36] detected three different bands of molecular weight of 96, 98 and 114 kDa in *Phanerochaete Chrysosporium*. Zymogram analyses for  $\beta$ -glucosidases has also been

used to show a 210 kDa protein in *Cellulomonas flavigena* [9], 52 kDa in *Sinorhizobium meliloti* [37], 120, 95 and 70 kDa in *Aspergillus fumigates* and 120 kDa in *Aspergillus niger* [7].

There is little or no published information on the direct resolution of  $\beta$ -glucosidases in environmental samples. Whereas SDS-PAGE electrophoresis of total soil proteins has been previously optimized but specific characterization of  $\beta$ -glucosidase in community proteomes presented a solvable challenge [38]. In our study, a zone of enzyme activity, corresponding to the range of catalytic polypeptides confirmed in *P. putida*,

exhibited  $\beta$ -glucosidase activity when soil proteins were subjected to zymogram analysis. These data suggest that there may be a narrow range of bacteria capable of processing cellobiose in the soil samples that we studied. However we cannot rule out the possibility that functional redundancy in the different enzymatic polypeptides found adequately compensates for the narrow range of phylogenetic groups that are selectively enriched by the addition of carbon substrates.

Improvements are still needed in the fine-scale resolution of total protein profiles in soils, in part because co-extracting impurities obscure the polypeptide bands subjected to SDS-PAGE analysis. This limitation of protein extraction by direct methods has been also observed by Benndorf et al. [13]. However, Schulze [39] obtained clear bands by SDS-PAGE using direct extraction but focusing on the dissolved organic matter previously extracted from soil. Indirect methods for extracting proteins from soil cultures inoculated with bacterial cultures have been presented as a possible alternative [40].

This study contributes to the understanding of the behaviour of soil enzymes under natural *in situ* conditions. Real-time PCR and zymogram assessment have been used in concert to quantify both potential and actual activity of  $\beta$ -glucosidase in soil, respectively. Future studies focusing on the optimization of extraction and purification techniques for soil proteins are under development.

#### Acknowledgements

This work was supported by ERDF-cofinanced grant CGL2009-07907 from the Spanish Ministry of Science of Innovation and the Program in Industrial Ecology at the University of California, Irvine. R. Cañizares is supported by the JAE-CSIC predoctoral Program.

#### References

- [1] D.E Stott, S.S. Andrews, M.A. Liebig, B.J. Wienhold, D.L. Karlen, Evaluation of  $\beta$ -Glucosidase Activity as a Soil Quality Indicator for the Soil Management Assessment Framework. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 74 (2010) 107-119.
- [2] S.P. Deng, M.A. Tabatabai, Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils. II. Glycosidases. *Biol. Fert. Soils* 22 (1996) 208-213.
- [3] M. D. Busto, N. Ortega, M. Perez-Mateos, Effect of immobilization on the stability of bacterial and fungal  $\beta$ -D-glucosidase. *Process Biochem.* 32 (1997) 441-449.
- [4] R. G. Joergensen, F. Wichern, Quantitative assessment of the fungal contribution to microbial tissue in soil. *Soil Biol. Biochem.* 40 (2008) 2977-2991.
- [5] R.W. Sterner, J.J. Elser, Ecological Stoichiometry - The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere. Princeton University Press, Princeton, 2002.
- [6] J.P. Schimel, M.N. Weintraub, The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biol. Biochem.* 35 (2003) 549-563.
- [7] K.H. Kim, K.M. Brown, P.V. Harris, J.A. Langston, J.R. Cherry, A proteomics strategy to discover  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus fumigatus* with two-dimensional page in-gel activity assay and tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 6 (2007) 4749-4757.
- [8] K.B.R.M. Krogh, P.V. Harris, C.L. Olsen, K.S. Johansen, J. Hojer-Pedersen, J. Borjesson, L. Olsson, Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium brasilianum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86 (2010) 143-154.
- [9] G.A. Barrera-Islas, A.C. Ramos-Valdivia, L.M. Salgado, T. Ponce-Noyola, Characterization of a  $\beta$ -Glucosidase Produced by a High-Specific Growth-Rate Mutant of *Cellulomonas flavigena*. *Curr. Microbiol.* 54 (2007) 266-270.
- [10] H.A. Cristóbal, A. Schmidt, E. Kothe, J. Breccia, C.M. Abate, Characterization of inducible cold-active  $\beta$ -glucosidases from the psychrotolerant bacterium *Shewanella* sp. G5 isolated from a sub-Antarctic ecosystem. *Enzyme Microb. Technol.* 45 (2009) 498-506.
- [11] M.J. Surpili, B. Müller-Röber, L. Willmtzer, A yeast-based model system for cloning secreted and membrane proteins. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 74 (2002) 599-608.
- [12] R.A. De Souza, M. Hungria, J.C. Franchini, L.M.D.O. Chueire, F.G. Barcellos, R.J. Campo, Quantitative and qualitative evaluations of soil microbes and biological nitrogen fixation in soybean. *Pesq. Agropec. Bras.* 43 (2008) 71-82.
- [13] D. Benndorf, G.U. Balcke, H. Harms, M. Von Bergen, Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *ISME Journal* 1 (2007) 224-234.
- [14] F. Bastida, J.L. Moreno, C. Nicolás, T. Hernández, C. García, Soil metaproteomics: A review of an emerging environmental science. Significance, methodology and perspectives. *Eur. J. Soil Sci.* 60 (2009) 845-859.
- [15] J.M. Steinweg, A.F. Plante, R.T. Conant, E.A. Paul, D.L. Tanaka, Patterns of substrate utilization during long-term incubations at different temperatures. *Soil Biol. Biochem.* 40 (2008) 2722-2728.
- [16] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673-4680

- [17] H. Qian, B. Hu, D. Cao, W. Chen, X. Xu, Y. Lu, Bio-safety assessment of validamycin formulation on bacterial and fungal biomass in soil monitored by real-time PCR. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 78 (2007) 239-244.
- [18] Z. Yu, W.W. Mohn, Killing two birds with one stone: Simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass. *Can. J. Microbiol.* 45 (1999) 269-272.
- [19] P.B. Gedalanga, B.H. Olson, Development of a quantitative PCR method to differentiate between viable and nonviable bacteria in environmental water samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (2009) 587-596.
- [20] O.A. Ogunseitan, J.F. LeBlanc, Environmental proteomic: methods and applications for aquatic ecosystems, in: G.A. Kowalchuck, F. Bruijn, I.M. Head, A.D. Akkermans, J.D. Elsas (Eds.) *Molecular microbial ecology manual*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2004, pp. 1027-1046.
- [21] O.A. Ogunseitan, Direct extraction of proteins from environmental samples. *J. Microbiol. Methods*, 17 (1993) 273-281.
- [22] O.A. Ogunseitan, Direct extraction of catalytic proteins from natural microbial communities. *J. Microbiol. Methods* 28 (1997) 55-63.
- [23] H. Schagger, G. Von Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166 (1987) 368-379.
- [24] V. Torsvik, L. Øvreås, Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion Microbiol.* 5 (2002) 240-245.
- [25] O.A. Ogunseitan, Protein profile variation in cultivated and native freshwater microorganisms exposed to chemical environment pollutants. *Microb. Ecol.* 31 (1996) 291-304.
- [26] A.C. Metcalfe, M. Krsek, G.W. Gooday, J.I. Prosser, E.M. Wellington, Molecular analysis of a bacterial chitinolytic community in an upland pasture. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 5042-5050.
- [27] S. Stubner, Enumeration of 16 rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen™ detection. *J. Microbiol. Meth.* 50 (2002) 155-164.
- [28] K. Xu, H. Liu, G. Du, J. Chen, Real-time PCR assays targeting formyltetrahydrofolate synthetase gene to enumerate acetogens in natural and engineered environments. *Anaerobe* 15 (2009) 204-213.
- [29] S. Henry, D. Bru, B. Stres, S. Hallet, L. Philippot, Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundance of 16S rRNA, *narG*, *nirK* and *nosZ* genes in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 5181-5189.
- [30] E. Benitez, R. Nogales, M. Campos, F. Ruano, Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Appl. Soil Ecol.* 32 (2006) 221-231.
- [31] B. Moreno, S. Garcia-Rodriguez, R. Cañizares, J. Castro, E. Benítez, Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agr. Ecosyst. Environ.* 131 (2009) 333-339.
- [32] M.D. Wallenstein, M.N. Weintraub, Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biol. Biochem.* 40 (2008) 2098-2106.
- [33] P. Nannipieri, Role of stabilised enzymes in microbial ecology and enzyme extraction from soil with potential applications in soil proteomics, in: P. Nannipieri, K. Smalla (Eds.) *Nucleic Acids and Proteins in Soil*, Springer, Heidelberg, 2006. pp. 75-94.
- [34] K. Goyal, P. Selvakumar, K. Hayashi, Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase (BglB) from *Thermotoga maritima* showing transglycosylation activity. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 15 (2001) 45-53.
- [35] C. Zhang, D. Li, H. Yu, B. Zhang, F. Ji, Purification and characterization of piceid- $\beta$ -D-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochem.* 42 (2007) 83-88.
- [36] E.S. Lyman, B. Li, V. Renganathan, Purification and characterization of a cellulose-binding  $\beta$ -glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 2976-2986.
- [37] J.Y. Kim, J.Y. Lee, S. Shin, G.J. Kim, Mining and identification of a glucosidase family enzyme with high activity toward the plant extract indicant. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57 (2009) 284-291.
- [38] G. Masciandaro, C. Macci, S. Doni, B.E. Maserti, A.C. Leo, B. Ceccanti, E. Wellington, Comparison of extraction methods for recovery of extracellular  $\beta$ -Glucosidase in two different forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 40 (2008) 2156-2161.
- [39] W. Schulze, Protein analysis in dissolved organic matter: What free proteins from soil leachate and surface water can tell us-a perspective. *Biogeosciences Discussion* 1 (2004) 825-853.
- [40] P.A. Maron, M. Maitre, A. Mercier, D.P.H. Lejon, V. Nowak, L. Ranjard, Protein and DNA fingerprinting of a soil bacterial community inoculated into three different sterile soils. *Res. Microbiol.* 159 (2008) 231-236.





## **DISCUSIÓN GENERAL**

---



## **DISCUSIÓN**

La creciente degradación de los suelos en climas áridos y semiáridos (EU, 2002) y la necesidad de producir alimentos para una población en constante aumento, son dos factores que ejercen todavía más presión sobre las áreas dedicadas a la agricultura (Lal, 2009). El cambio climático global es un factor que aumenta especialmente los riesgos que las diferentes prácticas de manejo agrícola ejercen sobre la producción agrícola y la conservación del suelo. La estructura y actividad de las diferentes poblaciones de organismos presentes en el suelo están directamente relacionadas con los conceptos de calidad y salud del mismo, a través de su papel en los procesos implicados en la producción de alimentos así como en los denominados servicios del ecosistema (calidad y suministro de agua, control de la erosión, regulación del clima, degradación de contaminantes, control de plagas, secuestro de carbono atmosférico, conservación de la biodiversidad (Kibblewhite et al., 2008)). Por tanto, el conocimiento de las propiedades biológicas es fundamental para estimar el impacto a corto plazo que perturbaciones antrópicas y naturales ejercen sobre la calidad y salud del suelo, a través de su influencia en la productividad, la biomasa y diversidad biológica (incluyendo sus productos -enzimas intra y extracelulares), así como en los ciclos del C y N del mismo (Bardgett et al., 2008).

Establecer relaciones entre estructura de la comunidad microbiana y las funciones del suelo sigue siendo un desafío para la comunidad científica, particularmente determinar si el funcionamiento de los ecosistemas está condicionado por la biodiversidad, o cómo la pérdida de grupos funcionales de microorganismos afecta al funcionamiento global del ecosistema. Por ello, urge identificar procesos, prácticas y políticas que contemplen la gestión de los recursos del suelo de una manera sostenible, que deriven en la minimización de los riesgos de degradación del suelo y la mejora de los servicios del ecosistema (Lal, 2009).

El presente trabajo de Tesis Doctoral sitúa como modelo de estudio un agroecosistema típico del sudeste mediterráneo, económicamente vital para la zona y de alto valor ecológico. En él, se han abordado diversas aproximaciones metodológicas para establecer el grado de sostenibilidad de diferentes prácticas agrícolas. Los resultados que se comentan en este trabajo son fruto de las investigaciones que se llevan a cabo en una finca experimental del IFAPA localizada en el término municipal de Arquillos (Jaén). En dicha finca se realizan ensayos controlados desde el año 1976 en olivares bajo diferentes sistemas de cultivo, los cuales difieren en su concepto y en su grado de sostenibilidad. Brevemente, la precipitación anual media de la zona es de 557 milímetros y el suelo predominante es un Regosol Antrópico (FAO, 1998) en donde los olivos se disponen en un

marco de 11 x 11 m sin riego. Para nuestro estudio, se diseñó un sistema de bloques al azar con cuatro tratamientos y cuatro parcelas por tratamiento. Los tratamientos fueron:

- No cubierta + Laboreo (**T**): 3-4 pases anuales con grada de disco (profundidad 30 cm) y/o cultivador en primavera, seguida de pase de grada en verano.
- No cubierta + Herbicidas (**NC**): la vegetación adventicia fue eliminada aplicando herbicidas de pre-emergencia simazina y diuron en otoño, sustituidos por oxyfluorfen desde hace cinco años. En primavera, se aplica glifosato localmente
- Cubierta + Herbicidas (**CH**): Las plantas adventicias mantienen una cubierta vegetal hasta marzo, donde se eliminaban inicialmente con diquat/ paraquat, antes de ser substituidos por glifosato.
- Cubierta + Desbrozadora (**CM**): Las plantas adventicias mantiene una cubierta vegetal controlada por varios pases de desbrozadora hasta finales de la primavera, cuando dichas hierbas finalizan su ciclo vegetativo.

Por tanto, el uso o no de cubiertas vegetales, y el uso o no de herbicidas para eliminar la vegetación espontánea son los parámetros que determinan la diferencia entre ellos.

Hasta la fecha, la evaluación del grado de sostenibilidad de un sistema de manejo agrícola ha venido siendo abordada mediante un conjunto de parámetros químicos, físicos y biológicos que han resultado muy útiles para valorar, fundamentalmente, los efectos a largo plazo de un determinado sistema sobre la calidad y salud del suelo. Este trabajo pretende aportar nueva información mediante el uso de metodologías bioquímicas, genómicas, transcriptómicas y proteómicas aplicadas al estudio de suelos. La hipótesis es que si el uso de marcadores biológicos es un excelente sistema para evaluar los efectos a corto plazo del uso del suelo sobre la calidad del mismo, pueden resultar aún más para la evaluación de los efectos a largo plazo.

Todos los tratamientos se localizaron en un mismo tipo de suelo, con diferencias texturales entre tratamientos y profundidades determinadas por el diferente manejo agrícola al que han sido sometidos (Castro et al., 2008). Es importante remarcar que, en todos ellos, el manejo de la vegetación espontánea supone el único aporte de materia orgánica que reciben estos suelos desde hace 30 años. La capacidad de cada sistema para incorporar carbono orgánico en forma de biomasa vegetal depende del propio sistema. Así, la media estimada (en un periodo de tres años) de los tratamientos T, CH y CM, de alrededor de 3700, 2500 y 4000 kg por hectárea y año, respectivamente, evidenció que no hubo diferencias significativas en el aporte de biomasa al suelo, mientras que la entrada en los

suelos sin cubierta (NC) no pudo ser determinada puesto que estos se mantuvieron sin vegetación mediante el uso de herbicidas (Castro et al., 2008). Como consecuencia, los niveles de carbono orgánico total fueron significativamente más bajos en suelos sin cubierta y sin laboreo (tratamiento NC) que en el resto de los tres tratamientos considerados.

### **Considerando la capa arable como una matriz homogénea**

En este primer apartado se discutirán los resultados obtenidos al aplicar las diferentes aproximaciones metodológicas al estudio del suelo, considerado éste como una capa homogénea que abarca desde la superficie hasta los 20 cm de profundidad, lo que tradicionalmente se ha denominado “capa arable”.

La determinación de algunas actividades enzimáticas potenciales del suelo mediante métodos tradicionales bioquímicos ha sido ampliamente utilizada en las últimas décadas para evaluar la calidad del suelo (p.ej. Dick, 1994; Dick et al., 1996; Nannipieri et al., 2002; Benítez et al., 2004; Benítez et al., 2006). En nuestro estudio, se determinaron cuatro actividades hidrolíticas implicadas en los ciclos del C, N, P y S ( $\beta$ -glucosidasa, ureasa, fosfatasa y arilsulfatasa, respectivamente), así como dos oxidoreductasas (deshidrogenasa y difenoloxidasas). Los resultados se agruparon en diagramas de estrella o “sun-ray plots” (Dilly & Blume, 1998) con la intención de establecer una comparación visual y numérica de cada tratamiento (capítulo 1). En estos diagramas, el área y la forma de cada estrella podría dar una idea de la diversidad funcional microbiana de cada uno de los sistemas ensayados (Nannipieri et al., 2002). De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos afirmar que la diversidad bioquímica de los suelos está directamente relacionada con el tipo de manejo. El ranking, de mayor a menor en términos de diversidad metabólica fue el siguiente: CM > CH > T > NC. El tratamiento con cubiertas vegetales y control mecánico de la vegetación espontánea (CM) caracterizaron a los suelos con mayor diversidad funcional, la cual disminuyó cuando dicha vegetación fue eliminada mediante el uso de glifosato (CH). Nuestro estudio reveló igualmente que el efecto de las cubiertas predominó sobre el uso de herbicidas.

La extracción y posterior análisis mediante PCR cuantitativa y PCR-DGGE del ADN bacteriano presente en los suelos estudiados evidenció que, tanto el tamaño como la diversidad de la población bacteriana, estuvieron determinados por el tipo de manejo de suelo. En este sentido, los valores más elevados se detectaron en suelos con cubierta vegetal que en suelos desprovistos de ella. Considerando los dos tratamientos que incluían cubierta vegetal, se detectó, en concordancia con otros estudios previos (Haney et al., 2000; Lupwayi et al., 2009), que el uso del herbicida glifosato una vez al año (tratamiento CH) no modificó el número total de bacterias determinado en suelos donde se utilizaron medios

mecánicos (tratamiento CM). Considerando los dos tratamientos en los que la vegetación espontánea fue eliminada, el uso continuo de tal herbicida (tratamiento NC) provocó una disminución del número de bacterias respecto al determinado en los suelos donde la vegetación fue eliminada por medios mecánicos (tratamiento T).

Los perfiles de DGGE obtenidos, que reflejan la estructura de la comunidad bacteriana, mostraron un bajo número de bandas de intensidad alta junto con numerosas bandas de intensidad débil, lo cual indica la existencia de un número limitado de bacterias dominantes, ubicuas y ecológicamente bien adaptadas, junto con poblaciones características de cada suelo (Crecchio et al., 2004). De este modo, las bandas del DGGE indicaron que la estructura de la población bacteriana del suelo fue dependiente del tipo de manejo agrícola, siendo el mayor factor determinante la presencia o ausencia de cubierta vegetal. El análisis clúster (UPGMA, coeficientes de similitud de Nei y Li) aplicado a las bandas del DGGE, agrupó los suelos en dos grupos claros, suelos con cubierta y suelos desprovistos de ella, con un rango de similitud entre ellos del 50%. El índice de diversidad de Shannon aplicado a las bandas DGGE evidenció que, tanto la diversidad bacteriana más alta y más baja, estuvo relacionada con la aplicación de herbicidas, ya fuera de forma permanente o una vez al año, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas entre suelos bajo laboreo y suelos con cubierta manejada sin herbicidas. Esta falta de relación entre diversidad y estructura de la población bacteriana, previamente puesta de manifiesto por otros autores al comparar suelos con diferente manejo (Wu et al., 2008), debe ser considerada con cautela, ya que la mayoría de los índices de diversidad utilizados no establecen diferencia alguna entre riqueza o abundancia de especies, o simplemente no reflejan un posible efecto de muestreo (Gotelli & Colwell, 2001). Por ello, la estructura de la población bacteriana fue analizada mediante el índice de similitud de Raup y Crick basado en la probabilidad. La aplicación de tal índice a las bandas generadas por el DDGE estableció diferencias entre las comunidades bacterianas presentes en los suelos del tratamiento NC y aquellas presentes en suelos bajo cubierta vegetal (CH y CM), así como ninguna diferencia entre estos últimos y los suelos bajo laboreo convencional (T). El análisis clúster basado en este índice estableció asimismo que la comunidad bacteriana presente en suelos bajo cubierta fue filogenéticamente distante a aquella presente en suelos desnudos.

Por tanto, los análisis efectuados evidenciaron el efecto positivo del uso de cubiertas vegetales sobre la comunidad bacteriana tras treinta años de ensayo. Sin embargo, recientes investigaciones sugieren que la estima de la biomasa total –métodos basados en el estudio del ADN- no debería ser usada como único indicador del estado metabólico si el objetivo es comparar suelos con diferentes estructuras de la comunidad microbiana o niveles de estrés fisiológico (Stromberger et al., 2011). Debido a ello, y con el fin de evaluar

el comportamiento de la población bacteriana metabólicamente activa, se llevó a cabo el estudio del ARN ribosómico transcripcionalmente activo (capítulo 2). Los resultados mostraron una tendencia opuesta, al presentar los suelos bajo cubierta vegetal la actividad bacteriana más baja, indicando así una falta de relación entre biomasa y actividad bacteriana, falta de relación que ha sido evidenciada previamente por otros autores (Stromberger et al., 2011).

La relación entre el número de copias de ARN ribosómico transcrito y el número de genes constitutivos podría ser indicativa de la expresión de los genes 16S bacterianos en cada uno de los tratamientos ensayados. Dicha relación sugiere una elevada expresión constitutiva en suelos donde se aplicaron herbicidas de forma constante (NC), siendo aproximadamente cuatro veces superior a la determinada en suelos desnudos bajo laboreo (T) y doscientas veces superior a la determinada en suelos bajo cubierta vegetal (CH y CM). Se ha demostrado que las bacterias en condiciones ambientales de estrés son capaces de mantener niveles elevados de ARN mensajero, lo cual les permite adaptarse rápidamente a situaciones en las que el substrato esté de nuevo disponible (Nicolaisen et al., 2008), pero podríamos preguntarnos por qué sucede lo mismo con el ARN ribosómico. Este exceso de actividad en condiciones de aridez y baja disponibilidad de nutrientes, como es el caso de los suelos del presente estudio, es un importante gasto metabólico que podría suponer un alto riesgo para la supervivencia de la población microbiana (Klappenbach et al., 2000). Sin embargo, la sobreexpresión de ARN ribosómico detectada en los suelos desprovistos de vegetación espontánea, especialmente en el tratamiento NC, podría ser indicativa de una determinada estrategia bacteriana encaminada a hacer frente a situaciones ambientales desfavorables. Considerando además que no todo el ARNr es necesario para la síntesis de proteínas (Fegatella et al., 1998), y que el número de genes 16S ARNr transcritos podría reflejar el ritmo al que las bacterias son capaces de responder ante la disponibilidad de recursos (Klappenbach et al., 2000), la continua actividad metabólica detectada en suelos desnudos podría estar asociada a la redirección de la maquinaria metabólica responsable del crecimiento hacia la síntesis de moléculas protectoras (xeroprotectores), con el fin de hacer frente a una situación de eventual estrés (Shimel et al., 2007).

Los resultados derivados de las técnicas genómicas y transcriptómicas, aplicadas al estudio de la biomasa y estructura de la comunidad bacteriana del suelo, ampliaron la información derivada del análisis de las actividades enzimáticas potenciales estimadas mediante métodos tradicionales sobre el efecto de diferentes prácticas agrícolas sobre la calidad del suelo. Como es bien conocido, la importancia del estudio de la actividad enzimática del suelo radica en que determinadas enzimas catalizan algunas reacciones bioquímicas esenciales para el funcionamiento del ecosistema. Así, son numerosos los



estudios científicos enfocados a la determinación de la actividad potencial de algunas enzimas en el suelo (p.ej. Bandick & Dick, 1999; Bending et al., 2004; Benitez et al., 2006). Sin embargo, el estudio de la actividad enzimática *in situ*, en condiciones naturales del suelo, aún se encuentra en sus primeras etapas (Wallenstein & Weintraub, 2008; Nannipieri et al., 2008).

Por este motivo, en esta Tesis Doctoral se llevó a cabo la optimización de metodologías genómicas, transcriptómicas y proteómicas, que junto con las metodologías bioquímicas tradicionales, fueron aplicadas al estudio de una enzima clave en el ciclo del carbono en el suelo. La enzima  $\beta$ -glucosidasa es una enzima filogenéticamente conservada que juega un papel clave en el ciclo del carbono (C) dada su participación en las etapas finales de la degradación de celulosa hasta glucosa, lo que sugiere además una estrecha relación entre su actividad y disponibilidad de C en el suelo (Stott et al., 2010). Es una enzima sensible a los cambios de manejo en el suelo (Knight and Dick, 2004) y ha sido propuesta como indicador de calidad de los mismos (Gil-Sotres et al., 2005).

En primer lugar, y para determinar tanto el número de copias de genes que codifican tal enzima (metodologías basadas en ADN) como el número de copias transcritas en las condiciones ambientales reinantes en los suelos objeto de estudio (metodologías basadas en ARN), fue necesario el diseño y optimización de cebadores específicos capaces de amplificar dichos genes. El éxito de un buen diseño de cebadores para la amplificación y posterior cuantificación por PCR cuantitativa de la molécula de ADN diana es una condición indispensable para que los resultados obtenidos sean reproducibles, así como para evitar uniones inespecíficas o formación de dímeros de cebadores (Stubner et al., 2002; Cui et al., 2007). Por ello, para comprobar la especificidad de los cebadores diseñados para la detección de  $\beta$ -glucosidasa bacteriana en suelos, junto con el análisis de la curva de fusión y electroforesis en geles de agarosa, se llevaron a cabo dos estrategias diferentes: (1) PCR cualitativa de ADN extraído de cultivos puros de bacterias de suelo y (2) una librería de clones tras un análisis PCR-DGGE de ADN extraído de suelos.

Los suelos del tratamiento CM, suelo bajo cubierta vegetal manejada por medios mecánicos, presentaron el mayor número de copias de genes que codifican la enzima  $\beta$ -glucosidasa, esto es, el mayor potencial para producir enzima (capítulo 2). CH y T presentaron similar número de copias, mientras que los valores más bajos fueron detectados en suelos desnudos manejados por aplicación de herbicidas (NC). Sin embargo, y al igual que lo descrito anteriormente para el ARN ribosómico, la transcripción potencial (análisis basado en el ADN) no fue indicativa de la transcripción real (análisis basado en el ARN) de dichos genes. La relación entre copias de genes de  $\beta$ -glucosidasa totales y

transcritos fue similar en los tratamientos T, CH y CM, mientras que el tratamiento NC presentó, de nuevo, una elevada sobreexpresión génica, que además fue independiente de la cantidad de sustrato disponible estimado como carbono hidrosoluble. A pesar de que la producción de enzima  $\beta$ -glucosidasa en suelos es inducible, algunos niveles de expresión constitutiva podrían significar un mecanismo de ventaja destinado a la detección de una eventual fuente de energía orgánica en condiciones desfavorables (Allison et al., 2011).

Tras 30 años de diferentes manejos de suelo, se llega a la conclusión de que los tratamientos T, CH y CM fueron igual de efectivos a la hora de introducir C en el suelo. En las condiciones ambientales en las que se desarrolló el experimento: olivar de secano, estrés hídrico, único aporte de biomasa en forma de C derivado de la vegetación espontánea, etc., podemos concluir que no existe diferencia alguna en la capacidad para incorporar C atmosférico entre los tres tratamientos. La presencia de cubiertas vegetales no significó una ventaja con respecto a los suelos labrados. Sin embargo, estos suelos presentaron una menor diversidad funcional potencial y, con respecto a la población bacteriana, un mayor gasto metabólico constitutivo no relacionado con el crecimiento. Asimismo, la ausencia de cubierta derivó en una diferente estructura de la población bacteriana. Estos hechos podrían ser indicativos de una posible especialización de la comunidad de bacterias en función del tipo de manejo. Al considerar el tratamiento NC, estas dos circunstancias se acentuaron, y los suelos bajo este tratamiento presentaron la menor diversidad funcional potencial, así como la mayor transcripción de genes constitutivos y  $\beta$ -glucosidasa que no derivaron en un aumento de la población de bacterias. Esta estrategia podría constituir un gasto metabólico de alto riesgo si no estuviese dirigida a la redirección de la maquinaria metabólica para una mejor supervivencia bacteriana en condiciones de estrés. Este hecho fue evidenciado en menor intensidad en el tratamiento T, lo cual evidenciaría un efecto positivo del uso de cubiertas en agricultura extensiva en clima semiárido.

### **Considerando la capa arable como una matriz heterogénea**

La mayoría de los estudios científicos dirigidos a evaluar el impacto que los diferentes usos del suelo o manejos agrícolas ejercen sobre las propiedades químicas, físicas y biológicas del suelo, consideran que tal impacto se localiza, fundamentalmente, en lo que se denomina “capa arable”, establecida a una profundidad de 20-25 cm desde la superficie (p. ej. Blanco-Canqui & Lal, 2008). Sin embargo, sería posible establecer de forma más precisa la presión de las actividades antrópicas sobre el suelo considerando la capa arable, no como un todo homogéneo, sino como una zona de características heterogéneas dividida en diferentes subcapas (p.ej. Kay & Vanderbygaard, 2002; Celik, 2005; Mijangos & Garbisu,

2010). Esta aproximación es aún más necesaria si se pretende evaluar ecosistemas frágiles o altamente vulnerables, en donde la localización exacta de las zonas de alto riesgo puede resultar vital (Bausenwein et al., 2008).

En la presente Tesis Doctoral, los suelos estudiados se dividieron en cuatro capas diferentes, localizadas a las profundidades de 0-2, 2-5, 5-10 y 10-20 cm. Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias a lo largo de la capa arable en las características del suelo. Los niveles de carbono orgánico total de los suelos bajo laboreo (T) fueron similares a los determinados en suelos bajo cubierta (CM y CH) cuando se consideró el perfil del suelo en su totalidad (capítulos 1 y 2). Al considerar las diferentes capas por separado, los niveles fueron significativamente iguales en todas las capas de T y en las tres capas más profundas de CM (capítulo 3), pero diferentes a la capa superficial de este último tratamiento, donde se localizaron los valores más altos. Este efecto fue corroborado al determinar el comportamiento de las actividades enzimáticas potenciales ya que toda la diferencia observada entre tratamientos se debió a los valores más altos detectados en la capa superficial de los tratamientos bajo cubierta (capítulos 3 y 4). Estos resultados, consistentes con numerosos estudios previos (Niemi et al., 2005; Novak et al., 2007; Geisseler & Horwath., 2009), evidencian la estrecha relación entre la actividad enzimática hidrolítica del suelo y los niveles de carbono orgánico total y disponible (Benítez et al., 1999; Carpenter-Boggs et al., 2003; Kandeler et al., 2001). Respecto a la actividad deshidrogenasa, medida del potencial oxidativo total de la microflora del suelo y por tanto de la actividad metabólica del mismo (Nannipieri et al., 2002), se observó el mismo comportamiento descrito para las hidrolasas. Comparando tratamientos en los cuales se utilizaron herbicidas (NC y CH), la capa superficial de 0-2 cm fue de nuevo responsable de los valores significativamente más altos detectados en los suelos bajo cubierta (capítulo 4).

Los efectos de la profundidad sobre la estructura de la población bacteriana fueron evaluados mediante PCR-DGGE, tanto a nivel de ADN como a nivel de ARN, este último para determinar la población bacteriana metabólicamente activa en los tratamientos T y CM (capítulo 3). La ventaja del estudio de genes transcritos 16S ARNr (ARN) respecto a genes totales (ADN) ha sido evidenciada recientemente por algunos estudios científicos (Hoshino et al., 2007; Reeve et al., 2010; Wallis et al., 2010), a pesar de que el análisis de ARN no está exento de las mismas limitaciones que los análisis basados en ADN (Norris et al., 2002; Griffiths et al., 2003). El principal inconveniente de ambos métodos está relacionado con la cantidad limitada de amplicones que pueden ser amplificados, así como con la eventual co-migración de diferentes secuencias de ácidos nucleicos, la cual puede derivar en una subestimación de la riqueza de especies (Hirsch et al., 2010). Con el fin de superar esta limitación, algunos autores han restringido sus análisis a evaluar, usando el índice de

similitud de Raup y Crick basado en la probabilidad, si las diferencias entre perfiles de ácidos nucleicos generados por DGGE son mayores o menores que lo que cabría esperar por efecto del azar (Rowan et al., 2003; Vivas et al., 2009). En nuestro trabajo, considerando cada banda como una unidad taxonómica operacional (Operational Taxonomic Units, OTU) (Ibekwe & Grieve, 2004), el análisis PCR-DGGE mostró diferencias evidentes entre perfiles DGGE, tanto de la comunidad bacteriana total (basados en ADN) como de bacterias metabólicamente activas (basados en ARN). En los suelos bajo laboreo (T), todas las capas fueron similares a nivel de ADN pero no fue así a nivel de ARN. La estructura de la comunidad bacteriana total resultó ser homogénea en todo el perfil de suelo mientras que aquella metabólicamente activa lo fue sólo en las capas intermedias. En suelos bajo cubierta vegetal gestionada por medios mecánicos (CM), los patrones de la comunidad basados en ADN fueron similares a los de la comunidad metabólicamente activa, ARN, mostrando las capas intermedias un alto grado de similitud. Algunos autores han evidenciado el efecto homogeneizador del laboreo, mostrando niveles comparables de carbono orgánico, actividades enzimáticas, biomasa y estructura de la comunidad bacteriana a lo largo del perfil (Six et al., 2000). En nuestro estudio, se observó una clara diferencia a nivel de estructura de la comunidad bacteriana total y metabólicamente activa entre las capas de los suelos sometidos a laboreo, lo cual indica la relevancia del uso de herramientas moleculares enfocadas en el estudio del ARN como indicador del estado fisiológico de las bacterias en suelos semiáridos.

La diferencia entre los niveles de biomasa bacteriana y número de genes que codifican la enzima  $\beta$ -glucosidasa determinados en el perfil del suelo en su totalidad, significativamente más altos en suelos bajo cubierta (capítulo 2), estuvo relacionada con el mayor número de copias de genes 16S ARNr y  $\beta$ -glucosidasa presentes en la capa superficial de 0-2 cm (capítulos 3 y 4). Sin embargo, el peso de la capa superficial fue menor o prácticamente nulo sobre los niveles de bacterias metabólicamente activas presentes en los suelos sin cubierta vegetal permanente (capítulo 2), ya que dicha población, mayor en suelos desnudos que en suelos bajo cubierta, se distribuyó entre las tres primeras capas o entre la primera y la última capa de suelo en los tratamientos T y NC, respectivamente (capítulos 3 y 4).

Respecto al número de genes  $\beta$ -glucosidasa transcritos, a pesar de que no fueron detectadas diferencias significativas entre los tratamientos T y CM cuando se consideró la capa arable en su totalidad (capítulo 2), el análisis por capas reveló una mayor actividad transcripcional en las capas subsuperficiales de los suelos bajo cubierta vegetal (capítulo 3). Los resultados guardan cierta relación con los niveles de carbono soluble detectados en las capas de ambos tratamientos. Al ser la  $\beta$ -glucosidasa un enzima inducible, y conteniendo los

extractos solubles moléculas de carbono simples como los azúcares (Charest et al., 2004), podría producirse la inducción de la enzima en capas subsuperficiales al mismo tiempo que la retroinhibición de la misma en la capa superficial, donde los niveles de carbono soluble fueron mucho más elevados. La relación entre la transcripción real y la capacidad potencial de producir  $\beta$ -glucosidasa fue, efectivamente, superior en las capas subsuperficiales de los suelos del tratamiento CM. Esta relación podría dar una idea de la expresión génica de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en condiciones naturales de los suelos objeto de estudio. No obstante, la metodología comúnmente utilizada para la determinación de la expresión génica, p. ej. la aplicación del método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001), no proporcionó una información interpretable cuando dicha metodología fue aplicada a nuevos suelos (capítulo 3). Este método ha sido utilizado con éxito en la evaluación de expresión génica en otras muestras ambientales tales como sustratos orgánicos (Di Gennaro et al., 2009; Monard et al., 2010), sin embargo, en nuestro estudio, la baja cantidad de ácidos nucleicos presentes en suelos bajo condiciones semiáridas dificultó enormemente la normalización de la reacción de PCR cuantitativa, con el consiguiente error resultante e interpretación inadecuada de los resultados (capítulo 3). La relación entre el número de genes que se han transcrito con respecto al número de genes que potencialmente podrían transcribirse indicó, de una forma más precisa, la expresión de genes funcionales como el que codifica la enzima  $\beta$ -glucosidasa en las condiciones ambientales de los suelos estudiados.

Por tanto, no es fácil establecer relaciones entre la expresión de algunos genes funcionales implicados en el ciclo del C y sustratos orgánicos implicados en tal ciclo cuando se consideran suelos bajo agricultura de secano en clima semiárido, donde además, la dinámica de la materia orgánica está fuertemente influenciada por las condiciones climáticas y el único aporte de materia orgánica está basado en la gestión de la vegetación espontánea. Así, mientras en algunas condiciones ambientales los resultados sugirieron la existencia de algún tipo de relación entre expresión  $\beta$ -glucosidasa y sustratos implicados en su síntesis (capítulo 3), en otras no se observó dependencia entre los niveles de input de carbono y el grado de mineralización de la materia orgánica, proceso en el que está fuertemente implicada la enzima  $\beta$ -glucosidasa (capítulo 4).

Así, la aparente contradicción detectada entre las entradas de biomasa y los niveles de carbono orgánico del suelo del tratamiento CH respecto a los del NC podría estar relacionada con un mayor grado de mineralización de la materia orgánica en el subsuelo del primero. Diferentes factores podrían estar implicados en este fenómeno. Por una parte, la mayor compactación de los suelos sin cubierta vegetal (NC) podría estar relacionada con la ralentización de la mineralización que motivó la similitud entre los niveles de carbono orgánico total y soluble detectada entre las capas de NC y las capas subsuperficiales de CH.

Por otra parte, la calidad de la materia orgánica presente en los diferentes suelos seguramente determinó la actividad microbiana relacionada con la degradación de compuestos de C. Con el fin de corroborar esta hipótesis se llevó a cabo el estudio de los ácidos grasos libres del suelo. Los ácidos grasos de cadena larga (>20C) fueron más abundantes en la capa superficial del suelo CH, mientras que las capas más profundas del suelo NC presentaron valores mayores que los correspondientes a las capas del suelo con cubierta vegetal espontánea (CH). Este hecho implicaría una mayor tasa de mineralización en estas últimas, así como el efecto protector de la cubierta vegetal en la capa superficial del tratamiento CH. En ambos tratamientos, los niveles de ácidos grasos de cadena corta (<20C) fueron más elevados en los primeros 10 cm del suelo respecto a la capa más profunda, con valores significativamente más altos en el tratamiento CH, indicando una mayor actividad microbiana en los suelos bajo cubierta vegetal (Fernández et al., 2003; Rubino et al., 2009). Asimismo, la presencia y ausencia de ácidos grasos iso y anteiso en la capa superficial de los tratamientos CH y NC, respectivamente, implicaría la mayor actividad microbiana presente en la primera, al asignarse un origen exclusivamente microbiano a estos tipos de ácidos grasos de cadena corta (Naafs et al., 2004). Con el objetivo de distinguir el origen de las distintas fuentes de materia orgánica en los suelos estudiados, se llevó a cabo un análisis de isótopos estables (Glaser, 2005; Medeiros & Simoneit, 2007). La composición isotópica  $\delta^{13}\text{C}$  de los ácidos grasos de cadena corta fue varias unidades más pesada en los suelos NC. Esta tendencia, indicativa de una mayor contribución microbiana (Dilly et al., 2001; Boschker & Middelburg, 2002), podría contradecir las asunciones anteriores acerca de la mayor actividad microbiana presente en suelos con cubierta vegetal (CH). Sin embargo, estos resultados podrían asimismo reflejar una descomposición temporal de compuestos con diferentes  $\delta^{13}\text{C}$  (Rubino et al., 2009), así como una mayor proporción de materia orgánica de origen vegetal frente a aquella de origen microbiano (capítulo 4).

La regulación de la síntesis bacteriana de enzima  $\beta$ -glucosidasa es un proceso no conocida con precisión. Son muchos los estudios enfocados a determinar la cinética o los efectos del pH, la temperatura y la disponibilidad de sustratos de carbono sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa (Shackle et al., 2000; Trasar-Cepeda et al., 2007; Moscatelli et al., 2011), algunos de ellos centrados en la inducción de genes  $\beta$ -glucosidasa en cultivos bacterianos (Busto, 1995). Sin embargo, las regulaciones transcripcionales y post-transcripcionales de genes bacterianos que codifican la enzima  $\beta$ -glucosidasa en condiciones medioambientales *in situ* no han sido objeto de estudio hasta la fecha. Al considerar los tratamientos NC y CH, suelos en los que se aplicaron herbicidas de forma constante o una vez al año, respectivamente, se observó de igual forma la falta de relación entre capacidad potencial

para producir enzima  $\beta$ -glucosidasa y la transcripción real de los genes implicados. La distribución a lo largo del perfil del suelo de los transcritos siguió un patrón similar al observado en el tratamiento T: niveles mayores en la capa superficial y valores similares en el resto de las capas. La relación entre transcritos y genes indicó mayor expresión génica en los cinco primeros centímetros del perfil de suelos sin cubierta vegetal (NC) que en la correspondiente capa de los suelos con cubierta vegetal (CH), así como niveles comparables desde los 5 hasta los 20 cm en ambos tratamientos (capítulo 4). Este comportamiento determinó los niveles de expresión génica detectados en los dos tratamientos cuando los suelos fueron considerados como un único perfil de 20 cm (capítulo 2). Sin embargo, no se encontró relación alguna entre expresión de los genes que codifican para la enzima  $\beta$ -glucosidasa y los niveles de carbono asimilable y la distribución de los diferentes tipos de ácidos grasos determinados a lo largo del perfil. Los resultados sugieren que, en determinadas condiciones medioambientales, la regulación de algunos genes funcionales no está determinada únicamente por la cantidad o calidad de los substratos inductores de enzimas o por la actividad bacteriana del suelo.

Con el fin de profundizar en los efectos derivados del manejo agrícola sobre la estructura genética  $\beta$ -glucosidasa del suelo, se llevó a cabo un análisis PCR-DGGE basado en ADN y enfocado al estudio de la diversidad molecular de genes bacterianos que codifican la enzima  $\beta$ -glucosidasa en los suelos de los tratamientos NC y CH (capítulo 4). Los dendogramas generados por el análisis de las bandas de DGGE mostraron dos grupos bien definidos, correspondientes a los dos tipos de manejo evaluados y con una similitud menor del 20%, lo cual indicó un claro efecto del manejo del suelo sobre la diversidad molecular de los genes  $\beta$ -glucosidasa. Las bandas de DGGE con alta intensidad, indicativo de elevada cantidad de ADN, fueron secuenciadas y posteriormente agrupadas en unidades taxonómicas operacionales (Operational Taxonomic Units, OTU). De un total de 65 secuencias, de las cuales el 91% presentó similitud con genes bacterianos  $\beta$ -glucosidasa, se obtuvieron 39 OTUs. El filo Proteobacteria dominó claramente en todas las OTUs analizadas, aunque también se detectaron representantes de los filos Chloroflexi, Deinococci, Actinobacteria, Thermotogae y Firmicutes, los cuales incluyen tanto bacterias grampositivas como gramnegativas. La diversidad molecular ( $\theta_{\pi}$ ) de los clones secuenciados no indicó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, sin embargo, cuando se determinó mediante AMOVA (análisis molecular de la varianza) la variación genética entre poblaciones, se evidenció una clara diferencia entre ambos tipos de manejo (capítulo 4).

El presente trabajo de Tesis Doctoral ha evidenciado la incongruencia entre potencial genético y algunas funciones del suelo asociadas a la producción de enzimas. Los

mecanismos de regulación de la expresión génica en condiciones medioambientales han sido generalmente relacionados con la disponibilidad de sustratos inductores. En nuestras condiciones edáficas y climáticas, este hecho no ha quedado manifestado de forma patente, aunque sí el efecto del uso del suelo sobre la transcripción y la diversidad filogenética de la enzima  $\beta$ -glucosidasa.

Con objeto de profundizar en los mecanismos de regulación post-transcripcionales de la enzima  $\beta$ -glucosidasa se diseñó una estrategia basada en metodologías proteómicas aplicadas a suelos. La proteómica de suelos se encuentra en sus primeras etapas de desarrollo y, hasta la fecha, muy pocos grupos de investigación centran su trabajo en la optimización de protocolos de extracción y purificación de proteínas del suelo. La extracción directa de proteínas del suelo es difícil y compleja (Benndorf et al., 2007), y mucho más la purificación e identificación de las mismas en condiciones nativas, no desnaturalizantes (Schulze et al., 2004). Por ello, las experimentaciones correspondientes al último capítulo de esta Tesis (capítulo 5) han sido, en gran parte, llevadas a cabo en la Universidad de California de Irvine, Estados Unidos, en donde el laboratorio de Dr. Ogunseitan es pionero en esta materia. La legislación americana sólo contempla el envío de muestras desde otros países siempre que éstas hayan sido tinalizadas, por lo que no era factible proceder de ésta manera con los suelos de olivar andaluz objeto de estudio. Por ello, la optimización de la extracción e identificación de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en condiciones nativas se realizó con un suelo seleccionado en una finca experimental de esta Universidad, bajo dos condiciones diferentes, suelo desprovisto de vegetación y suelo con cubierta vegetal.

Ambos suelos se enmendaron con dos tipos de compuestos de carbono: celobiosa, sustrato natural de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, y glucosa, el producto de la hidrólisis del primero. Los resultados derivados de la aplicación de tres metodologías diferentes: recuento de bacterias cultivables con capacidad para degradar celobiosa, análisis genómico y, análisis proteómico, evidenciaron la influencia del uso de cubiertas y de la biodisponibilidad de fuentes de carbono sobre la dinámica de las poblaciones bacterianas en el suelo. Así, la proporción de bacterias con capacidad para degradar celobiosa con respecto al número de bacterias totales fue mayor en suelos con cubierta (1,68%) que en suelos sin vegetación (0,17%). En cambio, no se detectaron diferencias entre ambos suelos cuando éstos fueron enmendados con glucosa. Los resultados obtenidos mediante aproximación genómica mostraron una perspectiva diferente que la generada por los datos de población bacteriana cultivable, ya que el número de copias de genes  $\beta$ -glucosidasa fue significativamente menor en los suelos con cubierta vegetal, no apreciándose ningún efecto derivado de la fuente de carbono utilizada como sustrato. Numerosos estudios relacionan los niveles de actividad  $\beta$ -glucosidasa potencial del suelo, determinada por métodos bioquímicos tradicionales en



condiciones óptimas de sustrato y temperatura, con la cantidad de sustratos disponibles. Nuestros resultados, que reflejan la capacidad potencial para producir enzima  $\beta$ -glucosidasa determinada por métodos moleculares, sugieren el efecto predominante de la presencia de cubierta sobre la adición de una fuente exógena de C, así como la importancia de los mecanismos de regulación transcripcional y post-transcripcional. Una vez en el suelo, la actividad de exoenzimas hidrolíticas de origen bacteriano está sometida a complejas interacciones entre sustrato y enzima, así como a la influencia de propiedades físicas o termodinámicas del suelo (Trasar-Cepeda et al., 2007) y el uso de la metaproteómica podría ser una herramienta útil para determinar la relación entre potencial y actividad real de un determinado enzima.

Con objeto de disponer de un control bacteriano que suministrara alguna información acerca de los diferentes tipos y pesos moleculares de la proteína  $\beta$ -glucosidasa, se aisló y posteriormente purificó el total de proteínas de una bacteria presente en los suelos estudiados y con capacidad para degradar celobiosa, *Pseudomonas putida* (capítulo 5). Así, tras un análisis de zimograma se identificaron 3 bandas de pesos moleculares de 120, 300 y 660 kDa, mostrando las tres actividad  $\beta$ -glucosidasa. Hasta la fecha, la información sobre los pesos moleculares de enzima  $\beta$ -glucosidasa procedentes de diversos microorganismos es extensa. Mediante SDS-PAGE se han obtenido bandas de  $\beta$ -glucosidasa con pesos moleculares de 81 y 77 kDa procedentes de la bacteria *Thermotoga marítima* (Goyal et al., 2001) y del hongo *Aspergillus oryzae* (Zhang et al., 2007), respectivamente. Lyman et al., detectó tres bandas de diferentes pesos moleculares de 96, 98 y 114 kDa en *Phanerochaete chrysosporium*. Cuando se llevó a cabo una zimografía para detectar la enzima  $\beta$ -glucosidasa se detectó una única proteína de 210 kDa en *Cellulomonas flavigena* (Barrera-Islas et al., 2007), 52 kDa en *Sinorhizobium meliloti*, (Kim et al., 2009), 120, 95 y 70 kDa en *Aspergillus fumiga* y 120 kDa en *Aspergillus niger* (Kim et al., 2007). Sin embargo, hasta la fecha no existe información sobre el análisis de enzima  $\beta$ -glucosidasa en muestras ambientales. Además, el hecho de caracterizar dicha proteína mediante métodos no desnaturalizantes lo hace aún más complicado.

En nuestro estudio, cuando las proteínas extraídas del suelo se sometieron a un análisis de zimograma, se detectó una zona de actividad  $\beta$ -glucosidasa, la cual correspondió a una serie de polipéptidos con actividad catalítica confirmado en *P. putida*. Estos datos una redundancia enzimática funcional y/o la existencia de una amplia cantidad de bacterias capaces de procesar celobiosa en las muestras de suelo consideradas.

**CONCLUSIONES**





## CONCLUSIONES

- Los tratamientos de laboreo y cubierta vegetal manejada bien mediante medios mecánicos o químicos incorporaron niveles equivalentes de carbono en el suelo. Por tanto, la presencia de cubiertas vegetales no significó una ventaja con respecto a los suelos labrados. El manejo agrícola consistente en mantener suelos sin cubierta mediante el uso de herbicidas incorporó menor cantidad de carbono atmosférico que los tres anteriores.
- La diversidad funcional potencial, la estructura de la población y la biomasa bacteriana total y metabólicamente activa de los suelos fueron mayores en suelos bajo cubierta vegetal que en suelos desnudos. El sistema de eliminación de la vegetación espontánea en suelos bajo cubierta no modificó sustancialmente los anteriores parámetros.
- La actividad  $\beta$ -glucosidasa determinada mediante métodos bioquímicos tradicionales estuvo relacionada con el número de genes bacterianos que codifican tal enzima en los suelos, independientemente del tratamiento ensayado.
- Las cubiertas vegetales promovieron diferente estructura de la población bacteriana total y metabólicamente activa respecto a los suelos sin cubierta. Los resultados indicaron que los métodos basados en ARN fueron más efectivos para discriminar los suelos estudiados que los métodos basados en el ADN o métodos bioquímicos tradicionales.
- No existió una relación directa entre el número de genes bacterianos constitutivos (ARN ribosomal) o funcionales ( $\beta$ -glucosidasa) y el número de genes realmente transcritos en las condiciones ambientales de los suelos estudiados. Sin embargo, este ratio estuvo condicionado por el uso o no de cubiertas vegetales.
- La sobreexpresión del ADN ribosomal en suelos sin cubierta, especialmente en aquellos en los que se aplicaron herbicidas, indicó un aumento de la actividad metabólica bacteriana con respecto a los suelos bajo cubierta vegetal, que además no estuvo relacionada con el aumento de la población bacteriana.
- La sobreexpresión de genes bacterianos que codifican  $\beta$ -glucosidasa en suelos sin cubierta más herbicidas indicó un aumento de la producción génica de enzima  $\beta$ -

glucosidasa con respecto a los demás tratamientos evaluados, que además no estuvo relacionada con una mayor disponibilidad de sustratos inductores.

- Esta mayor expresión génica detectada en los suelos sin cubierta vegetal podría constituir un importante riesgo para la supervivencia de la población bacteriana en condiciones desfavorables de sequía y bajos niveles de materia orgánica, y, consecuentemente, un efecto positivo de las cubiertas sobre la estabilidad biológica del suelo.
- El análisis por profundidades indicó un perfil homogéneo en suelos bajo laboreo, así como la importancia de la capa superficial en suelos bajo cubierta, donde se determinaron los valores más elevados de carbono, actividades enzimáticas potenciales y biomasa bacteriana del suelo.
- El análisis de las secuencias de ADN de las diferentes unidades taxonómicas operacionales, evidenciadas en el análisis DGGE, indicó similar diversidad molecular génica  $\beta$ -glucosidasa a lo largo de la capa arable, independientemente del tratamiento ensayado. Sin embargo, sí se detectaron diferencias filogenéticas de genes  $\beta$ -glucosidasa en función del tipo de manejo agrícola, evidenciando la especialización de la comunidad bacteriana en función de la ausencia o presencia de cubiertas vegetales.
- El análisis de zimograma de las proteínas extraídas de una bacteria de suelo con capacidad para degradar celobiosa (*Pseudomonas putida*) evidenció tres bandas de pesos moleculares de 120, 300 y 660 kDa con actividad  $\beta$ -glucosidasa. Cuando las proteínas totales extraídas del suelo se sometieron a dicho análisis, se detectó una zona de actividad  $\beta$ -glucosidasa correspondiente a la serie de polipeptidos con actividad catalítica confirmado en *P. putida*. Los resultados sugieren la redundancia enzimática funcional y/o la amplia cantidad de bacterias capaces de procesar celobiosa de los suelos considerados.
- La aplicación conjunta de técnicas tradicionales bioquímicas y metodologías “ómicas” es una adecuada estrategia para evaluar el grado de sostenibilidad de ecosistemas agrícolas sometidos a distintos tipos de manejo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



## **BIBLIOGRAFÍA**

Acton, D.F., Gregorich, L.J., 1995. The Health of Our Soils: Toward Sustainable Agriculture in Canada. Agriculture Agri-Food Canada, Ottawa, Canada.

Adam, G., Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 943-951.

Alef, K., Nannipieri, P., 1995. Enzyme Activities, In: Alef, K., Nannipieri, P. (Eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press Limited, San Diego, Ca, pp. 311-373.

Allison, S.D., Weintraub, M.N., Gartner, T.B., Waldrop, M.P., 2011. Evolutionary-Economic Principles as Regulators of Soil Enzyme Production and Ecosystem Function *Soil Enzymology*, In: Shukla, G., Varma, A. (Eds.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 229-243.

Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 215-221.

Anderson, J.P.E., 1982. Soil respiration, In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of soil analysis Part 2, chemical and microbiological properties*. American Society of Agronomy, Madison, pp. 831-871.

Anderson, T.H., 2003. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 98, 285-293.

Aon, M.A., Cabello, M.N., Sarena, D.E., Colaneri, A.C., Franco, M.G., Burgos, J.L., Cortassa, S., 2001. I. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* 18, 239-254.

Arias, M.E., González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Ball, A.S., 2005. Soil health - A new challenge for microbiologists and chemists. *International Microbiology* 8, 13-21.

Asociación Española De Municipios Del Olivo (AEMO), 2003. AEMO, al lado del olivar de montaña y de baja producción. *Mercaderes* 33, 136-140.

Bakken, L.R., 1997. Culturable and nonculturable bacteria in soil, In: Van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), *Modern Soil Microbiology*, Marcel Dekker, New York, pp. 47-61.

Balesdent, J., Chenu, C., Balabane, M., 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil and Tillage Research* 53, 215-230.

Bandick, A.K., Dick, R.P., 1999. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1471-1479.

Bardgett, R.D., Freeman, C., Ostle, N.J., 2008. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *ISME J* 2, 805-814.



Barrera-Islas, G.A., Ramos-Valdivia, A.C., Salgado, L.M., Ponce-Noyola, T., 2007. Characterization of a  $\beta$ -Glucosidase Produced by a High-Specific Growth-Rate Mutant of *Cellulomonas flavigena*. *Current Microbiology* 54, 266-270.

Bastida, F., Moreno, J.L., Nicolás, C., Hernández, T., García, C., 2009. Soil metaproteomics: A review of an emerging environmental science. Significance, methodology and perspectives. *European Journal of Soil Science* 60, 845-859.

Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T., García, C., 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147, 159-171.

Batjes, N.H., 1996. Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *European Journal of Soil Science* 47 151-163.

Bausenwein, U., Gattinger, A., Langer, U., Embacher, A., Hartmann, H.P., Sommer, M., Munch, J.C., Schloter, M., 2008. Exploring soil microbial communities and soil organic matter: Variability and interactions in arable soils under minimum tillage practice. *Applied Soil Ecology* 40, 67-77.

Benitez, E., Melgar, R., Nogales, R., 2004. Estimating soil resilience to a toxic organic waste by measuring enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1615-1623.

Benitez, E., Nogales, R., Campos, M., Ruano, F., 2006. Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Applied Soil Ecology* 32, 221-231.

Benitez, E., Nogales, R., Elvira, C., Masciandaro, G., Ceccanti, B., 1999. Enzyme activities as indicators of the stabilization of sewage sludges composting with *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology* 67, 297-303.

Benítez, M.-S., Tustas, F.B., Rotenberg, D., Kleinhenz, M.D., Cardina, J., Stinner, D., Miller, S.A., McSpadden Gardener, B.B., 2007. Multiple statistical approaches of community fingerprint data reveal bacterial populations associated with general disease suppression arising from the application of different organic field management strategies. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2289-2301.

Benndorf, D., Balcke, G.U., Harms, H., Von Bergen, M., 2007. Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *ISME Journal* 1, 224-234.

Berriault, R., Chenier, D., Singh, R., Middaugh, J., Mailloux, R., Appanna, V., 2005. Detection and purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase, malic enzyme, and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 26, 2892-2897.

Blackwood, C.B., Waldrop, M.P., Zak, D.R., Sinsabaugh, R.L., 2007. Molecular analysis of fungal communities and laccase genes in decomposing litter reveals differences among forest types but no impact of nitrogen deposition. *Environmental Microbiology* 9, 1306-1316.

Blanco-Canqui, H., Lal, R., 2008. No-Tillage and Soil-Profile Carbon Sequestration: An On-Farm Assessment. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 72, 693-701.

Blom, A., Harder, W., Matin, A., 1992. Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 331-334.

Boschker, H.T.S., Middelburg, J.J., 2002. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 40, 85-95.

Brons, J.K., van Elsas, J.D., 2008. Analysis of Bacterial Communities in Soil by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Libraries as Influenced by Different Reverse Primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, AEM.02195-02107.

Burns, R.G., 1982. Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14, 423-427.

Busto, M.D., Ortega, N., Perez-Mateos, M., 1995. Induction of [beta]-glucosidase in fungal and soil bacterial cultures. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 949-954.

Busto, M.D., Perez-Mateos, M., 2000. Characterization of  $\beta$ -d-glucosidase extracted from soil fractions. *European Journal of Soil Science* 51, 193-200.

Campos, M., Fernández, L., Ruano, F., Cotes, B., Cardenas, J., Castro, J., 2011. Short term response of ants to the removal of ground cover in organic olive orchards *European Journal of Entomology* 108(3), 417-423

Caravaca, F., Masciandaro, G., Ceccanti, B., 2002. Land use in relation to soil chemical and biochemical properties in a semi-arid Mediterranean environment. *Soil and Tillage Research* 68, 23-30.

Carpenter-Boggs, L., Stahl, P.D., Lindstrom, M.J., Schumacher, T.E., 2003. Soil microbial properties under permanent grass, conventional tillage, and no-till management in South Dakota. *Soil and Tillage Research* 71, 15-23.

Castro, J., 2000. Cubiertas vegetales en el olivar: funciones, tipos y manejo. *Vida Rural* 113, 38-40.

Castro, J., Fernández-Ondoño, E., Rodríguez, C., Lallena, A.M., Sierra, M., Aguilar, J., 2008. Effects of different olive-grove management systems on the organic carbon and nitrogen content of the soil in Jaén (Spain). *Soil and Tillage Research* 98, 56-67.

Celik, I., 2005. Land-use effects on organic matter and physical properties of soil in a southern Mediterranean highland of Turkey. *Soil and Tillage Research* 83, 270-277.

Charest, M.H., Antoun, H., Beauchamp, C.J., 2004. Dynamics of water-soluble carbon substances and microbial populations during the composting of de-inking paper sludge. *Bioresource Technology* 91, 53-67.

COM., 2006. Impact assessment of the thematic strategy on soil protection. Communication from the commission to the council, the european parliament, the european economic and social committee and the committee of the regions thematic strategy for soil protection commission of the european communities

Cotes, B., Castro, J., Cardenas, M., Campos, M., 2009. Responses of epigeal beetles to the removal of weed cover crops in organic olive orchards. *Bulletin of insectology* 62, 47-52.

Crecchio, C., Curci, M., Pellegrino, A., Ricciuti, P., Tursi, N., Ruggiero, P., 2007. Soil microbial dynamics and genetic diversity in soil under monoculture wheat grown in different long-term management systems. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1391-1400.

Crecchio, C., Gelsomino, A., Ambrosoli, R., Minati, J.L., Ruggiero, P., 2004. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1873-1883.

Cristóbal, H.A., Schmidt, A., Kothe, E., Breccia, J., Abate, C.M., 2009. Characterization of inducible cold-active  $\beta$ -glucosidases from the psychrotolerant bacterium *Shewanella* sp. G5 isolated from a sub-Antarctic ecosystem. *Enzyme and Microbial Technology* 45, 498-506.

Cui, W., Taub, D.D., Gardner, K., 2007. qPrimerDepot: a primer database for quantitative real time PCR. *Nucleic Acids Research* 35, D805-D809.

D'Amici, G.M., Timperio, A.M., Zolla, L., 2008. Coupling of Native Liquid Phase Isoelectrofocusing and Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis: A Potent Tool for Native Membrane Multiprotein Complex Separation. *Journal of Proteome Research* 7, 1326-1340.

Deng, S.P., Tabatabai, M.A., 1996. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils. II. Glycosidases. *Biology and Fertility of Soils* 22, 208-213.

Di Gennaro, P., Moreno, B., Annoni, E., García-Rodríguez, S., Bestetti, G., Benitez, E., 2009. Dynamic changes in bacterial community structure and in naphthalene dioxygenase expression in vermicompost-amended PAH-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 172, 1464-1469.

Dick, R.P., 1994. Soil enzyme activities as indicator of soil quality, In: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicsek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.), *Defining soil quality for a sustainable environment*. Soil Science Society of America Inc, Madison,WI, pp. 107-124.

Dick, R.P., Breakwill, D., Turco, R., 1996. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrating biological indicators, In: Doran, J.W., Jones, A.J. (Eds.), *Handbook of Methods for Assessment of Soil Quality*. . Soil Science Society of America, Madison, pp. 247-272.

Dick, W.A., 1984. Influence of Long-Term Tillage and Crop Rotation Combinations on Soil Enzyme Activities<sup>1</sup>. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48, 569-574.

Dilly, O., Bartsch, S., Rosenbrock, P., Buscot, F., Munch, J.C., 2001. Shifts in physiological capabilities of the microbiota during the decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutinosa* (Gaertn.) L.) forest. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 921-930.

Dilly, O., Blume, H.P., 1998. Indicators to assess sustainable land use with reference to soil microbiology. *Advances in Geoecology* 31, 29-36.

Doran, J.W., Parkin, T.B., 1994. Defining and assessing soil quality, In: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicsek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp. 3-21.

Doran, J.W., Safley, M., 1997. Defining and assessing soil health and sustainable productivity, In: Pankhurst, C., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.), Biological indicators of soil health. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 1-28.

Doran, J.W., Zeiss, M.R., 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology* 15, 3-11.

Dresler, J., Klimentova, J., Stulik, J., 2011. Bacterial protein complexes investigation using blue native PAGE. *Microbiological Research* 166, 47-62.

Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 20, 601-606.

Elsgaard, L., Andersen, G.H., Eriksen, J., 2002. Measurement of arylsulphatase activity in agricultural soils using a simplified assay. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 79-82.

European Council., 2008. Agriculture Council Political Agreement on the Health Check, 20 November 2008, 16049/08.

FAO, 1998. World Reference Base for Soil Resources. World Soil Resources Reports 84. FAO-ISRIC-ISSS, Roma

FAO, 2001. World Reference Base for Soil Resources. World Soil Resources Reports. FAO-ISRIC-ISSS, Roma

Fegatella, F., Lim, J., Kjelleberg, S., Cavicchioli, R., 1998. Implications of rRNA Operon Copy Number and R ibosome Content in the Marine Oligotrophic Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4433-4438.

Fernández-Quintanilla, C., 1997. Historia y evolución de sistemas de laboreo. El laboreo de conservación, In: García Torres, L., González-Fernández, P. (Eds.), Agricultura de conservación. Fundamentos agronómicos, medioambientales y económicos. Asociación Española Laboreo de Conservación/ Suelos Vivos, Cordoba, España, pp. 1-12.

Fernandez, I., Mahieu, N., Cadisch, G., 2003. Carbon isotopic fractionation during decomposition of plant materials of different quality. *Global Biogeochem. Cycles* 17, 1075.

Filip, Z., 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 88, 169-174.

Fließbach, A., Mäder, P., 2000. Microbial biomass and size-density fractions differ between soils of organic and conventional agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 757-768.

Franzluebbers, A.J., 2002. Soil organic matter stratification ratio as an indicator of soil quality. *Soil and Tillage Research* 66, 95-106.

Freibauer, A., Rounsevell, M.D.A., Smith, P., Verhagen, J., 2004. Carbon sequestration in the agricultural soils of Europe. *Geoderma* 122, 1-23.

Friedli, H., Lotscher, H., Oeschger, H., Siegenthaler, U., Stauffer, B., 1986. Ice core record of the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of atmospheric  $\text{CO}_2$  in the past two centuries. *Nature* 324, 237-238.

Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., Rossi, P., 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4, 634-643.

Frostegård, A., Bååth, E., 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22, 59-65.

García-Orenes, F., Guerrero, C., Roldán, A., Mataix-Solera, J., Cerdà, A., Campoy, M., Zornoza, R., Bárcenas, G., Caravaca, F., 2010. Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil and Tillage Research* 109, 110-115.

García, C., Ceccanti, B., Masciandaro, G., Hernández, T., 1995. Phosphatase and [beta]-glucosidase activities in humic substances from animal wastes. *Bioresource Technology* 53, 79-87.

García, C., Hernandez, T., Costa, F., 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 28, 123-134.

García, C., Hernández, T., Costa, F., 1994. Microbial activity in soils under mediterranean environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 1185-1191.

Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351-2359.

Geisseler, D., Horwath, W.R., 2009. Short-term dynamics of soil carbon, microbial biomass, and soil enzyme activities as compared to longer-term effects of tillage in irrigated row crops. *Biology and Fertility of Soils* 46, 65-72.

Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 877-887.

Glaser, B., 2005. Compound-specific stable-isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ) analysis in soil science. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168, 633-648.

Gleixner, G., Poirier, N., Bol, R., Balesdent, J., 2002. Molecular dynamics of organic matter in a cultivated soil. *Organic Geochemistry* 33, 357-366.

Gliessman, S.R., 2002. Agroecología. Procesos ecológicos en agricultura sostenible. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 359 pp

Gómez, J.A., Battany, M., Renschler, C.S., Fereres, E., 2003. Evaluating the impact of soil management on soil loss in olive orchards. *Soil Use and Management* 19, 127-134.

Gonzalez-Vogel, A., Eyzaguirre, J., Oleas, G., Callegari, E., Navarrete, M., 2011. Proteomic analysis in non-denaturing condition of the secretome reveals the presence of multienzyme complexes in *Penicillium purpurogenum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 145-155.

Gotelli, N.J., Colwell, R.K., 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4, 379-391.

Goyal, K., Selvakumar, P., Hayashi, K., 2001. Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase (BglB) from *Thermotoga maritima* showing transglycosylation activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 15, 45-53.

Gregorich, E.G., Carter, M.R., Angers, D.A., Monreal, C.M., Ellert, B.H., 1994. Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science* 74, 367-385.

Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., Bailey, M.J., 2003. Physiological and Community Responses of Established Grassland Bacterial Populations to Water Stress. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6961-6968.

Guerrero García, A., 2003. *Nueva Olivicultura*, 5<sup>o</sup> ed. Mundi-Prensa Libros, S.A Madrid, España.

Guzmán Casado, G.I., Alonso Mielgo, A.M., 2004. El manejo del suelo en el olivar ecológico, *Manual de olivicultura ecológica*. Universidad de Córdoba, Cordoba, pp. 29-54.

Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., Zuberer, D.A., 2000. Effect of Glyphosate on Soil Microbial Activity and Biomass. *Weed Science* 48, 89-93.

Hangen, E., Buczko, U., Bens, O., Brunotte, J., Hüttl, R.F., 2002. Infiltration patterns into two soils under conventional and conservation tillage: influence of the spatial distribution of plant root structures and soil animal activity. *Soil and Tillage Research* 63, 181-186.

Harris, J.A., 2003. Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration. *European Journal of Soil Science* 54, 801-808.

Harris, R.F., Karlen, D.L., Mulla, D.J., 1996. A conceptual framework for assessment and management of soil quality and health, In: Doran, J.W., Jones, A.J. (Eds.), *Methods for Assessing Soil Quality*. 49, Madison, Wisconsin, pp. 61-82.

Hill, G.T., Mitkowski, N.A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L.R., Jurkonie, D.D., Ficke, A., Maldonado-Ramirez, S., Lynch, S.T., Nelson, E.B., 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 15, 25-36.

Hirsch, P.R., Mauchline, T.H., Clark, I.M., 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 878-887.

Holland, J.M., 2004. The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 103, 1-25.

Hoshino, Y.T., Matsumoto, N., 2007. DNA- versus RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis profiles of a bacterial community during replenishment after soil fumigation. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 434-444.

Ibekwe, A.M., Grieve, C.M., 2004. Changes in developing plant microbial community structure as affected by contaminated water. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 239-248.

Insam, H., 2001. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma* 100, 389-402.

IPPC, 2007. *Climate Change 2007: Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.

Jandl, R., Lindner, M., Vesterdal, L., Bauwens, B., Baritz, R., Hagedorn, F., Johnson, D.W., Minkinen, K., Byrne, K.A., 2007. How strongly can forest management influence soil carbon sequestration? *Geoderma* 137, 253-268.

Jenkinson, D.S., Ladd, J.N., 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover, In: Paul, E.A., Ladd, J.N. (Eds.), *Soil Biochemistry*, Dekker, New York, pp. 415–471.

Jenkinson, D.S., Powlson, D.S., 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V: A method for measuring soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 8, 209-213.

Jenny, H., 1980. *The soil resource: origin and behavior*. The soil resource: origin and behavior.

Johnston, W., Stapleton, R., Sayler, G., 1996. Direct extraction of microbial DNA from soils and sediments, In: Akkermans, D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-9.

Kaiser, K., Eusterhues, K., Rumpel, C., Guggenberger, G., Kögel-Knabner, I., 2002. Stabilization of organic matter by soil minerals — investigations of density and particle-size fractions from two acid forest soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 451-459.

Kandeler, E., Tscherko, D., Stemmer, M., Schwarz, S., Gerzabek, M.H., 2001. Organic matter and soil microorganisms—investigations from the micro- to macro-scale. *Bodenkultur* 52, 117-131.

Karaca, A., Cetin, S.C., Turgay, O.C., Kizilkaya, R., 2011. Soil Enzymes as Indication of Soil Quality, In: Shukla, G., Varma, A. (Eds.), *Soil Enzymology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 119-148.

Karlen, D.L., Mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F., Schuman, G.E., 1997. Soil quality: A concept, definition, and framework for evaluation: (A guest editorial). *Soil Science Society of America Journal* 61, 4-10.

Kay, B.D., VandenBygaart, A.J., 2002. Conservation tillage and depth stratification of porosity and soil organic matter. *Soil and Tillage Research* 66, 107-118.

Kibblewhite, M.G., Ritz, K., Swift, M.J., 2008. Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 685-701.

Kim, J.-Y., Lee, J.-Y., Shin, Y.-S., Kim, G.-J., 2009. Mining and identification of a glucosidase family enzyme with high activity toward the plant extract indican. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57, 284-291.

Kim, K.H., Brown, K.M., Harris, P.V., Langston, J.A., Cherry, J.R., 2007. A proteomics strategy to discover  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus fumigatus* with two-dimensional page in-

gel activity assay and tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* 6, 4749-4757.

Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M., 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1328-1333.

Klose, S., Moore, J.M., Tabatabai, M.A., 1999. Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. *Biology and Fertility of Soils* 29, 46-54.

Klose, S.K., Tabatabai, M.T., 2002. Response of glycosidases in soils to chloroform fumigation. *Biology and Fertility of Soils* 35, 262-269.

Knight, T.R., Dick, R.P., 2004. Differentiating microbial and stabilized [beta]-glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 2089-2096.

Kögel-Knabner, I., Guggenberger, G., Kleber, M., Kandeler, E., Kalbitz, K., Scheu, S., Eusterhues, K., Leinweber, P., 2008. Organo-mineral associations in temperate soils: Integrating biology, mineralogy, and organic matter chemistry. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 61-82.

Köller, K., 2003. Techniques of soil tillage., *Soil tillage in agroecosystems.* , Ed. El Titi. CRC Press, Boca Raton, FL.

Kovacs, A., Yacoby, K., Gophna, U., 2010. A systematic assessment of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) as a tool for estimating bacterial richness. *Research in Microbiology* 161, 192-197.

Krause, F., 2006. Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis* 27, 2759-2781.

Krogh, K., Harris, P., Olsen, C., Johansen, K., Hojer-Pedersen, J., Borjesson, J., Olsson, L., 2010. Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium brasilianum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 143-154.

Lal, R., 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123, 1-22.

Lal, R., 2009. Laws of Sustainable Soil Management. *Agronomy for Sustainable Development* 29, 7-9. Sustainable Agriculture, In: Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Véronique, S., Alberola, C. (Eds.). Springer Netherlands, pp. 9-12.

Lal, R., 2011. Sequestering carbon in soils of agro-ecosystems. *Food Policy* 36, S33-S39.

Laudon, H., Sponseller, R., Lucas, R., Futter, M., Egnell, G., Bishop, K., Ågren, A., Ring, E., Högborg, P., 2011. Consequences of More Intensive Forestry for the Sustainable Management of Forest Soils and Waters. *Forests* 2, 243-260.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta]CT$  Method. *Methods* 25, 402-408.



Lupwayi, N.Z., Harker, K.N., Clayton, G.W., O'Donovan, J.T., Blackshaw, R.E., 2009. Soil microbial response to herbicides applied to glyphosate-resistant canola. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 129, 171-176.

Lymar, E.S., Li, B., Renganathan, V., 1995. Purification and characterization of a cellulose-binding  $\beta$ -glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2976-2980.

Makoi, J.H.J.R., Ndakidemi, P.A., 2008. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology* 7, 181-191.

Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R., 2008. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International* 34, 265-276.

Marschner, B., Brodowski, S., Dreves, A., Gleixner, G., Gude, A., Grootes, P.M., Hamer, U., Heim, A., Jandl, G., Ji, R., Kaiser, K., Kalbitz, K., Kramer, C., Leinweber, P., Rethemeyer, J., Schäffer, A., Schmidt, M.W.I., Schwark, L., Wiesenberg, G.L.B., 2008. How relevant is recalcitrance for the stabilization of organic matter in soils? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 91-110.

Marsh, T.L., 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* 2, 323-327.

Martinez Raya, A., Francia, J.R., Martinez Vilela, A., 2007. Introducción a la agricultura de conservación en olivar. Evaluación del comportamiento de los sistemas de manejo de suelos, In: Rodriguez Lizana, A., Rordoñez Fernandez, R., Gil Ribes, J. (Eds.), *Cubiertas vegetales en olivar*. Consejería de Agricultura y Pesca pp. 7-16.

Mazoyer, M., 1985. *Systèmes agricoles et développement agricole*. Institut National Agronomique Paris-Grigno, Paris, Minéo.

McCaig, A.E., Glover, L.A., Prosser, J.I., 2001. Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4554-4559.

Medeiros, P.M., Simoneit, B.R.T., 2007. Gas chromatography coupled to mass spectrometry for analyses of organic compounds and biomarkers as tracers for geological, environmental, and forensic research. *Journal of Separation Science* 30, 1516-1536.

Medina, F., Iglesias, A., 2010. Agricultural practices with greenhouse mitigation potential in Mediterranean countries: Evaluation and policy implications, In: *Bodenkultur*, U.f. (Ed.), *Proceedings of the 9th European IFSA Symposium*, Vienna, pp. 1401-1410.

Metcalfe, A.C., Krsek, M., Gooday, G.W., Prosser, J.I., Wellington, E.M.H., 2002. Molecular Analysis of a Bacterial Chitinolytic Community in an Upland Pasture. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5042-5050.

Metzger, M.J., Rounsevell, M.D.A., Acosta-Michlik, L., Leemans, R., Schröter, D., 2006. The vulnerability of ecosystem services to land use change. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 114, 69-85.

Mijangos, I., Garbisu, C., 2010. Consequences of soil sampling depth during the assessment of the effects of tillage and fertilization on soil quality: a common oversight. *Soil and Tillage Research* 109, 169-173.

Milgroom, J., Auxiliadora Soriano, M., Garrido, J.M., Gómez, J.A., Fereres, E., 2007. The influence of a shift from conventional to organic olive farming on soil management and erosion risk in southern Spain. *Renewable Agriculture and Food Systems* 22, 1-10.

Monard, C., Martin-Laurent, F., Devers-Lamrani, M., Lima, O., Vandenkoornhuyse, P., Binet, F., 2010. atz gene expressions during atrazine degradation in the soil drilosphere. *Molecular Ecology* 19, 749-759.

Moreno, B., Vivas, A., Nogales, R., Macci, C., Masciandaro, G., Benitez, E., 2009. Restoring biochemical activity and bacterial diversity in a trichloroethylene-contaminated soil: the reclamation effect of vermicomposted olive wastes. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 253-264.

Moreno, J.L., Bastida, F., Hernández, T., García, C., 2008. Relationship between the Agricultural Management of a Semi-arid Soil and Microbiological Quality. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39, 421 - 439.

Moscatelli, M.C., Lagomarsino, A., Garzillo, A.M.V., Pignataro, A., Grego, S., 2011. [beta]-Glucosidase kinetic parameters as indicators of soil quality under conventional and organic cropping systems applying two analytical approaches. *Ecological Indicators* In Press, Corrected Proof.

Murray, A.E., Hollibaugh, J.T., Orrego, C., 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2676-2680.

Muñoz-Cobo, J., Moreno Montesinos, J., Romero, C., Ruiz, M., 2001. Análisis cualitativo y cuantitativo de las comunidades de aves en cuatro tipos de olivares de Jaén. (I) Comunidades Primaverales. *Plagas*, 27, 109-125.

Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2, 317-322.

Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.

Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A., Wawer, C., 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities., In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., de

Bruijn, F.J. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-23.

Muyzer, G., 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.

Myers, R., Fischer, S., Lerman, L., Maniatis, T., 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 13, 3131–3145.

Naafs, D.F.W., Van Bergen, P.F., Boogert, S.J., De Leeuw, J.W., 2004. Solvent-extractable lipids in an acid andic forest soil; variations with depth and season. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 297-308.

Nannipieri, P., 2006. Role of Stabilised Enzymes in Microbial Ecology and Enzyme Extraction from Soil with Potential Applications in Soil Proteomics, In: Nannipieri, P., Smalla, K. (Eds.), *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 75-94.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54, 655-670.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., Valori, F., 2008. Effects of Root Exudates in Microbial Diversity and Activity in Rhizosphere Soils, In: Nautiyal, C.S., Dion, P. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence*. Springer Berlin, Germany, pp. 339-365.

Nannipieri, P., Grego, S., Ceccanti, B., 1990. Ecological significance of biological activity in soil, In: Bollag, J.M., Stotzky, G. (Eds.), *Soil biochemistry*, vol 6., Dekker, New York, pp. 293-355.

Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil, In: R.G Burns, Dick., R.P. (Eds.), *Enzyme in the Environmental Activit, Ecology and Application*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-33.

Navarro, C., Parra, M.A., 1997. Plantación, en Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L. *El cultivo del olivo*. Junta de Andalucía y Mundi-Prensa, Madrid, 170-189.

Nei, M., Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 5269-5273.

Nicolaisen, M.H., Bælum, J., Jacobsen, C.S., Sørensen, J., 2008. Transcription dynamics of the functional *tfdA* gene during MCPA herbicide degradation by *Cupriavidus necator* AEO106 (pRO101) in agricultural soil. *Environmental Microbiology* 10, 571-579.

Nielsen, N.M., Winding, A., Binnerup, S., Hansen, B., Kroer, N., 2002. Microorganisms as Indicators of Soil Health. National Environmental Research Institute (NERI). Technical Report No. 388.

Niemi, R.M., Vepsäläinen, M., Wallenius, K., Simpanen, S., Alakukku, L., Pietola, L., 2005. Temporal and soil depth-related variation in soil enzyme activities and in root growth of

red clover (*Trifolium pratense*) and timothy (*Phleum pratense*) in the field. *Applied Soil Ecology* 30, 113-125.

Norris, T.B., McDermott, T.R., Castenholz, R.W., 2002. The long-term effects of UV exclusion on the microbial composition and photosynthetic competence of bacteria in hot-spring microbial mats. *FEMS Microbiology Ecology* 39, 193-209.

Novak, J.M., Bauer, P.J., Hunt, P.G., 2007. Carbon Dynamics under Long- Term Conservation and Disk Tillage Management in a Norfolk Loamy Sand. *Soil Science Society of America Journal* 71, 453-456.

O'Donnell, A.G., Görres, H.E., 1999. 16S rDNA methods in soil microbiology. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 225-229.

O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrell, P.H., 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12, 1133-1142.

Ogunseitan, O.A., LeBlanc, J.F., 2004. Environmental proteomic: methods and applications for aquatic ecosystems, In: Kowalchuck, G.A., Bruijn, F., Head, I.M., Akkermans, A.D., Elsas, J.D. (Eds.), *Molecular microbial ecology manual*, 2nd ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1027-1046.

Ogunseitan, O., 2006. Soil Proteomics: Extraction and Analysis of Proteins from Soils, In: Nannipieri, P., Smalla, K. (Eds.), *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 95-115.

Ogunseitan, O.A., 2001. Microbial community proteomics, In: Rochelle, P.A. (Ed.), *Environmental molecular microbiology: protocols and applications*. Horizon Scientific Press, Norfolk, UK, pp. 25–140.

Ordoñez, R., Ramos, F.J., González, P., Pastor, M., Giráldez, J.V., 2001. Eficacia de la aplicación continuada de restos de poda de olivo sobre las propiedades físico-químicas de un suelo de olivar., V Jornadas sobre Investigación de la Zona Saturada del Suelo, Universidad pública de Navarra.

Øvreås, L., 2000. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters* 3, 236-251.

Pajaron, M., 2000. Valores agroecológicos de los sistemas agrarios actuales: el olivar. III, Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica: Una alternativa para el mundo rural del tercer milenio., Valencia, 21 al 26 de Septiembre de 1988., pp. 17–30.

Palese, A.M., Nuzzo, V., Favati, F., Pietrafesa, A., Celano, G., Xiloyannis, C., 2010. Effects of water deficit on the vegetative response, yield and oil quality of olive trees (*Olea europaea* L., cv Coratina) grown under intensive cultivation. *Scientia Horticulturae* 125, 222-229.

Parr, J.F., Papendick, R.I., Hornick, S.B., Meyer, R.E., 1992. Soil quality: Attributes and relationship to alternative and sustainable agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* 7, 5-11.

Parra López, C., Calatrava Requena, J., De Haro Giménez, T., 2004. Análisis multifuncional de sistemas agrarios: Aplicación del método del Proceso Analítico Jerárquico al olivar de producción convencional, ecológica e integrada de Andalucía. Ed. Unicaja. Málaga. España. Accésit en el VI Premio Unicaja de investigación sobre desarrollo económico y estudios agrarios. ISBN: 84-95191-73-3.

Pastor, M., 2008. Sistema de manejo en el suelo, In: Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (Eds.), El cultivo del olivo, 6º ed. Ediciones Mundiprensa y Junta de Andalucía, Madrid, España, pp. 240-295.

Pastor, M., Castro, J., Humanes, M.D., Saavedra, M., 1997. La erosión y el olivar: cultivo con cubierta vegetal., Comunicación I+D Agroalimentaria 22/97. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, Sevilla.

Pastor, M., Guerrero, A., 1990. Influence of non-tillage on olive grove production. *Acta Horticulturae* 286, 283-286.

Peigné, J., Ball, B.C., Roger-Estrade, J., David, C., 2007. Is conservation tillage suitable for organic farming? A review. *Soil Use and Management* 23, 129-144.

Pérez-Piqueres, A., Edel-Hermann, V., Alabouvette, C., Steinberg, C., 2006. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 460-470.

Perucci, P., Casucci, C., Dumontet, S., 2000. An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1927-1933.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, e36.

Powlson, D.S., 1994. The soil microbial biomass: before, beyond and back, In: Ritz, K., Dighton, J., Giller, G.E. (Eds.), *Beyond the Biomass*, Wiley, Chichester, UK, pp. 3-20.

Pradet-Balade, B., Boulmé, F., Beug, H., Müllner, E.W., Garcia-Sanz, J.A., 2001. Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? *Trends in Biochemical Sciences* 26, 225-229.

Ramanathan, V., Carmichael, G., 2008. Global and regional climate changes due to black carbon. *Nature Geosci* 1, 221-227.

Reeve, J.R., Schadt, C.W., Carpenter-Boggs, L., Kang, S., Zhou, J., Reganold, J.P., 2010. Effects of soil type and farm management on soil ecological functional genes and microbial activities. *ISME J* 4, 1099-1107.

Reilly, J.M., 1999. Climate change and agriculture: The state of the scientific knowledge. *Climatic Change* 43, 645-650.

Reisinger, V., Eichacker, L.A., 2006. Analysis of Membrane Protein Complexes by Blue Native PAGE. *PROTEOMICS* 6, 6-15.

Rigou, P., Rezaei, H., Grosclaude, J., Staunton, S., Quiquampoix, H., 2006. Fate of Prions in Soil: Adsorption and Extraction by Electroelution of Recombinant Ovine Prion Protein from Montmorillonite and Natural Soils. *Environmental Science & Technology* 40, 1497-1503.

Rodríguez-Lizana, A., Espejo-Pérez, A., González-Fernández, P., Ordóñez-Fernández, R., 2008. Pruning Residues as an Alternative to Traditional Tillage to Reduce Erosion and Pollutant Dispersion in Olive Groves. *Water, Air, & Soil Pollution* 193, 165-173.

Roszak, D.B., Colwell, R.R., 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews* 51, 365-379.

Rowan, A.K., Snape, J.R., Fearnside, D., Barer, M.R., Curtis, T.P., Head, I.M., 2003. Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 195-206.

Rubino, M., Lubritto, C., D'Onofrio, A., Terrasi, F., Kramer, C., Gleixner, G., Cotrufo, M., 2009. Isotopic evidences for microbiologically mediated and direct C input to soil compounds from three different leaf litters during their decomposition. *Environmental Chemistry Letters* 7, 85-95.

Saminathan, M., Muthukumaresan, K.T., Rengarajan, S., Muthukrishnan, N., Gautam, P., 2008. Blue native electrophoresis study on lipases. *Analytical Biochemistry* 377, 270-271.

Sánchez-Monedero, M., Mondini, C., Cayuela, M., Roig, A., Contin, M., De Nobili, M., 2008. Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils. *Biology and Fertility of Soils* 44, 885-890.

Schägger, H., Cramer, W.A., Vonjagow, G., 1994. Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 217, 220-230.

Schägger, H., von Jagow, G., 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199, 223-231.

Schimel, J., Balsler, T.C., Wallenstein, M., 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* 88, 1386-1394.

Schloter, M., Dilly, O., Munch, J.C., 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 98, 255-262.

Schoenholtz, S.H., Miegroet, H.V., Burger, J.A., 2000. A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. *Forest Ecology and Management* 138, 335-356.

Schulze, W., 2004. Protein analysis in dissolved organic matter: what free proteins from soil leachate and surface water can tell us-a perspective. *Biogeosciences Discussion* 1, 825-853.

Schulze, W.X., Gleixner, G., Kaiser, K., Guggenberger, G., Mann, M., Schulze, E.-D., 2005. A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles. *Oecologia* 142, 335-343.

Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T., Uchiyama, H., 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters* 23, 1205-1208.

Shackle, V.J., Freeman, C., Reynolds, B., 2000. Carbon supply and the regulation of enzyme activity in constructed wetlands. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1935-1940.

Sharma, S., Radl, V., Hai, B., Kloos, K., Mrkonjic Fuka, M., Engel, M., Schauss, K., Schloter, M., 2007. Quantification of functional genes from prokaryotes in soil by PCR. *Journal of Microbiological Methods* 68, 445-452.

Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S., Myers, R.M., 1989. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 232-236.

Six, J., Conant, R.T., Paul, E.A., Paustian, K., 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil* 241, 155-176.

Six, J., Guggenberger, G., Paustian, K., Haumaier, L., Elliott, E.T., Zech, W., 2001. Sources and composition of soil organic matter fractions between and within soil aggregates. *European Journal of Soil Science* 52, 607-618.

Six, J., Paustian, K., Elliott, E.T., Combrink, C., 2000. Soil Structure and Organic Matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 681-689.

Skujins, J., 1976. Extracellular enzymes in soil. *CRC critical reviews in microbiology* 4, 383-421.

Smith, P., 2004. Carbon sequestration in croplands: the potential in Europe and the global context. *European Journal of Agronomy* 20, 229-236.

Sofo, A., Celano, G., Ricciuti, P., Curci, M., Dichio, B., Xiloyannis, C., Crecchio, C., 2010. Changes in composition and activity of soil microbial communities in peach and kiwifruit Mediterranean orchards under an innovative management system. *Soil Research* 48, 266-273.

Sofo, A., Manfreda, S., Dichio, B., Fiorentino, M., Xiloyannis, C., 2007. The olive tree: A paradigm for drought tolerance in Mediterranean climates. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions* 4, 2811-2835.

Solaiman, Z., Kashem, M., Matsumoto, I., 2007. Environmental Proteomics: Extraction and Identification of Protein in Soil, In: Varma, A., Oelmüller, R. (Eds.), *Advanced Techniques in Soil Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 155-166.

Steinweg, J.M., Plante, A.F., Conant, R.T., Paul, E.A., Tanaka, D.L., 2008. Patterns of substrate utilization during long-term incubations at different temperatures. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2722-2728.

- Stevenson, F.J., 1994. Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions, New York.
- Stott, D.E., Andrews, S.S., Liebig, M.A., Wienhold, B.J., Karlen, D.L., 2010. Evaluation of  $\beta$ -glucosidase activity as a soil quality indicator for the Soil Management Assessment Framework. *Soil Science Society of America Journal* 74, 107-119.
- Stromberger, M.E., Shah, Z., Westfall, D.G., 2011. High specific activity in low microbial biomass soils across a no-till evapotranspiration gradient in Colorado. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 97-105.
- Stubner, S., 2002. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen™ detection. *Journal of Microbiological Methods* 50, 155-164.
- Tabatabai, M.A., 1982. Soil enzymes, In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties*. Soil Science Society of America, Madison, pp. 903-947.
- Tabatabai, M.A., 1994. Soil enzymes, In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, P.S. (Eds.), *Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties*. SSSA Book Series No. 5, Madison, pp. 775-833.
- Taguas, E.V., Ayuso, J.L., Peña, A., Yuan, Y., Pérez, R., 2009. Evaluating and modelling the hydrological and erosive behaviour of an olive orchard microcatchment under no-tillage with bare soil in Spain. *Earth Surface Processes and Landforms* 34, 738-751.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T.L., Flynn, S.J., 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13, 109-122.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782-787.
- Torsvik, V., Øvreås, L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5, 240-245.
- Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F., Leirós, M.C., 2007. Thermodynamic parameters of enzymes in grassland soils from Galicia, NW Spain. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 311-319.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, C., Gil-Sotres, F., Seoane, S., 1997. Towards a biochemical quality index for soils: An expression relating several biological and biochemical properties. *Biology and Fertility of Soils* 26, 100-106.
- Turner, B.L., Hopkins, D.W., Haygarth, P.M., Ostle, N., 2002. [beta]-Glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology* 20, 157-162.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703-707.
- Vanderlinden, K., Gabriels, D., Giráldez, J.V., 1998. Evaluation of infiltration measurements under olive trees in Córdoba. *Soil and Tillage Research* 48, 303-315.



Vilar, J., Velasco, M.M., 2007. Influencia en el precio del aceite de oliva de la utilización de otros aceites vegetales para la elaboración de biocombustibles. Seminario Estatal del sector del olivar de COAG, Zaragoza, octubre.

Vivas, A., Moreno, B., del Val, C., Macci, C., Masciandaro, G., Benitez, E., 2008. Metabolic and bacterial diversity in soils historically contaminated by heavy metals and hydrocarbons. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 1287-1296.

Vivas, A., Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., Benitez, E., 2009. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technology* 100, 1319-1326.

Vleeshouwers, L.M., Verhagen, A., 2002. Carbon emission and sequestration by agricultural land use: a model study for Europe. *Global Change Biology* 8, 519-530.

Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N., 2008. Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2098-2106.

Wallis, P.D., Haynes, R.J., Hunter, C.H., Morris, C.D., 2010. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. *Applied Soil Ecology* 46, 147-150.

Wang, Y., Tu, C., Cheng, L., Li, C., Gentry, L.F., Hoyt, G.D., Zhang, X., Hu, S., 2011. Long-term impact of farming practices on soil organic carbon and nitrogen pools and microbial biomass and activity. *Soil and Tillage Research*.

West, T., Six, J., 2007. Considering the influence of sequestration duration and carbon saturation on estimates of soil carbon capacity. *Climatic Change* 80, 25-41.

Widmer, F., Fließbach, A., Laczkó, E., Schulze-Aurich, J., Zeyer, J., 2001. Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog(TM)-analyses. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1029-1036.

Wilmes, P., Bond, P.L., 2006. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends in Microbiology* 14, 92-97.

Wittig, I., Karas, M., Schägger, H., 2007. High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 1215-1225.

Wittig, I., Schägger, H., 2009. Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *PROTEOMICS* 9, 5214-5223.

WMO, 2005. Climate and land degradation. World Meteorology Office, Geneva, Switzerland, p. 32.

Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51, 221-271.

Wu, T., Chellemi, D., Graham, J., Martin, K., Roskopf, E., 2008. Comparison of Soil Bacterial Communities Under Diverse Agricultural Land Management and Crop Production Practices. *Microbial Ecology* 55, 293-310.

Yang, Y.H., Yao, J., Hu, S., Qi, Y., 2000. Effects of Agricultural Chemicals on DNA Sequence Diversity of Soil Microbial Community: A Study with RAPD Marker. *Microbial Ecology* 39, 72-79.

Yu, Z., 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, 4800-4806.

Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111-129.

Zhang, C., Li, D., Yu, H., Zhang, B., Jin, F., 2007. Purification and characterization of piceid- $\beta$ -d-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry* 42, 83-88.



## APÉNDICE

---



## ABREVIATURAS

**ADRA:** del inglés Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (análisis de restricción ADNr amplificado)

**ARISA:** del inglés, Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer (Análisis de los espacios intergénicos ribosomales)

**ATP:** Adenosín Trifosfato

**BNE:** del inglés, Blue Native-PAGE

**CAP:** del inglés, Common Agricultural Policy (Política agraria común, **PAC**)

**CB+:** cellobiosa

**CEE:** Comunidad Económica Europea

**CFCs:** Cluorofluorocarbonados

**CFU:** del inglés, Colony-forming unit (Unidad formadora de colonias)

**CH:** Cover crop + herbicides (Cubierta con herbicidas)

**CM:** Cover crops + mower (Cubierta con desbrozadora)

**CNE:** del inglés, Clear Native-PAGE

**COM:** Comisión de las Comunidades Europeas

**COS:** Carbono orgánico del Suelo

**CPC:** del inglés, Cellobiose Polymyxin Colistin Agar

**DCM:** dicholomethane

**DGGE:** del inglés, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Análisis mediante electroforesis en agente desnaturalizante)

**DMM:** mannose analog 1-deoxymannojirimycin

**EDTA:** Ácido Etileno amino tetra acético

**EEA:** del inglés, European Environment Agency (Agencia europea de medio ambiente)

**EMBL:** European Molecular Biology Laboratoy (EMBL)

## Apéndice

- FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación
- FAME:** del inglés, fatty acid methyl esterase (ésteres metílicos de los ácidos grasos)
- FDAH:** fluoresceína diacetato hidrolasa
- FE:** del inglés, fumigation-extratio (extracción-fumigación)
- FI:** incubación-fumigación
- FISH:** del inglés, Fluorescent In Situ Hybridization (Análisis de fluorescencia in-situ )
- GC:** del inglés, Gas chromatography (Cromatografía de gases)
- GEI:** Gases de efecto invernadero
- GLU +:** glucosa
- HCFCs:** Hidroclorofluorocarbonados
- Hr-CNe:** del inglés, High resolution clear native PAGE
- HMW:** High molecular weigh
- INT:** piodophenyl-3 p-nitrophenyl-5 tetrazolium chloride
- INTF:** Iodonitrotetrazolium formazan
- IPCC:** del inglés, Intergovernmental Panel on C limate Change (Grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático)
- LULUCG:** del inglés, Land use, land-use change and forestry (cambio del uso de la tierra y silvicultura)
- NC:** Non-tillage and no-cover (No laboreo sin cubierta)
- NCBI:** National Center for Biotechnology Institute
- MNP:** del inglés, Most probable number Número más probable
- MOS:** Materia orgánica del suelo
- MUGlc:** 4-methylumbelliferyl-b-D-glucoside
- OTU:** del inglés, operational taxonomic unit (Unidad taxonómica operacional)
- PAGE:** del inglés, polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en geles de poliacrilamida)

**PDB:** Pee Dee Belemnite (estándar del  $\delta^{13}\text{C}$ )

**PI:** Punto isoeléctrico

**PLFA:** del inglés, fatty acid analysis (Análisis de ácidos grasos fosfolipídicos)

**qPCR :** del inglés, quantitative polymerase chain reaction, (PCR cuantitativa) o del inglés real time polymerase chain reaction , (PCR en tiempo real)

**RADP:** del inglés, Random Amplification of Polymorphic DNA (ADN polimórfico amplificado al azar)

**RISA:** del inglés, Restriction of Inter Spacer Sequences Analysis (análisis del espacio inter-ribosomal)

**RMP:** del inglés, recommended management practices (Prácticas agrícolas recomendadas)

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**SIR:** del inglés, Substrate-induced respiration (respiración inducida por sustrato)

**SOC:** del inglés, soil organic carbon (carbono orgánico del suelo)

**T:** Tillage (Laboreo)

**Taq:** Thermus aquaticus

**TGGE:** del inglés, Temperature gradient gel electrophoresis (Análisis mediante electroforesis en gel con gradiente térmico)

**T-RFLP:** del inglés, Terminal restriction fragment length polymorphism (Análisis de fragmentos de restricción)

**TSA:** Tryptic Soy Agar plates

**UNFCCC:** Convención Marco de las Naciones Unidas sobre cambio Climático



**INDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

Página

**Introducción**

**Tabla1.** Ventajas e inconvenientes del uso de la cubierta vegetal..... 14

**Figura 1.** Riesgo de vulnerabilidad a la degradación del suelo ..... 3

**Figura 2.** Propiedades, procesos y prácticas agrícolas que rigen la degradación o resistencia de un suelo y manejos sostenible ..... 4

**Figura 3.** Esquema de las diferentes alternativas de cultivo que pueden emplearse en olivar ..... 11

**Figura 4.** Distribución de la superficie de olivar por comunidad autónoma ..... 15

**Figura 5.** Principales sumideros de carbono ..... 17

**Figura 6.** Modelo de la dinámica de la materia orgánica ..... 18

**Figura 7.** Dinámica del carbono en el suelo ..... 19

**Figura 8.** Dogma central de la biología molecular ..... 29

**Materiales**

**Tabla 1.** Caracterización textural del suelo..... 50

**Figura 1.** Localización finca Salido Bajo ..... 45

**Figura 2.** Diseño experimental ..... 47

**Figura 3.** Toma de muestras de suelo ..... 47

**Figura 4.** Laboreo (T)..... 49

**Figura 5.** No laboreo (NC) ..... 49

**Figura 6.** Cubierta vegetal +herbicida (CH)..... 49

**Figura 7.** Cubierta vegetal + desbrozadora (CM ) ..... 50

**Figura 8.** Localización toma de muestras..... 51

**Figura 9.** Suelos muestreados ..... 52

**Figura 10.** Microcosm ..... 52

**Resultados**

**Capítulo 1. Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality**

**Table 1.** Soil organic carbon, bacterial population number and Shannon diversity index values for DGGE profiles for tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils. Mean values corresponding to four plots for each treatment ±standard error. For each column, significant differences are indicated by different letters ( $P \leq 0.05$ )..... 62

**Figure 1.** Enzyme activities for tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils. Mean values corresponding

to four plots for each treatment are presented for dehydrogenase ( $\text{mg INTF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) x10, o-diphenol oxidase ( $\text{mmol catechol } 10 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ )/1.5, b-glucosidase ( $\text{mg PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )/ 100, phosphatase ( $\text{mg PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )/100, urease ( $\text{mg NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) and arylsulphatase ( $\text{mg PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). For each enzyme activity, significant differences are indicated by different letters ( $P \leq 0.05$ )..... 63

**Figure 2.** DGGE profiles for tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils ..... 64

**Figure 3.** (a) Nei and Li's similarity coefficients (UPGMA dendrogram, tolerance 0.5%) and (b) Raup and Crick probability-based index of similarity cluster analyses, similarity values ( $S_{RC}$ ) between samples for DGGE profiles for tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils..... 64

**Capítulo 2. Bacterial  $\beta$ -glucosidase function and metabolic activity depend on soil management in semiarid rainfed agriculture**

**Table 1.** Soil Organic Carbon (SOC), Water Soluble Carbon (WSC) and ratios of transcript:gene copies in tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils ..... 74

**Figure 1.** Raup and Crick probability-based index of similarity cluster analyses for DGGE profiles for tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops+mower (CM) soils (adapted from Moreno et al., 2009)..... 73

**Figure 2.** Molecular estimates for tillage (T), non-tillage and no-cover (NC), cover crop + herbicides (CH), and cover crops + mower (CM) soils. Values are indicated when lower than the first y-chart. For each parameter, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post hoc)..... 74

**Capítulo 3. Transcriptional response of soil bacteria to land management in a highly vulnerable agroecosystem**

**Table 1.** Bacterial strains used to test specificity of primers ..... 85

**Table 2.** Nearest match identification of DGGE bands. The 100 % of clone sequenced showed homology with  $\beta$ -glucosidase gene ..... 85

**Table 3.** Soil Organic Carbon (SOC) and Water Soluble Carbon (WSC) in tillage (T) and cover crops + mower (CM) soils. For each parameter, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc)..... 86

**Table 4.** Similarity values ( $S_{RC}$ ) between samples for profiles of DNA and cDNA-based DGGE analysis for tillage (T) and cover crops + mower (CM) soils ..... 86

**Figure 1.** Enzyme activities for tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils. Vertical bars for SE are indicated only when larger than symbols. For each enzyme activity, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc) ..... 88

**Figure 2.** Molecular estimates for tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils. Vertical bars for SE are indicated only when larger than symbols. For

each parameter, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc) ..... 88

**Figure 3.**  $\beta$ -glucosidase gene expression normalized by the internal standard 16S rRNA in tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils. Vertical bars for SE are indicated only when larger than symbols. For each management, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc) ..... 89

**Figure 4.**  $\beta$ -glucosidase transcripts to genes ratio in tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils ..... 89

**Figure 5.** DGGE profiles for tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils. 1: depth 0-2 cm, 2: depth 2-5 cm, 3: depth 5-10 cm, 4: depth 10-20 cm, M: molecular size marker (100 bp DNA ladder, Genecraft®, Germany) ..... 90

**Figure 6.** Raup and Crick probability-based index of similarity cluster analyses of DNA- (a) and cDNA- based DGGE analysis (b) for tillage (T) and spontaneous cover crops + mower (CM) soils ..... 91

#### Capítulo 4. Consequences of soil management for molecular diversity and expression of bacterial $\beta$ -glucosidase genes

**Table 1.** Soil organic carbon (SOC), water soluble carbon (WSC) and enzyme activities for no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils (means $\pm$ SE). For each parameter, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc) ..... 103

**Table 2.** Free acids composition for no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils ( $\text{ng g}^{-1}$ ) ..... 104

**Table 3.**  $\delta^{13}\text{C}\%$  for no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils ..... 105

**Table 4.** Nearest match identification of DGGE bands for no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils ( $\text{ng g}^{-1}$ ) ..... 107

**Figure 1.** Molecular estimates for no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils. Mean values are presented as copy numbers  $\times \text{g soil}^{-1}$ . Values are indicated when lower than the first y-chart. Vertical bars denote 0.95 confidence intervals. For each parameter, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc) ..... 105

**Figure 2.**  $\beta$ -glucosidase transcripts:genes ratio in no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils ..... 107

**Figure 3.** DGGE profiles. 1: NC depth 0-2 cm, 2: NC depth 2-5 cm, 3: NC depth 5-10 cm, 4: NC depth 10-20 cm, 5: CH depth 0-2 cm, 6: CH depth 2-5 cm, 7: CH depth 5-10 cm, 8: CH depth 10-20 cm ..... 107

**Figure 4.** UPGMA dendrogram (a) and Raup and Crick probability-based index of similarity cluster analyses and similarity values (SRC) between samples (b) for DGGE profiles for no cover (NC) and spontaneous cover crops (CH) soils ..... 107

## Capítulo 5. Molecular analyses of $\beta$ -glucosidase diversity and function in soil

<b>Table 1.</b> Primers used for PCR amplifications in this study .....	119
<b>Figure 1.</b> Total TSA plate enumerations (means $\pm$ standard deviations). Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments of covered or non-covered soils; different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between covered and non-covered soils of any single treatment .....	120
<b>Figure 2.</b> Total CPC plate enumerations (means $\pm$ standard deviations). Different lower case letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments of covered or non-covered soils; different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between covered and non-covered soils of any single treatment .....	120
<b>Figure 3.</b> Alignment of representative aminoacids clons; conserved domains of oligonucleotides $\beta$ gluF y $\beta$ gluR2 are showed in red, bgluF2 y bgluR4 are showed in green. (For interpretation of the reference to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article .....	121
<b>Figure 4.</b> a) Verification of PCR products of real-time PCR by agarose gel electrophoresis. Melting curves of b) <i>P. putida</i> , c) Control soil, d) soil amended with cellobiose, e) soil amended with glucose.....	122
<b>Figure 5.</b> Copy number of $\beta$ -glucosidase gene .....	122
<b>Figure 6.</b> In-gel detection of $\beta$ -glucosidase activities following non-denatured-PAGE electrophoresis. Pp: <i>P. putida</i> ; Lane1: Control uncovered soil; Lane 2: CB + uncovered soil; Lane 3: GLU + uncovered soil; Lane 4: Control covered soil; Lane 5: CB + covered soil; Lane 6: GLU + covered soil; L: 50-bp ladder.....	123
<b>Figure 7.</b> Coomassie blue stained proteins extracted from <i>P. putida</i> following SDS-PAGE electrophoresis .....	123





