

Relación entre variabilidad biogeoquímica y rasgos estructurales de la comunidad microbiana en suelos forestales: Bosques de *Abies pinsapo* como caso de estudio

P. Torres-Cañabate¹, M.B. Hinojosa², R. García-Ruiz¹, T. Daniell², J.A. Carreira¹

(1) Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, España.

(2) Scottish Crop Research Institute (SCRI). Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, Scotland, UK.

➤ Recibido el 20 de febrero de 2009, aceptado el 15 de abril de 2009.

Torres-Cañabate, P., Hinojosa, M.B., García Ruíz, R., Daniell, T., Carreira, J.A. (2009). Relación entre variabilidad biogeoquímica y rasgos estructurales de la comunidad microbiana en suelos forestales: Bosques de *Abies pinsapo* como caso de estudio. *Ecosistemas* 18(2):91-102.

Relación entre variabilidad biogeoquímica y rasgos estructurales de la comunidad microbiana en suelos forestales: Bosques de *Abies pinsapo* como caso de estudio. Tradicionalmente, los estudios biogeoquímicos consideraban el suelo como una "caja negra", conectada con el resto del ecosistema mediante flujos de entrada y de salida de nutrientes, en la que éstos experimentan transformaciones mediadas en gran parte por microorganismos desconocidos. El desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha incrementado el conocimiento sobre las comunidades microbianas del suelo. Estudios recientes han puesto de manifiesto correspondencias entre la variabilidad de la disponibilidad de nutrientes y la estructura de la comunidad microbiana en suelos forestales. A este respecto, hemos empleado bosques de *Abies pinsapo* como modelo ya que muestran una gran variabilidad biogeoquímica asociada a diferencias litológicas y sucesionales, mientras que la estacionalidad mediterránea provoca una alta variabilidad intra-anual en la disponibilidad de nutrientes. Además, existen pinsapares sujetos a limitación o a saturación de nitrógeno. Mediante análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP), hemos puesto de manifiesto que los patrones de variabilidad biogeoquímica descritos en los pinsapares se corresponden con cambios en la composición y estructura de sus comunidades bacterianas.

Palabras clave: comunidad bacteriana del suelo, variabilidad biogeoquímica, T-RFLP.

Torres-Cañabate, P., Hinojosa, M.B., García Ruíz, R., Daniell, T., Carreira, J.A. (2009). Linking biogeochemical variability and microbial community structure in forest soils: *Abies pinsapo*-fir forests as a study case. *Ecosistemas* 18(2):91-102.

Linking biogeochemical variability and microbial community structure in forest soils: *Abies pinsapo*-fir forests as a study case. Traditionally, soil has been considered as a "black box", connected to the rest of the ecosystem by input and output fluxes, where nutrients are transformed mainly through processes controlled by unknown microorganisms. The development of new molecular techniques has increased our knowledge about microbiological soil communities. Recent studies reveal that change in nutrient availability in forest soils is associated with shifts in the soil community structure. We have used *Abies pinsapo*-fir forests as a model case to this regard, since they show a marked among-sites biogeochemical variability due to changes in lithology and successional status, while Mediterranean seasonality determines high intra-year variability in nutrients availability. Moreover, *A. pinsapo* forests that are either N-limited or N-saturated do exist. Using terminal restriction fragments length polymorphism (T-RFLP) analysis we have demonstrated that these patterns of biogeochemical variability are associated with shifts in the structure of the soil bacterial communities.

Key words: soil bacterial community, biogeochemical variability, T-RFLP.

Introducción

El suelo es un medio opaco y muy heterogéneo a pequeña escala, cuyo funcionamiento ecológico, esencialmente heterotrófico, está fuertemente controlado por la actividad de microorganismos. Se estima que un solo gramo de suelo puede albergar hasta 10^9 bacterias de cerca de 10^4 ribotipos distintos, de los cuales más del 95% no pueden ser cultivados por los

métodos tradicionales (Rosch y Bothe 2005). No es casual, por tanto, que los estudios biogeoquímicos hayan considerado tradicionalmente al suelo como una “caja negra” en sus diagramas de flujo (Tiedje et al. 1999). De esta “caja” apenas se podían precisar algunas de sus flechas de entrada (ej. producción de hojarasca) y salida (ej. tasas de lixiviación), y el balance neto de intercambios bi-direccionales entre distintas reservas de nutrientes (ej., tasas netas de mineralización y nitrificación). Habitualmente, se comenzaba a estudiar el proceso biogeoquímico de interés y de ahí se pasaba a tratar de descubrir los microorganismos y las rutas metabólicas implicadas en el mismo. Sin embargo, la caracterización de las comunidades microbianas en el medio ambiente es complicada, pues a las limitaciones de los tradicionales métodos de cultivo *in vitro* se une la extrema riqueza de especies y la elevada variabilidad de su distribución a muy pequeña escala (Rosch y Bothe 2005).

En la actualidad, las nuevas técnicas de biología molecular están cambiando radicalmente el panorama, permitiendo el acceso a poblaciones microbianas no cultivables y en las propias muestras frescas de suelo (*in vivo*). Esto ha revolucionado nuestra capacidad para enlazar los fenómenos biogeoquímicos con la ecología microbiana, en la que se están realizando novedosos descubrimientos sobre la diversidad taxonómica y funcional de los microorganismos. Ahora es posible, en el sentido contrario al tradicional, enfocar en primer lugar el estudio hacia los distintos genes funcionales, los microorganismos en los que residen y sus interacciones a nivel de comunidad, lo cual puede llegar a ampliar nuestro conocimiento sobre numerosos procesos biogeoquímicos importantes a escala local, regional y global (Zak et al. 2006).

Existe un amplio abanico de nuevas técnicas moleculares para el estudio, con una fiabilidad sin precedentes, de la estructura y función de la comunidad microbiana del suelo.

Algunas de ellas posibilitan la comparación directa entre comunidades microbianas en muestras frescas de suelo. Estos métodos se basan en la extracción del ADN de la comunidad microbiana y en su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Al ADN extraído y amplificado se le puede aplicar un amplio rango de técnicas que generan patrones de bandas de fragmentos de ácidos nucleicos, proporcionando una huella dactilar (*fingerprint*) característica de la comunidad microbiana en cuestión. Las técnicas para separar los diferentes fragmentos incluyen la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante o de temperatura (D-TGGE), el análisis del espaciador intergénico ribosómico (RISA), y el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) (Kirk et al. 2004; Zak et al. 2006). Esta última es una de las técnicas más ampliamente utilizada y se considera una técnica de alto rendimiento y alta reproducibilidad muy recomendable para la comparación directa de comunidades microbianas (Kirk et al. 2004; Zak et al. 2006).

Tradicionalmente el aspecto funcional de la comunidad se ha caracterizado mediante técnicas fisiológicas como la medida de actividades enzimáticas, nitrificación, respiración, mineralización, así como perfiles de utilización de sustratos diversos (ej., Biolog). Las técnicas moleculares han introducido novedades al respecto, ya que permiten enfocar a genes cuya expresión es responsable de procesos biogeoquímicos concretos (genes funcionales). Su estudio facilita información sobre el modo preciso en que los microorganismos regulan los ciclos biogeoquímicos. Por ejemplo, la abundancia de un determinado grupo funcional microbiano se puede evaluar mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR- quantitative polymerase chain reaction) o investigando el nivel de expresión de genes funcionales mediante técnicas de microarrays (Zak et al. 2006). El sondeo con isótopos estables SIP-stable isotope probing permite identificar quién, de entre la comunidad microbiana, es responsable de un proceso biogeoquímico particular, aunque se desconozca el gen funcional implicado. La técnica se basa en añadir el sustrato del proceso pero marcado isotópicamente (con ^{13}C o ^{15}N). Cuando dicho sustrato es metabolizado por un microorganismo, su ADN se enriquece de isótopos pesados, pudiendo entonces ser separado del resto del ADN microbiano en un gradiente de densidad y secuenciado para identificar a su portador (Radajewski et al. 2000; Neufeld et al. 2007). Los microorganismos activos también pueden ser estudiados mediante la extracción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) presente en muestras frescas de suelo y su posterior transcripción inversa y amplificación (RT-PCR).

Combinando secuencialmente las técnicas moleculares utilizadas para la caracterización de la estructura y función de las comunidades microbianas, se han desarrollado aproximaciones que permiten acoplar directamente descubrimientos en diversidad microbiológica con la ecofisiología del suelo y su biogeoquímica. Así, sabemos que la mayoría de los procesos importantes para la funcionalidad biogeoquímica de los ecosistemas terrestres, así como para la sostenibilidad de sus ciclos de nutrientes, dependen en última instancia del crecimiento y muerte de poblaciones microbianas o de las enzimas endógenas y exógenas que éstas producen (Tiedje et al. 1999). Por ejemplo, se ha cuantificado la abundancia y ocurrencia de los distintos genes funcionales que codifican las enzimas necesarias para desensamblar los polímeros que forman la pared de las células vegetales, lo que ha permitido averiguar cómo cambios en la comunidad microbiana producen respuestas funcionales que afectan a las tasas de descomposición de la hojarasca, un proceso biogeoquímico de global importancia (Zak et al. 2006).

Otro asunto con amplia tradición en la biogeoquímica forestal es la caracterización de variaciones espacio-temporales en la disponibilidad y en las tasas de transformación de nutrientes en el suelo (Fisher y Binkley 2000). La interpretación de los resultados consistía habitualmente en la búsqueda de correlaciones con factores de estado (mesoclima, litología, tipo de vegetación...), y la subsiguiente sugerencia de que comunidades microbiológicas distintas para cada combinación de éstos y, especialmente, cambios en la actividad de los microorganismos presentes debido a la estacionalidad de las condiciones de temperatura y humedad, estarían en la base de los patrones observados. Las técnicas moleculares abren la posibilidad de

ligar directamente la variación espacio-temporal de la disponibilidad de nutrientes con la de las comunidades microbianas, constatándose en muchos casos que aquélla se corresponde con cambios significativos y direccionales en la diversidad de éstas (Hackl et al. 2004; Chan et al. 2006).

En este artículo se presenta un ejemplo de ello, tomando como caso de estudio los bosques endémicos de *Abies pinsapo* del sur de España. Estos abetales relictos muestran una notable variabilidad biogeoquímica pese a su distribución restringida a localidades con condiciones muy definidas tanto micro-climática como topográficamente (Liétor 2002; Navarro et al. 2006). Dicha variabilidad se debe, por un lado, a diferencias litológicas y sucesionales (Liétor et al. 2002 y 2003; Viñegla et al. 2006) y, por otro, a la estacionalidad mediterránea a la que están sometidos que, junto a la elevada precipitación anual más propia de bosques templados, produce una alta variabilidad intra-anual en la disponibilidad de nutrientes (Liétor 2002). Por otro lado, estudios previos han mostrado la existencia de pinsapares sujetos a limitación o a saturación de nitrógeno (N) (Salido 2007; Torres-Cañabate et al. 2008). Con objeto de estudiar el engranaje microbiológico que subyace a esos patrones macroscópicos de variabilidad biogeoquímica en los pinsapares, en una primera aproximación hemos buscado correspondencias con la estructura de la comunidad bacteriana del suelo. Para ello se obtuvieron perfiles de las comunidades bacterianas (análisis T-RFLP de los genes 16S rRNA) del suelo en dos tipos de gradientes, (i) una litosecuencia sobre la que se superpone un gradiente geográfico de saturación de N, y (ii) una cronosecuencia sucesional de pinsapares calcáreos. En el primer gradiente se ha considerado también el efecto de fuentes de variación adicionales como la estacionalidad (primavera-verano) y la naturaleza de la materia orgánica (hojarasca, horizonte mineral Ah).

Metodología

Objeto de estudio y juego de parcelas (fuentes de variación principales)

Los bosques de *Abies pinsapo* son relictos de bosques templados de coníferas actualmente sujetos a las constricciones propias del clima mediterráneo. Actualmente su distribución se restringe a pequeños parches en las laderas norte de montañas del sureste peninsular: el Parque Natural de la Sierra de las Nieves y el Paraje Natural de los Reales de Sierra Bermeja en la provincia de Málaga, y el Parque Natural de la Sierra de Grazalema en Cádiz, con una superficie total de aproximadamente 3.956 ha (Navarro et al. 2006).

Estudios previos demuestran una elevada variabilidad biogeoquímica entre los distintos bosques de pinsapo debido a diferencias de litología y de estado sucesional (Liétor et al. 2002 y 2003; Viñegla et al. 2006). A su vez, se ha comprobado la existencia de un gradiente de saturación de N en pinsapares localizados a distancias crecientes del área industrializada del Campo de Gibraltar (Salido 2007; Torres-Cañabate et al. 2008). Además, la disponibilidad de nutrientes muestra una marcada variabilidad intra-anual y sus ciclos tienen un carácter más abierto de lo que es propio en los bosques templados de coníferas. Esto se debe, probablemente, al desacople que existe en los pinsapares entre flujos hidrológicos y demanda biótica de nutrientes, debido a su singular combinación de estacionalidad climática de tipo mediterráneo y cifras de precipitación anual más propias de climas templados (Liétor 2002). Esta información previa permite evaluar cambios en los perfiles de las comunidades bacterianas asociados a las siguientes fuentes de variación, manteniendo razonablemente homogéneos el resto de factores de estado (**Tabla 1**):

Localidades	B	SR	Y	G1	G2	R
Substrato	Serpentinas	Serpentinas	Calcáreo	Calcáreo	Calcáreo	Calcáreo
Estado sucesional	2b	2a	1	2b	3a	3b
Estatus de Nitrógeno	Saturación (limitación por P)	Limitación	Limitación	Limitación	Limitación	Co-limitación con P
Longitud	5° 12' 07"	4° 58' 14"	4° 58' 0"	5° 25' 03"	36° 46' 13"	5° 0' 35"
Latitud	36° 29' 26"	36° 36' 58"	36° 43' 37"	5° 25' 07"	36° 46' 11"	36° 4' 37"
Altitud	1200	1200	1200	1160	1220	1240
Orientación	NE	NE	NE	NE	NE	NW
Pendiente media (%)	61	51	39	43	50	41

Tabla 1. Localización y descripción fisio-geográfica de las parcelas de pinsapar objeto de estudio.

Localidades: B: Paraje Natural Los Reales de Sierra Bermeja (Estepona-Jubrique); SR: Sierra Real (Istán); Parque Natural Sierra de las Nieves: Y (Yunquera, Cañada del Alcornicalejo) y R (Ronda, Cañada de las Ánimas); Parque Natural Sierra de Grazalema: G1 y G2 (Sierra del Pinar, Grazalema).

Estado sucesional:

1: Agradativo, inicio fase exclusión de tallos (« latizal alto); 2a: Agradativo, transición exclusión tallos a reinicio sotobosque (« fustal bajo-medio); 2b: Agradativo, transición exclusión tallos a reinicio sotobosque (« fustal medio); 3a: Maduro, bien estructurado, pero sin atributos de estructura "old-growth"; 3b: Maduro, bosque "viejo" (estructura tipo "old-growth" en terminología anglosajona).

(i) *Secuencia litológica y de disponibilidad de N en pinsapares estructural y sucesionalmente comparables:*

Constituida por un juego de parcelas ubicadas en pinsapares sobre serpentinas en las sierras Bermeja (parcela B) y Real (parcela SR), o sobre sustrato calizo en la Sierra de las Nieves (pinsapar de Yunquera, parcela Y). En todos los casos las parcelas se sitúan en posiciones comparables desde el punto de vista topográfico y microclimático, englobando pinsapares con estructura de tipo fustal, en fase de transición entre exclusión de tallos y reiniciación. A su vez, esas tres sierras se alinean en dirección W-E coincidiendo con un gradiente de deposición atmosférica de N, de tal modo que el pinsapar de Sierra Bermeja presenta síntomas de saturación de N en tanto que los de Sierra Real y Sierra de las Nieves permanecen limitados por N. A modo de complemento, se incluyó también en este experimento un pinsapar adicional de la Sierra de las Nieves, el pinsapar de Ronda (parcela R), con mayor disponibilidad de N que el de Yunquera por ser un bosque en fase muy madura ("old-growth"; véase párrafo siguiente).

(ii) *Secuencia sucesional de pinsapares sobre el mismo tipo de roca madre:*

Constituida por un juego de parcelas ubicadas en las sierras de las Nieves (pinsapares de Yunquera y Ronda) y de Grazalema (pinsapar de Grazalema-Sierra del Pinar). Estas tres localidades presentan similar sustrato (calizas-dolomías), pero difieren en cuanto al tipo estructural del dosel y estado sucesional de los pinsapares presentes en las mismas. Esta secuencia, que permite comparar el efecto del grado de complejidad estructural y de desarrollo sucesional del bosque sobre la comunidad microbiana edáfica, incluye las siguientes parcelas (**Fig. 1**): parcela Y en el pinsapar de Yunquera (estructura del dosel tipo latizal alto, en fase de exclusión de tallos), parcelas G1 (fustal medio con grado inicial de regeneración del sotobosque) y G2 (rodal maduro bien estructurado) en el pinsapar de Grazalema-Sierra del Pinar y, por último, parcela R (estructura del dosel con distribución de tamaños en forma de "J" invertida, "old-growth" en la terminología anglosajona) en el pinsapar viejo de Ronda.

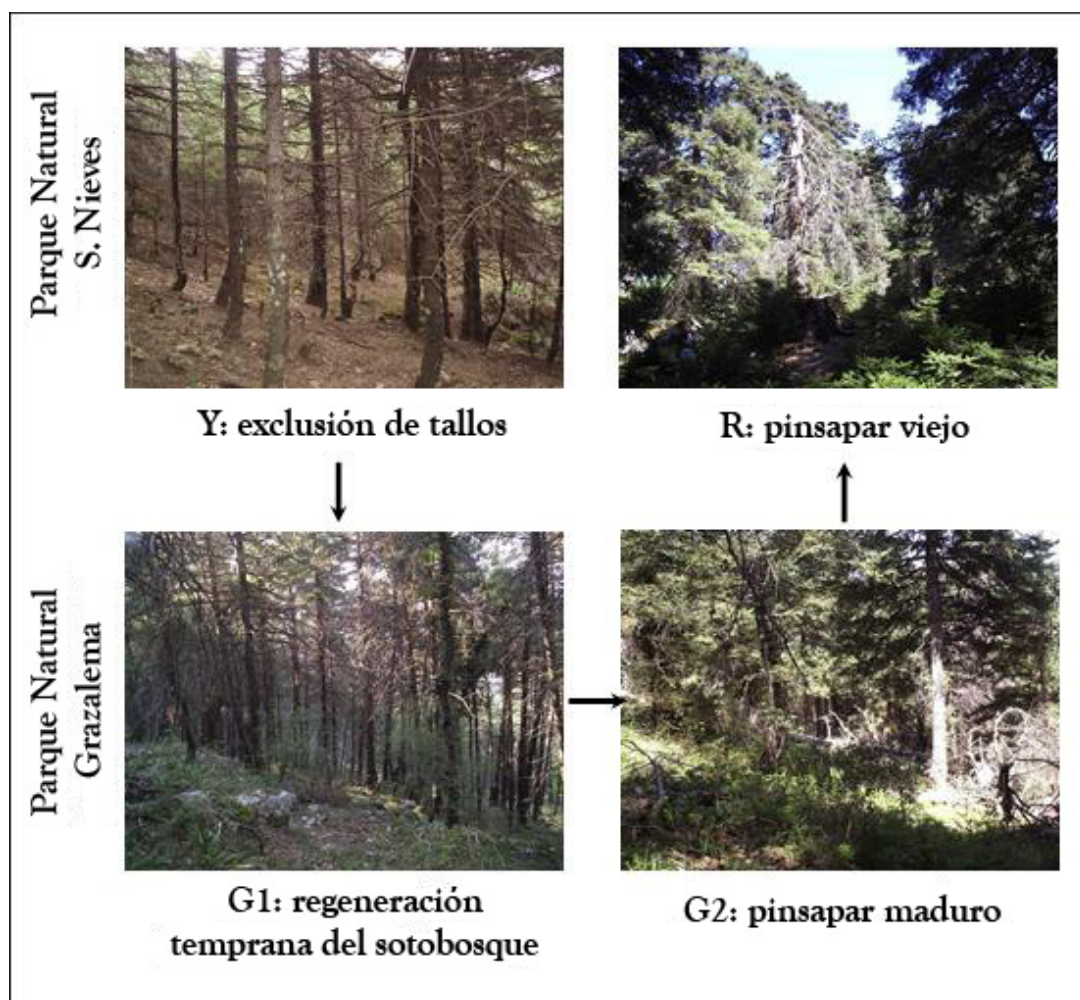


Figura 1. Parcelas que conforman la secuencia sucesional de pinsapares sobre sustrato calcáreo empleada en este estudio: desde Y (pinsapar de Yunquera) a G1 y G2 (pinsapares de Grazalema-Sierra del Pinar) y al pinsapar maduro de Ronda (R).

Muestreo

En el caso de la secuencia litológica y de disponibilidad de N, el muestreo se efectuó tanto en primavera como en verano (año 2007) para evaluar adicionalmente cambios estacionales. En cada fecha y parcela se tomaron aleatoriamente 5 muestras compuestas del horizonte Ah del suelo (de 0 a 10cm), y 5 de hojarasca (capas L+F). Cada muestra compuesta resultó de la mezcla de 4 muestras individuales. En el caso de la secuencia sucesional, en cada parcela se obtuvieron 3 muestras, compuestas cada una de ellas de 50 muestras de suelo (0-5cm de profundidad) tomadas a lo largo de tres transectos de 60 m de longitud.

Análisis de los perfiles de comunidades bacterianas

Actualmente, el análisis de T-RFLP es uno de los métodos más poderosos y ampliamente utilizados en ecología microbiana para testar diferencias entre comunidades mediante la comparación de la diversidad de secuencias de ADN amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Liu et al. 1997; Osborn et al. 2000). Este método se basa en la digestión con enzimas de restricción del ADN amplificado y marcado con fluorescencia en uno de sus extremos (**Fig. 2**). Posteriormente, los fragmentos son determinados en función de su tamaño con un analizador automático con detección láser de los productos marcados, produciendo un patrón altamente reproducible o huella dactilar (*fingerprint*) característica de la comunidad microbiana en función de su composición de especies (Osborn et al. 2000; Dunbar et al. 2001). De esta forma cada fragmento marcado (TRF-fragmento de restricción terminal) es representativo de un único ribotipo o unidad taxonómica operacional (OTU) (Marsh 1999).

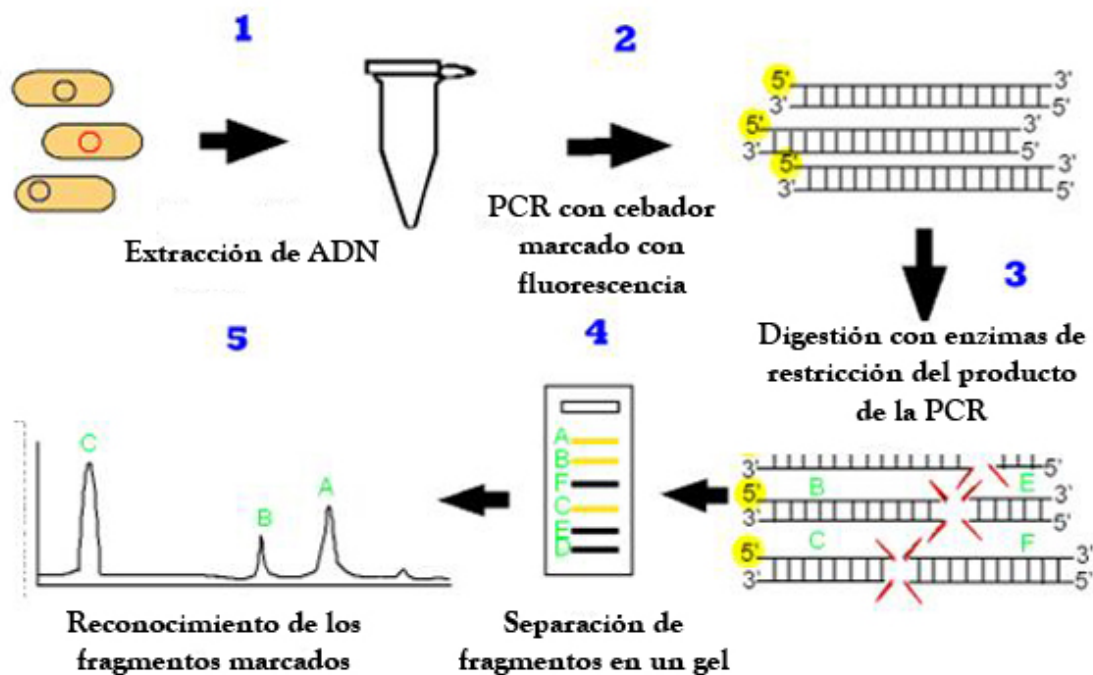


Figura 2. Esquema de las etapas del proceso de análisis de T-RFLP.

La diversidad bacteriana se caracterizó mediante el cálculo de la “riqueza específica” (S , número de OTUs diferentes) y el índice de Shannon (H' , $H' = -\sum p_i \ln p_i$) donde p_i es la abundancia relativa de cada OTU. Se utilizó un análisis de componentes principales (ACP) con objeto de ordenar las distintas parcelas en función de la huella dactilar de su comunidad bacteriana y evaluar si los principales gradientes de ordenación resultantes se correspondían con diferencias de (i) litología y disponibilidad de N y de (ii) estados sucesionales del pinsapar.

Para analizar relaciones estructura-función, en alícuotas correspondientes a la secuencia litológica y de disponibilidad de N se midieron también algunas variables relacionadas con el ciclo del N tales como las tasas de nitrificación potencial (Kandeler 1996), desnitrificación potencial (Klemedetsson et al. 1977) y respiración basal (Anderson 1982), así como el contenido en el suelo de nitrato (espectrofotometría con autoanalizador de flujo continuo SYSTEAM) y N total (analizador CNHS).

Correspondencia entre la litología y disponibilidad de N y la comunidad bacteriana del suelo.

El ACP realizado sobre los datos de T-RFLP segregó claramente las comunidades bacterianas en función del sitio de estudio y la estación del año en que se realizó el muestreo (**Fig. 3**). En la **Figura 4** se muestra también la segregación que se produjo entre la capa L+F de hojarasca y el horizonte Ah para cada combinación de sitio y estación de muestreo. La diferencia media entre primavera y verano fue de la misma magnitud que las encontradas entre sitios y entre horizontes, lo que refleja cambios en la comunidad microbiana asociados a la variabilidad estacional. El primer componente principal (CP1) ordenó los sitios a lo largo de un gradiente de disponibilidad de N. Así, las coordenadas más elevadas sobre el CP1 correspondieron a las parcelas B y R, que muestran asimismo los mayores valores promedios de concentración de N inorgánico y de tasas netas potenciales de nitrificación y de desnitrificación en el suelo. Lo contrario ocurre para el caso de las parcelas SR e Y. Las huellas dactilares de las comunidades bacterianas fueron manifiestamente distintas en los dos pinsapares serpentínícolas sucesionalmente comparables pero con distinto grado de disponibilidad de N (parcelas B y SR, véase **tabla 1**). Por lo tanto, cambios en las reservas y en los procesos implicados en el ciclo del N, derivados de la existencia de un gradiente de deposición atmosférica de N, se reflejan en la estructura de la comunidad microbiana. Por su parte, el segundo componente principal (CP2) ordenó los pinsapares estudiados en función de su litología (**Fig. 3**). La relación encontrada entre los indicadores de disponibilidad de N y el CP1 sugiere que los cambios observados en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo estuvieron ligeramente más influenciados por la disponibilidad de N que por diferencias litológicas. Por otro lado, de los veintinueve OTUs observados, sólo cinco mostraron correlaciones significativas ($p < 0,05$) con el CP1, uno con el CP2, y dos con el CP3. Los tres primeros ejes del ACP explican el 54% de la variabilidad total en los datos (**Tabla 2**). Esto indica que las tendencias principales de variación en la estructura de las comunidades bacterianas de los pinsapares se deben a cambios en una fracción relativamente pequeña de los OTUs (el 24% del total).

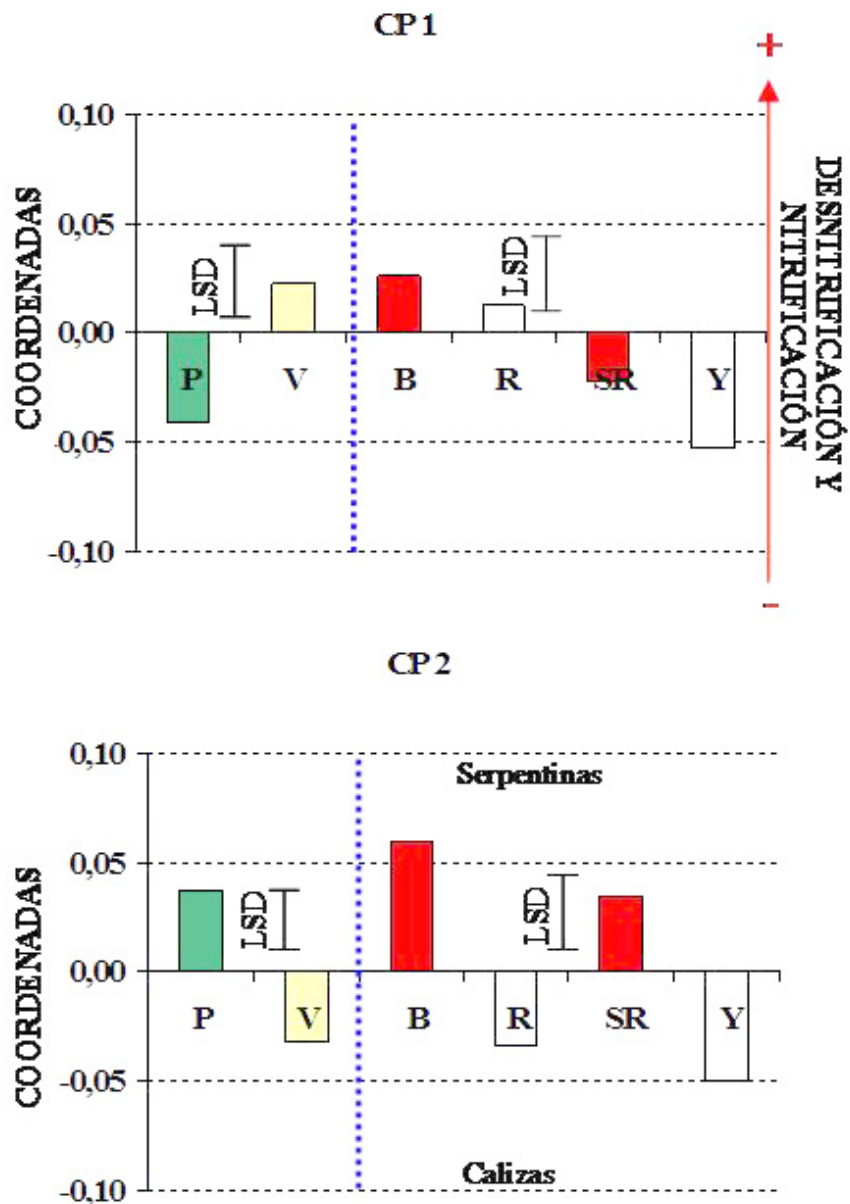


Figura 3. Valor medio de las coordenadas para los sitios y estaciones de muestreo sobre los dos primeros ejes (CP1 y CP2) del Análisis de Componentes Principales realizado con los datos del análisis T-RFLP en muestras de suelo de los pinsapares. B: Sierra Bermeja, R: Ronda, SR: Sierra Real, Y: Yunque; P: primavera, V: verano. La longitud de las barras de error representa la menor diferencia significativa entre medias (Anova seguido de test LSD). Las medias con valores positivos en el CP1 mostraron valores más elevados en las tasas potenciales de desnitrificación y nitrificación que aquellas con valores negativos.

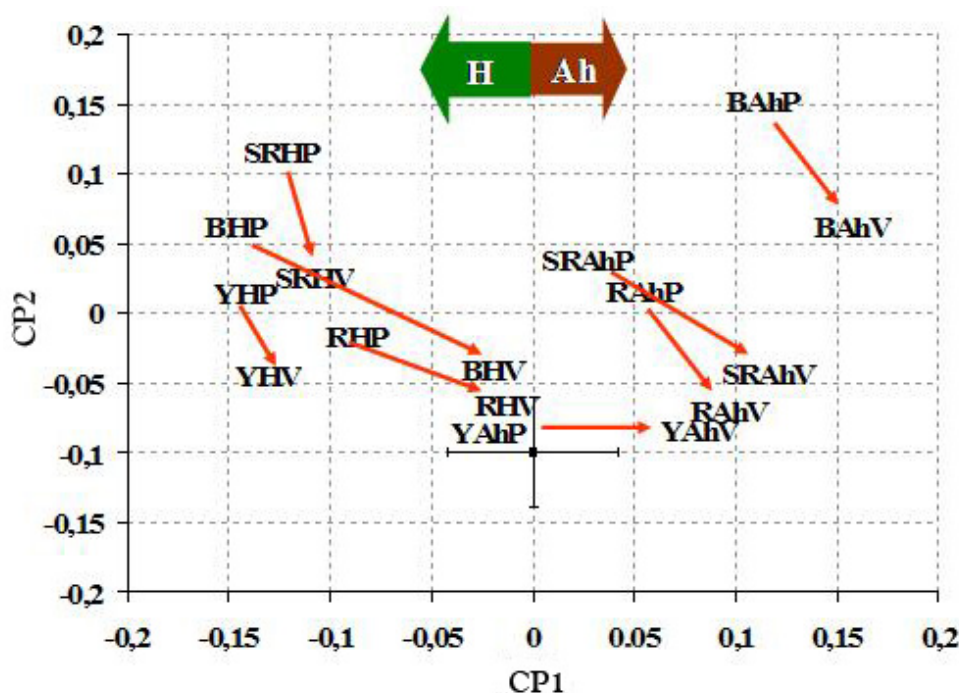


Figura 4. Posición media de cada combinación de horizonte, sitio y estación de muestreo sobre el espacio definido por los componentes principales CP1 (25.75% de varianza explicada) y CP2 (15.31%). La longitud de las barras de error indica la menor distancia sobre los ejes que ha de haber entre los casos representados para que estos sean significativamente distintos (LSD) en términos de sus coordenadas medias.

OTUs (orden de aparición)	CP1 (26%)	CP2 (15%)	CP3 (13%)
5	-0,70	0,01	-0,04
6	-0,76	0,35	-0,19
8	-0,74	-0,10	0,24
9	-0,81	-0,04	0,17
20	0,30	0,67	0,02
21	0,12	-0,63	-0,66
22	0,68	0,02	0,69

Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) observadas y las coordenadas de los tres primeros ejes del Análisis de Componentes Principales (ACP). En negrita se resaltan los coeficientes significativos ($p < 0,05$) y se muestra el porcentaje de varianza de los datos que explicaron los tres primeros componentes principales.

Las diferencias que muestra el ACP para la estructura de la comunidad bacteriana entre horizontes del suelo y fechas de muestreo se ven reflejadas en diferencias de S (pero no de H'). Ello indica que variaciones en la cantidad y naturaleza de la materia orgánica en el perfil del suelo, y en las condiciones de humedad y temperatura a lo largo del año, aportan una elevada variabilidad espacio-temporal a la composición específica de la comunidad microbiana dentro de una misma localización. Las cifras más elevadas de número de OTUs se encontraron en la capa de hojarasca y en primavera (**Fig. 5A**). A pesar de que no se encontraron diferencias entre los distintos sitios de estudio para ninguno de estos índices, las huellas dactilares de las comunidades bacterianas resultaron ser claramente distintas. Es decir, la alfa diversidad de la comunidad bacteriana es parecida entre sitios, pero se trata de comunidades diferentes.

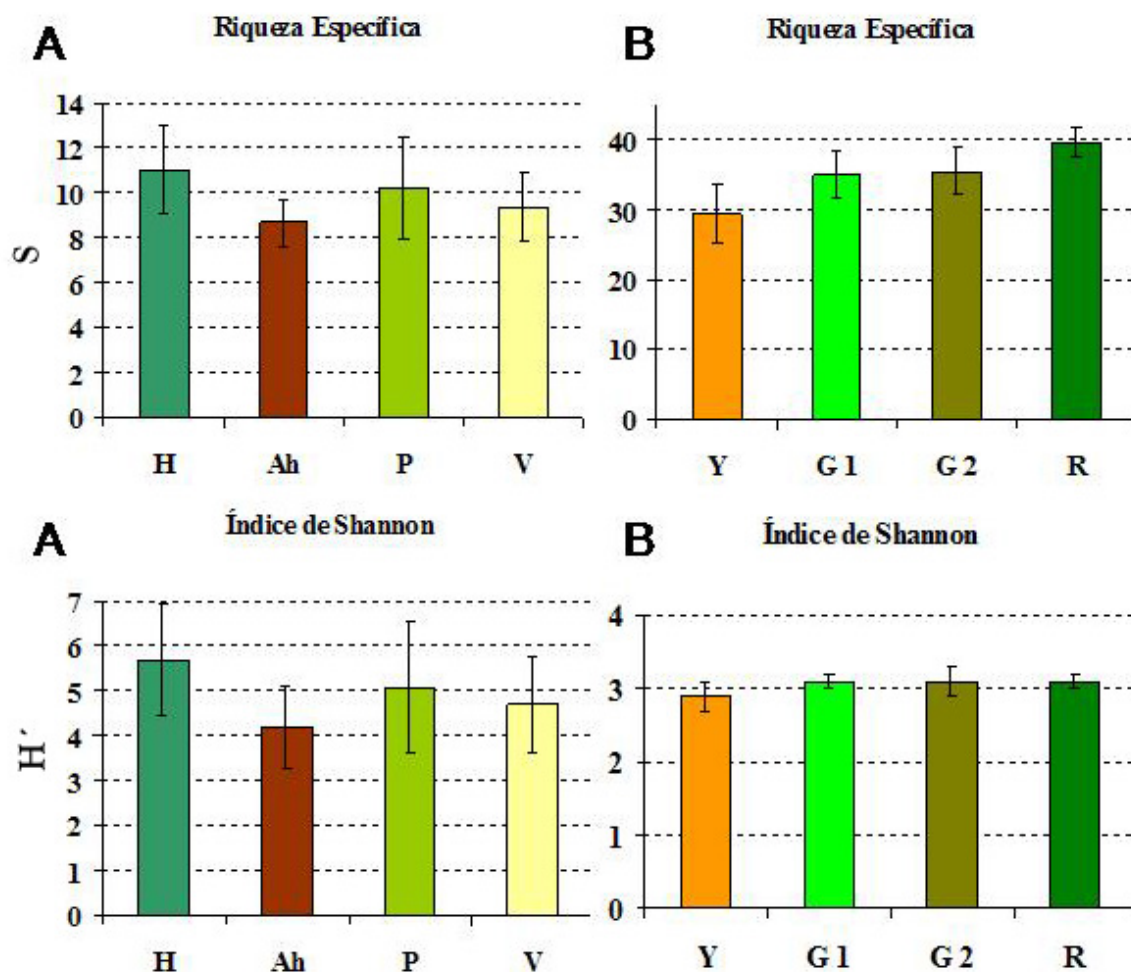


Figura 5. Riqueza específica (S) e índice de diversidad de Shannon (H') de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) para: (A) los distintos horizontes (H, hojarasca, y Ah, suelo) y estaciones (P, primavera, y V, verano) de la secuencia litológica y de disponibilidad de N en pinsapares estructural y sucesionalmente comparables; (B) la secuencia sucesional de pinsapares sobre el mismo tipo de roca madre (Y: pinsapar de Yunquera, fase sucesional agradativa, exclusión de tallos, latizal alto; G1: Pinsapar de Grazalema-Sierra del Pinar, agradativo, exclusión de tallos a reinicio del sotobosque, fustal medio; G2: Pinsapar de Grazalema, maduro, bien estructurado; R: pinsapar viejo ("old-growth") de Ronda). Las barras de error representan la desviación típica de los datos.

Correspondencia entre estado sucesional de los bosques de *Abies pinsapo* y diversidad bacteriana de sus suelos

La ordenación multivariante de los datos del análisis de T-RFLP indica que la complejidad estructural del dosel y el estado sucesional tienen también una fuerte influencia sobre la comunidad bacteriana del suelo en los pinsapares. El espacio resultante de la combinación de los ejes CP1 y CP2 muestra claramente la existencia de cambios graduales en la estructura de la comunidad bacteriana conforme avanza el estado sucesional del pinsapar (Fig. 6). Así, sobre dicho espacio se proyectan siguiendo una trayectoria congruente, desde bosques de pinsapo en fase temprana (Parcela Y) y avanzada (Parcela G1) de exclusión de tallos (estos dos estados se segregan únicamente en función del CP2), hasta bosques maduros bien estructurados (parcela G2) y, finalmente, bosques viejos (Parcela R).

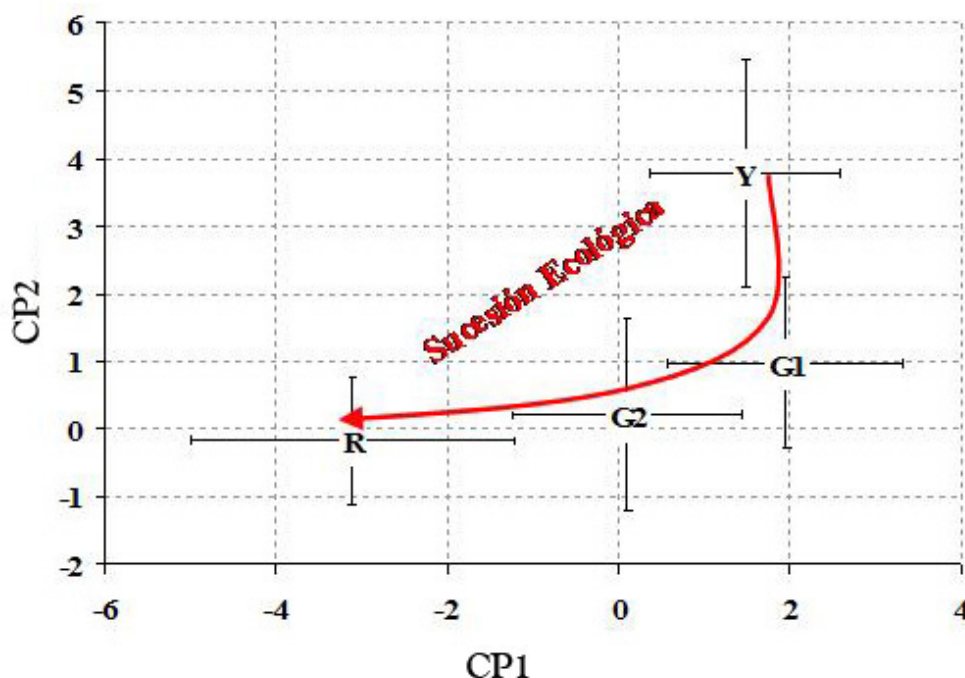


Figura 6. Representación de las medias de las coordenadas obtenidas para cada uno de los estadios sucesionales estudiados en los componentes principales 1, 19% de la varianza total, y 2, 13% de la varianza total (Y: pinsapar de Yunquera, fase sucesional agradativa, exclusión de tallos, latizal alto; G1: Pinsapar de Grazalema-Sierra del Pinar, agradativo, exclusión de tallos a reinicio del sotobosque, fustal medio; G2: Pinsapar de Grazalema, maduro, bien estructurado; R: pinsapar viejo ("old-growth") de Ronda). Las barras de error representan la desviación típica de los datos.

A diferencia de lo que ocurriría con la secuencia litológica y de disponibilidad de N, los cambios en la comunidad bacteriana a lo largo de la cronosecuencia sucesional de pinsapares calcáreos sí se corresponden con variaciones significativas en el valor de S (pero no en el de H') (**Fig. 5B**). Esto da a entender que a lo largo de la sucesión ecológica del pinsapar se produce también una sucesión en la comunidad bacteriana de sus suelos, con un aumento en la riqueza genética o número de "individuos" (OTUs) así como variaciones en sus abundancias proporcionales. El análisis de los datos brutos revela que los nuevos OTUs que aparecen hacia fases avanzadas de la sucesión, junto con otros que ya estaban presentes pero cuya abundancia relativa cambia, son los que más peso tienen en la ordenación multivariante.

Posiblemente el principal motor para el cambio en la estructura de la comunidad bacteriana sea el proceso de acreción de materia orgánica en el suelo y su progresiva humificación, concomitante al cambio sucesional. El contenido de carbono orgánico en el pinsapar maduro de Ronda dobla los valores observados en el pinsapar joven de Yunquera (Liétor et al. 2003). Del mismo modo, tanto las concentraciones totales y de formas lábiles de N y P, así como sus tasas de mineralización, presentaron valores mínimos en masas de pinsapar en fase de exclusión de tallos (donde se produce una elevada competencia por recursos), y aumentan a lo largo de la sucesión (Liétor et al. 2002; Viñegla et al. 2006).

Los cambios observados en la comunidad microbiana a lo largo de la secuencia sucesional también podrían relacionarse con variaciones en la comunidad florística del sotobosque. Hay que tener en cuenta que los componentes aéreo y subterráneo de los ecosistemas terrestres están íntimamente relacionados entre sí (Porazinska et al. 2003). Así por ejemplo, la sustitución de unas especies vegetales del sotobosque por otras puede llevar consigo cambios en la comunidad de descomponedores edáficos (entre ellos los microorganismos), afectando así a la mineralización de materia orgánica con consecuencias para otros procesos o componentes del ecosistema (De Deyn y Van der Putten 2005).

Conclusiones

La variabilidad biogeoquímica observada a escala macroscópica entre diversas tipologías de pinsapares se refleja claramente en cambios en la estructura de la comunidad microbiana de sus suelos (huella dactilar a escala microscópica). El principal gradiente que ordena las distintas comunidades bacterianas (CP1) se relaciona con variaciones entre pinsapares en la disponibilidad de N, independientemente de que tales variaciones se deban a la posición de los pinsapares a lo largo de un gradiente de deposición atmosférica de N o al estado sucesional (mayor disponibilidad de N hacia estados maduros). La litología (serpentinillas versus sustratos calcáreos) aparece como un segundo factor importante que explica la variabilidad en las

comunidades microbianas. A estos patrones de variabilidad general se superponen otros a escala intra-parcela (diferencias entre horizontes del suelo) e intra-anual (diferencias entre primavera y verano) cuya magnitud es del mismo orden pero coherente con la que existe entre parcelas (en general, las diferencias entre estas se mantienen para un horizonte y periodo de muestreo dados). La constatación de estos cambios de estructura de la comunidad microbiana es la antesala para dirigir la investigación hacia el esclarecimiento de relaciones estructura-función. Mediante el enfoque hacia genes funcionales y sus niveles de expresión (técnicas de transcriptómica como el RT-PCR), por ejemplo, se puede evidenciar qué grupos funcionales de microorganismos son los responsables de los cambios biogeoquímicos observables a macroescala y sus niveles de actividad.

Referencias

- Anderson, J.P.E. 1982. Soil respiration. En: Page, A. L., Miller, R. H., Kennedy, D. R., (eds). *Methods of soil analysis. Part 2, Chemical and Microbiological Properties*, pp. 831-872. Soil Science Society of America, Madison (WI), USA.
- Chan, O.C., Yang, X., Fu, Y., Feng, Z., Sha, L., Casper, P., Zou, X. 2006. 16S rRNA gene analyses of bacterial community structures in the soils of evergreen broad-leaved forests in south-west China. *FEMS Microbiology Ecology* 58:247-259.
- De Deyn, G.B., Van der Putten, W.H. 2005. Linking aboveground and belowground diversity. *Trends in Ecology and Evolution* 20:625-633.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O., Kuske, C.R. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 67:190-197.
- Fisher, R.F., Binkley, D. 2000. *Ecology and management of forest soils*, 3rd edn. John Wiley and Sons, New York. USA.
- Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Bodrossy, L., Sessitsch, A. 2004. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* 70:5057-5065.
- Kandeler, E. 1996. Potential nitrification. En: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (eds) *Methods in Soil Biology*, pp 147-151. Springer, Berlin Heidelberg, New York, USA.
- Kirk, J., Beaudette, L., Hart, M., Moutoglou, P., Klironomos, J., Lee, H., Trevors J. 2004. *Methods of studying soil microbial diversity*. *Journal of Microbiological Methods* 58:169-188.
- Klemedetsson, L., Svensson, B.H., Lindberg, T., Rosswall, T. 1977. The use of acetylene inhibition of nitrous oxide reductase in quantifying denitrification in soils. *Swedish Journal of Agricultural Research* 7:179-185.
- Liétor J. 2002. *Patrones de disponibilidad y limitación por nutrientes como indicadores de estado en masas de pinsapo (Abies pinsapo, Boiss.)*. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén. Jaén. España.
- Liétor, J., García-Ruiz, R., Viñegla, B., Ochoa, V., Linares, J.C., Hinojosa, B., Salido, T., Carreira, J.A. 2002. *Variabilidad biogeoquímica en masas de pinsapo: efecto de la litología y el estado sucesional*. *Ecología* 16:45-57.
- Liétor, J., Linares, J.C., Martín, J.M., García-Ruiz, R., Carreira, J.A. 2003. Relaciones suelo-planta en bosques de Abies pinsapo Boiss. Disponibilidad de nutrientes y estatus nutricional. *Acta Botánica Malacitana* 28:89-104.
- Liu, W., Marsh, T., Cheng, H., Forney, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology* 63:4516-4522.
- 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.
- Navarro, R.M., Lara, A., Blanco, P., Calzado, C., López, J., Fernández, Á., Guzmán, J.R., Sánchez, R. 2006. Aproximación a la definición del hábitat fisiográfico del Abies pinsapo Boiss. en Andalucía. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales* 15:137-152.
- Neufeld J.D., Vohra J., Dumont M.G., Lueders T., Manefield M., Friedrich M.W. and Murrell J.C. 2007. DNA stable-isotope probing. *Nature Protocols* 2:860-866.

- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., Timmis, K.N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* 2:39-50.
- Porazinska, D.L., Bardgett, R.D., Postma-Blaauw, M.B., Hunt, H.W., Parsons, A.N., Seastedt, T.R., Wall, D.M. 2003. Relationships at the aboveground-belowground interface: plants, soil biota and soil processes. *Ecological Monographs* 73:377-395.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R., Murrell, J.C. 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403:646-649.
- Rosch, C., Bothe, H. 2005. Improved assessment of denitrifying, N₂-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* 71:2026-2035.
- Salido, T. 2007. *Evaluación del estado de saturación de nitrógeno en masas de pinsapar (Abies pinsapo, Boiss.) del sur de la Península Ibérica: patrones generales de entrada, circulación interna y salida del nitrógeno en el ecosistema*. Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, Jaén, España.
- 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.
- Torres-Cañabate, P., Davidson, E., Bulygina, E., García-Ruiz, R., Carreira, J.A. 2008. Abiotic immobilization of nitrate in two soils of relic Abies pinsapo-fir forests under Mediterranean climate. *Biogeochemistry* 91:1-11.
- Viñegla, B., García-Ruiz, R., Liétor, J., Ochoa, V., Carreira, J.A. 2006. Soil phosphorus availability and transformation rates in relictic pinsapo fir forests from southern Spain. *Biogeochemistry* 78:151-172.
- Zak, D.R., Blackwood, C.B., Waldrop, M.P. 2006. A molecular dawn for biogeochemistry. *Trends in Ecology and Evolution* 21:288-295.