

SMART LINK #5

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS EN SUELOS VITÍCOLAS

Etourneau Laetitia*, Nicolato Tommaso*, Renouf Vincent*, Ixone Borinaga, Irene Paniagua**, Elvira Zaldivar** y Antonio Palacios**;** *Excell France y **Laboratorios Excell Ibérica.

Desde los trabajos de referencia de Winogradsky (1949) y Pochon y Barjac (1958), la microbiología del suelo nunca había sido tan popular como en los últimos años. Muchos esfuerzos en investigación se han dedicado a este campo y sus resultados han sido recientemente publicados. Los enfoques son tan dispares como complejos los sistemas empleados en su estudio. Algunas técnicas utilizadas pueden ser relativamente ubicuas (la famosa técnica canadiense de los calzoncillos bio de algodón enterrados...) o infinitamente sofisticadas (enfoque metagenómico...), a veces incluso a expensas del seguimiento de ciertos axiomas agronómicos (representatividad de la muestra, profundidad del muestreo...) o de las analíticas a emplear (retraso entre la toma de muestras y la realización del análisis), negligencia de ciertos efectos ambientales (temperatura, humedad...).

Cuando en los laboratorios Excell comenzamos a realizar reflexiones sobre la materia que nos ocupa, nuestra principal ambición era proponer un dispositivo analítico integral, práctico y pragmático. En la inmensidad de la diversidad de mohos, bacterias y otras levaduras presentes sobre y en el interior de los suelos, dos compuestos químicos comunes a todas estas células vivas están representando, primero su presencia, y en segundo lugar, su actividad. Se trata de las cantidades totales de ADN y ATP respectivamente. Estas dos biomoléculas son universales para cualquier tipo de organismo vivo.

Mediante la eliminación de organismos vivos visibles a simple vista (un microorganismo es por definición un organismo invisible) como insectos, gusanos y hormigas por ejemplo y mediante el análisis del ADN y el ATP, es posible evaluar la cantidad total de microorganismos presentes (toda célula microbiana tiene ADN, excepto ciertos virus que solo tienen RNA, si bien estos no se consideran a priori organismos vivos ya que dependen de una célula que funcione como hospedador) y su nivel de actividad (el ATP

es la molécula responsable de la energía celular; por lo tanto, su cantidad representa la vitalidad general del consorcio microbiano, asociación natural de dos o más especies que actúan como una comunidad). La tabla 1 resume las ventajas de estos dos enfoques complementarios en comparación con otras técnicas existentes.

La relación ATP/ADN potencialmente también puede proporcionar información muy interesante. El suelo que tiene cantidades significativas de ADN, pero valores de ATP relativamente bajos, podría poner en evidencia su mal funcionamiento: ¿por qué están presentes los gérmenes, pero no están activos? ¿existe quizás la presencia de compuestos tóxicos? ¿se debe a una deficiencia de nutrientes? ¿en qué elemento mineral en concreto? ¿puede ser debido a un exceso de agua?

Una vez establecidos y optimizados los métodos de funcionamiento analítico, hemos acumulado muchas medidas en los últimos 3 años con el fin de crear una base de datos sólida que sirva para interpretar los resultados venideros y así compararlos con datos complementarios. Este artículo detalla el trabajo realizado evocando los principales principios básicos de estos análisis y luego, presentando algunos ejemplos concretos de los resultados obtenidos, revelando el fuerte potencial que tienen estas analíticas como herramienta de diagnóstico, pero también como utensilio en la toma de decisiones para así guiar las prácticas agronómicas más adecuadas a nivel vitícola.

Tabla 1: Síntesis de enfoques analíticos en la caracterización de la vida microbiana en suelos vitícolas y ventajas de las técnicas elegidas por Excell: análisis del ATP (vitalidad celular) y del ADN (carga microbiana total).

TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LA VIDA MICROBIANA EN SUELOS VITIVINÍCOLAS	PROS Y CONTRAS
Técnica de calzoncillos de algodón	Sin referencias comparativas. Posibles efectos de fenómenos abióticos (acidólisis, fenómenos oxidativos...) y ciertamente no sólo microbianos (posibles intervenciones de insectos, colémbolos...).
Citometría de flujo	Ruido de fondo variable asociado con el recuento de fenómenos no microbianos.
Microscopia	Influencia de los pasos de preparación de la muestra y dificultad para implementar técnicas microscópicas genéricas de coloración permanente en microscopía.
Análisis de actividades enzimáticas	Los análisis específicos sólo tienen en cuenta una parte del consorcio microbiológico.
Mediciones de metabolismos respiratorios inducidas por sustrato	Ídem que en el caso de los análisis de actividades enzimáticas.
Aproximación metagenómica	Los análisis también están muy orientados y pueden desgranar fenómenos potencialmente raros, aislando unos de otros sin una visión generalista. En el estado actual del conocimiento, los datos obtenidos requieren una base de datos y personal especializado en su interpretación.
Test de vitalidad biológica Excell: medida del ATP	El ATP es una molécula universal para cualquier célula viva. La cantidad de ATP por célula representa la energía celular y por lo tanto, su actividad. El cálculo de su concentración es fácil de realizar y muy precisa.
Estimación Excell de la carga total microbiana medida en ADN total.	El ADN también es una molécula universal para cualquier célula viva. Su cantidad se fija según tipo de célula y estado celular. El método de medida debe estar normalizado para que asegure la fiabilidad en la comparación y la adecuada interpretación de resultados.

Materiales y métodos:

Las muestras de suelo se realizan con ayuda de materiales de muestreo clásicos (barrena, pequeñas palas, plantadoras de mano...) previamente limpiados y esterilizados. Las muestras se tomaron debajo de la cobertura vegetal a 20/30 centímetros de profundidad. En el laboratorio se eliminan todos los elementos biológicos visibles a simple vista (vegetales, insectos, lombrices de tierra...). La humedad del suelo se mide en ese momento y la tierra se disuelve en condiciones definidas y el ATP y el ADN se miden con dispositivos específicamente diseñados para ello. Las determinaciones de cobre en las mismas muestras de suelos se realizan a partir de protocolos normalizados (cobre total: norma ISO 11466 y cobre intercambiable NF X31-120), como se presentan en los resultados de este artículo

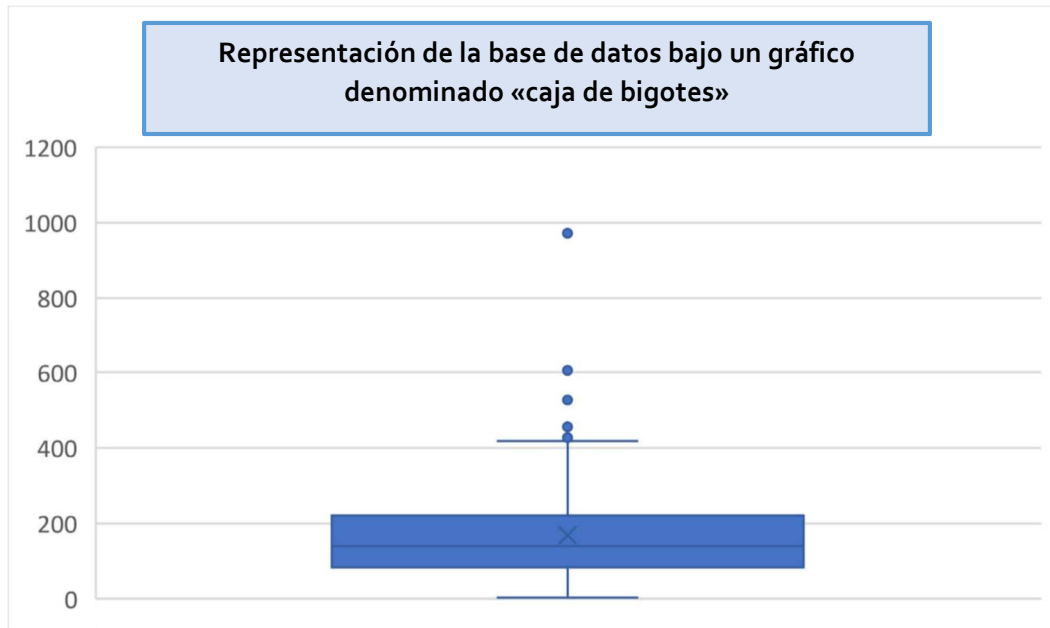
Resultados:

En la Tabla 2 se resumen los datos acumulados de las mediciones de ATP en el suelo en los últimos tres años. La medida del ATP se expresa en RLU (unidades relativas de luz) gracias al empleo de la enzima luciferasa, (enzima presente en las luciérnagas). Esta medida se corresponde con la cantidad de ATP que se transforma en intensidad luminosa. Los valores registrados dependen, por supuesto, del procedimiento utilizado y del aparato de medición. Se suele utilizar a modo de ejemplo la misma técnica de medición en auditorías de higiene en bodega, aunque para los análisis de suelos, el contexto es obviamente diferente (incluyendo el procedimiento analítico). En particular, hemos optado por transcribir la medida de RLU en la cantidad de ATP por gramo de materia seca (suelo). Los miles de datos acumulados (tabla 2 y gráfico 1) permiten estimar que por debajo de 50 RLU el suelo estudiado se considera «muy pobre» en vitalidad biológica; que entre 50 y 100 RLU la vitalidad biológica es «baja»; entre 100 y 200 RLU puede considerarse «media»; entre 200 y 400 RLU la vitalidad biológica se califica de «fuerte» y más allá de 400 RLU, de «muy fuerte».

Tabla 2: Valores clave en la base de datos del análisis de vitalidad biológica por mediciones del ATP expresadas en ng de ATP en g de materia seca (desde 2018).

Valor promedio	168 ng de ATP/g MS
Valor medio	140 ng de ATP/g MS
Valor mínimo	3 ng de ATP/g MS
Valor máximo	972 ng de ATP/g MS

Gráfico 1: Representación tipo caja de bigotes de la explotación de la base de datos del análisis de vitalidad biológica de los suelos por medición del ATP en Excell durante 3 años.



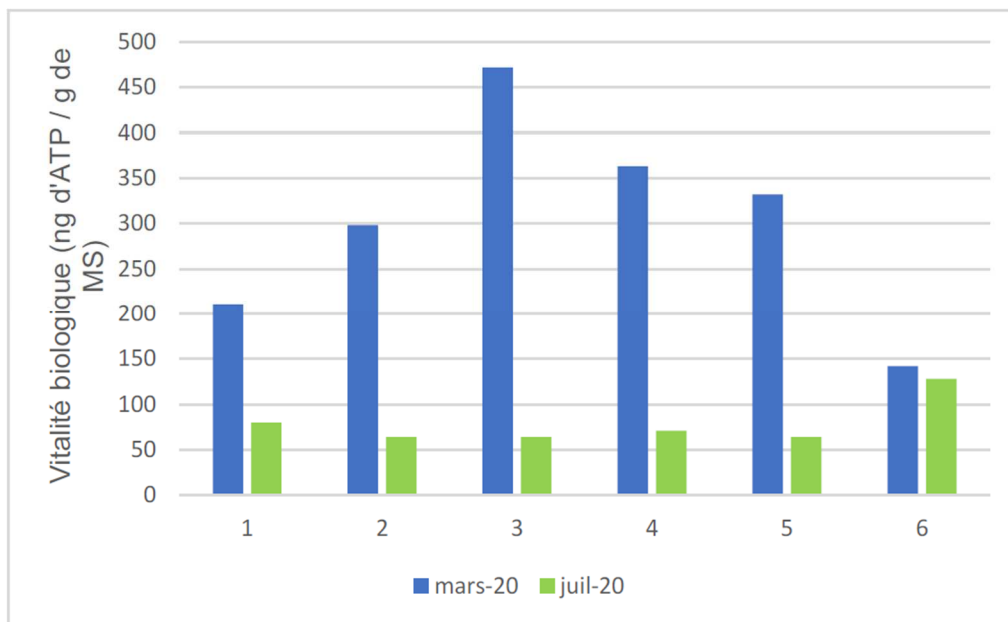
Ejemplos de resultados:

El gráfico 2 muestra los resultados obtenidos en distintos lugares de una parcela de Merlot en Libourne a principios de la primavera (muestreos realizados en marzo) y a mediados del verano (muestreos realizados en julio). Es interesante observar que los niveles de vitalidad biológica en general fueron relativamente más altos en primavera, descendiendo considerablemente a mediados del verano y la parcela que presentaba el nivel de vitalidad más bajo en marzo, es la que presenta el nivel de vitalidad más elevado a mediados de julio. Esta parcela corresponde a la parte menos arcillosa de la parcela en estudio.

Entre los compuestos del suelo probablemente hostiles a la vida microbiana, el cobre está evidentemente en el centro de todos los debates. Muchas publicaciones mencionan este tema (Karimi et al. 2021; Nunes et al. 2016 y Wang et al. 2009) pero los resultados propuestos son divergentes. Algunos datos se basan en fuertes consecuencias de la presencia de cobre sobre la riqueza (biomasa, diversidad...) microbiana y otros demuestran que el cobre no tiene un efecto significativo sobre las vías metabólicas centrales y esenciales, como la actividad beta-glucosidasa, implicada en el ciclo del carbono y en la degradación de la materia orgánica. Estos estudios tienen a menudo por objeto correlacionar la dosis de cobre empleada en los tratamientos con la vida microbiana del suelo. A partir de los indicadores de ATP y ADN hemos estudiado

los efectos de los contenidos reales de cobre total e intercambiable en el suelo justo en el momento de la realización del análisis microbiológico.

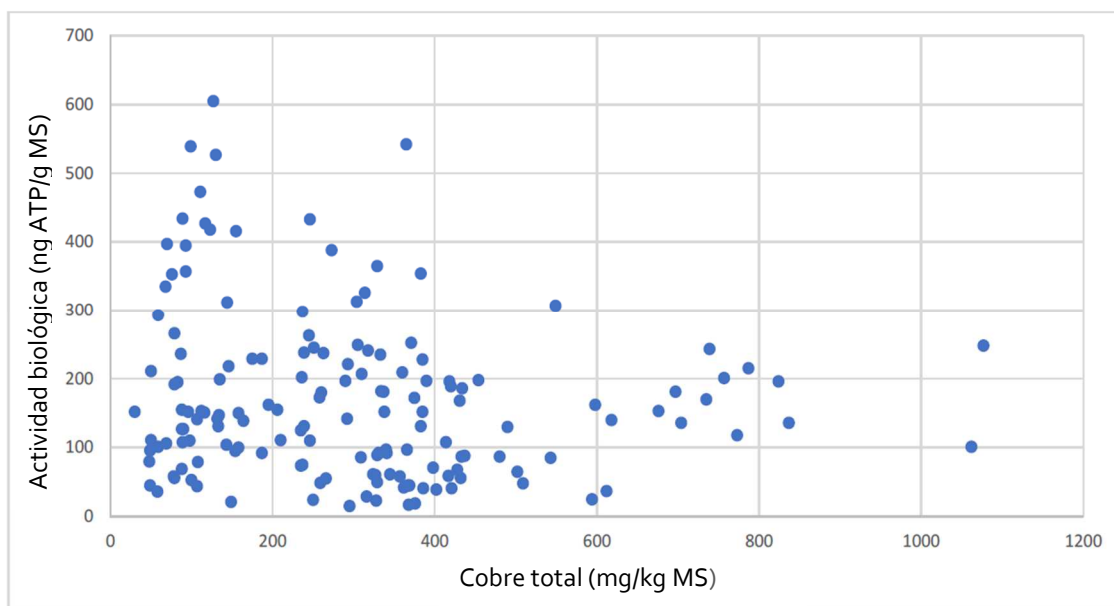
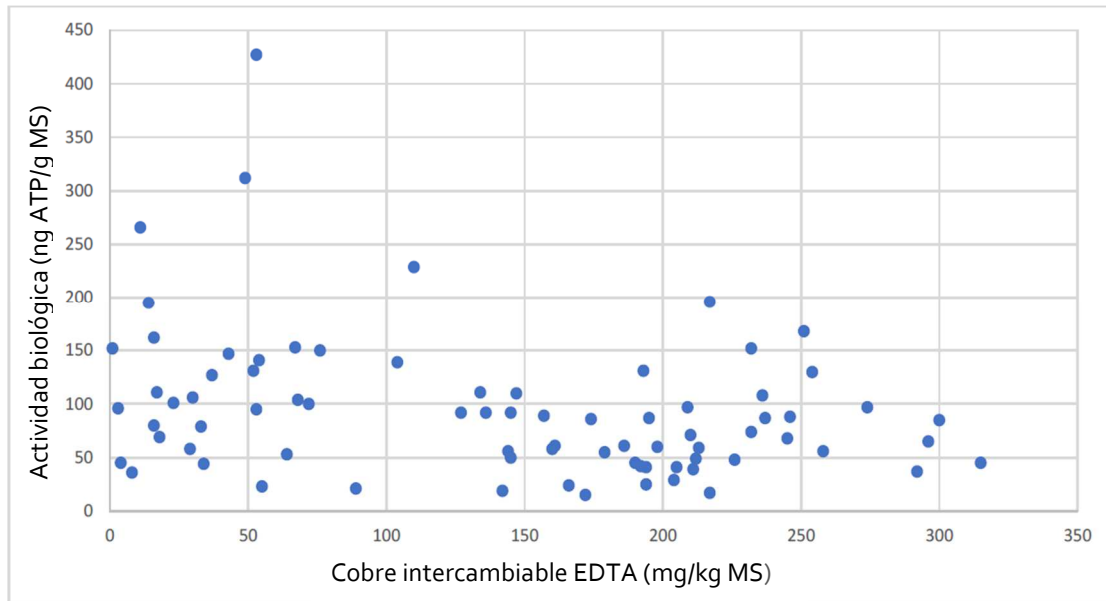
Gráfico 2. Comparación de los análisis de vitalidad biológica (ng de ATP/g de materia seca) en 6 puntos de muestreo de una misma parcela de Merlot en Libourne a principios de marzo (azul) y a mediados de julio (verde).



En la primera nube de puntos del gráfico 3 se representan los resultados obtenidos en los 80 análisis realizados en diferentes parcelas de 5 viñedos (Burdeos y Languedoc) pertenecientes a una misma unidad empresarial. Se observa la siguiente tendencia, los suelos con los mayores valores de vitalidad biológica son los que tienen niveles más bajos de cobre intercambiable. La correlación no es muy elevada, pero la tendencia es visible en las dos representaciones.

Esta primera serie de análisis se realizó en el verano de 2020. En diciembre del mismo año se llevó a cabo una segunda campaña analítica que consolidó las observaciones anteriores, pero con el doble de puntos de medición para reforzar las interpretaciones de resultados; indicar aquí que los valores de cobre total e intercambiable están sólidamente correlacionados entre ellos, pero se observan variaciones notables entre los dos puntos temporales de medida (verano y principios del invierno), lo que refleja sin duda una diferencia notable en la capacidad de retención del cobre según los suelos estudiados, lo que a priori podría tener una influencia directa manifiesta en los resultados.

Gráfico 3. Comparación entre las medidas de vitalidad biológica (ng de ATP/g de materia seca) y las de cobre intercambiable (gráfico superior) y cobre total (gráfico inferior).

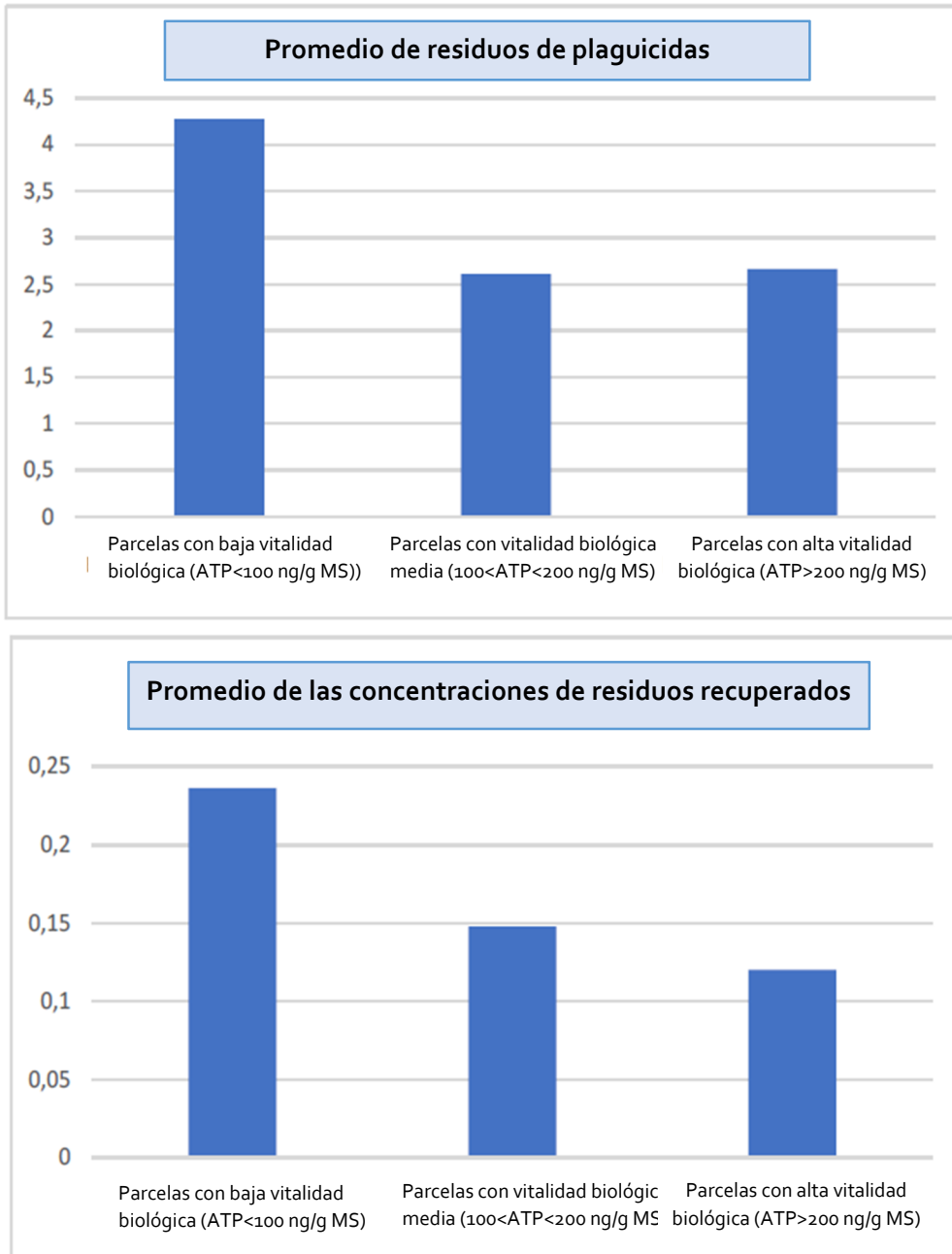


Por otra parte, el estudio de residuos de plaguicidas en suelo también es interesante para poder comprender las diferencias en los resultados de vitalidad biológica. En la tabla 3 que figura a continuación se comparan los datos de vitalidad biológica y el tipo de residuo de plaguicidas y su concentración en diferentes parcelas de un mismo viñedo. Los gráficos siguientes agrupan las parcelas según su nivel de vitalidad biológica. Observamos que las parcelas que presentan una vitalidad biológica inferior a 100 ng de ATP/g de suelo (lo que puede calificarse de relativamente baja) son las que presentan el número de residuos y la suma de concentraciones más elevadas (aunque, por supuesto este tipo de interpretación de datos relativos a los plaguicidas está siempre sujeta a ciertas precauciones y a nociones de toxicidad desconocidas sobre la parte biológica del suelo).

Tabla 3: Resultados de vitalidad biológica (ATP), pH, cobre total e intercambiable y residuos de plaguicidas (180 compuestos en diferentes parcelas de muestreo de un mismo viñedo). Los plaguicidas se expresan en mg/kg de MS.

Nd: no detectado

Figura 4. Resultados de la tabla 3 agrupando las parcelas de muestreo según su vitalidad biológica (ATP), número de plaguicidas cuantificados y suma de concentraciones recuperadas.



Como se ha mencionado en la introducción del artículo, la medición de la vitalidad biológica estimada por la cantidad de ATP, puede compararse con la cantidad de microorganismos presentes. Para estimar esta magnitud elegimos referirnos a la

determinación del ADN microbiano total. En la tabla 4 se comparan dos muestras de un mismo viñedo que, aunque presentan una cantidad de ADN microbiano total similar, presentan dos niveles de vitalidad biológica radicalmente diferentes. Estas dos muestras se realizaron en dos tipologías de suelos muy diferentes, asociadas igualmente a dos modos de conducción y de trabajo vitícola del suelo diversos.

Estos resultados apuntan a que, para una carga microbiana total relativamente similar, la vitalidad biológica y, por lo tanto, las actividades metabólicas de los microorganismos son mucho mayores en el punto de muestreo A que en el B. En este caso, evidentemente conviene preguntarse sobre las causas de estas diferencias (hidromorfía de los suelos, concentraciones de nitrógeno, carbono, minerales y elementos tóxicos...), ya que estas diferencias de actividad pueden ciertamente tener consecuencias sobre los ciclos de la materia y las posibilidades de asimilación para las cepas de vid que se encuentren plantadas en ella.

Tabla 4: Comparación de la vitalidad biológica (ATP) y carga microbiana (ADN total) en dos muestras de un mismo viñedo, pero con tipología y modos de trabajo diferente. (Para una cantidad de ADN similar, la vitalidad biológica se considera alta para A y baja para B).

	Vitalidad biológica (ATP en ng/g MS)	Carga microbiana total (μ g de ADN/g MS)
Lugar de muestreo A	338	14,4
Lugar de muestreo B	89	14,7

Conclusiones y perspectivas:

De manera muy general, el consorcio microbiológico de los suelos es un elemento clave en el ciclo de la materia orgánica (Anfrey 2017). Cuanto más importante, diversificada y activa sea esta microflora, más rápido será el proceso de degradación de la materia orgánica y más nutrientes intermediarios (minerales, inorgánicos y orgánicos) estarán disponibles para las cepas de vid. Por lo tanto, el análisis del componente microbiano de un suelo es de evidente interés, pero requiere cierta cautela, ya que los sistemas que se emplean en su estudio son complejos y se rigen por numerosas interrelaciones dentro del nicho ecológico edafológico.

Para disponer de datos precisos, globales y pragmáticos, Excell ha optado por concentrar sus estrategias analíticas en dos magnitudes vinculadas a toda forma de vida microbiana: el ADN total y el ATP. El ADN permite estimar la cantidad de células microbianas presentes y el ATP representa la actividad vital de esta microflora que vive en el suelo del viñedo.

Después de compilar los resultados de numerosos análisis en los últimos tres años, los niveles de vitalidad biológica pueden ahora distinguirse bien según las cantidades de ATP medidas. Estos análisis pueden poner de manifiesto importantes diferencias de nivel de actividad microbiana en los suelos en función de diferentes factores: tipología del suelo, modo de trabajo y laboreo de este último y la composición en elementos nutritivos o tóxicos. Entre estos últimos, las solicitudes más frecuentes actualmente son las destinadas a confrontar la medida de vitalidad biológica con el contenido de cobre residual presente en el suelo.

En general, para ayudar en las observaciones de vitalidad biológica del suelo mediante el método analítico del ATP, la medición complementaria del ADN total permite ponderar el nivel de actividad analizado. Observamos así que, en algunos casos, donde las cantidades de ADN parecen relativamente altas, los niveles de vitalidad pueden ser bajos, lo que cuestiona las causas y las consecuencias de tal prolepsis: si los microorganismos son numerosos y están bien presentes (elevada cantidad de ADN) ¿Por qué no están activos?

Referencias bibliográficas:

- Anfray, P. 2017. Guide Pratique de la vie des sols. Ed. France Agricole. Paris.
- Karimi, B., Masson, V., Guillard C., Leroy E., Pelligrinelli S., Giboulot E., Maron P.A., Ranjard, L., 2021. La biodiversité des sols est-elle impacter par l'apport de cuivre ou son accumulation dans les sols vignes? Synthèse des connaissances scientifiques. Etude et gestion des sols, vol. 28 pages 71 à 92.
- Nunes, I., Jacquiod. S., Brejnrod. A., Holm. P.E., Johansen, A., Brandt K.K., 2016. Coping with copper: legacy effect of cooper on potential activity of soil bacteria following a century of exposure. FEMS Microbiol. Ecol. 92. Fiw175.
- Pochon, J. et de Barjac H. 1958. Traité de microbiologie des sols, applications agronomiques. Ed. Dunod. Paris.
- Wang, Q.Y., Zhou D.M., Cang, L., 2009. Microbial and enzyme properties of apple orchard soil as affected by longterm application of copper fungicide. Soil Biol. Biochem. 41, 1504-1509.
- Winogradsky, S. 1949. Microbiologie du sol, problèmes et méthodes ; 50 ans de recherche. Ed. Masson. Paris.