

Análisis del ADN ambiental en la determinación de la fertilidad del suelo agrícola en la provincia de Loja

(Analysis of environmental DNA in the determination of fertility of agricultural soil in the province of Loja)

Masao Nishikawa¹, Franklin Román Cárdenas² , Miguel Marín-Gómez³

¹ JICA, Loja, Ecuador

² Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda, Ecuador

³ Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador

Masaonishikawa061748@gmail.com, froman@ueb.edu.ec, miguel.marin@unl.edu.ec

Resumen: La fertilidad del suelo se la puede determinar mediante diferentes procesos uno de estos es a través del análisis del ADN ambiental (eADN) el cual permite identificar la diversidad genética que se encuentran en dicho material, esencial en la formación y el mantenimiento de la productividad del suelo, este estudio, es el primero de su tipo en la provincia de Loja, se realizó mediante la selección de 9 áreas, en las cuales, se recogieron 26 muestras de suelo, se midió el eDNA y se estimó el número de microorganismos a partir de la cantidad de eDNA obtenido. El 35% de suelos totales (9) mostraron recuentos bacterianos mayores $6,0 \times 10^8$ células/g-suelo, el 15% (4) entre $2,0 \times 10^8$ células/g-suelo (recuentos bacterianos mínimos requeridos para la mineralización de compuestos orgánicos) y $6,0 \times 10^8$ células/g-suelo. Sin embargo, el 50% (13) restantes tenían menos de $2,0 \times 10^8$ células/g-suelo en estos suelos la mineralización con nitrógeno orgánico es extremadamente baja, encontrada en los cantones Saraguro, Paltas y Catamayo. Este estudio es importante porque identifica los recuentos bacterianos de diferentes suelos y la necesidad de incorporar microorganismos para mejorar rendimientos, gracias a la estandarización, la técnica se puede aplicar a la totalidad de los suelos de la provincia y del país.

Palabras clave: Biomasa Bacteriana, Recuentos Bacterianos, Índice de Fertilidad del Suelo.

Abstract: Soil fertility can be determined through different processes, one of these is through the analysis of environmental DNA (eDNA) which allows identifying the genetic diversity found in said material, essential in the formation and maintenance of soil productivity. soil, this study is the first of its kind in the province of Loja, it was carried out by selecting 9 areas, in which 26 soil samples were collected, eDNA was measured and the number of microorganisms was estimated from of the amount of eDNA obtained. 35% of total soils (9) showed bacterial counts greater than 6.0×10^8 cells/g-soil, 15% (4) between 2.0×10^8 cells/g-soil (minimum bacterial counts required for the mineralization of organic compounds) and 6.0×10^8 cells/g-soil. However, the remaining 50% (13) had less than 2.0×10^8 cells/g-soil in these soils mineralization with organic nitrogen is extremely low, found in the Saraguro, Paltas and Catamayo cantons. This study is important because it identifies the bacterial counts of different soils and the need to incorporate microorganisms to improve yields, thanks to standardization, the technique can be applied to all the soils of the province and the country.

Keywords: Bacterial Biomass, Bacterial Counts, Soil Fertility Index.

1. INTRODUCCIÓN

Un ambiente saludable del suelo permite el crecimiento de las plantas y la producción de los alimentos que está estrechamente relacionado con nuestra salud y nuestra vida [1], de gran importancia es la presencia de microorganismos ya que juegan un papel importante en la

descomposición de materiales orgánicos y el ciclo del carbono, nitrógeno, fósforo y varios otros nutrientes [2]

En los últimos años, la contaminación ambiental derivada del uso excesivo de químicos (fertilizantes, herbicidas fungicidas etc.) se ha convertido en un grave problema mundial [3], [4]. La provincia de Loja no es la excepción en la que el empleo de diferentes agroquímicos es de uso común en labores culturales de cultivos, como el maíz, tomate, hortalizas, para proteger a los microorganismos del suelo de los efectos nocivos de los agroquímicos, es necesario minimizar su uso, permitiendo su recuperación y su acción en diferentes actividades que ejercen en el suelo acelerando el proceso de biodegradación [5], [6]. El interés en la agricultura orgánica se incrementa a medida que aumenta la conciencia del consumidor sobre la seguridad alimentaria.

Los fertilizantes como el compost utilizado en la agricultura orgánica se pueden hacer empíricamente sin embargo es difícil ajustar sus componentes [7]. Los componentes orgánicos del suelo son utilizados por los cultivos agrícolas después de ser descompuestos por los organismos y las bacterias presentes en el suelo, es importante analizar la fertilidad del suelo enfocándose en la bioactividad de las bacterias involucradas, en la descomposición de materiales orgánicos y en la circulación de nutrientes como C, N, P y S [8], [9]. Además, la microbiota del suelo en sí procesa un conjunto lábil de nutrientes que esta potencialmente disponible para las plantas [10], [11], pero muchos de ellos son muy difíciles de separar y cultivar en un laboratorio.

Se han realizado varios intentos para extraer DNA directamente del suelo y analizar comunidades microbianas, recientemente se estableció el método para extraer eDNA, el DNA de microorganismos presentes en el medio ambiente como suelo y agua [12], mediante la utilización del método que extrae eDNA con agitación lenta (“Slow-Stirring Method”) y permite evaluar la fertilidad del suelo por la carga bacteriana presente en el mismo (biomasa bacteriana) [13].

El objetivo del presente estudio, es determinar la fertilidad del suelo de nueve cantones de la provincia de Loja. A través del análisis del eDNA, su importancia radica en la identificación de los recuentos bacterianos de diferentes suelos y la necesidad de incorporar microorganismos para mejorar rendimientos, gracias a la estandarización, la técnica se puede aplicar a la totalidad de los suelos de la provincia y del país.

2. METODOLOGÍA

Muestra: El suelo utilizado en este estudio fue recolectado en 26 campos agrícolas de nueve cantones (figura 1), Saraguro, Paltas, Celica, Alamor, Gonzanamá, Catamayo, Macará, Loja y Zapotillo, en la provincia de Loja.

Tres muestras por cantón a excepción de Gonzanamá en la que se tomó dos muestras, el suelo se recolectó a una profundidad de 5-10 cm sin la capa superficial del suelo y se eliminaron las raíces, piedras y materiales extraños, todas las muestras se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio, para extraer el eDNA, las muestras se secaron a temperatura ambiente durante una semana, luego se molieron con un mortero hasta obtener un polvo fino, y se tamizaron usando una malla de 1 mm.

Microbiota del suelo, se midió analizando eDNA extraído por el método de “Slow-Stirring Method” [13] que es un método simple y rápido de agitación lenta para extraer eDNA de los suelos mediante agitación física suave con tratamiento químico.

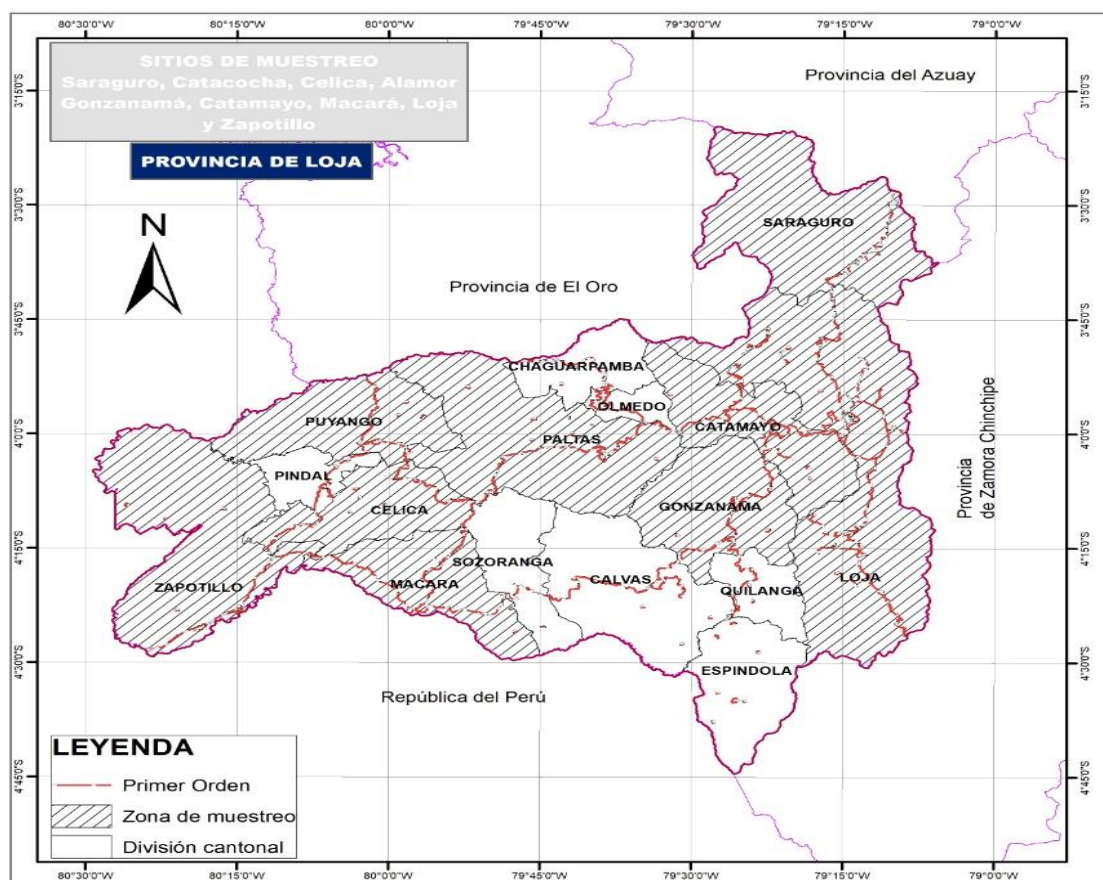


Figura 1. Mapa de las zonas de muestreo

Extracción de eADN: Para extraer eDNA en el suelo, se mezclaron 2,0 g de muestra del suelo con 8,0 ml de tampón de extracción de eDNA [Tris-HCl 100 mM, EDTA-2Na 100 mM, NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 1,5 M, Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 1% (p/v), pH 8,0] y 2,0 ml de dodecilsulfato sódico al 2,5% (p/v), y se agitó lentamente (200 rpm) por la noche (Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments, Alemania). La suspensión se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min y posteriormente se transfirieron 500 μl de sobrenadante a un micro tubo de 2,0 ml y se suplementaron con 50 μl de 3 M acetato sódico (pH 8,0) y 1400 μl de 100% etanol frío. Después de dejar por 30 minutos, el eDNA crudo se sedimentó por centrifugación a 13000 rpm por 3 min y se enjuagó con 70% y 100% de etanol, respectivamente. El sedimento de eDNA crudo se disolvió en TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0) después de secar en aire. Todos los procedimientos para extraer el eDNA descritos anteriormente se llevaron a cabo en la temperatura ambiente.

Cuantificación de eDNA: El eDNA extraído se cuantificó en función de la intensidad de las bandas de DNA (figura 2) en una electroforesis en un gel de agarosa agarosa [(1,5% en TBE 1x (Tris-Borato 90mM, EDTA 2 mM)] durante 40 min (120 V constante). Las bandas de eDNA se visualizaron mediante SYBR safe de Invitrogen. MK; marcador de peso molecular TrackIt 100 bp DNAladder de Invitrogen, la imagen de la electroforesis fue leída utilizando el software de análisis de imágenes NIH Image J.

Análisis de la microbiota en el suelo: Se estimó usando la ecuación $Y = 1.70 \times 10^8 \times X$ ($R^2 = 0.96$) [13], donde Y y X son la microbiota (recuentos bacterianos, células/g-suelo) y la cantidad de eDNA (g/g-suelo),respectivamente. Aunque la eficiencia de extracción no se probó en el

presente experimento, Miller et al., informaron que la eficiencia de extracción promedio fue del 86% utilizando un método de extracción similar [14].

Para evaluar diferencias de contenido de eDNA entre los nueve sitios, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la librería “stats” del programa estadístico R (R Core Team 2021).

3. RESULTADOS

Contenido de eDNA de suelo agrícola en la tierra de la provincia de Loja: primeramente se realizó la electroforesis en gel de agarosa de todas las muestras.

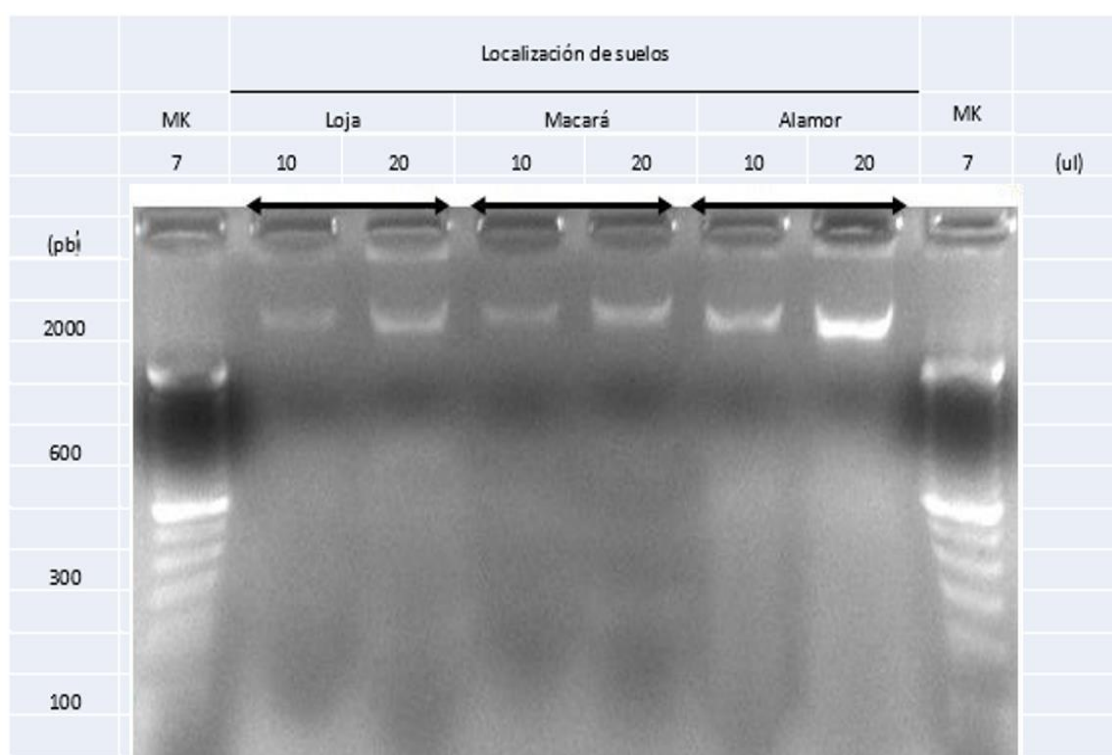


Figura 2. Análisis de eDNA extraído del suelo agrícola (electroforesis en gel de agarosa) de los cantones Loja, Macará y Alamor, corridos con 10 y 20 ul, el marcador de peso molecular en 7 ul, el marcador de 2000 pb.

Seguidamente se realizó una fotografía (tabla 1) que fue leída por el software de análisis de imágenes (NIH Image J, NIH), el suelo de Alamor mostró la mayor cantidad de eDNA, el valor promediado de las tres muestras fue de $16,2 \pm 3,1 \mu\text{g/g-suelo}$, por otro lado, la cantidad de eDNA en los suelos de Saraguro, Paltas y Catamayo fueron bajas con cantidades de eDNA inferior a $1 \mu\text{g/g-suelo}$.

Tabla 1. Contenido de eDNA en suelo agrícola de cantones de la provincia de Loja, contenido por cada muestra y promedio por área.

Área		Edna ng+/-SE/g-suelo)			Promedio ² en área		
		Promedio ¹					
Saraguro	1	114	+/-	39.5	264.4	+/-	107.6
	2	673.4	+/-	243.1			
	3	52.2	+/-	24.6			
Paltas	1	2171.4	+/-	480.9	916.5	+/-	279.4
	2	145.9	+/-	24.8			
	3	780.0	+/-	248.9			
Celica	1	7527.8	+/-	2259.6	3304.4	+/-	1391.11
	2	776.7	+/-	160.2			
	3	91.8	+/-	30.2			
Alamor	1	1790.2	+/-	2844.9	16210.4	+/-	3085.7
	2	20895.8	+/-	8045.6			
	3	9268.8	+/-	3955.7			
Gonzanamá	1	7326.9	+/-	872.8	4175.6	+/-	1485.5
	2	1024.2	+/-	250.2			
Catamayo	1	298.8	+/-	103.2	294.1	+/-	103.7
	2	67.5	+/-	34.1			
	3	427.3	+/-	203.3			
Macará	1	935.1	+/-	110.1	3758.6	+/-	1256.9
	2	8226.3	+/-	3245.0			
	3	3996.9	+/-	315.4			
Loja	1	1615.1	+/-	722.4	3079.3	+/-	1068.4
	2	1795.1	+/-	536.2			
	3	6743.9	+/-	3171.3			
Zapotillo	1	2431.0	+/-	962.6	2017.8	+/-	653.2
	2	35.8	+/-	10.2			
	3	4109.4	+/-	1022.0			

*1; Valor promedio \pm error estándar (SE) de 2 to 5 extractos

*2; Valor promedio \pm SE de 6 to 13 experimentos para un área

En el cantón Alamor se pudo observar alta variación de eDNA, respecto al resto de sitios (figura 3). el contenido de eDNA resulto mayor en Alamor y, menor en Catamayo y Saraguro, sin embargo esa diferencia no fue significativa (prueba Kruskal-Wallis $\chi^2= 12.707$, $df = 8$, $p = 0.1224$).

Microbiota en el suelo agrícola en los cantones de la provincia de Loja: La microbiota de cada suelo se calculó basándose en la cantidad de eDNA mostrada en la Figura 2. El valor promedio de la microbiota del suelo de todas las 26 muestras de suelos fue de $6,0 \pm 1,0 \times 10^8$ células/g-suelo (figura 4).

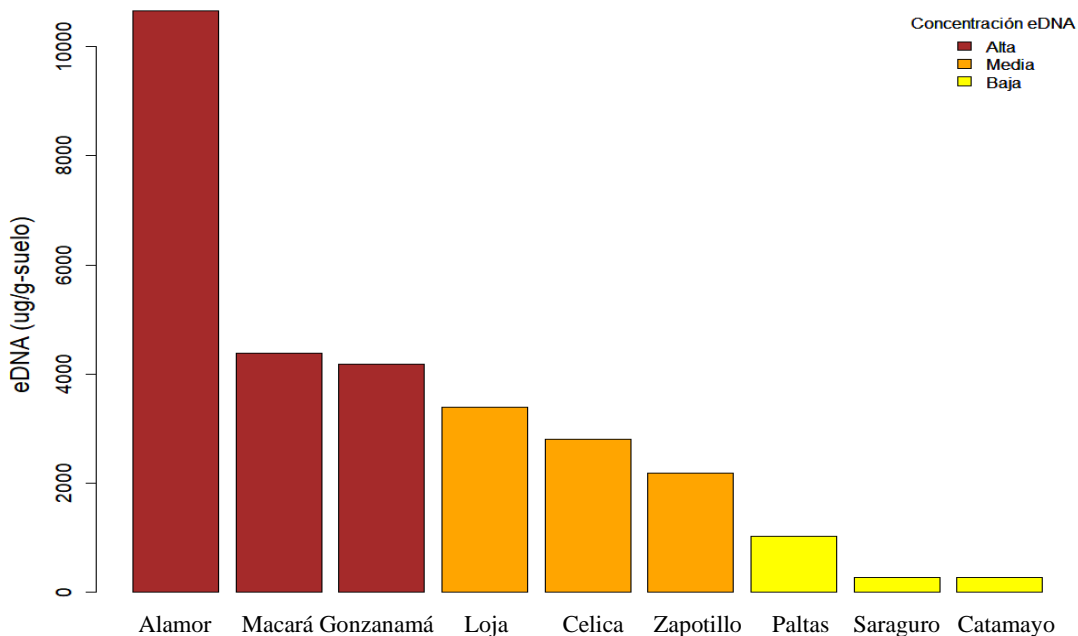


Figura 3. Variación de eDNA por cada sitio de muestreo.

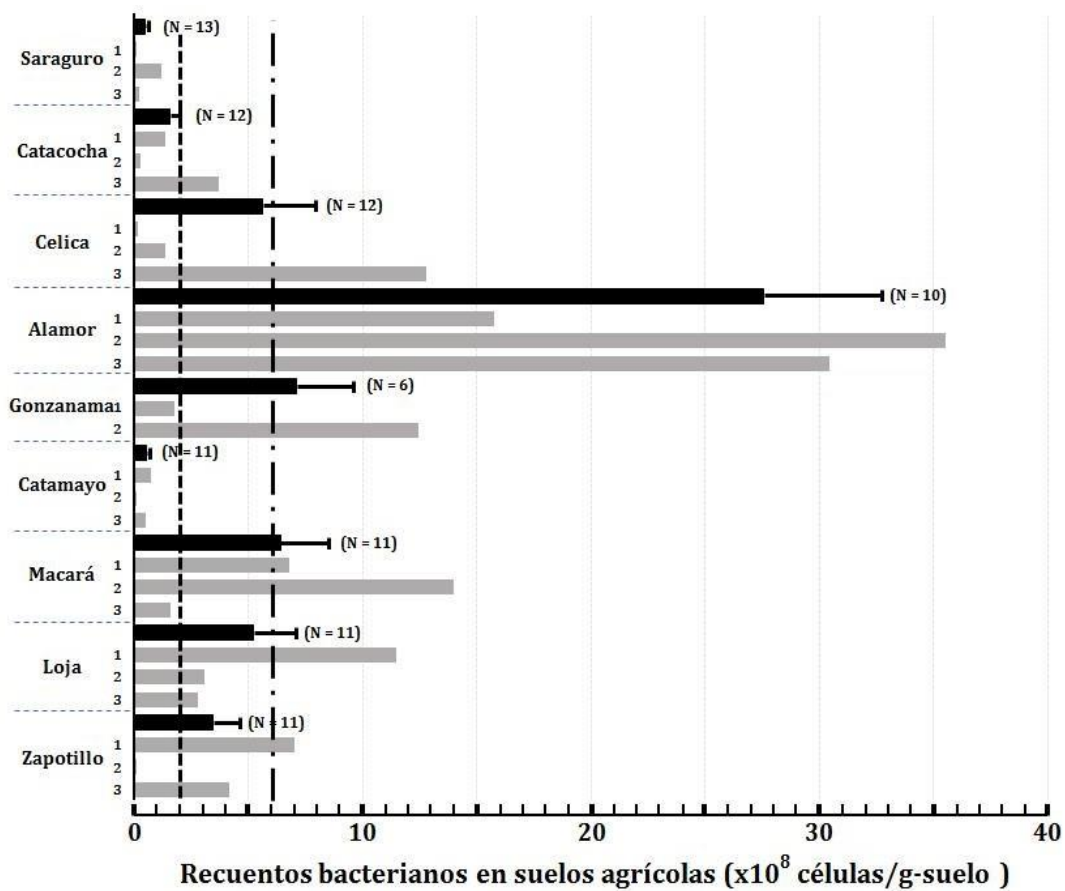


Figura 4. Recuentos bacterianos en suelos agrícolas

La microbiota del suelo se clasificó aproximadamente entre tres grupos ($6,0 \times 10^8$ o más, $2,0 - 6,0 \times 10^8$ y $2,0 \times 10^8$ o menos). Es decir, las biomásas bacterianas de 3 cantones (Alamor, Gonzanamá y Macará) fueron de $27,6 \pm 5,3$, $7,1 \pm 2,5$ y $6,4 \pm 2,1 \times 10^8$ células/g-suelo, las biomásas bacterianas de Celica, Loja y Zapotillo fueron de $5,6 \pm 2,4$, $5,2 \pm 1,8$ y $3,4 \pm 1,1 \times 10^8$ células/g-suelo, las biomásas bacterianas de Saraguro, Paltas y Catamayo fueron muy bajas [$0,5 \pm 0,2$, $1,6 \pm 0,5$ y $0,5 \pm 0,2 \times 10^8$ células/g-suelo]. Utilizando esta categorización, se observó diferencia significativa en el contenido de DNA en los tres grupos de cantones (prueba Kruskal-Wallis $\chi^2 = 10.417$, $df = 2$, $p = 0.00547$) (Figura 4).

El 35% (9 de 26 muestras) presentaron mayores biomásas bacterianas que el valor de $6,0 \times 10^8$ células/g-suelo, el 15% (4 de 26 muestras) biomásas bacterianas entre $2,0$ y $6,0 \times 10^8$ células/g-suelo, y el 50% (13 de 26 muestras) mostró biomásas bacterianas menos de $2,0 \times 10^8$ células/g-suelo.

4. DISCUSIÓN

El N es uno de los nutrientes esenciales para las plantas, está contenido en compuestos orgánicos, que deben descomponerse en nitrógeno inorgánico (mineralización) antes de ser utilizado por las plantas, en el suelo se descompone finalmente en nitrato a través del nitrógeno amoniacal y nitrito mediante la acción de los microorganismos, son numerosos los microorganismos que habitan en el suelo y están directamente involucrados en mineralización de compuestos orgánicos [15], los cuales habitan aproximadamente en el mismo número independientemente de altitud, latitud y naturaleza del suelo [16]. Las investigaciones sobre el DNA ambiental (eDNA) no solo se han aplicado para la detección de especies de microorganismos en el suelo, sino también para la estimación de la biomasa bacteriana (recuentos bacterianos) porque la concentración de eDNA se correlaciona positivamente con la biomasa bacteriana o la abundancia de microorganismos [12], confirmando que la cantidad de eDNA refleja la presencia o no de microorganismos (biomasa bacteriana) en el suelo [17].

Zhou [18] extrajeron $10,7 - 17,5$ g DNA de 1 g del suelo utilizando CTAB y PVPP (polivinilpirrolidona) como surfactantes [14]. Miller [19] usaron como tampón de extracción el surfactante SDS junto con disolventes orgánicos (fenol y cloroformo) además de la enzima de lisozima, obteniendo $14,7$ g DNA/g-suelo [14]. Por otro lado, [13] y [1], desarrollaron un método simple de extracción de eDNA del suelo ("Slow-Stirring Method") que no requiere los disolventes orgánicos y sugieren que la microbiota del suelo es útil como un criterio para evaluación de la fertilidad del suelo. Usando ese método, ellos cuantificaron el eDNA de 2000 muestras de Japón, y reportaron el promedio de biomasa bacteriana de $6,2 \times 10^8$ células/g-suelo [13], [1]. En esta investigación, cuantificamos eDNA en el suelo agrícola en nueve cantones de la provincia de Loja en Ecuador por el método simple sin usar disolventes orgánicos establecido por Aoshima [13], el valor promedio de biomasa bacteriana de los 26 suelos fue $6,0 \times 10^8$ células/g-suelo, el valor promedio encontrado es menor con la investigación contrastada.

La mineralización del nitrógeno orgánico es extremadamente importante para desarrollar una agricultura con buen rendimiento en la que intervienen los microorganismos del suelo. Sin embargo, la mineralización del nitrógeno orgánico difícilmente ocurrirá en suelos con biomasa bacteriana de $2,0 \times 10^8$ células/g-suelo o menor [19], [20] y [1]. El 50% de los 26 suelos medidos en este estudio mostraron una biomasa bacteriana menor de $2,0 \times 10^8$ células/g-suelo, muestras de suelo procedentes de Saraguro, Paltas, Celica, Gonzanamá, Catamayo, Macará y Zapotillo, estos datos sugieren que el mejoramiento del suelo es necesario en estos sectores.

Actualmente, existe gran expectativa en la agricultura orgánica, sin embargo es necesario mantener las bacterias y hongos del suelo, el aumento de la microbiota y la mejora de sus actividades culturales lo mantendrán más productivo, esperamos que este primer trabajo sea útil

para continuar con las investigaciones y mejorar así la fertilidad de los suelos por la conservación de la microbiota.

5. CONCLUSIONES

1. El análisis de ADN ambiental es una técnica que permite evaluar eficientemente la fertilidad del suelo a través de la determinación de la microbiota presente, en esta investigación se comprueba su validez y el procedimiento seguido puede ser empleado en futuras investigaciones.

2. Los suelos en Saraguro, Paltas y Catamayo mostraron la microbiota del suelo extremadamente bajas, el promedio fue del nivel de 10^7 células/g-suelo, reflejando diferencias significativas con el resto de sitios en cuanto al contenido de eDNA. Este nivel de microbiota del suelo es menor que la biomasa bacteriana ($2,0 \times 10^8$ células/g-suelo) necesaria para mantener la mineralización de nitrógeno orgánico, lo que sugiere mejorar la fertilización del suelo.

AGRADECIMIENTOS: El autor principal expresa el agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja por su acogida en el tiempo de cooperación.

REFERENCIAS

- [1] M. Kubo, M. Mukai, y D. Adhikari *Construction of Soil Fertile Index (SOFIX) Based on Microorganisms and Application for Agriculture*. Journal of Environmental Biotechnology, 15(2): 85-90 2016
- [2] A.C. Kennedy, *Bacterial diversity in agroecosystems*. Agriculture, Ecosystems & Environment. Elsevier volume 74: 65-76. 1999
- [3] A Sharpley, *Agricultural phosphorus, water quality, and poultry production: are they compatible?*. Poultry Science. Volume 78, Issue 5, 1999, Pages 660-673
- [4] D. Rigby, D. Cáceres, *Organic farming and the sustainability of agricultural systems*. Agricultural Systems. Volume 68, Issue 1, 2001. Pages 21-40
- [5] P. Maeder, A. Fliessbach, D. Dubois, L. Gunst, P. Fried and U. Niggli. *Soil fertility and biodiversity in organic farming*. Science 296: 1694-1697. 2002
- [6] M.A. Tsiafouli, E. Thébault, S.P. Sgardelis, P.C de Ruiter, W.H. van der Putten, K. Birkhofer, L. Hemerik, F.T. de Vries, R.D. Bardgett, M.V. Brady, L. Bjornlund, H.B. Jørgensen, S. Christensen, T.D. Hertefeldt, S. Hotes, W.H. Gera Hol, J. Frouz, M. Liiri, SR Mortimer, H. Setälä, J. Tzanopoulos, K. Uteseny, V. Pižl, J. Stary, V. Wolters, K. Hedlund. *Intensive agriculture reduces soil biodiversity across Europe*. Glob Chang Biol. Feb;21(2):973-85 2015
- [7] R.J. Stirzaker, J.B. Passioura & Y. Wilms. *Soil structure and plant growth: Impact of bulk density and biopores*. Plant Soil **185**, 151–162. 1996
- [8] E.K. Bünemann, L.M. Condron. Phosphorus and Sulphur Cycling in Terrestrial Ecosystems. In: Marschner, P., Rengel, Z. (eds) Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems. Soil Biology, vol 10. Springer, Berlin, Heidelberg. vol. 10. Springer. 2007
- [9] H.W. Scherer. *Sulfur in soils*. Journal of Plant Nutrition and Soil Sci, 172(3): 326-335. 2009.
- [10] R. Martens. *Current methods for measuring microbial biomass C in soil: Potentials and limitations*. Biol Fertil Soils 19, 87–99. 1995
- [11] M.E. Arias, J.A. González-Pérez, F.J. González-Vila, y A.S. Ball. *Soil health—a new challenge for microbiologists and chemists*. Int Microbiol, 8(1): 13-21. 2005.

- [12] S. Tsuji, M. Ushio, S. Sakurai, T. Minamoto, y H. Yamanaka *Water temperature- dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. PLoS One*, 12(4): e0176608. 2017
- [13] H. Aoshima, A. Kimura, A. Shibutani, C. Okada, Y. Matsumiya, M. Kubo. *Evaluation of soil bacterial biomass using environmental DNA extracted by slow-stirring method. Appl Microbiol Biotechnol*. Aug;71(6):875-80. 2006
- [14] D. N. Miller, J.E. Bryant, E.L. Madsen, y W.C. Ghiorse. *Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Appl Environ Microbiol*, 65(11): 4715-4724. 1999
- [15] J. Gans, M. Wolinsky, y J. Dunbar. *Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. Science*, 309(5739): 1387-1390. 2005
- [16] M. Kimura. *Microbial World Acting in Soil (9) -Microorganisms in Grassland-*. J. the Japanese Irrigation, Drainage and Reclamation Engineering, 59(12): 1413-1421. 1991.
- [17] H. Doi, R. Inui, Y. Akamatsu, K. Kanno, H. Yamanaka, T. Takahara, y T. Minamoto. *Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of streamfish. Freshwater Biol*, 62(1): 30-39. 2017.
- [18] J. Zhou, M.A. Bruns, y J.M. Tiedje. *DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. Appl Environ Microbiol*, 62(2): 316-322. 1996
- [19] Y. Fukuhara, S. Horii, T. Matsuno, Y. Matsumiya, M. Mukai, y M. Kubo. *Distribution of hydrocarbon-degrading bacteria in the soil environment and their contribution to bioremediation. Appl Biochem Biotechnol*, 170(2): 329-339. 2013
- [20] S. Horii, T. Matsuno, J. Tagomori, M. Mukai, D. Adhikari, y M. Kubo. *Isolation and identification of phytate-degrading bacteria and their contribution to phytate mineralization in soil. J Gen Appl Microbiol*, 59(5): 353-360. 2013.