



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Biotecnología

MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO

**ANÁLISIS METAGENÓMICO DE SUELOS
USADOS EN DIFERENTES PROCESOS
AGRONÓMICOS**

CECILIA LORES FERNÁNDEZ

SEPTIEMBRE, 2023

Dres. ÁNGEL CARLOS ROMÁN GARCÍA Y SONIA MULERO NAVARRO, profesores del Departamento de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA de la Universidad DE Extremadura.

INFORMAN:

Que Dña. CECILIA LORES FERNÁNDEZ ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Grado. Consideran que la memoria reúne los requisitos necesarios para su evaluación.

Badajoz, 4 de SEPTIEMBRE de 2023

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide / Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfatos

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid / Ácido etilendiaminotetraacético

ISR: Induced systemic resistance / Resistencia sistémica inducida o RIS

NaCl: Cloruro de sodio

NCBI: National Center for Biotechnology Information / Centro Nacional para la Información Biotecnológica

OTU: Operational Taxonomic Unit / Unidad Taxonómica Operativa o UTO

Pb: Par de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction / Reacción en Cadena de la Polimerasa

PGRP: Plant growth-promoting rhizobacteria / Bacterias rizosféricas estimuladoras del crecimiento de la planta

PVP: Poli-Vinil-Pirrolidona

TAE: Tris, acetato y EDTA

TRIS: Hidroximetil amino metano

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	13
1. Importancia de la vida del suelo en la agricultura	13
2. Beneficios de las poblaciones microbianas sobre las plantas	15
3. Estudio molecular de los microorganismos del suelo	17
4. Procedimiento del estudio metagenómico	18
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Extracción de ADN bacteriano de material del suelo	27
1.1. Extracción con protocolo diseñado por Pesquero Verde Alto.....	27
1.2. Extracción con “E.N.Z.A Soil DNA Kit”.....	29
2. Cuantificación de la extracción de ADN	32
3. Absorción colorimétrica	32
4. Detección electroforética de ADN genómico	33
5. Diseño de cebadores para PCR	35
6. Amplificación del ADN bacteriano por PCR	38
RESULTADOS	43
1. Testado de las técnicas de detección de ADN	43
1.1. Cuantificación de la concentración y pureza de ADN.....	43
1.2. Absorción en el visible al lector de microplaca.....	44

1.3. Electroforesis en gel de agarosa para la detección de ADN genómico	46
2. Identificación del ADN bacteriano de interés en las muestras de suelo .	47
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

Las poblaciones de microorganismos presentes en el suelo están demostrando ser fundamentales para el crecimiento de las plantas. Entre los muchos beneficios que aportan se encuentra una mayor adsorción de los nutrientes esenciales, un incremento de la resistencia frente a patógenos o el fomento del crecimiento vegetal gracias a la liberación de moléculas señalizadoras. Por consiguiente, los microorganismos pueden actuar como un potencial método de optimización de la productividad de los cultivos agrícolas.

Los análisis metagenómicos basados en el estudio del material genético presente en una muestra son esenciales en la identificación y estudio de estas poblaciones localizadas en los suelos de cultivo. Los pasos para desarrollar un estudio completo son la extracción del material genético de interés de una muestra de suelo, la posterior amplificación y el análisis molecular con herramientas bioinformáticas de la información genética aislada.

En este estudio se ha realizado un análisis metagenómico de las poblaciones bacterianas presentes en muestras de suelos de diferentes cultivos agrícolas de la región de Extremadura. Para ello, se realiza una extracción de ADN, se diseñan cebadores frente a bacterias de suelos mediterráneos y se lleva a cabo una identificación de las bacterias de interés.

En el desarrollo de este trabajo, se han evaluado dos métodos de extracción de ADN bacteriano, así como las técnicas de cuantificación y detección del ADN extraído.

También se ha comprobado la funcionalidad de los cebadores diseñados para el presente Trabajo de Fin de Grado.

Los resultados obtenidos han permitido optimizar el estudio metagenómico de suelo usado en procesos agronómicos y se han identificado las bacterias *Niabella soli*, *Bryocella elongata* y *Pontibacter populi* en muestras de cebolla, almendro y encina.

Palabras clave: microorganismos, suelo, cultivos agrícolas, análisis metagenómico, cebadores diseñados, *Niabella soli*, *Bryocella elongata*, *Pontibacter populi*.

ABSTRACT

The populations of microorganisms present in soil are proving to be crucial for plant growth. Among the many benefits they provide, adsorption of essential nutrients, increased resistance to pathogens, and the promotion of plant growth through the release of signaling molecules are enhanced. Consequently, microorganisms can potentially serve as a method for optimizing agricultural crop productivity.

Metagenomic analyses based on the study of genetic material present in a sample are essential for the identification and study of these populations in cultivated soils. The steps to conduct a comprehensive study include the extraction of the genetic material of interest from a soil sample, followed by amplification and molecular analysis using bioinformatic tools to analyze the isolated genetic information.

In this study, a metagenomic analysis of bacterial populations present in soil samples from different agricultural crops in the Extremadura region has been conducted. To achieve this, DNA extraction is performed, primers are designed targeting bacteria found in Mediterranean soils, and identification of the bacteria of interest is carried out.

In the course of this work, two methods of bacterial DNA extraction have been evaluated, as well as techniques for quantifying and detecting the extracted DNA. The functionality of the designed primers for this Bachelor's Thesis has also been confirmed.

The results obtained have allowed the optimization of metagenomic soil studies used in agronomic processes, and the bacteria *Niabella soli*, *Bryocella elongata* and *Pontibacter populi* have been o in samples from onion, almond, and oak trees.

Keywords: microorganisms, soil, agricultural crop, metagenomic analyses, designed primers, *Niabella soli*, *Bryocella elongata*, *Pontibacter populi*.

INTRODUCCIÓN

1. Importancia de la vida del suelo en la agricultura

La agricultura es un sector de importancia para la economía mundial, al igual que en España y, más concretamente en Extremadura. Así, el sector agroalimentario contribuye al PIB extremeño entre un 11% y un 13%, lo que supone un aporte de casi 100.000 millones de euros a la economía española de acuerdo con los últimos datos actualizados del Instituto Nacional de Estadística (INE). La importancia relativa del sector también se pone de manifiesto con las cifras de empleo representando en el año 2021 el 9,7% de personas empleadas en la región extremeña y el 3,7% de la media nacional. Estos datos obtenidos del Estudio del impacto económico de la agricultura eficiente en las zonas rurales como medida eficaz ante el reto demográfico ponen en evidencia la importancia económica de la agricultura.

No obstante, la agricultura tradicional no es una actividad sostenible, pues requiere grandes superficies para el cultivo (Popp et al., 2017) y consume enormes cantidades de agua dulce (Siebert et al., 2010). A ello se suma que, cada vez más zonas forestales se destinan a usos agrícolas (Steffen et al., 2015) y el incremento de la rentabilidad de los cultivos implica una utilización desorbitada de fertilizantes químicos, de los cuales una gran parte no se absorbe por la planta, sino que alcanza las aguas subterráneas y se distribuye por el agua marina afectando a toda la cadena trófica (Schmer et al., 2014).

Como resultado de la realización abusiva de estas prácticas se produce una reducción de la biodiversidad microbiana presente en el suelo (Li et al., 2019), convirtiéndose en suelos con baja diversidad y bajo contenido de materia orgánica que presentan mayor susceptibilidad a enfermedades, plagas y deficiencias nutricionales (Shi et al., 2021). Esta influencia de la calidad biológica sobre la salud y productividad se representa en la Figura 1.

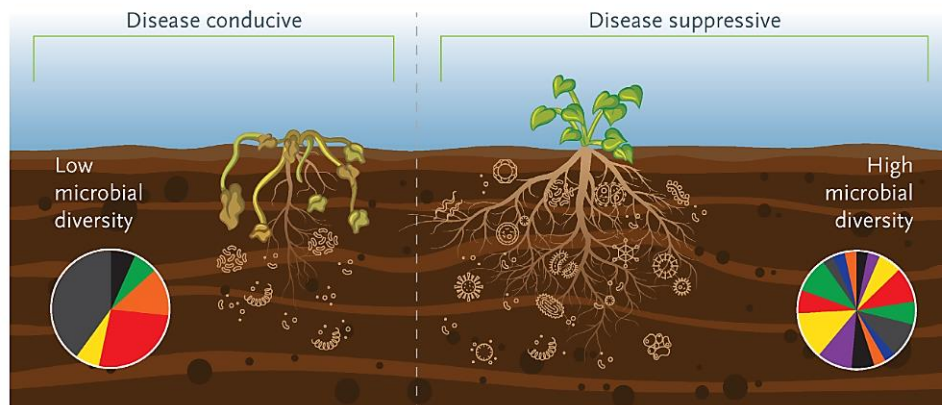


Figura 1. Representación de suelos con diferente grado de riqueza biológica. Se muestra un suelo con baja diversidad y poco contenido en materia orgánica denominado conducivo o susceptible (izquierda) y un suelo con alta diversidad y alto contenido en materia orgánica denominado supresivo (derecha). Las secciones de los círculos presentes en el gráfico indican las diferentes poblaciones de microorganismos presentes (Shi et al., 2021).

Por otra parte, el impacto del cambio climático está afectando gravemente en la producción de los cultivos a causa de su influencia sobre los factores bióticos (como microbios beneficiosos del suelo, plagas de insectos, microorganismos patógenos o malezas) y los factores abióticos (como la sequía o el estrés térmico) (Shahzad et al., 2021).

Por ello, un reto primordial es la búsqueda de herramientas biotecnológicas que permitan alcanzar un buen rendimiento agrícola. Arrojando luz frente a este desafío, numerosos estudios sobre microorganismos asociados a plantas están demostrando la enorme importancia de la rizosfera, compartimento del suelo influenciado por las raíces de las plantas para el adecuado crecimiento de las especies vegetales (Hiltner, 1904).

2. Beneficios de las poblaciones microbianas sobre las plantas

Dentro de los microorganismos que habitan en la rizosfera, destacan las bacterias rizosféricas estimuladoras del crecimiento de la planta, conocidas desde hace tiempo por su acrónimo PGPR procedente de su denominación inglesa como *plant growth-promoting rhizobacteria* (Kloepper et al., 1992).

Entre los diversos beneficios que suponen las PGPR para el cultivo vegetal bien recogidos en los trabajos de Bulgarelli et al. (2013), se incluye la fijación biológica del nitrógeno gracias a la actividad microbiana, elemento mineral esencial y necesario en mayor cantidad para el crecimiento vegetal o la solubilización del fósforo favoreciendo la disponibilidad de este microelemento que contribuye significativamente al crecimiento vegetal.

También estudiaron la biosíntesis de la fitohormona auxina en determinadas rutas microbianas que, bajo determinadas condiciones, activa rutas de señalización que promueven la formación de nuevas raíces laterales. Asimismo, algunos microorganismos interfieren con la síntesis del etileno que puede tener efecto inhibitorio sobre el crecimiento de tallos y raíces, especialmente en condiciones de estrés, por lo que aumenta el crecimiento de la planta. Por otra parte, los microorganismos pueden sintetizar una amplia gama de compuestos con actividad antimicrobiana, presentando claros beneficios para la planta en presencia de patógenos. Además, se ha comprobado que es posible promover una resistencia sistémica inducida (RIS o ISR por las siglas derivadas de su nombre en inglés) frente a un amplio espectro de organismos patógenos mediante la inoculación de plantas con bacterias no patógenas. Gracias a esta inducción, las plantas están preparadas para reaccionar más rápida y fuertemente a un ataque patógeno. En este sentido, se podrían utilizar los microorganismos como agentes de biocontrol.

Las interacciones beneficiosas mencionadas entre las plantas y los microorganismos se esquematizan en la Figura 2 mostrada a continuación.

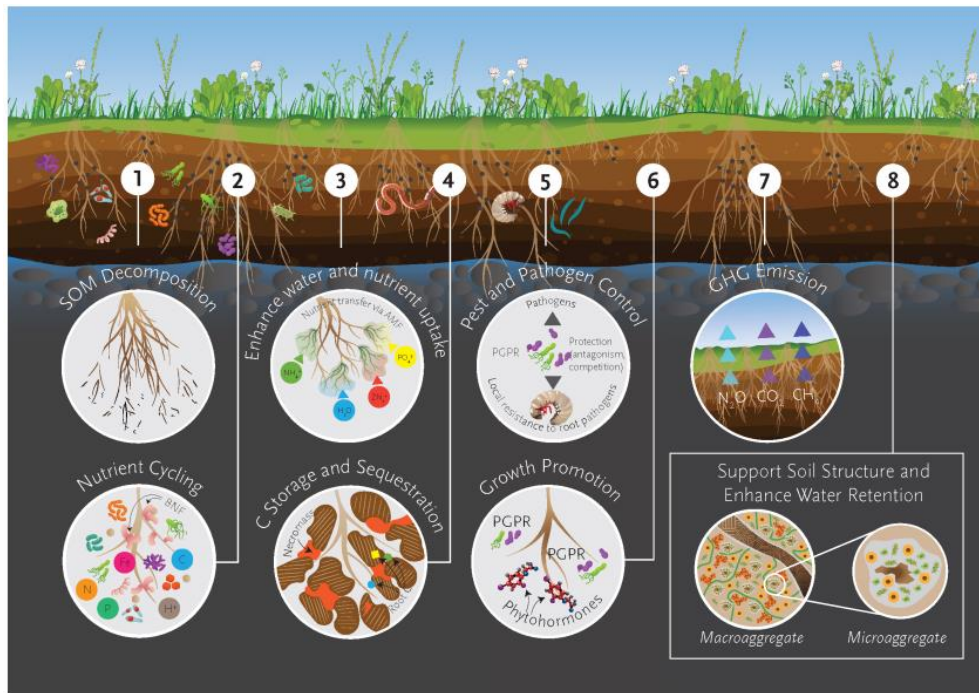


Figura 2. Visión general de la influencia, directa o indirectamente, del microbioma del suelo sobre la resistencia de las plantas al estrés abiótico y biótico. Entre ellas se incluyen la descomposición de restos radicales y materia orgánica del suelo (SOM) (1), el ciclo de los nutrientes en el suelo (2), incluida la fijación del N y la solubilización del P (3), almacenamiento y secuestro de C (4), control de plagas y patógenos de las plantas huésped (5), fomento del crecimiento de las plantas mediante la secreción de fitohormonas (6), emisión de gases de efecto invernadero (GEI) a través de actividades microbianas (7) o la creación de agregados para la estructura del suelo y la retención de agua (8). Esquema extraído de Shi et al. (2021).

En base a lo comentado, queda claramente expuesta la relevancia y potencial de los microorganismos para conseguir llevar a cabo una sostenible gestión agrónoma de los cultivos (Berg et al., 2014).

El aumento y actividad microbiana en la rizosfera se debe a la liberación de grandes cantidades de carbono orgánico por las raíces de las plantas, así como los carbohidratos e incluso aminoácidos exudados que actúan como determinantes químicos generales en la rizosfera (Bakker et al., 2013). Además, también se ha descrito más recientemente que los metabolitos secundarios de la planta son impulsores clave del desarrollo de comunidades microbianas específicas de la rizosfera (Weston & Mathesius, 2013).

Esta comunidad bacteriana presente en la rizosfera se recluta del principal depósito de microorganismos presentes en el suelo, por lo que el suelo es un interesante sujeto de estudio (Bakker et al., 2013).

3. Estudio molecular de los microorganismos del suelo

El estudio molecular de los microorganismos permite encontrar genes y funciones desconocidas, realizar reconstrucciones del genoma de bacterias y arqueas no cultivadas para descubrir las trayectorias evolutivas de los eucariotas y ancestrales o recuperar genomas desarrollando análisis metagenómicos a gran escala (Nayfach et al., 2021). Ello pone de manifiesto el gran potencial de esta técnica para el descubrimiento de genes, funciones o metabolitos de interés.

En este sentido, la metagenómica de las poblaciones microbianas del suelo abre nuevos caminos en el descubrimiento de tecnologías de origen biológico para infinidad de aplicaciones en agrobiotecnología, como puede ser la optimización de los cultivos agrícolas y su resistencia al cambio climático (Berg et al., 2014).

Para poder estudiar los microorganismos de un entorno determinado se recurre a métodos empleados para la identificación de microorganismos (Rolf, 2005). Dentro de ellos, se pueden diferenciar las técnicas dependientes de cultivo, cuya finalidad es el estudio de la morfología, el metabolismo y la composición química de los microorganismos, o bien en técnicas independientes de cultivo si su objetivo es el estudio del material genético (DNA y RNA) de los microorganismos.

Tradicionalmente, se ha realizado el cultivo y aislamiento de microorganismos para su posterior estudio (Nayfach et al., 2021), aunque solamente entre el 0.1 y 1.0% de las bacterias del suelo son cultivables por métodos de cultivo estándar (Rolf, 2005). En consecuencia, estas técnicas limitan el estudio de la diversidad de las comunidades microbianas del suelo.

Actualmente, debido a los inconvenientes de las técnicas dependientes de cultivo y gracias al descubrimiento de la PCR junto con los avances en las tecnologías de secuenciación y el análisis de datos, se están propiciando los estudios del microbioma a través de técnicas independientes de cultivo (Knight et al., 2018).

Recientemente, para el análisis de la diversidad genética se están perfeccionando las modernas ciencias ómicas, que permiten estudiar la totalidad o el conjunto de moléculas presentes en una muestra, así como las relaciones entre ellas (Nayfach et al., 2021).

Dentro de la clasificación de ómicas, se encuentran la metagenómica que trabaja a nivel del ADN, la metatranscriptómica que analiza a nivel del ARN, la metaproteómica que estudia a nivel de proteína y la metabolómica que examina a nivel de metabolitos. La técnica desarrollada en este trabajo es la metagenómica, cuya finalidad es la aplicación de técnicas genómicas modernas para el estudio directo del genoma de comunidades de microorganismos en su entorno natural, diferenciándose así de la genómica que estudia el material genético individualmente.

El suelo es probablemente el entorno natural más desafiante para el estudio de los microorganismos debido al gran tamaño de la comunidad microbiana y la diversidad de especies presentes (Rolf, 2005). Derivado de esta gran riqueza biológica, es posible descubrir gran cantidad de genes, funciones o productos de enorme interés biotecnológico.

La extrema heterogeneidad espacial, la naturaleza multifásica (gases, agua y material sólido) y las complejas propiedades químicas y biológicas del suelo parecen contribuir a la diversidad microbiana (Rolf, 2005). Por consiguiente, el estudio del microbioma de suelos con diferentes cultivos agrónomos puede permitir establecer relaciones entre las características de dicho suelo y las bacterias identificadas en los mismos, pudiendo incluso identificar géneros bacterianos que potencien el desarrollo de la especie vegetal cultivada en el suelo de interés.

El ADN microbiano aislado de una muestra de suelo se considera que representa el ADN de todos los microorganismos autóctonos del suelo y se denomina metagenoma del suelo (Rondon et al., 1999).

4. Procedimiento del estudio metagenómico

Llevar a cabo un experimento riguroso en la investigación del microbioma es una tarea compleja, puesto que los resultados pueden verse afectados por los métodos experimentales, los factores ambientales y los métodos de análisis (Knight et al., 2018). A pesar de que el efecto de estas variables aún está en estudio en este campo, con las prácticas actuales se pueden obtener resultados concluyentes.

A tales efectos, un paso previo de gran relevancia es diseñar los experimentos con procedimientos rigurosos para que generen datos significativos (Quince et al., 2017).

Recogida de muestras

El estudio metagenómico de las poblaciones bacterianas se inicia con la recolección del suelo sujeto de estudio. Para la conservación de muestras ambientales en la duración del estudio, deben mantenerse a -80°C siempre que sea posible (Knight et al., 2018). A su vez, el número de ciclos de congelación y descongelación de una muestra pueden afectar a los perfiles de la comunidad microbiana (Quince et al., 2017).

Extracción de ADN

El siguiente paso es la extracción del ADN de cada muestra. Un factor a tener en cuenta es que, como las poblaciones microbianas son grandes, los volúmenes de las muestras de estudio pueden ser pequeños (Rolf, 2005).

No obstante, debido a la heterogeneidad de los suelos, el grado de diversidad microbiana y la adherencia de los microorganismos a las partículas, la extracción es especialmente difícil (Tebbe & Vahjen, 1993).

La extracción del material genético se puede realizar por lisis directa de las células contenidas en la matriz de la muestra, seguida de la separación del ADN de la matriz y de los restos celulares (Ogram et al., 1987) o por separación de las células de la matriz del suelo continuada de lisis celular (Holben et al., 1988). A pesar de que los diferentes métodos de extracción podrían interferir en la cantidad de ADN aislado en función de la susceptibilidad de cada microorganismo, no hay estudios que analizaran exhaustivamente estas diferencias, y generalmente, se suele aislar el ADN mediante lisis directa. Esto se debe a que los microorganismos adheridos a las partículas también se lisan por la ausencia de una separación previa de los mismos, por lo que se considera que este método representa mejor la diversidad microbiana de una muestra de suelo (Leff et al., 1995).

Sin embargo, los métodos de extracción de ADN basados en la separación celular, aunque son menos eficientes en cuanto a cantidad de ADN recuperado, también son menos agresivos (Rolf, 2005).

A su vez, la extracción del ADN por lisis mecánica, a menudo, es considerada superior que la extracción utilizando lisis química (Quince et al., 2017).

Seguidamente, durante la propia extracción, el ADN bruto recuperado es purificado con procedimientos estándar (Rolf, 2005).

Construcción de bibliotecas de ADN del suelo

La construcción de bibliotecas con el ADN de una muestra de suelo se fundamenta en los métodos de clonación del ADN genómico de microorganismos individuales, de tal forma que implica la fragmentación del ADN del suelo, la inserción de estos fragmentos de ADN en un vector de clonación adecuado y la transformación de un huésped apropiado con los vectores recombinantes, cuyos pasos son bien descritos en la revisión de Rolf (2005) y se esquematizan en la figura 3.

La elección del método de preparación y secuenciación de la biblioteca se basa en la disponibilidad de materiales y servicios, costo, facilidad de automatización y cuantificación de muestras de ADN (Quince et al., 2017).

Las bibliotecas generadas se pueden clasificar, respecto al tamaño medio de inserción, en bibliotecas de inserción pequeña como vectores plásmidos (menos de 15 kb) y bibliotecas de inserción grande como cósmidos o fásmidos (ambos hasta 40 kb) o vectores BAC o cromosoma artificial bacteriano (más de 40 kb). Seguidamente, estos vectores de interés son introducidos en las células del huésped siendo el huésped por excelencia *Escherichia coli*.

Pese a que la generación de bibliotecas de suelo es conceptualmente simple, el tamaño del metagenoma del suelo y el gran número de clones que se requieren para una cobertura completa provocan una cierta dificultad en la construcción de las bibliotecas.

La clonación facilita la identificación de la función de los genes secuenciados y presenta la ventaja de que facilita la secuenciación del ADN que rodea a estos genes.

Sin embargo, solamente para recuperar genes conservados de diferentes hábitats del suelo por PCR, la construcción de bibliotecas no es un requisito previo.

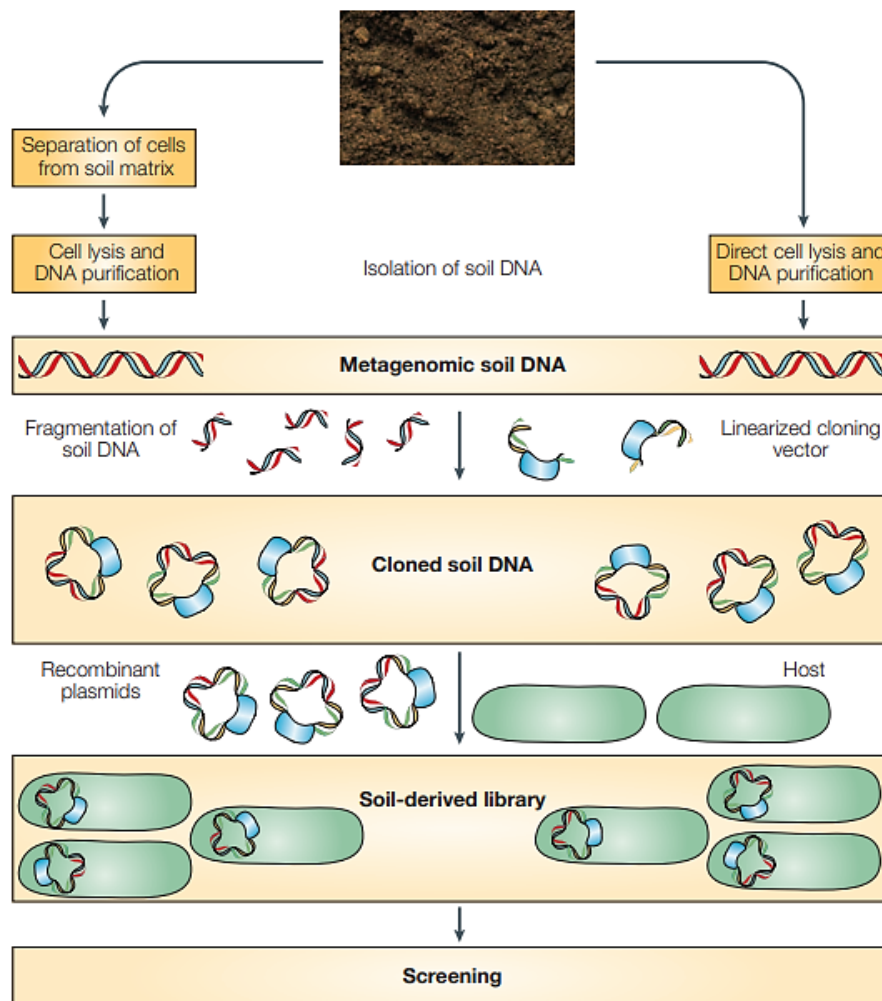


Figura 3. Esquema del procedimiento de un análisis metagenómico de ADN de suelo. La representación gráfica ha sido extraída de Rolf, (2005).

Análisis metagenómico

Una vez aislado o clonado el material genético de interés, se procede a la elección de la tecnología de análisis genómico a nivel molecular que permite identificar los microorganismos presentes en la muestra.

Como la complejidad del metagenoma del suelo es elevada se requieren técnicas moleculares sensibles y de alto rendimiento que implican un grado de dificultad considerable, como la secuenciación masiva. El cribado o screening de los elementos biológicos presentes en una muestra puede basarse en la actividad metabólica o en la secuencia de nucleótidos (Rolf, 2005).

Alternativamente, en el caso de la evaluación de las muestras de suelo, se utiliza principalmente la PCR, técnica *in vitro* de detección directa sobre la muestra fundamentada en la amplificación enzimática de una región específica de ácido desoxirribonucleótido (Mullis & Faloona, 1987). La secuencia de nucleótidos de interés está comprendida entre dos cebadores diseñados específicamente para un determinado microorganismo (Rolf, 2005).

Otra opción, aunque menos empleada, es la hibridación con sondas específicas de diana (Knietsch et al., 2003).

Por ende, no se analiza el genoma completo, sino que se estudia una porción del genoma de los microorganismos. Ambos métodos requieren el uso de cebadores y sondas adecuadas de regiones de genes y productos génicos conocidos, por lo que su aplicabilidad se limita a la identificación de especies conocidas o nuevos miembros de familias genéticas conocidas. No obstante, esta amplificación es un método menos costoso, bien probado, rápido y rentable para obtener una visión de baja resolución de una comunidad microbiana (Knight et al., 2018).

Para completar el estudio, tras la amplificación por PCR, se procede a realizar una secuenciación con posterior análisis de secuencias hasta conseguir perfilar la taxonomía, características funcionales y genómicas del microbioma, dependiendo de la finalidad perseguida en cada experiencia. Finalmente, se ejecuta un análisis estadístico y biológico posterior al proceso hasta determinar una validación.

Un término frecuente en los estudios bioinformáticos de metagenómica es la unidad taxonómica operativa con acrónimo UTO, también conocida por sus siglas en inglés OTU (*Operational Taxonomic Unit*), que es la unidad de clasificación seleccionada por el investigador para analizar el objeto de estudio. Las OTU se corresponden con secuencias similares, normalmente con un umbral de similitud del 97%, que se agrupan mediante herramientas bioinformáticas para asignar cada OTU a una entidad taxonómica en los diferentes niveles taxonómicos por comparación de las mismas en referencia a una base de datos conocidos (Knight et al., 2018).

Es importante destacar que la mayoría de los estudios metagenómicos son transversales, por lo que no presentan capacidad para evaluar la variabilidad temporal del microbioma. Por el contrario, los estudios longitudinales no se basan en los

resultados de una sola muestra que podría ser un valor atípico no representativo. Por tanto, para confirmar la veracidad de resultados es necesario recoger medidas continuas o repetidas durante un período prolongado de tiempo a través de estudios longitudinales (Quince et al., 2017).

OBJETIVOS

El objetivo general del presente Trabajo Fin de Grado es la optimización del estudio metagenómico sobre las poblaciones microbianas presentes en diferentes suelos de cultivo agrícola, identificando especies de bacterias que puedan tener una potencial aplicación para mejorar la productividad agraria.

Para poder alcanzar este objetivo, se persiguen los siguientes objetivos específicos:

- ⇒ Testado de la metodología de extracción de ADN bacteriano de distintas muestras de suelos de un cultivo de cebolla, de almendro y de encina. Los procedimientos de aislamiento del ADN analizados son un protocolo diseñado por la empresa colaboradora y un kit comercial preparado para la extracción de material genético de suelo.
- ⇒ Evaluación de cada método de extracción a través del análisis de la cantidad y calidad del ADN extraído.
- ⇒ Diseño de cebadores frente a bacterias de interés para una posterior amplificación por PCR.
- ⇒ Detección e identificación de especies bacterianas específicas en las muestras de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras analizadas fueron recogidas por la empresa Pesquero Verde Alto en suelo ubicado en Extremadura y procedente de tres tipos de cultivo agrícola. Más concretamente, se trabaja con 4 muestras de diferentes explotaciones de cebolla (designadas numéricamente como 9, 10, 11 y 12), 4 muestras de diferentes explotaciones de almendro (designadas numéricamente como 19, 20, 21 y 22) y 2 muestras de diferentes explotaciones de encina (designadas numéricamente como 35 y 36). Tras su recolección, se almacenan en congelación a -20°C.

1. Extracción de ADN bacteriano de material del suelo

En este trabajo se evalúa la extracción del ADN mediante un protocolo de extracción diseñado por la empresa colaboradora Pesquero Verde Alto, cuyo procedimiento detallado se describe a continuación y a través del producto comercial “E.N.Z.A Soil DNA Kit” de Omega Biotek de acuerdo con las instrucciones del fabricante comentadas brevemente.

1.1. Extracción con protocolo diseñado por Pesquero Verde Alto

Previamente a la extracción, se prepara la solución tampón CTAB que se va a emplear. Para ello, se añaden 200 µL de CTAB 10%, detergente para desestabilizar las membranas que impiden acceder al material genético; 100 µL de Tris 1M, tampón biológico para mantener el pH constante; 400 µL de NaCl 5M, sales que aumentan el poder iónico de la solución y favorecen la precipitación del material genético; 50 µL de

EDTA 0,5 M, agente quelante de iones metálicos como Ca^{2+} y Mg^{2+} para inhibir la acción de las nucleasas al no haber cofactores libres para su actividad protegiendo al ADN; 5 μL de espermidina 10%, poliamina de carácter policatiónico que se une con las moléculas de DNA de carga negativa facilitando su precipitación y 245 μL de agua libre de nucleasas. Sobre la mezcla anterior, se añaden 30 mg de PVP40 calentando en un baño hasta 65 °C para alcanzar la solubilidad del mismo, favoreciendo así la eliminación de los polifenoles de origen vegetal con este quelante.

Para iniciar la extracción se pesan entre 200 mg y 300 mg de tierra en la balanza y se llevan a un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Las cantidades exactas de tierra tomada de cada muestra se exponen en la Tabla 1.

Procedencia de la tierra	Número de muestra	Cantidad de tierra (mg)
Cebolla	9	290,7
Cebolla	10	261,5
Cebolla	11	276,4
Cebolla	12	287,7
Almendro	19	289,9
Almendro	20	265,9
Almendro	21	287,4
Almendro	22	291,7
Encina	35	294,5
Encina	36	289,3

Tabla 1. Cantidad de tierra con la que se realiza la extracción de ADN con el protocolo diseñado por Pesquero Verde Alto. En la izquierda se indica el cultivo agrícola existente donde se recogen las muestras, seguidamente se determina el número de muestra y a la derecha la cantidad de tierra pesada de cada muestra.

Sobre cada muestra contenida en un tubo se añaden 750 μL de tampón CTAB, solución de lisis para la extracción de ADN. Seguidamente, se tritura con un micromotero para lisar la muestra. Una vez lisada, se incorporan 250 μL de tampón CTAB alcanzando así un total de 1 mL de CTAB utilizado por muestra y 10 μL de β -Mercaptoetanol que favorece la desnaturalización. Luego, se somete a un pulso de agitador vórtex durante 1 min para homogeneizar el contenido.

A continuación, la mezcla se incuba a 65°C durante 10 min para provocar la desnaturalización proteica, intercalando una agitación con vórtex cada 3 minutos. Tras la incubación, se centrifuga la muestra a 13000 rpm durante 10 minutos para conseguir que los componentes celulares sin interés se depositen en el fondo del tubo Eppendorf. Seguidamente, se recoge el sobrenadante (que será un volumen de aproximadamente 700 µL) y se transfiere a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL. Sobre el precipitado se añade la misma cantidad del volumen sobrenadante recolectado de cloroformo - alcohol isoamílico (en proporción 24:1) y se somete a un pulso vórtex. El contenido del tubo se centrifuga durante 10 minutos a 13000 rpm recogiendo las proteínas desnaturalizadas en la fase orgánica más densa o en la interfase mientras que los ácidos nucleicos permanecen en la fase acuosa, alcanzando así una purificación de ácidos nucleicos. Después, se recoge la capa acuosa superior sin tocar la interfase y el volumen recuperado se lleva a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL. La misma cantidad de volumen recogido se añade de isopropanol y se mezcla con el agitador vórtex.

Posteriormente, se incuba durante 20 minutos a 20°C, seguido de otros 20 minutos a una temperatura de -20°C. Pasado este tiempo, se realiza una centrifugación durante 15 minutos a 14000 rpm. Gracias a este paso, se separa el ADN de la fase acuosa por precipitación, usando un alcohol selectivo en la precipitación del ADN en presencia de ARN.

Cuando finaliza la precipitación, se descarta el sobrenadante y se añaden 500 µL de etanol 80% preparado en fresco durante la extracción para concentrar la muestra y se aplica un vórtex para mezclar. Esta mezcla se centrifuga a 8000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se descarta el máximo sobrenadante posible y se deja secar completamente el precipitado hasta eliminar la totalidad del etanol.

Por último, se resuspende en 40 µL de una solución de 50 µg/mL de ARNasa, enzima que permite la eliminación del ARN que, en este caso, no resulta de interés.

1.2. Extracción con “E.N.Z.A Soil DNA Kit”

El kit de extracción proporciona unas perlas de vidrio en un tubo disruptor que deben ser transferidas a un tubo de centrifuga de 15 mL. Sobre este tubo se añaden entre 250 mg y 300 mg de tierra pesados en la balanza previamente y 1 mL de tampón

SLX-Mlus. Las cantidades precisas de tierra utilizada de cada muestra se especifican en la Tabla 2.

Procedencia de la tierra	Número de muestra	Cantidad de tierra (mg)
Cebolla	9*	299,2
Encina	36*	299,6

*Tabla 2. Cantidad de tierra con la que se realiza la extracción de ADN con el protocolo de “E.N.Z.A Soil DNA Kit”. Se indica el cultivo agrícola existente donde se recogen las muestras, el número de muestra y la cantidad de tierra pesada de cada muestra. El * indica que son muestras cuyo ADN ha sido extraído con el kit.*

El tubo se lleva al mezclador vórtex durante un tiempo de 3-5 minutos a máxima velocidad para lisar la muestra. Seguidamente, se añaden 100 μ L de tampón DS y se homogeniza con el resto del contenido del tubo aplicando un pulso de vórtex. Este tubo se somete primeramente a una incubación de 10 minutos a 70°C con agitación leve y luego se centrifuga a temperatura ambiente durante 3 minutos a 3000 rpm.

Posteriormente, se transfieren 800 μ L de sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 mL. Sobre este volumen se añaden 270 μ L de tampón P2 enfriado en hielo y se homogeniza el contenido con el agitador vórtex. A continuación, se deja reposar en hielo durante 5 minutos para después centrifugar durante otros 5 minutos a máxima velocidad. Tras la centrifugación, el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 mL. En este mismo tubo, se añaden 0,7 volúmenes de isopropanol al 100% y se mezcla su contenido invirtiendo el tubo de 20 a 30 veces.

Cuando la muestra contenga poco ADN es recomendable incubar la muestra durante 1 hora a -20°C. En este caso, se realiza también este paso y cuando termina la incubación, se centrifuga a máxima velocidad durante 10 minutos. El sobrenadante separado del sedimento debe ser retirado y desechado prestando especial atención a no tocar el sedimento de ADN. El sedimento debe secarse invirtiendo el tubo durante 1 minutos sobre papel absorbente.

Después, se agregan 200 μ L de tampón de elución y se mezcla con el agitador tipo vórtex. Seguidamente, la muestra se somete a una incubación a una temperatura de 70°C durante un tiempo de 15 minutos para disolver el ADN sedimentado. Sobre

el material genético diluido se adicionan 100 μ L de reactivo cHTR y se agita en el mezclador. La mezcla se deja reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos para luego llevarla a centrifugación durante 2 minutos a máxima velocidad.

El sobrenadante obtenido se transfiere a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 mL. Si el sobrenadante todavía tiene un color oscuro tras la centrifugación anterior, se repite la adicción de 100 μ L de reactivo cHTR con posterior reposo y centrifugación.

En el sobrenadante separado se añade un volumen igual de tampón XP1 y se mezcla con el agitador vórtex. El contenido del tubo se incorpora en una microcolumna de ADN HiBind en un tubo de recogida de 2 mL. La columna se centrifuga a 10.000 g durante 1 minuto y el filtrado se desecha.

Sobre la microcolumna depositada en el tubo de recolección utilizado anteriormente se añaden 500 μ L de tampón HBC diluido con isopropanol al 100% y se centrifuga a 10.000 g durante 1 minuto. El tubo de recolección y el filtrado recogido en dicho tubo son desechados. De seguido, la microcolumna de ADN HiBind se deposita sobre un nuevo tubo de recogida de 2 mL. Sobre la microcolumna se agregan 700 μ L de tampón de lavado de ADN diluido con etanol 100% y se centrifuga a 10.000 g durante 1 minuto. El filtrado recogido se desecha y el tubo de recolección se reutiliza para someter la microcolumna vacía a máxima velocidad durante 2 minutos, paso fundamental para eliminar el etanol residual que pueda interferir con pasos posteriores.

La microcolumna libre de etanol se transfiere a un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 mL y se añaden 90 μ L de tampón de elución previamente calentado a 70°C directamente sobre el centro de la microcolumna. Se deja reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos y se centrifuga a máxima velocidad durante 1 minuto.

El volumen filtrado en el paso anterior se vuelve a añadir en el centro de la microcolumna para dejarlo reposar durante 1 minuto y, posteriormente, someterlo a una centrifugación a máxima velocidad durante 1 minuto. Gracias a estos pasos, el ADN retenido en la columna es eludido completamente por el tampón de elución y el filtrado contiene el ADN, por lo que debe conservarse en congelación.

2. Cuantificación de la extracción de ADN

Como se desconocen los rendimientos de los métodos de extracción de ADN utilizados en las muestras de estudio es interesante realizar una confirmación de la presencia de ADN. Para ello, se efectúa una medida de concentración y pureza del ADN de las muestras en el espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop.

El espectrofotómetro utilizado es UV-Vis NanoDrop ND-1000 de la marca Thermo Fisher Scientific, cuya función es medir la absorbancia de la muestra en el ultravioleta a 260 nm, longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos y a 280 nm, longitud de onda a la que absorben las proteínas. Por tanto, la ratio 260/280 proporciona una valoración de la cantidad de proteína frente a ADN presente y la ratio 260/230 permite estimar la existencia de impurezas.

Antes de iniciar la cuantificación del ADN de las muestras es necesario realizar una limpieza de la superficie de medición, depositando 2 μ L de una disolución de limpieza y secando cuidadosamente con un papel absorbente. Seguidamente, para una correcta medida, se realiza un blanco añadiendo 2 μ L del tampón de elución o, en caso de no poder disponer del mismo, se puede emplear agua destilada, con posterior secado. A continuación, se agregan 2 μ L de cada muestra en el detector y se realiza la cuantificación de la concentración y pureza del ADN presente en cada muestra.

3. Absorción colorimétrica

Paralelamente, se realiza una medición de la absorbancia de las muestras en el espectro visible bajo el ojo humano para detectar la presencia de contaminantes en la muestra que puedan interferir con la medida del NanoDrop.

El lector de microplaca empleado es el modelo INFINITE F50 de la marca TECAN, que proporciona la medida de absorbancia de las muestras incluidas en una placa con múltiples pocillos.

La adecuada medición de absorbancia requiere la preparación de diluciones de cada muestra. En este caso, se trabaja con diluciones 1:20, por lo que se toman 10

μL de muestra y se mezclan con 190 μL de agua. Finalmente, las diluciones se depositan sobre una placa de 96 pocillos.

Las mediciones se han realizado en el espectro visible bajo límites de longitud de onda de 405 nm, 450 nm, 570 nm y 620 nm.

4. Detección electroforética de ADN genómico

La electroforesis en gel consigue la separación de las moléculas de ADN dependiendo de su tamaño y permite la observación directa de los fragmentos separados, por lo que se emplea para comprobar la presencia de ADN genómico en la muestra. El sistema de electroforesis horizontal de agarosa utilizado es de la marca BIO-RAD Laboratories.

El primer paso para poder realizar una electroforesis es la preparación del gel y el tampón de carga. Para ello, se prepara un volumen suficiente de tampón TAE 1X a partir de TAE 50X.

De esta preparación, se toma un volumen de 150 mL para preparar el gel mediano de electroforesis y se llevan a un matraz. El gel de agarosa debe estar a una concentración de 0,8%, por lo que es necesario añadir 1,2 g de agarosa pesados previamente en una balanza. Para que la agarosa se disuelva es necesario calentar la mezcla en un microondas hasta que la disolución se vuelve completamente transparente. Después, se añaden 8 μL de *green safe*, un colorante no tóxico que provoca la tinción de ácidos nucleicos para su visualización bajo luz ultravioleta.

Seguidamente, se deposita la mezcla sobre un recipiente molde que aporta forma al gel, cuyos extremos han sido tapados con cinta adhesiva previamente. Este recipiente presenta unas hendiduras donde se coloca el peine, cuya función es crear unas cavidades que serán los pocillos donde se introducirá la muestra. El gel se deja solidificar en oscuridad el tiempo necesario dependiendo de la temperatura ambiente.

Cuando enfría el gel se retiran tanto el peine de 20 pocillos como los adhesivos y el recipiente se introduce en la cubeta de electroforesis. Como el ADN tiene carga negativa es importante colocar los pocillos próximos al polo negativo, de tal forma que se desplacen hacia el polo positivo durante la carrera electroforética.

El interior de la cubeta se llena con 675 mL del tampón TAE 1X preparado previamente y se añaden 40 µL de *green safe* debido a que mejora la visualización del gel posteriormente.

Finalmente, se carga el gel con 5 µL del marcador para extracción de ADN genómico *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* de la casa comercial Thermo Fisher Scientific en los pocillos de los extremos entre los que se encuentran los pocillos centrales con las muestras. Cada pocillo contiene 20 µL de muestra y 3,3 µL de tampón de carga. A continuación, se tapa la cubeta y se conecta con la fuente de alimentación siendo las condiciones de carrera de 1 hora a 80 V.

Por último, se visualiza y fotografía el gel digitalmente mediante el documentador de geles INVITROGEN iBright CL1000 de la marca Thermo Fisher Scientific.

Como los resultados de concentración de ADN manifiestan grandes diferencias entre las muestras, se prepararon diluciones de las muestras para que la cantidad de ADN total en cada pocillo del gel de electroforesis fueran 400 ng de ADN en base a los datos proporcionados por el NanoDrop. Las composiciones de las diluciones se exponen a continuación en la Tabla 3.

Número de muestra	Volumen de muestra (µL)	Volumen de agua (µL)
9	20	0
9*	20	0
10	4,3	15,7
11	20	0
12	2,8	17,2
19	4,1	15,9
20	6,7	13,3
21	6	14
22	4,2	15,8
36	0,6	19,4
36*	20	0

Tabla 3. Preparación de diluciones con 400 ng de ADN totales. Se muestra el volumen tomado de cada muestra y volumen de agua añadido para preparar la dilución. El * indica que son muestras cuyo ADN ha sido extraído con el kit.

En los casos donde la concentración fuera insuficiente para alcanzar unos 400 ng, se introducen directamente 20 μL de la muestra. En cuanto a la muestra número 35, ausente en la Tabla 3, la medida de concentración de ADN proporcionada por el NanoDrop es tan elevada que habría que pipetear solamente 0,2 μL , aunque para evitar trabajar con volúmenes tan pequeños se prepara una dilución 1:10 adicional. De esta dilución, se toman 2,1 μL y se añaden 17,9 μL de agua para conseguir un volumen total final de 20 μL que serán empleados en la electroforesis. A su vez, teniendo en cuenta que la medida de concentración registrada puede no ser apropiada, se carga también en el gel otro volumen de 20 μL , de los cuales 3 μL proceden de la muestra obtenida tras la extracción y 17 μL de agua.

5. Diseño de cebadores para PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una reacción enzimática que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos. La técnica se fundamenta en la actividad de la enzima ADN polimerasa, la cual sintetiza el ADN.

Gracias a esta síntesis reiterada del ADN molde de interés es posible detectar la presencia de los productos de PCR en un análisis posterior de electroforesis.

El punto de partida para poder llevar a cabo una PCR es el diseño de los cebadores, también conocidos como primers. Los cebadores son secuencias sintéticas cortas de ADN de cadena sencilla que se unen a una secuencia diana de ADN y permiten la incorporación de los dNTP que componen el ADN gracias a la actividad de la polimerasa.

Debido al desconocimiento de las posibles comunidades bacterianas presentes en los suelos donde fueron extraídas las muestras se optó por orientarse en investigaciones metagenómicas publicadas en muestras de suelos similares.

El objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado es identificar especies de bacterias, no obstante, la mayoría de las investigaciones acerca de las comunidades bacterianas de suelo aún están en auge y, principalmente, los estudios solamente alcanzan hasta el nivel de género bacteriano.

Consecuentemente, por la similitud climatológica de las regiones estudiadas, se escogieron algunos de los géneros identificados en los estudios de Miralles et al. (2020)¹⁸ sobre la comunidad bacteriana de suelos de ecosistemas mediterráneos semiáridos.

Seguidamente, en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) se buscaron especies de bacterias pertenecientes a dichos géneros, cuyo genoma completo o, al menos, una parte, fueran conocidos. Como se ha comentado previamente, para poder utilizar como método de identificación la PCR es fundamental conocer la secuencia de ADN de las bacterias de interés, con el objetivo de poder diseñar primers específicos que permitan asegurar la presencia de esas bacterias en la muestra de estudio.

La clasificación en categorías taxonómicas de las bacterias de interés en este trabajo se expone en la Tabla 4.

Clase	Orden	Familia	Género	Especie
<i>Chitinophagia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Niabella</i>	<i>Niabella soli</i>
<i>Terriglobia</i>	<i>Terriglobales</i>	<i>Acidobacteriaceae</i>	<i>Bryocella</i>	<i>Bryocella elongata</i>
<i>Cytophagia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Hymenobacteraceae</i>	<i>Pontibacter</i>	<i>Pontibacter populi</i>
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Hyphomicrobiales</i>	<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Microvirga</i>	<i>Microvirga subterranea</i>

Tabla 4. Clasificación taxonómica de las bacterias de interés. Se indica clase, orden, familia, género y especie ordenadamente de izquierda a derecha.

Una vez seleccionadas las especies bacterianas de interés, es preciso diseñar cebadores de gran especificidad y calidad que puedan ser utilizados en la PCR y aseguren la presencia de la bacteria en la muestra frente a un resultado positivo de amplificación del ADN molde. Para ello, se emplea la herramienta bioinformática en línea Primer-BLAST.

En la entrada principal de esta herramienta se encuentran varios parámetros que deben determinarse para que Primer-BLAST pueda encontrar cebadores potenciales frente a las secuencias deseadas acorde a las condiciones de trabajo de PCR que se van a emplear.

Dentro del apartado *PCR Template*, hay que introducir la secuencia de referencia para la que se desean diseñar primers que permitan confirmar su presencia en una muestra. En esta experiencia se utilizan secuencias de ADN bacteriano que se buscaron en la base de datos NCBI. Para cada una de las bacterias de interés se han diseñado un par de primers frente a genes localizados en la región del ADN ribosomal 16S y otro par de primers frente a ADN codificante para proteínas únicas de la especie. En este mismo apartado, si las secuencias son muy grandes, se podría indicar el número de nucleótido sobre el que se desea que se localice el primer.

En la sección de *Primer Parameters*, hay que limitar el tamaño del producto de PCR. En este caso, se desea que el tamaño máximo sea de 200 pb y como tamaño mínimo se utiliza el tamaño preestablecido por el programa. Otro parámetro de interés es la temperatura de fusión del cebador (T_m), cuyo valor debe estar entre 58 - 62° C. A su vez, las T_m no deben diferir más de 5 °C entre los dos cebadores de una misma pareja.

Otro apartado del programa es *Exon/intron selection*, empleado para diseñar primers de ARN, por lo que no se debe rellenar para la obtención de cebadores de PCR convencional.

Finalmente, en la sección *Primer Pair Specificity Checking Parameters*, se exponen los parámetros de especificidad de la pareja de cebadores. Entre los parámetros que se deben modificar están la base de datos en la que se desea que el programa busque la información genómica necesaria para construir los cebadores y la especie del organismo frente al que se están buscando los cebadores para conseguir especificidad de los cebadores por la especie.

Las características de los primers que se han diseñado específicamente para el presente trabajo se enuncian en la Tabla 5.

En cuanto a la longitud de los cebadores, todos ellos medían 20 nucleótidos siendo el tamaño mínimo que permite una adecuada hibridación de 16 nucleótidos.

Especie	Región genómica	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Longitud del amplicón
<i>Niabella soli</i>	ADN ribosomal 16S	Forward	CACAAAGCAAGGTGCTGCAT	90
		Reverse	AACTAGTGATGGGGGTTGCG	
	ADN codificante único de especie	Forward	AACAACATCGGGCGTACCAT	71
		Reverse	GGAGTGGTATCTACGTGCCG	
<i>Bryocella elongata</i>	ADN ribosomal 16S	Forward	AAGAAGCCCCGGCTAACTTC	171
		Reverse	TCTCCCACTCAAGCCCGA	
	ADN codificante único de especie	Forward	TTGAAGAGCAGCGACGAACT	74
		Reverse	TATGGAACCTCCACCGGAGT	
<i>Pontibacter populi</i>	ADN ribosomal 16S	Forward	CATAAGACCACGGTCCTGGC	107
		Reverse	CGAAGTCTTGGTAGGCCGTT	
	ADN codificante único de especie	Forward	TTTGCGGCGCATCTTCAAAA	172
		Reverse	ACCATAGCCCTTGTGGCTTC	
<i>Microvirga subterranea</i>	ADN ribosomal 16S	Forward	CCCACTGGGACTGAGACAC	158
		Reverse	TGCGGGTACCGTCATTATCG	
	ADN codificante único de especie	Forward	CTGGCCTGGATCACGTTCTT	114
		Reverse	GATTGGGATCGGGCCATAGG	

Tabla 5. Cebadores utilizados en las amplificaciones de diferentes genes bacterianos para la identificación de las bacterias de interés. Se indica la especie frente a la que se ha diseñado el cebador, la región donde se localizan los genes de los que se ha tomado la secuencia de referencia para el diseño de los primers, la secuencia del cebador y la longitud del amplicón.

6. Amplificación del ADN bacteriano por PCR

Los primers diseñados son sintetizados por la empresa Integrated DNA Technologies IDT y enviados hasta el laboratorio con una hoja de especificaciones cada uno.

Cada primer es proporcionado en un tubo y liofilizado, pudiendo apreciarse a simple vista como una película translúcida o polvo blanquecino. El contenido del tubo debe ser reconstituido añadiendo el volumen de agua destilada que especifica el fabricante para cada cebador. Cada tubo contiene una cantidad de oligonucleótidos que, después de disolverse en el volumen de agua añadido, la concentración de la disolución es de 100 µM.

Para el desarrollo de la PCR convencional se emplea el kit comercial de Master Mix (2X) de Promega, que contiene una mezcla para PCR con los reactivos necesarios para el funcionamiento de la reacción enzimática y el tampón de reacción apropiado.

Debido a la cantidad de kit para PCR disponible, del total de las 12 muestras obtenidas se escogen 5 para amplificar por PCR con los primers de bacterias típicas de suelos mediterráneo. La selección de las muestras se basa en los resultados positivos de la electroforesis en gel.

Paralelamente a las 5 muestras, se incluye un control estándar proporcionado por la empresa colaboradora para garantizar que se ha conseguido aislar el ADN genómico en buen estado.

El soporte para la PCR es una placa de múltiples viales, cada uno de los cuales contiene 25 μL totales de volumen: 1 μL de ADN, 5 μL de mix de primers, 12,5 μL de mix de PCR y el volumen restante de 6,5 μL de agua destilada libre de nucleasas.

La concentración de los primers para realizar la PCR debe ser de 3 μM , por lo que hay que preparar una dilución. Por cada vial de PCR son necesarios 5 μL de cada par de primers, por lo que se prepara un volumen total de 40 μL de cada mix de primers para disponer de cantidad de sobra.

Teniendo en cuenta la ecuación $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$, se calcula que, para un volumen de 40 μL de disolución de ambos primers de 3 μM , se deben tomar 1,2 μL de volumen de disolución 100 μM de cada primer. Después, se añaden 37,6 μL de agua destilada libre de nucleasas hasta obtener un volumen final de 40 μL de mix de primers.

Las muestras son depositadas en los viales de PCR con la organización mostrada en la Figura 4.

Después de preparar todos los viables, se introduce la placa en el termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler de Applied Biosystems. Las condiciones del termociclador empleadas para la amplificación son:

1ª etapa. Duración de 2 minutos a una temperatura de 95 °C.

2ª etapa. 35 ciclos de una primera etapa a una temperatura de 95 °C durante 30 segundos, una segunda etapa a una temperatura de 59 °C durante 30 segundos y una tercera etapa a una temperatura de 72 °C durante 30 segundos.

3ª etapa. Duración de 10 minutos a una temperatura de 72 °C.

4ª etapa. Conservación a 4°C.

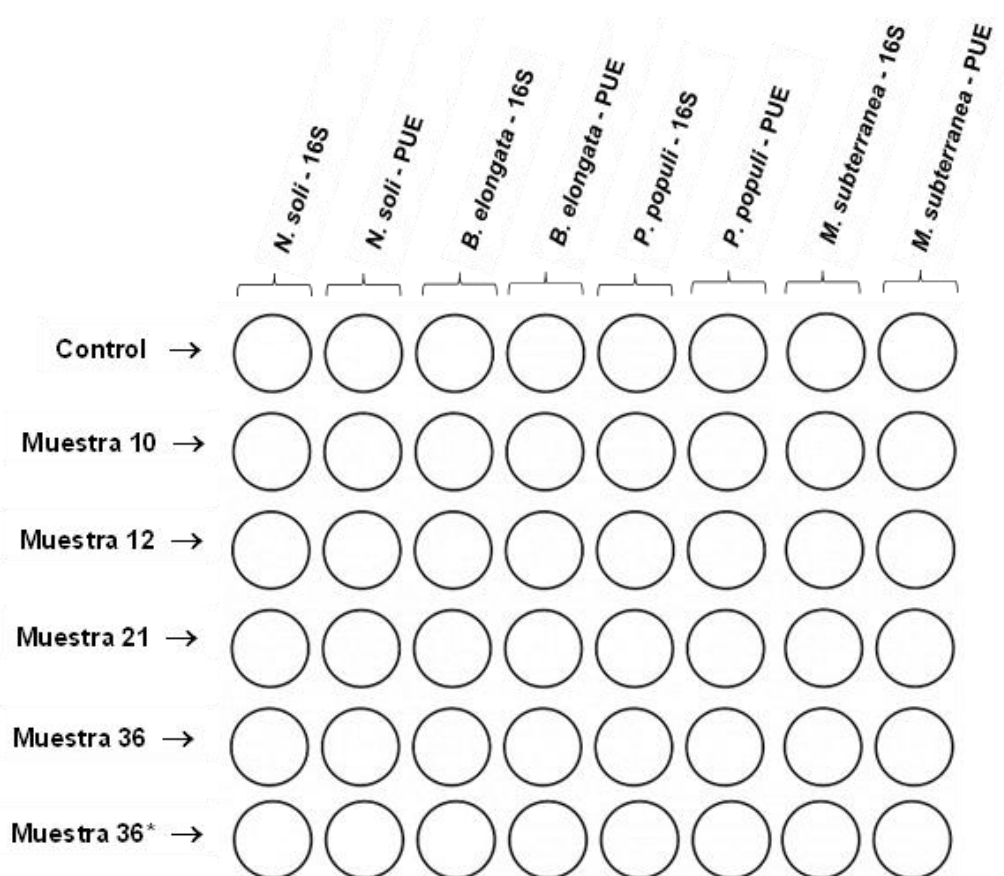


Figura 4. Esquema de la disposición de los viales en la placa de PCR. Las abreviaturas 16S y PUE se refieren a ADN ribosomal 16S y ADN codificante para proteínas únicas de especie, respectivamente.

Para evaluar si existe amplificación tras la PCR es preciso correr las muestras en un gel de agarosa mediante electroforesis.

El total de muestras para realizar la electroforesis son 48, por lo que se prepara un gel mediano con 20 pocillos y un gel grande con 40 pocillos.

Para obtener los geles, en primer lugar, se prepara una cantidad suficiente de 2500 mL de disolución de tampón TAE 1X a partir del TAE 50X disponible en el laboratorio.

A partir de esta disolución de TAE 1X la elaboración del gel mediano sigue los mismos pasos que se han descrito anteriormente en la elaboración del gel para detectar ADN genómico.

Para el gel grande, del volumen total de preparado de disolución de TAE 1X, se toman 300 mL y se transfieren a un matraz. Para conseguir una concentración 0,8% en este gel se añaden 2,4 g de agarosa pesados previamente en la balanza.

Seguidamente, se calienta la mezcla en un microondas hasta que la agarosa se disuelve completamente y el contenido del matraz se vuelve completamente transparente. Después, se deja enfriar ligeramente y se añaden 13 μL de *green safe*, colorante no tóxico que tiñe los ácidos nucleicos para su posterior visualización.

A continuación, se deposita la mezcla en un molde grande, cuyos extremos han sido tapados con cinta adhesiva previamente. Sobre las hendiduras de este recipiente se sitúan dos peines que darán forma a los pocillos, cuya función es servir de soporte para introducir las muestras. El gel se deja solidificar en oscuridad el tiempo necesario dependiendo de la temperatura ambiente.

Después del enfriamiento, se retiran los peines de 20 pocillos y adhesivos para introducir el molde con el gel en la cubeta de electroforesis. Las hileras de pocillos deben situarse próximos al polo negativo para que el ADN de carga negativa migre hacia el polo positivo cuando se aplica la corriente eléctrica.

El interior de la cubeta se llena con 1350 mL del tampón TAE 1X preparado previamente y se añaden 70 μL de *green safe* debido a que mejora la visualización del gel posteriormente.

Finalmente, se incorporan las muestras de la placa de PCR. En el gel mediano se cargan 8 pocillos con el contenido de la muestra de control estándar seguidos de un pocillo con el marcador y 8 pocillos con la muestra 10 seguidos de un pocillo con el marcador. En cuanto al gel grande, la primera hilera de pocillos se carga con el contenido de la muestra 12 seguida de un pocillo con el marcador y el contenido de la muestra 21 seguido de un pocillo con el marcador. Respecto a la segunda hilera de pocillos, los 8 primeros se cargan con el contenido de la muestra 36 seguidos de un pocillo con el marcador y 8 pocillos con la muestra 36* seguidos de un pocillo con el marcador. Cada pocillo contiene 20 μL de muestra y 3,3 μL de tampón de carga. El marcador empleado es *GeneRuler 100 pb DNA Ladder* de la casa comercial Thermo Fisher Scientific y la cantidad añadida del mismo son 5 μL .

A continuación, se tapa la cubeta y se conecta con la fuente de alimentación siendo las condiciones de carrera de 45 minutos a 100 V.

Por último, el gel grande se divide en dos geles medianos y se realiza la visualización de cada gel de forma individualizada. Para guardar el resultado, se fotografían los geles digitalmente mediante el documentador de geles INVITROGEN iBright CL1000 de la marca Thermo Fisher Scientific.

RESULTADOS

Para analizar los diferentes pasos del análisis metagenómico de este Trabajo de Fin de Grado se han realizado varias pruebas descritas en *Metodología*, cuyos resultados se presentan a continuación.

1. Testado de las técnicas de detección de ADN

1.1. Cuantificación de la concentración y pureza de ADN

Conocidas las medidas de concentración obtenidas en el NanoDrop y el volumen de disolución donde se ha diluido el ADN extraído es posible determinar la cantidad total de ADN presente en cada muestra (Figura 5).

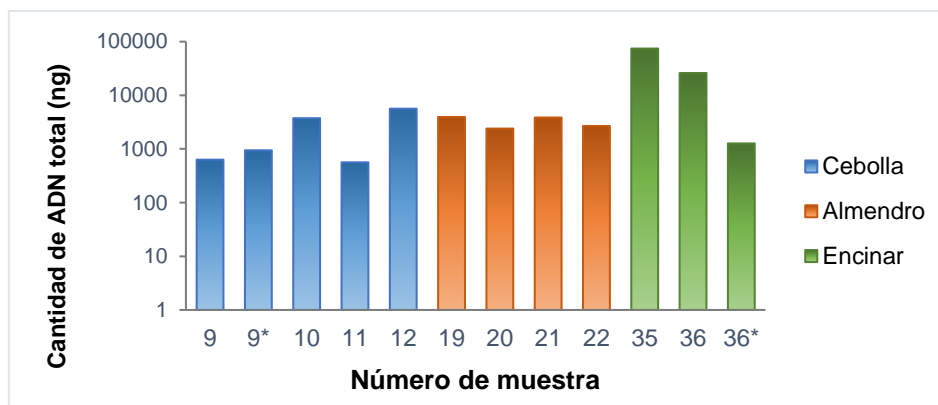


Figura 5. Representación de la cantidad de ADN en cada muestra. Los datos de cantidad de ADN en nanogramos (ng) se representan sobre el eje vertical de escala logarítmica de base 10 y se indica cada número de muestra en el eje horizontal. A su vez, las muestras se agrupan por colores en función del cultivo agrónomo del que han sido recogidas.

A la vista de los datos gráficos, la cantidad de ADN aislada con la extracción diseñada por la empresa presenta mayores diferencias entre las variadas muestras mientras que el kit muestra resultados más homogéneos en cuanto a cantidad de ADN recuperado.

Respecto a los valores de la ratio 260/280 y la ratio 260/230, se considera un ADN de pureza adecuada cuando las relaciones son 1,8 – 2,0 y 1,8 – 2,2 respectivamente. Sin embargo, en esta experiencia se obtienen unos resultados desfavorables para todas las muestras y con independencia del método de extracción de utilizado, que revelan la presencia de contaminación y gran impureza en las muestras.

Por otra parte, las muestras 35 y 36 presentan mayor contenido en material genético que las demás en base a los datos del NanoDrop. Estas mismas muestras presentaban una coloración oscura fuerte a diferencia de las demás muestras, por lo que su color a simple vista podría estar indicando el riesgo de una cuantificación errónea del NanoDrop en el ultravioleta por la elevada saturación de color. Por ello, resulta interesante valorar la absorción colorimétrica de las muestras en el visible.

1.2. Absorción en el visible al lector de microplaca

Para constatar la exactitud de los resultados obtenidos de concentración de ADN en base a su absorción a 260 nm, se han realizado medidas de absorbancia a 405 nm, 450 nm, 570 nm, y 620 nm, como se muestra en la Figura 6.

De forma general, prestando atención a las representaciones de absorbancia de cada muestra, se puede comprobar que las muestras 35 y 36 aisladas con protocolo diseñado por la empresa presentan una mayor absorbancia en cualquiera de las longitudes de onda. En cambio, el ADN extraído con el kit, tanto de la muestra 9* como 36* presenta unos valores de absorbancia bajos.

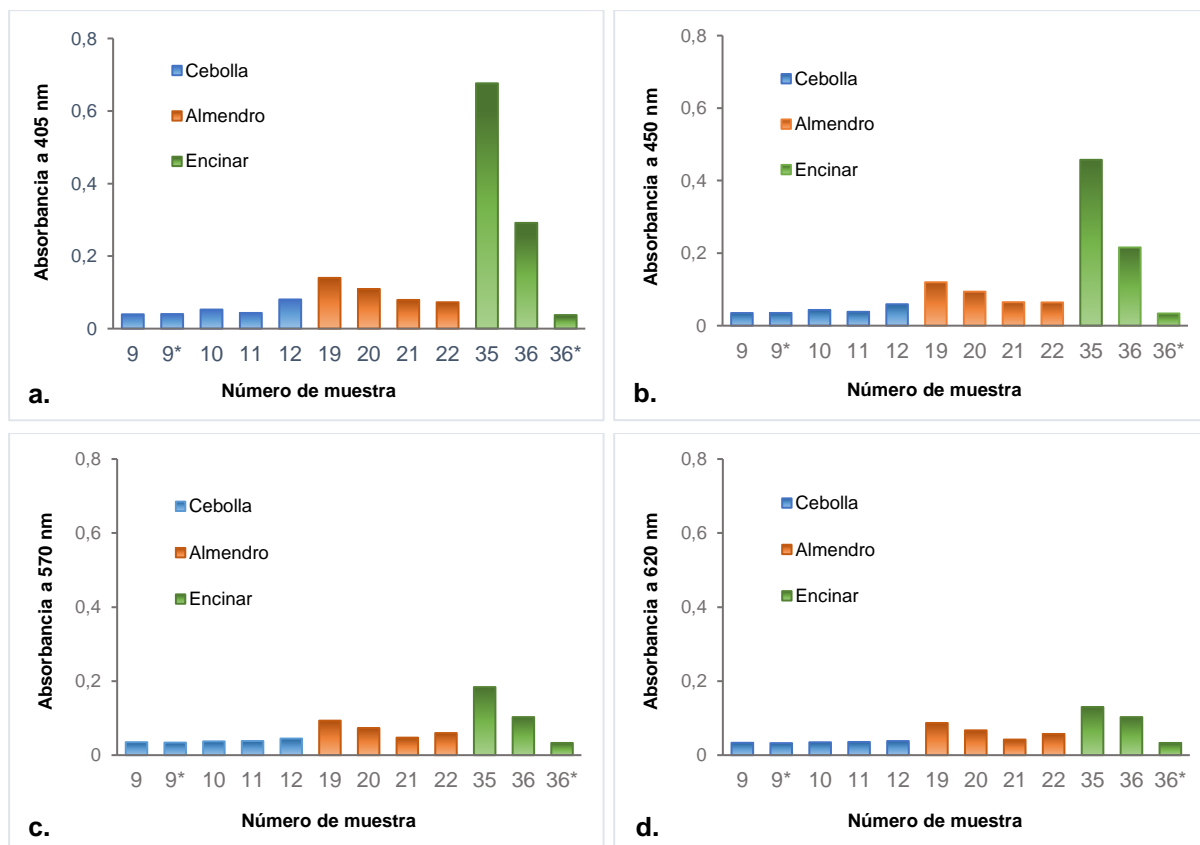


Figura 6. Representación de la absorbancia de cada muestra. Los datos del gráfico *a* se corresponden con las medidas a una longitud de onda de 405 nm, los del gráfico *b* con las medidas a una longitud de onda de 450 nm, los del gráfico *c* con las medidas a una longitud de onda de 570 nm y los del gráfico *d* con las medidas a una longitud de onda de 620 nm.

La determinación de la presencia de ADN mediante la cuantificación de la absorbancia es un ensayo rápido de gran interés. Debido a ello, resulta interesante establecer una posible correlación entre la saturación de color a simple vista y la medida de absorbancia en el ultravioleta para detectar la existencia de interferencias en la medida del Nanodrop (Figura 7).

Se puede decir que, considerando el gráfico de correlación, existe una relación directa entre las medidas de absorbancia en el visible y la concentración de ADN debido a la absorbancia en el ultravioleta para todas las muestras. Por tanto, la coloración visible de las muestras está implicando un error en la medida de absorbancia a 260 nm, por lo que no es fiable el empleo del NanoDrop. Consecuentemente, se recurre a la robusta técnica de la electroforesis en gel, aunque también más lenta, para confirmar el éxito de la extracción de ADN bacteriano

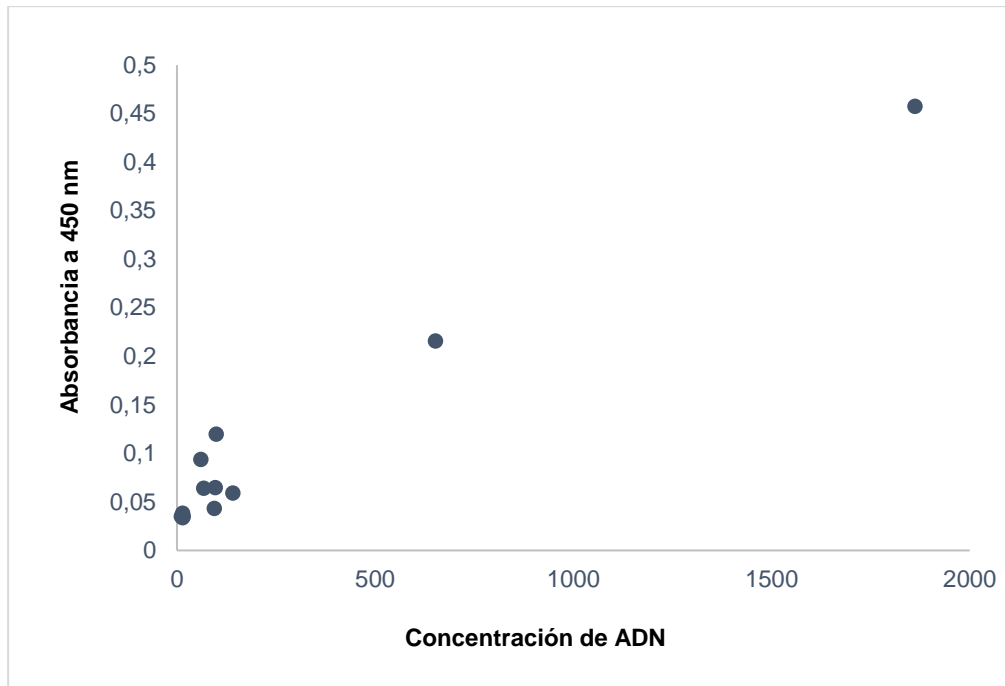


Figura 7. Gráfico de correlación entre la concentración de ADN y la absorbancia. Se representan los datos de absorbancia a 450 nm frente a la concentración de ADN de todas las muestras (extraídas con el protocolo diseñado y el kit comercial).

1.3. Electroforesis en gel de agarosa para la detección de ADN genómico

La electroforesis en gel de agarosa permite asegurar la presencia de material genético en la muestra y valorar la integridad de la muestra de ADN. Cuando el perfil de electroforesis manifiesta una única banda en la parte superior del gel se considera que existe ADN genómico no degradado en la muestra.

La visualización del gel de electroforesis realizado en este estudio se presenta en la *Figura 8* comprobando la existencia de ADN genómico que, por su tamaño, migra una distancia corta durante la carrera electroforética, en las muestras 10, 12, 21 y 36* solamente. Además, el ADN no parece estar degradado, pues no hay presencia de varias bandas que indiquen fragmentos de ADN de varios tamaños.

En comparación con las medidas de concentración registradas en función de la absorbancia a 260 nm, es destacable que, a pesar del elevado valor de concentración de ADN para la muestra 35 y 36 respecto a las demás, no se aprecia banda en su pocillo en la electroforesis.

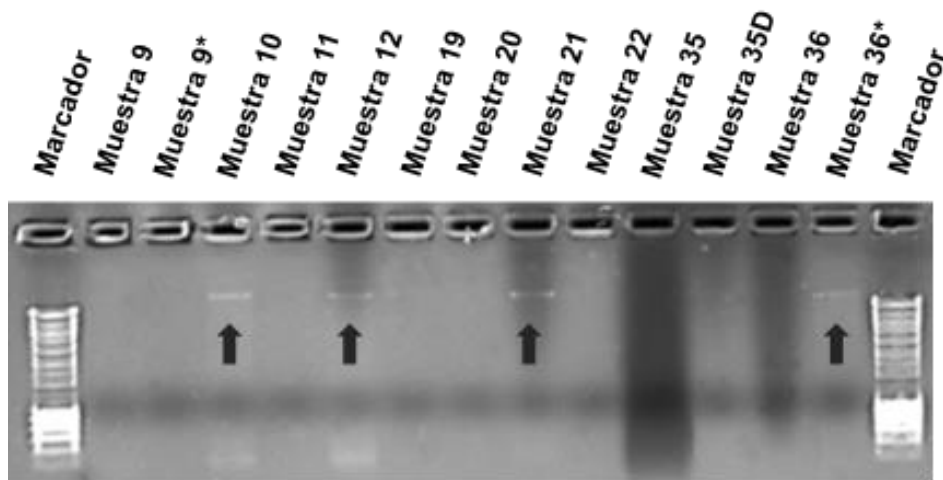


Figura 8. Gel de agarosa al 0,8% para detectar ADN genómico. El gel se carga con todas las muestras después de la extracción de ADN y se incorpora un marcador de 1 kb (M). El * indica que son muestras cuyo ADN ha sido extraído con el kit y 35D hace referencia a la dilución de la muestra número 35.

2. Identificación del ADN bacteriano de interés en las muestras de suelo

La PCR se realiza con cebadores específicos de especie diseñados para este Trabajo de Fin de Grado como se ha descrito en *Materiales y métodos*, por lo que la amplificación de la región bacteriana comprendida entre los mismos revela la presencia de la bacteria de interés en la muestra. Por tal motivo, es fundamental verificar que existe amplificación del ADN bacteriano mediante el análisis por electroforesis de agarosa. Los resultados de las carreras electroforéticas se exponen en las Figuras 9, 10 y 11 identificando las bacterias de interés en las muestras cargadas en aquellos pocillos donde se puede apreciar una banda.

Las imágenes de electroforesis muestran que no existe banda de control estándar no específico para ninguno de los cebadores diseñados, pero sí existe banda con determinados cebadores en las muestras de estudio.

El marcador utilizado ha sufrido un poco de degradación, ya sea por mantenerse demasiado tiempo a temperaturas elevadas o por el tiempo que ha transcurrido desde su adquisición, pero es posible identificar la banda de 500 pb y comprobar que las bandas de amplificación avanzan una distancia considerable de acuerdo con sus tamaños comprendidos entre 71 pb y 171 pb.

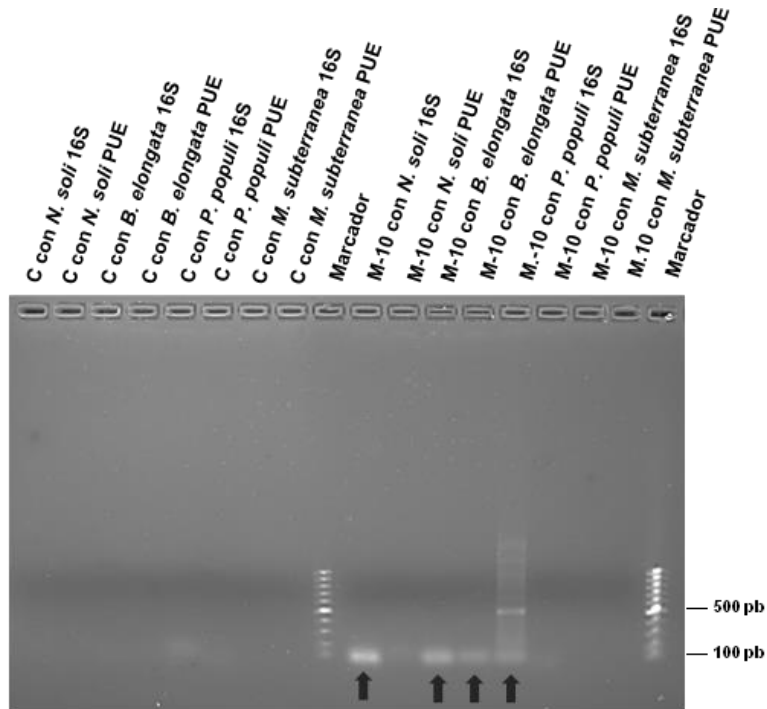


Figura 9. Gel de agarosa mediano al 0,8% para detectar bacterias de interés. El gel se carga con los 8 primeros pocillos de control estándar (C) con las diferentes parejas de cebadores y los 8 últimos pocillos de muestra 10 de cebolla (M-10) con las diferentes parejas de cebadores. Al final de cada muestra se incorpora un marcador de 100 pb.

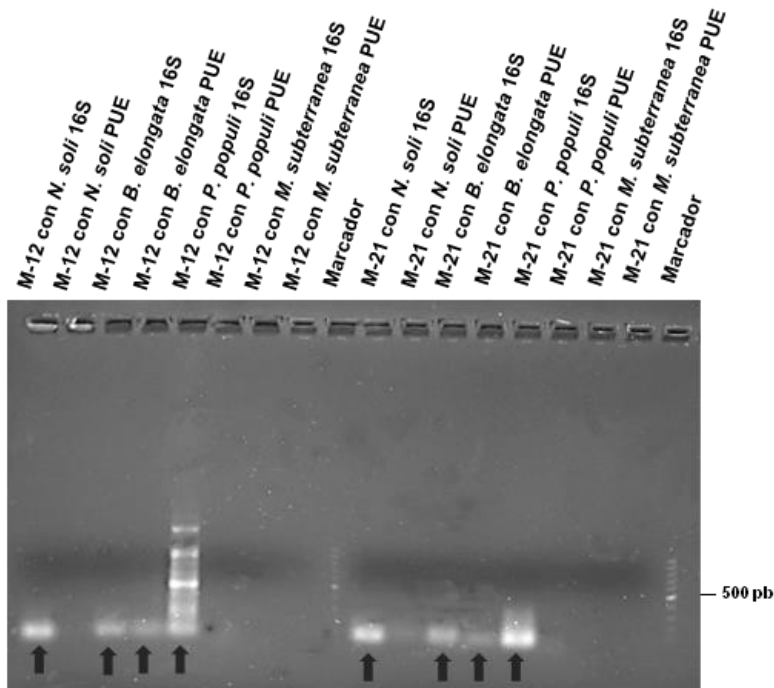


Figura 10. Gel de agarosa mediano al 0,8% para detectar bacterias de interés. El gel se carga con los 8 primeros pocillos de muestra 12 de cebolla (M-12) con las diferentes parejas de cebadores y los 8 últimos pocillos de muestra 21 de almendro (M-21) con las diferentes parejas de cebadores. Al final de cada muestra se incorpora un marcador de 100 pb.

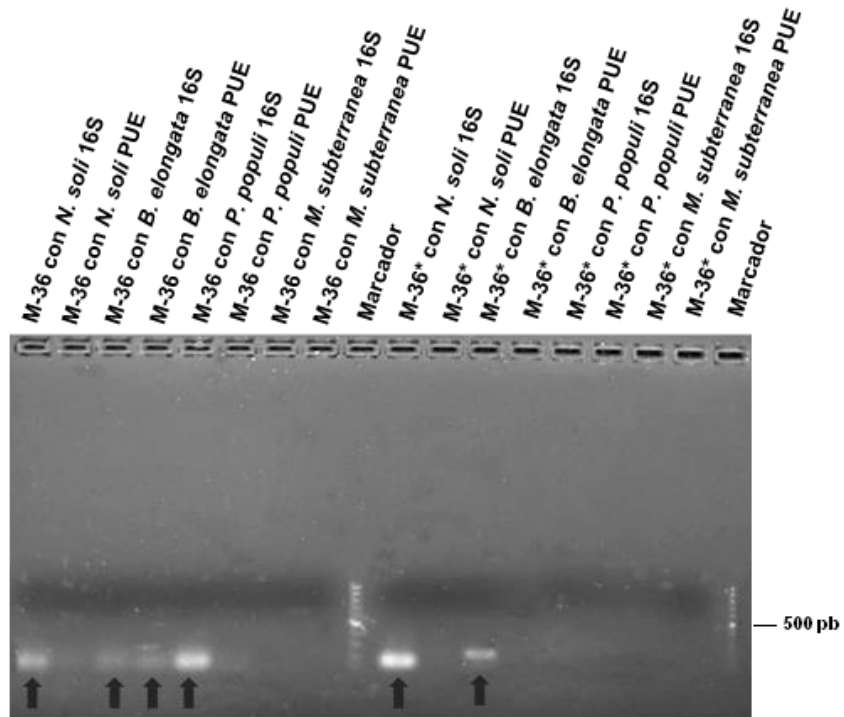


Figura 11. Gel de agarosa mediano al 0,8% para detectar bacterias de interés. El gel se carga con los 8 primeros pocillos de muestra 36 de encina (M-36) con las diferentes parejas de cebadores y los 8 últimos pocillos de muestra 36* de encina (M-36*) con las diferentes parejas de cebadores. Al final de cada muestra se incorpora un marcador de 100 pb. El * indica que son muestras cuyo ADN ha sido extraído con el kit.

DISCUSIÓN

Respecto a la extracción del ADN bacteriano, en esta investigación se consigue un 30% de eficacia en el aislamiento de ADN genómico sobre un total de 10 muestras con el protocolo tradicional basado en el uso del tampón CTAB. Esta rentabilidad es considerablemente deficiente, por lo que se plantean experimentos para conseguir una optimización del protocolo mediante el aumento de los tiempos de incubación o la incorporación de enzimas líticas de membrana celular en tampón CTAB, de acuerdo con el procedimiento de resultados favorables para de la extracción con CTAB recogido en los estudios de Kathiravan et al. (2015).

Empleando “E.N.Z.A Soil DNA Kit” se alcanza un 50 % de efectividad sobre un total de 2 muestras, aunque futuros trabajos deben confirmar el rendimiento real de este kit de extracción.

La correlación directa entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia en el espectro visible junto con la ausencia de ADN genómico en las muestras de mayor concentración de ADN según los datos del NanoDrop que proporciona el análisis por electroforesis sugiere que la espectrofotometría a 260 nm registrada con el NanoDrop conduce a resultados inexactos de concentración de ADN.

Se ha descrito que, en muestras de suelo con gran heterogeneidad, frecuentemente existe contaminación por la abundancia de multitud de compuestos no eliminados en la extracción con tampón CTAB, como los ácidos húmicos o

compuestos fenólicos (Miao et al., 2014), responsables de la coloración oscura de las muestras después de la extracción (Kathiravan et al., 2015).

En estas muestras que presentan una coloración intrínseca del propio material el instrumento espectrofotométrico está cuantificando una absorbancia que no se debe a la presencia real de ADN, sino a la existencia de cualquier contaminante capaz de absorber o dispersar la luz a 260 nm (O'Neill et al., 2011).

Por consiguiente, la medida de absorbancia a 260 nm directamente tras la extracción de ADN no es una herramienta apropiada para la cuantificación de ADN en muestras de suelo heterogéneo y se requiere el empleo de la técnica convencional de electroforesis de ADN para confirmar la existencia de ADN genómico en la muestra. Como alternativa, se podría realizar una purificación del ADN bacterianos con métodos de purificación positivamente evaluados (Engel et al., 2012), aunque la rentabilidad de este proceso aún es un reto debido al coste, complejidad y tiempo requerido para su desarrollo (Jeong et al, 2017).

En este estudio metagenómico se ha identificado la bacteria *Niabella soli* en los suelos utilizados para el cultivo de cebolla, almendro y encina. La coloración amarilla de las colonias de esta bacteria se debe a la producción de pigmentos tipo flexirrubina (Anderson et al., 2012). La especie *N. soli* parece interesante por su capacidad para producir una variedad de glicosil hidrolasas y un número considerable liasas de polisacáridos (Weon et al., 2008) que pueden favorecer la degradación de residuos orgánicos, aunque aún no se han realizado estudios funcionales sobre las enzimas de esta especie.

La bacteria *Bryocella elongata* también ha sido detectada en las muestras procedentes de suelo donde se cultiva cebolla, almendro y encina. Las características morfológicas, químicas y taxonómicas se exponen en los trabajos de Dedysh et al. (2012), pero el conocimiento acerca de su distribución y actividad ambiental sigue siendo muy limitado.

Los suelos de cebolla, almendro y encina presentan en su capa rizosférica la bacteria *Pontibacter populi*. El papel ecológico de esta especie bacteriana aún no ha sido descrito, aunque se conoce con detalle su fisiología microbiana (Xu et al., 2012).

A pesar de que la literatura científica no ha determinado por el momento el interés agronómico de estas especies, los cebadores diseñados en este trabajo para PCR pueden ser de utilidad para la detección de las bacterias de interés en otros estudios metagenómicos como paso previo al estudio ecológico de estas mismas bacterias.

En cuanto a la especie bacteriana *Microvirga subterranea* no se ha podido identificar en ninguna de las muestras analizadas. Esto podría deberse a una mala calidad del ADN extraído o una cantidad de material genético recuperado insuficiente, aunque sí hay material genético para la detección de las otras bacterias sobre estas mismas muestras, por lo que resultaría extraño que la misma metodología de extracción altere la calidad del ADN bacteriano de una especie solamente. Otra causa más esperable es que la bacteria *M. subterranea* no está presente en las muestras de estudio, aunque para poder confirmar este resultado con total seguridad es necesario repetir la electroforesis incluyendo una muestra positiva donde esté localizada la región comprendida entre los cebadores de la bacteria. Además, solamente con este estudio carente de un control positivo no se podría descartar la posibilidad de que los primers diseñados no sean funcionales y, en tal caso, se requeriría el diseño y evaluación de unos nuevos cebadores específicos.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del estudio genómico desarrollado en el presente Trabajo de Fin de Grado son:

1. El protocolo tradicional basado en el empleo de tampón CTAB para la extracción de ADN bacteriano debe ser optimizado para conseguir aislar material genético de calidad y alta pureza.
2. La cuantificación de ADN en base a la medida de absorbancia a 260 nm de la muestra no es apropiada para muestras de suelo heterogéneo por la presencia de contaminantes que llevan a resultados erróneos.
3. La electroforesis en gel de agarosa debe ser utilizada para asegurar la existencia de ADN genómico en la muestra, favoreciendo la identificación de las bacterias de interés en pruebas posteriores.
4. Los cebadores diseñados específicamente en este estudio para la detección de las bacterias *Niabella soli*, *Bryocella elongata* y *Pontibacter populi* generan buenos resultados en PCR convencional.
5. Se han identificado las bacterias *Niabella soli*, *Bryocella elongata* y *Pontibacter populi* en las muestras de suelo recogidas en cultivos de cebolla, almendro y encina de la región de Extremadura.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, I., Munk, C., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Tice, H., Glavina Del Rio, T., Cheng, J.F., Han, C., Tapia, R., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Mavromatis, K., Pagani, I., Mikhailova, N., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., ... Ivanova, N. (2012). Genome sequence of the flexirubin-pigmented soil bacterium *Niabella soli* type strain (JS13-8T). *Standards in Genomic Sciences*, 7, 210-220. <https://doi.org/10.4056/sigs.3117229>.
- Bakker, P.A., Berendsen, R.L., Doornbos, R-F., Wintermans, P.C. & Pieterse, C.M. (2013). The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00165>.
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M. & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00148>.
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>.
- Dedysh, S.N., Kulichevskaya, I.S., Serkebaeva, Y.M., Mityaeva, M.A., Sorokin, V.V., Suzina, N.E., Rijpstra, W.I. & Sinninghe Damste, J.S. (2012). *Bryocella elongata*

- gen. nov., sp. nov., a member of subdivision 1 of the Acidobacteria isolated from a methanotrophic enrichment culture, and emended description of *Edaphobacter aggregans* Koch et al. 2008. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 654-664. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.031898-0>.
- Engel, K., Pinnell, L., Cheng, J., Charles, T.C. & Neufeld, J.D. (2012). Nonlinear electrophoresis for purification of soil DNA for metagenomics. *Journal of Microbiological Methods*, 88, 35-40. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.10.007>.
- Equipo de profesores de la Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales de la Universidad de Extremadura (2023). *Estudio del impacto económico de la agricultura eficiente en las zonas rurales como medida eficaz ante el reto demográfico*. [Archivo PDF]. <https://www.juntaex.es/w/estudio-impacto-economico-regadios-zonas-rurales>.
- Hiltner, L (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung and Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98, 59-78.
- Holben, W. E., Jansson, J. K., Chelm, B. K. & Tiedje, J. M. (1988). DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 703-711. <https://doi.org/10.1128/aem.54.3.703-711.1988>.
- Jeong, H., Choi, J.H. & Son, A. (2017). Necessity of purification during bacterial DNA extraction with environmental soils. *Environmental Health and Toxicology*, 32, 1-10. <https://doi.org/10.5620/eh.t.e2017013>.
- Kathiravan, M. N., Gim, G. H., Ryu, J., Kim, P. I., Lee, C. W., & Kim, S. W. (2015). Enhanced method for microbial community DNA extraction and purification from agricultural yellow loess soil. *Journal of Microbiology*, 53, 767-775. <https://10.1007/s12275-015-5454-0>.

- Kloepper, J.W. & Beauchamp, C.J. (1992). A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 1219-1232. <https://doi.org/10.1139/m92-202>.
- Knietsch, A., Bowien, S., Whited, G., Gottschalk, G. & Daniel, R. (2003). Identification and characterization of genes encoding coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3048 – 3060. <https://doi.org/10.1128/aem.69.6.3048-3060.2003>.
- Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B.C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolk, T., McCall, L-I., McDonald, D., Melnik, A.V, Morton, J.T., Navas, J., Quinn, R.A., Sanders, J.G., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Tripathi, A., Xu, Z.Z., ... Dorrestein, P.C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 410-422. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9>.
- Leff, L. G., Dana, J.R., McArthur, J.V. & Shimkets, L.J. (1995). Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1141–1143. <https://doi.org/10.1128/aem.61.3.1141-1143.1995>
- Li, Y., Fang, F., Wei, W., Wu, X., Cui, R., Li, G., Zheng, F. & Tan, D. (2019). Humic Acid Fertilizer Improved Soil Properties and Soil Microbial Diversity of Continuous Cropping Peanut: A Three-Year Experiment. *Scientific Reports*, 9, 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48620-4>.
- Miao, T., Gao, S., Jiang, S., Kan, G., Liu, P., Wu, X., An, Y. & Yao, S. (2014). A method suitable for DNA extraction from humus-rich soil. *Biotechnology Letters*, 11, 1-6. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1591-5>.
- Miralles, I., Soria, R., Lucas-Borja, M. E., Soriano, M., & Ortega, R. (2020). Effect of biocrusts on bacterial community composition at different soil depths in Mediterranean semi-arid ecosystems. *Science of the Total Environment*, 733, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138613>.

- Mullis, K. & Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of ADN in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335 - 350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6).
- Nayfach, S., Roux, S., Seshadri, R., Udway, D., Varghese, N., Schulz, F., Wu, D., Paez-Espino, D., Chen, I., Huntemann, M., Palaniappan, K., Ladau, J., Mukherjee, S., Reddy, T.B., Nielsen, T., Kirton, E., Faria, J.P., Edirisinghe, J.N., Henry, C.S., ... Eloë-Fadrosch, E.A. (2021). A genomic catalog of Earth's microbiomes. *Nature Biotechnology*, 39, 499–509. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0718-6>.
- Ogram, A., Saylor, G.S. & Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7, 57–66. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90025-X).
- O'Neill, M., Arthure, K., Riedel, S., McMillan, N.D. & McPartlin, J. (2011). Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. *Journal of Physics: Conference Series*, 307, 1-6. <https://doi.org/101088/1742-6596/307/1/012047>.
- Popp, A., Calvin, K., Fujimori, S., Havlik, P., Humpenöder, F., Stehfest, E., Bodirsky, B.L., Dietrich, J.P., Doelmann, J.C., Gusti, M., Hasegawa, T., Kyle, P., Obersteiner, M., Tabeau, A., Takahashi, K., Valin, H., Waldhoff, S., Weindl, I., Wise, M., Kriegler, E., ... van Vuuren, D.P. (2017). Land-use futures in the shared socio-economic pathways. *Global Environmental Change*, 42, 331-345. <http://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2016.10.002>.
- Quince, C., Walke, A.W., Simpson, J.T., Loman, N.J. & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature biotechnology*, 35, 833-844. <http://doi.org/10.1038/nbt.3935>.
- Rolf, D. (2005). The metagenomics of soil. *Nature*, 3, 470-478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1160>.

- Rondon, M. R., Goodman, R. M. & Handelsman, J. (1999). The earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends in Biotechnology*, 17, 403-409. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(99\)01352-9](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(99)01352-9).
- Schmer, M.R., Vogel, K.P., Varvel, G.E., Follett, R.F., Mitchell, R.B. & Jin, V.L. (2014). Energy Potential and Greenhouse Gas Emissions from Bioenergy Cropping Systems on Marginally Productive Cropland. *Plos one*, 9, 1-8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0089501>.
- Shahzad, A., Ullah, S., Dar, A.A., Sardar, M.F., Mehmood, T., Tufail, M.A., Shakoor, A. & Haris, M. (2021). Nexus on climate change: agriculture and possible solution to cope future climate change stresses. *Environmental Science and Pollution Research*, 28,14211–14232. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12649-8>.
- Shi, S., Marshal, S., Schon, N., Digman, B., Bell, N. & O'Callaghan, M. (2021). Insights into the soil microbiome and prospects for its manipulation for improved pasture resilience. *Resilient Pastures - Grassland Research and Practice Series*, 17, 163-178. <https://doi.org/10.33584/rps.17.2021.3475>.
- Siebert, S. & Döll, P. (2010). Quantifying blue and green virtual water contents in global crop production as well as potential production losses without irrigation. *Journal of Hydrology*, 384, 198–217. <http://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.07.031>.
- Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S.E., Fetzer, I., Bennett, E.M., Biggs, R., Carpenter, S.R., de Vries, W., de Wit, C.A., Folke, C., Gerten, D., Heinke, J., Mace, G.M., Persson, L.M, Ramanathan, V., Reyers, B. & Sörlin, S. (2015). Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science*, 347, 1-10. <http://doi.org/10.1126/science.1259855>.
- Weon, H.Y., Kim, B.Y., Joa, J.H., Kwon, S.W., Kim, W.G. & Koo, B.S. (2008). *Niabella soli* sp. nov., isolated from soil from Jeju Island, Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 467-469. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65304-0>.

Weston, L.A. & Mathesius, U. (2013) Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 283-297. <http://doi.org/10.1007/s10886-013-0248-5>.

Xu, M., Wang, Y., Dai, J., Jiang, F., Rahman, E., Peng, F., & Fang, C. (2012). *Pontibacter populi* sp. nov., isolated from the soil of a Euphrates poplar (*Populus euphratica*) forest. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62, 665-670. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030122-0>.

