



**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**

TRABAJO FIN DE GRADO DE CIENCIAS AMBIENTALES

Autor: Ángeles Rosa Contreras Martínez

Microbiota aerobia cultivable asociada al complejo ecohidrológico de *Ziziphus lotus* en la llanura litoral de Torregarcía-Amoladeras (Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar): distribución en el perfil vertical

Cultivable aerobic microbiota associated to the ecohydrological complex of *Ziziphus lotus* in the coastal plain of Torregarcía-Amoladeras (Cabo de Gata-Níjar Natural Park): distribution in the vertical profile

Director: María José López López

Codirector: Francisco Javier Cabello Piñar

Septiembre 2020

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Justificación y antecedentes del tipo de informe o estudio	2
1.2. Procesos ecológicos que tienen lugar en la zona vadosa: papel de las plantas y la microbiota	3
1.3. Biodiversidad del suelo y sus funciones	5
1.4. Distribución de la microbiota en el perfil del suelo y la zona vadosa	6
1.5. El azufairar: un ecosistema dependiente de aguas subterráneas.....	7
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
3. METODOLOGÍA	11
3.1. Área de estudio y muestreo.....	11
3.2. Diseño del muestreo	11
3.3. Medidas analíticas.....	13
3.3.1. Humedad y contenido en materia orgánica.....	13
3.3.2. Carga microbiana: recuento de bacterias y hongos totales.....	14
3.3.3. Actividad metabólica: biodiversidad funcional (Biolog Ecoplate™).....	17
3.4. Análisis de datos.....	19
4. CUERPO DE LA MEMORIA.....	19
4.1. Descripción de la columna de suelo y características de los materiales extraídos.....	19
4.2 Efecto de la profundidad y la influencia de <i>Ziziphus lotus</i> sobre la carga bacteriana y fúngica	21
4.3. Efecto de la profundidad y la influencia de <i>Ziziphus lotus</i> sobre la biodiversidad funcional.....	24
4.4. Análisis de correlación	29
5. CONCLUSIONES.....	31
6. AGRADECIMIENTOS	31
7. BIBLIOGRAFÍA	31

RESUMEN

Los azufaifares son ecosistemas de zonas áridas de gran interés ecológico y biogeográfico. El azufaifar de la llanura litoral de Torregarcía-Amoladeras puede ser estudiado bajo una perspectiva ecohidrológica por su posible papel en la biota subterránea. Los estudios acerca de la distribución de las comunidades microbianas a lo largo de las diferentes capas que componen el perfil del suelo son muy reducidos. Este trabajo se centró en el estudio de la variabilidad en la carga microbiana y su actividad metabólica a lo largo del perfil de la zona vadosa asociada del ecosistema dependiente de aguas subterráneas dominado por *Ziziphus lotus*. Para ello, se recogieron muestras de seis profundidades, entre 1 m y 36 m, durante la perforación de dos pozos ubicados en la llanura costera del Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar. Uno de dichos pozos estaba próximo a azufaifos y otro lejano. En dichas muestras se analizó la población microbiana cultivable y la biodiversidad funcional (actividad metabólica), obteniendo además la funcionalidad que presentan los microorganismos para metabolizar diferentes fuentes carbonadas. Los resultados demostraron que existen diferencias significativas entre las comunidades microbianas de cada pozo, siendo la población bacteriana más abundante en suelo próximo a azufaifo. Sin embargo, no se puede afirmar que las diferencias en la distribución en profundidad de la comunidad microbiana sean causadas por la influencia de *Z. lotus*, ya que dichas comunidades también se ven afectadas por las diferentes capas que conforman el perfil geológico, muy diferentes entre las dos ubicaciones estudiadas. Adicionalmente, se demostró que el azufaifo produce una influencia positiva en la biodiversidad funcional y en el balance de actividades metabólicas, principalmente en los primeros metros del suelo, aunque se pierde al aumentar la profundidad. Este estudio aporta un acercamiento preliminar al conocimiento de la compleja estructura de la comunidad microbiana asociada a la zona vadosa del ecosistema dependiente de aguas subterráneas dominado por *Z. lotus*.

Palabras clave: Zona vadosa, Biodiversidad funcional, bacterias aerobias cultivables, hongos totales

ABSTRACT

Jujube are arid zone ecosystems of great ecological and biogeographic interest. The jujube from the Torregarcía-Amoladeras coastal plain can be studied from an ecohydrological perspective due to its possible role in the underground biota. Studies on the distribution of microbial communities along the different layers that make up the soil profile are very limited. This work focused on the study of the variability in microbial load and its metabolic activity along the profile of the associated vadose zone of the groundwater-dependent ecosystem dominated by *Ziziphus lotus*. For this, samples were collected from six depths between 1 m and 36 m, during the drilling of two wells located in the coastal plain of the Cabo de Gata-Níjar Natural Park. One of these wells was close to jujubes and another far away. In these samples, the cultivable microbial population and functional biodiversity (metabolic activity) were analyzed, also obtaining the functionality that microorganisms present to metabolize different carbonate sources. The results showed that there are significant differences between the microbial communities of each well, being the most abundant bacterial population in soil close to jujube. However, it cannot be said that the differences in the depth distribution of the microbial community are caused by the influence of *Z. lotus*, since these communities are also affected by the different layers that make up the geological profile, very different between the two locations studied. Additionally, it was shown that jujube produces a positive influence on functional biodiversity and on the balance of metabolic activities, mainly in the first few meters of the soil, although it is lost with increasing depth. This study provides a preliminary approach to understanding the complex structure of the microbial community associated with the vadose zone of of the groundwater dependent ecosystem dominated by *Z. lotus*.

Keywords: Vadose zone, Functional biodiversity, total aerobic bacteria, total fungi.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación y antecedentes del tipo de informe o estudio

Este Trabajo Fin de Grado se ha realizado en el marco del proyecto ADAPTAMED (LIFE14 CCA/ES/000612, <https://www.lifeadaptamed.eu/>) liderado por la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía, y en el que participa como socio la Universidad de Almería, a través del Centro Andaluza para la Evaluación y Seguimiento del Cambio Global (CAESCG), junto a la Universidad de Granada y la Estación Biológica de Doñana (CSIC). Life ADAPTAMED tiene como objetivo principal la protección de los servicios de los ecosistemas en espacios naturales protegidos de Andalucía (Cabo de Gata, Doñana y Sierra Nevada) frente a los efectos del cambio climático. El proyecto coordina un proceso estratégico para establecer un modelo de gobernanza para la adaptación al cambio climático en cada espacio. Además, representa un paso esencial para facilitar la consolidación a largo plazo de la Red de Observatorios del Cambio Global de Andalucía, una red que quedó establecida en la Ley de Cambio Climático Andaluza (Ley 8/2018, Artículo 22).

Los objetivos principales del Life ADAPTAMED pasan por integrar en la gestión de los ecosistemas de manera efectiva, las estrategias dirigidas a la adaptación y mitigación del cambio global, maximizando la provisión de servicios ecosistémicos, tales como el secuestro de carbono y mantenimiento del ciclo hidrológico, la retención y formación de suelos, producción primaria, o la polinización y dispersión de semillas. Por ello, el proyecto incluye un conjunto de acciones de gestión en ambientes representativos de la región Mediterránea (matorrales mediterráneos, predesérticos, y de alta montaña; y pinares y bosques de quercíneas), siguiendo un esquema de gestión adaptativa que permita evaluar los efectos sobre los ecosistemas de dichas acciones. Para el caso concreto del Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar, dichas acciones se han desarrollado en tres ambientes diferentes que tratan de representar la diversidad de ecosistemas y objetivos de gestión de este parque (Tabla 1). Entre éstos, destaca el azufaifar (Matorrales arborescentes de *Ziziphus lotus*, hábitat 5220) de la llanura litoral de Torregarcía, un ecosistema que ha sido identificado como “ecosistema dependiente de aguas subterráneas” (GDE por sus siglas en inglés, Groundwater Dependent Ecosystem, Guirado et al., 2018), y representa una prioridad para la conservación de la biodiversidad en Europa (Tirado, 2009).

Dada la vinculación del funcionamiento ecosistémico del azufaifar y las condiciones del acuífero (Torres et al. 2020), en el marco del diseño de acciones de gestión y seguimiento del azufaifar, se realizó una acción preliminar para la caracterización del acuífero y el estado de las aguas subterráneas asociadas, y se instaló una red de 8 pozos de sondeo, que deben servir para el seguimiento en continuo de la porción subterránea del ecosistema dependiente de aguas subterráneas. Los trabajos que presentamos aquí deben ser enmarcados en el conjunto de tareas que se están realizando para conocer el funcionamiento del ecosistema en su conjunto, desde el dosel vegetal hasta la zona vadosa.

Tabla 1. Acciones centrales del proyecto Life ADAPTAMED en el Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar.

Acción central	Objetivo general	Objetivos específicos
C1 Manejo de pinar-espartal para favorecer la recuperación de servicios ecosistémicos a través de la creación de núcleos de biodiversidad en áreas de pinar-espartal	Aumentar la capacidad del ecosistema para infiltrar agua hacia capas profundas del suelo, incrementar la productividad del ecosistema, disminuir el riesgo de incendio, y mantener el hábitat para la biodiversidad.	Gestión forestal para mejorar la estructura de las formaciones arbustivas y arbóreas. Siembra de arbustos autóctonos para la consolidación de islas de fertilidad y biodiversidad.
C3 Aumentar la resiliencia y capacidad de proveer servicios en el complejo ecohidrológico del azufaífar	Asegurar que la cantidad y calidad de los servicios de los ecosistemas proporcionados por las formaciones de matorrales de <i>Ziziphus lotus</i> en la llanura costera eólica del Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar frente al cambio climático.	Establecer una red de vigilancia de las aguas subterráneas como parte de un sistema de alerta temprana (8 perforaciones y 30 piezómetros). Densificar y reestructurar espacialmente las manchas e individuos de <i>Z. lotus</i> . Eliminar los competidores CAM invasores (<i>Agave</i> spp.) y derivar técnicas eficaces de eliminación a hábitats con amenazas similares.
C4 La conservación del suelo y la gestión agrícola como instrumentos para la protección de servicios ecosistémicos y adaptación al cambio climático de ecosistemas semiáridos	Mejorar la capacidad de las terrazas para retener agua y nutrientes. Control de la erosión y reducción de la escorrentía en microcuencas. Aumentar la capacidad de adaptación contra el cambio climático de los hábitats 6220 y 5330.	Reconstrucción de balates con mampostería seca para mejorar la retención de agua y nutrientes. Manejo de cultivos abandonados y suelo desnudo utilizando técnicas tradicionales según los ciclos locales de disponibilidad de agua (arado, barbecho, siembra y pastoreo) para mejorar el secuestro de carbono y mantenimiento de la biodiversidad.

1.2. Procesos ecológicos que tienen lugar en la zona vadosa: papel de las plantas y la microbiota

La zona vadosa, también conocida como zona del suelo no saturada, comprende los materiales y estructuras que podemos encontrar entre la superficie terrestre emergida y las aguas subterráneas (Figura 1, Ibañez, 2018). Esta zona comprende el suelo, entendido este como la capa superficial de la corteza terrestre, y al regolito, esto es, el material que se ubica entre el suelo y el acuífero. El conocimiento disponible sobre los procesos biológicos que tienen lugar en esta zona, particularmente en el regolito, es actualmente muy escaso, ya que es difícil disponer de las infraestructuras necesarias para ello, y el estudio de los ecosistemas dependientes de aguas subterráneas (GDE, por sus siglas en inglés, Groundwater Dependent Ecosystems) bajo una perspectiva holística es aún escaso (Eamus et al. 2006). Actualmente es ampliamente conocido que las interacciones entre las raíces de las plantas, la fauna, los microorganismos y los componentes abióticos juegan un papel fundamental en la capa suelo constituyendo un sistema natural abierto y

dinámico. Dichas interacciones determinan las propiedades del suelo y con él su riqueza y biodiversidad como ecosistema (Coleman y Whitman, 2005). De la misma forma, cabe esperar que las interacciones y procesos ecológicos se den a lo largo de toda la zona vadosa aportando información clave para entender qué ocurre a nuestros pies.

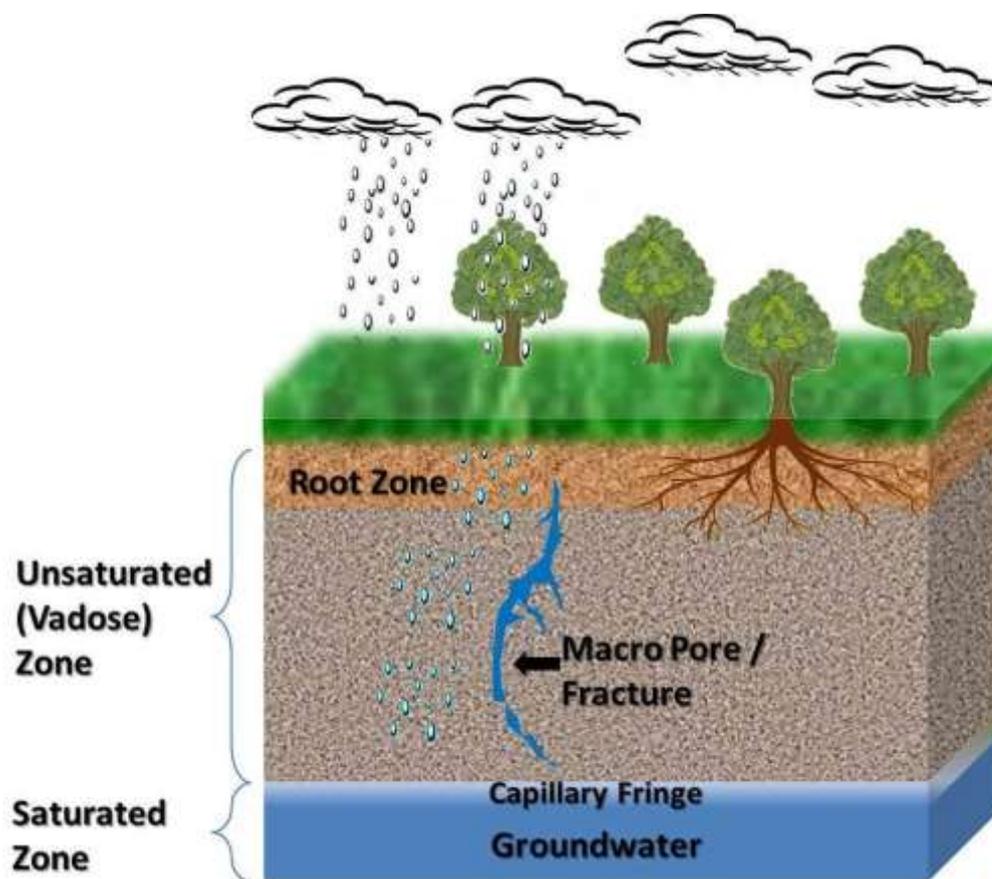


Figura 1. Zona vadosa: porción de la masa de suelo que se extiende entre la superficie y la parte superior del nivel freático principal, comúnmente llamada zona de aireación o zona no saturada. Tomado de <https://www.diccionario.geotecnia.online/palabra/zona-vadosa/>.

Para comprender estas interrelaciones y los procesos que derivan de ellas, hemos de tener en cuenta que el suelo está compuesto por la materia orgánica e inorgánica que se va depositando en forma de agregados. Estos agregados originan un espacio poroso muy importante por el que discurren o se depositan una serie de nutrientes, agua, aire y gases del que se sirven diferentes seres vivos. Las plantas aprovechan los poros libres del suelo para desarrollar su sistema radicular, y a través de él exudan distintos compuestos orgánicos (rizodeposiciones), que atraen diferentes comunidades de microorganismos (Hiltner, 1904). Estos microorganismos que interaccionan con las raíces son propios de cada individuo vegetal, independientemente de la especie de planta ya que lo que determina la población de microorganismos son los requerimientos específicos de cada

planta, las propiedades ambientales y climáticas de la zona y las características del suelo. El crecimiento de las raíces es específico de cada especie, y se ve influenciado por los factores abióticos del suelo (pH, la salinización del medio, la concentración de aluminio, y disponibilidad de nutrientes), los cuales influyen significativamente su crecimiento (Gregory, 2006), tanto en volumen, como en profundidad.

La mayor parte de las interacciones biológicas que tienen lugar en la zona vadosa ocurren en la rizosfera, que se define como aquella “zona del suelo que rodea a la raíz y se ve afectada por ella” (Darrah, 1993). Esta zona tiene propiedades distintas al suelo que le rodea porque en ella se producen distintos procesos biológicos, físicos y químicos en función de las interacciones que realice la planta (Hinsinger et al., 2009). Cabe esperar, por tanto, que las raíces juegan un papel relevante en los procesos que tienen lugar en la zona vadosa. Las raíces pueden modificar las propiedades del terreno y estimular o inhibir el crecimiento de microorganismos por medio de los exudados radiculares (Gregory, 2006). De esta forma la planta libera distintos compuestos al medio que junto con las células desprendidas y las raíces en descomposición constituyen un sustrato rico en nutrientes del que se sirven las comunidades microbianas, que al interactuar con este medio, potencian el gradiente de descomposición de la materia orgánica del suelo (Paterson, 2003). Los compuestos orgánicos liberados por las raíces en sus rizodeposiciones, son fundamentalmente azúcares, polisacáridos, ácidos orgánicos, aminoácidos, péptidos y proteínas (Bowen y Rovira, 1999; Jones et al, 2004). La liberación de compuestos al sustrato sirve a las plantas para establecer interacciones con otras plantas y microorganismos, y se sabe que algunos de los compuestos liberados funcionan como mensajeros que se encargan de iniciar las interacciones del sistema raíz-microorganismos-suelo (Walker et al, 2003).

Las interacciones biológicas que tienen lugar en el suelo, y en toda la zona vadosa, generan sistemas de retroalimentación que confieren estabilidad y resiliencia a los ecosistemas, siendo esenciales para su productividad y funcionamiento (Bever, 2003). Estas interacciones pueden ser tanto positivas como negativas. Por ejemplo, cuando los microorganismos establecen una relación simbiótica con la planta, originan una interacción positiva, por el contrario, las interacciones con plantas parásitas o microbios patógenos cercanos a ella, pueden perjudicar a la planta (Mathesius, 2003). Las plantas se sirven de este mecanismo de rizodeposición para reconocer el tipo de interacción (positiva o negativa) con los microorganismos que la rodean y actuar de forma pasiva, liberando compuestos al medio para intentar interrumpir interacciones perjudiciales (Fray, 2002), ya que una especie microbiana específica puede ser dañina o no en función de su abundancia (Maurhofer et al., 1992).

1.3. Biodiversidad del suelo y sus funciones

El suelo se caracteriza por albergar una gran biodiversidad. En él habitan bacterias, hongos, oomicetos, nematodos, protozoos, algas, virus, archaeas y artrópodos (Lynch, 1990; Meeting, 1992; Bonkowski et al., 2009; Bu'ee et al., 2009; Raaijmakers et al., 2009). En un gramo de suelo se pueden encontrar más de 1 millón de genomas bacterianos distintos (Gans et al., 2005), siendo la diversidad bacteriana mayor en el suelo que en la rizosfera (Uroz et al 2010). Estos organismos desempeñan un papel crucial en los

ecosistemas, y son fundamentales en la adquisición de nutrientes, los ciclos de los elementos (nitrógeno, carbono, potasio, fósforo, etc.) y la formación del suelo (Van der Heijden et al., 2008). Las plantas necesitan estos elementos (nitrógeno, fósforo y potasio), que pueden resultar limitantes para su desarrollo, ya que son escasos en el suelo o se hayan constituyendo estructuras complejas en los polímeros. Por este motivo, las plantas dependen de los organismos del suelo que se encargan de la degradación de estas complejas estructuras, facilitando a la planta la adquisición de los distintos nutrientes. A cambio, los microorganismos obtienen el carbono y otros nutrientes que requieren para su crecimiento, fijado en el suelo por la planta. (Alden et al., 2001; Demoling et al., 2007; Rousk y Baath, 2007).

Desde hace una década tenemos cada vez más claro la diversidad microbiana del suelo afecta al funcionamiento de los ecosistemas (Van der Heijden et al., 2008). El interés de esta cuestión reside en el empobrecimiento de la diversidad microbiana que sufren los suelos cuando son perturbados por acción humana (Torsvik et al., 1996; Gans et al., 2005). Existen pocos estudios al respecto, sin embargo, algunos como el realizado por Vogelsang et al. (2006) muestran que la diversidad por sí misma, no es tan relevante, ya que está en cierta manera viene determinada por la identidad de la especie vegetal a cuya rizosfera se asocia. Por otro lado, se ha demostrado que, si aumenta la diversidad de hongos, se incrementa la productividad y diversidad vegetal, así como su capacidad para adquirir nutrientes (Van der Heijden et al. 1998; Jonsson et al. 2001; Maherali y Klironomos, 2007). En general, se puede decir que la diversidad microbiana influye en los suelos pobres o salobres con poca disponibilidad de nutrientes, ya que éstos son más vulnerables a la pérdida de diversidad microbiana (Van der Heijden et al. 2008). Además, la diversidad puede afectar a la adaptabilidad de la vegetación, que en estas condiciones depende de las interacciones con los microorganismos para subsistir (Van der Heijden et al., 2008).

Finalmente, cabe destacar que la productividad de la planta está determinada por sus interacciones directas mutualistas o patógenas con microorganismos, pero también por las interacciones que se producen de manera indirecta con otros organismos de vida libre que compiten por los nutrientes existentes y alteran su suministro (Van der Heijden, 2008). En este sentido destacan por ejemplo la actividad de los hongos micorrícicos y las bacterias fijadoras de nitrógeno que son responsables de entre el 5 y el 20% (praderas y sabanas), y el 80% (bosques templados y boreales) de todo el nitrógeno, y hasta el 75% del fósforo, que es adquirido por las plantas anualmente (Van der Heijden, 2008). Esto es indicativo de la dependencia que poseen las plantas con los microorganismos que aumenta o disminuye conforme la disponibilidad de nutrientes.

1.4. Distribución de la microbiota en el perfil del suelo y la zona vadosa

Revelar los patrones de distribución de los microorganismos a lo largo de las diferentes capas que componen el perfil del suelo es una tarea compleja. La información actual en este campo no solo es reducida, sino que además es costosa y dependiente del área de estudio considerada. Si bien hay un escaso conocimiento acerca de la distribución e influencia que tiene la microbiota en las capas más superficiales del perfil (0 cm-20 cm), el conocimiento adquirido sobre la distribución de los microorganismos a mayor

profundidad (>20 cm) es prácticamente nula. A pesar de ello, algunas investigaciones indican que estas poblaciones de microorganismos suelen cambiar y disminuir su biomasa con la profundidad (Eilers et al., 2012; Ekelund et al., 2001; Fritze et al., 2000; Hansel et al., 2008; Hartmann et al., 2009; Will et al., 2010; Zvyagintsev, 1994). De acuerdo con dichos estudios, las poblaciones de microorganismos en el perfil del suelo se distribuyen de la siguiente manera: 1) las primeras capas del suelo albergan una gran diversidad de microorganismos, cuyas poblaciones difieren mucho tanto dentro de un mismo ecosistema y entre ecosistemas diferentes, ya que dependen de la heterogeneidad en las características edáficas y climáticas que se presentan en el paisaje; 2) en las horizontes intermedios (20 cm a 60 cm) se localizan comunidades microbianas relativamente homogéneas dentro de un mismo ecosistema e independientemente de la cubierta vegetal; 3) los horizontes más profundos presentan una característica llamativa consistente en que sus comunidades poseen más semejanzas con los horizontes superficiales, presentando gran diversidad de microorganismos, aunque de menor abundancia. Este gradiente en la estructura de estas comunidades a lo largo del perfil del suelo se asocia principalmente a la disponibilidad del carbono orgánico, que también disminuye con la profundidad, a estas poblaciones se las relaciona con el secuestro de carbono a largo plazo (Fierer et al., 2005; Rumpel y Kogel-Knabner, 2011; Trumbore, 2000).

Más allá de la biodiversidad que alberga el suelo, existen otro conjunto de microorganismos que habitan la zona vadosa, y que forman parte también de la biota de los complejos ecohidrológicos. Los GDEs se caracterizan por ofrecer una gran complejidad de hábitats subterráneos susceptibles de albergar una gran diversidad de comunidades microbiológicas (Griebler y Lueders, 2009). Se considera que las zonas de transición (ecotonos) entre el suelo, la zona vadosa, los sedimentos acuáticos, y el subsuelo saturado albergan una gran diversidad y actividad de la microbiota, que regula la transferencia de nutrientes, partículas, organismos y energía entre la litosfera, la biota y la atmósfera (Gibert et al., 1990).

1.5. El azufaifar: un ecosistema dependiente de aguas subterráneas

En las llanuras litorales del sureste ibérico la vegetación natural corresponde a matorrales de arbustos arborescentes pre-desérticos. Este es el caso del azufaifar de Torregarcía-Amoladeras en el Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar, un ecosistema de gran valor, ya que alberga la mejor población europea de *Ziziphus lotus*. En esta zona, el *Z. lotus* (conocido localmente como azufaifo) actúa como una especie ingeniería del ecosistema (Tirado et al. 2009), debido a su capacidad de modificar el ambiente allí donde crece, creando condiciones adecuadas para otro gran conjunto de especies.

La capacidad de *Z. lotus* de “dirigir” la estructura y funcionamiento del ecosistema deriva de sus particulares características estructurales y fisiológicas (Figura 2). Se trata de un caducifolio de verano que posee raíces profundas y muestra una estrategia anisohídrica (Gorai et al., 2010), lo que implica que mantiene sus estomas abiertos para mantener el flujo hídrico en condiciones de estrés. El resultado es que este arbusto es capaz de mantener dicho flujo desde el suelo hasta las hojas, incluso durante el verano (Torres et al., 2020), el momento más duro para el desarrollo de la biota en el sureste árido ibérico.



Figura 2. *Ziziphus lotus* en la llanura litoral de Torregarcía-Amoladeras (Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar): a) raíces suprficiales, b) hojas y estomas, c) porte. Fuente: CAESCG.

El conjunto de atributos estructurales y funcionales que posee *Z. lotus*, le permiten explorar la zona vadosa y obtener agua del acuífero, dando lugar a un sistema GDE terrestre (Figura 3, Guirado et al. 2018). Como en el resto de las regiones áridas y semiáridas del planeta, con escasa presencia de agua superficial, los GDEs terrestres se consideran muy valiosos (Eamus et al. 2006), ya que manifiestan un funcionamiento diferente en períodos de sequía (Murray et al., 2003; Boulton et al., 2008; Griebler et al., 2014). Este tipo de ecosistemas proporcionan, además, beneficios y servicios para el ser humano tales como el control y mitigación de inundaciones, la mejora de la calidad de las aguas superficiales y subterráneas, la reducción de la erosión, la disminución del riesgo de deslizamientos de tierra, la mejora de la infiltración del agua y el apoyo al almacenamiento de agua en el suelo, o la facilitación de la recarga de aguas subterráneas (Eamus et al., 2006; Kløve et al., 2011). A esto hay que sumar el hecho de que facilitan la supervivencia de múltiples especies durante los períodos de sequía (Murray et al., 2006), y dan lugar a islas de recursos en una matriz de escasa cobertura vegetal (Figura 2) (Akasheh et al., 2008; Harman et al., 2014).



Figura 3. El azufaifar de la llanura litoral de Torregarcía-Amoladeras (Parque Natural cabo de Gata-Níjar), un ecosistema dependiente de aguas subterráneas (GDE) en un acuífero costero (Tomado de Guirado et al., 2013).

Los azufaifares son ecosistemas de zonas áridas de gran interés ecológico y biogeográfico que se distribuyen por la cuenca Mediterránea, particularmente en el norte de África. En Europa, este ecosistema se encuentra altamente amenazado dado que sólo se encuentra en el sureste ibérico y algunas zonas de Sicilia y Chipre, y su área de distribución está siendo ocupada por la agricultura intensiva (Tirado et al., 2009; Cancio et al., 2017; López-Rodríguez et al., 2020). El resultado es que se trata de un hábitat prioritario para la conservación en Europa (Directiva 92/43/CEE).

Junto al interés para la conservación de la biodiversidad que posee el azufaifar de la llanura litoral de Torregarcía-Amoladeras, se trata de un ecosistema que puede ser estudiado bajo una perspectiva ecohidrológica por su posible papel en la biota

subterránea. Para el caso concreto del género *Ziziphus* se ha demostrado la existencia de una gran diversidad de bacterias en la rizosfera de *Z. jujuba* (el azufaifo cultivado) (Zhang et al., 2020), pero aún no se ha descrito dicha comunidad bacteriana para la rizosfera de *Z. lotus*, y mucho menos para la zona vadosa del GDE al que este arbusto da lugar.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El conocimiento disponible sobre los procesos biológicos que tienen lugar en la zona vadosa es actualmente muy escaso. Las interacciones entre las raíces de las plantas, la fauna, los microorganismos y los componentes abióticos determinan las propiedades del suelo y con él su riqueza y biodiversidad como ecosistema. La mayor parte de las interacciones biológicas que tienen lugar en la zona vadosa ocurren en la rizosfera, que tiene propiedades distintas al suelo que le rodea. Dado el papel que *Z. lotus* tiene sobre la dinámica del ecosistema por su capacidad de tomar agua del acuífero, cabe esperar, que sus raíces jueguen un papel relevante en los procesos que tienen lugar en la zona vadosa.

Este trabajo se centró en el estudio de la variabilidad en la carga microbiana y su actividad metabólica a lo largo del perfil de la zona vadosa asociada del GDE dominado por *Z. lotus*, un especie ingeniera del ecosistema. La importancia de este arbusto reside en que se trata de una especie freatófita que, al igual que se ha demostrado para la retama, podría aportar agua a los niveles superficiales del suelo. Por este mismo motivo se espera que existan diferencias en las poblaciones microbianas de las zonas próximas a *Z. lotus*.

Como ya se ha comentado, existe muy poca información sobre las comunidades microbianas en profundidad, por lo que consideramos que este estudio será de ayuda para aumentar el conocimiento general sobre el comportamiento de estas poblaciones en profundidades de hasta 26 y 38 metros, el máximo excavado en los pozos estudiados. Esta profundidad es suficiente para abarcar gran parte del regolito perteneciente a la zona vadosa. De acuerdo con ello, el objetivo principal de este trabajo fue establecer el perfil de distribución de la población microbiana cultivable, su abundancia y actividad, con la profundidad. Para la consecución de dio objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la influencia de la presencia del azufaifo en los niveles de la población microbiana cultivable
- Determinar la influencia de la presencia del azufaifo en la actividad metabólica de la población microbiana

Para el abordaje del estudio se planteó la siguiente hipótesis:

Al ser *Ziziphus lotus* un arbusto freatófita que desarrolla largas raíces para aprovechar el agua subterránea, modifica el ambiente de sus alrededores; por este motivo se espera una mayor abundancia microbiana y diversidad metabólica en suelo próximo al azufaifo frente a un suelo lejano a esta especie. En cuanto a la profundidad se espera una reducción de la carga microbiana y de la actividad metabólica debido a la disminución de aporte de carbono, agua y oxígeno.

3. METODOLOGÍA

3.1. Área de estudio y muestreo

El estudio fue realizado en la llanura costera del Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar, al sudeste de España (Figura 4, 36°49'20"N, 2°16'50"W) en el periodo de 2018 y 2019. El clima es de tipo Mediterráneo semiárido con veranos cálidos y secos, e inviernos suaves. La temperatura media anual es de 18 °C, y las precipitaciones, distribuidas desigualmente durante el año, son de 220 mm/año en promedio, se producen sobretodo en otoño e invierno (Machado et al., 2011). La llanura está situada sobre un pequeño acuífero de poca profundidad que pertenece a la parte occidental del gran acuífero Hornillo-Cabo de Gata. Su estructura geológica corresponde a las estribaciones de la cuenca sedimentaria de la Sierra Alhamilla (1000 m.s.n.m.) ~20 km al norte, así como de los depósitos marinos del Cuaternario superpuestos (Vallejos et al., 2018).



Figura 4. Llanura litoral de Torregarcía-Amoladeras en el Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar. Fuente: CAESCG.

3.2. Diseño del muestreo

Las muestras fueron recogidas a partir del suelo extraído durante la perforación de dos pozos ubicados en el área de estudio: pozo 2 y pozo 8 (Figura 5). El pozo 2 (pozo con azufaifo cercano) se caracteriza por presentar un gran individuo de *Z. lotus* en sus inmediaciones (2 m) mientras que el pozo 8 (pozo con azufaifo lejano) muestra los individuos de *Z. lotus* más cercanos a una distancia de 10 m. En este último caso pudimos identificar la presencia de *Retama sphaerocarpa*, una especie de leguminosa también de raíces profundas, aunque de mucho menor porte y cobertura que los azufaifos.

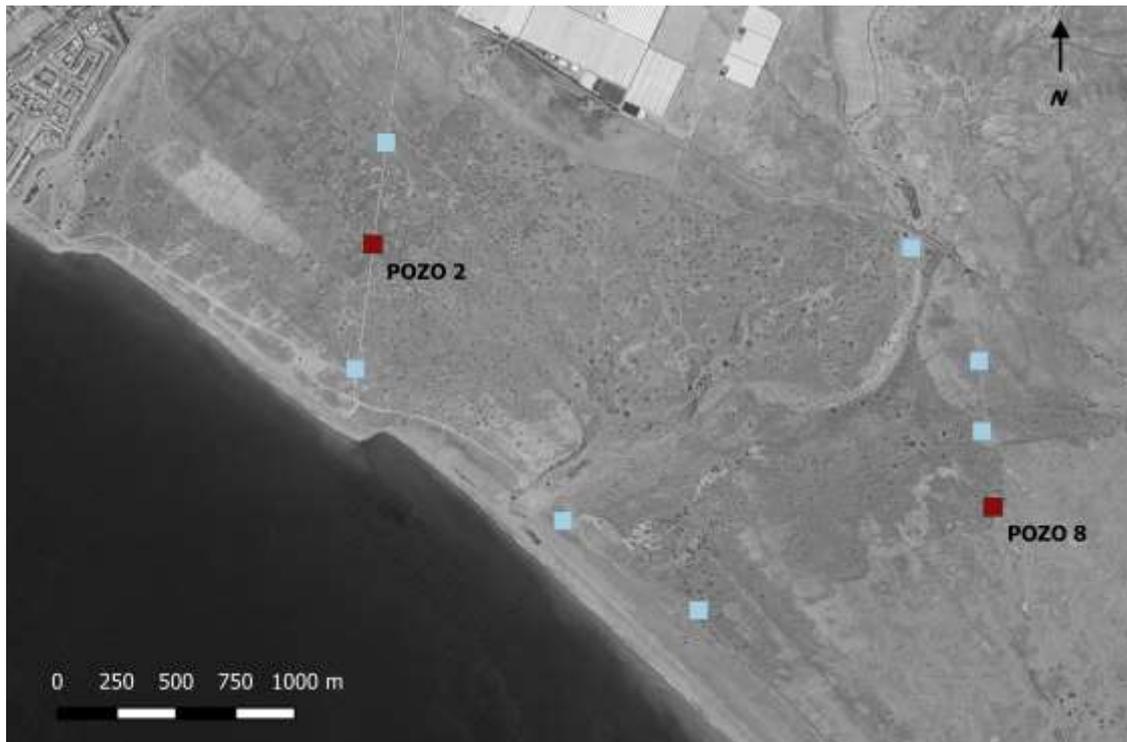


Figura 5. Distribución espacial de los puntos de muestreo dentro la red de pozos ADAPTAMED para el seguimiento del agua subterránea en la llanura litoral de Torregarcía-Amoladeras (Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar). POZO 2: con azufaifo cercano; POZO 8: con azufaifo lejano. Fuente: CAESCG.

Los pozos fueron perforados a través del sistema de rotopercusión hidráulica (Figura 6). De los materiales extraídos y dispuestos en superficie se recogió una muestra por metro perforado. Para los análisis realizados en este trabajo se seleccionaron muestras de seis profundidades en cada uno de los pozos en estudio (Tabla 2). Adicionalmente, se recolectó una muestra del agua empleada en la perforación (agua de sondeo) de cada uno de los dos pozos, A12/18 y A1/19, que corresponden al pozo 2 y al pozo 8 respectivamente.



Figura 6. Sistema de rotopercusión empleado en la perforación de los pozos. Fuente: CAESCG.

Tabla 2. Muestras extraídas de los pozos 2 y 8 a distintas profundidades

Pozo 2: azufaifo próximo(a)		Pozo 8: azufaifo lejano	
1 m	3 m	1 m	3 m
5 m	10 m	5 m	10 m
20 m	38 m	20 m	26 m

Las muestras fueron recogidas en frascos estériles de 100 mL, transportadas al laboratorio y conservadas congeladas (-20 °C) hasta su análisis.

3.3. Medidas analíticas

En las muestras de suelo obtenidas se analizó la humedad, el contenido en materia orgánica, la carga microbiana cultivable (recuento de bacterias y hongos totales) y la biodiversidad funcional (actividad metabólica), tal y como se describe en los siguientes apartados. Los parámetros indicados se analizaron en muestras de todas las profundidades, a excepción de la biodiversidad funcional que se analizó para muestras recogidas a partir de la zona más superficial (1 m), intermedia (10 m) y profunda (20 m). En el agua de sondeo se analizó exclusivamente la carga microbiana a fin de determinar su contribución a los niveles de dicho parámetro en las muestras de suelo. Todos los análisis que se describen a continuación se efectuaron en muestras descongeladas durante 24 h a 4 °C. En todos los casos se emplearon tres réplicas por muestra.

3.3.1. Humedad y contenido en materia orgánica

El análisis de la humedad y el contenido en materia orgánica de las muestras de suelo se llevó a cabo empleando métodos gravimétricos. Para la determinación de la humedad se introdujeron 5 g de la muestra en recipientes tarados y tras desecación en horno durante 24 h a 105 °C se determinó el peso seco de la muestra una vez enfriadas en desecador (Figura 7). La humedad se calculó mediante sustracción del peso seco final, del peso inicial, y se expresó como porcentaje (% humedad) en peso de la muestra.



Figura 7. Método de análisis de humedad en muestras de suelo.

El contenido en materia orgánica se determinó empleando muestras desecadas a partir de las que se pesó 1 g que se incorporó en crisoles tarados. Dichas muestras fueron calcinadas en un horno mufla a 550 °C durante 3 h y posteriormente se pesaron una vez enfriadas en desecador (Figura 8). El contenido en materia orgánica se calculó restando el peso final el inicial, y se expresó como porcentaje en peso seco de la muestra.

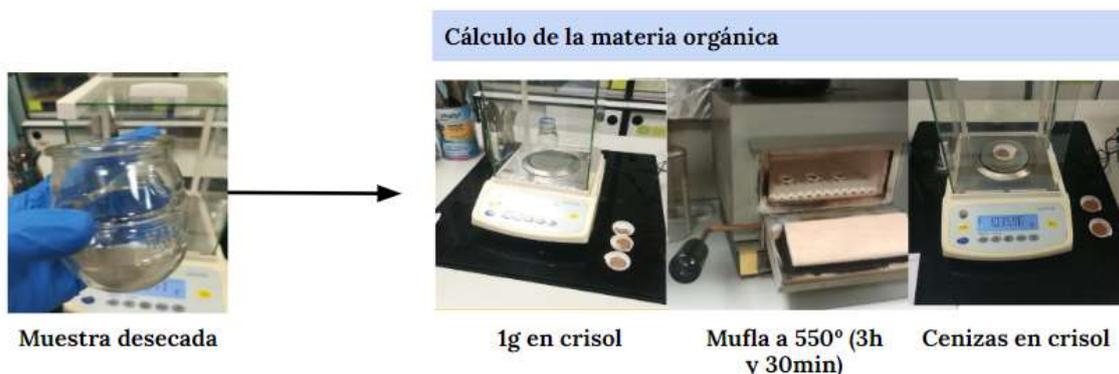


Figura 8. Método de análisis del contenido en materia orgánica de la muestra.

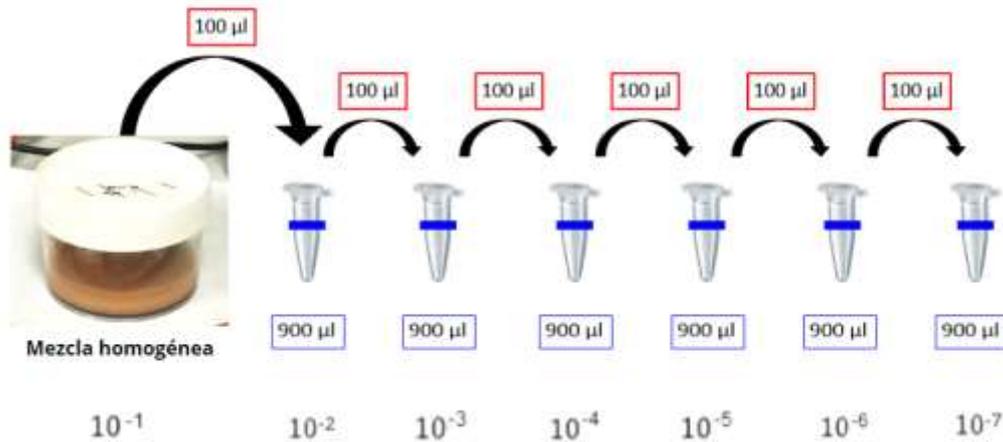
3.3.2. Carga microbiana: recuento de bacterias y hongos totales

Para el análisis de la abundancia microbiana se empleó la técnica de la dilución decimal seriada de las muestras, siembra en placa y recuento de colonias tras cultivo. Se analizaron tanto bacterias como hongos totales. Estos análisis se efectuaron en las muestras de suelo y de agua de sondeo.

Las muestras, 10 g de suelo o 10 mL de agua, se incorporaron en condiciones estériles en frascos ISO de 500 mL con 90 ml de solución salina estéril (NaCl 0,9% p/p) y se mantuvieron en agitación (160 rpm) durante 30 min. A partir de esta dilución (10^{-1}) se prepararon sucesivas diluciones decimales seriadas mediante transferencia de 100 μ L a

ependorfd con 900 μL de solución salina estéril, llegando hasta una dilución de 10^{-7} para suelo y 10^{-3} para agua (Figura 9).

a)



b)

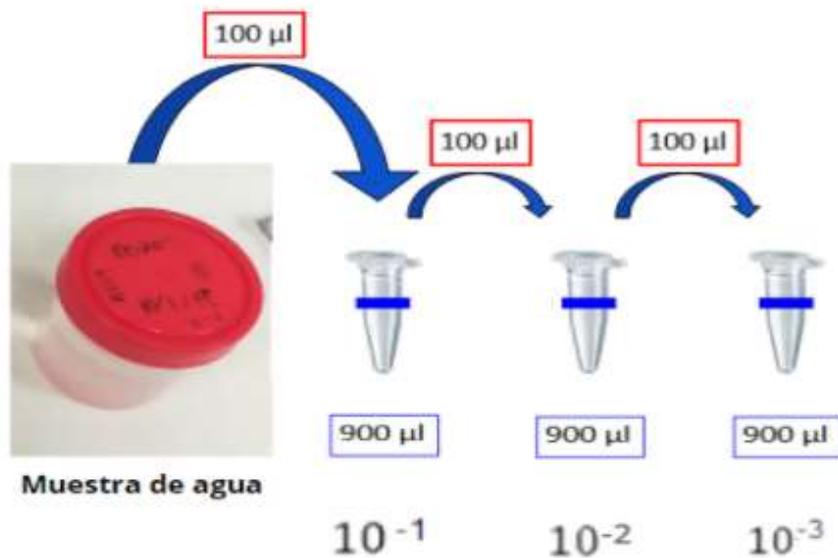


Figura 9. Preparación de las muestras de suelo (a) y agua (b) mediante dilución decimal seriada para recuento microbiano.

En caso necesario, para muestras con reducida carga microbiana, se empleó un método alternativo para la preparación de la muestra, que incluyó una concentración del agua o de la dilución 10^{-1} mediante filtración a través de filtro de membrana estéril de $0,45 \mu\text{m}$ (Figura 10). El filtro se depositó en placa con el medio de cultivo correspondiente según el grupo microbiano a cuantificar (RB-hongos o TSA-bacterias), según se especifica a continuación.



Figura 10. Procedimiento de concentración de muestras para análisis de carga microbiana

A partir de las diluciones preparadas se sembraron placas Petri con agar Rosa de Bengala (RB) (Panreac) para hongos y Soja Triptona Agar (TSA) (Panreac) para bacterias. Para ello se incorporaron 0,1 mL de cada dilución en ambos medios que se distribuyeron por toda la superficie mediante el rodamiento de bolitas de vidrio estériles que se retiraron posteriormente. Las placas sembradas se incubaron a 30 °C durante 48 h en el caso de bacterias (TSA) y 5 días los hongos (RB). Tras el período de incubación se contaron las colonias y los datos se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC) por peso seco (g p.s.) de suelo o volumen (mL) de agua (UFC/g p.s. o mL), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{g}} = \frac{\text{n}^{\circ}\text{colonias} \times 10}{\text{mL sembrados}}$$

Donde:

Nº de colonias: número de colonias contadas en placas.

10ⁿ: inverso de la dilución sembrada en la placa de recuento.

mL sembrados: volumen de la dilución sembrado en placa (0,1 mL).

Para facilitar el análisis de los datos de recuento, su representación e interpretación, se calculó el logaritmo decimal, de modo que los datos se expresaron como Log UFC/g p.s. o mL.

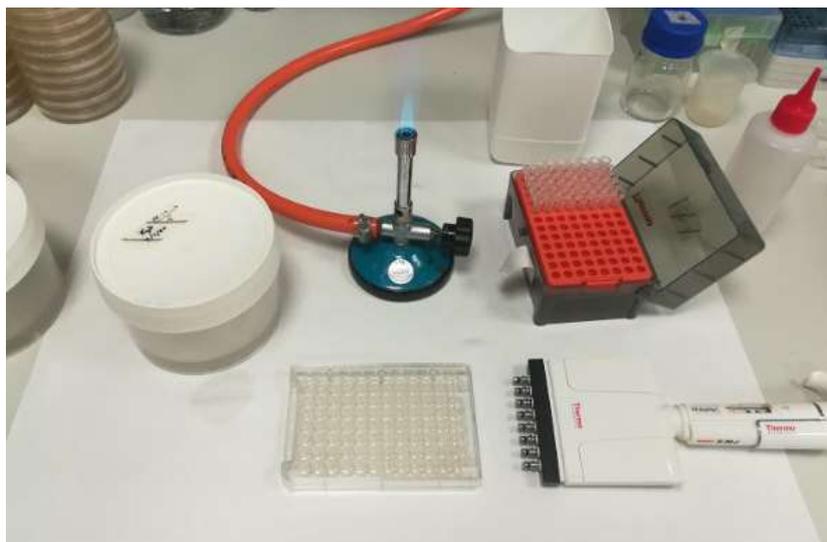


Figura 12. Material para siembra de *Biolog Ecoplate™*.

Las microplacas se incubaron a 25 °C durante 48 h en cámara de cultivo. Tras el período de cultivo, la intensidad de coloración azul indicativa de actividad frente a sustrato se analizó mediante medida de la absorbancia o densidad óptica (OD) a 590 nm en espectrofotómetro para microplacas EON Biotek (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EEUU). A partir de dicha medida (OD) se determinaron los siguientes parámetros:

- Riqueza de Sustrato (SR): indica el número de sustratos oxidados y mide la suma del número de celdas donde el valor de OD_i fue mayor de 0,15, de acuerdo con la siguiente forma:

$$SR = \sum OD_i \geq 0,15$$

- Valor medio de intensidad de color en cada pocillo (AWCD por sus siglas en inglés, average well color development), el cual es un indicador de la intensidad de la actividad metabólica de la comunidad microbiana y se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$AWCD = \sum OD_i / N$$

Donde OD_i es el valor corregido de OD (Densidad óptica) y N es el número de sustratos, en este caso $N = 31$.

- Los valores de AWCD se expresan también agrupados por tipos de sustratos mediante el parámetro SAWCD (Substrate average well color development) entendido como el desarrollo de color del pocillo promedio de sustrato basado en diferentes fuentes de carbono de naturaleza química similar (aminoácidos,

aminas, carbohidratos, ácidos carboxílicos, compuestos fenólicos y polímeros) el cual determina el potencial de las comunidades microbianas del suelo que metabolizan estos grupos de sustratos. Se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$SAWC = \sum DO_i / N$$

- Diversidad de Shannon (H), utilizado para el cálculo de la diversidad fisiológica de la comunidad bacteriana en cuestión. Se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$H' = \sum p_i (\ln p_i)$$

donde $P_i = O_{Di} / \text{suma } O_{Di}$.

3.4. Análisis de datos

Todas las mediciones se realizaron al menos por triplicado y los datos se presentan como la media. La prueba de normalidad de los conjuntos de datos se realizó mediante el de Shapiro-Wilk y, cuando fue necesario, se aplicaron transformaciones para asegurar el supuesto de parametricidad, que se validó mediante la prueba de Levene. Para todos los análisis estadísticos se empleó un nivel de significación de $p < 0,05$. La comparación de los valores medios para los niveles de pozo y profundidad se realizó mediante Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación múltiple de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD) post hoc. Adicionalmente se realizó un análisis de correlación de Spearman para establecer las relaciones existentes entre todas las variables en estudio. Los programas empleados en el análisis estadístico fueron Excel 1.10 para la estadística descriptiva y realización de gráficas y Statgraphics 18 para la estadística inferencial.

4. CUERPO DE LA MEMORIA

En los siguientes apartados se describen los resultados obtenidos en este trabajo. En primer lugar, se detallan las características distintivas de los materiales extraídos, seguidamente se describen los resultados correspondientes al análisis de la abundancia bacteriana y fúngica y su actividad metabólica y finalmente se ofrece un análisis de correlación de los distintos parámetros analizados.

4.1. Descripción de la columna de suelo y características de los materiales extraídos

Durante la extracción de los materiales a partir de los pozos 2 y 8 se anotaron las principales características de la columna y se analizó la materia orgánica y humedad en las muestras seleccionadas para este trabajo. En la Tabla 3 se recopila dicha información,

incluyendo además los datos de medida in situ de pH y Conductividad Eléctrica del agua de los pozos.

En relación con la distribución del material y perfil de los pozos, las principales observaciones fueron las siguientes:

- Capa freática: En el pozo 2 aparece a los 19 m, mientras que en el pozo 8 a los 11,5 m.
- Perfil de materiales: En los dos pozos aparece una capa de caliche, depósito edáfico endurecido de carbonato de calcio (CO_3Ca), ubicado en torno a los 2-3 m en el pozo 2 y a los 3 m en el pozo 8. A continuación de dicha capa, en el pozo 2 se observa una capa homogénea de arcillas grises que alcanza los 26 m. Por el contrario, en el pozo 8, la capa inferior es más heterogénea, incluyendo por debajo del depósito de caliche, 6-7m de arcilla roja, seguido de 3-4 m de arena, y 10 m de arcillas marrones. Las arcillas grises aparecen a los 25 m.

El agua de los dos pozos tuvo un pH cercano a la neutralidad, 7,8 en el pozo 2 y 7,4 en el pozo 8. Por el contrario, la conductividad eléctrica fue más elevada en el pozo 2 (8,9 mS/cm) que en el pozo 8 (3,6 mS/cm), probablemente debido a una mayor influencia marina en el primero, extremo que debe comprobarse.

Respecto al contenido en materia orgánica de las muestras de suelo a distintos niveles de profundidad, los valores estuvieron en el rango de 0,4 a 2,7 % con una media de 1,4%, sin diferencias significativas globales entre los dos pozos. No obstante, el patrón de acuerdo con la profundidad fue diferente en los dos pozos. En el pozo 2, el contenido en materia orgánica fue disminuyendo con la profundidad hasta los 20 m, y por debajo de dicho nivel, en el que aparece la capa freática, experimentó un nuevo incremento a niveles incluso superiores a los obtenidos en la capa más superficial. En el pozo 8, las variaciones del contenido en materia orgánica fueron más heterogéneas, los niveles mayores (alrededor de 2,5 %) se obtuvieron en las capas superficial (1m) y la correspondiente a arcillas marrones (20 m), mientras que los inferiores (alrededor de 0,8%) se encontraron en la capa de caliche (3m) y la capa más profunda con arcillas grises (26 m). Es importante destacar que la cantidad de materia orgánica que presente el suelo va a condicionar la abundancia y actividad microbiana, ya que es el sustento principal de las poblaciones heterótrofas.

Por su parte la humedad del material fue muy variable entre las distintas capas de los dos pozos y fluctuó en un amplio rango de valores, 3 a 34%. En el pozo 2 las muestras con mayor humedad fueron aquellas extraídas de profundidades a las que se encontraba la capa freática (>20 m), sin embargo, en el pozo 8, dicha característica no condujo a muestras con mayor contenido en humedad, probablemente por aspectos relacionados con la conservación y transporte de la muestra. En cualquier caso, este parámetro no se puede considerar muy fiable para definir las características de las muestras, dado que, como se ha indicado, puede sufrir oscilaciones derivadas de las condiciones de extracción, transporte y conservación. Por ello, en este trabajo, la humedad se ha considerado como mero indicativo y se empleó, principalmente, para ajustar los valores de otros parámetros a peso seco de muestra.

Tabla 3. Características de los materiales y agua de los pozos 2 y 8

Pozo	Suelo				Agua	
	Profundidad (m)	Materia orgánica (%)*	Humedad (%)*	Tipo de material	pH	CE (mS/cm)
2	1	1,73±0,22 B	6,39±0,95 D	Suelo	7,8	8,9
	3	1,64±0,26 B	5,12±0,66 D	Capa de caliche		
	5	0,55±0,07 D	6,15±0,25 D	Capa homogénea de arcillas grises		
	10	0,96±0,09 C	11,57±0,64 C			
	20**	0,81±0,08 CD	15,89±1,4 B			
	38	2,24±0,09 A	33,94±1,3 A			
8	1	2,41±0,21 a	9,84±0,58 c	Suelo	7,4	3,6
	3	0,88±0,05 c	2,94±0,15 f	Capa de caliche		
	5	1,24±0,01 b	11,27±1,26 b	Arcillas rojas		
	10**	1,32±0,32 b	7,72±0,83 d	Arenas		
	20	2,51±0,24 a	26,43±0,67 a	Arcillas marrones		
	26	0,76±0,09 c	5,69±0,32 e	Arcillas grises		

* Los valores son la media de tres determinaciones ± desviación estándar. Valores en la misma columna con diferente letra indican diferencias significativas según el test LSD Fisher ($p < 0,05$).

** Nivel de la capa freática.

4.2 Efecto de la profundidad y la influencia de *Ziziphus lotus* sobre la carga bacteriana y fúngica

El análisis de la carga bacteriana y fúngica de cualquier muestra requiere de su recogida en condiciones tales que se evite la contaminación por parte de microorganismos del entorno circundante a la misma o de otros materiales que se encuentren en contacto con ella. El sistema de recogida empleado en este trabajo (ver apartado 3) implica el uso de agua necesaria para realizar el dragado. Esta circunstancia, unida a la inevitable mezcla de materiales durante la extracción, conducen a una contaminación de la muestra que debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados. Para intentar paliar dicho efecto y restar interferencias, se analizó el contenido microbiano del agua empleada en el dragado que arrojó valores de 4 Log UFC/mL para bacterias y nulos para hongos, con resultados casi idénticos en el agua empleada en el dragado de los dos pozos. De acuerdo con ello, podemos considerar que, a efectos de comparación entre las muestras de los dos pozos, la contribución de la carga del agua no resulta importante.

Por otra parte, es preciso enfatizar que las técnicas analíticas empleadas en este trabajo para la determinación de la carga microbiana permiten cuantificar exclusivamente la microbiota cultivable aerobia y anaerobia facultativa. Dicha población supone un porcentaje muy reducido respecto a la población real, para cuya aproximación es

necesario emplear técnicas metagenómicas (Mocali y Benedetti, 2010). Por otra parte, se obvia la población anaerobia cultivable que, en hábitats como los sometidos a estudio, pueden representar un importante porcentaje, principalmente en capas profundas y por debajo de la correspondiente al nivel freático (Gagliano et al., 2020). A pesar de todos estos inconvenientes, se considera que la información que suministran los análisis efectuados en este trabajo resulta valiosa como una primera aproximación al estudio de la microbiota en los ecosistemas singulares analizados.

En la Figura 13 se muestra una comparativa de los valores de carga bacteriana en los dos pozos. Los niveles de bacterias en las muestras oscilaron entre 6 y 7,5 (Log UFC/g) y sus valores medios fueron significativamente superiores en las muestras del pozo 2, con un valor de 7 (Log UFC/g), que en las del pozo 8, en la que se alcanzó un valor de 6,5 (Log UFC/g) (Figura 13).

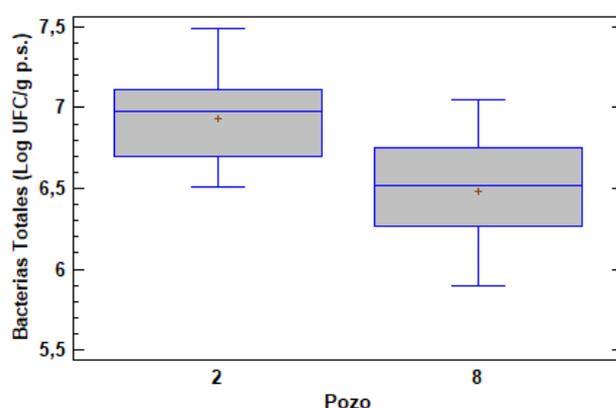


Figura 13. Comparación de la carga bacteriana (Log UFC/g) entre las muestras de suelo del pozo 2 (azufaifo próximo) y el pozo 8 (azufaifo lejano). El gráfico de cajas y bigotes representa la media (+), mediana (línea en el interior de la caja), la caja que incluye los valores entre el cuartil 1 (25% de los datos) y cuartil 3 (75% de los datos) y los bigotes (valores máximo y mínimo).

La distribución de la carga bacteriana en función de la profundidad se muestra en la Figura 14 para los dos pozos. En ambos casos se obtuvieron niveles relativamente elevados de recuentos bacterianos en todas las profundidades analizadas y significativamente diferentes de acuerdo a dicho factor, sin embargo, la tendencia fue distinta en los dos pozos. En el pozo 2, la carga bacteriana disminuyó progresivamente al aumentar la profundidad, desde el valor máximo de 7,5 (Log UFC/g), correspondiente al primer metro, hasta valores en torno a 6,5 (Log UFC/g) en las muestras más profundas (20 y 38 metros). Por el contrario, en el pozo 8, los recuentos bacterianos se redujeron en los 3 primeros metros respecto a los valores máximos obtenidos en la muestra más superficial (1 m), pero se incrementaron en capas más profundas (> 5 m), en las que alcanzaron valores en torno a 6,5 (Log UFC/g) o incluso iguales a los obtenidos en la muestra superficial (20 m). Estos patrones pueden estar relacionados con los perfiles de materiales dispares entre los dos pozos, más o menos homogéneos y con un gradiente de concentración de materia orgánica en profundidad decreciente en el pozo 2, y muy

heterogéneo y con fluctuaciones en contenido en materia orgánica entre las distintas capas del pozo 8 (Tabla 3).

En cualquier caso, aparte de la contribución de las características de los materiales de la columna de suelo a los niveles bacterianos obtenidos, es preciso destacar que, para casi para todos los niveles de profundidad se obtuvo una mayor abundancia de bacterias en el pozo 2, próximo a azufaifo que en el pozo 8, lejano a azufaifo.

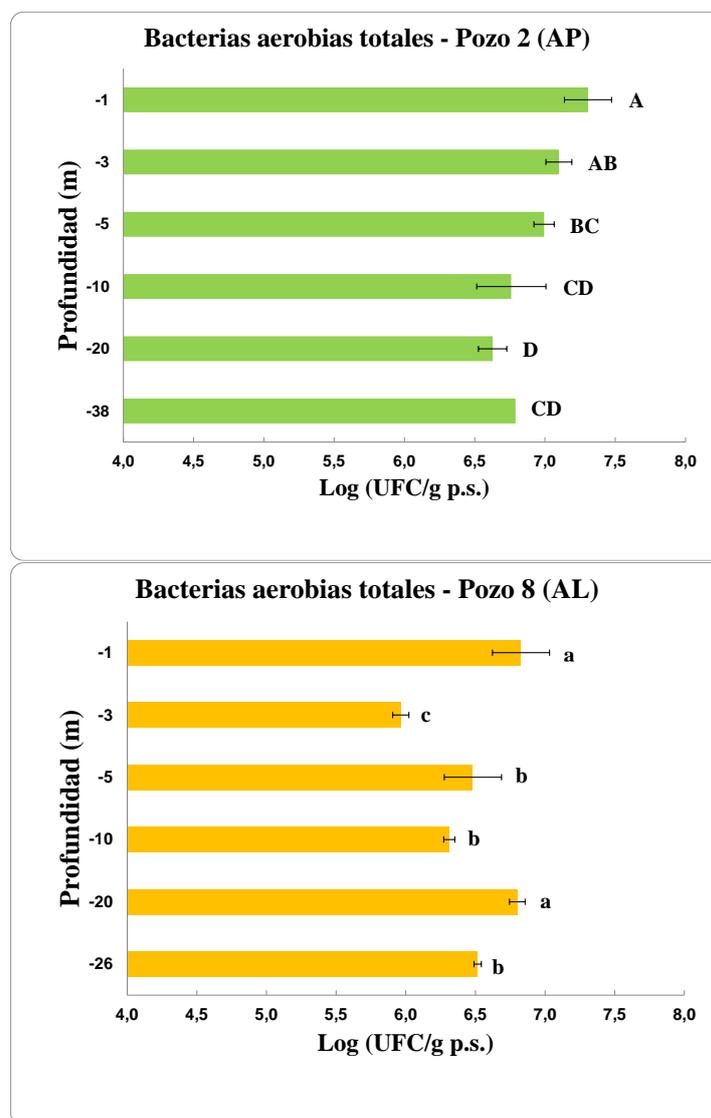


Figura 14. Recuento de las bacterias aerobias totales en función de la profundidad expresado en Log (UFC/g p.s.). Pozo 2 con azufaifo próximo (AP) y Pozo 8 con azufaifo lejano (AL). Las barras de error representan la desviación estándar. Barras con diferente letra indican diferencias significativas según el test LSD Fisher ($p < 0,05$).

En el caso de los hongos no se obtuvieron diferencias significativas en los recuentos para los dos pozos (Figura 15). Este grupo microbiano sólo se detectó en ambos pozos en las dos muestras más superficiales analizadas (1 y 3 m), alcanzando los máximos niveles en a 1 m de profundidad (alrededor de 4 Log UFC/g) y un descenso significativo a los 3 m (3-3,5 Log UFC/g) (Figura 16). El patrón fue muy similar en los dos pozos. Esta distribución no resulta sorprendente habida cuenta de los reconocidos requerimientos de

oxígeno de dicho grupo microbiano y de su dependencia de la presencia de materia orgánica, más abundante en las capas superficiales (Tabla 3).

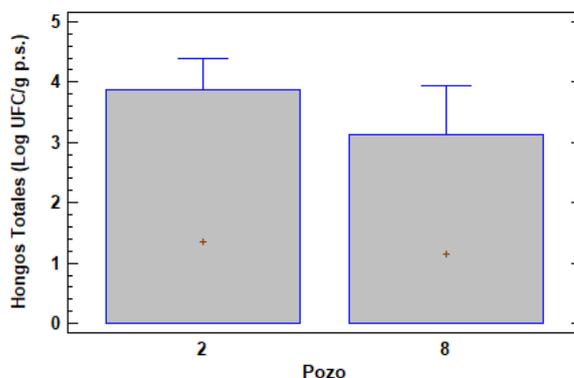


Figura 15. Comparación de la carga fúngica (Log UFC/g) entre las muestras de suelo del pozo 2 (azufaifo próximo) y el pozo 8 (azufaifo lejano). El gráfico de cajas y bigotes representa la media (+), mediana (línea en el interior de la caja), caja que incluye los valores entre el cuartil 1 (25% de los datos) y cuartil 3 (75% de los datos) y los bigotes (valores máximo y mínimo).

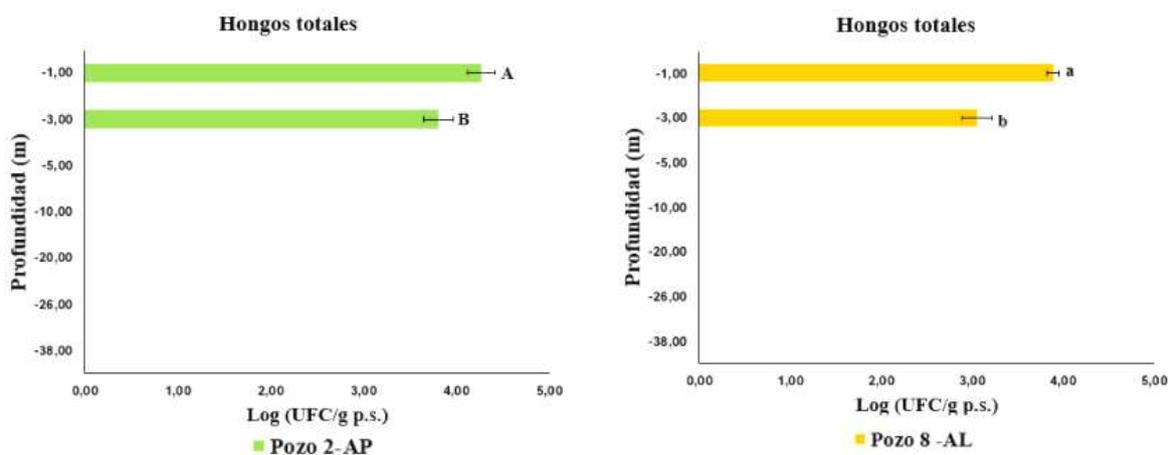


Figura 16. Recuento de hongos totales en función de la profundidad expresado en Log (UFC/g p.s.) Pozo 2 con azufaifo próximo (AP) y Pozo 8 con azufaifo lejano (AL). Las barras de error representan la desviación estándar. Barras con diferente letra indican diferencias significativas según el test LSD Fisher ($p < 0,05$)

4.3. Efecto de la profundidad y la influencia de *Ziziphus lotus* sobre la biodiversidad funcional

La biodiversidad funcional está relacionada con la diversidad de actividades metabólicas que es capaz de desarrollar la comunidad microbiana presente en las muestras analizadas. Estas actividades se analizaron en este trabajo empleando Biolog Ecoplates, que permiten sondear la capacidad de las comunidades microbianas para metabolizar un total de 31 fuentes carbonadas diferentes. Los resultados de esta analítica permiten determinar diversos parámetros tales como riqueza de sustratos susceptibles de ser metabolizados (R), intensidad de la actividad metabólica global (AWCD) o agrupada por grupos de sustratos (SAWCD) y

el índice de biodiversidad de Shannon (H), que en este caso informa de la biodiversidad funcional. Los resultados obtenidos para tales parámetros se describen a continuación.

La riqueza de sustrato mide básicamente el número de sustratos de entre los 31 analizados que son susceptibles de ser metabolizados por la microbiota de las muestras analizadas. Los resultados para este parámetro se representan en la Figura 17, tanto para la comparativa global entre pozos como para la distribución del mismo en profundidad. En general, la población microbiana de las muestras del pozo 2 fueron capaces de utilizar más sustratos carbonados que las del pozo 8, pero en el primer caso dicha capacidad fue decreciendo conforme se incrementó la profundidad, mientras que en el pozo 8 experimentó escasa variación respecto a dicho factor. En la capa más superficial (1 m), la comunidad microbiana del pozo 2 fue capaz de metabolizar más de 20 fuentes carbonadas frente a las menos de 15 detectadas para las muestras del pozo 8. En la capa más profunda (20 m) la comunidad del pozo 2 sólo fue capaz de metabolizar unas dos fuentes carbonadas mientras que en el pozo 8 se mantuvo el número de sustratos.

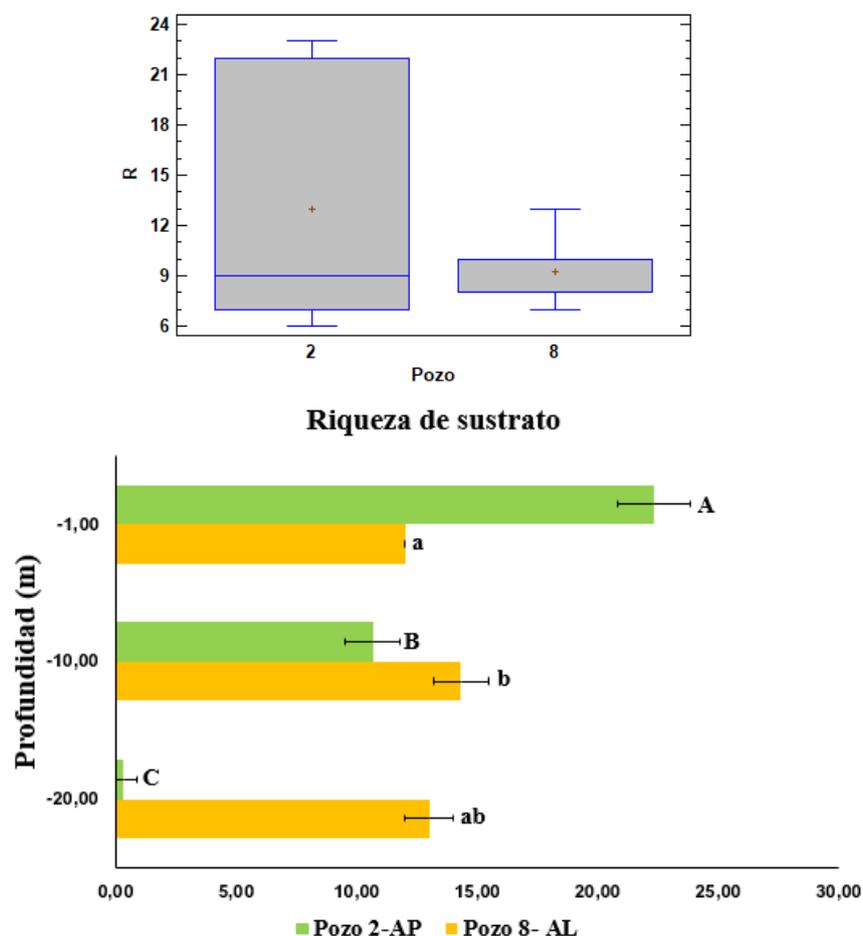


Figura 17. Riqueza de Sustrato (R) de la comunidad microbiana en los dos pozos (superior) y en función de la profundidad (inferior), empleando la técnica *Biolog Ecoplate*TM. Pozo 2 con azufaifo próximo (AP) y Pozo 8 con azufaifo lejano (AL). Las barras de error representan la desviación estándar. Barras con diferente letra indican diferencias significativas según el test LSD Fisher ($p < 0,05$).

En la Figura 18 se muestran los resultados de intensidad de actividad metabólica, expresada mediante el parámetro AWCD (Average well color development), para los dos pozos y su distribución en profundidad. En general se obtuvo una mayor intensidad metabólica en el pozo 2 que en el pozo 8, principalmente en la capa superior (1m) e intermedia (10 m), pero fue similar en ambos casos para la capa más profunda (20 m). En los dos pozos, la intensidad metabólica decreció con la profundidad, y resulta notable los elevados valores obtenidos en la muestra superficial (1 m) del pozo 2 ($>0,5$) en comparación con los correspondientes a la muestra del pozo 8 en la misma capa ($<0,2$). Aunque, en principio, dichas diferencias pudieran atribuirse a la presencia de niveles distintos de contenido en materia orgánica, que induciría y promocionaría la existencia de una comunidad con mayor potencialidad y actividad metabólica, lo cierto es que la capa superficial de los dos pozos presenta contenidos similares en materia orgánica, incluso mayores en el pozo 8. Por tanto, existen otros factores derivados, probablemente, de la diferente composición de dicha fracción que podrían explicar las diferencias observadas.

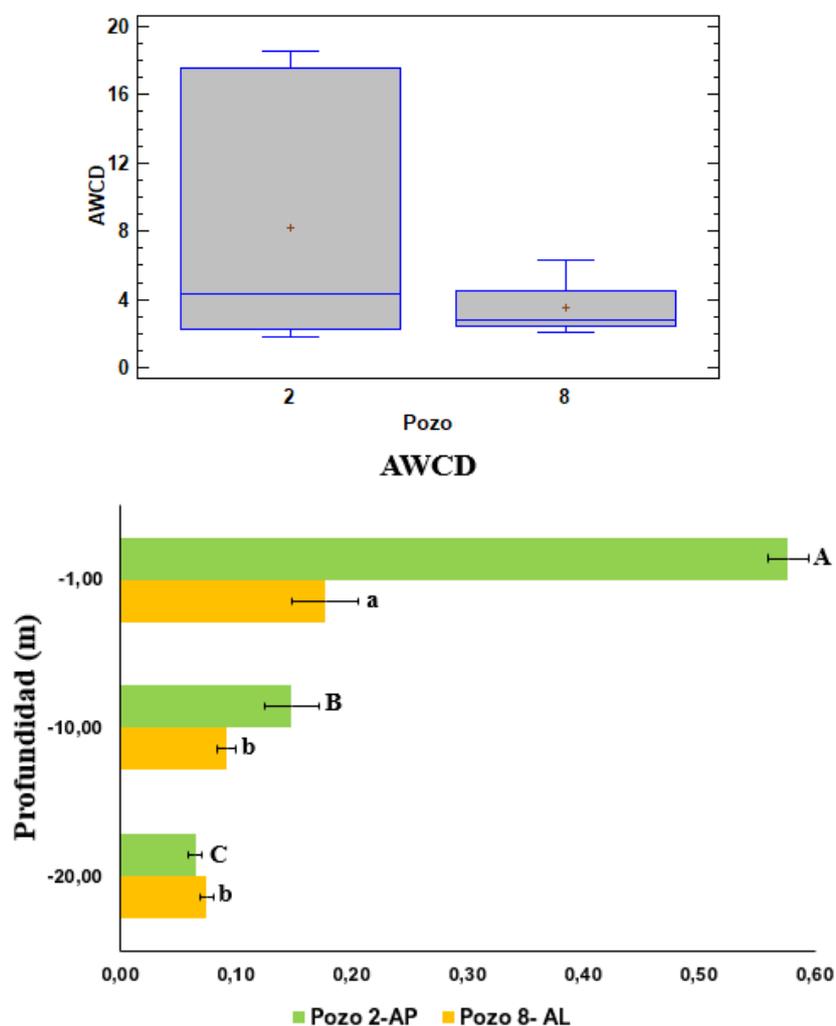


Figura 18. Intensidad de la actividad metabólica de la comunidad microbiana (AWCD) en los dos pozos (superior) y en función de la profundidad (inferior) empleando la técnica *Biolog Ecoplate*TM. Pozo 2 con azufaifo próximo (AP) y Pozo 8 con azufaifo lejano (AL). Las barras de error representan la desviación estándar. Barras con diferente letra indican diferencias significativas según el test LSD Fisher ($p < 0,05$).

La biodiversidad funcional calculada mediante el Índice de Shannon (H) para las muestras de los dos pozos y a distintas profundidades se representa en la Figura 19. Este parámetro alcanzó niveles medios similares en ambos pozos, y su rango estuvo entre 2 y 3. El patrón en profundidad fue diferente entre los dos pozos. En el pozo 2 disminuyó con la profundidad, desde un valor cercano a 3 a 1 m a 0,6 a los 20 m, mientras que en el pozo 8, aunque experimentó fluctuaciones al profundizar sus niveles oscilaron muy poco, variando entre 2 y 2.6.

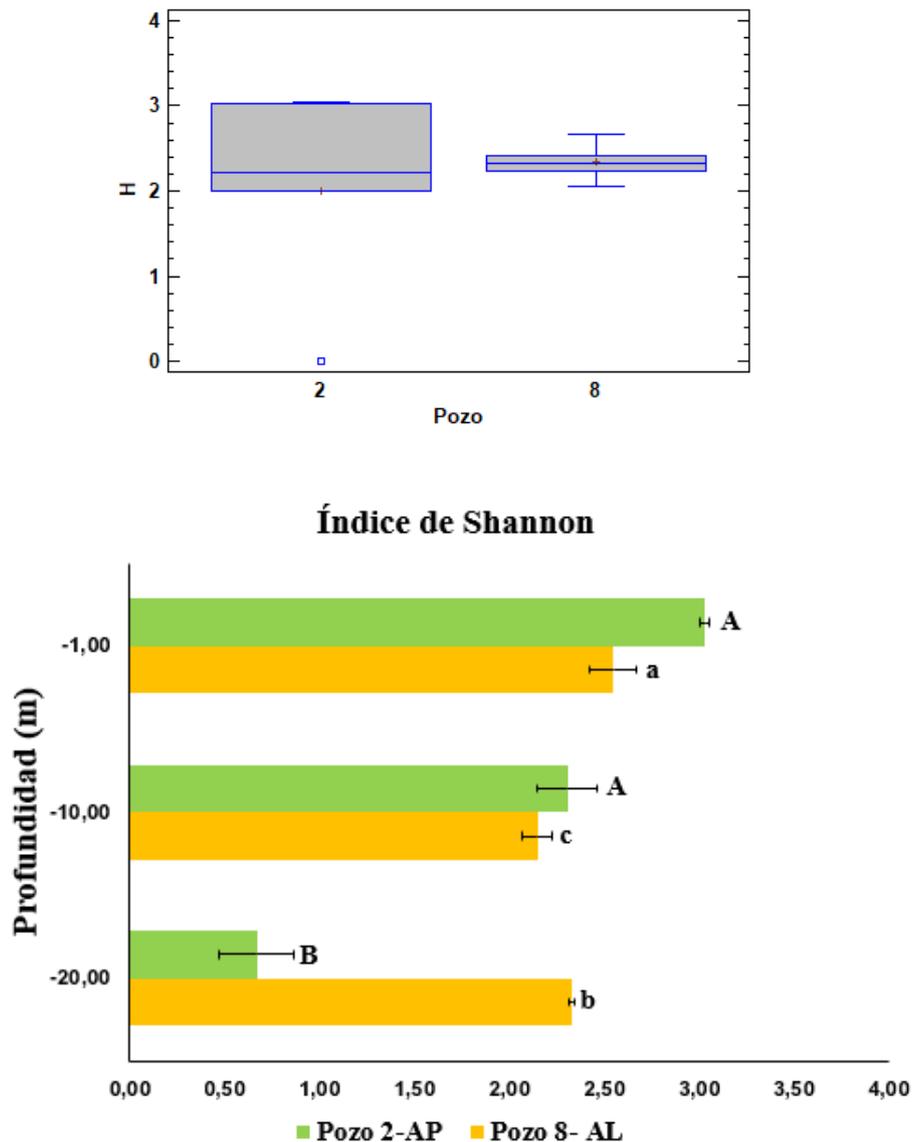


Figura 19. Biodiversidad funcional (Índice de Shannon-H) de la comunidad microbiana en los dos pozos (superior) y en función de la profundidad (inferior) empleando la técnica *Biolog Ecoplate*TM. Pozo 2 con azufaifo próximo (AP) y Pozo 8 con azufaifo lejano (AL). Las barras de error representan la desviación estándar. Barras con diferente letra indican diferencias significativas según el test LSD Fisher ($p < 0,05$).

Para establecer las actividades metabólicas dominantes en cada una de las muestras se calculó el índice SAWCD (Substrate average color development) mediante el que las intensidades o abundancia de actividad metabólica obtenida para las 31 fuentes carbonadas empleadas en la técnica se agrupan en seis categorías (ácidos carboxílicos, aminas, aminoácidos, fenólicos y polímeros). Esta agrupación permite obtener un patrón o perfil fisiológico a nivel de comunidad que puede ser característico para cada tipo de muestra. En la Figura 20 se muestran dichos resultados representados para cada uno de los grupos de actividades como porcentaje del total de intensidad de actividad. En general se observan patrones diferentes según las muestras consideradas. En el pozo 2 destaca la presencia de todas las actividades analizadas y en proporciones similares o balanceadas en la capa superficial (1m), a diferencia de lo que ocurrió en la muestra del pozo 8, en el que las actividades relacionadas con el metabolismo de ácidos carboxílicos y polímeros dominaron respecto a las otras cuatro actividades. Esto puede estar relacionado, como se comentó previamente, con la diferente cualidad de la materia orgánica presente en el suelo de las dos ubicaciones.

Respecto a la distribución de actividades según profundidad, en el pozo 2, la actividad degradativa de polímeros aumenta con la profundidad desde un 15 % hasta más del 50%. Sin embargo, los microorganismos con preferencias por aminas, carbohidratos y los compuestos fenólicos disminuyen hasta desaparecer en algunos casos. Los ácidos carboxílicos presentan una fluctuación a los 10 metros en los que su porcentaje aumenta originando una heterogeneidad de valores sin una tendencia clara. En el pozo 8, el perfil fisiológico no presenta un patrón definido por la variación en profundidad, aunque destaca por una parte la similitud de patrón entre la capa superior (1 m) y la inferior (20 m) y la presencia de todas las actividades en todos los niveles estudiados.

Estos resultados requieren de un estudio más profundo que permita relacionar las actividades dominantes en cada uno de los entornos con el impacto de las mismas sobre aspectos relevantes del ecosistema tales como captación/emisión de carbono consecuencia de procesos de mineralización/humificación de la materia orgánica o con la capacidad del sistema para responder a perturbaciones.

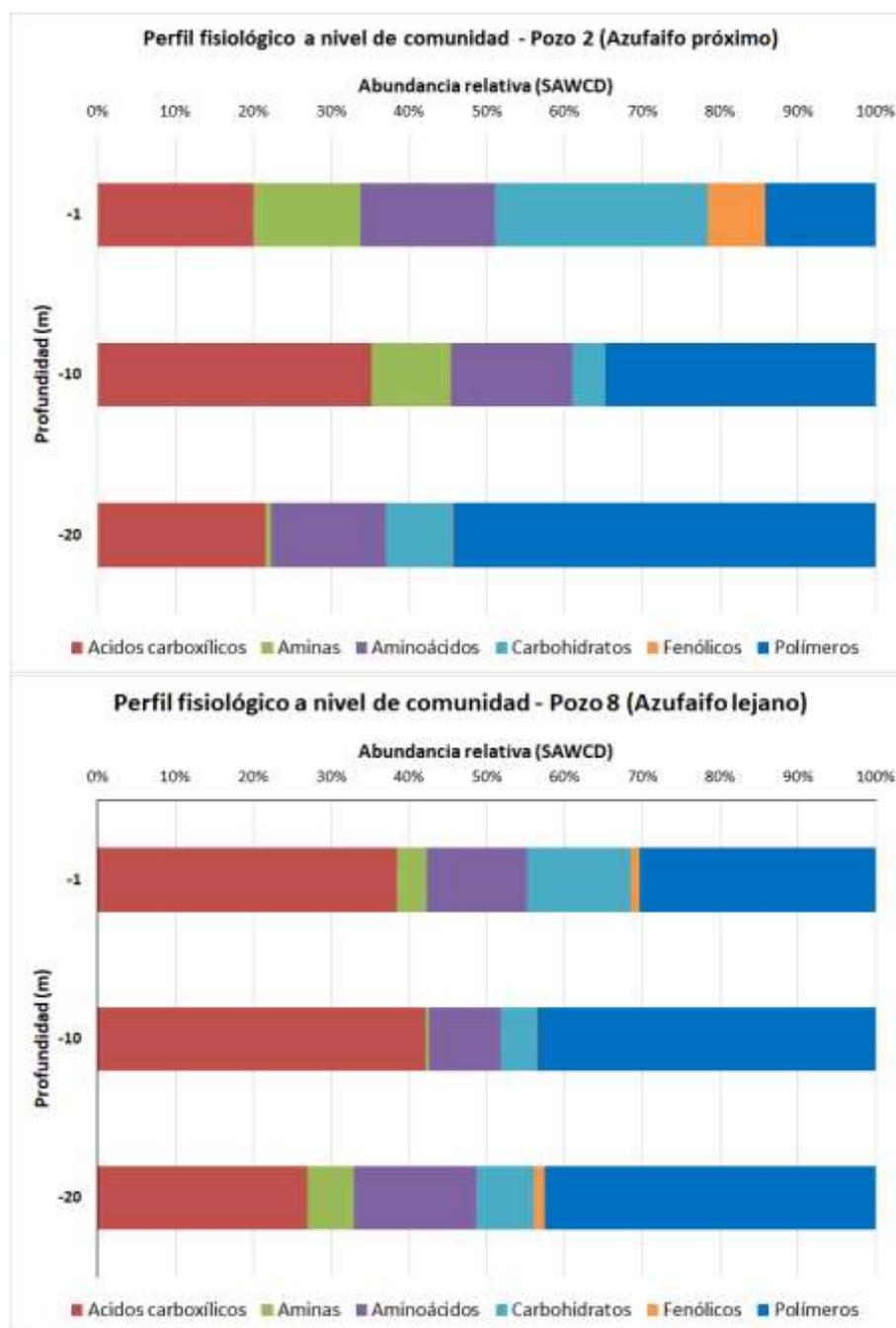


Figura 20. Perfil fisiológico a nivel de comunidad (SAWCD) en función de la profundidad obtenido empleando la técnica Biolog Ecoplate™. Pozo 2 con azufaifo próximo (AP) y Pozo 8 con azufaifo lejano (AL).

4.4. Análisis de correlación

Para establecer la relación existente entre las variables en estudio se llevó a cabo un análisis de correlación de Spearman cuya matriz se muestra en la Figura 21 diferenciada para los resultados obtenidos en cada uno de los pozos. Tal y como se infiere de la visualización global de ambas matrices, la mayoría de parámetros estuvieron correlacionados positivamente entre sí y negativamente con la profundidad en el pozo 2, mientras que las correlaciones fueron muy variables o estuvieron ausentes en el caso del

pozo 8. En este caso, destaca especialmente la ausencia de correlación entre la profundidad y varios parámetros, lo que pone de manifiesto la heterogeneidad de resultados o ausencia de patrón con la profundidad descrita en los apartados precedentes y que se atribuye a las variaciones en las características de los materiales de las distintas capas analizadas.

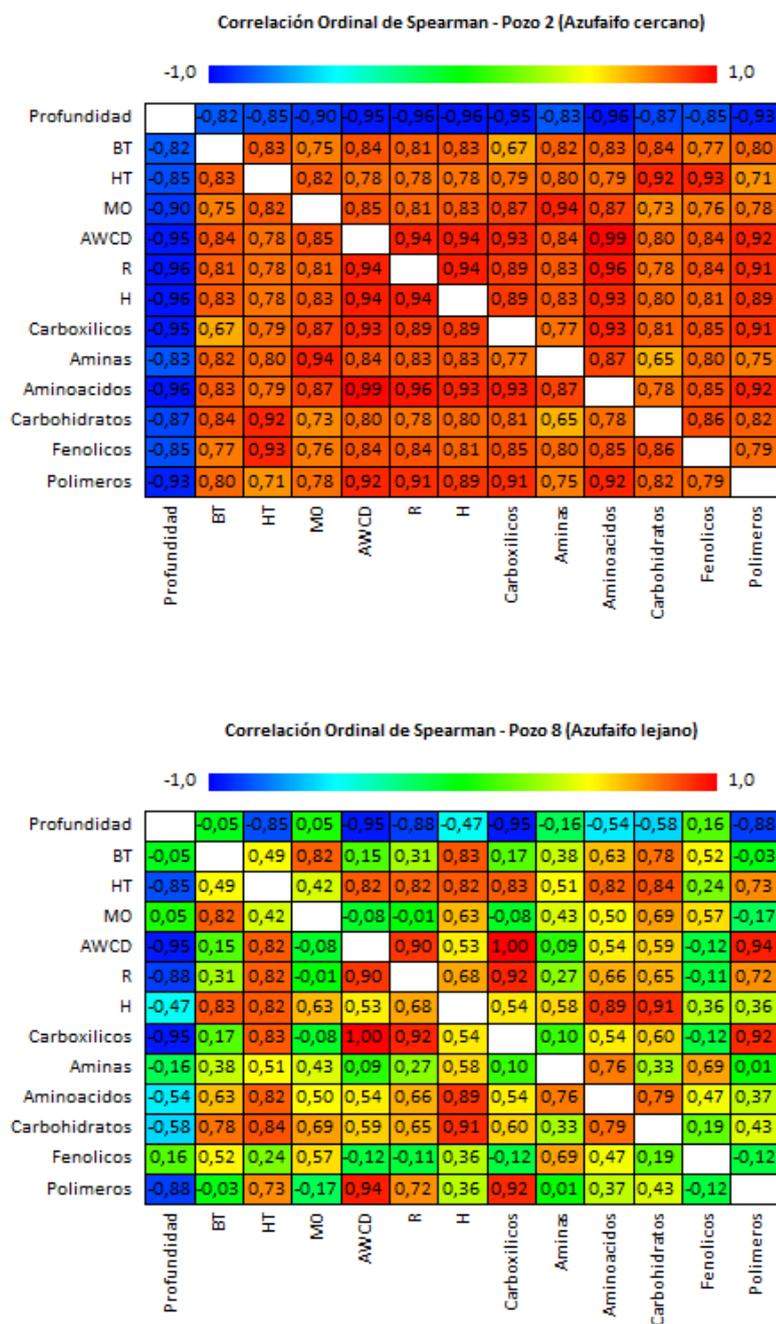


Figura 21. Análisis de correlación de las variables. Pozo 2 con azufaifo próximo (AP) y Pozo 8 con azufaifo lejano (AL).

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permitieron extraer las siguientes conclusiones:

1. La población bacteriana es más abundante en suelo próximo a azufaifo que en suelo lejano a dicha especie.
2. El patrón de distribución vertical de las comunidades bacterianas se encuentra más determinado por la estructura y composición de las diferentes capas que conforman el perfil geológico del subsuelo que por la influencia de *Ziziphus lotus*.
3. El azufaifo produce una influencia positiva en la biodiversidad funcional y en el balance de actividades metabólicas microbianas, principalmente en los primeros metros del suelo, aunque dicho efecto se pierde al aumentar la profundidad.

6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el marco de la Plataforma LTSER "La Plataforma LTSER del Sureste Ibérico Árido - España (LTER_EU_ES_027)", el proyecto LIFE Adaptamed (LIFE14349 CCA/ES/000612), y el proyecto RTI2018-102030-B-I00 de la Universidad de Almería (PPUENTE2020/001). Las tareas de determinación microbiológica se realizaron en el laboratorio de Microbiología del Dpto. de Biología y Geología de la Universidad de Almería, y con el apoyo del Centro Andaluz para la Evaluación y Seguimiento del Cambio Global (CAESCG).

Agradezco en primer lugar el esfuerzo de mis tutores María José López López y a Francisco Javier Cabello Piñar ya que sin ellos esto no habría sido posible, a mis compañeros de laboratorios sobre todo a María Rosa Martínez Gallardo que me ayudaron de forma incondicional a realizar los análisis de este trabajo. Y por último y no menos importante el apoyo constante de mis amigos y familia que me han ayudando a lo largo de este bonito viaje del cual atesorare muchos recuerdos, sonrisas y llantos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Akashah, O., Neale, C., y Jayanthi, H. (2008). Detailed mapping of riparian vegetation in the middle Rio Grande River using high resolution multi-spectral airborne remote sensing. *Journal of Arid Environments*, 72(9), 1734-1744.
- Alden, L., Demoling, F., y Baath, E. (2001). Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soil. *Appl Environ Microbiol*, 67: 1830–1838.
- Andalucía. Ley 8/2018, de 8 de octubre, de medidas frente al cambio climático y para la transición hacia un nuevo modelo energético en Andalucía. Boletín Oficial del Estado, 7 de noviembre de 2018, núm. 269, pp: 108161-108201.
- Bever, J.D. (2003). Soil community feedback and the coexistence of competitors: conceptual frameworks and empirical tests. *New Phytologist*, 157: 465-473.

- Bonkowski, M., Villenave, C., y Griffiths, B. (2009). Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant Soil*, 321: 213–233.
- Boulton, A., Fenwick, G., Hancock, P., y Harvey, M. (2008). Biodiversity, functional roles and ecosystem services of groundwater invertebrates. *Invertebrate Systematics*, 22(2), 103
- Bowen, G.D. y Rovira, A.D. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*, 66: 1–102.
- Buee, M., De Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L., y Jurkevitch, E. (2009). The rhizosphere zoo: an overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil*, 321: 189–212.
- Cancio, I., González-Robles, A., Bastida, J., Isla, J., Manzaneda, A., Salido, T., y Rey, P. (2017). Landscape degradation affects red fox (*Vulpes vulpes*) diet and its ecosystem services in the threatened *Ziziphus lotus* scrubland habitats of semiarid Spain. *Journal of Arid Environments*, 145: 24-34.
- Darrah, P.R. (1993). The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil*, 155/156: 3–22
- Demoling, F., Figueroa, D. y Baath, E. (2007). Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils. *Soil Biol Biochem*, 39: 2485–2495.
- Eamus, D., y Froend, R. (2006). Groundwater-dependent ecosystems: the where, what and why of GDEs. *Australian Journal of Botany*, 54 (2): 91.
- Eilers, K., Debenport, S., Anderson, S., y Fierer, N. (2012). Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 50: 58-65.
- Ekelund, F., Ronn, R., y Christensen, S. (2001). Distribution with depth of protozoa, bacteria and fungi in soil profiles from three Danish forest sites. *Soil Biology & Biochemistry*, 33: 475-481.
- España. Directiva 92/43/CEE Del Consejo de 21 de mayo de 1992 *relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres*. Boletín Oficial del Estado, 22 de julio, núm. 206, pp: 7-50.
- Fierer, N., Chadwick, O.A., y Trumbore, S.E. (2005). Production of CO₂ in soil profiles of a California annual grassland. *Ecosystems*, 8: 412-429.
- Fray, R. G. (2002). Altering plant–microbe interactions through artificially manipulating bacterial quorum sensing. *Annals of Botany*, 89: 245–253.
- Fritze, H., Pietikäinen, J., y Pennanen, T. (2000). Distribution of microbial biomass and phospholipid fatty acids in Podzol profiles under coniferous forest. *European Journal of Soil Science*, 51: 565-573.

- Gagliano, A. L., Calabrese, S., Daskalopoulou, K., Kyriakopoulos, K., Tagliavia, M., y D'Alessandro, W. (2020). Methanotrophy in geothermal soils, an overlooked process: The example of Nisyros island (Greece). *Chemical Geology*, 539: 119546.
- Gans, J., Wolinsky, M., y Dunbar, J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309: 1387–1390.
- Gibert J., Dole-Olivier M.J., Marmonier P., y Vervier P. (1990) Surface water – groundwater ecotones. In: The Ecology and Management of Aquatic-Terrestrial Ecotones (Eds R.J. Naiman & H. De ´camps), pp. 199–225. UNESCO Paris and Parthenon Publishing Group, Carforth.
- Gorai, M., Maraghni, M. and Neffati, M. (2010). The relationship between phenological traits and water potential patterns of the wild jujube *Ziziphus lotus* in southern Tunisia. *Plant Ecology & Diversity*, 3: 273–280.
- Gregory, P. (2006). Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science?. *European Journal of Soil Science*, 57 (1): 2-12.
- Griebler, C. y Lueders, T. (2009). Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 54: 649–677.
- Griebler, C., Malard, F., y Lefébure, T. (2014). Current developments in groundwater ecology—from biodiversity to ecosystem function and services. *Current Opinion In Biotechnology*, 27: 159-167.
- Guirado Hernández E. (2013). Factores que afectan a la distribución espacial de vegetación freatofita (*Ziziphus lotus*) en el acuífero costero de Torre García (sureste de España). Trabajo Fin de Máster. Universidad de Almería. Almería.
- Guirado, E., Alcaraz-Segura, D., Rigol-Sánchez, J., Gisbert, J., Martínez-Moreno, F., Galindo-Zaldívar, J. *et al.* (2018). Remote-sensing-derived fractures and shrub patterns to identify groundwater dependence. *Ecohydrology*, 11 (6): 1933.
- Hansel, C. M., Fendorf, S., Jardine, P. M., y Francis, C. A. (2008). Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1620-1633.
- Harman, C., Lohse, K., Troch, P., y Sivapalan, M. (2014). Spatial patterns of vegetation, soils, and microtopography from terrestrial laser scanning on two semiarid hillslopes of contrasting lithology. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 119(2), 163-180.
- Hartmann, M., Lee, S., Hallam, S. J., y Mohn, W. W. (2009). Bacterial, archaeal and eukaryal community structures throughout soil horizons of harvested and naturally disturbed forest stands. *Environmental Microbiology*, 11: 3045-3062.
- Hinsinger, P., Bengough A. G., Vetterlein D., y Young I. M. (2009). Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, 321: 117-152.

- Ibañez, J. (2018). *La Zona Vadosa y la Zona Crítica Terrestre (zona de aireación, zona no saturada, regolito y nappa) (Conceptos y Definiciones)*. Consultado: 14 de julio de 2020. <https://www.madrimasd.org/blogs/universo/2018/10/23/149164>
- Jones, D.L., Hodge, A., y Kuzyakov, Y. (2004). Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist*, 163: 459–480.
- Kløve, B., Ala-aho, P., Bertrand, G., Boukalova, Z., Ertürk, A., y Goldscheider, N. *et al.* (2011). Groundwater dependent ecosystems. Part I: Hydroecological status and trends. *Environmental Science & Policy*, 14 (7): 770-781.
- López-Rodríguez, M., Salinas-Bonillo, M., Torres, M., Pachecho-Romero, M., Guirado, E., Castro Nogueira, H., y Cabello, J. (2020). Launching collective science-policy-society strategies to conserve the *Ziziphus lotus* habitat (Priority Habitat 5220). *Ecosistemas*, 29 (1): 1890.
- Lynch, J. M. (1990). *The Rhizosphere*. Nueva York. John Wiley & Sons. ISBN: 04-719-2548-9.
- Mathesius, U. (2003). Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes – the Rhizobium-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. *Plant and Soil*, 255: 105–119.
- Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D., y Defago, G. (1992). Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*, 82: 190–195.
- Meeting, F.B. (1992). *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Washington. Marcel Dekker, Inc. ISBN: 08-247-8737-4.
- Mocali, S., y Benedetti, A. (2010). Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, 161 (6): 497-505.
- Murray, B. R., Hose, G. G., Eamus, D. y Licari, D. (2006). Valuation of groundwater-dependent ecosystems: a functional methodology incorporating ecosystem services. *Australian Journal of Botany*, 54: 221–229.
- Murray, B. R., Zeppel, M. J., Hose, G. C., y Eamus, D. (2003). Groundwater dependent ecosystems in Australia: it's more than just water for rivers. *Ecological Management & Restoration*, 4: 110–113.
- Paterson, E. (2003). Importance of rhizodeposition in the coupling of plant and microbial productivity. *European Journal Of Soil Science*, 54(4), 741-750.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., y Moenne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*, 321: 341–361.

- Rousk, J. y Baath, E. (2007). Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios. *FEMS Microbiology and Ecology*, 62: 258–267.
- Rumpel, C., y Kogel-Knabner, I. (2011). Deep soil organic matter—a key but poorly understood component of terrestrial C cycle. *Plant and Soil*, 338: 143–158.
- Tirado, R. (2009). 5220 Matorrales arborescentes con *Ziziphus* (*) (Disponible: http://www.jolube.es/Habitat_Espana/documentos/5220.pdf). En: VV.aa., Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. 68 p.
- Torres-García, M.T., Salinas-Bonillo, M.J., Gázquez-Sánchez, F., Fernández-Cortés, A., Querejeta, J.I., y Cabello, J. 2020. Squandering Water in Drylands: The Water Use Strategy of the Phreatophyte *Ziziphus lotus* (L.) Lam in a Groundwater Dependent Ecosystem. *American Journal of Botany* (aceptado).
- Torsvik, V., Sorheim, R., y Goksoyr, J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 170–178.
- Trumbore, S. (2000). Age of soil organic matter and soil respiration: radiocarbon constraints on belowground C dynamics. *Ecological Applications*, 10: 399–411.
- Uroz, S., Buée, M., Murat, C., Frey-Klett, P., y Martin, F. (2010). Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environmental Microbiology Reports*, 2(2), 281–288.
- Van der Heijden, M. G. A., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T. *et al.* (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396: 72–75.
- Van der Heijden, M., Bardgett, R., y van Straalen, N. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11 (3): 296–310.
- Vogelsang, K. M., Reynolds, H. L. y Bever, J. D. (2006). Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytol.*, 172: 554–562.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., y Vivanco, J.M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology*, 132: 44–51.
- Will, C., Thurmer, A., Wollherr, A., Nacke, H., Herold, N., Schrumf, M., Gutknecht, J., Wubet, T., Buscot, F., Daniel, R. (2010). Horizon-specific bacterial community composition of german grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6751–6759.

- Zhang, M., Yang, L., Hao, R., Bai, X., Wang, Y., y Yu, X. (2020). Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria isolated from jujube (*Ziziphus jujuba*) and their potential to enhance drought tolerance. *Plant and Soil*, 452 (1-2): 423-440.
- Zvyagintsev, D. (1994). Vertical distribution of microbial communities in soils. En: Ritz, K., Dighton, J., Giller, K. (Eds.), *Beyond the Biomass* (pp. 29-37). West Sussex, Reino Unido. John Wiley & Sons. ISBN: 04-719-5096-3.