

Universidad Pública de Navarra
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
BIOCIENCIAS

Nafarroako Unibertsitate Publikoa
NEKAZARITZAKO INGENIERITZAKO
ETA BIOZIENTZIETAKO GOI MAILAKO
ESKOLA TEKNIKOA

Evaluación del interés de métodos sencillos
de medida de la actividad microbiana del
suelo para la identificación y caracterización
de *terroirs* vitícolas

Presentado por
MAITE LOIDI ERVITI –k
aurkeztua

MÁSTER UNIVERSITARIO EN AGROBIOLOGÍA AMBIENTAL
UNIBERTSITATE MASTERRA INGURUMEN AGROBIOLOGIAN

Pamplona, 6 de noviembre de 2020

Iruña, 2020ko azaroaren 6a

Resumen

En la viticultura, la actividad biológica del suelo es uno de los factores biológicos, que junto a los antrópicos y a los físicos determina la identidad del vino de una bodega o *terroir*. Sin embargo, no se dispone de métodos que permitan, de manera sencilla, estimar esta actividad. El objetivo de este trabajo es evaluar si el método TBI (*tea bag index*) y el uso de placas Biolog Ecoplates™ permiten diferenciar entre muestras procedentes de suelos de una explotación vitícola situada en Traibuenas (Navarra) en función de la zona de muestreo, de la profundidad a la que se toma la muestra y de si las muestras se toman en la línea del cultivo o en las calles. Además, se evaluó si las diferencias observadas se corresponden con los *terroirs* definidos en el viñedo por el personal técnico de la bodega propietaria. A la vista de los resultados, los índices empleados se consideran de interés, siendo el índice de Shannon medido a través del método Biolog Ecoplates™ el que mejor permitió diferenciar los *terroirs*. En cuanto a los parámetros de muestreo, la profundidad afecta más a los parámetros del TBI que a los del método Biolog Ecoplates™, siendo relevante para todos los índices la época del ciclo en las que se realizó el muestreo.

Palabras clave

Terroir, actividad biológica del suelo, biodiversidad del suelo, índice de las bolsas de té, Biolog Ecoplates™

Abstract

In viticulture, soil biological activity is one of the biological factors, which together with the anthropic and physical factors determines the identity of the wine in a winery or *terroir*. However, there are no methods available that allow, in a simple way, to estimate this activity. The aim of this work is to assess whether the TBI (tea bag index) method and the use of Biolog Ecoplates™ allow differentiating between samples from soils of a winery located in Traibuenas (Navarra) depending on the sampling area, the depth at which the sample is taken and whether the samples are taken in the line of the crop or in the streets. In addition, it was evaluated whether the differences observed corresponded to the *terroirs* defined in the vineyard by the technical staff of the owner winery. In view of the results, the indices used are considered of interest, being the Shannon index measured through the Biolog Ecoplates™ method the one that best allowed differentiating the *terroirs*. As for the sampling parameters, the depth affects more the TBI parameters than those of the Biolog Ecoplates™ method, being relevant for all the indexes the time of the cycle in which the sampling was carried out.

Key words

Terroir, soil biological activity, soil biodiversity, tea bag index, Biolog Ecoplates™

Laburpena

Mahastigintzari dagokionean, lurzoruko jarduera biologikoa da, faktore antropiko eta fisikoekin batera, ardo edo *terroir* baten identitatea zehazten duen faktoreetako bat. Hala ere, ez dago jarduera hau modu errazean estimatzeko metodorik. Lan honen helburua TBI (*tea bag index*) metodoak eta Biolog Ecoplates™ plaken erabilerak Traibuenas-en (Nafarroan) kokatutako mahasti-ustiapen bateko lur-laginen artean desberdintzeko balio duen aztertzea da. Zehazki, laginketa zonalde, kokapen (kalea edo linea) eta laginketa sakonera desberdinen artean bereizteko balio duen aztertu zen. Halaber, behatutako desberdintasunak bodegako teknikariek definitutako *terroir*-ekin bat zetozen aztertu zen. Emaitzek, erabili indizeak interesgarritzat hartu daitezkeela adierazi dute, Biolog Ecoplates™ metodoaren bidez neurtutako Shannon- en indizea delarik *terroir*-en artean hobekien desberdintzea ahalbidetu duena. Laginketa parametroei dagokienean, sakonerak eragin handiagoa dauka TBIren parametroetan Biolog Ecoplates™ metodoko parametroetan baino, eta laginketa garaia esanguratsua da indize guztietarako.

Hitz gakoak

Terroir, lurzoruko jarduera biologikoa, lurzoruko biodibertsitatea, te-poltsen indizea, Biolog Ecoplates™

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente al equipo docente del máster por haber conseguido terminar con éxito las clases en un año complicado. Así como a mis tutores, Gonzaga Santesteban y Javier Abad, por aconsejarme y guiarme en el desarrollo de este trabajo.

También ha sido imprescindible la colaboración de mis compañeras del grupo de Fruticultura y Viticultura Avanzadas, que me han ayudado en la toma de muestras, y del departamento de Ciencias, que me ha permitido usar sus equipos para realizar alguna de mis medidas. Así como a Fernando Blanco, de Neiker, quien ha colaborado con el protocolo de Biolog Ecoplates™.

Este trabajo no habría sido posible sin la colaboración de Bodegas Ochoa, empresa que lleva muchos años colaborando con el grupo de Viticultura y Fruticultura Avanzadas de la UPNA y apostando por la investigación para un mejor desarrollo de la viticultura y con menos impacto en el medio ambiente.

Agradecer también a todo el grupo de Fruticultura y Viticultura Avanzadas, por haberme y animado a hacer este máster, aunque haya podido suponer un menor rendimiento en mi trabajo.

Y por último a mi familia y amigos, para quienes últimamente no he estado tan disponible como me hubiera gustado. Muchas gracias a todos por vuestra paciencia y apoyo.

Este trabajo se ha realizado dentro del proyecto VinoRosado (0011-1365-2019-000111), financiado por el Departamento de Desarrollo Económico del Gobierno de Navarra y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Índice

1. Antecedentes	9
1.1. Servicios ecosistémicos y cultivo de la vid	9
1.2. El controvertido concepto de <i>terroir</i>	11
1.3. La biodiversidad y la actividad microbiana en suelo de viñedos. Métodos de medida.....	13
2. Objetivos	17
3. Material y métodos.....	19
3.1. Biolog Ecoplates™	20
3.2. Índice de las bolsas de té (TBI)	24
3.3. Análisis de datos.....	26
4. Resultados y discusión	27
4.1. Análisis de los factores que afectan a los parámetros de medida de actividad biológica del suelo.....	27
4.1.1. Ubicación.....	27
4.1.2. Profundidad.....	27
4.1.3. Estación	29
4.2. Análisis de interacciones entre factores	30
4.2.1. Ubicación-profundidad.....	30
4.2.2. Ubicación-estación	31
4.2.3. Profundidad-ubicación	31
4.2.4. Profundidad-estación	32
4.2.5. Estación-ubicación.....	34
4.2.6. Estación-profundidad	34
4.3. Evaluación de la correspondencia entre los <i>terroirs</i> y los parámetros de actividad biológica del suelo.....	35
5. Conclusiones.....	41
6. Bibliografía	43

1. Antecedentes

El cultivo de la vid alcanza una superficie mundial de aproximadamente 7.4 millones de hectáreas que producen 78 millones de toneladas de uvas al año, empleadas tanto en la producción de vino (63%), como en la producción de uva de mesa (35%) y en uvas secas (1.7%). En 2018, se produjeron 292 millones de hectolitros de vino en todo el mundo y el valor total de los vinos exportados fue de 31 mil millones de euros (OIV, 2020). Más de la mitad de la superficie de viñedo mundial está situada en el continente europeo, continente con gran tradición vitícola. De hecho, en algunos países con mucha tradición en la elaboración de vino, como es el caso de España, Italia o Francia, más del 20% de la superficie agrícola está ocupada por viñedos (CE, 2009). La viticultura ha formado parte durante siglos de un sistema agrícola multifuncional, que ha incluido pastos y árboles frutales de bajos insumos, lo que ha dado lugar a una gran diversidad funcional.

Esta diversidad funcional, según la FAO, es consecuencia de las interacciones entre organismos vivos, su diversidad y las funciones ecosistémicas que aporta la comunidad biológica. Aunque los procesos físicos y químicos que contribuyen al funcionamiento del ecosistema se pueden medir con relativa facilidad, estas medidas no aportan demasiada información sobre las complejas interacciones biológicas y físicas que impulsan los procesos del ecosistema.

Sí se ha observado la relación entre la biodiversidad de un ecosistema y su productividad, y entre la biodiversidad y la estabilidad de las comunidades, apreciándose que las comunidades con mayor diversidad biológica son más productivas que las que tienen una diversidad menor y son más estables ante las perturbaciones. Corroborando esta idea, en un estudio de Pywell et al., (2015) se demostró que las prácticas agrícolas respetuosas con la vida silvestre y que emplean medidas de conservación en los paisajes cultivados, reducen los efectos negativos de la agricultura intensiva y son eficaces para conservar y restaurar la biodiversidad e incluso para incrementar los rendimientos de los cultivos. Otro estudio realizado por Paiola et al., (2020), centrado concretamente en viticultura, también concluyó que la viticultura ecológica mejora, aunque sea de manera débil, la diversidad a escala de paisaje. Al mismo tiempo se demostró que el uso de cubiertas y la conservación de la cobertura nativa del suelo hace que los viñedos alberguen mayor riqueza y abundancia de artrópodos, influye positivamente en las comunidades fúngicas y en las bacterias, promoviendo la biodiversidad, mientras que el manejo intensivo, empleando labranza y herbicidas, es perjudicial para la mayoría de los taxones. Años antes, Trivellone et al., (2014) ya observaron que la intensificación agrícola tiene un efecto directo sobre la biodiversidad. A este respecto, hoy en día existe un acuerdo general de que la intensificación agrícola tiene un profundo impacto en la biodiversidad con posibles efectos en cascada sobre las funciones de los ecosistemas y la prestación de servicios. Sin embargo, en las últimas décadas se ha llevado a cabo en los viñedos una gestión que ha provocado una separación de las zonas de producción y de conservación, al mismo tiempo que se ha realizado un manejo intensivo, con una alta mecanización y un elevado uso de productos fertilizantes y fitosanitarios. Como consecuencia varios servicios ecosistémicos se han visto afectados, lo que ha dado lugar a altas tasas de erosión del suelo, degradación de la estructura y la fertilidad del suelo, contaminación de las aguas subterráneas y altos niveles de insumos agrícolas (Zaller et al., 2015).

1.1. Servicios ecosistémicos y cultivo de la vid

Los servicios ecosistémicos, según la FAO, son contribuciones directas o indirectas de los ecosistemas a los seres humanos, apoyando directa o indirectamente a la supervivencia y a la calidad de la vida. Los sistemas agrarios, como es el caso de la viticultura, son a la vez fuente y

sumidero de importantes servicios ecosistémicos clave para la provisión de alimentos, así como para el mantenimiento de bienes de alto interés económico, social y ambiental para la sociedad.

Estos servicios ecosistémicos (SE), como se observa en la Figura 1, se categorizan en cuatro grandes grupos:

- SE de abastecimiento, que proporcionan beneficios materiales (ej. comida, madera, agua, combustibles).
- SE de regulación, que proporcionan beneficios de la regulación de servicios ecosistémicos (ej. calidad del agua o del aire, polinización de cultivos).
- SE de soporte, que son necesarios para la producción de los demás SE (ej. hábitat de las especies, mantenimiento de la diversidad genética).
- SE culturales, que proporcionan beneficios no materiales que los humanos consiguen de los ecosistemas (ej. estética del paisaje, identidad cultural, histórica o espiritual).



Figura 1.- Categorías de servicios ecosistémicos (Adaptado de Evaluación de los Ecosistemas del Milenio (2005) WWF-2016)

Como ya se ha indicado, los sistemas agrícolas son al mismo tiempo fuente y sumidero de servicios ecosistémicos. En una revisión realizada por Winkler et al., (2017) en la que pretende identificar los servicios ecosistémicos aportados por los viñedos que han sido más estudiados en las investigaciones científicas se concluyó que éstos pertenecían a las categorías de servicios de aprovisionamiento, de regulación y culturales.

Dentro de los servicios ecosistémicos de aprovisionamiento se incluyen los productos que son obtenidos del cultivo de la vid y que podemos consumir, en este caso serían las uvas de mesa, de vino y las uvas secas, así como las hojas de parra que son utilizadas en algunas cocinas mediterráneas.

En la categoría de servicios de regulación se encuentran procesos de filtración, secuestro, almacenamiento y acumulación que ayudan a fijar contaminantes y compuestos orgánicos en el suelo. Como todos los sistemas perennes, los viñedos son lugares potenciales para secuestrar carbono, especialmente en el suelo, aumentando de manera considerable con un adecuado manejo del viñedo (Galati et al., 2016). También es importante un buen conocimiento y manejo del viñedo para conseguir otros servicios ecosistémicos de regulación importantes, como son el control de plagas y el control de enfermedades. En este sentido, es frecuente que se dedique un esfuerzo importante al control de plagas empleando pesticidas, a pesar de que otras prácticas culturales permitirían un menor uso de insumos químicos sintéticos, aprovechando los servicios ecosistémicos de control de plagas aportados por los enemigos naturales de las plagas de la vid (Kross et al., 2012). Las enfermedades y las plagas con frecuencia están muy relacionadas, ya que son las plagas las que funcionan como vector de muchas enfermedades. Del mismo modo que un buen manejo integrado proporciona un servicio de control de plagas, algo similar ocurre con el control de enfermedades. Un manejo cuidadoso del *canopy* de la vid que mejore la aireación y la penetración de la luz favorecerá el control de enfermedades, así como un adecuado cuidado del suelo que mejore su calidad, aportando así a la planta más capacidad para soportar la presión de la enfermedad (Nicholas & Durham, 2012).

Otra categoría de servicios ecosistémicos aportados por los viñedos son los servicios culturales, los cuales no son tangibles, pero son de gran importancia, como el patrimonio o las tradiciones culturales. Los paisajes de viñedos funcionan como hitos de las áreas donde se encuentran ubicados, atraen visitantes, crean identidad local, y representan el patrimonio cultural y las tradiciones (Winkler & Nicholas, 2016). De hecho, la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) ha declarado varios paisajes de viñedos como lugares de Patrimonio Mundial, como son los de Piamonte, en Italia, o los *terroirs* de la Borgoña, en Francia (UNESCO, 2020). Como vemos, englobado dentro de este concepto de tradición e identidad local, podemos incluir la idea de *terroir*, la cual recoge, además de las condiciones naturales como el clima y el suelo de una región, los servicios culturales en forma de tradiciones de cultivo de la vid y de vinificación propias de la zona (Trubek, 2008).

1.2. El controvertido concepto de *terroir*

La palabra *terroir* no tiene ningún significado lingüístico equivalente en el inglés, alemán u otros idiomas. A partir de los años 90 el término se puso de moda en el campo de la viticultura y la enología, debido probablemente a la búsqueda de un equilibrio entre el rápido progreso tecnológico que se da en la sociedad y los conceptos tradicionales. Esto ha impulsado movimientos de "regreso a la naturaleza", que cuidan del medio ambiente y han fomentado estudios sobre el *terroir* y la valorización de los productos del *terroir* (Schaller, 2017).

Aunque el interés incrementó en los años 90, ya a partir de los años 70 se comenzaron a realizar estudios sobre este concepto que, a pesar de no haber sido definido, sí era aceptado que aglutinaba la interacción entre la planta, el suelo, el clima y los diferentes factores que afectan a las características de la uva y, en consecuencia, del vino. Era un concepto que existía como una idea, pero no había sido definido y tenía una connotación negativa. "Le goût du *terroir*" (el sabor de la tierra) se refería a los vinos que no podían venderse fuera de una región, debido a defectos de calidad (Schaller, 2017). Vaudour, en 2003, define el *terroir* como una entidad espacial y

temporal, que se caracteriza por rasgos homogéneos o dominantes que son significativos para la uva y/o el vino; es decir, el suelo, el paisaje y el clima, a una escala de duración determinada, dentro de un territorio que se ha fundado en la experiencia social e histórica y en las elecciones técnicas relacionadas con el genotipo. Más adelante, en 2010, la Organización Internacional de la Viña y el Vino en la resolución OIV/VITI 333/2010 definió el *terroir* vitivinícola como un concepto que se refiere a un espacio sobre el cual se desarrolla un saber colectivo de las interacciones entre un medio físico y biológico identificable y las prácticas vitivinícolas aplicadas, que confieren unas características distintivas a los productos originarios de este espacio. El *terroir* incluye características específicas del suelo, de la topografía, del clima, del paisaje y de la biodiversidad. Ésta es la definición aceptada a día de hoy y asumida por los científicos que estudian este concepto. En la actualidad, en algunos ámbitos, es un concepto que se está poniendo en valor y que ha sido sujeto de numerosas investigaciones. Pasando de la connotación negativa del "Le goût du *terroir*" (el sabor de la tierra) a estar positivamente valorado tanto por los viticultores como por los consumidores. Sin embargo, desde el ámbito económico, donde también se ha empezado a estudiar, se concluye que el *terroir* es una construcción social, solo una idea (Córdoba et al., 2015; Gergaud & Ginsburgh, 2010; Josling, 2006). Mientras, también se argumenta que es una barrera proteccionista de las administraciones de las naciones y que los críticos que juzgan la calidad de los vinos son oportunistas que se benefician de este mercado (Combris et al., 1997; Gergaud & Ginsburgh, 2010). Esto nos indica, que desde varios aspectos el concepto de *terroir* ha sido menospreciado, puesto en duda y considerado un mito.

Uno de los motivos por los que ha sido considerado un mito es que las interacciones que definen el *terroir* deben dar al vino características que lo diferencien de otros. Sin este requisito de aportar características distintivas, el *terroir* es simplemente "geografía del viñedo". Los vínculos entre las geografías únicas, las vides y las experiencias sensoriales únicas del vino son cruciales para el concepto. El componente cultural del *terroir*, tal como se presenta en la definición de la OIV, consiste en prácticas de toda la zona que han evolucionado a partir del conocimiento colectivo de los efectos del entorno físico y biológico de esa zona en la viticultura y la elaboración de vinos. Sin embargo, en las zonas en que no existen restricciones a las prácticas vitivinícolas, el componente cultural del *terroir* es insignificante, ya que las variaciones de estas prácticas sirven principalmente para diluir las firmas de área de los componentes físicos y biológicos. Así es cierto que cada vino se produce en un entorno único, pero no todos los vinos tienen características derivadas del lugar que los distinguen fácilmente.

Otra idea que pone en duda el concepto es que las interacciones entre el entorno físico, el biológico y el conocimiento colectivo sobre el que se basa la idea de *terroir*, son difícilmente demostrables. Se habla del *terroir* como un concepto subjetivo que no puede ser verificado científicamente, por lo tanto, como no es ciencia, no es real. Sin embargo, nadie niega que las variaciones de las características medibles de las uvas y los vinos están relacionadas con las variaciones anuales medibles del entorno físico y biológico, lo que es denominado la variación de la cosecha. Entonces, ¿por qué negar el *terroir*, que es la variación de las características de las uvas y el vino relacionadas con las variaciones espaciales del entorno físico y biológico?

Para alejar el concepto de *terroir* de la mística y el marketing, hay que estudiarlo desde un punto de vista científico-técnico para que esté basado en realidades menos discutibles, aunque siga siendo un concepto ligeramente quijotesco (Deloire et al., 2005). En las últimas décadas varios artículos científicos se han centrado en el vínculo entre las características de las uvas y el vino y el entorno físico y biológico de los viñedos.

Para entender cómo funciona un *terroir* es esencial considerar todos los factores que intervienen y su interacción. Ya que un gran vino puede darse bajo diversas condiciones climáticas, pero nadie puede definir cuál es la temperatura ideal, o las precipitaciones adecuadas y su distribución a lo largo del ciclo, como tampoco se puede decir cuál es el mejor tipo de suelo o cuáles son las técnicas de cultivo indicadas para todo tipo de viñedos. Lo que sí se conoce es que el *terroir* alcanza su mejor expresión cuando la precocidad de la variedad de vid cultivada se adapta a las condiciones climáticas del lugar, asegurando una madurez plena al final del ciclo (Van Leeuwen & Seguin, 2006).

Intentando comprender mejor esta interacción se han hecho ensayos que estudian simultáneamente los tres componentes principales del *terroir* (suelo, clima y variedad), comparando el desarrollo de la vid y la composición de la uva obtenida en diferentes variedades y tipos de suelos, durante varios años para observar también las variaciones anuales de clima. Se ha observado que los efectos producidos por las tres variables han sido muy significativos tanto en el desarrollo de la vid como en la composición de la uva. Sin embargo, el impacto del clima y del suelo ha sido mayor que el de la variedad (Van Leeuwen et al., 2004). Siguiendo esta línea, varios grupos de científicos, especialmente en Alemania, trataron de averiguar las influencias de los meso y microclimas en los parámetros de calidad de la vid, así como en el suelo, los nutrientes, el agua y el balance térmico del suelo. Observaron que los parámetros mesoclimáticos, geomorfológicos y de suelo pueden explicar aproximadamente el 60-70% de la formación de la cosecha, así como de la acumulación de azúcar en las bayas. Otra parte de la variabilidad es debida a la gestión del viñedo: cómo se gestiona el suelo, qué técnicas de cosecha se emplean, qué manejo de la vegetación se hace, es decir, las actividades culturales que también componen el *terroir* (Schaller, 2017). También hay estudios sobre cómo afectan a la expresión del *terroir* los factores físico-químicos del suelo (Van Leeuwen et al., 2018, Van Leeuwen et al., 2004, G. Seguin, 1986) y se ha observado que la biodiversidad funcional que se encuentra en los suelos de los viñedos es determinante no solo para las propiedades físico-químicas y nutricionales de estos suelos, sino también para la salud de la vid, el rendimiento y la calidad de la uva (Belda et al., 2017).

1.3. La biodiversidad y la actividad microbiana en suelo de viñedo. Métodos de medida

El suelo es uno de los hábitats con mayor diversidad de la tierra, albergando una de las colecciones más diversas de organismos vivos. En ningún otro lugar de la naturaleza hay una concentración tan densa de especies como en las comunidades del suelo. Por ejemplo, un solo gramo de suelo puede contener millones de bacterias de varios miles de especies. La biota del suelo incluye microorganismos (bacterias, hongos, etc.), microfauna (protozoos, nematodos, etc.), mesofauna (ácaros, colémbolos, etc.) y macrofauna (insectos, lombrices de tierra, etc.), así como las raíces que crecen en el suelo e interactúan con otras especies bajo tierra y sobre la misma. Los organismos del suelo participan en una amplia diversidad de procesos esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas, actuando como impulsores primarios del reciclaje de nutrientes, regulando la dinámica de la materia orgánica del suelo, el secuestro del carbono del suelo y la emisión de gases de efecto invernadero; modificando la estructura física del suelo y la presencia de agua en el mismo, potenciando la absorción de nutrientes por la vegetación y su eficiencia, y potenciando la salud de las plantas. Estas funciones, además de ser esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas naturales, constituyen un recurso importante para el manejo sostenible de los sistemas agrícolas. De hecho, se ha comprobado que cuanto mayor es la biodiversidad del suelo, mayor es la velocidad de reciclaje de los nutrientes, mejor la agregación del suelo y la estabilidad de los agregados, y mayor la capacidad de control de

enfermedades de los suelos agrícolas (FAO, 2009). En el caso del viñedo, parte esencial de la biodiversidad la componen las diferentes variedades cultivadas, pero tienen un papel esencial el resto de plantas y animales que conviven con las vides, ya que ofrecen beneficios para el óptimo desarrollo del cultivo (*Guía de la biodiversidad en viñedos*, 2018). Por lo tanto, junto con el resto de factores físicos y culturales, la conservación de la biodiversidad es crucial no sólo para mantener o aumentar la sostenibilidad y estabilidad de los sistemas agrícolas, ya sea para la producción de cultivos o para la conservación de la naturaleza, sino también para preservar el patrimonio biológico de las regiones vitivinícolas (OIV, 2018). En este sentido, el aspecto biológico de los suelos ha sido subestimado durante años, cuando en realidad contiene una gran diversidad.

Actualmente, un tema candente en el estudio de la biodiversidad en viñedos es la investigación de la composición del microbioma del suelo, que es el reservorio de la microbiota asociada a la vid e influye en su crecimiento, la composición de la uva y las propiedades sensoriales finales de los vinos (White, 2020 ; Belda, Zarraonaindia, et al., 2017). En este contexto nace el concepto de *terroir* microbiano, basado en la idea de que hay una composición única de la población microbiana en cada sitio. Se conoce la existencia de diversas poblaciones de microorganismos asociados con las vides en la rizosfera y como endófitos y se ha estudiado la posible influencia de la presencia de estas poblaciones en los metabolitos del vino (Liu et al., 2019). Con el desarrollo de técnicas genéticas, la investigación se ha centrado en estudiar la singularidad tanto de levaduras naturales presentes en el suelo, como del conjunto de microorganismos que se encuentran en el suelo y en diversas partes de la planta. Se ha intentado conocer cómo influyen estas levaduras en la variedad de compuestos sintetizados durante la fermentación y cómo influyen los microorganismos en las propiedades sensoriales de la uva y el vino. Goddard et al., (2010) observaron poblaciones naturales de levaduras genéticamente diferentes en distintos suelos. Posteriormente se identificaron subpoblaciones de estos organismos que fueron halladas en distintas regiones vitícolas y se emplearon para la fermentación de los mostos, descubriéndose que había diferencias en aroma y sabor en los vinos, lo que indicaba que había una contribución microbiana cuantificable en el *terroir* (Knight et al., 2015). Otros estudios (Burns et al., 2015; Zarraonaindia et al., 2015) también apoyan esta idea, sin embargo, la correlación que se ha observado en ambos estudios no tiene por qué indicar causalidad, por lo que se necesita más investigación para vincular una o más características funcionales del microbioma del suelo con una propiedad sensorial específica de los vinos terminados. Otro inconveniente a la hora de confirmar la idea del *terroir* microbiano, es la dificultad para asegurar la estabilidad de estas comunidades en los suelos, dada la potencial transferencia de los organismos a través de los insectos. Indudablemente estas técnicas genómicas podrán ayudar al conocimiento del suelo, del viñedo y del *terroir*, e incluso según varios autores (Gilbert et al., 2014; Vaudour et al., 2015) posibilitaría la manipulación del microbioma de nuestro suelo para mejorar su calidad y lograr atributos específicos de la uva y el vino.

Otra manera de estudiar las comunidades microbianas del suelo mucho más sencilla consiste en analizar la biodiversidad presente. Desde luego, no es un método comparable al anterior, pero aporta una cantidad de datos mucho más manejable y sencilla de comprender, que da una muestra de la diversidad de especies que tenemos en nuestros suelos y permite comparar diferentes *terroirs*. Este dato de diversidad de especies es empleado en muchos estudios en los que se ha observado que la actividad microbiana puede mejorar varios procesos del ecosistema. Capó-Bauçà et al., (2019) en un ensayo realizado en viña, observaron que la biodiversidad de las comunidades microbianas fue más alta en parcelas con cubierta vegetal que en parcelas labradas. Para ello emplearon el método de Biolog Ecoplates™, el cual es un método sencillo

que nos da el dato de diversidad de las comunidades de bacterias heterótrofas aerobias cultivables, a través de distintos índices, como son el índice de diversidad de Shannon o el índice de diversidad Simpson, los cuales consideran la cantidad de especies que existen en una muestra y la cantidad relativa de individuos que hay para cada una de las especies, es decir, tienen en cuenta tanto la riqueza de especies como su equitatividad. Otros parámetros que se miden con este método son el número de sustratos utilizados (NUS) y el AWCD (average well color development) empleado como indicador de la actividad microbiana.

En ecología la velocidad de descomposición de la materia orgánica y la estabilidad de la misma se han empleado como medidas de referencia para conocer la actividad biológica de un suelo. La velocidad de descomposición se ve condicionada por varios factores, como son la naturaleza y el estado de los restos orgánicos, los microorganismos implicados en el proceso y su nivel de activación, el clima, la aireación y humedad del terreno, el pH, así como las acciones antrópicas sobre los suelos, como pueden ser la intensificación de las labores o la incorporación de fertilizantes. El método más empleado para medir este parámetro es el de la bolsa de hojarasca o litter bag, en el que una cantidad conocida de hojarasca se introduce en bolsas de nylon o mosquitera, se coloca en la superficie del suelo o se entierra, se recupera a intervalos de tiempo preestablecidos y se mide el peso de la materia que persiste, siendo la pérdida de peso el material que se ha degradado, empleándose este método especialmente en bosques (Karberg N. J., 2008). Otro método que se emplea para evaluar la velocidad de descomposición y así tener una idea del nivel de actividad del suelo de manera sencilla, es el índice de las bolsas de té (Tea Bag Index) (Keuskamp et al., 2013), donde la composición de la materia a degradar es estable en su composición y por tanto permite su comparación entre diferentes puntos, motivo por el que está siendo empleado en diferentes investigaciones, especialmente en el campo de la ecología (Fujii et al., 2017; Mayer et al., 2017). Corroborando su utilidad, Duddigan et al. (2020), hicieron una investigación que demostró la validez del método a nivel mundial asegurando que las hojas de té se descomponen de una manera que es representativa de otros restos de hojarasca nativos.

Una ventaja de ambos métodos, tanto el método Biolog Ecoplates™, para medir biodiversidad microbiana, como el índice de las bolsas de té, es que son métodos sencillos y de bajo coste, que pueden ser realizados por el personal técnico de las bodegas, a diferencia de lo que ocurre con las otras técnicas de estudio masivo del microbioma del suelo, y pueden por tanto aportar información asequible y útil para el conocimiento del suelo de sus viñedos.

En este contexto, es de interés conocer cómo responden estos métodos en suelos de viñedo en diferentes momentos y ubicaciones para determinar cuáles son los más adecuados para la toma de muestras y la realización de las medidas. Y a partir de estos muestreos y mediciones observar si es posible la identificación de los distintos *terroirs* a través de la biodiversidad microbiana presente en el suelo del viñedo y la velocidad de descomposición de la hojarasca y su grado de estabilización.

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es evaluar los métodos empleados para su uso en suelos de viñedo y comprobar si hay relación entre los parámetros medidos, diversidad de las comunidades de bacterias heterótrofas aerobias cultivables presentes en el suelo, actividad microbiana, velocidad de descomposición y grado de descomposición de la hojarasca, con los diferentes *terroirs* identificados en el viñedo. Del mismo modo, también se va a observar si existen cambios en estos parámetros según varios factores que han sido considerados, como son la ubicación del muestreo, la profundidad y el momento en el que se ha llevado a cabo a lo largo del ciclo, o si se mantienen estables, lo que podría indicar cuál es la mejor manera de realizar las medidas, facilitando así el trabajo de los técnicos.

3. Material y métodos

El trabajo se realizó en los viñedos de Bodegas Ochoa, bodega familiar de larga tradición situada en Olite dedicada a la elaboración y crianza de vinos (tintos, blancos, rosados y moscatel) bajo la Denominación de Origen Navarra. La totalidad de la producción vinícola de la bodega se realiza empleando uva procedente de viñedos propios, que alcanzan una extensión de 149 has., situadas en el municipio de Traibuenas y una parcela de viñas viejas en Olite. Este estudio se llevó a cabo en los viñedos de Traibuenas, con una superficie superior a 140 has. Este municipio está ubicado a unos kilómetros al sur de Olite y a 55 km de la capital navarra, limita al norte con Murillo del Cuende, al sur con el río Aragón, al este con Santacara y al oeste con Caparros. Navarra está dividida en cuatro zonas climáticas (atlántica, pirenaica, media y sur) situándose el municipio de Traibuenas en esta última, caracterizada por una orografía llana y una altitud no superior a los 400 msnm. El clima es mediterráneo Csa según Köppen, con precipitaciones escasas y veranos cálidos y secos. La precipitación media anual ronda los 430 mm, concentrándose especialmente en primavera y otoño con una media de 125-130 mm respectivamente. En cuanto a las temperaturas, se puede decir que son suaves, con inviernos con mínimas de 2°C y máximas de 11°C y veranos con máximas que rondan los 30°C, aunque observando el histórico se han llegado a alcanzar los 47°C en el mes de julio.

Bodegas Ochoa ha venido realizando muchos proyectos de investigación con el grupo de Fruticultura y Viticultura Avanzadas llevándose a cabo en una colaboración anterior la determinación en el viñedo de estudio de distintos *terroirs* de diferente clase vitivinícola. Para poder determinar estos *terroirs* se establecieron 78 Puntos de Seguimiento Detallado (PSD) en todo el viñedo. Estos PSD están compuestos por un grupo de cepas próximas en el espacio y lo más similares posible, empleando la sección del tronco para medir esta similitud. Estas cepas son las que fueron objeto del seguimiento, haciendo diferentes conteos, medidas y muestreos a lo largo de todo el ciclo para así poder caracterizar cada uno de los puntos. Con esta información junto con la obtenida del mapa de litología, de clases agrológicas y la aportada por el conocimiento previo de los técnicos de la bodega se determinaron los distintos *terroirs*:

- Clase vitivinícola 1: zonas de alto valor enológico. Zonas que propician un desarrollo equilibrado de la planta y gran calidad vitivinícola: buen drenaje, profundidad del suelo suficiente (no excesiva), suelo medio-pobre y/o pedregoso. A veces en laderas pronunciadas. Esta clase suele dar vinos complejos, y de gran potencial enológico para elaborar vinos de reserva con aptitud a envejecer.

- Clase vitivinícola 2: zonas que generan mayor vigor en la planta, debido al tipo de suelo, a su disponibilidad de agua o a tratarse de zonas de deposición. Esta clase permite generar vinos más ligeros y frutales, con muy buena aptitud para elaborar rosados y tintos jóvenes, así como crianzas ligeros, siendo vinos muy aromáticos.

- Clase vitivinícola 3: zonas limitantes debido a pequeñas profundidades, lo que dificulta su manejo. Zonas en las que el trabajo en viñedo es esencial. Se debe trabajar el suelo de manera diferenciada cada año para poder asemejarlo con el resto de la parcela. En este caso a base de abonos naturales, con cubiertas o con estiércol.

- Clase vitivinícola 4: zona con limitaciones debido a acumulaciones de agua. Se debe trabajar el suelo de manera diferenciada cada año para poder asemejarlo con el resto de la parcela. En estos casos siempre interesará aportar estructura al suelo y limitar la cantidad de agua.

Tras haber determinado en el terreno los distintos *terroirs* y con la información obtenida en los 78 PSD estudiados, se seleccionaron 16 de estos PSD en base a criterios de homogeneidad y representatividad dentro de los *terroirs* definidos (Figura 2).

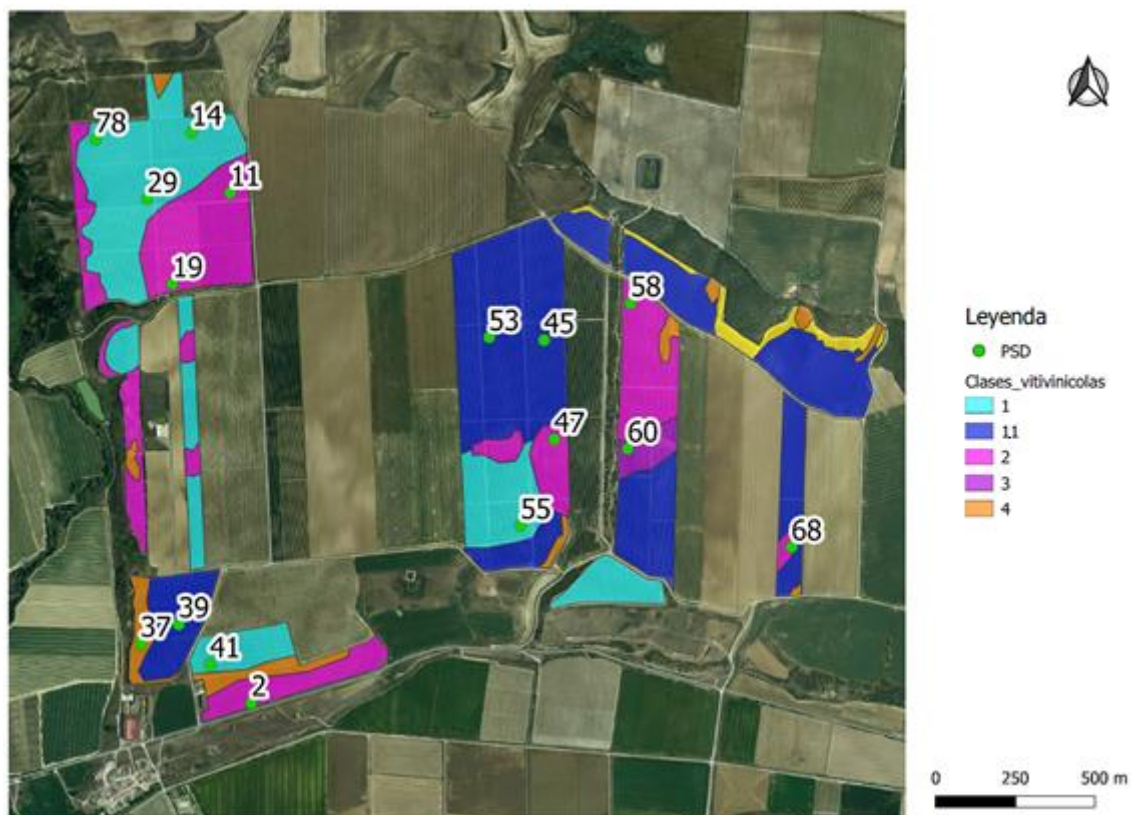


Figura 2.- Distribución de los 16 PSD en los diferentes *terroirs* identificados

Es en estos 16 PSD donde se llevó a cabo el análisis de la diversidad de comunidades de bacterias heterótrofas aerobias cultivables del suelo, empleando el método Biolog Ecoplates™, así como de la velocidad de descomposición de la materia orgánica y el grado de la estabilización de la hojarasca, mediante el método de las bolsas de té (TBI).

3.1. Biolog Ecoplates™

La diversidad de comunidades de bacterias heterótrofas aerobias cultivables de suelo se midió empleando la técnica Biolog Ecoplates™ debido a la efectividad y rapidez demostrada, especialmente a nivel de suelo (Epelde et al., 2008; Rutgers et al., 2016). Las Biolog Ecoplates™ son placas que contienen 3 series repetidas de 31 fuentes de carbono más un blanco, de forma que en cada placa, formada por 96 pocillos, se pueden medir 3 muestras. Esos substratos de carbono pueden ser divididos en ocho clases de compuestos, polisacáridos y compuestos complejos, celulosa, hemicelulosa, quitina, compuestos fosforilados, ácidos orgánicos, aminoácidos y aminos biógenas. El tetrazolio presente en las placas se reduce para formar una coloración morada. La tasa y la extensión de formación de color morado en cada pocillo indican la tasa y la extensión a la que ocurre la respiración microbiana utilizando el substrato presente en cada pocillo (Figura 3). El número de fenotipos presentes en una comunidad microbiana de suelos puede ser caracterizado determinando los perfiles de utilización de fuentes de carbono por parte de los microorganismos.

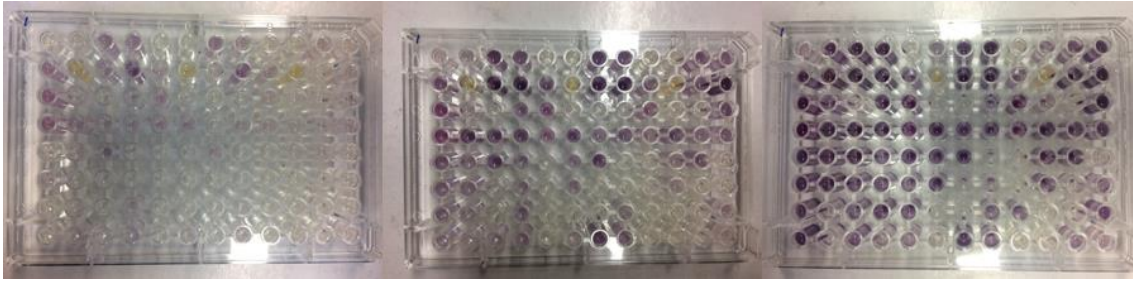


Figura 3.- Evolución de la tasa de formación de color indicador de la respiración microbiana. Placa 1 el día 1, el día 2 y el día 4.

Varias investigaciones han sugerido que los parámetros abióticos dependientes de la estación, como la temperatura y la humedad del suelo, podrían influir en la estructura de la comunidad microbiana y en su actividad. Sin embargo, el papel que juega la estación en la dinámica de las comunidades microbianas sigue sin estar claro (Bardgett et al., 1999, Lipson, 2007). Para observar si hay algún cambio estacional, los muestreos de suelo se llevaron a cabo en tres momentos, el 7 de octubre de 2019, el 21 de enero de 2020 y el 6 de mayo de 2020, considerando estas muestras de otoño, invierno y primavera respectivamente. Las muestras se recogieron en todos los puntos de seguimiento a dos profundidades, 10 y 30 cm, y en dos lugares, en la calle (entre medio de dos filas de cepas) y en el cordón (bajo las cepas), por lo que para cada PSD se tomaron cuatro muestras de suelo, lo que hace un total de 64 muestras en cada una de las fechas. Las muestras de suelo son muestras simples, para su recogida se empleó una barrena (Figura 4), aunque en el muestreo de octubre fue necesario el uso de azada debido a la dureza del terreno por la falta de humedad, especialmente en las muestras tomadas en la calle.



Figura 4.- Recogida de muestra de suelo con barrena en la calle y en el cordón.

Las muestras, una vez recogidas, se conservaron en cámara fría hasta su análisis. En laboratorio se procesaron manteniéndolas siempre correctamente identificadas haciendo pequeñas modificaciones del método empleado por Epelde et al. (2008). Se pasaron por un tamiz de 2 mm para eliminar partículas grandes (Figura 5) y se pesó 1 g de cada una de ellas, se añadieron 9 ml de agua ultrapura Mili-Q autoclavada y se agitaron los tubos, colocados en posición horizontal, durante una hora en un agitador de vaivén a 125 rpm. Pasada esta hora se agitaron los botes uno a uno en un vórtex y se dejaron reposar durante 5 minutos. Se dispensaron 0.12 ml de este

contenido a un nuevo tubo estéril, se enrasó a 12 ml con agua ultrapura Mili-Q autoclavada y se volvió a agitar.



Figura 5.- Tamizado de la muestra.

Una vez preparada la muestra se vertió el contenido de esta segunda dilución en un reservorio estéril para pipeta multicanal, se cogieron 150 μ l de la muestra y se llenaron las columnas de pocillos de la primera muestra (4 columnas). En otra placa se hizo otra replica de la misma muestra (Figura 6). Se vertió la siguiente muestra y se procedió de la misma manera, de forma que había 3 muestras por placa y dos repeticiones de cada muestra.

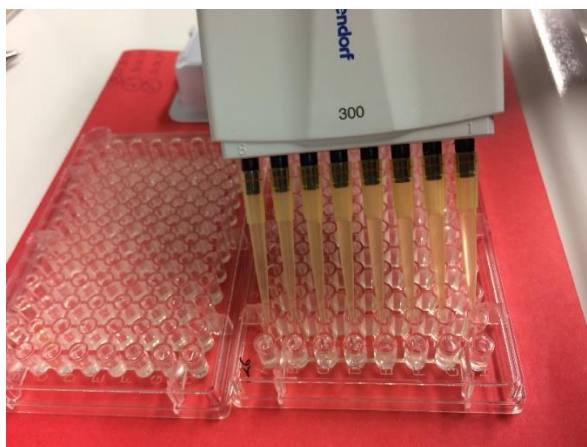


Figura 6.- Preparación de las placas.

Justo tras preparar cada placa (t_0) se midió en un lector de microplacas Biotek Synergy ht (Figura 7) a 595 y a 750 nm (Rutgers et al., 2016; Sofo & Ricciuti, 2019), a 595 nm para evaluar el desarrollo del color más los valores de turbidez y a 750 nm para medir únicamente los valores de turbidez. Esta turbidez en las diluciones es debida a las partículas arcillosas y húmicas en la suspensión coloidal del suelo (Sofo & Ricciuti, 2019). Tras la medida, las placas se mantuvieron en una estufa a 30°C tomando las medidas necesarias para evitar la evaporación en los pocillos periféricos. Posteriormente, se hicieron dos medidas diarias durante la primera semana y una medida al día la segunda semana.

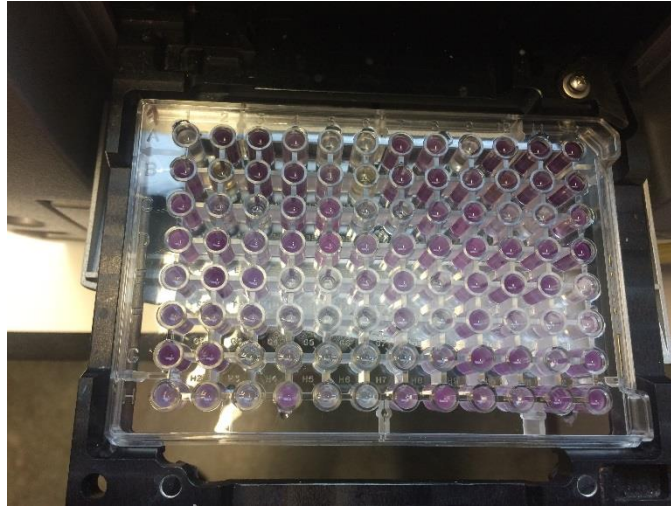


Figura 7.- Medida de placa Biolog Ecoplates™ en lector de microplacas

Con los datos obtenidos se calcularon el AWCD (average well color development), el número de sustratos utilizados (NUS), el índice de diversidad de Shannon (H') y el índice de diversidad de Simpson (1-D). Se hizo la media de los valores de absorbancia de las dos repeticiones teniendo así un valor para cada fuente de carbono, longitud de onda y tiempo de medida. Se procedió a restar la absorbancia a 750 nm a la absorbancia a 595 nm y con este dato (mAbs), corrigiéndolo siempre con la medida del blanco para cada tiempo, se calcularon los parámetros a estudiar. Los cálculos se basaron en el método descrito por Xu et al., 2015, con algunas modificaciones.

$$\text{NUS} = \text{n}^\circ \text{ de sustratos mAbs} > 0.25$$

$$\text{AWCD} = \bar{x} \text{ mAbs}$$

$$H' = - \sum (p_i \cdot \log_2 (p_i))$$

$$1-D = \sum (p_i)^2$$

Donde p_i es mAbs en el pocillo i dividido entre la suma de las mAbs de las 31 fuentes de carbono, considerando solamente las mAbs mayores que 0,25. El valor de absorbancia de 0,25 se observó que marca el comienzo de la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos, por lo tanto, el número de sustratos que presentaron una absorbancia mayor o igual a 0,25 se consideraron para el cálculo de NUS. Para calcular los índices de biodiversidad también se emplearon los valores de absorbancia mayores a 0,25. Como se ha comentado, se disponía de gran cantidad de momentos de medida, ya que éstas se realizaron durante dos semanas, pero el tiempo de medida para el cual los parámetros tienen más sentido es aquel que corresponde al 50% de la fase en la que el incremento de mAbs tiene una regresión lineal. Para calcularlo se empleó el programa SigmaPlot, este tiempo varió mucho de unas muestras a otras, siendo en unas muestras de unas 40 horas y sobrepasando en otras las 100 horas.

El AWCD (average well color development), es la media de las absorbancias para cada muestra y tiempo e indica la actividad biológica de cada muestra en un tiempo concreto de medida. En este trabajo se consideró el valor de tiempo calculado con SigmaPlot. El índice de diversidad de Shannon (H') mide la probabilidad de seleccionar todas las especies presentes en la proporción con que existen en la población. Su valor se incrementa a medida que aumenta la riqueza de especies y su distribución es más homogénea entre todas las especies presentes. Tiene un valor mínimo de 0, cuando solo hay una especie, valores menores de 2 si la diversidad es baja y

mayores de 3 cuando es alta. Por su parte, el índice de Simpson (D) nos da la probabilidad de que dos individuos muestreados al azar pertenezcan a dos especies diferentes, dependiendo mucho su valor de la especie más abundante y menos de la riqueza específica, obteniéndose valores comprendidos entre 0 y 1, siendo el 0 la población más diversa y 1 la menos diversa. Como se indica, tanto el índice de diversidad de Shannon como en índice de diversidad de Simpson tienen en cuenta la riqueza y la equitatividad de las especies.

3.2. Índice de las bolsas de té (TBI)

El método de las bolsas de té es un método sencillo y barato para medir la velocidad de descomposición utilizando bolsas de té como bolsas de residuos vegetales. Se estudió la diferencia en la descomposición entre el té verde de las hojas secas de *Camellia sinensis* y té rooibos de las hojas secas de *Aspalathus linearis* enterrado durante al menos 90 días. El té es consumido por los organismos del suelo y la pérdida de peso en las bolsas representa una medida de la descomposición resultante de las actividades catabólicas de los organismos del suelo a lo largo del tiempo. La comparación de la descomposición del té verde, un material de descomposición rápida, con el té rooibos, un material difícil de degradar, permite el cálculo del índice de bolsas de té (TBI). El TBI describe una constante de velocidad de descomposición de la hojarasca (k) y un factor que cuantifica el grado de estabilización de la hojarasca (S). La constante de descomposición k se calcula a partir de la pérdida de masa de las muestras de té de rooibos utilizando un modelo de descomposición exponencial (Keuskamp et al., 2013). El grado de estabilización (S) se define como la desviación de la fracción descompuesta real en el té verde, en comparación con la fracción que debe descomponerse en función de su labilidad química, y se calcula a partir de la relación entre la fracción de té verde que realmente se descompone después de 90 días y la fracción de té verde que es hidrolizable, pudiéndose interpretar como una cuantificación del efecto inhibitor de las condiciones ambientales sobre la descomposición de la fracción lábil (Duddigan et al., 2020). El valor científico de esta nueva metodología ya ha sido valorado y está siendo utilizada en muchos países de todo el mundo. De hecho, se mantienen diferentes colaboraciones y se llevan a cabo proyectos que emplean este método para ver cómo el clima afecta a la descomposición del material vegetal y crear un mapa global de tasas de descomposición de suelos a través de la campaña Teatime4science.

En este ensayo, para saber la velocidad de descomposición de la materia orgánica en los 16 puntos, se empleó este método de acuerdo con el protocolo de Keuskamp et al. (2013) para lo que se enterraron las bolsas de té en el cordón a ambas profundidades (10 y 30cm). A diferencia del método Biolog Ecoplates™, que fue medido en dos ubicaciones (calle y cordón) este método solo se pudo llevar a cabo en el cordón. Esto se debe a que era necesario marcar el punto exacto donde se enterraban las bolsas para poder encontrarlas en el momento de extraerlas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y estas marcas, normalmente unas varas verticales, impedirían las labores que se llevan a cabo en la calle. Tras pasar enterradas un periodo mínimo de tres meses se recogieron las bolsas y se calculó el índice de descomposición de la materia orgánica y el grado de estabilización de la hojarasca. Las primeras bolsas se enterraron el 7 de octubre 2019 y se recogieron el 21 de enero de 2020, las segundas estuvieron enterradas desde el 21 de enero al 6 de mayo y ese día se volvió a enterrar otra tanda de bolsas de té en todos los PSD a estudiar y se recogieron el 19 de agosto. De esta forma, las primeras muestras serán considerada las de invierno, las segundas las de primavera y las últimas las de verano.



Figura 8.-Marcado de la ubicación de las bolsas de té en el cordón.

Las muestras, tras ser recogidas, se mantuvieron a temperatura ambiente en un lugar cálido y seco para que perdieran la humedad y una vez secas se procedió a medir el peso seco de su contenido (Figura 9), teniendo mucho cuidado para no perder nada de material y de limpiar bien los restos de tierra antes de vaciar las bolsas. De esta manera, al conocer el peso seco de estas bolsas antes de enterrarlas, ya que había sido medido con anterioridad, se calculó la diferencia de estos pesos, obteniendo así los datos de S (el grado de estabilización de la hojarasca) y k (velocidad de descomposición de la hojarasca) como describe Keuskamp et al. (2013).



Figura 9.- Medida del peso del té verde y del rooibos tras ser desenterrado.

Como se aprecia en la Figura 10 el estado de descomposición de ambos té fue muy diferente, encontrándose el té verde bastante más degradado que el rooibos, que tenía un estado similar al que tenía al ser enterrado. Esta diferencia es debida a la naturaleza del material, ya que el té verde es mucho más lábil que el rooibos, el cual tiene un mayor contenido en lignina, que es más recalcitrante.

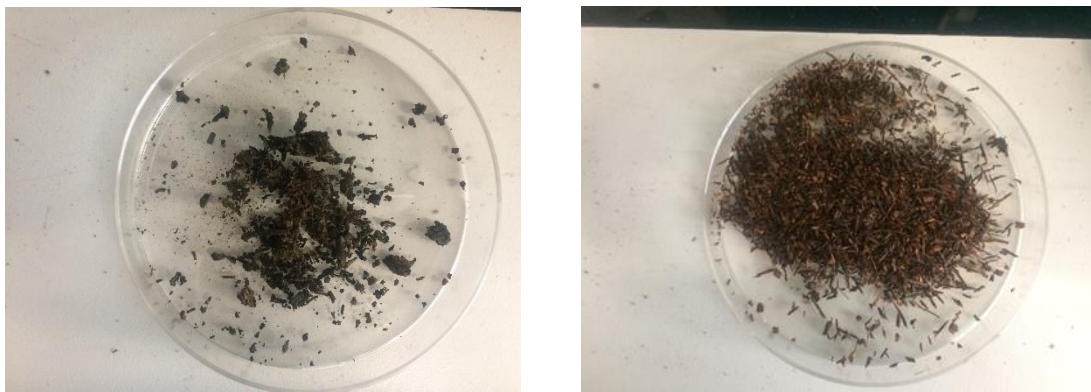


Figura 10.- Estado de té verde y té rooibos tras tres meses enterrado

3.3. Análisis de datos

En este estudio se analizaron los parámetros medidos, actividad biológica, diversidad de Shannon, velocidad de descomposición y grado de estabilización de la hojarasca, para comprobar si son capaces de diferenciar *terroirs*. Al mismo tiempo, se estudiaron las distintas ubicaciones, profundidades y momentos de muestreo, para observar si hubo efecto de estos factores sobre los parámetros medidos.

Para analizar los datos se utilizó el test de muestras pareadas empleando el programa IBM SPSS Statistics. Con este test se observó si cada uno de los factores estudiados en cada PSD tuvo efecto en los distintos parámetros que han sido medidos. Estos factores analizados fueron la ubicación (calle-cordón), la profundidad (10 cm-30 cm) y la estación del año. El efecto de estos factores se estudió tanto individualmente como su interacción dos a dos. También se observó, empleando el mismo test, si hubo efecto del *terroir* en los parámetros medidos. Para ello se hicieron las medias de los valores de los PSD que forman cada *terroir*. Los parámetros que se consideraron fueron los dos índices de las bolsas de té, k y S , y como parámetros de biodiversidad el AWCD y el índice de Shannon (H').

También se hizo un análisis de componentes principales utilizando el software estadístico R, versión 3.6.1 (R Core Team 2019) con Rstudio (versión 1.2.2019). Se emplearon los paquetes FactoMineR (Lê et al., 2008) y Factoextra (Kassambara, 2016) y los gráficos descriptivos se hicieron usando el paquete ggplot2 (Wickham H, 2016). Para analizar las componentes principales, los parámetros de actividad microbiana y de biodiversidad se separaron según su ubicación, teniendo de este modo seis parámetros, los dos índices de las bolsas de té, k y S , y cuatro obtenidos con el método Biolog Ecoplates™, AWCD de la calle, AWCD del cordón, Shannon de la calle y Shannon del cordón. Como factores se analizaron los *terroirs* y el manejo (cubierta-laboreo). Este factor no se ha considerado en el test de muestras pareadas porque este test analiza el efecto del factor en cada punto de seguimiento, por lo que ambos factores tienen que darse en el mismo punto, cosa que no es posible con el manejo. Para analizar los datos con R se han hecho medias de las medidas en las diferentes estaciones y ubicaciones, obteniéndose un dato para cada PSD y profundidad.

4. Resultados y discusión

4.1. Análisis de los factores que afectan a los parámetros de medida de actividad biológica del suelo

En este apartado se presentan los resultados relativos al efecto de la ubicación (calle vs. cordón), profundidad (10 cm vs. 30 cm) y estación (primavera, verano, otoño e invierno) sobre los parámetros de medida de actividad biológica del suelo empleados en este trabajo.

4.1.1. Ubicación

En la Figura 11 se presentan los resultados de los parámetros de actividad y biodiversidad según el factor ubicación. Para este factor, solo podemos estudiar su efecto sobre los parámetros obtenidos mediante el método de Biolog Ecoplates™ ya que, tal y como se describió en el apartado 3, las bolsas de té solo se han puesto en el cordón. Se comprueba que, de manera general, se observan valores más altos en el cordón que en la calle, siendo este efecto estadísticamente significativo para el índice de Shannon.

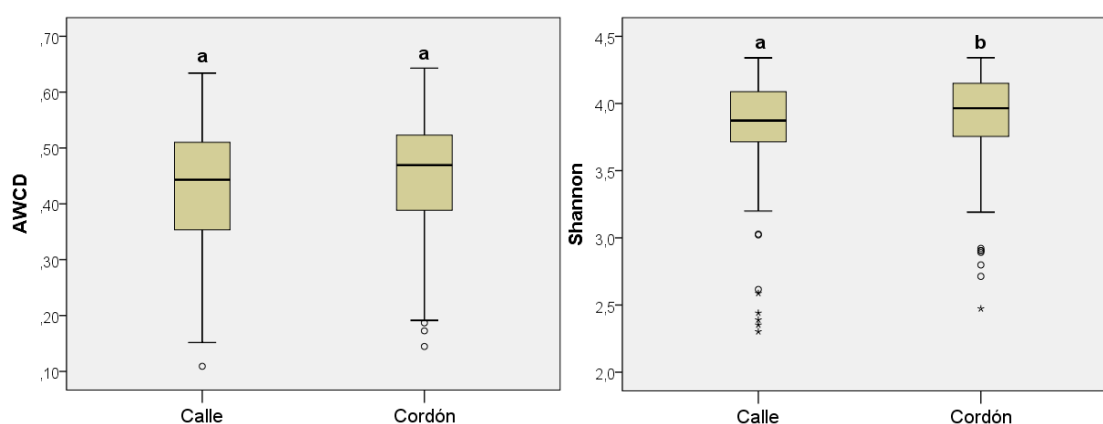


Figura 11.- Boxplot de los parámetros AWCD y H' en función del factor ubicación.

Este efecto observado podría deberse a que el estado de humedad en el cordón será más favorable que en la calle, al menos en la temporada más seca, que es el verano, porque es cuando la viña recibe aporte de agua a través del riego, y este riego solo afecta al cordón. También podría tener un efecto importante la compactación del suelo, que siempre será mayor en la calle que en el cordón. Esta compactación provocaría una menor aireación en el suelo, lo que afectaría negativamente a la actividad bacteriana. Sin embargo, hay que señalar que, aunque estadísticamente se ha observado un efecto de la ubicación en el índice de Shannon, tanto en la calle como en el cordón se han obtenido valores elevados en este índice, 3,78 y 3,88 respectivamente, que se corresponden con niveles de biodiversidad altos en ambos casos.

4.1.2. Profundidad

En la Figura 12 se presentan los resultados de todos los parámetros estudiados en función del factor profundidad. Las profundidades a las que se han tomado las muestras han sido 10 cm y 30 cm. Se comprueba que este factor sí ha tenido efecto en los parámetros medidos con las bolsas de té, la velocidad de descomposición de la hojarasca (k) y su grado de estabilización (S), mientras no muestra ningún efecto en los parámetros de biodiversidad. También se ha observado que los índices de las bolsas de té (TBI), k y S , han estado negativamente relacionados entre sí, mostrando k valores más bajos a 10 cm que a 30 cm, mientras que en S ha ocurrido lo contrario.

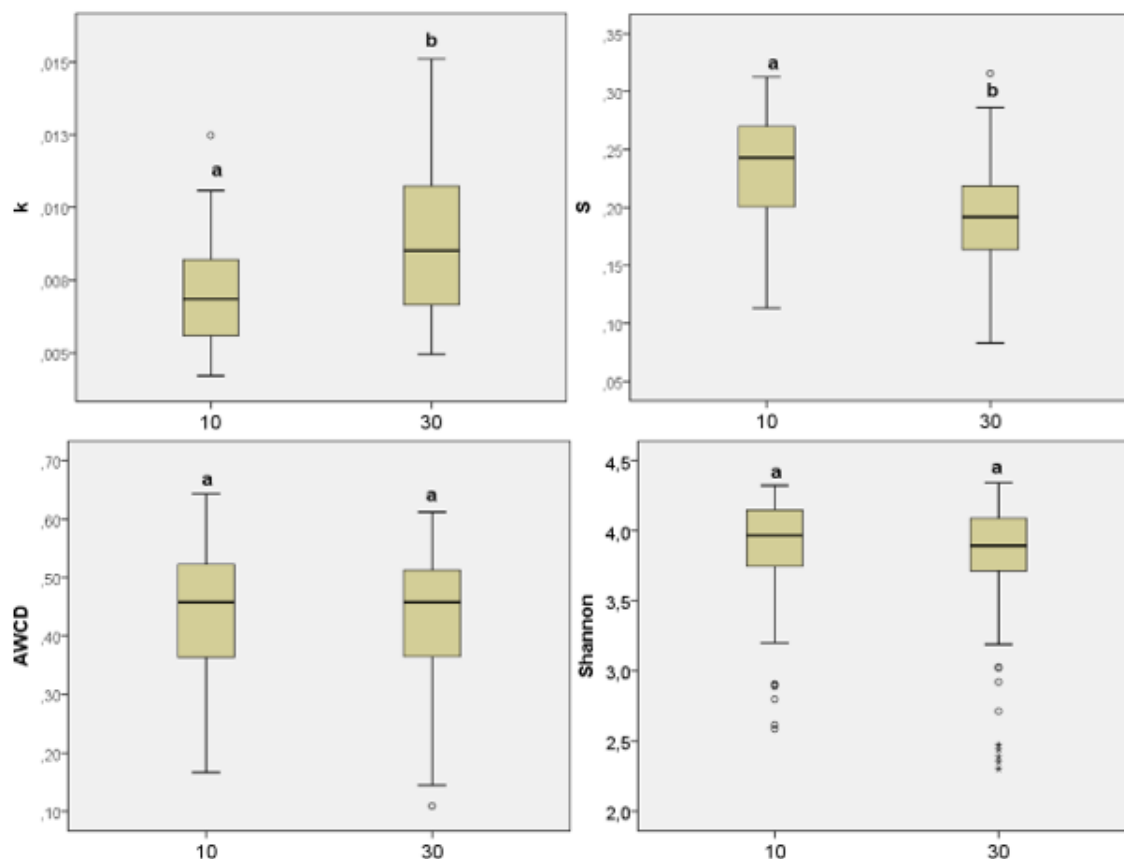


Figura 12.- Boxplot de los parámetros k , S , AWCD y H' en función del factor profundidad.

El efecto de la profundidad tanto en k como en S podría deberse a las diferencias en temperatura y humedad que se dan en las distintas profundidades de suelo, deduciéndose de estos datos una mayor humedad y temperatura en profundidades mayores, aunque también podrían deberse a variaciones de otros factores que se dan en profundidad. La correlación negativa observada entre k y S no se vio en el estudio realizado por Elumeeva et al. (2018), donde sí observaron que la altitud, el contenido de agua y el pH influyeron significativamente en el factor de estabilización (S), mientras ninguno de estos factores predijo la velocidad de descomposición (k).

En las medidas de actividad microbiana y de biodiversidad, a pesar de no verse efecto de la profundidad, sí se ha observado una ligera tendencia a una menor diversidad en la profundidad 30 cm, lo que va en la misma dirección que otros estudios que sí han observado efecto de la profundidad (Liang et al., 2019, Zhang et al., 2017, Eilers et al., 2012, Griffiths et al., 2003) y también a un estudio hecho por Steenwerth et al. (2008) específicamente en suelo de viñedo. Estos autores han relacionado este descenso de la diversidad con un descenso en profundidad de la humedad del suelo, aunque en nuestro caso no podríamos afirmar que se da esta condición. De hecho, en unas medidas realizadas en estos viñedos, aunque no exactamente en los puntos de muestreo de este estudio, se ha observado un aumento de la humedad con la profundidad, al menos en las fechas estudiadas, que van de mayo a septiembre (Abad, J. Datos no publicados), por lo que habrá que considerar que hay otros factores químicos y físicos del suelo que también pueden variar con la profundidad, lo que también influirá en las comunidades bacterianas. De hecho, Liang et al. (2019) observaron que las comunidades microbianas y su actividad estaban muy condicionadas por las propiedades edáficas y observaron una heterogeneidad ambiental importante incluso en un rango de profundidad pequeño (0-40).

También vieron que la actividad microbiana y su estructura está condicionada por factores diversos, entre ellos el carbono orgánico del suelo (COS) y el pH.

4.1.3. Estación

Las épocas en las que se han tomado las medidas han sido diferentes en los distintos parámetros estudiados. Mientras los datos de los TBI se han medido en invierno, primavera y verano los de biodiversidad han sido en otoño, invierno y primavera. Mostrando los TBI lo que ha ocurrido durante los tres meses o más que las bolsas han estado enterradas, mientras el método de Biolog Ecoplates™ muestra la biodiversidad presente en el momento del muestreo.

En la Figura 13 se presentan los resultados de los diferentes parámetros en función de la estación. Se comprueba que la realización de las medidas en una estación o en otra sí ha tenido un efecto en la velocidad de descomposición (k), obteniéndose los valores más bajos en invierno seguidos de los de primavera y alcanzándose los valores más altos en verano. En el grado de estabilización de la hojarasca (S), se observa la tendencia contraria en la evolución de los datos en las distintas estaciones y se comprueba que ha habido efecto entre medir en invierno y primavera o verano, pero no entre primavera y verano. Los parámetros de actividad biológica y de biodiversidad también muestran que ha habido efecto entre medir en diferentes estaciones. Sin embargo, en AWCD solo ha habido efecto entre medir en invierno y otoño o primavera, pero no lo ha habido entre medir en otoño y en primavera, mientras en el índice de Shannon sí que ha habido efecto entre todas las estaciones analizadas. A pesar de que en AWCD no ha mostrado efecto de la estación entre otoño y primavera, sí se observa la misma tendencia a obtener en primavera mayores valores que en otoño y menores que en invierno, al igual que ocurre en Shannon.

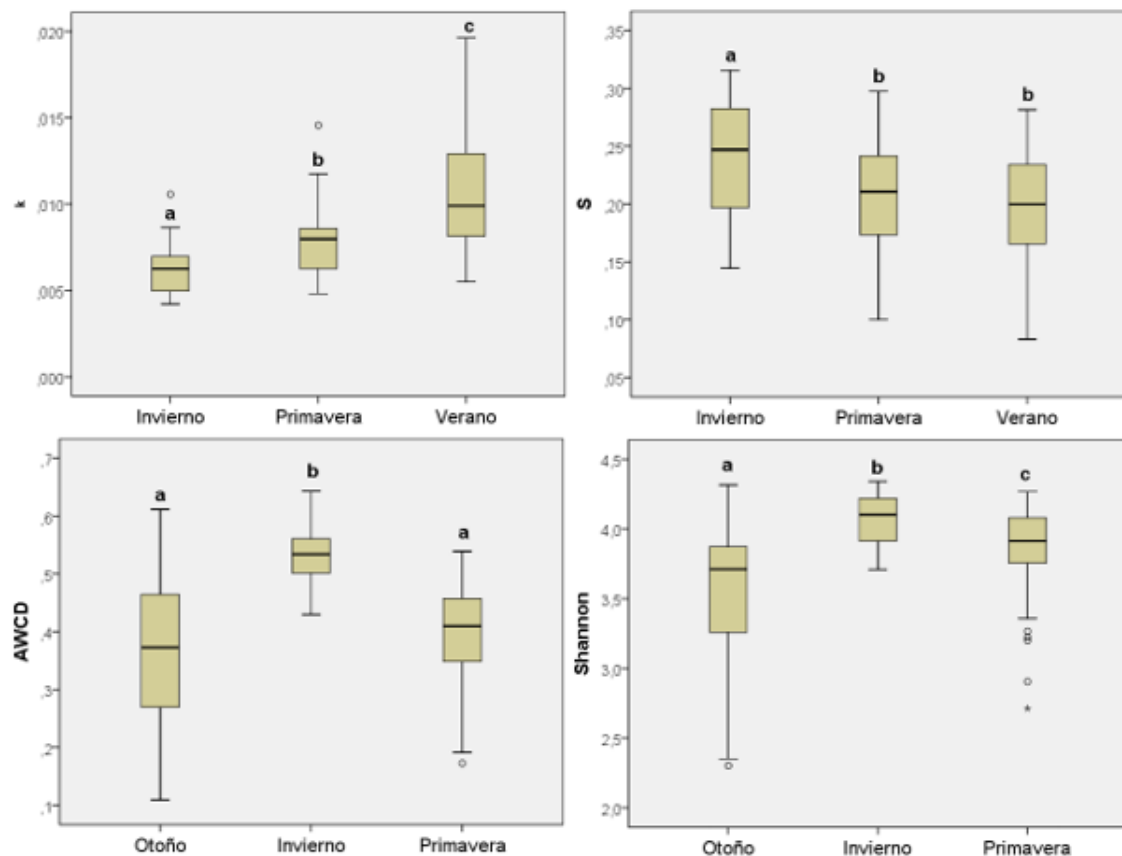


Figura 13.- Boxplot de los parámetros k , S , AWCD y H' en función del factor estación.

Estas variaciones estacionales obtenidas en los índices de las bolsas de té son esperables, ya que son procesos muy condicionados por el clima. Se ha comprobado que la descomposición ha aumentado en épocas con altas temperaturas y con humedad, que en el caso del verano sería la aportada por el riego, mientras se ha mantenido más baja cuando las temperaturas han sido más frías. La tendencia contraria se aprecia en el grado de estabilización, observándose un efecto en realizar las medidas en invierno comparado con las otras estaciones, lo que podría indicar que este parámetro se ve más afectado por la temperatura.

Los parámetros de diversidad, a diferencia de lo observado en estudios anteriores donde no se han encontrado cambios estacionales en la comunidades microbianas (Corneo et al., 2013), han mostrado que sí hay efecto de la estación. Este efecto, de producirse, cabría esperar que provocara un descenso de la actividad microbiana y de la biodiversidad en invierno, sin embargo, se ha obtenido un aumento de estas en la estación fría. Para intentar explicar este resultado se han analizado los datos meteorológicos correspondientes al mes anterior de la toma de las muestras para ver si se ha podido dar alguna condición que pudiera ayudar a comprender este resultado, como podría ser una temporada especialmente seca en primavera o un invierno poco frío, pero los datos muestran que la primavera fue lluviosa, con 76 mm de precipitación acumulada y el invierno menos húmedo, con 33 mm de precipitación acumulada y no demasiado frío, pero tampoco con temperaturas elevadas, ya que la media del mes fue de 4 °C. Este efecto de la estación, por lo tanto, no parece que pueda asociarse a estas condiciones de temperatura y humedad, si no que indica que podría deberse a otros cambios que se hayan podido producir en el suelo.

4.2. Análisis de interacciones entre factores

Una vez observado que los factores analizados han tenido efecto de manera individual sobre algunos de los parámetros medidos, es de interés analizar el efecto de la interacción dos a dos de estos factores sobre los parámetros. De esta manera, las interacciones que se ha analizado son las siguientes:

4.2.1. Ubicación-profundidad

En la Figura 14, se presentan los resultados de AWCD y Shannon en función de la ubicación y la profundidad. Se comprueba que no ha habido efecto de la ubicación en la profundidad 10 cm, pero sí en 30. Apreciándose, como se ha indicado anteriormente, valores ligeramente más altos en el cordón a ambas profundidades.

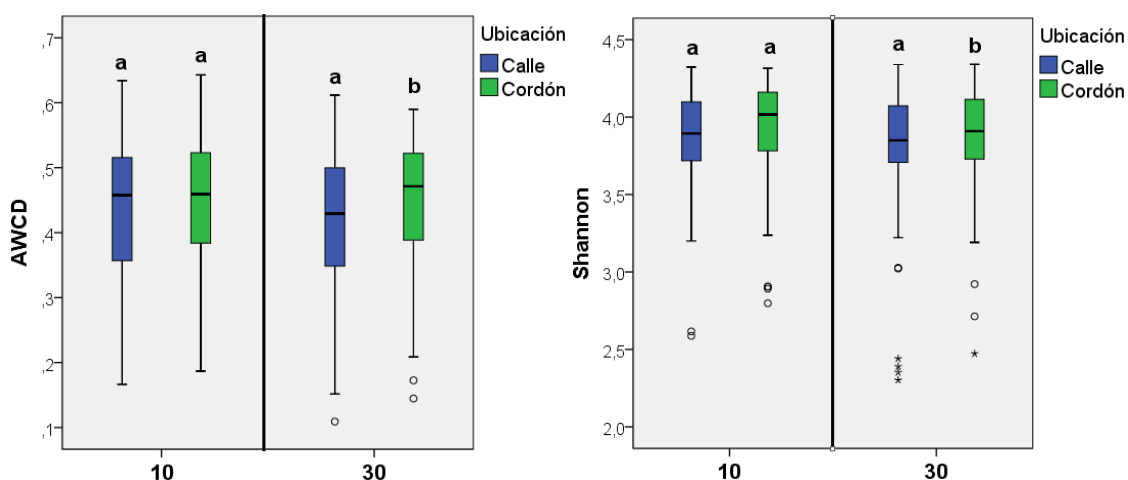


Figura 14.- Boxplot de los parámetros AWCD y H' en función de la interacción de los factores ubicación y profundidad.

Este efecto de la ubicación en los parámetros de biodiversidad podría achacarse a una mayor compactación del terreno en la calle que en el cordón, especialmente en la profundidad 30 cm. Esta compactación habría sido provocada por los pases de maquinaria para hacer los tratamientos y la vendimia, lo que resultaría en una limitación de la aireación lo que podría reflejarse en una disminución de la actividad microbiana y de la biodiversidad.

4.2.2. Ubicación-estación

En la Figura 15 se presentan los resultados de AWCD y Shannon en función de la ubicación y la estación en la que se toma la muestra de suelo. Se comprueba que no ha habido efecto de la ubicación en ninguno de los parámetros en invierno y primavera, pero sí lo ha habido en otoño en el índice de Shannon, en AWCD no se observa tampoco efecto en otoño, pero sí se aprecia la misma tendencia que en Shannon.

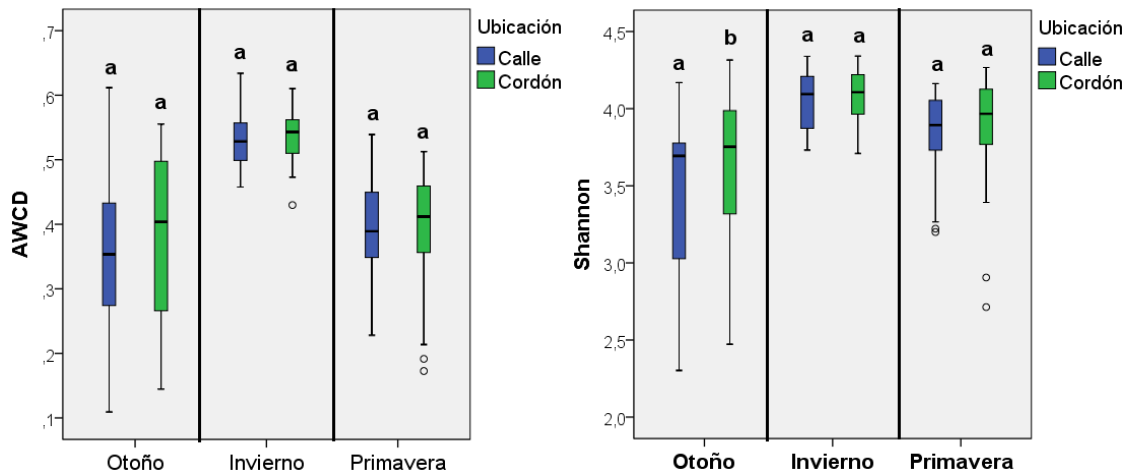


Figura 15.- Boxplot de los parámetros AWCD y H' en función de la interacción de los factores ubicación y estación.

Este efecto de la ubicación en otoño puede ser debido a que, en la fecha del muestreo, 7 de octubre, en la calle la humedad era muy baja, ya que la precipitación acumulada durante el último mes apenas alcanza los 15 mm. Por su parte, en el cordón, ha habido un aporte de agua durante todo el verano a través del riego, lo que podría explicar la mayor biodiversidad observada en esa ubicación frente a la observada en la calle. En invierno y en primavera no se ha apreciado ningún efecto de la ubicación, ya que las condiciones de humedad han sido las mismas, ya que no hay riego. Sin embargo, sí se aprecia una ligera tendencia a obtener valores algo más altos en el cordón, lo que podría explicarse por la menor compactación que se da en esta ubicación. La compactación disminuye cuando se hacen los laboreos, pero hay que tener en cuenta que las fechas de los muestreos no fueron próximas a estas fechas de laboreos.

4.2.3. Profundidad-ubicación

En la Figura 16 se presentan los resultados de AWCD y Shannon en función de la profundidad y la ubicación. Se comprueba que para el índice de Shannon no ha habido efecto de la profundidad ni en el cordón ni en la calle, mientras en AWCD sí ha habido efecto de la profundidad al considerar los datos de la calle, observándose una menor actividad en la profundidad 30.

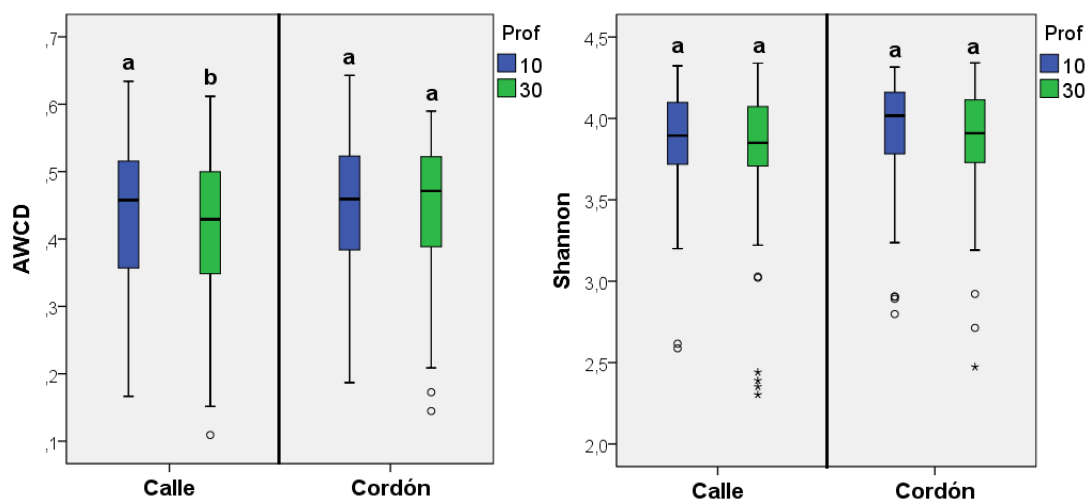


Figura 16.- Boxplot de los parámetros AWCD y H' en función de la interacción de los factores profundidad y ubicación.

Este efecto de la profundidad en la calle coincide con otros estudios que observan menor actividad a profundidades mayores (Liang et al., 2019, Zhang et al., 2017, Eilers et al., 2012, Steenwerth et al. 2008, Griffiths et al., 2003) y podría deberse a una mayor compactación producida en profundidad, que no se daría en el cordón porque en esa ubicación no se realizan pases de maquinaria. En Shannon, aunque no ha habido efecto de la profundidad en la calle, sí se ha observado la misma tendencia.

4.2.4. Profundidad-estación

En la Figura 17 se presentan los resultados de los cuatro parámetros estudiados en función de la profundidad y de la estación. Se comprueba que en la velocidad de descomposición de la materia orgánica (k) ha habido efecto de la profundidad en la medida de primavera, obteniéndose valores más altos a 30 cm que a 10 cm, pero no en invierno y verano. Mientras en el grado de estabilización ha habido efecto de la profundidad en invierno y primavera, pero no en verano. En el índice de Shannon no se ha observado efecto de la profundidad en ninguna estación de medida, mientras en AWCD ha habido efecto en primavera, obteniéndose valores menores a 30 cm que a 10 cm.

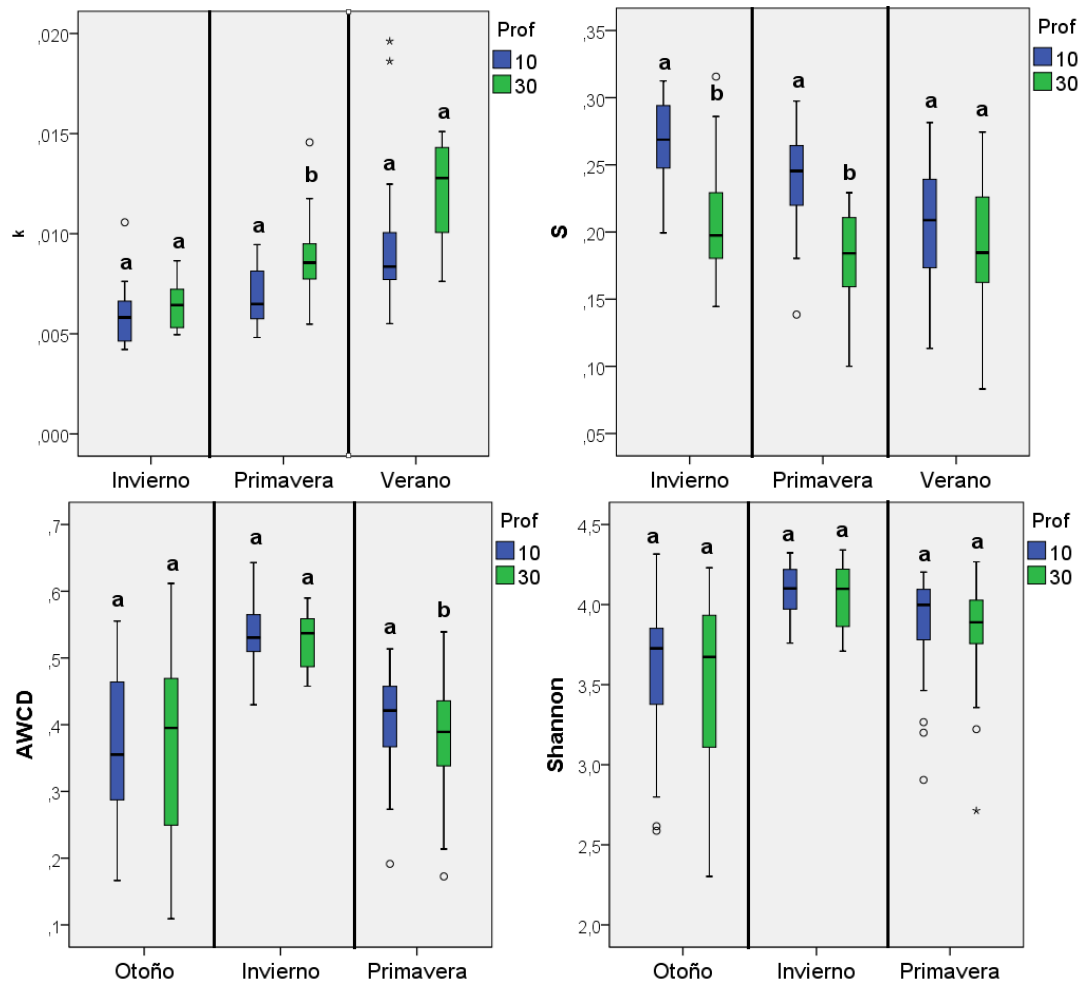


Figura 17.- Boxplot de los parámetros k , S , AWCD y H' en función de la interacción de los factores profundidad y estación.

Los efectos observados en la velocidad de descomposición de la hojarasca en primavera podrían explicarse en parte por una mayor humedad y temperatura en profundidad, hay que tener en cuenta que esta medida resume lo ocurrido en los meses que las bolsas de té han estado enterradas. Las de primavera, se enterraron el 21 de enero y se desenterraron el 6 de mayo, por lo que durante los primeros meses las temperaturas fueron invernales. Estas temperaturas frías habrían afectado más en superficie que en profundidad, donde las temperaturas serían superiores, favoreciendo la descomposición. Esta diferencia de temperaturas también justificaría el efecto de la profundidad en el grado de estabilización en la medida de primavera y también en la de invierno.

En cuanto al efecto observado en la actividad microbiana en primavera, hay que recalcar que la muestra fue tomada el 6 de mayo, fecha en la que aún no se había labrado el terreno, por lo que la compactación podría ser un factor importante a considerar, especialmente en profundidad. También habría que tener en cuenta que las temperaturas medias esa semana rondaban los 20°C, alcanzándose máximas de más de 27°C, por lo que la temperatura del suelo a profundidad 10 cm también sería alta. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente estos cambios que se observan en los parámetros relacionados con la actividad microbiana también podrían deberse a otras alteraciones que se hayan producido en el suelo con la profundidad.

4.2.5. Estación-ubicación

En la Figura 18 se presentan los resultados de AWCD y Shannon en función de la estación del muestreo y de la ubicación. Se comprueba que ambas ubicaciones, calle y cordón, han mantenido la misma tendencia que la observada al analizar los datos de las dos ubicaciones en su conjunto. Mostrando en AWCD un efecto entre hacer el muestreo en invierno o hacerlo en otoño o primavera. Mientras que en Shannon se ha observado este efecto entre todas las estaciones.

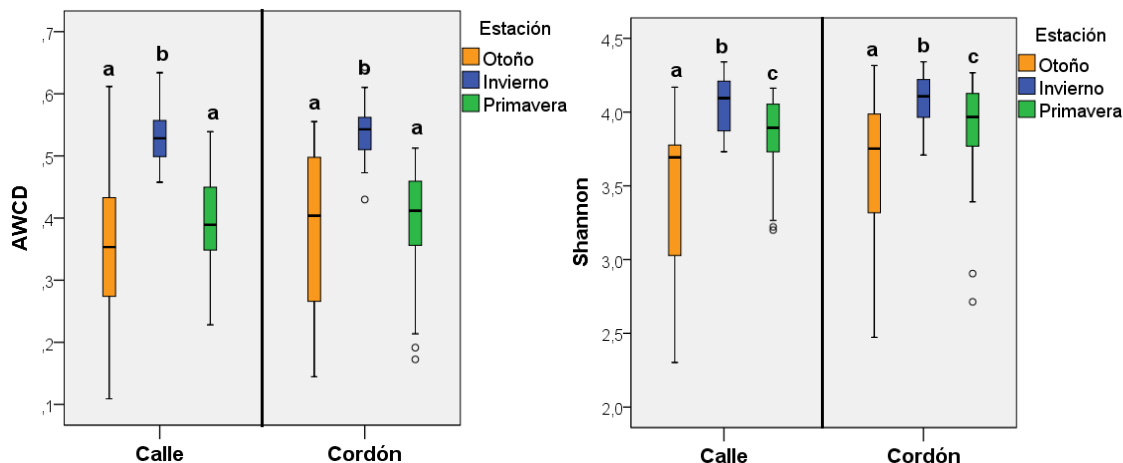


Figura 18.- Boxplot de los parámetros AWCD y H' en función de la interacción de los factores estación y ubicación.

Como ya se ha indicado al comentar los datos de las dos ubicaciones en conjunto, cabría esperar resultados inversos a los obtenidos. Los bajos resultados del otoño podrían deberse a que la muestra se tomó el 7 de octubre, fecha en la que precipitación acumulada era muy baja, por lo que el terreno estaba muy seco, especialmente en la calle, pero también en el cordón. Sin embargo, los altos valores de invierno, correspondientes al muestro del 21 de enero, resultan más complicados de explicar. No obstante, se puede ver que este efecto inesperado no es producto de la ubicación, ya que se da tanto en la calle como en el cordón.

4.2.6. Estación-profundidad

En la Figura 19 se presentan los resultados de k , S , AWCD y Shannon en función de la estación y de la profundidad. En k el efecto de la estación se ha observado entre verano y primavera e invierno en la profundidad 10 cm, mientras en la profundidad 30 cm ha habido efecto entre todas las estaciones. La realización de la medida en invierno o en verano ha tenido efecto en S a 10 cm, pero no a 30 cm, mientras medir en invierno o en primavera ha tenido efecto a 30 cm pero no a 10 cm. En AWCD medir en invierno o en otoño o primavera ha tenido efecto a ambas profundidades, mientras que en Shannon el efecto se ha observado entre todas las estaciones y también en las dos profundidades.

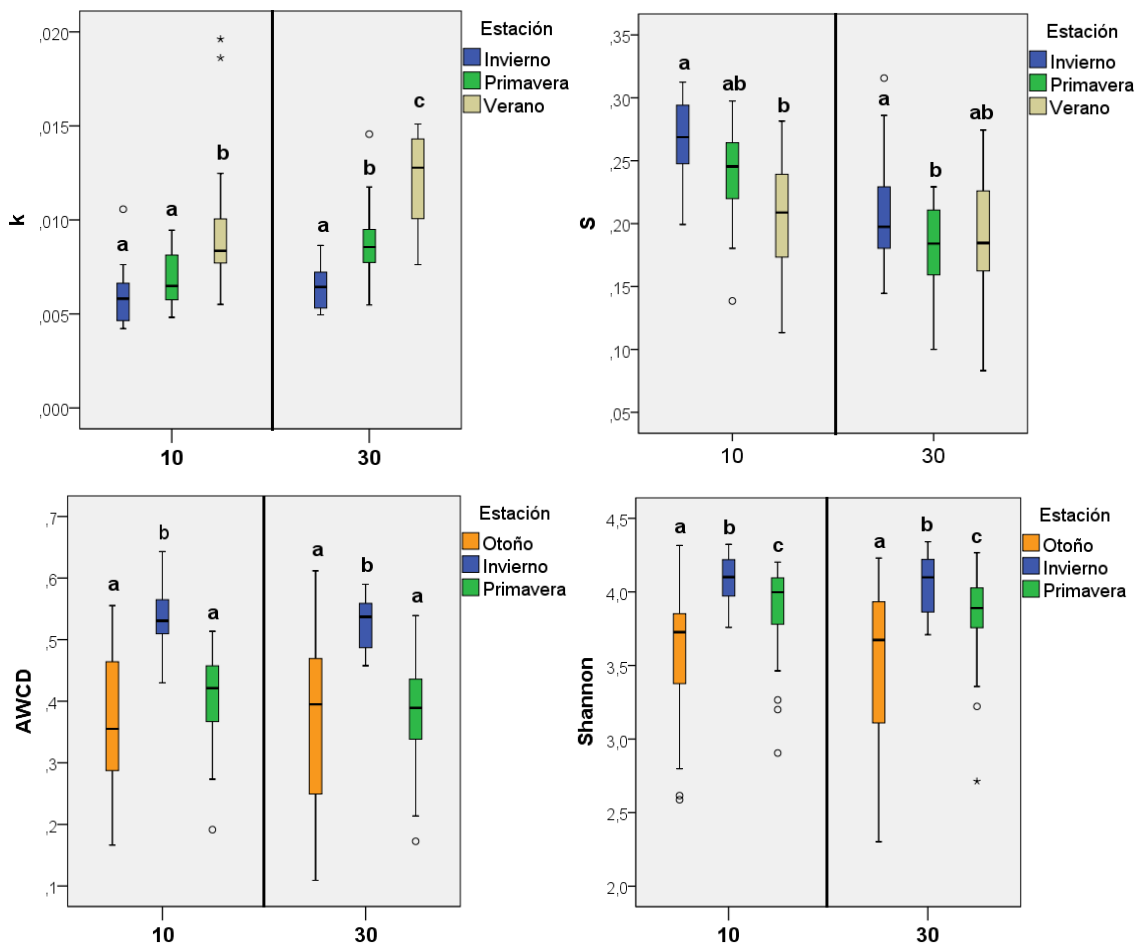


Figura 19.- Boxplot de los parámetros k , S , AWCD y H' en función de la interacción de los factores estación y profundidad.

Las tendencias que muestran los parámetros k y S han sido las mismas que las observadas analizando los datos de las dos profundidades en conjunto, aumentando k de invierno a verano y descendiendo S . En la medida de S el efecto de la estación no se ha visto tan claro en la profundidad 30 cm, lo que podría deberse a que la diferencia de la temperatura del suelo a esa profundidad no sería tan grande entre las distintas estaciones.

En los parámetros de diversidad y actividad, se aprecian las mismas tendencias que estudiando las dos profundidades en conjunto. Observándose en invierno un aumento de ambos parámetros a las dos profundidades, como ya se ha comentado, no sería un resultado esperado, pero que es consistente en ambas profundidades.

4.3. Evaluación de la correspondencia entre los *terroirs* y los parámetros de actividad biológica del suelo

En la Figura 20 se presentan los resultados de los parámetros estudiados, k , S , AWCD y Shannon, en los diferentes *terroirs* establecidos en el viñedo. Observándose si hay efecto del *terroir* en estos. Se comprueba que en el parámetro k solo se ha visto efecto del *terroir* entre los *terroirs* 1 y el 2. El efecto del *terroir* en S se ha apreciado entre el *terroir* 4 y todos los demás. En AWCD no se ha observado ningún efecto de los *terroirs* y en Shannon es en el parámetro en el que más efectos de los *terroirs* se han visto, observándose efecto entre el *terroir* 4 y el resto, y entre el 1 y el 1.1 y el 1 y el 2.

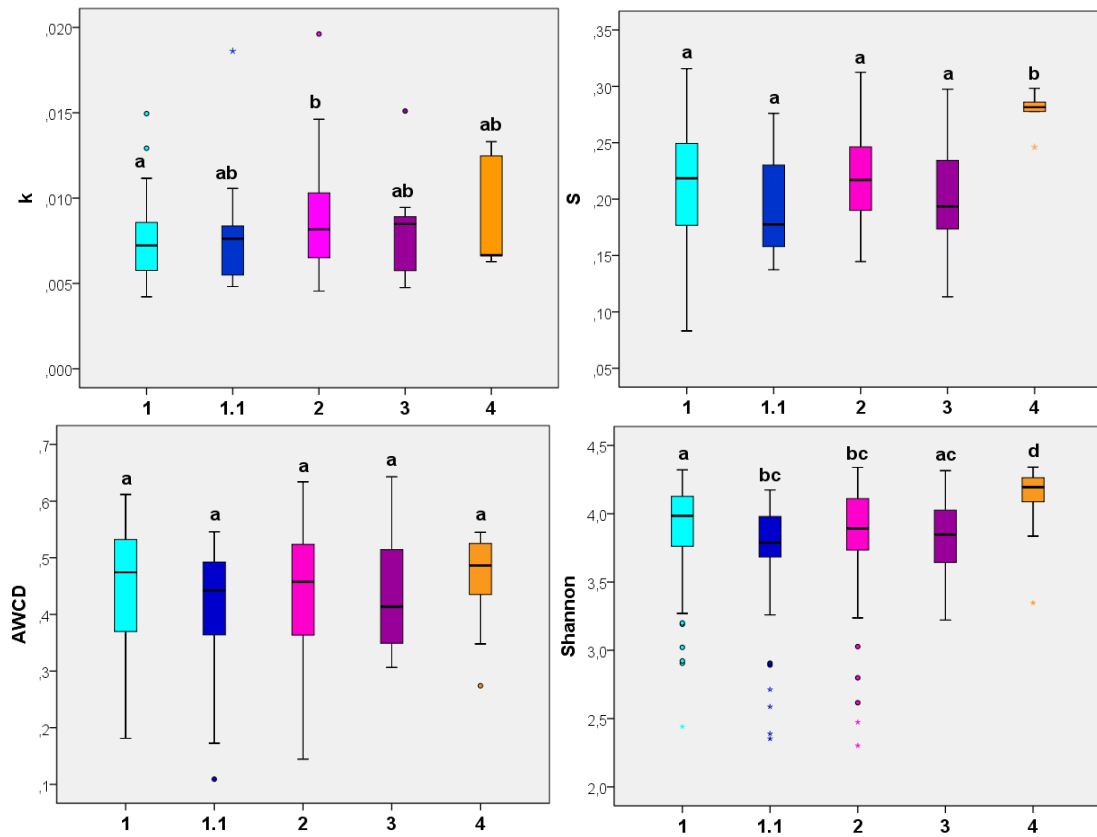


Figura 20.- Boxplot de los parámetros k , S , AWCD y H' en función los distintos terroirs identificados.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de los efectos de los distintos *terroirs* sobre cada parámetro según los factores analizados. Se comprueba que el parámetro sobre el que más efecto han tenido los *terroirs* es el índice de Shannon, observándose esta tendencia tanto analizando todos los factores en conjunto como por separado.

Tabla 1.- Resultados del test de muestras pareadas de los distintos terroirs según los factores analizados en cada uno de los parámetros estudiados (*: existe efecto significativo de los terroirs).

Parámetro	Factor		Terroirs									
			1-2	1-1.1	1-3	1-4	1.1-2	2-3	2-4	1.1-3	3-4	1.1-4
k	Profundidad	10										
		30										
	Estación	Invierno										
		Primavera									*	
		Verano										
S	Profundidad	10				*						
		30										
	Estación	Invierno										
		Primavera										
		Verano				*	*					
AWCD	Ubicación	Calle										
		Cordón							*		*	*
	Profundidad	10										
		30										*
Estación	Otoño											
	Invierno							*		*		
	Primavera	*										
Shannon	Ubicación	Calle										
		Cordón	*	*		*	*		*	*	*	*
	Profundidad	10	*						*			*
		30		*			*				*	
	Estación	Otoño				*			*			*
		Invierno				*			*	*		*
Primavera										*		

Se puede ver que los *terroirs* han tenido más efecto en las medidas de Shannon tomadas en el cordón que en la calle. En cuanto a las profundidades, los *terroirs* muestran efecto en ambas, pero curiosamente, estos efectos no se dan entre los mismos *terroirs*, observándose efecto en Shannon a profundidad 10 cm entre los *terroirs* 1-2, 2-4 y 1.1-4, mientras a profundidad 30 cm el efecto en Shannon es entre el 1-1.1, el 1.1-2 y el 3-4. En las medidas realizadas en las diferentes estaciones también se ha visto efecto de los *terroirs*, especialmente en otoño y en invierno.

Al observarse que parece haber efecto de los *terroirs*, se ha hecho un análisis de componentes principales para observar cuánto se diferencian entre ellos y qué parámetros son los que marcan más estas diferencias.

En la Figura 21 se presentan los resultados del análisis de componentes principales, se comprueba que entre las tres primeras componentes se explica el 82,23% de la variabilidad de los datos. El 43,55% de esta variabilidad se recoge en la componente 1, la cual está fuertemente

relacionada con los parámetros medidos por el método Biolog Ecoplates™, la actividad microbiana y la biodiversidad, estando positivamente relacionados entre ellos. En la componente 3 tienen más peso los índices de las bolsas de té, k y S, los cuales tienen una ligera tendencia a relacionarse negativamente.

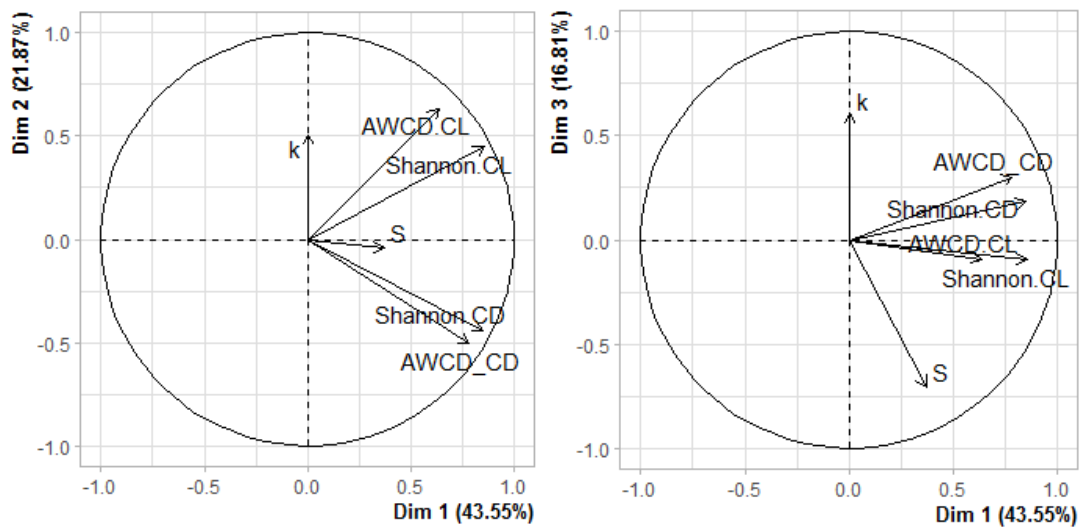


Figura 21.- Análisis de componentes principales.

En la Figura 22 se presentan los resultados del análisis de componentes principales según los diferentes *terroirs*. Se comprueba que la componente 1 puede diferenciar algo más entre *terroirs*, observándose que el *terroir* 4 se proyecta muy separado del resto, especialmente del 1.1, lo que señala su singularidad a nivel de actividad biológica. La componente 3 no parece distinguir entre *terroirs*, de lo que se podría deducir que los parámetros k y S no serían particularmente sensibles para discriminar *terroirs*, al menos en unas condiciones como las de la zona de estudio.

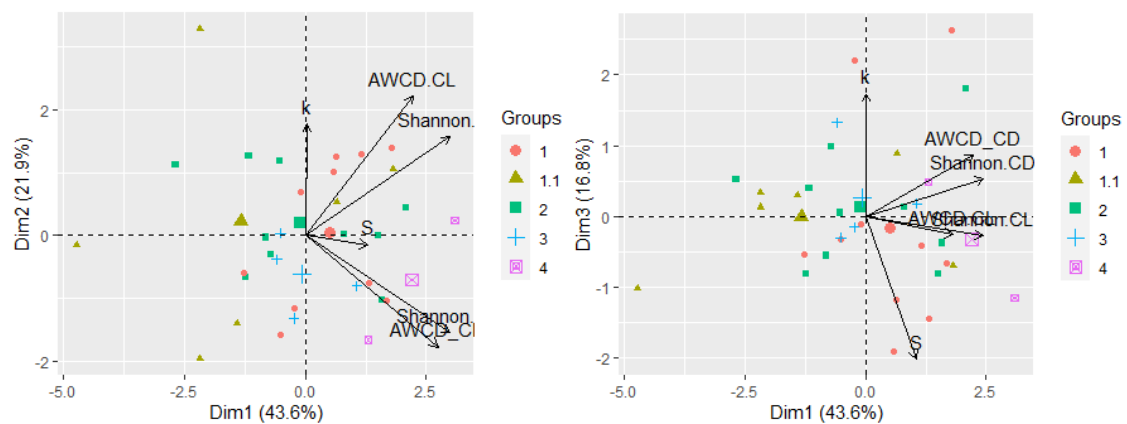


Figura 22.- Biplot de las componentes principales y los diferentes *terroirs*.

Tras constatarse esta separación entre algunos de los *terroirs*, y aprovechando que en la finca se emplean distintas estrategias de manejo de suelo (cubierta o laboreo), se ha querido evaluar si estas diferencias de manejo constituirían un factor adicional de diferenciación, y si su peso era comparable al que tenía el propio *terroir*. Este estudio no podía plantearse de manera sistemática, al no estar todos los tipos de manejo en todos los *terroir*, por lo que se plantea una comparación basada en el mismo análisis de componentes principales descrito arriba. En la Figura 23 se presentan los resultados del análisis de componentes principales según el manejo

del suelo, diferenciándose en cubierta y laboreo. Se comprueba en la componente 1 que hay una tendencia a encontrar algo más de biodiversidad y de actividad en aquellos suelos con cubierta que en aquellos con laboreo, sin que aparezcan diferencias para la componente 3 que no muestra ningún efecto.

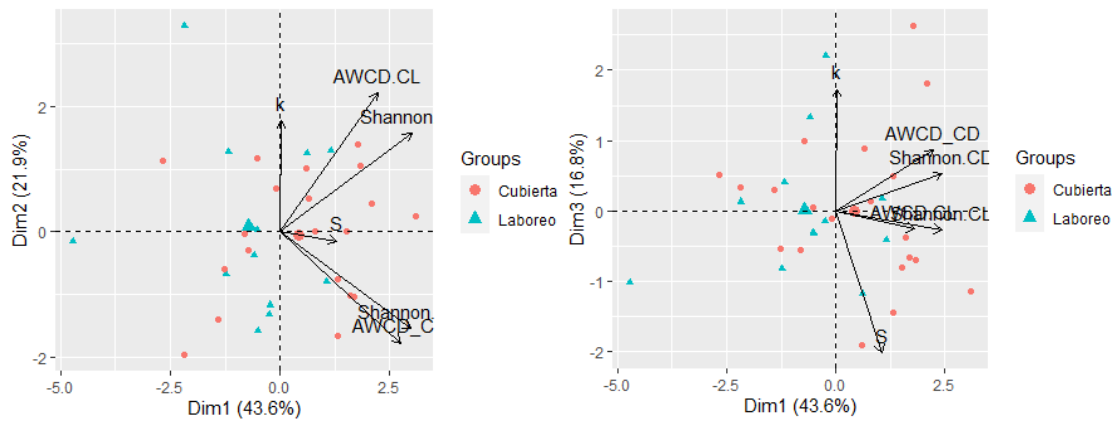


Figura 23.- Biplot de las componentes principales y el factor manejo.

Estos resultados, que relacionan una mayor biodiversidad con el empleo de cubierta, son consistentes con otras investigaciones (Blanco-Canqui et al., 2015, Capó-Bauçà et al., 2019). Sin embargo, Buchholz et al. (2017), en un estudio hecho en viñedo, observaron que la biota del suelo se ve más afectada por sus características que por el laboreo, lo que podría explicar por qué la diferenciación entre *terroirs* resulta, para algunos de ellos, mayor que la observada en la comparación entre distintos manejos del suelo.

5. Conclusiones

Los resultados del presente Trabajo Fin de Máster permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Los métodos evaluados (índice de las bolsas de té y Biolog Ecoplates™) han demostrado su interés para medir la actividad microbiana y la biodiversidad del suelo de manera sencilla en suelos de viñedos de climas mediterráneos. Sin embargo, no todos estos parámetros han sido de igual utilidad para caracterizar *terroirs*, siendo el índice de Shannon, medido mediante Biolog Ecoplates™, el de mayor interés para este objetivo.
- El cultivo de la vid implica, al menos en las condiciones de estudio, unos niveles de biodiversidad del suelo elevada, lo que indica que se trata de un cultivo relativamente respetuoso, y pone en valor el interés del viñedo como parte de un agrosistema sostenible.
- Los factores estudiados (profundidad, ubicación y estación) afectan a los parámetros de actividad y diversidad biológica del suelo considerados, de modo que:
 - Las muestras tomadas a mayor profundidad (30 cm) han presentado valores más altos de k y más bajos de S que las tomadas a menor profundidad (10 cm), probablemente como consecuencia de las diferencias de temperatura y humedad entre ambas profundidades. Por el contrario, la profundidad de la muestra no ha afectado a la actividad ni a la diversidad microbiana medidas con el método Biolog Ecoplates™, si bien hay una tendencia a encontrar valores menores a mayor profundidad.
 - La ubicación del punto de muestreo (calle o cordón) no ha implicado diferencias relevantes en términos generales, si bien los muestreos en las calles pueden verse afectados por la compactación del terreno.
 - Las épocas del año han tenido un efecto muy relevante en todos los parámetros considerados. Los parámetros derivados de las medidas con bolsas de té han seguido el patrón previsible, aumentando k de invierno a verano y disminuyendo S. Por el contrario, los derivados de las placas Biolog Ecoplates™ han mostrado mayor diversidad en invierno que en otoño y primavera. Estos resultados podrían estar, al menos en parte, afectados por las condiciones meteorológicas y las fechas de laboreo, por lo que sería de interés diseñar un protocolo para el muestreo que tuviera en cuenta estos aspectos, al objeto de minimizar las variaciones asociadas a factores distintos de los que se pretende estudiar.
- Los *terroirs* identificados por el personal técnico de la bodega han mostrado, en algunos casos, diferencias en la actividad y diversidad microbiológica de sus suelos, siendo el índice de Shannon el que más discrimina. En consecuencia, podría ser de interés incluir este tipo de medidas en la caracterización de *terroirs*, que habitualmente se basa en el estudio de las propiedades fisicoquímicas del suelo.
- El uso de cubierta vegetal tiende a favorecer ligeramente la biodiversidad microbiana del suelo, lo que confirma su interés como herramienta de gestión sostenible del viñedo.

6. Bibliografía

- Bardgett, R. D., Lovell, R. D., Hobbs, P. J., & Jarvis, S. C. (1999). Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(7), 1021–1030. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00016-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00016-4)
- Belda, I., Palacios, A., Fresno, J., Ortega, H., & Acedo, A. (2017). WineSeq[®] : A new tool for the study of the functional biodiversity of soils, and its use as a biomarker and guide for vitiviculture practices . *BIO Web of Conferences*, 9, 01012. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20170901012>
- Blanco-Canqui, H., Shaver, T. M., Lindquist, J. L., Shapiro, C. A., Elmore, R. W., Francis, C. A., & Hergert, G. W. (2015). Cover crops and ecosystem services: Insights from studies in temperate soils. *Agronomy Journal*, 107(6), 2449–2474. <https://doi.org/10.2134/agronj15.0086>
- Buchholz, J., Querner, P., Paredes, D., Bauer, T., Strauss, P., Guernion, M., Scimia, J., Cluzeau, D., Burel, F., Kratschmer, S., Winter, S., Potthoff, M., & Zaller, J. G. (2017). Soil biota in vineyards are more influenced by plants and soil quality than by tillage intensity or the surrounding landscape. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17601-w>
- Burns, K. N., Kluepfel, D. A., Strauss, S. L., Bokulich, N. A., Cantu, D., & Steenwerth, K. L. (2015). Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by geographic features. *Soil Biology and Biochemistry*, 91, 232–247. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.002>
- Capó-Bauçà, S., Marqués, A., Llopis-Vidal, N., Bota, J., & Baraza, E. (2019). Long-term establishment of natural green cover provides agroecosystem services by improving soil quality in a Mediterranean vineyard. *Ecological Engineering*, 127(October 2018), 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.12.008>
- CE. (2009). *Importancia del vino en las áreas agrícolas totales*.
- Combris, Lecocq, & Visser. (1997). Estimation of a Hedonic Price Equation for Bordeaux Wine : Does Quality Matter ? Author (s) : Pierre Combris , Sébastien Lecocq and Michael Visser Published by : Wiley on behalf of the Royal Economic Society Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/29579>. *The Economic Journal*, 107(441), 390–402.
- Córdoba, J., Molina-Cano, J.-L., Pérez, P., Morcuende, R., Moralejo, M., Savé, R., & Martínez-Carrasco, R. (2015). Photosynthesis-dependent/independent control of stomatal responses to CO₂ in mutant barley with surplus electron transport capacity and reduced SLAH3 anion channel transcript. *Plant Science*, 239, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.07.011>
- Corneo, P. E., Pellegrini, A., Cappellin, L., Roncador, M., Chierici, M., Gessler, C., & Pertot, I. (2013). Microbial community structure in vineyard soils across altitudinal gradients and in different seasons. *FEMS Microbiology Ecology*, 84(3), 588–602. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12087>
- Deloire, A., Vaudour, E., Carey, V., Bonnardot, V., & Van Leeuwen, C. (2005). Grapevine responses to terroir: A global approach. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, 39(4), 149–162. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2005.39.4.888>
- Duddigan, S., Shaw, L. J., Alexander, P. D., & Collins, C. D. (2020). Chemical Underpinning of the Tea Bag Index: An Examination of the Decomposition of Tea Leaves. *Applied and*

Environmental Soil Science, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6085180>

- Eilers, K. G., Debenport, S., Anderson, S., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.03.011>
- Elumeeva, T. G., Onipchenko, V. G., Akhmetzhanova, A. A., Makarov, M. I., & Keuskamp, J. A. (2018). Stabilization versus decomposition in alpine ecosystems of the Northwestern Caucasus: The results of a tea bag burial experiment. *Journal of Mountain Science*, 15(8), 1633–1641. <https://doi.org/10.1007/s11629-018-4960-z>
- Epelde, L., Becerril, J. M., Hernández-Allica, J., Barrutia, O., & Garbisu, C. (2008). Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Applied Soil Ecology*, 39(3), 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.01.005>
- FAO. (2009). *Glosario de Agricultura Orgánica de la FAO*.
- Fujii, S., Mori, A. S., Koide, D., Makoto, K., Matsuoka, S., Osono, T., & Isbell, F. (2017). Disentangling relationships between plant diversity and decomposition processes under forest restoration. *Journal of Applied Ecology*, 54(1), 80–90. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12733>
- G. Seguin. (1986). Terroirs : study techniques Establishment of ecogeopedological sequences. In other Influence of geological and pedological factors. *Experientia*, 42, 861–873.
- Galati, A., Crescimanno, M., Gristina, L., Keesstra, S., & Novara, A. (2016). Actual provision as an alternative criterion to improve the efficiency of payments for ecosystem services for C sequestration in semiarid vineyards. *Agricultural Systems*, 144, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2016.02.004>
- Gergaud, O., & Ginsburgh, V. (2010). Natural Endowments, Production Technologies and the Quality of Wines in Bordeaux. Does Terroir Matter? *Journal of Wine Economics*, 5(1), 3–21. <https://doi.org/10.1017/s1931436100001346>
- Gilbert, J. A., Van Der Lelie, D., & Zarraonaindia, I. (2014). Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 5–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320471110>
- Goddard, M. R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R. C., & Jun, C. (2010). A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: Evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environmental Microbiology*, 12(1), 63–73. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02035.x>
- Guía de la biodiversidad en viñedos*. (2018). https://fundacionglobalnature.org/wp-content/uploads/2016/08/guia_biodiversidad.pdf
- Josling, T. (2006). The war on terroir: Geographical indications as a transatlantic trade conflict. *Journal of Agricultural Economics*, 57(3), 337–363. <https://doi.org/10.1111/j.1477-9552.2006.00075.x>
- Karberg N. J., N. A. S. and C. P. G. (2008). *Field measurements for forest carbon monitoring* (C. M. Hoover (Ed.); Springer S).
- Kassambara, A. (2016). Practical guide to principal component methods in R: PCA, M (CA), FAMD, MFA, HCPC, factoextra. Vol. 2. *Sthda*.

<http://www.sthda.com/english/rpkgs/factoextra> BugReports

- Keuskamp, J. A., Dingemans, B. J. J., Lehtinen, T., Sarneel, J. M., & Hefting, M. M. (2013). Tea Bag Index: A novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(11), 1070–1075. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12097>
- Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., & Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: Evidence for a microbial aspect to terroir. *Scientific Reports*, 5(March), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep14233>
- Kross, S. M., Tylianakis, J. M., & Nelson, X. J. (2012). Effects of Introducing Threatened Falcons into Vineyards on Abundance of Passeriformes and Bird Damage to Grapes. *Conservation Biology*, 26(1), 142–149. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01756.x>
- Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Liang, H., Yan, J., Luo, L., & Wang, X. (2019). Characterizing the intra-vineyard variation of soil bacterial and fungal communities. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01239>
- Lipson, D. A. (2007). Relationships between temperature responses and bacterial community structure along seasonal and altitudinal gradients. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(2), 418–427. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00240.x>
- Liu, D., Zhang, P., Chen, D., & Howell, K. (2019). From the Vineyard to the Winery: How Microbial Ecology Drives Regional Distinctiveness of Wine. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02679>
- Mayer, M., Matthews, B., Rosinger, C., Sandén, H., Godbold, D. L., & Katzensteiner, K. (2017). Tree regeneration retards decomposition in a temperate mountain soil after forest gap disturbance. *Soil Biology and Biochemistry*, 115, 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.09.010>
- Nicholas, K. A., & Durham, W. H. (2012). Farm-scale adaptation and vulnerability to environmental stresses: Insights from winegrowing in Northern California. *Global Environmental Change*, 22(2), 483–494. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2012.01.001>
- OIV. (2018). Functional biodiversity in the vineyard. *OIV Collective Expertise*, 47.
- OIV. (2020). *Situación actual del sector vitivinícola a nivel mundial*. <http://www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/situacion-actual-del-sector-vitivinicola-a-nivel-mundial>
- Paiola, A., Assandri, G., Brambilla, M., Zottini, M., Pedrini, P., & Nascimbene, J. (2020). Exploring the potential of vineyards for biodiversity conservation and delivery of biodiversity-mediated ecosystem services: A global-scale systematic review. *Science of the Total Environment*, 706. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135839>
- Pywell, R. F., Heard, M. S., Woodcock, B. A., Hinsley, S., Ridding, L., Nowakowski, M., & Bullock, J. M. (2015). Wildlife-friendly farming increases crop yield: Evidence for ecological intensification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1816). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1740>
- Robert I. Griffiths, Andrew S. Whiteley, Anthony G. O'Donnell, M. J. B. (2003). Influence of depth and sampling time on bacterial community structure in an upland grassland soil.

Microbiology Ecology, 43(1), 35–43.

- Rutgers, M., Wouterse, M., Drost, S. M., Breure, A. M., Mulder, C., Stone, D., Creamer, R. E., Winding, A., & Bloem, J. (2016). Monitoring soil bacteria with community-level physiological profiles using Biolog™ ECO-plates in the Netherlands and Europe. *Applied Soil Ecology*, 97, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.06.007>
- Schaller, K. (2017). Terroir - Myth and/or reality - outstanding marketing idea? A review. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 45(2), 332–342. <https://doi.org/10.15835/nbha45210898>
- Sofa, A., & Ricciuti, P. (2019). A standardized method for estimating the functional diversity of soil bacterial community by Biolog® EcoPlates™ assay-The case study of a sustainable olive orchard. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(19), 1–9. <https://doi.org/10.3390/app9194035>
- Steenwerth, K. L., Drenovsky, R. E., Lambert, J.-J., Kluepfel, D. A., Scow, K. M., & Smart, D. R. (2008). Soil morphology, depth and grapevine root frequency influence microbial communities in a Pinot noir vineyard. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(6), 1330–1340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.04.031>
- Trivellone, V., Schoenenberger, N., Bellosi, B., Jermini, M., de Bello, F., Mitchell, E. A. D., & Moretti, M. (2014). Indicators for taxonomic and functional aspects of biodiversity in the vineyard agroecosystem of Southern Switzerland. *Biological Conservation*, 170, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.12.008>
- Trubek, A. B. (2008). *The Taste of Place A Cultural Journey into Terroir*. University of California Press.
- UNESCO. (2020). *World Heritage List*.
- Van Leeuwen, C., Friant, P., Choné, X., Tregoat, O., Koundouras, S., & Dubourdieu, D. (2004). Influence of climate, soil, and cultivar on terroir. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(3), 207–217.
- Van Leeuwen, C., Roby, J. P., & De Rességuier, L. (2018). Soil-related terroir factors: A review. In *Oeno One* (Vol. 52, Issue 2). <https://doi.org/10.20870/oenone.2018.52.2.2208>
- Van Leeuwen, C., & Seguin, G. (2006). The concept of terroir in viticulture. *Journal of Wine Research*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/09571260600633135>
- Vaudour, E. (2003). *Les terroirs viticoles. Définitions, caractérisation, protection*.
- Vaudour, E., Costantini, E., Jones, G. V., & Mocali, S. (2015). An overview of the recent approaches to terroir functional modelling, footprinting and zoning. *Soil*, 1(1), 287–312. <https://doi.org/10.5194/soil-1-287-2015>
- White, R. E. (2020). The Value of Soil Knowledge in Understanding Wine Terroir. *Frontiers in Environmental Science*, 8(February), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00012>
- Wickham H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer-Verlag New York (Ed.)).
- Winkler, K. J., Viers, J. H., & Nicholas, K. A. (2017). Assessing ecosystem services and multifunctionality for vineyard systems. *Frontiers in Environmental Science*, 5(APR). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00015>
- Xu, W., Ge, Z., & Poudel, D. R. (2015). Application and Optimization of Biolog EcoPlates in

Functional Diversity Studies of Soil Microbial Communities. *MATEC Web of Conferences*, 22, 1–6. <https://doi.org/10.1051/mateconf/20152204015>

- Zaller, J. G., Winter, S., Strauss, P., Querner, P., Kriechbaum, M., Pachinger, B., Gomez, J. A., Campos, M., Landa, B., Popescu, D., Comsa, M., Iliescu, M., Tomoiaga, L., Bunea, C.-I., Hoble, A., Marghitas, L., Rusu, T., Lora, A., Guzman, G., ... Jung, V. (2015). BiodivERsA project VineDivers: Analysing interlinkages between soil biota and biodiversity-based ecosystem services in vineyards across Europe. *Geophysical Research Abstracts*, 17(February 2019), EGU2015-7272.
- Zarraonaindia, I., Owens, S., Weisenhorn, P., West, K., & Hampton-Marcell, J. (2015). The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. *MBIO*, 6(2), 176. <https://doi.org/10.1128/mBio.02527-14>.Editor
- Zhang, B., Penton, C. R., Xue, C., Quensen, J. F., Roley, S. S., Guo, J., Garoutte, A., Zheng, T., & Tiedje, J. M. (2017). Soil depth and crop determinants of bacterial communities under ten biofuel cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 112, 140–152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.04.019>