



Reyna, Dalila Luz

Estudio de la fracción de proteínas relacionadas a la glomalina como indicador de calidad de suelos



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Reyna, D. L. (2018). *Estudio de la fracción de proteínas relacionadas a la glomalina como indicador de calidad de suelos. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina : Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/870>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Estudio de la fracción de proteínas relacionadas a la Glomalina como indicador de calidad de suelos

TESIS DOCTORAL

Dalila Luz Reyna

dalila.reyna@gmail.com

Resumen

La glomalina es una proteína producida en las hifas de los hongos micorrizicos arbusculares (HMA). Es una glicoproteína hidrofóbica, resistente a la degradación que se encuentra muy abundante en el suelo. La glomalina se define operacionalmente basándose en los métodos para su extracción y cuantificación. Con estas consideraciones se ha definido una fracción fácilmente extraíble (GRSP-FE) y una fracción total (GRSPTotal). El objetivo principal de este trabajo fue analizar si la glomalina puede ser utilizada como un indicador de calidad de suelo que permita discriminar entre diferentes manejos

agrícolas, en particular para caracterizar las denominadas Buenas Prácticas Agrícolas. En consecuencia, la evaluación precisa de la concentración de GRSP en nuestro estudio resultaba crítica. Debido a inconsistencias observadas al inicio del trabajo debimos evaluar la precisión del método de Bradford generalmente usado para cuantificar GRSP.

Analizamos cuidadosamente el ensayo de Bradford mediante la medición de una serie de diluciones de la fracción GRSP-FE, y considerando además la estabilidad temporal del ensayo. Encontramos que los valores de concentración GRSP-FE eran dependientes y variables con el nivel de dilución del extracto de suelo, y que el ensayo mostraba una gran inestabilidad en el tiempo. Después de una serie de estrategias para solucionar estas inconsistencias, optamos por usar otro método colorimétrico que también cuantifica proteína total, el ensayo del ácido bicinónico (BCA). Este método resultó robusto para el análisis y decidimos reemplazar el método de Bradford por el del Ácido Bicinónico.

Una vez establecido el método, analizamos las muestras del proyecto BIOSPAS, en el cual las prácticas de manejo agrícola y los sitios para el estudio se seleccionaron basándose en los principios de la Agricultura Certificada buscando caracterizar las buenas prácticas agrícolas (BPA). Analizamos las dos fracciones definidas para la glomalina: la fácilmente extraíble (GRSP-FE) y la total (GRSP-Total). Encontramos la hipótesis que dice que la glomalina funciona como indicador de calidad de suelo discriminando prácticas agrícolas en los ambientes con suelos franco limosos (Monte Buey y Pergamino) y no se encontró lo mismo en ambientes con suelos franco arenosos (Bengolea) o arcillosos (Viale). Por lo tanto, observamos que la glomalina como indicador de suelo presenta una fuerte dependencia de la textura del suelo del ambiente en estudio. Por otra parte, la fracción de GRSP-total funcionó mejor que la GRSP-FE como indicador, sugiriendo que la glomalina es un indicador que registra la historia de uso del suelo más que efectos inmediatos de cambio de manejo. Para comprender mejor el significado de la glomalina como indicador en el contexto de otros parámetros físicos, químicos, bioquímicos y biológicos analizamos su correlación con dichos parámetros. Se encontró buena correlación con la comunidad de micorrizas en los suelos medidas como densidad de esporas y con su dinámica en relación al ciclo del fósforo. También se corroboraron la característica de hidrofobicidad atribuida a la glomalina a través de su correlación con los lípidos neutros del suelo, y la característica de glicoproteína sugerida por su correlación con los carbohidratos

totales del suelo. Se ratifica la glomalina como un importante componente de la materia orgánica del suelo, presentándose una alta correlación de la glomalina con el carbono orgánico total y con el nitrógeno total; mostrando posiblemente una relación diferencial y característica con las diferentes fracciones orgánicas del suelo (COPg, COPf, COM). Se verificó también la relación de la glomalina con la estabilidad estructural de los agregados.

El hecho que estas relaciones de la glomalina con otros parámetros del suelo que verifican el conjunto de conceptos históricamente desarrollado sobre la misma, se establezcan únicamente en los sitios donde la glomalina funciona como indicador de calidad y manejo de suelo sugiere fuertemente que el paradigma de la glomalina debe ser utilizado no solo considerando la precisión del método de determinación de proteínas sino también la textura de los suelos que se van a analizar.



Universidad Nacional de Quilmes
Departamento de Ciencia y Tecnología
Laboratorio de Bioquímica, Microbiología e Interacciones
Biológicas en el Suelo (LBMIBS)

Tesis de Doctorado en Ciencia y Tecnología

Estudio de la fracción de proteínas relacionadas a la
Glomalina como indicador de calidad de suelos.

Dalila Luz Reyna

Director: Dr. Luis Gabriel Wall

Bernal, Argentina, Marzo, 2015.-

A Mari, mi vieja, por su incansable espíritu.

Quilmes, proviene del término kilmee que en lengua kakana significa “entre cerros”. Los Quilmes son una comunidad diaguita que habita los Valles Calchaquies en la provincia de Tucumán. Sus habitantes lucharon por más de un siglo resintiendo la conquista española, y tras ser derrotados sufrieron el destierro. La mayor parte de su población fue obligada a trasladarse a pie hacia la actual ciudad de Quilmes en la provincia de Buenos Aires.

A ellos, a sus descendientes y a todos aquellos que en estas tierras luchan, resisten y no se rinden haciendo honor a este pueblo que dio origen a su nombre.

Muchas gracias a todos y a cada uno de los que me han acompañado a lo largo de estos años, que me han brindado una mano amiga. Han escuchado, aconsejado y levantado la copa para brindar por los tiempos que fueron, son y serán! Todos ya son parte de este trabajo, y por eso exclamo Si! los logramos!

Al Dr. Luis Gabriel Wall, mi director, que ha sabido guiarme en este arduo camino observando siempre con sutil sabiduría y elocuente honestidad, permitiendo que recorra libremente todas mis fortalezas y debilidades sin escatimarle a ninguna.

A los integrantes del Laboratorio de Bioquímica, Microbiología e Interacciones Biológicas en el Suelos. Porque disfrutar de lo que hago para ganarme el pan sobre la mesa es una gran suerte y además poder hacerlo en lugar donde se respira genuina camaradería es un gran placer. Me han ayudado a sortear numerosas dificultades para ir en busca de lo que estaba buscando, porque siempre formulan las preguntas adecuadas. Lucho, Leo, Anto, Germán, Ale, Beti, Pato, Lean, Juan, Belén, Tomas, Claudio y Luis, y todos los que estuvieron.

A la Universidad Nacional de Quilmes que me ha dado el espacio para hacer lo que hago, y hasta la oportunidad de comenzar en el camino de la enseñanza que está siendo todo un aprendizaje. A Mari, por sus agudos comentarios sobre la especie humana. A Bruno que siempre me dio la solución al problema; la llave, el microscopio, los reactivos, el presupuesto. Al laboratorio de micología por los prestamos en los momentos oportunos. A Andrés por compartir las vicisitudes del enseñar.

Al BIOSPAS, la gran caravana científica! Una experiencia en que participar fue un privilegio y sin la cual este trabajo no sería lo que es, ya que de él forman parte también el trabajo de otros integrantes del proyecto que cooperaron con sus datos, análisis y pensamientos a construirlo. A Noelia por los ratos compartidos, grandes para siempre.

Al ANPCyT y al CONICET que han sido las instituciones que me dieron las becas para poder llevar a cabo el trabajo.

A la familia que la vida me ha dado, por aguantar, aguantar y aguantar...y seguir aguantando. Grandiosos seres celestiales que todo lo mejoran. Con ellos estoy en casa. Y no hay nada mejor que estar en casa, con las pantuflas puestas, tomándose un mate,

charlando sobre lo que me paso de camino a la panadería, y ante el inminente par de unos que se ve sobre la mesa pedir a gritos que me tachen la doble generala. A Mari, Jorgeline, Roci, Ari, Ani, Ceci, Tonys, Leda, Nati, Yanis, Ade, Cami, Vetri, Ariel, Hebe, Rodolfo, Inés, Claudio, Javi, Laura, Sergio, Juan. Muchas Gracias por estar! Y a los peques que han llegado, y a los que están viniendo, por la alegría bajo el brazo de verlos crecer junto a sus queridos padres. Benja, Pedrito, Nina, Nam.

Y finalmente a usted que se sumerirá en este trabajo, y es mejor que lo haga sin esperar demasiado, y tal vez al final pueda encontrar algo de la esencia de la vida en estas líneas; o no. Según Woody Allen (*Melinda and Melinda*, 2004), algunos consideran que la esencia de la vida no es cómica, es trágica. No hay nada intrínsecamente divertido en la terrible existencia humana. Otros discrepan. Los filósofos la consideran absurda porque al final solo se puede reír. Las aspiraciones humanas son ridículas e irracionales. Todo es según el cristal. Nos cuentan una historia, unas anécdotas; algunos las convierten en un relato dramático, y otros toman esas anécdotas y las convierten en una comedia romántica. Pero está visto que no hay una esencia que pueda definirse. Los momentos de humor existen, pero existen en un entorno general trágico. Nos reímos para ocultar nuestro terror a la mortalidad. Y entonces, ahora simplemente levanto mi copa y brindo con usted. Por los buenos momentos. Comedia o tragedia, lo importante es disfrutar la vida mientras puedas. Porque solo tenemos un viaje y cuando se acaba, se acaba. Y con un buen electrocardiograma o no, cuando menos lo esperas, fin.

Índice de Contenidos

Abreviaturas.....	1
-------------------	---

Capítulo 1: Introducción

1.1 El ecosistema del suelo.....	8
1.2 Sistemas agrícolas sustentables y Calidad del suelo.....	14
1.3 La glomalina, una proteína persistente del suelo producida por Hongos Micorrícicos Arbusculares.....	18
1.4 Extracción y cuantificación de glomalina del suelo.....	21
1.5 La glomalina como indicador de calidad de suelos.....	24
1.6 Objetivos e Hipótesis del trabajo.....	27

Capítulo 2: Revisión del método colorimétrico para cuantificar proteínas del suelo relacionadas con la glomalina

2.1 Introducción.....	31
2.2 Materiales y Métodos.....	32
2.2.1 Suelos.....	32
2.2.2 Extracción de glomalina.....	32
2.2.3 Cuantificación de glomalina.....	33
2.2.4 Análisis estadístico.....	34
2.3 Resultados.....	35
2.3.1 Ensayo de Bradford y diluciones del extracto de glomalina.....	35
2.3.2 Ensayo del ácido bicinconínico y diluciones del extracto de glomalina.....	37
2.4 Discusión.....	41

Capítulo 3: Extracción y cuantificación de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina en diferentes manejos agrícolas en siembra directa del suelo

3.1 Introducción.....	44
3.2 Materiales y Métodos.....	45
3.2.1 Suelos.....	45
3.2.2 Extracción de glomalina.....	47
3.2.3 Cuantificación de glomalina.....	47
3.2.4 Análisis estadístico.....	48
3.3 Resultados.....	49
3.4 Discusión.....	55

Capítulo 4. Relación de las fracciones de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina con otros parámetros que caracterizan diferentes manejos agrícolas en siembra directa del suelo

4.1 Introducción.....	60
4.2 Materiales y Métodos.....	61
4.2.1 Suelos.....	61
4.2.2 Extracción de glomalina y cuantificación de glomalina.....	61
4.2.3 Análisis de la comunidad de hongos micorrícicos arbusculares a partir de la separación y caracterización de las esporas presentes en el suelo.....	61
4.2.4 Análisis de perfiles de ácidos grasos de diferentes fracciones de lípidos del suelo.....	62
4.2.5 Análisis químico del suelo y fraccionamiento físico de la materia orgánica del suelo.....	63
4.2.6 Obtención de V_{MAX} para la actividad enzimática de fosfatasa.....	64
4.2.7 Análisis de la estabilidad estructural de los agregados y de la hidrofobicidad del suelo.....	65
4.2.8 Análisis estadístico.....	66

4.3 Resultados.....	66
4.3.1 Análisis de correlación entre los valores de GRSP y la comunidad de esporas de HMA.....	66
4.3.2 Análisis de correlación entre los valores de GRSP y los ácidos grasos neutros y Fosfolípidos.....	69
4.3.3 Análisis de correlación entre los valores de GRSP, la comunidad de esporas de HMA, el fósforo extraíble y la actividad fosfatasa.....	73
4.3.4 Análisis de correlación entre los valores de GRSP y los de carbono orgánico, nitrógeno total y carbohidratos del suelo.....	74
4.3.5 Análisis de correlación entre los valores de GRSP y la estabilidad estructural de los agregados.....	76
4.4 Discusión.....	78
 Conclusiones y Perspectivas.....	 88
 Apéndices: Estudios complementarios	
Apéndice A. Análisis de la influencia de diferentes formas de preservación y almacenamiento de las muestras de suelo sobre los valores medidos de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina.....	92
Apéndice B. Análisis de la sensibilidad de la fracción de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina como indicador de calidad de suelo frente a diferentes rotaciones de cultivos.....	96
 Referencias.....	 100

Abreviaturas

AAPRESID	Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa
AC	Agricultura Certificada
AcM	anticuerpo monoclonal
AIC	sigla en inglés, Akaike Information Criterion criterio de información de Akaike
AN	Ambiente Natural
ANPCyT	Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica
BCA	sigla en inglés, biconchonic acid ácido bicinconínico
BIC	sigla en inglés, Bayesian information criterion criterio de información Bayesiano
BIOSPAS	Biología del Suelo y Producción Agropecuaria Sustentable
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas
BSA	sigla en inglés, <i>bovine serum albumin</i> albúmina sérica bovina
Bt	horizonte B textural
C	carbono
°C	grados centígrados
CERZOS	Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida
CIRN	Centro de Investigación en Recursos Naturales
cm	centímetro
CO₂	dioxido de carbono
CONICET	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
COM	carbono orgánico mineral
COPf	carbono orgánico particulado fino
COPg	carbono orgánico particulado grueso
COT	carbono orgánico total
CH₄	metano
CHt	carbohidratos totales
CHs	carbohidratos solubles
Cu	cobre
d	dilución

DMP-LB	diámetro medio ponderado, medido por el método de Le Bissonnais
EDTA	sigla en inglés, ethylenediaminetetraacetic acid ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	sigla en inglés, enzyme-linked immunosorbent <i>assay</i> ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas
EE.UU.	Estados unidos
FAUBA	Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires
FAMEs	sigla en inglés, fatty acid methyl esters ésteres metílicos de ácidos grasos
FCEFyN	Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
FONCyT	Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica
g	gramo
g	aceleración de la gravedad
GRSP	sigla en inglés, glomalin-related soil proteins proteínas del suelo relacionadas con la glomalina
GRSP-FE	sigla derivada al español de la sigla en inglés EE-GRSP easily extractable glomalin-related soils proteins proteínas del suelo relacionadas con la glomalina fácilmente extraíbles
GRSP-Total	sigla derivada al español de la sigla en inglés Total-GRSP total glomalin-related soil proteins proteínas del suelo relacionadas con la glomalina totales
h	hora
ha	hectárea
H₂O	agua
HMA	hongos micorrícicos arbusculares
hsp	sigla en inglés, heat shock proteins proteína de choque térmico
H₂SO₄	ácido sulfúrico
IMBIV	Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
INVAM	International Collection of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi
km	kilómetro
K_M	constante de Michaelis-Menten

LSD	sigla en inglés, Least Significant Difference mínima diferencia significativa
LBMIBS	Laboratorio de Bioquímica, Microbiología e Interacciones Biológicas en el suelo
M	molar
m	metro
m²	metro cuadrado
MES	sigla en inglés, 2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid ácido 2-(<i>N</i> -morfolino) etanosulfónico
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mm	milímetro
mM	milimolar
MO	materia orgánica
MOD	materia orgánica disuelta
MUB	metilumbeliferona
N	nitrógeno
NH₃	amoníaco
NLFA	sigla en inglés, neutral lipid fatty acid ácidos grasos lipídicos neutros
nm	nanómetro
NO₃⁻	nitrato
Nt	nitrógeno total
ONG	organización no gubernamental
P	fósforo
PANS	Prácticas Agrícolas No Sustentables
PBS	sigla en inglés, phosphate-buffered saline buffer fosfato salino
Pe	fósforo extraíble
pH	potencial de hidrogeno
PLFA	sigla en inglés, phospholipid-derived fatty acids ácidos grasos derivados de fosfolípidos
PO₄⁼	fosfato

ppm	partes por millón
PVA	polivinil-alcohol
%	porcentaje
R²	coeficiente de determinación
rpm	revoluciones por minuto
S	azufre
[S]	concentración de sustrato
S.A.	sociedad anónima
SD	siembra directa
SDS	sigla en inglés, sodium dodecyl sulfate dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	sigla en inglés, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SO₄⁼	sulfato
µg	microgramo
µl	microlitro
µm	micrómetro
UBA	Universidad de Buenos Aires
UNC	Universidad Nacional de Córdoba
UNESCO	<i>sigla en inglés, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i> Organización Cultural, Científica y Educativa de las Naciones Unidas
UNLP	Universidad Nacional de La Plata
UNNE	Universidad Nacional del Nordeste
UNRC	Universidad Nacional de Río Cuarto
UNQ	Universidad Nacional de Quilmes
UNS	Universidad Nacional del Sur
TE-GRSP	sigla en inglés, total extractable glomalin-related soil proteins proteínas del suelo relacionadas con la glomalina extraíbles totales
V₀	velocidad inicial
V_{MAX}	velocidad máxima
vs	versus
WDPT	sigla en inglés, water drop penetration time tiempo de penetración de la gota de agua

Capítulo 1

Introducción

1.1 El ecosistema del suelo

El suelo (pedósfera) es la capa que cubre la superficie de la tierra y se desarrolla en la interface donde los organismos (biósfera) interactúan con las rocas y minerales (litósfera), el agua (hidrósfera) y el aire (atmósfera) (Voroney y Heck, 2014). El concepto de interacción permite pensar al suelo como un ecosistema en constante evolución, que se forma mediante un proceso dinámico. Inicialmente se producen alteraciones físicas y químicas de las rocas por la acción de diversos factores geográficos y climáticos (como elevación, latitud, temperatura, lluvias, exposición al sol y viento y otros), formándose una capa homogénea y rica en nutrientes; que luego por la acción de los organismos se transforma desarrollándose un perfil del suelo en capas con diferentes composiciones llamadas *horizontes*.

La materia mineral está compuestas por partículas de diferentes tamaños: arcillas (< 2 μm), limos (2 a 50 μm) y arenas (50 μm a 2 mm), y la relación de proporción entre ellas determina la *textura del suelo*, que es un determinante importante de la retención de agua y la aireación. Las partículas más chicas (arcillas) tienen una superficie muy grande en relación al volumen y pueden contener más agua y generar un ambiente menos poroso que las partículas más grandes (arenas). Por lo tanto, a mayor contenido de arcilla hay una mayor retención del agua y una menor porosidad, por lo que el flujo de agua y el contenido de aire disminuyen, favoreciendo el desarrollo de un ambiente más anaerobio (suelo arcilloso). Por el contrario, a menor contenido de arcillas menor retención del agua y mayor porosidad favoreciendo un ambiente árido (suelo arenoso) debido al aumento del flujo de agua. Un suelo fértil (suelo franco) tiene una composición equilibrada de minerales que favorece el desarrollo de una gran variedad de organismos. Unida a las partículas minerales (principalmente a arcillas) se encuentra la materia orgánica (MO) del suelo. La MO se define como la suma de compuestos orgánicos que tienen como base un carbono oxidable, que provienen de la descomposición de restos de plantas, animales y microorganismos, y de compuestos liberados al entorno por las raíces y por los mismos microorganismos y fauna del suelo. La descomposición de la MO ocurre por dos procesos paralelos; una *humificación* con conversión de compuestos orgánicos definidos a una

composición indefinida o compleja por acción microbiana inespecífica, incluyendo re-síntesis microbiana, preservación selectiva y estabilización por interacciones con compuestos inorgánicos, y transformación directa a compuestos negros y bioestables (*humus*). El otro proceso es una *mineralización* de la MO con conversión por acción microbiana de compuestos orgánicos lábiles y materia orgánica disuelta (MOD) (*lixiviación*) a formas inorgánicas simples (CO_2 , CH_4 , H_2O , NO_3^- , NH_3 , $\text{PO}_4^{=}$, $\text{SO}_4^{=}$) (Zech y col., 1997). Si bien, la fracción orgánica representa una menor proporción de la masa total de los suelos que la mineral, tiene una gran influencia en las propiedades del suelo, en el funcionamiento de los ecosistemas, y en la magnitud de diversos procesos de transformación que ocurren en los ecosistemas. A su vez, los efectos de la MO a menudo implican interacciones con la fracción mineral del suelo y las variaciones observadas a través de diferentes suelos pueden ser consecuencia no solo de las variaciones cualitativas o cuantitativas en los componentes orgánicos del suelo sino también de esta interacción.

La MO presenta diversas funciones en el suelo y puede influenciar procesos biológicos, físicos o químicos en el suelo. La función más importante de la MO es proporcionar la energía metabólica necesaria para los procesos biológicos del suelo; la mineralización de la MO puede afectar, positiva o negativamente, la reserva de macronutrientes (N, P, S) para las plantas; y tanto la actividad enzimática como el crecimiento de plantas y microorganismos puede estimularse o inhibirse por la presencia de componentes húmicos del suelo. También tiene una importante influencia en las propiedades físico-químicas del suelo; favorece el intercambio de cationes, ayuda a mantener las condiciones de pH (capacidad buffer), forma complejos estables con metales y oligoelementos mejorando la disolución de los minerales, reduciendo las pérdidas de micronutrientes y la potencial toxicidad de los metales, y mejorando la disponibilidad de fósforo. La MO es muy importante en la estabilización de la estructura del suelo, por la formación de enlaces con las superficies de partículas minerales, uniéndose a partículas individuales y a agregados de partículas. La formación de agregados favorece la penetración de agua en el suelo, mejora la aireación y facilita el ingreso de las raíces en crecimiento a través de la estructura del suelo (Baldock y Nelson, 2000). El contenido de

MO caracteriza a los suelos y se relaciona con la fertilidad; si bien en general los suelos contienen entre 1-10 % de MO, los suelos llamados orgánicos pueden contener aún más del 20 % de MO (Voroney y Heck, 2014). Así, la definición de la MO es cambiante, buscando establecer nuevas interpretaciones que representen con más coherencia el concepto de heterogeneidad en función del origen, de la composición química y física, de la diversidad funcional, y del carácter dinámico del material orgánico en el suelo. Para Baldock y Nelson (2000), la MO del suelo es la suma de todo el material orgánico de origen natural o alterado, biológica o térmicamente, que se encuentra en el suelo o en la superficie del suelo, independientemente de su origen, ya sea vivo o muerto, o estado de descomposición, excluyendo las plantas vivas por encima del suelo. Esta definición incluye en la MO además de los componentes no-vivos, la comunidad de organismos del suelo, que son parte del carbono orgánico determinado cuando se mide la materia orgánica del suelo.

La abundancia y diversidad de organismos en el suelo es mucho mayor que en cualquier otro ecosistema. Un g de suelo contiene 10, 100 y hasta 1000 metros de hifas de micorrizas arbusculares, 10^9 bacterias y cientos de especies de organismo diferentes (Voroney y Heck, 2014). Si bien, los organismos del suelo pueden clasificarse de acuerdo a varios criterios la clasificación según su tamaño es muy usada (Bardgett, 2005; Coleman y Wall, 2014).

La **macrofauna**, que son los más grandes (más de 2 mm y hasta 20 mm de diámetro), comprenden diferentes grupos taxonómicos que atraviesan varios niveles tróficos (categoría de clasificación de los organismos vivos según su forma de obtener materia y energía). Los denominados ingenieros del ecosistema: lumbricina (lombrices de tierra), isoptera (térmitas) y formicidae (hormigas), son capaces de moverse a través del suelo causando cambios físicos en la materia biótica y abiótica, modulando la disponibilidad de recursos para otras especies y construyendo estructuras órgano-minerales características (estructuras biogénicas) en donde se producen procesos tales como la estimulación de la actividad microbiana, la formación de la estructura del suelo, la dinámica de la materia orgánica del suelo y el intercambio de agua y gases. Los habitantes

de la hojarasca: coleoptera (escarabajos), araneae (arañas), chilopoda (ciempiés), diplopoda (milpiés), son capaces de fragmentar físicamente la vegetación o rastrojos de cultivos y favorecen la actividad microbiana.

Dentro de la **mesofauna** (entre 0,1 a 2 mm de diámetro), los más conocidos son los microartrópodos y entre ellos los más abundantes en el suelo son collembola (colémbolos o saltadores) y acari (ácaros). Estos organismos regulan la descomposición de los residuos vegetales, afectando el ciclo de nutrientes y el crecimiento de las plantas. Los ácaros constituyen más del 80% de todos los artrópodos vivos del suelo, y están representados por cuatro subórdenes con diferentes hábitos alimenticios: *Oribatida* (fungívoros), *Mesostigmata* (predadores), *Prostigmata* (fungívoros o predadores) y *Astigmata* (bacteriófagos). Los colémbolos son en general fungívoros, bacteriófagos aunque también saprófagos (se alimentan de plantas en descomposición), coprófagos (se alimentan de excrementos), necrófagos (se alimentan de cadáveres).

Los dos grupos más abundantes de **microfauna** (menos de 0,1 mm de diámetro) son los protozoos (organismos eucariotas unicelulares) y los nemátodos (gusanos redondos). Estos organismos requieren una película de agua alrededor de las partículas de suelo para moverse, alimentarse y reproducirse, y por lo tanto su actividad está limitada al espacio de poro lleno de agua en el suelo, pero puede soportar condiciones adversas por la rápida formación de estructuras resistentes. Su importancia se debe a sus hábitos de alimentación; los protozoos son principalmente bacteriófagos, aunque también hay fungívoros, predadores y saprófagos, y los nemátodos se alimentan de plantas, aunque también hay bacteriófagos, fungívoros, predadores y omnívoros. Afectan el flujo de nutrientes y energía tanto por mejora de la disponibilidad de nutrientes para absorción de la planta como impactando la actividad y la composición microbiana.

Los miembros más numerosos y diversos de la comunidad de organismos del suelo son los **microorganismos**, que comprenden bacterias, hongos, archeas, actinomicetes y algas, y constituyen la denominada microflora del suelo (rango de tamaño similar a la microfauna, menos de 0,1 mm de diámetro). Son los principales responsables de la descomposición, transformación y mineralización de sustancias orgánicas complejas. Los

dos grupos más abundantes son las bacterias y los hongos; sin embargo, actualmente se le da también gran importancia al grupo de las archeas. Las **archeas** son procariotas unicelulares que se han presentado históricamente como extremófilas, ya que se han encontrado originalmente en ambientes que presentan condiciones extremas de temperatura, salinidad, acidez o alcalinidad. En estudios recientes se reportó su presencia en suelos de condiciones no extremas, y se encontró que las archeas son muy importantes, incluso más que las bacterias, en la oxidación del amoníaco, que es un proceso clave del ciclo del nitrógeno, siendo los organismos oxidantes de amoníaco más abundantes en los suelos (Leininger y col., 2006).

Las **bacterias** son procariotas, unicelulares, y se mueven a través de las películas de agua debido a la presencia de flagelos, o si los flagelos están ausentes se mueven por transporte pasivo a través de las raíces, de la fauna, o por el movimiento del agua en el suelo. Las bacterias realizan funciones específicas de gran importancia ecológica. Por ejemplo, bacterias quimioautótrofas, que obtienen energía por medio de la oxidación de compuestos inorgánicos, como las nitrificantes (géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*) son importantes en el ciclo de nutrientes ya que oxidan amonio a nitrato (proceso de nitrificación). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* infectan las raíces de las leguminosas, aumentando considerablemente las reservas de N, lo que tiene importantes consecuencias para la productividad de la planta y la estructura de la comunidad. Algunas bacterias libres, bacterias heterótrofas no simbióticas también realizan este proceso de fijación de N, por ejemplo, las de los géneros *Azotobacter* y *Clostridium*. De todos modos, el conocimiento de la diversidad bacteriana ha sido ampliado enormemente con el advenimiento de las técnicas moleculares que revelaron que solo conocemos por cultivo en el laboratorio un 1-10% de la diversidad microbiana que existe, con lo cual el paradigma de la relación estructura de las comunidades bacterianas y funcionamiento del suelo es un tema de debate actualmente (Wall, 2011).

Los **hongos** son eucariotas, y pueden ser unicelulares (levaduras) o filamentosos y formar un micelio fúngico; son heterótrofos, es decir obtienen energía por medio de la oxidación de compuestos orgánicos; no contienen clorofila y se alimentan por absorción.

Su principal función en el suelo es descomponer la materia orgánica del suelo a través de la producción de enzimas extracelulares. A su vez, las extensas redes de micelio pueden explorar recursos que estén disponibles en el espacio y en el tiempo, y trasladar los nutrientes a otras partes de la red de micelio. También se unen a las partículas del suelo mejorando la estabilidad estructural, y proporcionan una fuente de alimento para la fauna del suelo. Algunos hongos, los micorrícicos, forman asociaciones mutualistas con raíces de las plantas, suministrando nutrientes limitantes del crecimiento a la planta, como N y P, y obteniendo a cambio C y un espacio libre de competencia (Bardgett, 2005). Dentro de éstos, los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), que tienen una gran importancia en el suelo, son los considerados productores de la glomalina que fue objeto de estudio de este trabajo.

En resumen, los factores que influyen en la formación del suelo son: el material de origen, el clima, la comunidad de organismos, la topografía (que se refiere a los accidentes del terreno) y el tiempo (Voroney y Heck, 2014; Hillel, 2007). Estos factores no son independientes sino que, como vimos anteriormente, están íntimamente relacionados entre sí. Además de los factores antes mencionados también se incluye la intervención humana que generalmente tiene un efecto negativo produciendo la degradación del suelo. La deforestación de especies vegetales nativas, el cultivo por labranza mecánica (muy relacionado con el fenómeno de compactación, que es la densificación del suelo por pérdida de aire) y la aplicación de fertilizantes y pesticidas, son ejemplos que promueven la modificación de los patrones de agua y aire, salinización, acidificación o alcalinización, desertificación, erosión y pérdida de MO que conducen a la degradación del suelo (Voroney y Heck, 2014; Hillel, 2007). Por lo tanto, es muy importante generar un manejo racional en busca de alcanzar la mayor productividad posible manteniendo la biodiversidad del suelo; esto se relaciona con el concepto de *sustentabilidad*. El uso sustentable de un recurso significa que el recurso sea usado de manera tal que la potencial calidad y productividad se preserve, es decir que el uso en el presente no disminuya la calidad del recurso y la habilidad de las generaciones futuras para continuar usándolo (Hillel, 2007).

1.2 Sistemas agrícolas sustentables y Calidad del suelo

El desarrollo de sistemas agrícola sustentables requiere mantener la estabilidad en el tiempo de la producción de alimentos y su rentabilidad, a la vez que se mantiene el equilibrio con el medio ambiente para proteger, conservar y/o mejorar el suelo como recurso y favorecer el desarrollo de los seres humanos y de la mayoría de las especies (Doran y Zeiss, 2000). Por lo tanto, el concepto de sustentabilidad de un sistema agrícola está asociado al manejo que realiza el productor, que es quien tiene y decide el uso del suelo. Asimismo, debe ser atendido desde ámbitos locales, regionales e internacionales y debe encontrar apoyo en todos los sectores interesados. Depende de decisiones políticas de cada país y región que entiendan el desafío de resguardar las superficies cultivables para producir más y mejores alimentos (De Lima Holzmann, 2013). Los científicos, por su parte, hacen una importante contribución mediante la traducción de los conocimientos científicos y la información sobre la función del suelo a enfoques prácticos a través de los cuales los productores pueden evaluar la sustentabilidad de sus sistemas agrícolas (Doran, 2002).

En este contexto aparece la Siembra Directa (SD), desarrollada en Inglaterra en la década de 1940 (AAPRESID, 2013a), que es un sistema de manejo agrícola que consiste en cultivar sin disturbar el suelo y que busca una solución al creciente problema de la erosión del suelo. En Argentina, las primeras experiencias en SD datan de la década de 1970. Sin embargo, fue en 1989 con la fundación de AAPRESID (Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa) que esta tecnología tuvo una gran difusión entre los productores, llegando actualmente al 78,5 % de la superficie sembrada, alrededor de 20 millones de hectáreas que corresponden a la cuarta parte de la superficie mundial bajo SD (AAPRESID, 2013a; AAPRESID, 2013b; AAPRESID, 2013c). AAPRESID es un organización no gubernamental (ONG) establecida para crear una red interactiva de productores innovadores que buscan maneras prácticas para desarrollar, adaptar y adoptar un nuevo paradigma en la agricultura basado en la SD (Albertango y col., 2014). En su experiencia de más de 25 años y con el apoyo de trabajos de investigación realizados por diferentes organizaciones, ideó un sistema de gestión de calidad ambiental y productivo denominado

Agricultura Certificada (AC) (AAPRESID, 2013d), con el fin de lograr efectos en la producción a largo plazo y otorgar un valor agregado a nivel empresarial, en función a un conjunto de metodologías que se conocen como Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) (AAPRESID, 2013e) y que comprenden las siguientes prácticas :

- No remoción, presencia de cobertura: Como ya mencionamos, consiste en cultivar sin disturbar el suelo generando la presencia de cobertura permanente por cultivos y/o rastrojos. Esto favorece a disminuir la erosión del suelo, el uso de combustible y la emisión de carbono; y mejora la calidad del agua, la actividad biológica y la fertilidad del suelo. Así, la SD logra mayores niveles productivos con estabilidad temporal y en armonía con el ambiente, disminuyendo los costos de producción.

- Rotación de cultivos: Consiste en la variación de cultivos en el tiempo y el espacio. Esto permite un uso balanceado de nutrientes mejorando las condiciones físicas, bioquímicas y biológicas del suelo, también tienen un efecto inhibitorio sobre patógenos y presenta ventajas desde el punto de vista empresarial permitiendo la diversificación de los riesgos productivos.

- Manejo Integrado de Malezas, Enfermedades, Insectos y otras plagas: Procura reducir los problemas fitosanitarios generados por malezas, enfermedades, insectos y otras plagas, a través de la utilización de diversas tácticas, considerando factores económicos, sociales y ambientales, y teniendo un profundo conocimiento de la biología de la plaga con el fin de optimizar el control en relación a todo el sistema de producción de una especie cultivada. En lugar de eliminar una plaga se busca mantenerla por debajo del nivel de daño económico, con el fin de afectar lo menos posible las redes tróficas.

- Manejo eficiente y responsable de agroquímicos: Se busca seleccionar productos agroquímicos con niveles de toxicidad cada vez menores, que se apliquen en concentraciones también menores y que sean cada vez más específicas controlando sólo a las plagas objetivo sin afectar al resto. También es importante considerar tanto la seguridad en el almacenamiento y el transporte de los productos, como en la eliminación de las aguas residuales. Esto procura proteger el ambiente, la salud de trabajador, y la

salud del consumidor para lo cual particularmente importante considerar el tiempo transcurrido entre la aplicación del agroquímico y la cosecha.

- Nutrición estratégica: Procura la incorporación de un plan racional de fertilización, que contemple tanto la cantidad de nutrientes a aplicar como su uso eficiente en los cultivos. Con este fin, resulta particularmente importante realizar un análisis del suelo para determinar la correcta cantidad de fertilizante. Una buena forma de evaluar la fertilidad química es el balance de nutrientes, que se estima como la diferencia entre la cantidad de nutrientes que entran y que salen de un sistema definido en el espacio y en el tiempo.

Este conjunto de metodologías busca definir sistemas agrícolas sustentables, ya que permite obtener mejores resultados en los rendimientos de la producción, mejorando la conservación del ambiente y en consecuencia la salud de plantas, animales y seres humanos. En este sentido la sustentabilidad es un sinónimo de la salud o calidad del suelo (Doran, 2000). La *calidad del suelo* ha sido definida como "la capacidad de un tipo específico de suelo para funcionar, dentro de los límites de sistemas naturales o manejados, manteniendo la productividad de plantas y animales, manteniendo y/o mejorando la calidad del agua y del aire, y en concordancia con el desarrollo de la humanidad" (definido por la Soil Science Society of America Ad Hoc Committee on soil quality) (Doran, 2000). Actualmente se prefiere utilizar el término *salud del suelo* ya que presenta al suelo como un sistema vivo y dinámico cuyas funciones están mediadas por una diversidad organismos, que son los que requieren un manejo adecuado para su conservación (Doran, 2000). Así, la evaluación de la calidad o salud del suelo y la dirección del cambio en el tiempo, es el principal indicador de la sustentabilidad de un sistema agrícola.

En este sentido, se han establecido un conjunto de características que debe tener un buen indicador de calidad de suelo: reflejar algún aspecto del funcionamiento del ecosistema, tener buena correlación con funciones benéficas del suelo, presentar sensibilidad a las variaciones de manejo, ser comprensible y útil para los productores, y debe ser de simple y barata determinación (Doran, 2000). Clásicamente, se

han utilizado indicadores relacionados con propiedades físicas y químicas del suelo, como textura, contenido de agregados, densidad aparente, porosidad, capacidad de retención de agua, conductividad eléctrica, porcentaje de sodio intercambiable, pH, fósforo, azufre, contenido de carbono (AAPRESID, 2013e; Gil *et al.*, 2005). Sin embargo, se observó que estas propiedades cambian lentamente, por lo que además resulta necesario definir indicadores basados en propiedades bioquímicas y biológicas del suelo debido a que su funcionamiento depende en gran proporción de ellas, y además éstas podrían ser sensibles a detectar pequeños cambios.

Por lo tanto, debido a la diversidad de factores químicos, físicos y biológicos que controlan las variaciones de calidad del suelo en el tiempo y en el espacio y a la complejidad de los suelos en sí mismos, la evaluación de la calidad de suelo es un proceso también complejo. Para realizar una evaluación integrada del funcionamiento del suelo parece más acertado utilizar un conjunto mínimo de indicadores que abarquen diferentes características, ya que un indicador individual no podría describir y cuantificar todos los fenómenos involucrados (Doran, 2000; Romaniuk y col., 2011a). Como punto de partida en la búsqueda de indicadores de calidad de suelo es importante consensuar algunos aspectos como; qué parámetros deben ser parte de un conjunto mínimo de datos para evaluar la calidad de suelo, estandarizar las metodologías utilizadas en la determinación de dichos parámetros y también los procedimientos para la recolección y almacenamiento de muestras de suelo, y finalmente ajustar modelos de referencia para cada sistema de manejo evaluado, mediante el establecimiento de pesos y valores a cada función/indicador en estos modelos, teniendo en cuenta aspectos característicos de los sitios (Doran, 2000). Varios métodos se han usado para calcular un índice cuantitativo e integrado de calidad de suelo. El enfoque más utilizado se basa en la selección de un conjunto mínimo de indicadores cuya relevancia se establece a través de los resultados de un análisis de componentes principales y después se suman para obtener un valor final (Andrews y col., 2002; Romaniuk y col., 2011a). En un análisis de índices de calidad de suelo construidos a través de dos enfoques metodológicos, básicamente analizando por componentes principales los parámetros físicos, químicos y biológicos, conjuntamente o

de manera separada; se observaron las mismas tendencias entre las situaciones evaluadas por ambos enfoques (Romaniuk y col., 2011a). A su vez, se observó que estos índices de calidad de suelo integrados mostraron la misma sensibilidad que índices basados en la diversidad microbiológica del suelo (Romaniuk y col., 2011b). Sin embargo, la inclusión de los parámetros físicos, químicos y biológicos en el índice final de calidad de suelo permitiría representar una imagen más completa del impacto de las prácticas de manejo en el suelo (Romaniuk, 2011a), y así representar más adecuadamente la complejidad característica del suelo.

1.3 La glomalina, una proteína persistente del suelo producida por Hongos Micorrízicos Arbusculares

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) pertenecen al phylum Glomeromycota (Schüssler y col., 2001) y forman una simbiosis mutualística con las raíces del 80% de las plantas superiores (Allen, 1996). En esta simbiosis las plantas se benefician por el aumento de la captación de nutrientes, principalmente fósforo y nitrógeno, mientras que los hongos tienen un acceso directo y constante a carbohidratos producidos por la planta en la fotosíntesis (Smith y Read, 2008). Las asociaciones raíz-HMA, llamadas micorrizas arbusculares, han existido por más de 1000 millones de años (Morton, 1990; Simon y col., 1993; Taylor y col., 1995) y se presentan en prácticamente todos los ecosistemas de la tierra (Berea y col., 1997). Las micorrizas arbusculares son un tipo de asociación endomicorrízica caracterizada por la formación de estructuras intracelulares en la raíz colonizada; tales como *arbúsculos*, que son estructuras formadas por hifas muy ramificadas y son los sitios primarios de intercambio de nutrientes entre los simbiosites; *vesículas*, que son estructuras de almacenamiento de lípidos y también pueden ser intercelulares; y *circunvoluciones*, enrollamientos de hifas que podrían tener una función similar a los arbúsculos. Estas estructuras intrarradicales se conectan a un micelio extraradical o micelio del suelo. El micelio extraradical se extiende con la formación de hifas corredoras para la exploración del suelo y de nuevas raíces para ser colonizadas, y está involucrado en la absorción de nutrientes inmóviles en el suelo. También tiene como

función la formación de esporas, que son los propágulos para la dispersión en el tiempo y en el espacio de los HMA (Smith y Read, 2008).

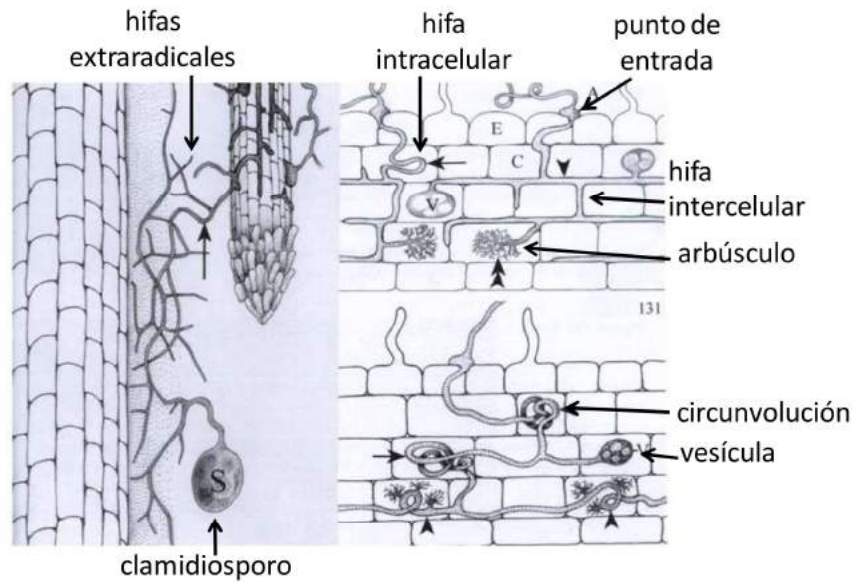


Figura 1.1 Esquema de las diferentes estructuras que forman los hongos micorrízicos arbusculares en relación con la raíz del hospedero (modificado de Smith y Read, 2008)

La **glomalina** se identificó en la década de 1990 en un trabajo para producir anticuerpos monoclonales que reaccionaran con los HMA (Wright y col., 1996). El anticuerpo monoclonal 32B11 desarrollado contra esporas de *Glomus intraradices* FL208 muestra reacción con aislados de numerosas especies de HMA, y no presenta, o es muy baja, reactividad cruzada con otros hongos no micorrízicos típicos del suelo, tales como *Rhizoctonia*, *Gaeumannomyces*, *Endogone*, *Mucor*, y *Phytophthora* (Wright y col., 1996). Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta usando el AcM 32B11 se evidenció que la glomalina forma parte de la pared celular de las hifas de los HMA (Driver y col., 2005); también se detectó glomalina en pelos radiculares, en raíces en la fase activa de micorrización, en arbusculos dentro de las células de la raíz, en la pared de esporas en el micelio del suelo, y asociada a la materia orgánica del suelo y a partículas del suelo; pero no se observó glomalina sobre raíces no micorrizadas ni sobre hifas secas (Rillig y Mummey, 2006; Steinberg y Rillig, 2003; Wright, 2000; Wright y col., 1996). Esta sustancia

reactiva al anticuerpo 32B11 asociada a las estructuras de los HMA se denominó “glomalina”. El nombre “glomalina” deriva de Glomales, que es el orden taxonómico en el que se incluía a los HMA en la clasificación vigente en el momento de la identificación. Se debe considerar que en la clasificación taxonómica actual los HMA constituyen un phylum o división dentro del reino Hongos (Schüssler y col., 2001). A su vez, se reportó que la glomalina presenta propiedades fisicoquímicas inusuales; es una glicoproteína hidrofóbica, resistente a proteólisis y a desnaturalización por temperatura, pH y detergentes (Wright y col., 1996; Wright y Upadhyaya, 1996; Wright y Upadhyaya, 1998; Bolliger y col., 2008), lo que indica su aparente estabilidad. Esto sugiere que la glomalina inicialmente producida en las paredes celulares de las hifas en crecimiento activo de los HMA permanece en forma residual en el suelo luego de la muerte y degradación de las hifas.

Sin embargo, el significado y papel de la glomalina en el ecosistema todavía no está claro (Treseder y Turner, 2007). Las interpretaciones acerca de su posible funcionalidad han ido cambiando o se han ido ampliando o modificando, desde un rol que se interpretó como su secreción activa para mejorar la agregación del suelo mejorando el micronicho donde vive el hongo (Wright y Upadhyaya, 1998; Steinberg y Rillig y, 2003), a ser considerada una hidrofobina que modifica la adquisición de agua (Driver y col., 2005; Rillig, 2005), y también se ha relacionado estructuralmente con una proteína de choque térmico (hsp), proteínas que se producen en respuesta a situaciones de estrés (Gadkar y Rillig, 2006).

Finalmente, la hipótesis actual determina que la glomalina está específicamente relacionada con el metabolismo de los HMA, aunque se desconoce aún su función fisiológica, y tampoco se termina de comprender su rol como una proteína persistente del suelo, si esto es casual o si responde a una propiedad que funciona como elemento donde actúa la selección natural en la evolución de los HMA y su interacción simbiótica y con el ambiente. En el suelo se la reconoce como una proteína de pegamento de partículas de suelo formando conglomerados con fragmentos de raíces y materia orgánica del suelo y

favoreciendo el desarrollo de un ambiente en el que se multiplican las micorrizas (Purin y Rillig, 2007).

1.4 Extracción y cuantificación de la glomalina del suelo

En la práctica la glomalina se define operacionalmente como una proteína del suelo resistente a altas temperaturas, y su identificación se basa en los métodos usados para su extracción y en los ensayos usados para su cuantificación. En la ciencia del suelo es una práctica común definir fracciones basadas en un método de extracción determinado, por ejemplo las fracciones de la materia orgánica se definen por su solubilidad en determinado medio; los ácidos húmicos son solubles en solución alcalina y precipitan cuando se acidifican los extractos alcalinos, los ácidos fúlvicos son solubles en solución alcalina y permanecen solubles en la acidificación de los extractos alcalinos, y las huminas son insolubles en solución alcalina. La fracción operacional denominada glomalina no es en absoluto una sustancia pura en el sentido bioquímico de una fracción proteica. Por esta razón, Rillig (2004a) sugiere que el término "glomalina" en el sentido estricto debe referirse sólo al producto del gen putativo de los HMA que se ha descrito como el gen que codifica para el producto reactivo al anticuerpo 32B11, mientras que las fracciones extraídas desde el suelo deben ser nombradas como "proteínas del suelo relacionadas con la glomalina" (GRSP). Los protocolos usados para extraer glomalina del suelo, que inicialmente fueron establecidos por Wright y Upadhyaya (1996), indican que la solubilización de glomalina se lleva a cabo mediante el uso de un buffer de citrato de sodio en una relación 8:1 (volumen/peso) de buffer de extracción a suelo, y requiere un proceso en una autoclave (121 °C). Tanto la concentración y el pH del buffer de citrato de sodio como el tiempo de autoclavado varían según la fracción glomalina a extraer. Se ha definido una fracción fácilmente extraíble de glomalina (GRSP-FE) que se extrae por 30 min de autoclavado (121 °C) de 1 g de suelo suspendido en 8 ml de citrato de sodio 20 mM, pH 7.0, y que se relaciona con las hifas biológicamente activas. Por otro lado, una fracción total de glomalina (GRSP-Total) que se extrae por 60 min de autoclavado (121 °C) de 1 g de suelo suspendido en 8 ml de citrato de sodio 50 mM, pH 8.0, y que se considera

la proteína residual que ha quedado en el suelo luego de la muerte y degradación de las hifas, como parte de la materia orgánica asociada a las partículas del suelo. Dos métodos se han usado históricamente para cuantificar la cantidad de glomalina en los extractos de suelo: el ensayo de Bradford y el ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA) con el AcM 32B11 (Wright y col., 1996). El ensayo de Bradford cuantifica proteínas totales y no es capaz de distinguir la fuente de proteína (Rosier y col., 2006), sin embargo es simple, rápido y reproducible (Halvorson y Gonzales, 2006). El uso del ensayo de Bradford para cuantificar glomalina se basa en la similitud observada en los perfiles de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de extractos de hifas de HMA y de suelo (Wright y Upadhyaya, 1998), lo que supone que el procedimiento de extracción desnaturaliza completamente todas las proteínas distintas a la glomalina. Por otro lado, utilizando el AcM 32B11 el ensayo cuantifica proteína inmunoreactiva, lo que indica que el ensayo de ELISA es mucho más específico que el ensayo de Bradford a pesar de que es operativamente más complejo.

Varios trabajos han revisado el concepto operacional de la glomalina y los métodos usados para su cuantificación. Se ha demostrado que junto con la fracción de glomalina se co-extraen otras proteínas termoestables no micorrícicas que pueden estar presentes en el suelo (Rosier y col., 2006; Gillespie y col., 2011), así como también ácidos húmicos y fúlvicos que son componentes de la materia orgánica del suelo (Nichols y Wright, 2005, 2006) y lípidos (Gillespie y col., 2011). Además, se ha encontrado que proteínas distintas a la glomalina y compuestos polifenólicos (ácidos húmicos y taninos) presentes en el extracto puede reaccionar con el ensayo de Bradford y sobreestimar así los valores obtenidos, como también producir degradación o interferencia en el ensayo de ELISA y subestimar sus resultados (Rosier y col., 2006; Whiffen y col., 2007; Schindler y col., 2007; Roberts y Jones, 2008). Por otro lado, aunque los protocolos utilizados para extraer glomalina que se describieron anteriormente son generalmente aceptados, muchos autores han realizado modificaciones de estos protocolos tratando de mejorar las condiciones de extracción. Algunos autores (por ejemplo, Wright y Upadhyaya, 1998; Wright y Anderson, 2000; Rillig y col., 2003; Halvorson y González, 2006; Rosier y col.,

2006; Nichols y Wright, 2005, 2006; Wright y col., 2006; Schindler y col., 2007) han extraído la fracción total de glomalina con varios ciclos de autoclavado de 60 min sucesivos con buffer de extracción fresco. El punto final de extracción de la glomalina total se ha descrito como "... hasta que el sobrenadante no muestra el color rojo-marrón típico de glomalina" (Wright y Upadhyaya, 1998) y "...hasta que el sobrenadante es casi incoloro" (Wright y col., 2006). Otros autores (por ejemplo, Wright y col., 1999; Rillig y col., 2001) aplicaron el protocolo de extracción de la fracción total de glomalina de una muestra de suelo después de una primera extracción de la fracción fácilmente extraíble de glomalina. A pesar de esos esfuerzos, se demostró que el protocolo que se utiliza para extraer glomalina total aparentemente no elimina toda la glomalina del suelo, por lo que esta fracción quizás debería denominarse como glomalina total extraíble (TE-GRSP) (Lovelock y col., 2004a; Wright col., 2006). Por otro lado, Wright y col. (2006) compararon diferentes buffers de extracción y encontraron que el pirofosfato de sodio extrae más proteínas que el citrato de sodio, en una variedad de suelos provenientes de ambientes naturales de dos estados centrales, Nebraska (pastura, textura franco limosa) y Colorado (pradera, textura limosa arenosa), y dos estados de la costa este, Maryland (bosque, textura limosa) y Georgia (pastura, textura franco arenosa), de los estados unidos. Janos y col. (2008) examinaron diferentes aspectos de los protocolos de extracción y cuantificación de la glomalina y encontraron que la eficacia de la extracción puede estar relacionada con la carga negativa y la capacidad de regulación del pH del buffer de extracción, con el pH del suelo en estudio, su contenido de arcilla, y con el pH óptimo para la desagregación de los complejos minerales de glicoproteína-arcilla (Halvorson y González, 2006), lo que indica que "las variaciones en el procedimiento de extracción se deben examinar en cada suelo individual con el fin de establecer protocolos para la máxima extracción de glomalina" (Wright y Upadhyaya, 1996). Todos estos trabajos han demostrado que la evaluación precisa de la cantidad absoluta de glomalina en el suelo es problemática y requiere una mejora de los protocolos de extracción y una mayor comprensión de las limitaciones de los métodos de cuantificación. A pesar de estas observaciones, y tomando en cuenta la aceptación que ha tenido la glomalina como

indicador de calidad de suelo (ver más adelante), el protocolo original es ampliamente usado, y la fracción de glomalina así determinada se usa comúnmente para caracterizar suelos (Rillig y col., 2001; Bird y col., 2002; Rillig y col., 2002; Steinberg y Rillig, 2003; Rillig y col., 2003; Harner y col., 2004; Lovelock y col., 2004a; Driver y col., 2005).

1.5 La glomalina como indicador de calidad de suelos

El contenido de glomalina en el suelo está determinado por la relación entre su producción y su descomposición, y estos dos flujos pueden ser afectados independientemente por las condiciones del ambiente (Rillig, 2004b; Treseder y Turner, 2007). La glomalina es producida por los HMA, por lo tanto los factores que controlan la abundancia y composición de la comunidad de HMA influirían en el contenido de glomalina en el suelo. Características de las plantas hospederas como, el largo de las raíces, la disponibilidad y el balance de nutrientes determinan el acceso de los HMA a los productos de la fotosíntesis. Los HMA son más abundantes en presencia de raíces finas más largas y con mayor disponibilidad de las plantas hospederas. A su vez, la disponibilidad de nutrientes inorgánicos en el ambiente (como dióxido de carbono, amonio, nitrato, fosfato y agua) presenta un efecto en el desarrollo de los HMA, dado que cuando el crecimiento de las plantas se ve limitado por los nutrientes éstas asignan más carbono a sus simbiontes quienes le proveen de estos nutrientes a las plantas por traslocación. Por ejemplo, la fertilización con N y P a menudo reduce el crecimiento de HMA debido a que la limitación de nutrientes disminuye y sería más costoso para la planta desarrollar la micorriza que tomar directamente el nutriente del suelo. Por el contrario, el CO₂ atmosférico alto aumenta la abundancia de HMA, ya sea porque las plantas necesitan más N o P, o porque el C está más fácilmente disponible, o por ambos caminos. A su vez, la abundancia de HMA también tiende a ser mayor cuando la disponibilidad de agua es baja, posiblemente debido a una necesidad de las plantas a favorecer el crecimiento de los simbiontes para mejorar el acceso al agua. En este sentido, la composición de la comunidad de plantas afectaría el contenido de glomalina (Rillig y col., 2002).

La glomalina es un componente cuantitativamente muy importante de la MO del suelo, ya que representa aproximadamente el 13% del carbono orgánico total del suelo (COT), es decir aproximadamente nueve veces más que los ácidos húmicos (Nichols y Wright, 2006); y también que es relativamente rica en nitrógeno conteniendo entre 0,9 y 7% del nitrógeno total del suelo (Lovelock y col., 2004a; Nichols y Wright, 2006; Rillig y col., 2001). Por ello se piensa que la glomalina probablemente sirva como fuente de C y N para los microorganismos. En una visión sistémica del suelo, la glomalina podría ser vista como un destino final de la fotosíntesis del sistema planta-suelo incorporando C orgánico a la biósfera a partir de la transformación del CO₂ del aire a través de la planta y la traslocación al HMA en simbiosis con la misma. La descomposición de glomalina puede ser afectada por las características del suelo, tales como la disponibilidad de nutrientes (que influyen en la actividad microbiana) y la textura del suelo (por ejemplo las arcilla pueden proporcionar protección física) (Nichols y Wright, 2005); y por lo tanto, alteraciones en estos factores ambientales producen potenciales consecuencias en las reservas de carbono y nitrógeno en el suelo. La glomalina no es un exudado de los HMA, sino que queda contenida dentro de las paredes de hifas y cuando las hifas mueren y se descomponen dejan un residuo de glomalina en el suelo (Driver y col., 2005; Treseder y Turner, 2007). Por lo tanto, el depósito de glomalina en el suelo está determinado por el contenido de hifas, el contenido de glomalina en las hifas, el tiempo de recambio de las hifas y el tiempo de recambio de la glomalina. Se encontró que la glomalina reside durante al menos 7 años y hasta 42 años en suelos naturales (Rillig y col., 2001); y estas tasas de recambio relativamente lentas permiten que este compuesto se acumule a altas concentraciones en el suelo (Rillig, 2004b), encontrándose entre 2 a 15 mg/g de suelo y hasta 60 mg/g de suelo en una amplia variedad de suelos de diferentes ambientales (ácidos, calcáreos, pastizales y suelos cultivados) (Wright y Upadhyaya, 1998; Wright y col., 1999).

La glomalina puede ser considerada un indicador de calidad del suelo ya que refleja varios aspectos del funcionamiento de los ecosistemas y presenta buena correlación con funciones benéficas en el suelo. Por un lado, brinda una mirada bioquímica indirecta sobre

los HMA como grupo funcional en el suelo. Éstos son considerados “mutualistas claves” en los ecosistemas terrestres, dado a que influyen en la fisiología de las plantas individuales (afectan la nutrición de la planta y mejoran la relación de la planta con el agua), presentan interacciones ecológicas claves en el suelo (protegen contra patógenos de la raíz e interactúan con microorganismos benéficos que contribuyen a la nutrición de la planta) y actúan como ingenieros del hábitat influyendo en la agregación del suelo (Rillig, 2004a). La agregación del suelo es un proceso complejo que comienza con la consolidación de partículas del suelo dentro de microagregados (< 0.25 mm) y progresa a la formación de macroagregados en el cual participan numerosos organismos y agentes aglutinantes (Wright y Upadhyaya, 1998). La importancia de los HMA en la agregación del suelo se debe a que son muy abundantes, tienen acceso intraradical directo al carbono de la planta y por lo tanto no usan completamente el carbono de la MO, y tanto por la forma de crecimiento de las hifas como por la producción de glomalina conduce a la estabilización de estructuras (Rillig, 2004a).

Quizás uno de los resultados más relevantes para instalar el concepto de glomalina como un indicador de calidad de suelo es aquel que estableció una fuerte correlación (curva respuesta de tipo “saturación”) entre la glomalina y la estabilidad de los agregados del suelo, en varios tipos de suelo (Wright y Upadhyaya, 1998).

Es posible que la glomalina contribuya también a la hidrofobicidad de las partículas del suelo, favoreciendo la incorporación de microorganismos que aportan a su vez polisacáridos y otros sub-productos a la formación de agregados. En consecuencia, la glomalina está relacionada con la estabilidad de los agregados del suelo, que es un parámetro que sirve para estimar la habilidad de un suelo de mantener buenos índices de infiltración de agua y adecuada aireación favoreciendo el crecimiento de las plantas. A su vez, la glomalina se reportó como un importante componente de la MO, reserva de C y N en el suelo, que presenta gran influencia en la capacidad de almacenamiento de nutrientes, la formación de agregados y la capacidad de retención de agua del suelo (Nichols y Wright, 2006).

Por otro lado, la glomalina presenta un característico color marrón rojizo oscuro probablemente relacionado con el hierro como un componente estructural, que puede desempeñar un papel en su acumulación y/o función. Se encontró que la glomalina contiene altas concentraciones de hierro entre 0,8 a 8,8% (Wright y Upadhyaya, 1998) y por lo tanto tiene la capacidad de formar complejos con metales. Por esta razón, influye en la fertilidad del suelo (Wright y Upadhyaya, 1998; Nichols y Wright, 2005), así como también se reportó su importancia en la remediación de suelos contaminados por su capacidad de formar complejos con elemento potencialmente tóxicos (González-Chávez y col., 2004; Cornejo y col., 2008).

Otro aspecto interesante a considerar es que la extracción y cuantificación de glomalina es un proceso muy simple y de bajo costo.

En general, se han tomado los valores de glomalina como indicadores de la degradación de un suelo dado que los valores son máximos en suelos de bosques o pasturas nativas y decaen en función del manejo antrópico del suelo, en particular por labranza convencional del mismo (Rillig y col., 2003).

Alternativamente, el escenario de la siembra directa con rotación de cultivos permite hipotetizar que la recuperación y estabilidad de las comunidades micorrícicas en los suelos agrícolas, conllevaría a un aumento en los niveles de micorrizas de esos suelos, y por ende aumentarían los niveles de glomalina, convirtiéndose así la glomalina en un potencial indicador de ganancia de calidad y no de degradación de suelos.

1.6 Objetivos e hipótesis del trabajo

Este trabajo se enmarcó en el proyecto BIOSPAS (Biología del Suelo y Producción Agropecuaria Sustentable, www.biospas.org), realizado entre los años 2008 y 2012, en el que se combinó la acción pública con la privada con la participación concurrente de 12 grupos de investigación provenientes de 11 instituciones académicas, y tres entidades del ámbito productivo privado: AAPRESID, Rizobacter Argentina S.A. y La Lucía S. A. del Grupo Romagnoli; quienes cofinanciaron el proyecto junto con el FONCyT del Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva y las Instituciones Beneficiarias del Proyecto,

varias universidades nacionales como UNQ, UNLP, UNC, UNS, UNRC, UNNE, UBA, el CONICET y el INTA. El objetivo de dicho proyecto fue estudiar en forma multidisciplinaria la dinámica de los procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren en el suelo, comparando tres situaciones de manejo agrícola bajo siembra directa (Wall, 2011). Como parte del proyecto BIOSPAS, nuestros objetivos e hipótesis de trabajo fueron los siguientes:

1- Extraer y cuantificar las fracciones, fácilmente extraíble y total, de Proteínas del Suelo Relacionadas con la glomalina (GRSP) desde las muestras de suelo del proyecto BIOSPAS; con el fin de evaluar la influencia de las prácticas agrícolas en los niveles de glomalina, considerando los lotes muestreados en diferentes regiones geográficas y las diferentes épocas del año (estaciones). Dado a que la glomalina es considerada un componente bioquímico estructurante del suelo cuyos niveles estarían asociados a la calidad del suelo, esperamos encontrar que las prácticas agrícolas afecten los niveles de glomalina de manera tal que los sistemas más sustentables presenten mayores valores (Capítulo 3).

2- La determinación de la cantidad absoluta de GRSP en el suelo resulta problemática y por eso requiere un mayor entendimiento de los métodos de extracción y cuantificación de glomalina desde muestras de suelo. En esta búsqueda hemos evaluado la precisión y el grado de reproducibilidad y repetibilidad en la cuantificación de GRSP usando métodos colorimétricos diferentes para determinar proteínas en extractos de suelo (Capítulo 2).

3- Debido a que existen diferentes criterios en relación al procesamiento y almacenamiento de las muestras de suelo, consideramos importante analizar como diferentes formas de almacenamiento y preservación de las muestras de suelo influyen en los valores medidos de GRSP. El criterio de nuestro laboratorio fue trabajar con muestras

de suelo tamizadas (< 2 mm) y conservadas a 4°C. También se analizaron muestras secadas al aire y conservadas a -20 °C (Apéndice A).

4- Con el fin de realizar un análisis cuidadoso de la sensibilidad a las variaciones de manejo de la glomalina como indicador de calidad de suelo, se realizaron mediciones de la fracción de GRSP en un ensayo controlado comparando situaciones de monocultivo vs. rotación de cultivos (Apéndice B).

5- Integrar estos estudios a los de otras líneas de trabajo del proyecto BIOSPAS, buscando un mayor entendimiento de las relaciones que se establecen entre las fracciones glomalina y la comunidad de micorrizas, el perfil de ácidos grasos, el fósforo extraíble, la actividad de fosfatasa, el carbono orgánico, el nitrógeno total, el contenido de carbohidratos y la estabilidad estructural de los agregados (Capítulo 4).

Capítulo 2

Revisión del método colorimétrico utilizado para cuantificar proteínas del suelo relacionadas con la glomalina

Reyna D.L., L.G. Wall. 2014. Revision of two colorimetric methods to quantify glomalin-related compounds in soils subjected to different managements, *Biology and Fertility of Soils* 50 (2): 395-400.

2.1 Introducción

La evaluación precisa de la cantidad absoluta de glomalina en el suelo es problemática y requiere un mayor entendimiento de los métodos de extracción y cuantificación de glomalina. La precisión del método para evaluar la cantidad de glomalina es crítico en nuestro estudio, porque nuestro propósito es comparar suelos agrícolas con bastante similitud en su historia de uso. Los suelos estudiados, provenientes del proyecto BIOSPAS, si bien representan prácticas agrícolas diferentes tienen en común el sistema de labranza de siembra directa.

Como vimos anteriormente, comúnmente dos métodos se han usado para cuantificar la cantidad de glomalina en los extractos de suelo: el ensayo de Bradford y el ensayo de ELISA con el AcM 32B11 (Wright y col., 1996). Sin embargo dado que el AcM 32B11 no es un producto comercial, la cantidad de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP) se mide generalmente con el ensayo de Bradford. Nuestro objetivo inicial fue evaluar la precisión y el grado de reproducibilidad y repetibilidad en la cuantificación de GRSP usando dos métodos colorimétricos diferentes para determinar proteínas en extractos de suelo: el ensayo de Bradford y el ensayo del ácido bicinónico (BCA). Estos dos métodos cuantifican proteínas totales, pero se diferencian en las reacciones químicas en las que basan la determinación. El ensayo de Bradford se basa en una reacción en condiciones ácidas, en la que la forma aniónica del colorante se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas e iónicas, principalmente, a los residuos de arginina y en menor medida con residuos de histidina, lisina, tirosina y fenilalanina. El ensayo del ácido bicinónico se basa en una reacción bajo condiciones alcalinas, en la que el Cu^{++} forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas y se convierte en Cu^+ . El Cu^+ , unido a residuos de tirosina, triptófano y cisteína, entonces reacciona con el reactivo de BCA (Stoscheck, 1990). En ambos ensayos se usa como estándar la albúmina sérica bovina, una proteína de peso molecular similar a la glomalina (Gadkar y Rillig, 2006; Rosier y col., 2006).

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Suelos

Los suelos usados se obtuvieron del proyecto BIOSPAS. Se usaron cuatro muestras puntuales de suelo del tratamiento de referencia, Ambiente Natural (AN), provenientes de los cuatro sitios diferentes en estudio, Bengolea y Monte Buey en la provincia de Córdoba, Pergamino en la provincia de Buenos Aires y Viale en la provincia de Entre Ríos. (ver la descripción de los suelos en la sección 3.2.1 Suelos en 3.2 Materiales y Métodos en el Capítulo 3). Además, para corroborar algunas observaciones metodológicas se utilizaron dos muestras adicionales de otros suelos. Una muestra de suelo de Balcarce en la provincia de Buenos Aires (47 ° 45 'Sur, 58 ° 18' Oeste), un suelo agrícola degradado; esta muestra fue cedida por el Dr. Alejandro Ferrari investigador de LBMIBS, UNQ, Argentina. La otra muestra de suelo fue tomada en el Parque Pereyra Iraola en la provincia de Buenos Aires (34 ° 50 '22 "Sur, 58 ° 9' 47" Oeste) declarado Reserva de la Biosfera por la UNESCO en 2008, un terreno natural donde no se practica ningún cultivo desde hace más de 100 años.

2.2.2 Extracción de glomalina

Para extraer la glomalina se usó el protocolo reportado por Wright y Upadhyaya (1996), con especial atención a las sugerencias realizadas por Janos y col. (2008) "(1) usar volúmenes iguales de buffer de extracción para todas las muestras, (2) usar el mismo tiempo de autoclavado y sacar las muestras del autoclave rápidamente al final del ciclo, y (3) centrifugar inmediatamente para separar el sobrenadante del suelo después del proceso de autoclavado". Se suspendió 1 g de suelo en 8 ml de citrato de sodio 20 mM, pH=7.00 (ácido cítrico, sal trisódica dihidratada), en tubos de vidrio de 50 ml. Los tubos se autoclavaron a 121 °C durante 30 min. (Autoclave de mesa, Modelo EA-21, Stoord, Buenos Aires, Argentina), y luego se centrifugaron a 5000 *g* durante 15 minutos (Centrifuga multi (RF) serie multipurpose, Thermo Electron Corporation, Milford, EE.UU.).

El sobrenadante representa la fracción fácilmente extraíble de las proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP-FE) (Wright y Upadhyaya 1996).

2.2.3 Cuantificación de glomalina

Para cuantificar la glomalina en la fracción extraída, como proteína total, se usaron y compararon dos métodos colorimétricos diferentes. El ensayo de Bradford, midiendo la absorbancia a 595 nm y usando un reactivo colorante de proteínas comercial (Bio-Rad 500-0006, Mellville, EE.UU.). El ensayo se realizó en microplacas de 96 celdas de fondo plano y usando albúmina sérica bovina (BSA) (1.28 a 12.8 μg de proteína por pozo) como estándar. La BSA se usa generalmente como estándar en los ensayos de glomalina (Gadkar y Rillig, 2006; Rosier y col., 2006.). Cada celda contenía 50 μl de reactivo colorante de proteínas y 160 μl de las soluciones estándares o de las diferentes diluciones del extracto de suelo. El ensayo del ácido bicinconínico (BCA), midiendo la absorbancia a 562 nm y usando un reactivo de trabajo estándar que se produce mezclando dos reactivos; 100 volúmenes del reactivo A con 2 volúmenes del reactivo B. El reactivo A se produce disolviendo 1 g bicinconinato de sodio, 2 g de carbonato de sodio, 0.16 g de tartrato de sodio, 0.4 g de hidróxido de sodio y 0.95 g de bicarbonato de sodio en 100 ml de agua destilada y ajustando el pH a 11.25 con hidróxido de sodio 10 M. El reactivo B se produce disolviendo 0.4 g de sulfato cúprico pentahidrato en 10 ml de agua destilada (Stoscheck, 1990). El ensayo se realizó en microplacas de 96 celdas de fondo plano y usando BSA (0.625 a 25 μg de proteína por pozo) como estándar. Cada celda contenía 200 μl de reactivo de trabajo y 10 μl de las soluciones estándares o de las diferentes diluciones del extracto de suelo. Estas placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas antes de la medición. Se realizaron diferentes diluciones del extracto de suelo para lograr una determinación más precisa, de acuerdo con una curva de calibración estándar: muestra sin diluir, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500. Las diluciones se llevaron a cabo en dos buffers diferentes: en el buffer fosfato salino, pH = 7.4 (PBS) y en el buffer de extracción, citrato de sodio 20 mM, pH = 7.0 para comparar el efecto de diferentes diluyentes. Tanto las soluciones estándares como cada dilución de los extractos se midieron por triplicado

en diferentes celdas de una misma placa. Todos los valores reportados se normalizaron a 1 g de suelo seco. La absorbancia de las muestras se leyó con un lector de microplacas multifuncional (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Offenburg, Alemania), a 27 °C y sin agitación. Para comparar ambos métodos de determinación de proteínas, Bradford y BCA, se utilizó la misma muestra de suelo.

2.2.4 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2012). Para estudiar los efectos de las diferentes diluciones practicadas a los extractos, los datos se analizaron estableciendo modelos lineales generales (Zuur y col., 2009). Las distribuciones normales fueron controladas por gráficos normales de los residuos estandarizados y mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks sobre los residuos. La homogeneidad de varianzas se verificó por gráficos de residuos vs. valores predichos y mediante la prueba de Levene sobre los valores absolutos de los residuos. Algunos conjuntos de datos mostraron heterocedasticidad de varianza, que fue modelada por la aplicación de la función de variación de la identidad (varIdent en InfoStat) usando como criterio valores más bajos del criterio de Akaike (AIC) y del criterio de información Bayesiano (BIC). La independencia de los errores se verificó mediante gráficos de los residuos en función de la variable que se presumió podía generar dependencias sobre las observaciones. Para evaluar las diferencias significativas entre los valores, se usaron las pruebas de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) y pruebas de contraste. Las diferencias se consideraron significativas con p-valor < 0.05.

2.3 Resultados

2.3.1 Ensayo de Bradford y diluciones del extracto de glomalina

Con el fin de explorar la precisión del ensayo de Bradford para cuantificar las proteínas del suelo relacionadas la glomalina, se ensayaron diez diluciones diferentes (sin diluir, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/50, 1/100, 1/200 y 1/500) con la fracción de GRSP-FE obtenida a partir de una muestra de suelo que corresponde al Ambiente Natural de Monte Buey, muestreada en Septiembre/2011 (principios de primavera, campos después de la cosecha); la concentración de GRSP-FE en cada dilución se cuantificó como se describe en la sección 2.2.3 Cuantificación de glomalina en 2.2 Materiales y Métodos (Figura 2.1). Sorpresiva e inesperadamente, se encontraron serias inconsistencias en los resultados en función de la dilución practicada. Los valores de concentración de GRSP-FE reactivas con Bradford fueron más altos cuando mayor era la dilución del extracto. El incremento de los valores calculados para las GRSP-FE reactivas con Bradford varió entre 10-40% en diluciones sucesivas para muestras con valores de absorbancia dentro del intervalo lineal del estándar de BSA, y entre 70-270% cuando el valor de la absorbancia estaba fuera del rango lineal del estándar de BSA. Dos disolventes diferentes se usaron para preparar las diluciones: citrato de sodio 20 mM y buffer fosfato salino. Los valores de concentración de glomalina calculados a partir de diluciones diferentes, difirieron significativamente ($p < 0.05$), independientemente del buffer utilizado como disolvente. Además, se encontró que los valores absolutos de GRSP-FE para cada dilución fueron similares independientemente del disolvente, por ejemplo: la concentración estimada a partir de la dilución 1/8 era 1.00 ± 0.23 mg/g en citrato de sodio 20 mM (buffer que mantiene las condiciones de extracción) y 1.03 ± 0.16 mg/g en PBS (buffer comúnmente usado en el ensayo de cuantificación); la concentración estimada a partir del extracto más diluido ($d=1/500$) fue 7.99 ± 0.88 mg/g y 7.38 ± 0.29 mg/g, respectivamente.

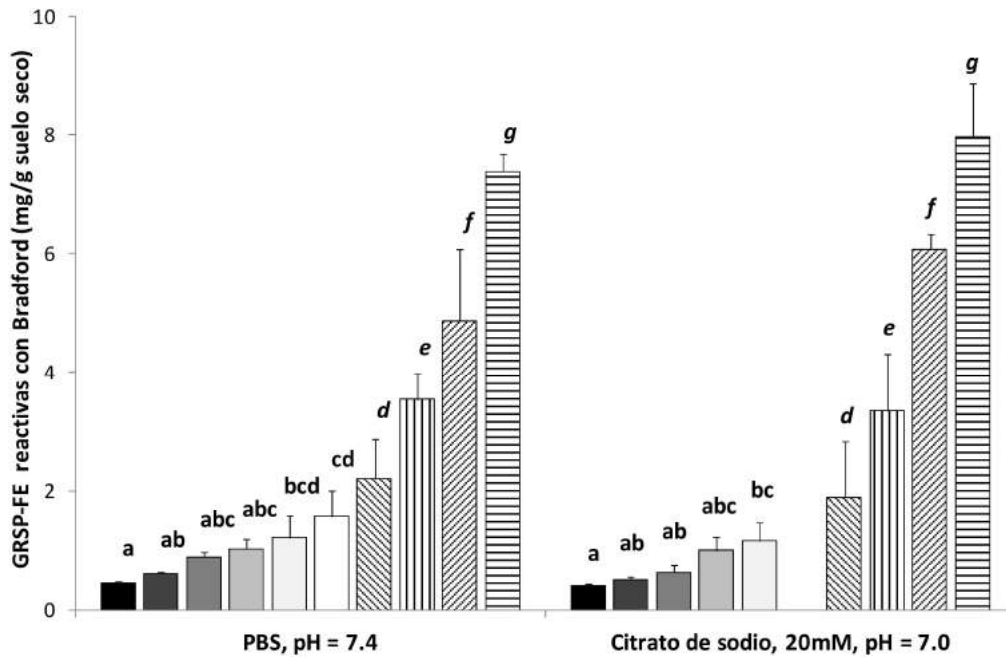


Figura 2.1: Comparación de la concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina fácilmente extraíbles (GRSP-FE), expresada como mg de proteína por g de suelo seco, en diferentes diluciones del extracto de suelo con dos disolventes diferentes. Las diluciones realizadas fueron: ■ sin diluir, ■ d=1/2, ■ d=1/4, ■ d=1/8, □ d=1/16, □ d=1/32, ▨ d=1/50, ▩ d=1/100, ▪ d=1/200 y ▫ d=1/500. La cantidad de proteína se determinó por el método colorimétrico de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Se muestran los valores medios de tres determinaciones repetidas (n=3) con sus desviaciones estándar indicadas por líneas. Las letras sobre las columnas representan las diferencias significativas ($p < 0.05$) en GRSP-FE entre las diferentes diluciones del extracto de suelo en cada disolvente utilizado, determinado por comparaciones de a pares de LSD de Fisher y pruebas de contrastes. En cursiva se indica los valores que se encontraron fuera del intervalo lineal de BSA en cada ensayo.

Debido a la inconsistencia de los valores de GRSP-FE en función de la dilución, tratamos de encontrar nuevas condiciones óptimas para el ensayo de Bradford para conseguir equiparar los valores determinados. Nuestras primeras hipótesis fueron que el aumento aparente en la reactividad de Bradford podría ser una consecuencia de una desagregación de los complejos de proteína de la glomalina como resultados de la dilución de la solución que contiene la fracción de glomalina. Con el fin de tratar de evitar la potencial agregación diferencial de la glomalina, se probaron diferentes enfoques. Para romper la potencial agregación de la glomalina en la solución, se usaron dos detergentes, el dodecil sulfato de sodio (SDS) y el Tritón X en concentraciones de 0.2 g/100 ml y 0.01

g/100 ml, respectivamente. Por otra parte, teniendo en cuenta que el hierro es un componente estructural muy importante en la glomalina que podría relacionarse con la potencial agregación, se usaron agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0.1 M, 0.05 M y 0.01 M) y el dipiridil (0.025 M) Estas estrategias no permiten resolver la inconsistencia observada en los valores determinados de EE-GRSP reactivas con Bradford, es decir el problema persistió.

2.3.2 Ensayo del ácido bicinónico y diluciones del extracto de glomalina

Teniendo en cuenta los resultados expuestos anteriormente decidimos comparar el método de Bradford con otro método colorimétrico como el del ácido bicinónico (BCA). La Figura 2.2 muestra los valores de las concentraciones de la fracción de GRSP-FE obtenidos a partir de cuatro muestras de suelo diferentes correspondientes al Ambiente Natural, muestreadas en Septiembre/2010 (principios de primavera, campos después de la cosecha) en los cuatro sitios geográficos diferentes en estudio. En este caso, seis diluciones diferentes se llevaron a cabo usando el buffer de extracción como diluyente: sin diluir, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. La fracción de GRSP-FE se cuantificó con ambos métodos como proteína total, usando BSA como estándar. Los valores finales de GRSP-FE se expresaron en mg de proteína equivalente a la BSA por g de suelo seco. El aumento en los valores de las concentraciones determinadas por el ensayo de Bradford como función de la dilución del extracto fue similar a la observada en el experimento anterior (comparar Figura 2.2.A con la Figura 2.1). Este resultado fue independiente de los diferentes tipos de suelo correspondientes a diferentes ubicaciones geográficas (Figura 2.2.A). Las concentraciones de las GRSP-FE reactivas con Bradford se incrementaron entre 10-50% entre diluciones sucesivas (sin diluir, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32). Por ejemplo, los valores para la muestra de suelo de Monte Buey fueron: 0.32 ± 0.02 mg/g (a), 0.38 ± 0.02 mg/g (b), 0.60 ± 0.01 mg/g (c), 0.9 ± 0.3 mg/g (d), 1.40 ± 0.05 mg/g (e) y 1.84 ± 0.18 mg/g (f) (cada letra se refiere a cada columna en la Fig. 2.2.A). La diferencia entre los valores en las diferentes diluciones fue estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Alternativamente, cuando la fracción de GRSP-FE se determinó usando el ensayo de BCA los valores

estimados a partir de las diferentes diluciones no variaron significativamente ($p>0.05$) (Figura 2.2.B). Esto fue particularmente cierto para los valores dentro del límite de detección lineal del método.

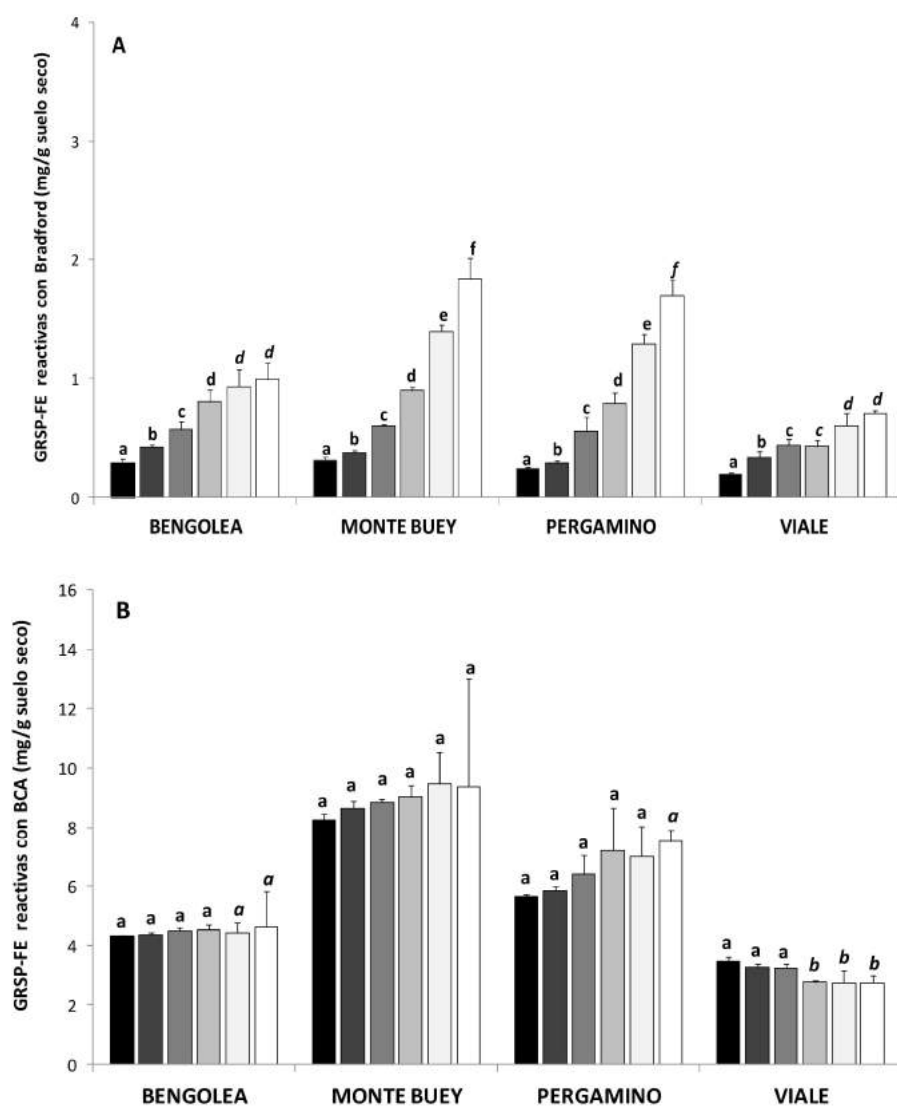


Figura 2.2: Concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina fácilmente extraíbles (GRSP-FE), expresada como mg de proteína por g de suelo seco, de diferentes diluciones del extracto de suelo con citrato de sodio 20 mM, pH 7.00. Las diluciones fueron: ■ sin diluir, ■ d=1/2, ■ d=1/4, ■ d=1/8, □ d=1/16 y □ d=1/32. La cantidad de proteína se determinó por (A) ensayo de Bradford y (B) ensayo de ácido bicinconínico (BCA), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Se muestran los valores medios de tres repeticiones con sus desviaciones estándares indicadas por líneas. Las letras sobre las columnas representan las diferencias significativas ($p<0.05$) en GRSP-FE entre las diferentes diluciones del extracto de suelo, determinado por comparaciones de a pares de LSD de Fisher y pruebas de contrastes. En cursiva se indican los valores que se encontraron fuera del intervalo lineal de BSA en cada ensayo.

En un experimento independiente analizamos otros tipos de suelos para corroborar las observaciones anteriores (Figura 2.3). Una vez más la concentración determinada por el ensayo de Bradford se incrementó significativamente ($p < 0.05$) entre las diluciones sucesivas (Figura 2.3.A), mientras que la concentración determinada por ensayo de BCA no varió significativamente ($p > 0.05$) en función de la dilución (Figura 2.3.B).

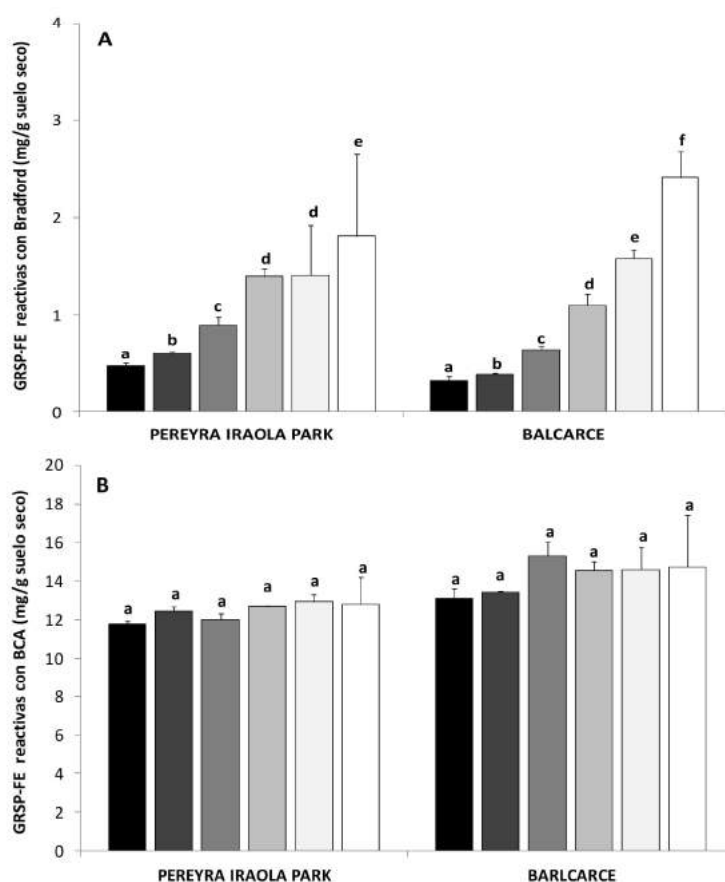


Figura 2.3: Comparación de la concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina fácilmente extraíbles (GRSP-FE), expresada como mg de proteína por g de suelo seco, de diferentes diluciones del extracto de suelo con citrato de sodio 20 mM, pH 7.00 a partir de dos muestras de suelo como control, del Parque Pereyra Iraola y de Balcarce. Las diluciones fueron: ■ sin diluir, ■ d=1/2, ■ d=1/4, ■ d=1/8, □ d=1/16 y □ d=1/32. La cantidad de proteína se determinó por (A) ensayo de Bradford y (B) ensayo de ácido bicinonínico (BCA), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Se muestran los valores medios de tres repeticiones con sus desviaciones estándares indicadas por líneas. Las letras sobre las columnas representan las diferencias significativas ($p < 0.05$) en GRSP-FE entre las diferentes diluciones del extracto de suelo, determinado por comparaciones de a pares de LSD de Fisher y pruebas de contrastes. En cursiva se indican los valores que se encontraron fuera del intervalo lineal de BSA en cada ensayo.

Por otro lado, con el fin de explorar la estabilidad en el tiempo del ensayo de Bradford y del ensayo de BCA, las intensidades de los picos de absorción a 595 nm y a 562 nm, respectivamente, se registraron en un intervalo de tiempo de 0 a 45 minutos cada 90 segundos desde el inicio de la reacción colorimétrica. La Figura 2.4 muestra la intensidad de los picos de absorción en función del tiempo para diferentes diluciones de la fracción de glomalina extraída y para diferentes diluciones de BSA usada como estándar en los dos ensayos.

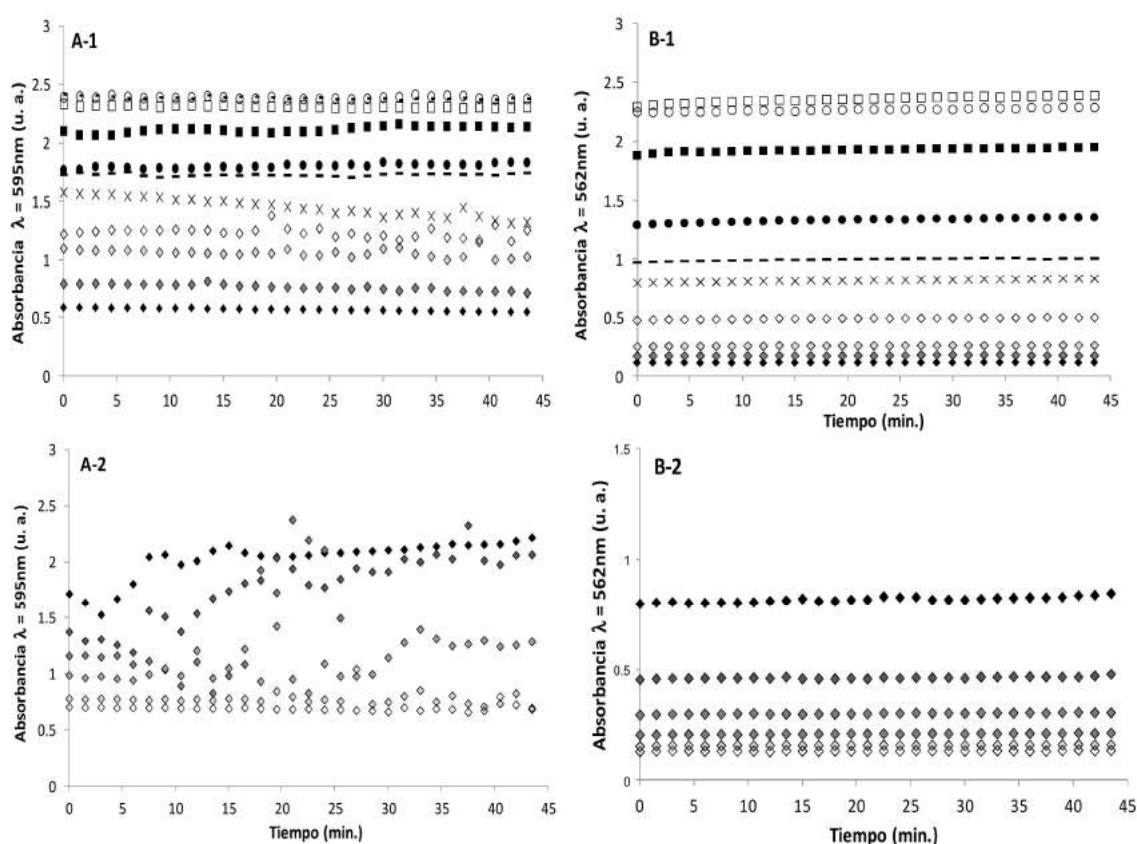


Figura 2.4: Dependencia temporal de la intensidad pico de absorción a (A) 595 nm para el ensayo de Bradford y (B) 562 nm para el ensayo del ácido bicinconónico, para (1) diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) usada como estándar en cada ensayo y (2) diferentes diluciones del extracto en el buffer de extracción (citrateo 20 mM, pH 7,0). Las concentraciones estándares de BSA utilizadas fueron: (A) \blacklozenge citrato de sodio 20 mM, \blacklozenge 8 $\mu\text{g/ml}$, \blacklozenge 16 $\mu\text{g/ml}$, \blacklozenge 24 $\mu\text{g/ml}$, \times 32 $\mu\text{g/ml}$, $-$ 40 $\mu\text{g/ml}$, \bullet 48 $\mu\text{g/ml}$, \blacksquare 56 $\mu\text{g/ml}$, \square 64 $\mu\text{g/ml}$, \circ 72 $\mu\text{g/ml}$ y $-$ 80 $\mu\text{g/ml}$ para el ensayo de Bradford y (B) \blacklozenge citrato de sodio 20 mM, \blacklozenge 50 $\mu\text{g/ml}$, \blacklozenge 100 $\mu\text{g/ml}$, \blacklozenge 250 $\mu\text{g/ml}$, \times 500 $\mu\text{g/ml}$, $-$ 750 $\mu\text{g/ml}$, \bullet 1000 $\mu\text{g/ml}$, \blacksquare 1500 $\mu\text{g/ml}$, \square 2000 $\mu\text{g/ml}$, \circ 2500 $\mu\text{g/ml}$ para el ensayo del ácido bicinconónico. Las diluciones de extracto realizadas fueron: \blacklozenge sin diluir, \blacklozenge d=1/2, \blacklozenge d=1/4, \blacklozenge d=1/8, \blacklozenge d=1/16 y \blacklozenge d=1/32.

Se encontró que el ensayo de Bradford era muy inestable en el tiempo para la muestra de suelo (Figura 2.4.A-2), mientras que el ensayo de BCA tenía una fuerte estabilidad en el tiempo (Figura 2.4.B-2). Además, la estabilidad en el tiempo de BSA era igual tanto para el ensayo de Bradford como para el ensayo de BCA (Figura 2.4.A-1 y 2.4.B-1).

2.4 Discusión

Nuestros resultados sugieren que el ensayo de Bradford puede no ser del todo apropiado para cuantificar proteínas del suelo relacionadas con la glomalina. En general, la cuantificación de GRSP en las fracciones extraídas a partir de muestras de suelo como proteína total se realiza utilizando el protocolo del ensayo de Bradford reportado por Wright y Upadhyaya (1996); en el que la fracción extraída se diluye 1/100 en buffer fosfato salino, pH = 7.4, y la absorbancia de la muestra se lee a 590 nm usando BSA como estándar. En nuestros estudios se encuentra una notable diferencia entre las concentraciones de GRSP-FE determinadas usando el ensayo de Bradford en diferentes diluciones de la misma fracción extraída (Fig. 2.1, Fig. 2.2.A y Fig. 2.3.A), y también una inestabilidad del ensayo de Bradford en el tiempo (Fig. 2.4.A). Alternativamente, con el método de BCA no se observaron diferencias significativas entre los valores determinados en las diferentes diluciones de la misma fracción extraída (Fig. 2.2.B y Fig. 2.3.B). La igualación de las concentraciones determinadas de GRSP-FE reactivas con BCA junto con la fuerte estabilidad en el tiempo del ensayo de BCA (Fig. 2.4.B) sugiere que el ensayo de BCA es un método bueno y preciso para cuantificar GRSP-FE.

Las inconsistencias del ensayo de Bradford se observaron en diferentes suelos con diferentes características físico-químicas, pero no se encontraron en soluciones estándares de BSA. Esto parece indicar que el ensayo de Bradford si bien es preciso para la determinación de proteínas similares a la BSA, no es preciso para cuantificar GRSP. Se sugirió considerar la naturaleza metalo-glico-proteica de la glomalina, la cual está relacionada con la posible agregación de la proteína en el suelo, para explicar este problema; sin embargo vimos que usando detergentes y agentes quelantes para intentar

romper la agregación de la glomalina en el extracto no se observaron cambios en este comportamiento, lo indica que no debería ser un problema relacionado con la agregación de la proteína. Si bien, otros estudios deberían llevarse a cabo a fin de entender si el resultado inesperado con el ensayo de Bradford se debe a propiedades típicas de la glomalina; debido a los resultados observados con el ensayo de BCA parece más adecuado pensar en las limitaciones propias del ensayo de Bradford para la cuantificación de GRSP y como éste se ve afectado por las sustancias co-extraídas con el protocolo utilizado para la extracción de glomalina (Nichols y Wright, 2005, 2006; Rosier y col., 2006; Whiffen y col., 2007; Schindler col., 2007; Roberts y Jones, 2008; Gillespie y col., 2011). Finalmente, proponemos a partir de nuestros resultados que el uso de ensayo de BCA puede ser más apropiado que el ensayo de Bradford para cuantificar proteínas del suelo relacionadas con la glomalina, ya que mostró una mayor precisión en la determinación de los valores de concentración y una mayor estabilidad en el tiempo, lo que parece indicar que es un método más robusto.

Capítulo 3

**Extracción y cuantificación de proteínas
del suelo relacionadas con la glomalina
en diferentes manejos agrícolas
en siembra directa del suelo**

3.1 Introducción

La evaluación de la calidad del suelo en los sistemas agrícolas es de gran importancia debido a los problemas ambientales relacionados con la degradación del suelo y a la búsqueda constante de desarrollar una producción agrícola cada vez más sustentable. Es necesario evaluar la calidad del suelo para detectar cambios en sus propiedades relacionados a las diferentes prácticas de manejo agrícolas y para poder tomar decisiones respecto de esas mismas prácticas y los manejos que se hacen sobre el suelo. Si bien, actualmente se busca consenso sobre criterios de calidad de suelo, es decir que características debe tener un suelo para considerarse de máxima calidad, es importante tener en cuenta que la calidad del suelo no se puede medir directamente sino que se llega a ese concepto midiendo parámetros o propiedades que sirven como indicadores de calidad de suelo. Son los cambios en estos indicadores los que determinan si la calidad del suelo está mejorando, es estable o disminuye en función a cambios en el manejo (Brejda y col., 2000). Los niveles de glomalina como indicadores de calidad de suelo, han sido y son muy utilizados debido primeramente a su fácil determinación en el laboratorio que permite la obtención de rápidos resultados. También, por su íntima relación con la comunidad de micorrizas en el suelo y su uso como indicador indirecto de HMA, ya que los HMA son microorganismos del suelo que cumplen un papel importante en el funcionamiento de los ecosistemas. A su vez, la glomalina se encontró como parte primordial de la MO del suelo y está relacionada a la estabilidad de los agregados del suelo. Todos estos parámetros son muy utilizados como indicadores cuando se busca caracterizar la calidad del suelo y de alguna manera parecen estar resumidos o contenidos en el valor de glomalina de los suelos. En esta parte del trabajo nuestro objetivo fue extraer y cuantificar las fracciones, fácilmente extraíble y total, de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP) desde muestras de suelo con diferentes manejos agrícolas en siembra directa, con el fin de evaluar la influencia de dichas prácticas agrícolas en los niveles de glomalina.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Suelos

Los suelos estudiados corresponden a los analizados en el proyecto BIOSPAS, y corresponden a campos de producción real. Las prácticas de manejo agrícola y los sitios para el estudio se seleccionaron junto con los Productores Agropecuarios siguiendo una definición de trabajo de los manejos del suelo basada en los principios de la Agricultura Certificada establecidos por la Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (AAPRESID, 2013d-e). Los tres tratamientos definidos fueron (Tabla 3.1): (1) Buenas Prácticas Agrícolas (BPA): manejo sustentable de agricultura bajo siembra directa, sujeto a rotaciones típicas de cultivos (soja-trigo-maíz), uso de cultivo de cobertura, reposición de nutrientes y minimizando el uso de agroquímicos (herbicidas, insecticidas y fungicidas); (2) Prácticas Agrícolas No Sustentables (PANS): manejo agrícola bajo siembra con alto índice de monocultivos, baja sustitución de nutrientes y alto uso de agroquímicos (herbicidas, insecticidas y fungicidas); (3) Ambiente Natural (AN): usado como referencia, fueron seleccionados pastizales naturales en un área de aproximadamente 1 ha cerca de las parcelas cultivadas (a menos de 5 km), donde se no se cultivó durante (al menos) los últimos 30 años (Figuerola y col., 2012). Los tratamientos se repitieron 4 veces en campos agrícolas situados a través de una transecta de 400 km oeste-este a lo largo de la región más productiva en la Pampa Argentina, específicamente en las localidades de Bengolea en la provincia de Córdoba (33 ° 01 '31 "Sur, 63 ° 37' 53" Oeste); Monte Buey en la provincia de Córdoba (32 ° 58 '14 "Sur, 62 ° 27' 06" Oeste); Pergamino en la provincia de Buenos Aires (33 ° 56 '36 "Sur, 60 ° 33' 57" Oeste) y Viale en la provincia de Entre Ríos (31 ° 52 '59,6 "Sur y 59 ° 40' 07" Oeste) (Tabla 3.2). Se realizaron cuatro muestreos, en dos diferentes estaciones: Verano/2010-2011 (campos con soja ó maíz en madurez fisiológica) e Invierno/2010-2011 (campos en barbecho o al momento previo de la siembra de trigo). Las muestras de suelo se recogieron por triplicado para cada tratamiento en tres puntos de muestreo de 5 m² separados al menos 50 m uno del otro, teniendo cuidado de no seguir la línea de siembra en el campo. Cada muestra de la fracción de los 10 cm superiores del suelo se recogió como un compuesto de 16 a 20 submuestras elegidas al

azar. Las submuestras de suelo se combinaron, se homogeneizaron en el campo y se transportaron al laboratorio a 4 °C. En los 3 días posteriores de la recolección, las muestras se tamizaron para eliminar las raíces y restos vegetales a través de una malla de 2 mm, y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento.

Tabla 3.1. Descripción de los diferentes manejos agrícolas en los sitios estudiados calculados como valores promedios para los años 2005-2009.

	Bengolea		Monte Buey		Pergamino		Viale	
	BPA	PANS	BPA	PANS	BPA	PANS	BPA	PANS
<i>Años bajo siembra directa (%)</i>	100	80	100	100	100	100	100	100
<i>Relación Maíz/Soja</i>	1.5	4	0.7	4	1.5	5	1.5	4
<i>Índice de rotación^a</i>	1.67	1.33	1.8	1.17	1.33	1	1.5	1.17
<i>Invierno con trigo (%)^b</i>	60	40	60	20	40	0	40	20
<i>Invierno con cultivo cobertura (%)^c</i>	20	0	40	0	0	0	20	0
<i>Uso de herbicida (l/ha)^d</i>	27.7	43.8	22	38.6	29.3	46.5	34.5	43.1
<i>Uso de insecticida (N° aplicaciones/año)</i>	4	10	6	8	-	3	1.3	2.3
<i>Uso de fungicida (N° aplicaciones/año)</i>	1	0	0	1	-	1	-	-
<i>Rendimiento de soja (kg/ha)</i>	3067	2775	3167	2675	2933	2825	3000	1805
<i>Incremento del rendimiento de soja (%)^e</i>	10.5		18.4		3.8		66.2	
<i>Rendimiento de maíz (kg/ha)</i>	10500	2700	12550	800	9500	(g)	7030	3450
<i>Incremento del rendimiento de maíz (%)^f</i>	289		1468.8		-		103.8	

^aCalculado como número de cultivo por año, en los 5 años anteriores al muestreo. ^bPorcentaje de inviernos con trigo sembrado como un cultivo de invierno. ^cPorcentaje de inviernos con otro cultivo de cobertura (*Vicia sp.*, *Melilotus alba* or *Lolium perenne*) sembrado como cultivo de invierno. Los cultivos de cobertura se quemaron químicamente antes de sembrar los cultivos de verano. ^dCalculado como litros de herbicidas de baja toxicidad sobre litros de herbicidas de moderada toxicidad. La toxicidad se define de acuerdo a las categorías de toxicidad de EPA. ^eIncremento porcentual del rendimiento en las BPA en función de las PANS. (g) No se sembró maíz en Pergamino bajo PANS.

Tabla 3.2: Características de los suelos usados en este estudio (Kraemer y col., 2012a).

	Bengolea	Monte Buey	Pergamino	Viale
<i>Clasificación del suelo</i>	Haplustol éntico	Argiudol típico	Argiudol típico	Hapludert
<i>Textura</i>	franco arenosa	franco limosa	franco limosa	franco arcillosa limosa
<i>Lluvia anual media (mm)</i>	880	930	1000	1165
<i>Temperatura anual media (°C)</i>	16.9	17.2	16.7	18.4
<i>Distribución de</i>				
<i>tamaño de partículas</i>	<i>Arena (%)</i>	<i>Limo (%)</i>	<i>Arcilla (%)</i>	
	57	16	16	2
	29	61	62	56
	14	23	22	42

3.2.2 Extracción de glomalina

Para extraer la glomalina se usó el protocolo reportado por Wright y Upadhyaya (1996), con especial atención a las sugerencias realizadas por Janos y col. (2008) (ver la sección 2.2.2 Extracción de glomalina en 2.2 Materiales y Métodos en el Capítulo 2). La fracción fácilmente extraíble (GRSP-FE) se extrajo suspendiendo 1 g de suelo en 8 ml de citrato de sodio (ácido cítrico, sal trisódica dihidratada) 20 mM, pH=7.00, en tubos de vidrio de 50 ml. Los tubos se autoclavaron a 121 °C por 30 min. Para la fracción total (GRSP-Total) se suspendió 1 g de suelo en 8 ml de citrato de sodio (ácido cítrico, sal trisódica dihidratada) 50 mM, pH=8.00 en tubos de 50 ml, y se autoclavaron los tubos a 121 °C por 60 min. Los procesos de autoclave se realizaron en una autoclave de mesa (Modelo EA-21, Stoord, Buenos Aires, Argentina). Luego del proceso de autoclavado se centrifugó a 5000 g durante 15 minutos (Centrifuga multi (RF) serie multipurpose, Thermo Electron Corporation, Milford, EE.UU.) y el sobrenadante representa las fracciones de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP).

3.2.3 Cuantificación de glomalina

Para cuantificar la glomalina en las fracciones extraídas, como proteína total, se usó el método colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA) (ver el desarrollo detallado del método de BCA en la sección 2.2.3 Cuantificación de glomalina en 2.2 Materiales y Métodos en el Capítulo 2). Para lograr una determinación más precisa, de acuerdo con una curva de calibración estándar, se ensayaron tres diluciones para cada fracción

extraída: sin diluir, $d=1/2$ y $d=1/4$; y cada dilución se midió por triplicado en diferentes celda de una misma placa. Todas las diluciones se realizaron con el buffer de extracción, citrato de sodio 20 mM, pH=7.0 para la fracción GRSP-FE y citrato de sodio 50 mM, pH=8.0 para la fracción GRSP-Total. Los valores reportados se normalizaron a 1 g de suelo seco. La absorbancia de las muestras se leyó con un lector de microplacas multifuncional (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Offenburg, Alemania), a 27 °C y sin agitación.

3.2.4 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2012). Inicialmente, para estudiar los efectos de los tratamientos (Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Prácticas Agrícolas No Sustentables (PANS) y Ambiente Natural (AN)) y de las épocas de muestreo (Verano e Invierno) sobre los niveles de las dos fracciones de glomalina medidas, EE-GRSP y Total-GRSP, los datos se analizaron mediante la construcción de modelos lineales mixtos (Zuur y col., 2009). En estos, considerando el diseño experimental, los tratamientos y las épocas de muestreo se usaron como efectos fijos, y los años (2010 y 2011) y los sitios (Bengolea, Monta Buey, Pergamino y Viale) de muestreo se consideraron efectos aleatorios. La estructura aleatoria incluye los sitios anidados dentro de los años y los tratamientos anidados dentro de los sitios. Posteriormente, se realizó el análisis de los sitios por separado estableciendo modelos lineales generales (Zuur y col., 2009). Las distribuciones normales fueron controladas por gráficos normales de los residuos estandarizados y mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks sobre los residuos. La homogeneidad de varianzas se verificó por gráficos de residuos vs. valores predichos y mediante la prueba de Levene sobre los valores absolutos de los residuos; y en los casos que fue necesario se modeló la heterocedasticidad de varianza. La independencia de los errores se verificó mediante gráficos de los residuos en función de la variable que se presumió podía generar dependencias sobre las observaciones. Para evaluar las diferencias significativas entre los valores, se usaron las pruebas de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) y pruebas de contraste. Las diferencias se consideraron significativas con $p<0.05$. Los coeficientes de

correlación de Pearson fueron calculados para evaluar la relación entre diferentes variables, entre las fracciones GRSP-FE y GRSP-Total entre sí y con la textura del suelo. Se realizaron regresiones lineales simples para determinar el grado de vinculación entre las diferentes fracciones de glomalina.

3.3 Resultados

Los valores de GRSP-FE y GRSP-Total, en mg por g de suelo seco, en las tres situaciones de manejo agrícola y las dos épocas de muestreo estudiadas se muestran en la Figura 3.1. El análisis de los efectos de los tratamientos y de las épocas de muestreo sobre los niveles de las dos fracciones de glomalina medidas, GRSP-FE y GRSP-Total, se realizó considerando los cuatro sitios, los tres tratamientos dentro de estos sitios, las tres muestras puntuales en cada tratamientos, los dos años y las dos épocas de muestreo (número de muestras analizadas = 144). También se consideró que en la determinación de la concentración de GRSP en cada fracción extraída se ensayaron tres diluciones y tres determinaciones para cada dilución, con el fin de obtener una determinación más precisa. Así, el número total de datos analizados fue 1296.

A partir del análisis estadístico se observó que para la **fracción fácilmente extraíble** los efectos fijos estudiados (tratamientos y estaciones) no presentaron interacción ($p=0.9963$). Entre los tratamientos, se observó una diferenciación significativa ($p=0.0015$), encontrándose que las prácticas agrícolas (BPA y PANS) se diferenciaron del AN pero no entre sí: $AN > BPA \approx PANS$ (Figura 3.1.A); y entre las épocas de muestreo (verano e invierno) no se observó diferencias significativas ($p=0.0528$) (Figura 3.1.B).

Para la **fracción total** tampoco hubo interacción entre los efectos fijos ($p=0.8878$). En este caso, entre tratamientos también se observaron diferencias significativas ($p=0.003$), encontrándose que las prácticas agrícolas se diferenciaron del AN y además lo hicieron entre sí: $AN > BPA > PANS$ (Figura 3.1.A); y además tampoco se observó diferencias entre épocas de muestreo ($p=0.1497$) (Figura 3.1.B).

A su vez, los valores relativos de GRSP para las prácticas agrícolas, BPA y PANS, en función del valor de AN (indicados sobre las columnas respectivas en la Figura 3.1.A),

fueron mayores para BPA; y esto se observó en las dos fracciones de glomalina, GRSP-FE y GRSP-Total.

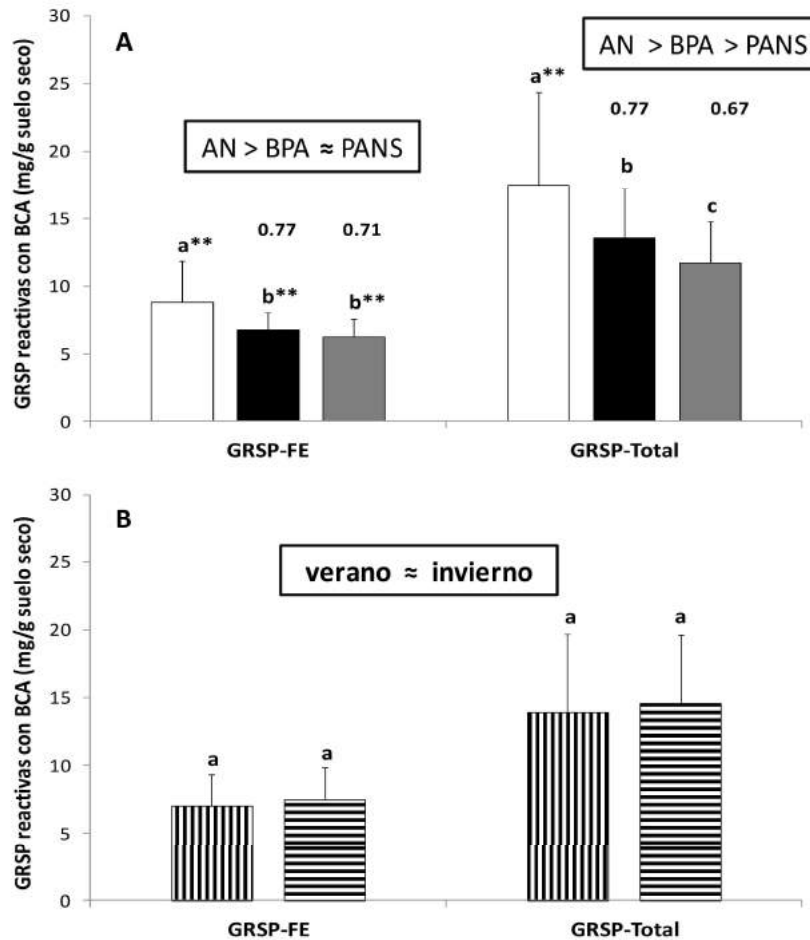


Figura 3.1: Concentración de las fracciones de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina fácilmente extraíbles (GRSP-FE) y totales (GRSP-Total), extraídas de muestras de suelo de los cuatro ambientes estudiados comparando (A) las tres situaciones de distinto manejo agrícola: □ AN, ■ BPA y ■ PANS, y (B) las dos épocas de muestreo: ▨ verano y ▩ invierno. La cantidad de proteína, expresada como mg de proteína por g de suelo seco, fue determinada por el método calorimétrico de BCA usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. En la Figura 3.1.A, se muestran las medias del número total de muestras separadas por tratamientos (n=48) con sus desviaciones estándares indicadas por las líneas, y sobre las respectivas columnas se muestran los valores relativos de EE-GRSP y Total-GRSP para los tratamientos de BPA y PANS en función del valor del AN (control). En la Figura 3.1.B, se muestran las medias del número total de muestras separadas por estaciones (n=72) con sus desviaciones estándares indicadas por las líneas. Las letras sobre las columnas representan el análisis estadístico (p<0.05, n=144), entre tratamientos (Figura 3.1.A) y entre estaciones (Figura 3.1.B). Los asteriscos representan los p-valores significativos: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Por otro lado, resultó de interés analizar los sitios por separado. En este caso, se observó que los valores de glomalina son mayores en el sitio de Viale y menores en Bengolea; mientras que en Monte Buey y Pergamino mostraron valores intermedios. La Figura 3.2 muestra los valores totales de GRSP-FE y GRSP-Total para los ambientes naturales de todos los sitios, a modo de ejemplo de esta observación.

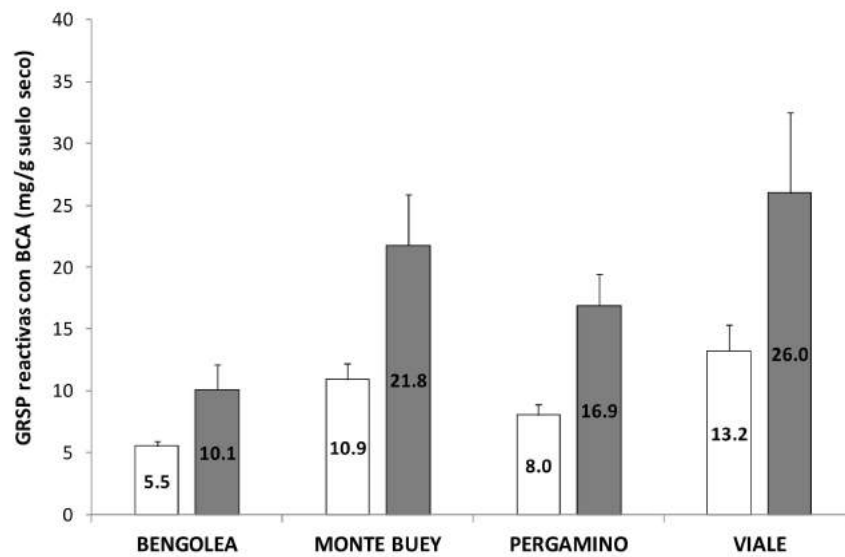


Figura 3.2: Concentración de las fracciones de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina □ fácilmente extraíbles (GRSP-FE) y ■ totales (GRSP-Total), extraídas de las muestras de suelo de los ambientes naturales de los cuatro sitios estudiados.

La Figura 3.3 muestra los valores promedio de GRSP-FE y GRSP-Total, en mg por g de suelo seco, considerando las tres situaciones de manejo agrícola del suelo y en los cuatro tiempos de muestreo estudiados para los cuatro sitios separados. Sobre las respectivas columnas se indican los valores de GRSP-FE y GRSP-Total de las situaciones de manejo agrícola relativos al valor del AN, dentro de un mismo ambiente y un mismo tiempo de muestreo.

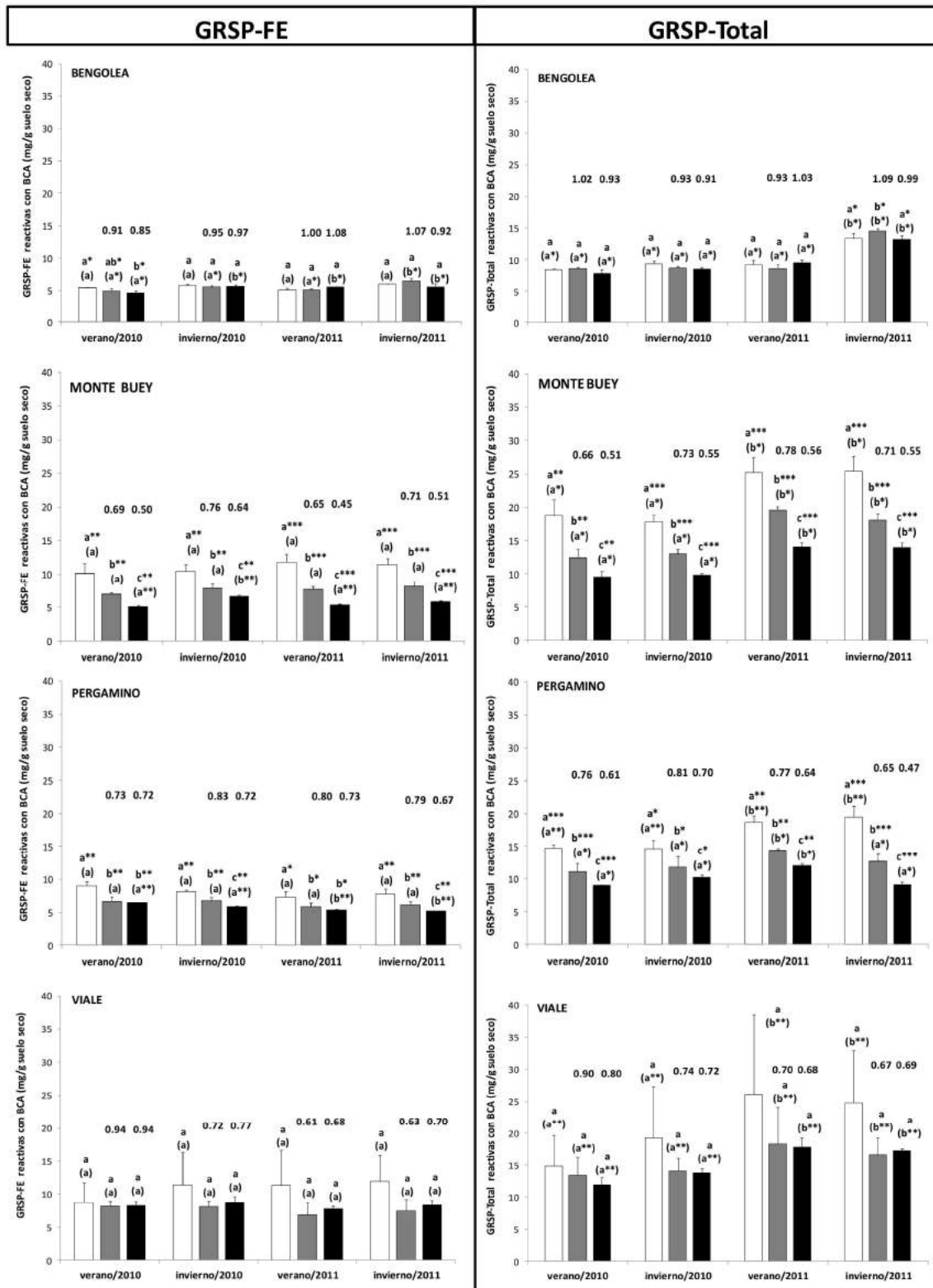


Figura 3.3: Leyenda a continuación.

Figura 3.3: Concentración de las fracciones de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina fácilmente extraíbles (GRSP-FE) y de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina totales (GRSP-Total), extraídas de muestras de suelo de los cuatro ambientes estudiados comparando tres situaciones de distinto manejo agrícola: □ AN, ■ BPA y ■ PANS, en cuatro diferentes tiempos de muestreo. La cantidad de proteína, expresada como mg de proteína por g de suelo seco, fue determinada por el método calorimétrico de BCA usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Se muestran las medias de tres replicas (n=3) con sus desviaciones estándares indicadas por las líneas. Sobre las respectivas columnas, se muestran valores relativos de GRSP-FE y GRSP-Total para los tratamientos de BPA y PANS en función del valor del AN (control). Las letras sobre las columnas representan el análisis estadístico ($p < 0.05$, $n=9$) entre tratamientos dentro de cada sitio y cada muestreo; y las letras entre paréntesis representan el análisis estadístico ($p < 0.05$, $n=12$) entre muestreos dentro de cada sitio y cada tratamiento. Los asteriscos representan los p-valores significativos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Se observó que los valores de GRSP-FE y GRSP-Total en función de las prácticas agrícolas mostraron para cada sitio una tendencia diferente que relaciona los distintos tipos de manejo del suelo. Los sitios de Monte Buey y Pergamino, mostraron un patrón similar: los niveles de GRSP-FE y GRSP-Total disminuyeron en el siguiente orden: AN > BPA > PANS, y las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Además, los valores relativos de GRSP-FE y GRSP-Total para manejos agrícolas de BPA y PANS en función del valor de AN (BPA/AN y PANS/AN, indicados en las columnas respectivas en la Figura 3.3), fueron mayores para BPA en los dos sitios. Los valores de GRSP-FE y GRSP-Total en suelos de Bengolea y Viale no mostraron una tendencia clara en función al uso del suelo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los diferentes manejos agrícolas. En Bengolea, en donde se observaron los menores valores absolutos de glomalina (Figura 3.2), las relaciones BPA/AN y PANS/AN mostraron valores similares entre sí y cercanos a uno, lo que indicó que los niveles de glomalina en los diferentes manejos agrícolas no presentaron diferencias entre sí, y además los manejos agrícolas tuvieron niveles de glomalina similares al ambiente natural. Mientras que en Viale, con los mayores valores absolutos de glomalina (Figura 3.2), los niveles de GRSP-FE y GRSP-Total en el ambiente natural fueron más altos, indicando que los manejos agrícolas se diferenciaron del ambiente natural aunque no se diferenciaron entre sí. La mayor variabilidad del AN de Viale sobre todos los otros tratamientos y sitios, se debió a que una de las muestras puntuales presentó valores notablemente menores que las otras dos

repeticiones (ej: Verano/2010, GRSP-FE: AN1: 5.41, AN2: 9.55, AN3: 11.2; GRSP-Total: AN1: 9.47, AN2: 16.08, AN3: 18.91). Las tendencias observadas en cada sitio se mantuvieron en los cuatro muestreos realizados y además en general no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las concentraciones de glomalina entre los muestreos en los diferentes tratamientos (letras entre paréntesis en la Figura 3.3). A su vez, las tendencias observadas se mantuvieron en las dos fracciones extraídas de glomalina, GRSP-FE y GRSP-Total, con mayores valores absolutos de concentración en la fracción total.

Para analizar la relación entre las fracciones de glomalina se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson, que mostraron alta correlación al analizar todos los datos juntos (0.85, $p < 0.0001$), como también al analizar los sitios separados (Bengolea: 0.76, $p = 6E-8$; Monte Buey: 0.86, $p = 2.8E-11$; Pergamino: 0.6, $p = 1.2E-4$; Viale: 0.82, $p = 1.1E-9$). También se realizaron regresiones lineales entre los valores de GRSP-Total (se usó como variable dependiente) y GRSP-FE (como variable independiente) para estudiar en más profundidad la relación y establecer si hay alguna diferencia entre los diferentes sitios. La Figura 3.4 muestra las regresiones lineales, con las ecuaciones de las rectas establecidas, los p-valores de los estadísticos determinados (pendiente) y los valores de R^2 (que determinan qué proporción de la variación total es explicada por el modelo). Las tendencias establecidas fueron rectas con ordenada al origen cero (los p-valores de éste estadístico determinaron que son cero en todos los casos: sitios juntos: 0.932, B: 0.064, MB: 0.602, P: 0.604, V: 0.755) y con pendiente aproximada a 2. Así, se pudo establecer que la relación entre las fracciones de glomalina fue tal que la fracción total fue dos veces la fracción fácilmente extraíble, y esto se observó al analizar los sitios juntos y separados.

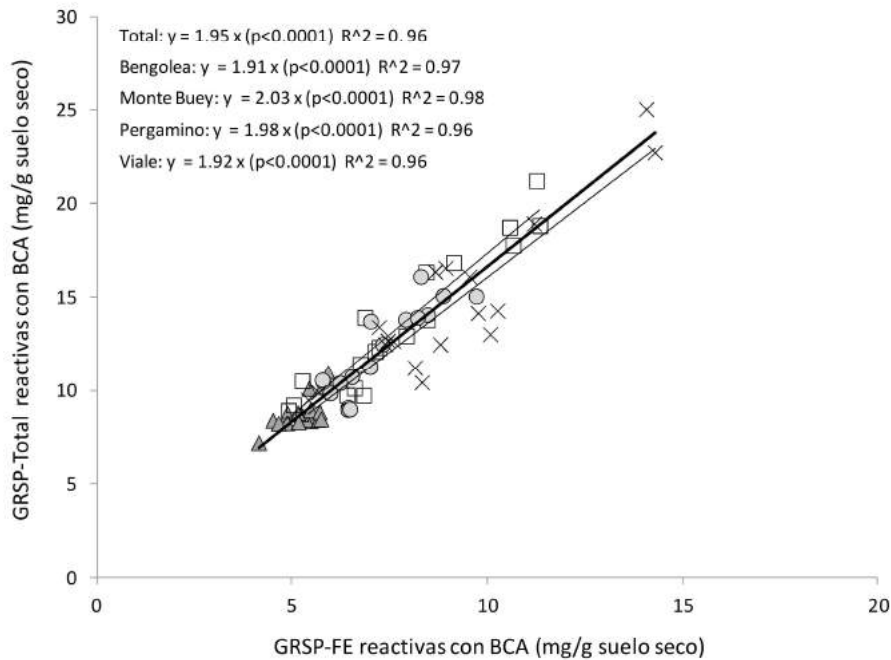


Figura 3.4: Relación entre las fracciones de glomalina, GRSP-FE y GRSP-Total, medidas por el ensayo de BCA, desde las muestras de: Δ Bengolea, \square Monte Buey, \circ Pergamino y \times Viale. Inserto en el gráfico se muestran las ecuaciones de las rectas establecidas, los p-valores de las pendientes y los valores de R^2 .

3.4 Discusión

Nuestros resultados muestran que los niveles de glomalina son influenciados por las características inherentes del suelo en cada ambiente particular, afectando tanto los valores absolutos encontrados como las tendencias que relacionan la concentración de glomalina con los diferentes usos del suelo. En todos los campos en producción comparados en este estudio los manejos agrícolas que definen las BPA y las PANS son marcadamente diferentes entre sí. El tipo de manejo es bajo siembra directa, durante los 6 años anteriores a los muestreos, con excepción de un solo año (2004/2005) en Bengolea, donde el lote de las PANS fue labrado con un arado cincel. Entonces, la principal diferencia entre ambos manejos agrícolas fue el predominio de soja en la sucesión de cultivos en las PANS y una proporción más equilibrada de maíz, trigo y soja en la rotación en las BPA, que se tradujo en mayores cosechas. Otras prácticas agronómicas que

distinguen las BPA y las PANS son la incorporación de cultivos de cobertura y la menor cantidad de herbicidas utilizados (Tabla 3.1).

A continuación se describen los suelos de los diferentes ambientes estudiados. El suelo en **Bengolea** es un suelo franco arenoso, Haplustol Entiotico, ubicado en la Pampa Piamonte, donde el régimen de humedad es en su mayoría ústico y donde las arenas fluviales y los limos se encuentran junto con los sedimentos loésicos. El suelo en **Monte Buey** está en una zona plana en el límite entre la Pampa Piamonte y la Pampa Ondulada; es un suelo franco limoso, Argiudol típico con un horizonte *Bt* iluvial moderadamente desarrollado y una mayor proporción de la fracción de limo. El suelo en **Pergamino** es un suelo franco limoso, Argiudol típico, con un horizonte *Bt* bien desarrollada, representante de la Pampa Ondulada; la precipitación es ligeramente mayor que en el sitio anterior, la red de drenaje está bien definida y el relieve es suavemente ondulada (pendientes de sobre 2% y hasta el 5%). El suelo en **Viale** es franco arcillo limoso, Hapludert; la precipitación es la más alta de la transecta, el relieve también es suavemente ondulado y el sistema de drenaje está bien desarrollado. La mineralogía de arcilla de los horizontes superficiales de los suelos de Bengolea, Monte Buey y Pergamino es bastante similar, que consiste en arcillas 2:1, principalmente illitas con una pequeña proporción de los minerales irregulares de esmectita-ilita interestratificada, y trazas de caolinita. Por el contrario, el suelo en Viale se caracteriza por una proporción considerable de esmectita junto con proporciones inferiores de los minerales de arcilla mencionados anteriormente (Kraemer y col., 2012a).

En resumen, los suelos varían del más arenoso en el ambiente menos lluvioso sobre el oeste, Bengolea, al más arcilloso en el ambiente más húmedo en el este, Viale (Tabla 3.2). En estos dos suelos, con los menores (Bengolea) y mayores (Viale) valores absolutos de concentración, los niveles de glomalina no manifiestan diferencias entre las BPA y las PANS. Mientras que en las situaciones intermedias, representadas por los suelos de Monte Buey y Pergamino que presentan características edáficas similares, se observa una tendencia relacionada con el modelo que implica la existencia de mayores redes de micorrizas en suelos de ambientes naturales que disminuyen en la medida que los suelos

son utilizados en producción agrícola. En estos casos, las BPA se ven reflejadas con mayores niveles de glomalina en comparación a las PANS. A su vez, las tendencias observadas se mantienen en las dos fracciones extraídas de glomalina, con mayores valores absolutos en la fracción total (aproximadamente dos veces más que la fracción fácil) que parecen estar relacionados con las condiciones más drásticas de extracción de esta fracción. Por otro lado, analizando las diferentes épocas de muestreo vemos que los niveles de glomalina no presentan dinámica por efectos estacionales.

Se ha reportado que la textura del suelo influye en los niveles de glomalina. Rillig y Steinberg (2002) observaron que los HMA que crecen en un medio de bolitas de vidrio grandes producen menos glomalina por unidad de longitud de hifas que aquellos que crecen en un medio con bolitas de vidrio pequeñas. Rillig y col. (2003) reportaron diferencias en la descomposición de glomalina por efectos directos de diferentes ambientes. Así, la textura del suelo puede afectar tanto la producción de glomalina por parte de los HMA como también modificar el tiempo de recambio de la glomalina en el suelo. Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados, en los cuales en el suelo de Bengolea con una textura más arenosa (57% arena, 29% limo, 14% arcilla) se encuentran los menores valores absolutos, en el suelo de Viale con textura más arcillosa (2% arena, 56% limo, 42% arcilla) los mayores valores absolutos, y en los suelos con texturas intermedias entre estos, Monte Buey (16% arena, 61% limo, 23% arcilla) y Pergamino (16% arena, 62% limo, 22% arcilla), valores absolutos intermedios. Analizando la relación de las fracciones de glomalina con la textura del suelo a través de coeficientes de correlación de Pearson, se observa que los niveles de glomalina se correlacionan positivamente con el contenido de arcilla (GRSP-FE: 0.6, $p=0.0001$; GRSP-Total: 0.56, $p=0.0003$) y con el contenido de limo (GRSP-FE: 0.41, $p=0.0119$; GRSP-Total: 0.41, $p=0.0127$), mientras que los hacen negativamente con el contenido de arena (GRSP-FE: 0.6, $p=0.0001$; GRSP-Total: -0.58, $p=0.0002$). Es decir, encontramos en los suelos estudiados que los valores de glomalina dependen de la textura del suelo, y entonces también sería posible pensar que la textura del suelo podría afectar la influencia de las

prácticas agrícolas sobre los niveles de glomalina, es decir podría afectar a la glomalina como indicador de calidad del suelo.

Los resultados presentados en este capítulo corroboran la hipótesis general que la glomalina funciona como indicador de calidad de suelo diferenciando entre prácticas agrícolas, pero esto es más claro y significativo para los valores de la denominada glomalina total y también lo es para suelos de tipo franco limoso y no ocurre lo mismo en suelos franco arenosos o arcillosos. Que la fracción total sea un mejor indicador que la fracción fácilmente extraíble sugiere que la glomalina es un indicador que necesita mayor tiempo de desarrollo (tiempo de acumulación de glomalina), es decir que registra historias de uso del suelo más que efectos inmediatos de cambio de manejo. Por otra parte, la dependencia de la glomalina como indicador en relación a la textura del suelo requiere de un mayor trabajo de investigación como es el análisis de la relación de la glomalina con otros parámetros bioquímicos o fisicoquímicos del suelo que contribuyan a construir una explicación de este fenómeno diferencial con la textura, quizás relativo al proceso de extracción.

Capítulo 4

**Relación de las fracciones de proteínas
del suelo relacionadas con la glomalina con
otros parámetros que caracterizan diferentes
manejos agrícolas en siembra directa del suelo**

4.1 Introducción

Los resultados presentados y discutidos hasta aquí, en particular en el capítulo anterior, indican que las características edáficas del ambiente deben ser tenidas en cuenta al analizar las diferencias que reflejan los niveles de glomalina en relación a la calidad del suelo frente a diferentes manejos agrícolas. Así, en nuestros ejemplos, en el suelo de textura más arenosa, cercano a la localidad de Bengolea, se encontraron los menores valores absolutos de glomalina y no se manifestaron diferencias entre las prácticas agrícolas analizadas. En el suelo de textura más arcillosa, cercano a la localidad de Viale, si bien se registraron los mayores valores de glomalina, tampoco se manifestó la diferencia entre prácticas agrícolas. En los suelos con textura franco limosa, Monte Buey y Pergamino, se registraron valores intermedios de glomalina (Monte Buey > Pergamino) y se observó una tendencia relacionada con la presencia de mayores redes de micorrizas en suelos de ambientes naturales que disminuyen según el uso agrícola del suelo: AN > BPA > PANS. Por lo tanto, para entender mejor las diferencias observadas en estos suelos y tratar de comprender mejor el significado biológico/bioquímico/edáfico del valor que se obtiene de la fracción de glomalina en los suelos, optamos por analizar en cada sitio de muestreo la relación de las fracciones de glomalina extraídas, GRSP-FE y GRSP-Total, medidas como proteína total, contrastando dichos valores con los de otras variables que permiten caracterizar el suelo en otros aspectos, como la comunidad de micorrizas, el perfil de ácidos grasos, el fósforo extraíble, la actividad de fosfatasa, el carbono orgánico, el nitrógeno total, el contenido de carbohidratos y la estabilidad estructural de los agregados.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Suelos

Los suelos analizados y los datos que aquí se incluyen en el análisis se obtuvieron del proyecto BIOSPAS y se describen en la sección 3.2.1 Suelos en 3.2 Materiales y Métodos en el Capítulo 3, y brevemente a continuación.

4.2.2 Extracción de glomalina y cuantificación de glomalina

La extracción y cuantificación de glomalina, tanto en su forma de GRSP-FE como GRSP-Total se realizó como se describe en las secciones 3.2.2 Extracción de glomalina y 3.2.3 Cuantificación de glomalina en 3.2 Materiales y Métodos en el Capítulo 3.

4.2.3 Análisis de la comunidad de hongos micorrícicos arbusculares a partir de la separación y caracterización de las esporas presentes en el suelo (Realizado por la Dra. María Noelia Cofré. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET). FCEFyN. Universidad Nacional de Córdoba, proyecto BIOSPAS)

De cada muestra de suelo se tomaron 100 g que fueron tamizados empleando mallas de distinto tamaño de apertura (125 y 38 μm) siguiendo la metodología propuesta por Gerdemann y Nicolson (1963). Posteriormente, los materiales retenidos en los tamices de 125 y 38 μm fueron transferidos a tubos de centrifuga de 50 ml y centrifugados en sacarosa al 80% (Walker y col., 1982). Las esporas obtenidas en la interfase entre la solución de sacarosa y agua fueron lavadas y colocadas en cápsulas de Petri de 9 cm de diámetro con base cuadrículada de 1 cm de lado. Las esporas y esporocarpos aparentemente saludables y sin ningún tipo de señal de daño fueron diferenciados según tamaño, color, ornamentaciones, número de paredes, número de láminas en cada pared y forma de la hifa sustentora. Luego fueron cuantificadas bajo lupa estereoscópica Nikon SMZ745T. Para cada tipo morfológico se realizaron preparados permanentes usando Polivinil-alcohol (PVA) y PVA + Melzer (Morton, 1988; Omar y col., 1979), como medios de montaje. Las esporas en reactivo de Melzer fueron aplastadas para poder observar la tinción de las diferentes paredes. Las morfoespecies fueron identificadas bajo microscopio

óptico Nikon Eclipse E200, fotografiadas y comparadas con las descripciones de las especies originales y aislamientos de referencia descritos en INVAM (<http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>), Blaszkowski (<http://www.zor.zur.edu.pl/Glomeromycota/index.html>), Schenck y Perez (1990) y Redecker y col. (2013). Las especies fueron asignadas a cada tipo de espora siguiendo las nominaciones taxonómicas de Schüßler y Walker (2010) y Redecker y col. (2013). De cada una de las muestras de suelo se analizó la comunidad de esporas de HMA, se determinó la densidad de esporas, expresada en número de esporas en 100 g de peso seco de suelo, totales y clasificadas en las familias encontradas (Cofré, 2014).

4.2.4 Análisis de perfiles de ácidos grasos de diferentes fracciones de lípidos del suelo

(Realizado por el Dr. Alejandro Ferrari. Laboratorio de Bioquímica, Microbiología e Interacciones Biológicas en el Suelo (LBMIBS). Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes, proyecto BIOSPAS)

Los perfiles de ácidos grasos se analizaron como sigue: 3 g de suelo se extrajeron con un buffer mezcla de cloroformo-metanol-citrato (1:2:0.8 v/v/v), y la capa orgánica se fraccionó a través de una columna de extracción en fase sólida llena de sílice. Los lípidos neutrales, glicolípidos y fosfolípidos se eluyeron con cloroformo, acetona y metanol, respectivamente. Las fracciones fueron entonces expuestas a una metanólisis alcalina suave, se extrajo con hexano, modificada con 33,75 µg del ácido graso estándar de 19:0 éster de metilo (no encontrado en muestras ambientales), se evaporó bajo una corriente de N₂, y se resuspendieron en 100 µl de hexano. Detalles analíticos de la técnica se pueden encontrar en Frostegard ycol. (1993). El análisis cromatográfico de los FAMES extraídos se llevó a cabo de acuerdo con el sistema de TSBA 40 MIDI (Sasser, 1990). Brevemente, 2 µl del extracto lipídico de cada fracción de lípidos se inyecta en un cromatógrafo de gases con un detector de ionización de llama (Agilent 6890 plus), usando H₂ como gas portador y una columna capilar de siloxano fenil metil 2.5% Ultra (25m x 200 µm x 0,33 µm). La temperatura inicial del horno de 170 °C se incrementó a 260 °C a 5 °C/min, seguido de otro aumento a 310 °C a 40 °C/min. Cada concentración de ácido graso en la muestra se calculó en relación con el estándar interno 19:0 éster de metilo, y se

expresó como nanomoles por gramo de suelo seco. En total, 73 ácidos grasos diferentes de los perfiles de los ácidos grasos fosfolipídicos (PLFA) y de los ácidos grasos neutros (NLFA) obtenidos a partir de las diferentes muestras de suelo se detectaron con el sistema MIDI y se analizaron adicionalmente (Ferrari y col., 2015).

4.2.5 Análisis químico del suelo y fraccionamiento físico de la materia orgánica del suelo (Realizado por el Ing. Matías Duval. CERZOS-CONICET. Departamento de Agronomía. Universidad Nacional del Sur, proyecto BIOSPAS)

En las muestras de suelo, secadas al aire y tamizadas con malla de 2 mm, se realizaron las siguientes determinaciones:

Carbono orgánico total del suelo (COT) por combustión seca (1500°, LECO Analizador de carbono), expresado en porcentaje de peso seco (Duval y col., 2013).

Nitrógeno total (Nt) por el método de Kjeldhal (Bremmer, 1996), expresado en porcentaje de peso seco (Duval y Galantini, 2010).

Fósforo extraíble (Pe) por el método de Bray y Kurtz (1945), expresado en ppm (Duval y Galantini, 2010).

Carbohidratos totales y solubles. La extracción de los carbohidratos totales (CHt) se realizó por una hidrólisis ácida en la cual 1 g de muestra de suelo se trató con 10 ml de H₂SO₄ 0,5 M y se calentó a 80 °C durante 24 h. Para la extracción de los carbohidratos solubles (CHs) se suspendió 1 g de muestra de suelo en 10 ml de agua destilada y se calentó a 80 °C durante 24 h. Después de la extracción con agua caliente, se añadió H₂SO₄ para obtener una concentración 0,5 M como en el procedimiento de hidrólisis con ácido diluido y se procesó inmediatamente. Después de las extracciones, cada suspensión se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min (Angers y Mehuys, 1989; Puget y col., 1999). El contenido de carbohidratos en los extractos se determinó por espectrometría utilizando el método de espectrometría de antrona con glucosa como el estándar (Brink y col., 1960) y se expresó en kg/ha (Duval y col., 2013).

Fraccionamiento por tamaño de partícula del COT por tamizado en húmedo del suelo (Cambardella y Elliott, 1992; Galantini, 2005). 50 g de suelo se mezclaron con 100 ml de agua destilada en recipientes de vidrio de 120 ml. Se añadieron 10 bolitas de vidrio (5

mm de diámetro) para aumentar la destrucción total y reducir los problemas potenciales creados por diferentes contenidos de arena (Cambardella y Elliott, 1992). Las muestras fueron sometidas a dispersión mecánica a través de un agitador rotatorio durante aproximadamente 16 h a 40 rpm, para desintegrar los agregados. El tamizado se hizo con un par de tamices de 53 μm y 105 μm de diámetro de malla, moviéndose hacia atrás y adelante hasta que el agua que salía por el tamiz estaba clara a simple vista. Se obtuvieron tres fracciones: la fracción gruesa (105-2000 μm) que contiene partículas gruesas de carbono orgánico (COPg) y arenas gruesas; la fracción media (53 a 105 μm) que contiene partículas finas de carbono orgánico (COPf) y arenas muy finas; la fracción fina (< 53 μm) que contiene carbono orgánico asociado a minerales (COM), así como limos y arcillas minerales. El material retenido en cada tamiz se transfirió por medio de chorros de agua a recipientes de aluminio, fue secado al horno a 105 °C durante 24 h y luego pesado. El contenido de carbono del COPg y del COPf se determinó de la misma manera que el COT. Se utilizó la diferencia entre el COT y (COPg + COPf) para calcular el contenido de carbono orgánico de la fracción < 53 μm (COM) (Duval y col., 2013).

4.2.6 Obtención de V_{MAX} para la actividad enzimática de fosfatasa (Realizado por el Dr. Luciano Gabbarini. Laboratorio de Bioquímica, Microbiología e Interacciones Biológicas en el Suelo (LBMIBS). Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes, proyecto BIOSPAS)

Se pesaron 0.1 g de suelo en tubos plásticos de 20 ml (BMT-20S IKA) con 10 bolitas de acero y se resuspendieron en 10 ml de agua desionizada estéril. Para facilitar la disgregación de las partículas se trató la muestra 120 segundos a 6000 rpm en un dispersor (Ultra-Turrax tube drive IKA[®]) que hace girar un rotor dentro del tubo provocando que las bolitas metálicas golpeen las partículas de suelo. Luego se agregaron 100 μl en cada celda de una placa de 96 celdas previamente cargada con buffer de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) 0.1M pH 6.1 y el sustrato fluorescente 4-metilumbeliferona fosfato (4-MUB fosfato) en diferentes concentraciones (1, 2, 8, 20, 50, 60, 80 y 90 μM) en un volumen final de 200 μl . Cada concentración de sustrato se hizo por triplicado. En cada mezcla de reacción se midió la cantidad de 4-MUB producido a cada

minuto durante 40 minutos en un fluorómetro POLARstar Omega (BMG Labtech, Germany) a una temperatura de 30°C con filtros de excitación a 355 nm y emisión a 460 nm. Una vez obtenidas las cantidades de producto para los diferentes tiempos se calculó la velocidad inicial (V_0) para cada mezcla de reacción considerando a ésta un promedio de las V_0 de las diferentes enzimas capaces de hidrolizar fosfato que están presentes en el suelo. Con las V_0 para las diferentes concentraciones de sustrato se estimó la velocidad máxima (V_{MAX}) para cada muestra de suelo ajustando los datos a una hipérbola cuadrática de ecuación: $V_0 = V_{MAX} \cdot [S] / (K_M + [S]) - 1$. La V_{MAX} se expresó en mmol MUB/g suelo seco.min. (Gabbarini y col., 2012).

4.2.7 Análisis de la estabilidad estructural de los agregados y de la hidrofobicidad del suelo (Realizado por el Ing. Ag. Mg. Filipe Kraemer. Instituto de Suelos, CIRN, INTA, Castelar. Cátedra de Manejo de Suelos, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, proyecto BIOSPAS)

Para determinar la estabilidad estructural por la metodología de Le Bissonnais (1996) se tomaron 6 muestras no disturbadas de los primeros 20 cm de profundidad de cada unidad muestral. Se realizaron los tres pre-tratamientos: a) humedecimiento lento, b) agitado en etanol, y c) humedecimiento rápido. El pre-tratamiento de humedecimiento rápido se realizó con un tiempo de inmersión de 10 segundos. El índice de estabilidad estructural (valores más altos a mayor estabilidad) (DMP-LB) se obtuvo a partir del promedio de los tres pre-tratamientos (Kraemer y col., 2012a).

Para determinar la hidrofobicidad de los suelos se utilizó la metodología del tiempo de penetración de la gota de agua (WDPT), que determina el tiempo que tarda una gota de agua en entrar completamente al suelo. El WDPT fue medido según el método de Letey (1969), modificado por Chenu y col. (2000) (Kraemer y col., 2012b).

4.2.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2012). Las relaciones entre las diferentes variables medidas se evaluaron mediante coeficientes de correlación de Pearson, y cuando fue necesario determinar el grado de vinculación entre variables se realizaron regresiones lineales entre ellas.

4.3 Resultados

4.3.1 Análisis de correlación entre los valores de GRSP y la comunidad de esporas de HMA

Con el fin, de analizar la relación entre la glomalina y la comunidad de HMA en los diferentes ambientes estudiados, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson entre las diferentes fracciones de glomalina extraídas, GRSP-FE y GRSP-Total, expresadas en mg de GRSP reactivas con BCA por g de suelo seco; y la densidad de esporas de HMA expresada en número de esporas en 100 g de suelo seco. Se analizaron las correlaciones con la densidad de esporas totales y con las diferentes familias encontradas de HMA en dichos suelos (Figura 4.1).

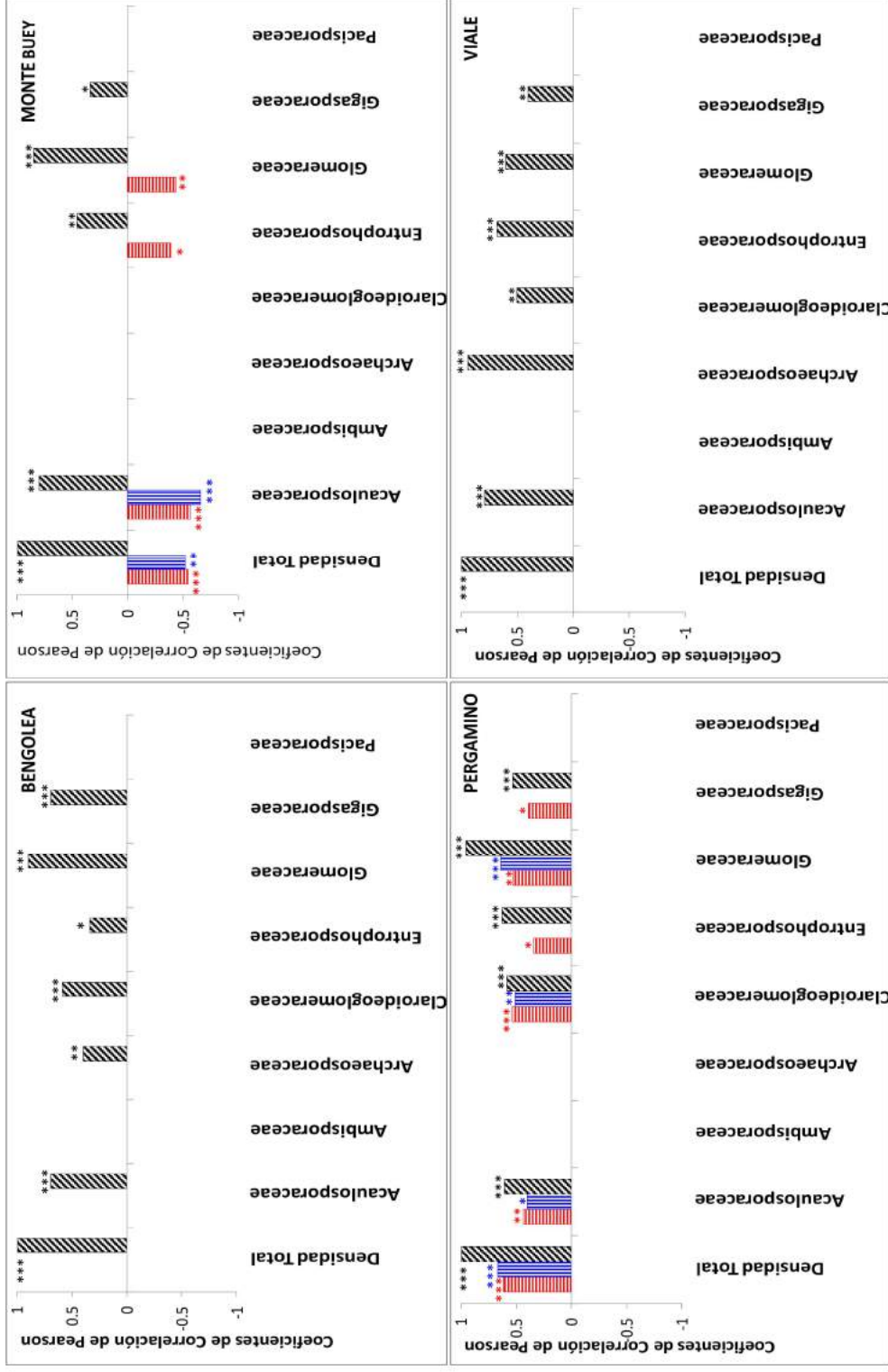


Figura 4.1: Análisis de correlación de Pearson en los cuatro ambientes estudiados, de la densidad total de esporas de HMA y de la densidad de esporas de las diferentes familias de HMA encontradas, con: la densidad total de esporas, la fracción fácilmente extraíble de glomalina (GRSP-FE), y la fracción total de glomalina (GRSP-Total). Los asteriscos sobre las columnas representan los p-valores significativos: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. Cuando los p-valores no fueron significativos (p>0.05) la correlación se consideró nula.

Se observó que la relación entre las fracciones de glomalina y la comunidad de HMA presentó resultados diferentes en los diferentes sitios. En Bengolea y Viale, donde los valores de GRSP no funcionaron como indicadores de manejo de los suelos, no se observó correlación de la densidad de esporas con las fracciones de glomalina. En estos dos sitios la comunidad de micorrizas estuvo representada por las familias: *Acaulosporaceae*, *Archaeosporaceae*, *Claroideoglomeraceae*, *Entrophosporaceae*, *Gigasporaceae* y *Glomeraceae*, que presentaron correlación positiva con la densidad total de esporas. En Pergamino y Monte Buey, donde los valores de GRSP si funcionaron como indicadores de manejo de los suelos, si hubo correlación aunque con grandes diferencias entre ambos sitios. Mientras que en Pergamino la correlación fue positiva (a mayor cantidad de esporas de HMA mayor cantidad de GRSP) en Monte Buey la correlación fue negativa. A su vez, analizando las diferentes familias encontradas se observó que en Pergamino hubo correlación de la densidad total de esporas con las familias: *Acaulosporaceae*, *Claroideoglomeraceae*, *Glomeraceae*, *Entrophosporaceae* y *Gigasporaceae*; y entre éstas, las tres primeras mostraron correlación con las dos fracciones de glomalina y las dos últimas solo con la fracción GRSP-FE. En Monte Buey, las familias predominantes fueron: *Acaulosporaceae*, que mostró correlación con las dos fracciones de glomalina; *Glomeraceae* y *Entrophosporaceae*, mostraron correlación solo con la fracción fácilmente extraíble; y *Gigasporaceae* no mostró correlación. Es importante remarcar en este momento que en los suelos de Monte Buey, en particular en los ambientes naturales se encontraron valores particular e inusualmente elevados de fosforo extraíble (Duval y col., 2013).

4.3.2 Análisis de correlación entre los valores de GRSP y los ácidos grasos neutros y fosfolípidos

Se determinaron las correlaciones de Pearson entre las fracciones de glomalina expresadas en mg de GRSP reactivas con BCA por g de suelo seco; y los ácidos grasos de las fracciones de lípidos neutros (NLFA) (Figura 4.2) y de fosfolípidos (PLFA) (Figura 4.3), expresados en nmol de ácidos grasos por g de suelo seco, tanto totales como clasificados en nueve grupos químicos. Para los NLFA (Figura 4.2), se observó que mientras en Bengolea y Viale no hubo correlación con las fracciones de glomalina, en Pergamino y Monte Buey si hubo una correlación positiva. Para los PLFA (Figura 4.3), la tendencia fue diferente observándose solo en Pergamino correlación positiva entre los ácidos grasos y la glomalina, mientras que en los otros sitios no hubo correlación. A su vez, tanto para los NLFA como para los PLFA, en los cuatro sitios se observó similitud en el patrón de correlación entre los ácidos grasos totales y los diferentes grupos químicos encontrados, lo cual permite inferir que los perfiles de NLFA y PLFA son coherentes con su estructura.

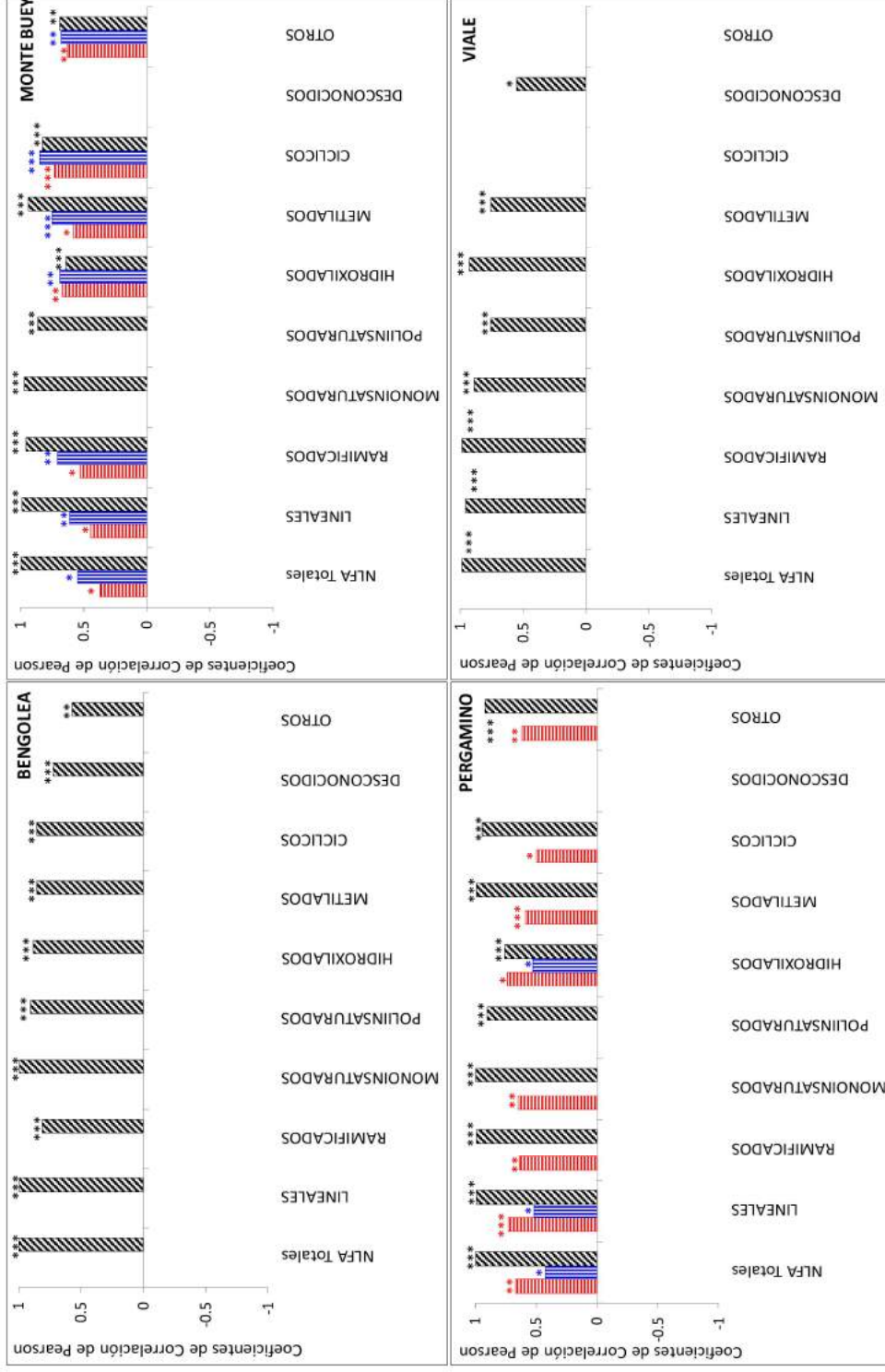


Figura 4.2: Análisis de correlación de Pearson en los cuatro ambientes estudiados, de la concentración de NLFA, total y clasificada en nueve grupos químicos, con: ▨ la concentración total de NLFA, ■ la fracción fácilmente extraíble de glomulina (GRSP-FE), y ■ la fracción total de glomulina (GRSP-Total). Los asteriscos sobre las columnas representan los p-valores significativos: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. Cuando los p-valores fueron no significativos (p>0.05) la correlación se consideró nula.

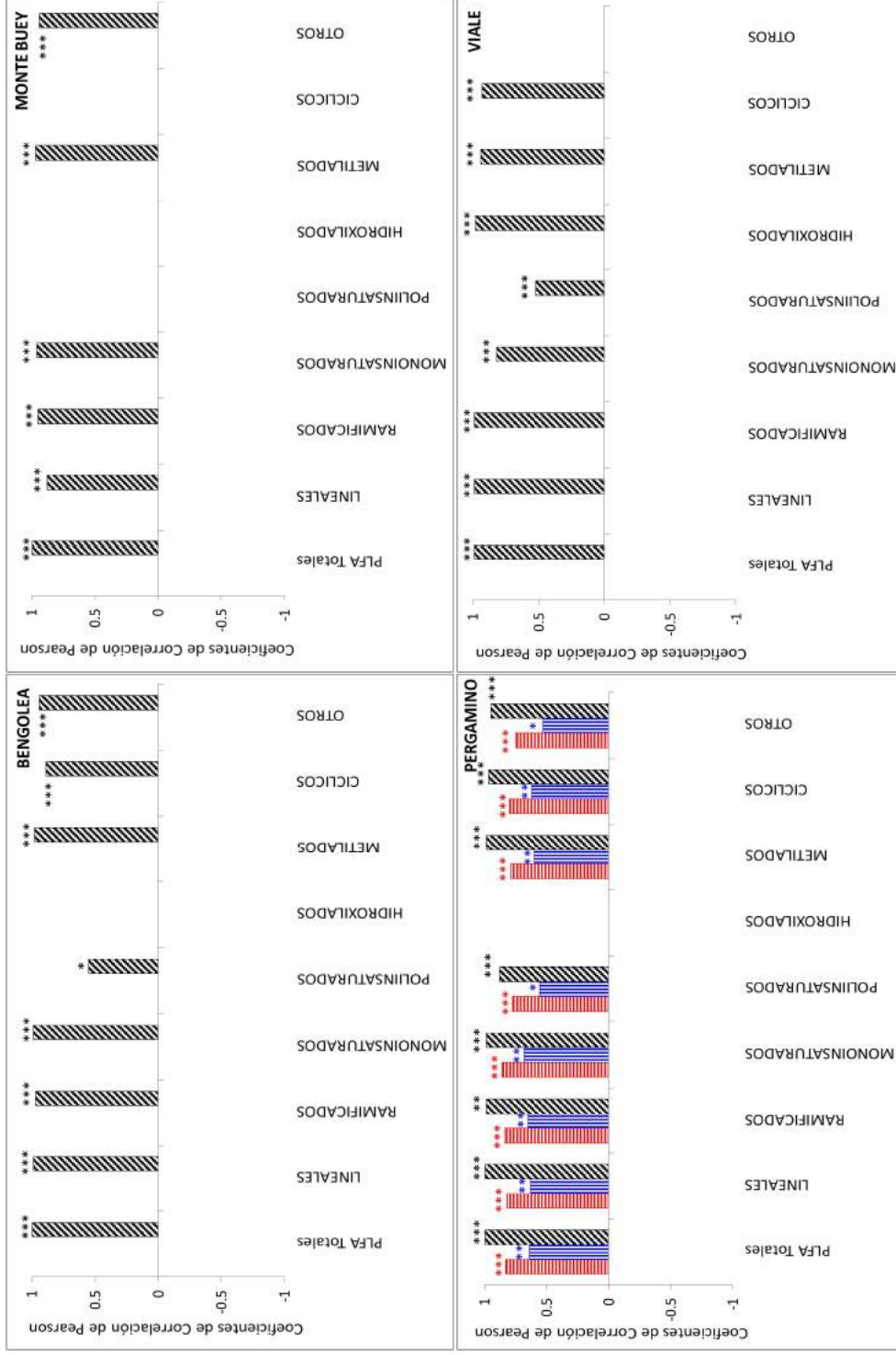


Figura 4.3: Análisis de correlación de Pearson en los cuatro ambientes estudiados, de la concentración de PLFA, total y clasificada en nueve grupos químicos, con: ▨ la concentración total de PLFA, ▨ la fracción fácilmente extraíble de glomalina (GRSP-FE), y ▨ la fracción total de glomalina (GRSP-Total). Los asteriscos sobre las columnas representan los p-valores significativos: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. Cuando los p-valores fueron no significativos (p>0.05) la correlación se consideró nula.

Por otro lado, se analizó la relación de las fracciones de glomalina con el ácido graso individual 16:1w5c de las fracciones de los NLFA y los PLFA (Tabla 4.1). El ácido graso 16:1w5c es considerado en forma consensuada por la comunidad científica como marcador de hongos micorrícicos arbusculares (Olsson, 1999; Larsen y Bødker, 2001; Grigera y col., 2007), y según la nomenclatura este ácido graso es un isómero *cis* (c) que contiene 16 átomos de carbono y es monoinsaturado en la posición 5 (w5). Al analizar las correlaciones de Pearson, se observó que en Bengolea, Monte Buey y Viale ninguna de las dos fracciones de glomalina extraídas se correlacionaron con el ácido graso marcador de HMA. Pergamino se diferenció de estos sitios ya que mostró correlación positiva del ácido graso marcador de HMA con las dos fracciones de glomalina, GRSP-FE y GRSP-Total. A su vez, en todos los sitios el ácido graso 16:1w5c mostró igual tendencia tanto en los NLFA como en los PLFA y evidenció una alta correlación con los ácidos grasos totales.

		16:1 w5c - NLFA	16:1 w5c - PLFA
Bengolea	GRSP-FE		
	GRSP-Total		
	Ácidos grasos totales	0.86***	0.97***
Monte Buey	GRSP-FE		
	GRSP-Total		
	Ácidos grasos totales	0.78***	0.81***
Pergamino	GRSP-FE	0.73***	0.91***
	GRSP-Total	0.56*	0.76***
	Ácidos grasos totales	0.94***	0.97***
Viale	GRSP-FE		
	GRSP-Total		
	Ácidos grasos totales	0.76***	0.96***

Tabla 4.1: Análisis de correlación de Pearson en los cuatro ambientes estudiados entre las fracciones de glomalina (GRSP-FE y GRSP-Total) y el ácido graso marcador de HMA (16:1w5c). Los asteriscos representan los p-valores significativos: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. Cuando los p-valores fueron no significativos (p > 0.05) la correlación se consideró nula (espacios libres).

4.3.3 Análisis de correlación entre los valores de GRSP, la comunidad de esporas de HMA, el fósforo extraíble y la actividad fosfatasa

Dado que en el ciclo del fósforo en el suelo éste se relaciona con los HMA y con la actividad de fosfatasa, y que el paradigma establecido para la glomalina plantea su relación con los HMA, se analizaron las relaciones de las fracciones de glomalina expresadas en mg de GRSP reactivas con BCA por g de suelo seco y la densidad de esporas de HMA expresada en número de esporas en 100 g de suelo seco, con los valores del fósforo extraíble (Pe) expresado en ppm y la V_{MAX} que caracteriza a la actividad fosfatasa expresada en mmol MUB/g suelo seco.min (Tabla 4.2).

		Pe	V_{MAX}
Bengolea	GRSP-FE		0.44**
	GRSP-Total		
	Densidad de esporas		
	V_{MAX}		1***
Monte Buey	GRSP-FE	0.87***	0.51**
	GRSP-Total	0.77***	
	Densidad de esporas	-0.57***	-0.38*
	V_{MAX}	0.62***	1***
Pergamino	GRSP-FE		0.65***
	GRSP-Total		
	Densidad de esporas		
	V_{MAX}		1***
Viale	GRSP-FE		
	GRSP-Total		
	Densidad de esporas		
	V_{MAX}		1***

Tabla 4.2: Análisis de correlación de Pearson en los cuatro ambientes estudiados entre las fracciones de glomalina (GRSP-FE y GRSP-Total), la densidad de esporas de HMA, el fósforo extraíble (Pe) y la V_{MAX} que caracteriza la actividad fosfatasa. Los asteriscos representan los p-valores significativos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Cuando los p-valores fueron no significativos ($p > 0.05$) la correlación se consideró nula (espacios libres).

Se observó que en Bengolea, Pergamino y Viale ni las fracciones de glomalina ni la densidad de esporas se correlacionaron con el Pe, mientras que en Monte Buey si hubo correlación, las dos fracciones de glomalina se correlacionaron positivamente mientras que la correlación con la densidad de esporas fue negativa. A su vez, en Monte Buey el Pe tuvo una correlación positiva con la V_{MAX} de la actividad fosfatasa mientras que en los otros sitios no se observó correlación. Otro dato de interés es que la V_{MAX} se correlacionó

con la fracción fácilmente extraíble de glomalina excepto en Viale, y también en Monte Buey la V_{MAX} mostró una correlación negativa con la densidad de esporas.

4.3.4 Análisis de correlación entre los valores de GRSP y los de carbono orgánico, nitrógeno total y carbohidratos del suelo.

La Figura 4.4 muestra, en los diferentes ambientes estudiados, las correlaciones de Pearson entre las fracciones de glomalina, el carbono orgánico total del suelo (COT), las fracciones del COT: carbono orgánico particulado grueso (COPg), carbono orgánico particulado fino (COPf) y carbono orgánico mineral (COM), el nitrógeno total (Nt) y carbohidratos, solubles (CHs) y totales (CHt). Las fracciones GRSP-FE y GRSP-Total expresadas en mg de GRSP reactivas con BCA por g de suelo seco, tanto el COT y sus fracciones como el Nt expresados como porcentaje de peso seco, y los CHs y CHt expresados en kg/ha.

Se observó que en los cuatro ambientes la glomalina, tanto total como fácilmente extraíble, se correlacionó positivamente con el COT y con el Nt, sin embargo en Viale se observaron correlaciones solo con la fracción total de glomalina. A su vez, entre el COT y el Nt hubo una alta correlación positiva. Al analizar las diferentes fracciones de COT (COPg, COPf, COM) se observaron diferencias en el patrón de correlación entre los sitios. En Monte Buey y Pergamino las diferentes fracciones de COT mostraron correlación positiva con las dos fracciones de glomalina; en Viale también se observó este patrón de correlación pero solo con la fracción GRSP-Total. A su vez, las diferentes fracciones mostraron correlación positiva con el COT. En Bengolea las fracciones de glomalina se correlacionaron positivamente con la fracción mineral (COM), y el COT tuvo una correlación positiva con las fracciones COPg y COM. Por otro lado, la correlación de las fracciones de glomalina con los carbohidratos también mostró diferentes patrones entre los sitios. En Monte Buey y Pergamino se observó una alta correlación positiva, tanto de los CHt como los CHs, con las dos fracciones de glomalina. En Viale solo los CHs mostraron correlación positiva con la fracción GRSP-Total; y en Bengolea no se observó correlación alguna. A su vez, solo en Pergamino y Viale los CHs tuvieron una correlación positiva con el COT.

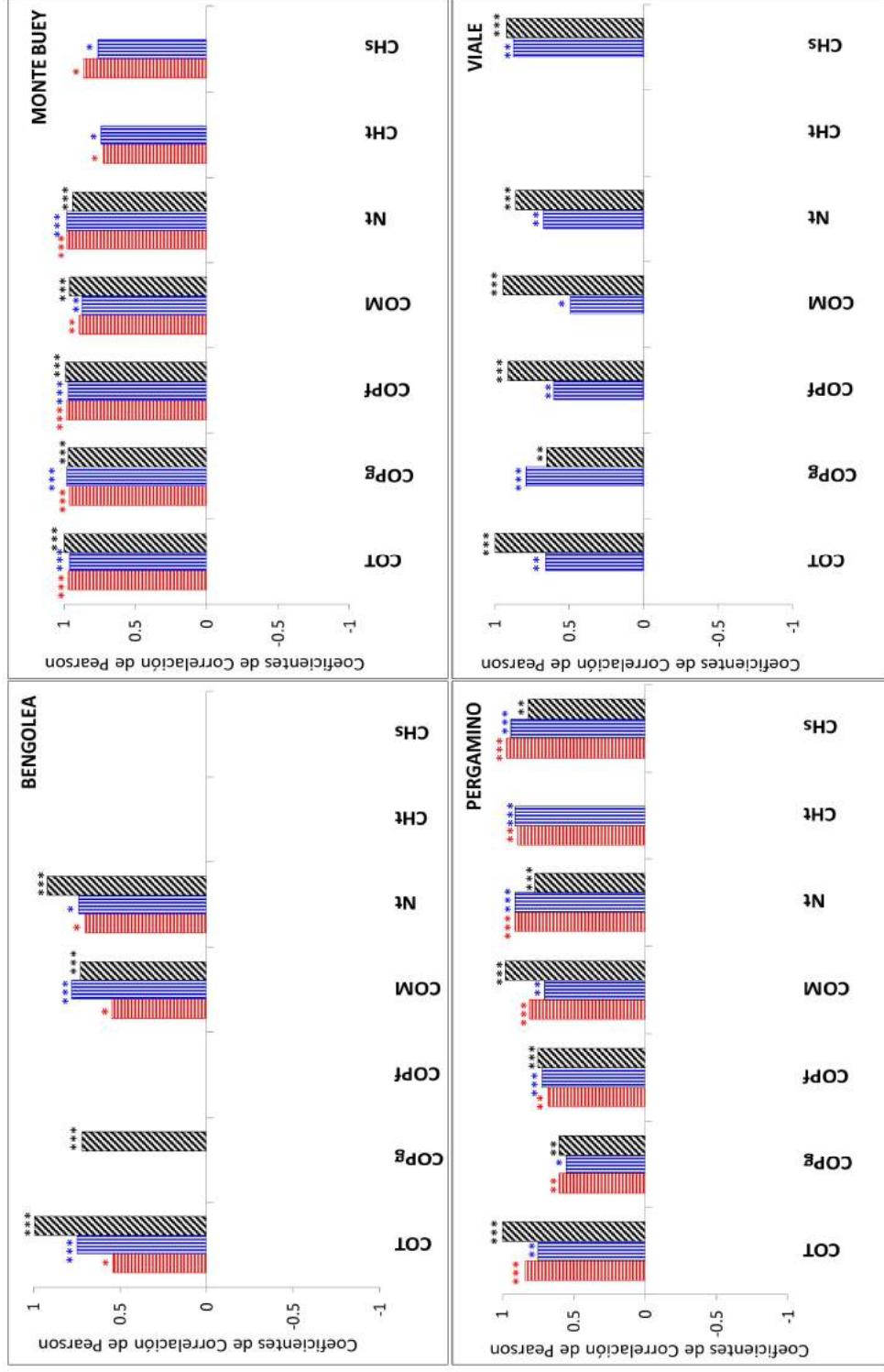


Figura 4.4: Análisis de correlación de Pearson en los cuatro ambientes estudiados, del COT y sus fracciones: COPg, COPf, COM, del Nt y de los CHs y CHT con: la fracción fácilmente extraíble de glomalina (GRSP-FE), la fracción total de glomalina (GRSP-Total). Los asteriscos sobre las columnas representan los p-valores significativos: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. Cuando los p-valores fueron no significativos (p>0.05) la correlación se consideró nula.

4.3.5 Análisis de correlación entre los valores de GRSP y la estabilidad estructural de los agregados

Buscando ver si nuestros datos de GRSP determinados por un nuevo método colorimétrico siguen cumpliendo uno de los preceptos más importantes del paradigma de la glomalina, como lo es su relación con la estabilidad de agregados de los suelos (Wright y Upadhyaya, 1998), se analizó la relación de las fracciones de glomalina expresadas en mg de GRSP reactivas con BCA por g de suelo seco y la estabilidad estructural de los agregados expresada como el diámetro promedio ponderado en mm. Se observó que los coeficientes de correlación de Pearson entre el índice de estabilidad estructural de los agregados determinado por el método de Le Bissonnais (DPM-LB) y las fracciones de glomalina mostraron una relación positiva (GRSP-FE: 0.30, $p=0.016$; GRSP-Total: 0.38, $p=0.0022$). Con el fin de estudiar más profundamente esta relación se realizaron regresiones lineales simples entre el índice de estabilidad y las fracciones de glomalina, y se observó que si bien los modelos de regresión lineal fueron aceptados (GRSP-FE: $p=0.016$; GRSP-Total: $p=0.02$) la proporción de la variación total explicada por el modelo fue muy baja (GRSP-FE: $R^2=0.09$; GRSP-Total: $R^2=0.14$). Entonces, se estableció la relación de la estabilidad de los agregados y el \log_{10} de las fracciones de glomalina. En este caso, los coeficientes de correlación de Pearson también mostraron una relación positiva (\log_{10} GRSP-FE: 0.32, $p=0.0104$; \log_{10} GRSP-Total: 0.41, $p=0.001$). En las regresiones lineales simples entre el índice de estabilidad de agregados y el \log_{10} de las fracciones de glomalina (Figura 4.5), ahora se observó que los modelos de regresión lineal fueron aceptados (GRSP-FE: $p<0.0001$; GRSP-Total: $p<0.0001$) y la proporción de la variación total explicada por el modelo fue alta (GRSP-FE: $R^2=0.87$; GRSP-Total: $R^2=0.88$). En estas regresiones lineales, las tendencias establecidas, tanto con la fracción de glomalina fácilmente extraíble como con la total, fueron rectas con ordenada al origen cero, ya que los p-valores de éste estadístico determinaron que son cero (GRSP-FE: $p=0.8505$; GRSP-Total: $p=0.2813$).

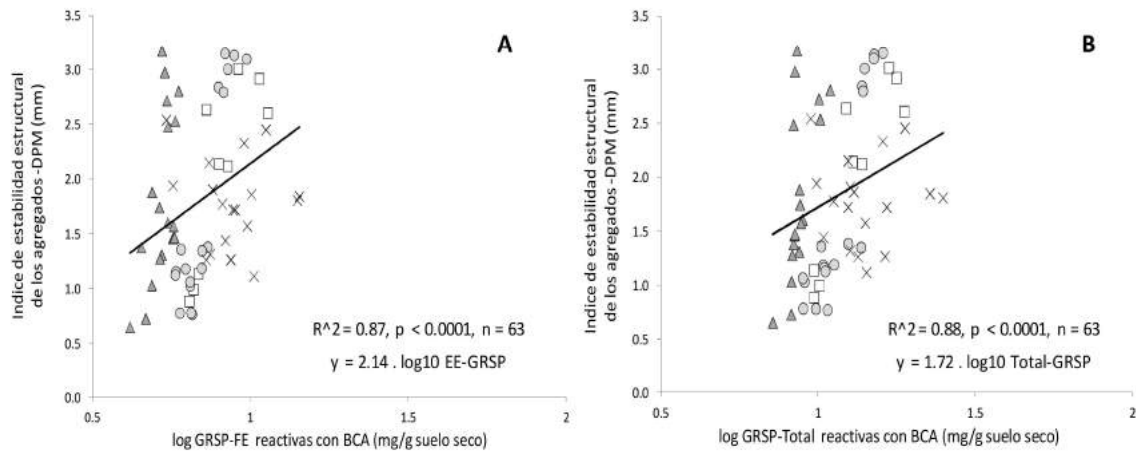


Figura 4.5: Relación entre: **(A)** DPM-LB y log10 GRSP-FE y **(B)** DPM-LB y log10 GRSP-Total, desde las muestras de: Δ Bengolea, \square Monte Buey, \circ Pergamino y \times Viale. Inserto en los gráficos se muestran las ecuaciones de las rectas establecidas, los valores de R^2 , los p-valores de las pendientes y el número de datos (n).

También se analizó la relación entre las fracciones de glomalina y la estabilidad estructural de los agregados en los sitios por separado, con el fin de establecer si existía alguna diferencia entre los diferentes sitios (Tabla 4.3), como las encontradas con los parámetros anteriormente analizados. Se observó que en Bengolea, Monte Buey y Pergamino las dos fracciones de glomalina se correlacionaron con el índice de estabilidad (DPM-LB), mientras que en Viale no hubo correlación.

		DPM-LB
Bengolea	GRSP-FE	0.57*
	GRSP-Total	0.62**
Monte Buey	GRSP-FE	0.80**
	GRSP-Total	0.90**
Pergamino	GRSP-FE	0.90***
	GRSP-Total	0.89***
Viale	GRSP-FE	
	GRSP-Total	

Tabla 4.3: Análisis de correlación de Pearson en los cuatro ambientes estudiados entre el \log_{10} de las fracciones de glomalina (GRSP-FE y GRSP-Total) y el DPM que caracteriza a la estabilidad estructural de los agregados determinado el método de Le Bissonnais. Los asteriscos representan los p-valores significativos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Cuando los p-valores fueron no significativos ($p > 0.05$) la correlación se consideró nula (espacios libres). sd: sin determinar.

4.4 Discusión

El análisis de la relación entre la glomalina y diferentes variables químicas, físicas, bioquímicas y biológicas que caracterizan los suelos, realizado en este capítulo, corroboran sensiblemente la conclusión alcanzada en el capítulo anterior que las propiedades inherentes del suelo tienen una gran influencia en los niveles de glomalina y en su valor como un indicador de calidad de suelo que pueda discriminar entre diferentes prácticas agrícolas.

La glomalina es una proteína producida en las paredes celulares de las hifas en crecimiento activo de los hongos micorrícicos arbusculares, que puede permanecer en el suelo por su alto valor de recambio aún una vez que las hifas han muerto y se han degradado (Wright y col., 1996; Wright y Upadhyaya, 1996), y por esta razón nos planteamos analizar la **relación entre las fracciones de glomalina y la comunidad de esporas de HMA presentes en los suelos en estudio**. En el análisis de la comunidad de esporas de los HMA en los ambientes estudiados se identificaron 46 morfoespecies en base a caracteres morfológicos distribuidas en 8 familias. La densidad de esporas disminuyó en el siguiente orden AN > BPA > PANS en todos los sitios, excepto en Monte Buey que mostró un patrón inverso (PANS \geq BPA > AN) y menores valores absolutos. En cuanto a la diversidad de los HMA, Bengolea fue el sitio con mayor diversidad en donde el AN fue el más diverso, mientras que en Monte Buey, Pergamino y Viale los suelos manejados (BPA y PANS) presentaron igual diversidad que los ambientes naturales (Cofré, 2014).

Se ha reportado que los niveles de glomalina no siempre están correlacionados con la abundancia y diversidad de los HMA en el suelo (Lovelock y col., 2004b), y diferentes factores pueden ser responsables de esta falta de correlación. Por un lado, se debe tener en cuenta qué variables se utilizan para analizar la comunidad de micorrizas, como por ejemplo la identificación de esporas, la longitud de las hifas, la colonización de la raíz o el potencial de inoculo; ya que todas estas variables tienen limitaciones y pueden representar dinámicas diferentes de la comunidad de micorrizas que no necesariamente se relacionen con la dinámica de la glomalina en el suelo (Millner y Wright, 2002; Purin y

Rillig, 2007). Por otro lado, se ha observado que diferentes especies de HMA pueden variar en el grado de producción de glomalina dando como resultado diferentes niveles de glomalina. Se registró que *Gigaspora rosea* y *Gigaspora gigantea* tendían a mostrar mayores niveles de glomalina que *Glomus intraradices* y *Glomus etunicatum* (Wright y col., 1996; Wright y Upadhyaya, 1999), y que *Acaulospora morrowiae* produjo niveles relativamente más altos en comparación con *Gigaspora rosea*, *Glomus etunicatum*, y *Glomus intraradices* (Lovelock y col., 2004b); esto sugiere que las especies *Glomus* parecen asignar menos recursos a la producción de glomalina que *Gigaspora* y *Acaulospora* (Treseder y Turner, 2007). Nuestros resultados (Sección 4.3.1 - Figura 4.1) indican que la relación entre las fracciones de glomalina y la comunidad de esporas de HMA presenta diferencias en los diferentes sitios estudiados. En los sitios en los cuales los niveles de glomalina no diferencian las prácticas agrícolas estudiadas (Bengolea y Viale) no se observa correlación entre las fracciones de glomalina y la densidad de esporas, lo que podría sugerir que en estos suelos la glomalina y la comunidad de micorrizas presentan dinámicas diferentes no relacionadas. Mientras que en los sitios en los cuales los niveles de glomalina manifiestan las diferencias entre prácticas (Pergamino y Monte Buey) si hay correlación, sugiriendo una dinámica relacionada entre estas variables en estos suelos. A su vez, en Pergamino y Monte Buey se observan diferentes patrones de correlación en función de las diferentes familias, lo que podría manifestar diferencias de la producción de glomalina en las diferentes familias de HMA encontradas y una dinámica de las comunidades de HMA moduladas por los niveles de P del suelo. Es remarcable también que encontramos correlación de nuestros valores de GRSP con aquellas familias en las cuales fueron reportadas las mayores producciones de glomalina como las Familias *Acaulosporaceae*, *Gigasporaceae* y *Glomeraceae*, a lo que podemos sumar como contribuyente a la fracción de GRSP a los HMA de las Familias *Claroideoglomeraceae*, *Entrophosporaceae*.

Por otro lado, se analizó la **relación entre las fracciones de glomalina y los ácidos grasos neutros (NLFA) y fosfolípidos (PLFA)**. Esta relación resulta importante dado que se ha observado, a través del análisis químico de las fracciones de GRSP extraídas, que con

los protocolos comúnmente usados para extraer glomalina se co-extraen materiales no-proteicos principalmente lípidos y ácidos grasos (Gillespie y col., 2011). A su vez, se debe tener en cuenta que el análisis de ácidos grasos en el suelo se ha usado comúnmente para caracterizar la ecología microbiana del suelo y además puede abrir nuevas oportunidades de estudios sistemáticos en relación con la caracterización bioquímica de los ecosistemas del suelo (Ferrari y col., 2015). El análisis de las fracciones lipídicas en los ambientes estudiados fue lo suficientemente sensible para diferenciar prácticas agrícolas, encontrándose diferencias en las concentraciones de ácidos grasos del suelo y en los perfiles tanto de los PLFA como de los NLFA (estos han sido ignorados en la mayoría de los estudios de suelos) (Ferrari y col., 2015). Los PLFA, debido a su alta rotación como biomoléculas, podrían proporcionar información acerca de la comunidad microbiana activa del suelo (Tunlid y White, 1992); mientras que los NLFA, que consisten principalmente en sustancias de reserva de energía en los organismos vivos (Larsen y Bodker, 2001), proporcionarían información sobre el estado fisiológico de la biota del suelo. Nuestros resultados (Sección 4.3.2 - Figura 4.2 y Figura 4.3) muestran diferencias en los patrones de relación entre las fracciones de glomalina (GRSP-FE y GRSP-Total) y las fracciones de ácidos grasos (NLFA y PLFA); y estas diferencias se manifiestan claramente al analizar particularmente los grupos químicos de ácidos grasos encontrados. En los suelos en los cuales las fracciones de glomalina mostraron correlaciones positivas con la fracción de NLFA (Monte Buey y Pergamino), los niveles de glomalina permiten diferenciar entre BPA y PANS. Mientras que en los suelos donde no hubo correlación (Bengolea y Viale) los niveles de glomalina no diferencian las prácticas agrícolas. Para los PLFA, solo en el ambiente de Pergamino se observaron correlaciones positivas, mientras que en los otros ambientes no hubo correlación. Por lo tanto, la tendencia de diferenciación en función de la glomalina como indicador de diferentes prácticas agrícolas se manifiesta más rotundamente en el perfil de los NLFA (que representan los lípidos de reserva del suelo) que en el perfil de los PLFA (que se relacionan con las membranas de la comunidad microbiana activa del suelo), y esto podría estar relacionado con las características de

hidrofobicidad asignada a la glomalina (Wright y col., 1996; Wright y Upadhyaya, 1996; Wright y Upadhyaya, 1998).

La hidrofobicidad del suelo se origina por la acumulación de compuestos orgánicos hidrofóbicos como la glomalina, y analizando la relación de las fracciones de glomalina con la hidrofobicidad a través de coeficientes de correlación de Pearson, se observa que los niveles de glomalina se correlacionan positivamente con la hidrofobicidad (EE-GRSP: 0.57, $p=0.0003$; Total-GRSP: 0.58, $p<0.0003$). Es decir, cuanto mayor es la concentración de glomalina mayor es la hidrofobicidad, y entonces posiblemente la glomalina influye en la hidrofobicidad del suelo y por lo tanto podría relacionarse con los ácidos grasos neutros.

Dentro de los ácidos grasos, se analizó la **relación entre las fracciones de glomalina y el ácido graso marcador de hongos micorrícicos arbusculares, 16:1w5c, tanto en la fracción de los NLFA** (donde se atribuye la presencia de este ácido graso a las esporas) **como en la de los PLFA** (donde se atribuye la presencia de este ácido graso a las hifas). En los ambientes estudiados, el ácido graso 16:1w5c disminuyó regularmente en la dirección AN > BPA > PANS en el perfil de los PLFA, mientras que no se encontraron diferencias entre BPA y PANS en el perfil de los NLFA (Ferrari y col., 2015). Nuestros resultados (Sección 4.3.2 - Tabla 4.1) no muestran diferencias entre los patrones de relación de la glomalina y el ácido graso 16:1w5c, en los perfiles de los NLFA y de los PLFA. En ambos casos, se observan correlaciones positivas con la glomalina solo en el ambiente de Pergamino, mientras que en los otros ambientes no hay correlación.

Lo observado en relación al ácido graso marcador de micorrizas se muestra en concordancia con el análisis de la comunidad de esporas de HMA, presentando entre los sitios en los cuales los niveles de glomalina diferencian prácticas agrícolas el caso particular de Monte Buey. En Monte Buey, la densidad de esporas de HMA se correlaciona negativamente con las fracciones de glomalina (se encuentran mayores niveles de glomalina cuanto menor es la cantidad de esporas de HMA), y el marcador 16:1w5c no muestra correlación (ya que los p-valores son no significativos). Para comprender esta observación es importante considerar que en Monte Buey, las concentraciones de fósforo en el suelo, en el AN y las BPA, fueron notablemente más altas que en cualquier otro sitio.

Para el AN se registraron concentraciones de fósforo extraíble mayores entre 73% y 80% y para las BPA entre 30% y 40% (Duval y Galantini, 2010). A su vez, en este sitio se observaron los valores más bajos de densidad de esporas y riqueza de especies y un patrón inverso en relación a las prácticas agrícolas; esto apoyaría la idea de que el fósforo disponible en el suelo se relaciona negativamente con los HMA (Cofré, 2014), de acuerdo a la dinámica funcional atribuida a las simbiosis micorrícicas (Smith y Read, 2008).

Con el fin de profundizar el entendimiento de la influencia de la disponibilidad de fósforo sobre los niveles de glomalina en el suelo, se analizó la **relación entre las fracciones de glomalina, la comunidad de esporas de hongos micorrízicos arbusculares, el fósforo extraíble y la V_{MAX} que caracteriza a la actividad fosfatasa**. El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de la plantas. La mayor parte del fósforo total no se encuentra directamente disponible para los cultivos sino que está en un equilibrio dinámico entre las formas orgánicas e inorgánicas que depende del ambiente y del manejo agrícola. Las formas lábiles que se encuentran disponibles en el corto y mediano plazo para las plantas y los microorganismos del suelo están representadas por el fósforo extraíble (Pe) (Suñer y Galantini, 2014). Los niveles de Pe en los ambientes estudiados muestran diferentes tendencias. En Monte Buey se detectaron marcadas diferencias entre las prácticas agrícolas, los valores disminuyen en el siguiente orden AN >> BPA >> PANS. En Bengolea y Pergamino los niveles de Pe fueron similares entre las distintas prácticas; y en Viale el AN presentó menores niveles que las BPA y las PANS, con una fuerte estratificación en superficie en estas dos últimas (Duval y Galantini, 2010). Por otro lado, las fosfatasas ácidas son enzimas de tipo hidrolasas que tienen una gran importancia en ciclo del fósforo ya que hidrolizan ésteres de fosfato, es decir participan en la mineralización del fósforo orgánico. Las hidrolasas controlan la tasa de degradación de los sustratos haciéndolos disponibles para plantas y microorganismos. Por lo tanto, esta clase de enzimas pueden ser utilizadas como indicadores de la calidad del suelo. En todos ambientes estudiados, al comparar las prácticas agrícolas la V_{MAX} de la actividad fosfatasa (que es un parámetro que da información de la cantidad de enzima), presenta un valor más alto en las BPA que en las PANS. Sin embargo, observando los valores para los

diferentes sitios ordenados de oeste a este, se observa un pequeño gradiente ascendente para las V_{MAX} de las prácticas agrícolas, y esta variación geográfica posiblemente sugiere que los valores de actividades enzimáticas podrían estar influenciados por la textura de los suelos (Gabbarini y col., 2012).

La disponibilidad de fósforo en el suelo debería tener un efecto contrario en los niveles de glomalina, ya que cuanto mayor es el contenido de fósforo en el suelo el crecimiento de las plantas no se ve limitado por este nutriente esencial, y para las plantas es menos costoso tomar directamente el fósforo del suelo que desarrollar la simbiosis con los HMA productores de glomalina (Smith y Read, 2008). Sin embargo, se han reportado efectos contradictorios de la disponibilidad de fósforo sobre los niveles de glomalina. Lovelock y col. (2004a) observaron que las concentraciones de fósforo en el suelo se asociaban negativamente con los niveles de glomalina, mientras que Nichols y Wright (2005) no encontraron correlación entre el contenido de fósforo y los niveles de glomalina en el suelo. Nuestros resultados (Sección 4.3.3 - Tabla 4.2) indican que en Monte Buey, donde las concentraciones de Pe son marcadamente más altas que en los otros sitios, un aumento de Pe se traduce en un aumento de la actividad fosfatasa y una disminución de la densidad de esporas de los HMA. Sin embargo, los niveles de glomalina también aumentan con el Pe marcando una contradicción al modelo que considera al fósforo como un nutriente limitante del desarrollo de HMA, ya que las concentraciones de fósforo en el suelo se relacionan positivamente con los niveles de glomalina. En Bengolea, Pergamino y Viale ni las fracciones de glomalina ni la densidad de esporas ni la actividad fosfatasa se ven influenciadas por el Pe. A su vez, se analizó la correlación del ácido graso marcador de micorrizas, *16:1w5c*, con el Pe y la V_{MAX} de la actividad fosfatasa, y en ninguno de los sitios se observó correlación (datos no mostrados).

Otro nutriente inorgánico importante es el nitrógeno. Si bien existe una creciente evidencia de que los HMA están implicados en la absorción y transferencia de nitrógeno inorgánico a la planta, no está claro si este proceso mejora la nutrición nitrogenada de la planta a partir del valor de N disponible en el suelo o simplemente facilita su absorción sin superar las limitaciones que los niveles de N disponible marcan sobre el desarrollo de la

planta (Smith y Read, 2008). Sin embargo, si se ha observado que la disponibilidad de nitrógeno tiene efectos beneficiosos para el desarrollo de HMA, y por lo tanto es posible esperar un efecto acorde sobre los niveles de glomalina. Se han reportado efectos contradictorios de la disponibilidad de nitrógeno sobre los niveles de glomalina. Knorr y col. (2003) asociaron positivamente la glomalina con reservas de nitratos y amonio en el suelo, mientras que Nichols y Wright (2005) no encontraron correlación. A su vez, las contradicciones observadas en la influencia de la disponibilidad de los nutrientes del suelo sobre los niveles de glomalina, tanto del fósforo como del nitrógeno, podrían estar relacionadas con efectos diferenciales de estos nutrientes sobre la producción y descomposición de glomalina (Treseder y Turner, 2007). Al analizar la **relación entre la glomalina y el nitrógeno total (Nt)** (Sección 4.3.4 - Figura 4.4) se observa que en los cuatro ambientes estudiados el nitrógeno total se relaciona positivamente con la glomalina, y éste, a su vez, presenta una alta relación positiva con el carbono orgánico del suelo. Se debe destacar que las reservas de nitrógeno se han encontrado muy asociadas a los niveles de carbono orgánico, reportándose que toda pérdida de carbono orgánico en el suelo genera una pérdida proporcional de nitrógeno (Nannipieri y Eldor, 2009).

Los niveles de glomalina en el suelo se han encontrado muy a menudo estrechamente relacionados con las concentraciones de carbono orgánico en el suelo (COT), reportándose correlaciones positivas entre estas fracciones en diferentes ambientes (Bird y col., 2002; Rillig y col., 2003; Nichols y Wright, 2005;). Si bien, en general el contenido de COT se considera el predictor más consistente de los niveles de glomalina, las razones de esta relación no son obvias. Por ejemplo, la glomalina podría reducir la descomposición de materia orgánica favoreciendo la formación de agregados y generando una protección física de la actividad enzimática (Rillig, 2004a; Wright y Upadhyaya, 1998). Otra posibilidad es que los organismos descomponedores podrían preferir otros compuestos orgánicos antes que la glomalina, y así la descomposición de la glomalina se reduciría cuando aumenta el contenido de COT. A su vez, en suelos con alto contenido de COT, en los cuales los nutrientes inorgánicos están menos disponibles, las plantas podrían favorecer el desarrollo de HMA (Treseder y Turner, 2007). Al analizar la **relación entre las**

fracciones de glomalina y el COT (Sección 4.3.4 - Figura 4.4), nuestros resultados muestran que en los cuatro ambientes el COT se relaciona positivamente con la glomalina. A su vez, en el análisis de las fracciones orgánicas como indicador de calidad del suelo en los sitios estudiados, Duval y col. (2013) observaron que el contenido de COT estaba fuertemente influenciado por el contenido de arcilla y limo en el suelo, encontrándose la fracción más abundante relacionada con el mayor contenido de arcilla (Viale); de igual manera que nuestras observaciones del contenido de glomalina (Capítulo 3).

Al analizar los patrones de **relación de la glomalina con las diferentes fracciones de COT (COPg, COPf, COM)** (Sección 4.3.4 - Figura 4.4), se observaron diferencias entre los sitios. En Monte Buey y Pergamino, en donde los niveles de glomalina diferencian las prácticas agrícolas y tienen suelos franco limosos, las fracciones de glomalina se relacionan positivamente con las diferentes fracciones de COT, y a su vez estas fracciones muestran correlación positiva con el COT. En Viale, en donde los niveles de glomalina no diferencian las prácticas agrícolas y tiene el suelo de textura más arcillosa y el clima más húmedo, se observa una tendencia de relación con las diferentes fracciones de COT similar, aunque solo con la fracción total de glomalina. En Bengolea, en donde tampoco los niveles de glomalina diferencian las prácticas agrícolas y tiene el suelo de textura más arenosa y el clima menos lluvioso, se observa que la glomalina se relaciona solo con la fracción de carbono orgánico mineral (COM). Entonces, posiblemente la relación de la glomalina con las diferentes fracciones orgánicas permita caracterizar los diferentes suelos.

Por otro lado, se analizó la **relación de la glomalina con los carbohidratos totales y solubles** (Sección 4.3.4 - Figura 4.4), observándose también diferentes patrones en los diferentes sitios. En Monte Buey y Pergamino tanto los CHT como los CHs se relacionan con la glomalina, en Viale solo los CHs se relacionan con la fracción total de glomalina, y en Bengolea no se observa correlación. Esta observación coincide con que en estos sitios se reportó que los CHT (fracción con dinámica intermedia) parecen ser mejores indicadores que los CHs (fracción altamente dinámica) para detectar los efectos del manejo a corto y mediano plazo (Duval y col., 2013). La relación de la glomalina con los

carbohidratos se analizó pensando que podría haber una correlación en tanto que la glomalina es una glicoproteína (Wright y Upadhyaya, 1996, 1998). Sin embargo, se debe tener en cuenta que también se ha reportado que las fracciones de GRSP extraídas con los protocolos comúnmente utilizados, mostraron espectros de NMR más relacionados con las sustancias húmicas que con las glicoproteínas típicas (Schindler y col., 2007), y que el análisis químico de dicha fracción mostró baja concentración de carbohidratos (Gillespie y col., 2011).

Los niveles de glomalina en el suelo se han encontrado fuerte y positivamente relacionados con la estabilidad de agregados (Wright y Upadhyaya, 1998; Bird y col., 2002; Rillig y col., 2002; Rilling, 2004). Esta relación se observó en muchos estudios (Rillig, 2004 - Tabla 2), y se estableció un patrón curvilíneo de tipo saturación (Wright y Upadhyaya, 1998). Es decir, más allá de un dado valor, un aumento en la concentración de glomalina no manifiesta aumentos detectables de la estabilidad de los agregados del suelo. Sin embargo, en suelos donde la estabilidad de los agregados y los niveles de glomalina son bajos esta relación parece ser lineal (Wright y Upadhyaya 1998; Harner y col., 2004). A su vez, este patrón de correlación entre los niveles de glomalina y la estabilidad de los agregados se observó en suelos donde el carbono proviene de la materia orgánica del suelo, mientras que en suelos ricos en carbonatos la glomalina no se correlacionó positivamente con la estabilidad de los agregados (Rillig y col., 2003). Al analizar la **relación de la glomalina con la estabilidad estructural de los agregados** en los suelos agrícolas aquí analizados (Sección 4.3.5 - Figura 4.5) se estableció una relación lineal entre la estabilidad estructural de los agregados y el \log_{10} de las fracciones de glomalina, que indicaría una relación curvilínea de tipo saturación similar a la ya observada entre la glomalina y la estabilidad de los agregados. De todos modos, al analizar los sitios por separado (Sección 4.3.5 - Tabla 4.4), se vio que en Monte Buey y Pergamino, sitios en los cuales los niveles de glomalina diferencian prácticas agrícolas, hubo una fuerte correlación positiva entre las fracciones de glomalina y el índice de estabilidad de los agregados. Esta tendencia de relación se observó también en Bengolea, mientras que en Viale no hubo correlación. Las particularidades encontradas en los suelos de Viale podrían

eventualmente atribuirse a la influencia de su alto contenido diferencial en arcillas respecto de los otros suelos estudiados y a una diferencia entre ellos en las interacciones suelo-microbiota y suelo-macromoléculas.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que las fracciones de GRSP correlacionan con la comunidad de micorrizas, analizadas tanto como comunidad de esporas de HMA como a través del ácido graso marcador de HMA (*16:1w5c*), y que esta relación se ve afectada por la dinámica de las micorrizas en función al ciclo del fósforo. Por otro lado, la marcada relación de GRSP con los lípidos neutros del suelo ratifica indirectamente la característica de hidrofobicidad atribuida a la glomalina; y su característica de glicoproteína se establece dada la relación de las GRSP con los carbohidratos, principalmente con la fracción de carbohidratos que se encontró que mejor refleja los efectos de manejos del suelo, que son los carbohidratos totales. A su vez, las fracciones de GRSP se relacionan fuerte y positivamente con el carbono orgánico total y el nitrógeno total, corroborando que la glomalina es un importante componente de la materia orgánica del suelo. Mostrando además que posiblemente la glomalina se relaciona de manera diferencial y característica en un dado ambiente y manejo del suelo con las diferentes fracciones orgánicas del suelo (COPg, COPf, COM). Además, las fracciones de GRSP medidas con nuestro método de BCA corrobora la relación establecida con la estabilidad estructural de los agregados, el patrón curvilíneo de tipo saturación, corroborando la observación más relevante para instalar la glomalina como indicador de calidad de suelo.

Conclusiones y Perspectivas

Luego de analizar la fracción de proteínas relacionadas a la glomalina (GRSP) como potencial indicador de calidad y manejo de suelo comparando diferentes prácticas agrícolas en siembra directa podemos pronunciar las siguientes conclusiones.

El método de Bradford, generalmente utilizado en la cuantificación de glomalina como proteína total de las GRSP, no sería un método apropiado para cuantificar GRSP dado a que mostró inconsistencias en su reproducibilidad y precisión en los valores de concentración determinados, y una notable inestabilidad temporal.

En la evaluación de otro método para cuantificar GRSP, el ensayo del ácido bicinconínico (BCA) que al igual que Bradford cuantifica proteína total, parece ser más apropiado y robusto para cuantificar GRSP, ya que mostró una mayor precisión y reproducibilidad en la determinación de los valores de concentración de GRSP y una mayor estabilidad en el tiempo.

Sobre la base de estos resultados, decidimos utilizar el ensayo de BCA para cuantificar GRSP en nuestros extractos de suelo.

Se analizaron las muestras de suelo del proyecto BIOSPAS dirigido a diferenciar con marcadores biológicos suelos bajo Buenas Prácticas Agrícolas de aquellos manejados con prácticas no sustentables. La relación de los valores de glomalina con los manejos de suelo dependió de la textura del suelo. Por lo tanto, si bien corroboramos la hipótesis de la glomalina como indicador de calidad de suelo con mayores valores en sistemas más sustentables, esto fue solamente significativo en los ambientes con suelos de tipo franco limoso (Monte Buey y Pergamino), mientras que en los ambientes con suelos franco arenosos (Bengolea) o arcillosos (Viale) la diferenciación no fue tan clara. Por otra parte, la fracción total de glomalina se mostró como un mejor indicador de calidad de suelo comparado con lo que muestra la fracción fácilmente extraíble de la glomalina. Este hecho sugiere que la glomalina sería un indicador que registra la historia de uso antes que efectos inmediatos de cambio de manejo en el suelo. Esta observación se relaciona posiblemente con la característica de acumulación y gran persistencia de la glomalina en el suelo. Los resultados de muestras de suelo de un ensayo controlado de rotaciones de

cultivos diferencial de corta duración (dos años y medio), que no reflejaron cambios en las concentraciones de glomalina entre tratamientos corroboran la hipótesis anterior. Más aún, el hecho que los suelos cultivados aumentaran en ese período de dos años y medio su valor de glomalina en forma diferencial al suelo sin cultivar en ese mismo período plantea que la glomalina funciona como un indicador de uso del suelo pero necesita de mayor tiempo para desarrollar diferencias entre tratamientos más sutiles como intensidad o diversidad de rotaciones de cultivos.

Por otro lado, se analizó como diferentes formas de almacenamiento y preservación de las muestras de suelo podrían influir en los valores de GRSP. Observamos que si bien los valores absolutos de GRSP se ven afectados, las tendencias que relacionan los niveles de GRSP con las prácticas agrícolas no cambian, es decir no se ve afectada la glomalina como potencial indicador de calidad de suelo.

Con el fin de comprender mejor el fenómeno de dependencia de la glomalina como indicador en relación a la textura del suelo, se analizó la relación de las fracciones de glomalina determinadas, GRSP-FE y GRSP-Total, con otros parámetros físicos, químicos, bioquímicos y biológicos obtenidos en las mismas muestras de suelo y que caracterizan el suelo en otros aspectos. A partir de este análisis pudimos corroborar la relación de la glomalina con los niveles de micorrizas en los suelos medidos como densidad de esporas y con algunas familias de HMA en particular, así como con su dinámica en relación al ciclo del fósforo. También se corroboraron la característica de hidrofobicidad atribuida a la glomalina dado su relación con los lípidos neutros del suelo, y la característica de glicoproteína dada su relación con los carbohidratos totales del suelo. Se ratifica la glomalina como un importante componente de la materia orgánica del suelo, presentándose una alta relación de la glomalina con el carbono orgánico total y con el nitrógeno total. Y además, se corrobora la relación establecida de la glomalina con la estabilidad estructural de los agregados.

Una observación relevante de este trabajo ha sido sin duda el concepto de que la importancia de la glomalina como indicador de suelo para diferenciar prácticas agrícolas está muy influenciada por las características edáficas del ambiente. Si bien, se ha

establecido que la textura del suelo influye en los niveles de glomalina, en nuestros resultados además observamos que la posibilidad de que diferentes manejos del suelo se vean reflejados por diferentes niveles de glomalina puede ser afectada por el contenido de arena, arcilla y limo del suelo estudiado. En consecuencia, nos planteamos realizar ensayos que nos permitan analizar con mayor cuidado la influencia de la textura del suelo sobre los valores de GRSP determinados. A futuro buscaremos analizar más específicamente los efectos del contenido de arcilla, arena y limo en la muestra del suelo-sustrato en el proceso de extracción de las fracciones de GRSP. Para ello realizaríamos una "dilución" de los suelos ya analizados en los cuales, según los resultados expuestos, los niveles de glomalina permiten diferenciar las prácticas agrícolas, como en los suelos de los ambiente de Pergamino y Monte Buey. Estos suelos tienen características texturales franco limosas y se podría variar la textura del sustrato a extraer agregando cantidades crecientes de arenas o arcillas. En comunicaciones con El Dr. Hector Morras y el Ing. Ag. Mg. Filipe Behrends Kraemer (del Instituto de Suelos del INTA-Castelar), nos plantearon que es importante considerar que las características del material agregado sean similares a los suelos estudiados. En el caso del agregado de arena, la principal característica es la granulometría; y en general los suelos de la región evaluada en el BIOSPAS presentan arenas muy finas, de 50 a 100 o hasta 200 micrones. Y en el caso de la arcilla, hay que tener en cuenta su mineralogía, particularmente si las arcillas se expanden; la ilita es un buen punto de partida ya que presenta una ocupación real mayor en los suelos estudiados. Otra posibilidad sería "fabricar suelos", es decir construir suelos mezclando cantidades diferentes de arenas, arcillas y limos y utilizarlos como sustratos de desarrollos de HMA en plantas cultivadas en dichos sustratos, y analizar allí la producción de glomalina. Esto nos permitiría analizar con mayor especificidad la relación de la textura no solo con la glomalina sino también con las micorrizas que la producen.

A su vez, para corroborar los resultados observados en el trabajo nos planteamos extraer y cuantificar GRSP a partir de otras muestras de suelo buscando cubrir una mayor variedad de los mismos.

Otro camino que vamos a continuar desarrollando, en busca de ampliar el conocimiento sobre la glomalina y considerando las limitaciones del método para su cuantificación, consiste en avanzar en el estudio de la misma por técnicas moleculares a partir de cultivos in vitro en sistemas de cultivo de raíces como órganos aislados de cepas puras (monospóricas) de hongos micorrícicos arbusculares como sistemas modelos para la obtención de glomalina. Esta línea de trabajo fue parcialmente desarrollada en paralelo durante el trabajo de tesis que aquí se presenta. El conjunto de dificultades técnicas y operacionales que encontramos en esta línea de trabajo no nos permitió contar con un cultivo de HMA con suficiente biomasa que nos permita encarar una purificación de glomalina para su estudio y obtención de anticuerpos.

Finalmente y cerrando las conclusiones de este trabajo, el hecho que las relaciones de la glomalina con otros parámetros del suelo que verifican el conjunto de conceptos históricamente desarrollado sobre la misma, se establezcan únicamente en los sitios donde la glomalina funciona como indicador de calidad y manejo de suelo, sugiere fuertemente que el paradigma de la glomalina, debe ser utilizado no solo considerando la precisión del método de determinación de proteínas sino también la textura de los suelos que se van a analizar.

Apéndices

Estudios Complementarios

Apéndice A. Análisis de la influencia de diferentes formas de preservación y almacenamiento de las muestras de suelo sobre los valores medidos de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina.

El muestreo del suelo y posterior preparación de la muestra es un evento fundamental para realizar un análisis representativo de la situación que se quiere evaluar. La preparación de la muestra de suelo implica procesamientos para su secado, disgregación, tamizado, homogenización y almacenamiento; y en estos procesos se debe evitar la contaminación. Las condiciones de almacenamiento son muy importantes ya que en la muestra se genera un nuevo ambiente con nuevas condiciones, y esto puede ser decisivo al medir ciertas propiedades. Los métodos más comunes de almacenamiento son el secado al aire, la conservación en frío (4°C) o la congelación (-20 °C). En general, el método más extendido para los análisis de suelos es el secado al aire, y las determinaciones físicas y químicas tradicionales no se ven afectadas por este procesamiento. Sin embargo, la conservación en frío o la congelación son cada vez más utilizadas, principalmente al evaluar propiedades biológicas. Esto se debe a que el secado al aire puede tener un efecto de cambio de la composición de la comunidad de microorganismos y, si bien la rehumectación para restablecer la población original es una alternativa que se usa, actualmente es muy cuestionada (Daglio y col., 2005) y los procesos intrínsecos a estos cambios no son bien comprendidos. La extracción y cuantificación de las proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP) en general se realiza desde muestras de suelo secadas al aire (Wright y Upadhyaya, 1996; Wright y Upadhyaya, 1998; Wright y col. 1999; Wright y Anderson, 2000; Rillig y col., 2001; Bird y col., 2002; Rillig y col., 2002; Rillig y col., 2003; Steinberg y Rillig, 2003; Harner y col., 2004; Nichols y Wright, 2005, 2006; Wright y col., 2006; Schindler y col., 2007; Whiffen y col., 2007; Wright y col., 2007). Aunque también se han realizado otros procesamientos como secado en estufa ($\approx 55^{\circ}\text{C}$) (Halvorson y Gonzalez, 2006; Janos y col., 2008) y almacenamiento a 4°C (Lovelock y col., 2004).

Dentro del proyecto BIOSPAS se utilizaron diferentes formas de almacenamiento en función de los parámetros a determinar. Las propiedades físicas (Kraemer y col., 2012a; Kraemer y col., 2012b) y químicas (Duval y col., 2013) se realizaron sobre muestras de suelo secadas al aire. Los análisis basados en la extracción de ADN, sobre muestras de suelo conservadas a -20°C (Figuerola y col., 2012; Rosa y col., 2014); para las determinaciones de perfiles de ácidos grasos en fracciones de lípidos se usaron muestras conservadas a -20°C hasta su molienda en Nitrógeno líquido y luego conservadas a -20°C hasta el momento de la extracción de lípidos (Ferrari y col., 2015). Se usaron muestras de suelo conservadas a 4°C , tanto para la determinación de diferentes comunidades microbianas, como por ejemplo la comunidad de esporas de hongos micorrícicos arbusculares (Cofré, 2014), la comunidad de pseudomonas cultivables (Agaras y col., 2012) y la comunidad de bacterias desnitrificantes (Rosa y col., 2004), la actividad enzimática y respiración microbiana inducida por sustrato (Gabbarini, Frene y Wall, 2012) y los niveles de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina.

Dada la importancia del criterio de preservación y almacenamiento de la muestra de suelo al realizar un dado análisis, decidimos comparar cómo diferentes formas de almacenamiento de la muestra influyen sobre los valores medidos de GRSP. Se usaron muestras de suelo, secadas al aires y conservadas a 4°C y a -20°C , obtenidas del proyecto BIOSPAS del muestreo de febrero/2010, descritas en la sección 3.2.1 Suelos en 3.2 Materiales y Métodos en el Capítulo 3. Las muestras secadas al aire fueron cedidas por el grupo de la Ing. Agr. Maria Iglesias (FCA-UNNE), miembro del BIOSPAS. La extracción y cuantificación de la fracción GRSP-Total se realizó con el método descrito en las secciones 3.2.2 Extracción de glomalina y 3.2.3 Cuantificación de glomalina en 3.2 Materiales y Métodos en el Capítulo 3. El análisis estadístico se realizó dentro de cada sitio, estableciendo modelos lineales generales para estudiar el efecto de los tratamientos y las diferentes formas de conservación de las muestras; y se utilizó el software estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2012).

La Figura A.1 muestra los valores promedio de GRSP-Total, expresados en mg de GRSP reactivas con BCA por g de suelo seco, considerando las tres situaciones de manejo agrícola del suelo y las tres formas de conservación de las muestras, analizadas para los cuatro sitios separados.

Se observó que la tendencia de los valores de Total-GRSP y sus variaciones relativas en función de los diferentes manejos del suelo en cada sitio, se mantiene en las tres formas de almacenamiento de la muestra. Lo observado en el Capítulo 3 para muestras almacenadas a 4°C, en donde en los sitios de Monte Buey y Pergamino los niveles de GRSP permitían diferenciar manejos de suelo (AN > BPA > PANS), mientras que en los sitios de Bengolea y Viale esta diferenciación no se observaba, se repitió tanto en las muestras secadas al aire como en las muestras conservadas a -20 °C. Además, la tendencia de los valores relativos de Total-GRSP para manejos agrícolas de BPA y PANS en función del valor de AN (BPA/AN y PANS/AN, indicados en las columnas respectivas en la Figura A1), también fueron similares en las muestras almacenadas de diferentes maneras. Una característica que diferenció las formas de almacenamiento fue que los valores absolutos de las muestras secadas al aire fueron significativamente más altos que las muestras a 4°C y a -20 °C, excepto en Bengolea en donde los valores no presentaba diferencias significativas entre formas de conservación de las muestras.

Por lo tanto, si bien la forma de preservación y almacenamiento de las muestras de suelo influye en el valor absoluto determinado de las proteínas del suelo relacionadas con la glomalina, no cambia las tendencias que relacionan los niveles de GRSP con las prácticas agrícolas, es decir no afecta la glomalina como indicador de calidad de suelo.

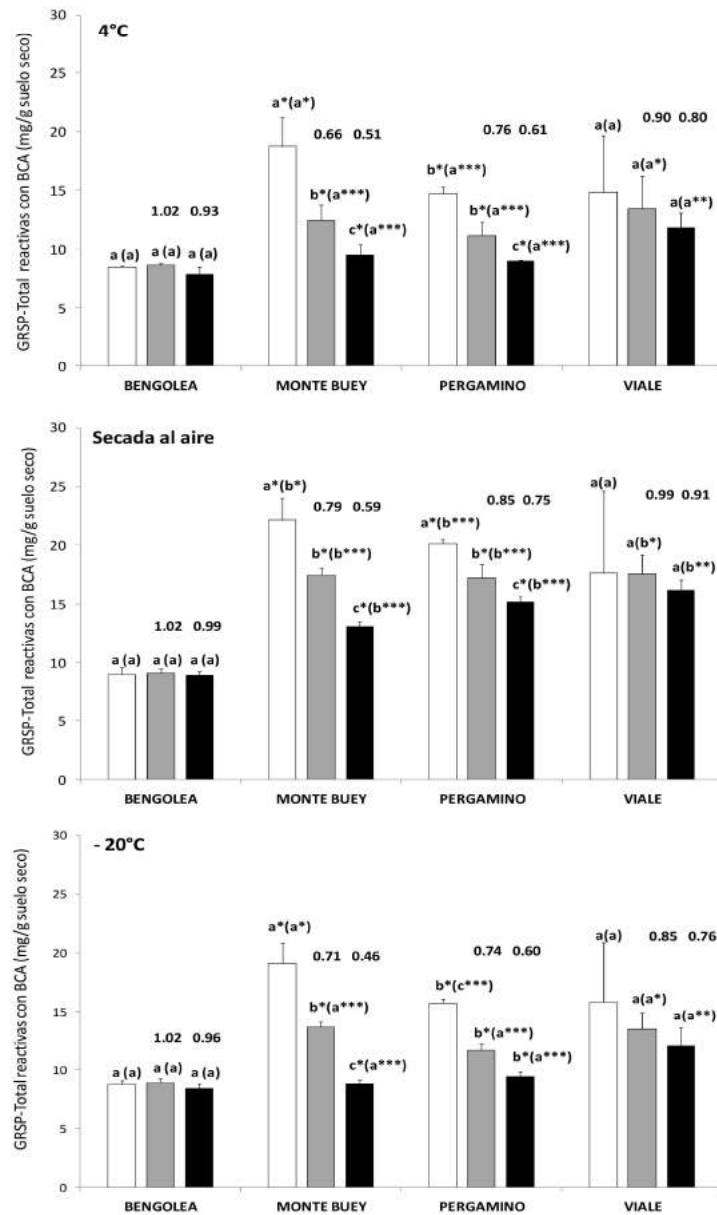


Figura A.1: Concentración de la fracción total de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP-Total), extraídas de muestras de suelo de febrero/2010, de los cuatro ambientes estudiados comparando tres situaciones de distinto manejo agrícola: □ AN, ■ BPA y ■ PANS, y tres formas de almacenamiento de las muestras de suelo. La cantidad de proteína, expresada como mg de proteína por g de suelo seco, fue determinada por el método calorimétrico de BCA usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Se muestran las medias de tres replicas (n=3) con sus desviaciones estándares indicadas por las líneas. Sobre las respectivas columnas, se muestran valores relativos de Total-GRSP para los tratamientos de BPA y PANS en función del valor del AN (control). Las letras sobre las columnas representan el análisis estadístico entre tratamientos dentro de cada sitio; y las letras entre paréntesis representan el análisis estadístico entre formas de almacenamiento de las muestras dentro de cada tratamiento y cada sitio. Los asteriscos representan los p-valores significativos: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Apéndice B. Análisis de la sensibilidad de la fracción de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina como indicador de calidad de suelo frente a diferentes rotaciones de cultivos.

Como hemos visto en el Capítulo 3, la glomalina resulta un posible indicador de calidad del suelo en suelos franco limosos como el del caso estudiado en Pergamino. A su vez, encontramos que la glomalina está muy relacionada con el carbono orgánico y el nitrógeno del suelo y probablemente forme parte de sus reservas en el suelo, así como también se correlacionó estrecha y positivamente con la estabilidad estructural de los agregados del suelo. La comunidad de micorrizas, el carbono orgánico, el nitrógeno total y la estabilidad de los agregados son parámetros generalmente seleccionados dentro del conjunto de datos para evaluar la calidad del suelo, y entonces la variación de los niveles de glomalina podría ser también considerada. Sin embargo, dado el carácter acumulativo de la glomalina en el suelo no queda claro si su determinación puede servir como indicador temprano para analizar respuestas en un proceso de cambio de manejo de un suelo.

Por ello y con el objeto de evaluar más profundamente la sensibilidad de la glomalina a las variaciones de manejo, se realizaron mediciones de los niveles de la fracción GRSP-Total en un ensayo controlado comparando diferentes situaciones de rotación de cultivos. El ensayo (Figura B.1) se encuentra en un lote del INTA Pergamino (Buenos Aires) y fue diseñado por el grupo del Dr. Marcelo Carmona (Cátedra de Fitopatología, FAUBA), miembro del proyecto BIOSPAS. El lote tenía una historia reciente previa de rotación soja-maíz en las tres campañas anteriores. Se planteo un diseño de 16 parcelas de 50 m² en donde se realizaron cuatro tratamientos con cuatro replicas cada uno: un monocultivo de maíz en verano, una rotación incompleta de soja en verano y trigo en invierno, un monocultivo de soja en verano, una rotación completa de maíz y soja en verano con trigo en invierno. La aplicación de agroquímicos se llevo a cabo según estándares de la región, pero se eliminó el uso fungicidas. Las muestras consistieron en cinco repiques de la capa superficial 0-10 cm de cada parcela, en los cuatro extremos y el

centro de la parcela entre líneas de siembra. También se tomaron muestras de la capa superficial 0-10 cm en cada calle (calle 1 y calle 2). Los muestreos se realizaron antes de comenzar el ensayo en Febrero/2010 y luego en Septiembre/2012. Las muestras secadas al aire y tamizadas a < 2 mm fueron originalmente obtenidas por el grupo del Dr. Juan Galantini (CERZOS. UNS-CONICET) quienes nos cedieron una parte de las mismas para su análisis. La extracción y cuantificación de la fracción Total-GRSP se realizó con el método descrito en las secciones 3.2.2 Extracción de glomalina y 3.2.3 Cuantificación de glomalina en 3.2 Materiales y Métodos en el Capítulo 3. El análisis estadístico se realizó estableciendo modelos lineales generales para estudiar el efecto de las rotaciones; y se utilizó el software estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2012).

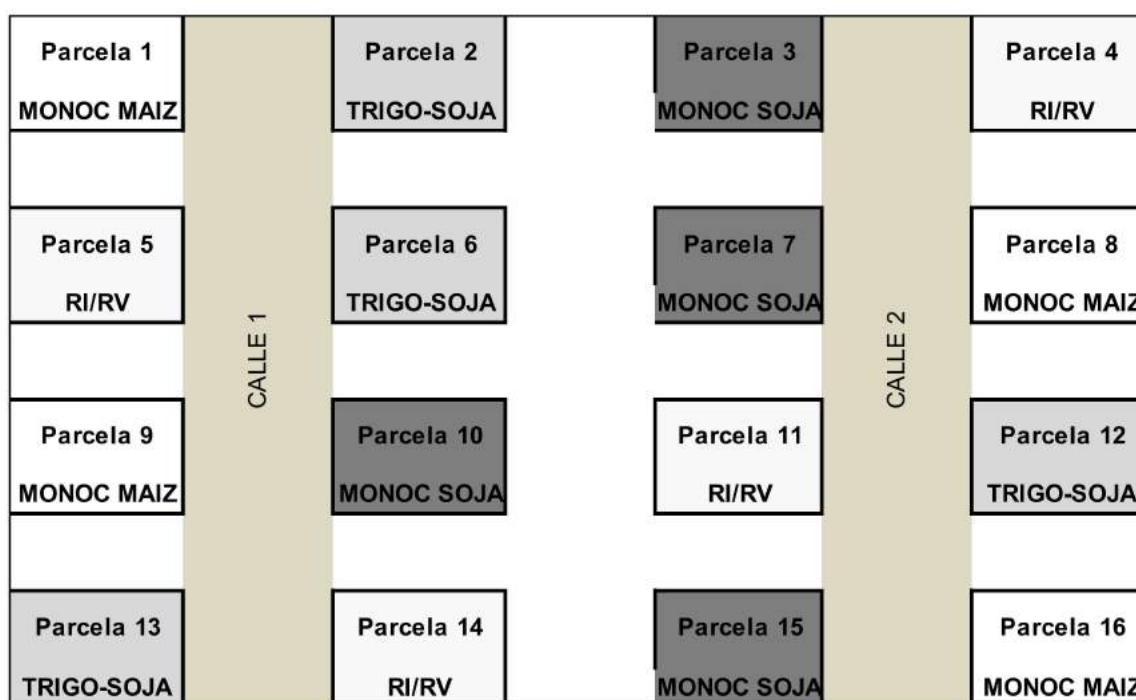


Figura B.1: Esquema del diseño del ensayo en el lote de Pergamino. Dentro de cada fila se encuentran los cuatro tratamientos ensayados: □ monocultivo de maíz en verano, ■ rotación incompleta de soja en verano y trigo en invierno, ■ monocultivo de soja en verano, □ rotación completa de maíz y soja en verano con trigo en invierno.

La Figura B.2 muestra los valores promedio de GRSP-Total, expresados en mg de GRSP reactivas con BCA por g de suelo seco, considerando las cuatro situaciones de rotación de cultivo en los dos muestreos realizados.

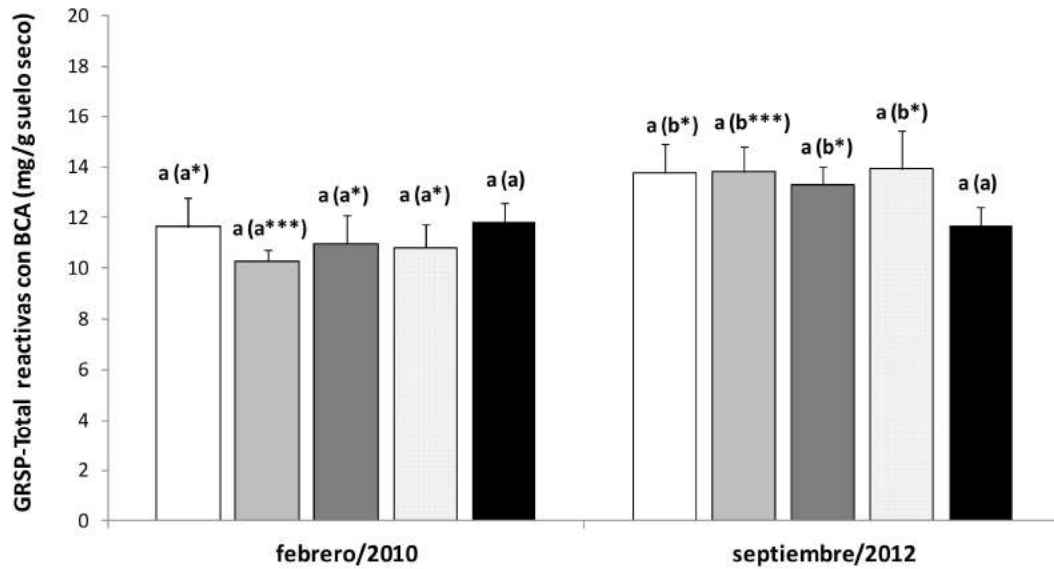


Figura B.2: Concentración de la fracción total de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP-Total), extraídas de muestras de suelo del ensayo del INTA Pergamino, muestreadas en febrero/2010 y en septiembre/2012, comparando cuatro situaciones de rotación de cultivos: □ monocultivo de maíz, □ rotación incompleta de soja en verano y trigo en invierno, ■ monocultivo de soja en verano, □ rotación completa de maíz y soja en verano con trigo en invierno; y ■ las calles. La cantidad de proteína, expresada como mg de proteína por g de suelo seco, fue determinada por el método calorimétrico de BCA usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Para las rotaciones se muestran las medias de cinco replicas (n=5) con sus desviaciones estándares indicadas por las líneas, y para las calles se muestran las medias de dos replicas (n=2) con sus desviaciones estándares indicadas por las líneas. Las letras sobre las columnas representan el análisis estadístico entre tratamientos en cada muestreo; y las letras entre paréntesis representan el análisis estadístico entre tiempos de muestreo dentro de cada tratamiento. Los asteriscos representan los p-valores significativos: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de GRSP-Total entre las diferentes rotaciones de cultivo ensayadas y las calles, ni al inicio del ensayo (febrero/2010) (p=0.063) ni dos años y medio después de iniciado el mismo (septiembre/2012) (p=0.2033). Sin embargo, si se encontró diferencia significativa entre los valores de Total-GRSP entre los diferentes tiempos de muestreo dentro de cada tipo

de rotación, observándose una acumulación de entre 15 y 25% de GRSP-Total en los cuatro tipos de rotación en los dos años y medio transcurridos entre muestreos. Este aumento debido a la presencia de cultivos en rotación o sin ella no sería un artefacto o error constante de las determinaciones ya que los valores de GRSP-Total medidos en las muestras de suelo provenientes de las calles donde no hubo cultivos en el mismo período de tiempo, no mostraron diferencias significativas ($p=2496$).

A partir de estos resultados, podríamos decir que las proteínas del suelo relacionadas con la glomalina no pueden ser utilizadas como un indicador temprano para monitorear diferencias entre suelos con diferentes manejos o prácticas agrícolas; pudiendo relacionar este resultado con la característica de acumulación de la glomalina en el suelo y su gran persistencia en el suelo como un hecho necesario para la construcción de su valor como indicador de calidad de suelo.

Referencias

- AAPRESID, 2013a. Historia de la siembra directa. Online. <http://www.aapresid.org.ar/historia/>.
- AAPRESID, 2013b. La SD en la argentina. Online. http://www.aapresid.org.ar/wp-content/uploads/2013/02/la_sd_en_argentina.pdf.
- AAPRESID, 2013c. Evolución de la superficie en Siembra Directa en Argentina. Online. http://www.aapresid.org.ar/wp-content/uploads/2013/02/aapresid.evolucion_superficie_sd_argentina.1977_a_2011.pdf.
- AAPRESID, 2013d. Agricultura Certificada. Buenas Prácticas Agrícolas. Online. <http://www.aapresid.org.ar/ac/buenas-practicas-agricolas/>.
- AAPRESID, 2013e. Manual de Buenas Prácticas Agrícolas e indicadores de gestión. Online. <http://www.aapresid.org.ar/ac/wp-content/uploads/sites/4/2013/02/manual.pdf>.
- Agaras, B., Wall, L., Valverde, C., 2012. Specific enumeration and analysis of the community structure of culturable pseudomonads in agricultural soils under no-till management in Argentina. *Applied Soil Ecology* 61, 305-319.
- Albertango, J., Belloso, C., Giraudo, M.B, Periretti, R., Permingeat, H., Wall, L., 2014. Conservation Agriculture in Argentina, en Jat, R.A., Sahrawat, L., Kassam A.H. (Eds.), *Conservation Agriculture: Global Prospects and Challenges*. British Library, London, 352-373.
- Allen, M., 1996. The ecology of arbuscular mycorrhizas: a look back into the 20th century and a peek into the 21st. *Mycological Research* 100, 769–82.
- Andrews, S.S., Mitchell, J.P., Manicinelli, R., Karlen, D.J., Hartz, T.K., Horwath, W.R., Pettygrove, G.S., Scow, K.M., Munk, D.S., 2002. On-farm assessment of soil quality in California's Central Valley. *Agronomy Journal* 94, 12–23.
- Angers, D.A., Mehuys, G.R., 1989. Effects of cropping on carbohydrate content and water-stable aggregation of a clay soil. *Canadian Journal of Soil Science* 69, 373–380.
- Baldock, J.A., Nelson, P.N., 2000. Soil organic matter, en: Sumner, M.E. (Eds.), *Handbook of Soil Science*. CRC Press, Boca Raton, B25-B84.

-
- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., Azcón, R., 1997. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganism within the context of sustainable soil–plant systems, en: Gange, A.C., Brown, V.K. (Eds.), *Multitrophic interactions in terrestrial systems*. Cambridge University Press, Cambridge, 521–559.
 - Bardgett, R.D., 2005. The diversity of life in soil, en: Crawley, M. J., Little, C., Southwood T. R. E., and Ulfstrand, S. (Eds.), *The Biology of Soil. A Community and Ecosystem Approach*. Oxford University Press, Oxford, 24-55.
 - Bird, S.B., Herrick, J.E., Wander, M.M., Wright, S.F., 2002. Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in semi-arid rangeland. *Environmental Pollution* 116, 445-455.
 - Bolliger, A., Nalla, A., Magid, J., de Neergaard, A., Nalla, A.D., Bog-Hansen, T.C., 2008. Re-examining the glomalin-purity of glomalin-related soil protein fractions through immunochemical, lectin-affinity and soil labelling experiments. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 887-893.
 - Bray, R.H., Kurtz, L.T., 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59, 39-45.
 - Brejda, J.J., Moorman, T.B., Smith, J.L., Karlen, D.L., Allan, D.L., Dao, T.H., 2000. Distribution and variability of surface soil properties at a regional scale. *Soil Science Society of America Journal* 64, 974–982.
 - Bremner, J.M., 1996. Nitrogen total, en Sparks, D.L. (ed.). *Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods*, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, 1085–1121.
 - Brink, R.H., Dubach Jr., P., Lynch, D.L., 1960. Measurement of carbohydrates in soil hydrolyzates with anthrone. *Soil Science* 89, 157–166.
 - Cambardella, C.A., Elliott, E.T., 1992. Particulate soil organic-matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Science Society of America Journal* 56, 777–783.
 - Chenu, C., Le Bissonnais, Y., Arrouays, D. 2000. Organic matter influence on clay wettability and soil aggregate stability. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64: 1479-1486.

- Cofré, Noelia. 2014. Tesis Doctoral Comunidades nativas de hongos micorrizicos arbusculares: respuesta frente a distintas prácticas agrícolas y efectos sobre el crecimiento de *Glycine max* (L.) Merril. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET), Facultad de Cs. Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Coleman, D.C., Wall, D.H., 2014. Soil Fauna: Occurrence, Biodiversity, and Roles in Ecosystem Function, en: Eldor P. (Ed.), Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Colorado State University, Ft. Collins, Academic Press, 4 ed., 111-150.
- Cornejo, P., Meier, S., Borie, G., Rillig, M., Borie, F., 2008. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Sci. Total Environ.*, 406, 154–160.
- Daglio, G., Sterren, M., Benintende, S., 2005. Almacenamiento de muestras de suelo: incidencia sobre la cuantificación de biomasa microbiana. *Agriscientia*, XXII (2), 63-68.
- De Lima Holzmann, R., 2013. Indicadores en Fruticultura. Sostenibilidad y orgánico. Demandas y respuestas, en: Ullé J. (Ed.), Bases tecnológicas de sistemas de producción agroecológicos. Nodos Agrícola Ganadero, Horticultura Orgánica y Cultivos Perennes. INTA, Buenos Aires, 71-82.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Doran, J. W., 2002. Soil health and global sustainability: translating science into practice. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 88, 119-127.
- Doran, J. W., Zeiss, M. R., 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology* 15, 3–11.
- Driver, J.D., Holben, W.E., Rillig, M.C., 2005. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 101–106.

-
- Duval, M., Galantini, J., 2010. Fracciones orgánicas del suelo: Efecto del manejo sobre las propiedades químicas del suelo bajo diferentes condiciones edafoclimáticas. Reunión anual del BIOSPAS. La plata, Buenos Aires, Argentina.
 - Duval, M., Galantini, J., Iglesias, J., Canelo, S., Martínez, J.M., Wall, L., 2013. Analysis of organic fractions as indicators of soil quality under natural and cultivated systems. *Soil & Tillage Research* 131, 11–19.
 - Ferrari, A.E., Ravnskov, S., Larsen, J., Tonnersen, T., Maronna, R.A., Wall, L.G., 2015. Crop rotation and seasonal effects on fatty acid profiles of neutral and phospholipids extracted from no-till agricultural soils. *Soil Use and Management*, doi: 10.1111/sum.12165.
 - Figuerola, E.L., Guerrero, L.D., Rosa, S.M., Simonetti, L., Duval, M.E., Galantini, J.A., Bedano, J.C., Wall, L.G., Erijman, L., 2012. Bacterial indicator of agricultural management for soil under no-till crop production. *PLoS One* 7, e51075.
 - Gabbarini, L., Frene, J., Wall, L., 2012. Estudios bioquímicos de suelos con diferentes manejos agrícolas en siembra directa. XIX Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
 - Gadkar, V., Rillig, M.C. 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiol. Lett.* 263, 93-101.
 - Galantini, J., 2005. Separación y análisis de las fracciones orgánicas. In: Marban, L., Ratto, S. (Eds.), *Manual “Información y Tecnología en los Laboratorios de Suelos para el Desarrollo Agropecuario Sostenible”*. de la AACCS. Capítulo IV parte 2, pp. 95–106.
 - Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46, 235-244.
 -
 - Gil, S., Trasar, F.C., Leiros, M.C., Seoane S., 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.* 37, 877-887.

- Gillespie A, Farrell R, Walley F, Ross A, Leinweber P, Eckhardt K-U, Regier T, Blyth R. 2011. Glomalin-related soil protein contains non-mycorrhizal-related heat-stable proteins, lipids and humic materials. *Soil Biol Biochem* 43,766–777.
- Gonzalez-Chavez, M.C., Carrillo-Gonzalez, R., Wright, S.F., Nichols, K.A., 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, 130,317-323.
- Grigera, M.S., Drijber, R.A., Shores-Morrow, R.H., Wienhold, B.J., 2007. Distribution of the arbuscular mycorrhizal biomarker C16:1cis11 among neutral, glycol and phospholipids extracted from soil during the reproductive growth of corn. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 1589–1596.
- Halvorson, J.J., Gonzalez, J.M., 2006. Bradford reactive soil protein in Appalachian soils: distribution and response to incubation, extraction reagent and tannins. *Plant and Soil* 286, 339–356.
- Harner, M.J., Ramsey, P., Rillig, M., 2004. Protein accumulation and distribution in floodplain soils and river foam. *Ecology Letters* 7, 829–836.
- Hillel, D., 2007. *Soil Formation en: Soil in the Environment: Crucible of Terrestrial Life*, Elsevier Science, Oxford, 1ra. Ed., 13-26.
- Janos, D.P., Garamszegi, S., Beltran, B., 2008. Glomalin Extraction and Measurement. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 728–739.
- Kraemer, F.B., Fernández, P.L., Castiglioni, M.G., Morrás, H., 2012a. Evaluación del tiempo de inmersión de los agregados en el tratamiento de humedecimiento rápido de la técnica de Le Bissonnais, XIX Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Kraemer, F.B., Garibaldi, L.A., Empson, M., Castiglioni, M.G., Cosentino, D.A., Morrás, H.J., Bressan, E., 2012b. Hidrofobicidad subcrítica en suelos de textura y mineralogía contrastantes de la región pampeana bajo distintos manejos agrícolas. XIX Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Knorr, M.A., Boerner, R.E.J., Rillig, M.C., 2003. Glomalin content of forest soils in relation to fire frequency and landscape position. *Mycorrhiza* 13, 205–210.

-
- Larsen, J., Bødker, L., 2001. Interactions between pea rootinhibiting fungi examined using signature fatty acids. *New Phytologist*, 149, 487–493.
 - Le Bissonnais Y. 1996. Aggregate stability and assessment of soil crustability and erodability : I. Theory and methodology. *Eur. J. Soil Sci.* 47: 425-437.
 - Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C., 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442, 806-809.
 - Letey, J. 1969. Measurement of contact angle, water drop penetration time, and critical surface tension. p. 43–47. *In* L.F. DeBano and J. Letey (ed.) *Water Repellent Soils. Proc. Symp. Water Repellent Soils*, University of California, Riverside. Univ. of California, Riverside.
 - Lovelock, C.E., S.F. Wright, D.A. Clark, Ruess, R.W., 2004a. Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. *J. Ecol.* 92, 278–287.
 - Lovelock C.E., Wright, S.F., Nichols, K.A., 2004. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1009–1012.
 - Millner, P.D., Wright, S.F., 2002. Tools for support of ecological research on arbuscular mycorrhizal fungi. *Symbiosis* 33, 101–123.
 - Morton, J.B. 1990. Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): Their role in macro- and microevolutionary processes. *Mycotaxon* 37, 493-515.
 - Morton, J., Bentivenga, S., Wheeler, W., 1993. Germ plasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48, 491-528.
 - Nannipieri, P., Eldor, P., 2009. The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 2357–2369.

-
- Nichols, K.A., Wright, S.F., 2005. Comparison of glomalin and humic acid in eight native US soils. *Soil Science* 170, 985–997.
 - Nichols, K.A., Wright, S.F., 2006. Carbon and nitrogen in operationally defined soil organic matter pools. *Biology and Fertility of Soils* 43, 215–220.
 - Omar, M., Bolland, L., Heather, W., 1979. A permanent mounting medium for fungi. *Bulletin of the British Mycological Society* 13, 31-32.
 - Olsson, P.A. 1999. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 29, 303–310.
 - Puget, P., Angers, D.A., Chenu, C., 1999. Nature of carbohydrates associated with water-stable aggregates of two cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 55–63.
 - Purin S., Rillig M. C., 2007. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia* 51, 123-130.
 - Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S.L., Morton, J.B., Walker, C., 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23, 515-531.
 - Rillig MC. 2004a. Arbuscular mycorrhizae, glomalin and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science* 84, 355–363.
 - Rillig M.C. 2004b. Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecol. Lett.* 7, 740–754.
 - Rillig, M.C., 2005. A connection between fungal hydrophobins and soil water repellency? *Pedobiologia* 49, 395-399.
 - Rillig, M.C. y D.L. Mummey. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171, 41–53.
 - Rillig M.C, Ramsey, P.W., Morris, S., Eldor, A.P., 2003. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant and Soil* 253, 293–299.
 - Rillig, M.C., Steinberg, P.D., 2002. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: A mechanism of habitat modification? *Soil Biol. Biochem.* 34,1371–1374.

-
- Rillig, M.C., Wright, S.F., Eviner, V.T., 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: Comparing effects of five plant species. *Plant Soil*, 238, 325-333.
 - Rillig, M.C., Wright, S.F., Nichols, K.A., Schmidt, W.F., Torn, M.S. 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant and Soil* 233, 167–177.
 - Roberts, P. y D.L. Jones. 2008. Critical evaluation of methods for determining total protein in soil solution. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1485-1495.
 - Romaniuk, R., Giuffré, L., Costantini, A., Bartoloni, N., Nannipieri, P., 2011a. A comparison of indexing methods to evaluate quality of soils: the role of soil microbiological properties. *Soil Research*, 49, 733-741.
 - Romaniuk, R., Giuffré, L., Costantini, A., Nannipieri, P., 2011b. Assessment of soil microbial diversity measurements as indicators of soil functioning in organic and conventional horticulture systems. *Ecological Indicators* 11, 1345-1353.
 - Rosa, S., Kraemer, F., Soria, M., Guerreroa, L., Morrás, H., Figuerola, E., Erijman, L., 2014. The influence of soil properties on denitrifying bacterial communities and denitrification potential in no-till production farms under contrasting management in the Argentinean Pampas. *Applied Soil Ecology* 75, 172-180.
 - Rosier, C.L., Hoyer, A. T., Rillig, M.C., 2006. Glomalin-related soil protein: assessment of current detection and quantification tools. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2205–2211.
 - Sasser, M., 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis, en: Clement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (Eds.), *Methods in phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest, 199–204.
 - Schenck, N., Perez, Y., 1990. Manual for identification of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi.(INVAM). University of Florida, Gainesville, Florida, USA.
 - Schindler, F.V., Mercer, E.J., Rice, J.A., 2007. Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 320–329

-
- Schüssler, A., Schwarzott, D., Walker, C., 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105, 1413–1421.
 - Schüßler, A., Walker, C., 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera, Gloucester, in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich and Oregon State University.
 - Simon, L., J. Bousquet, R.C. Levesque, and M. Lalonde. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363, 67-69.
 - Smith, S.E., Read D.J., 2008. Arbuscular micorrizas, en: *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd Edition. Academic Press, San Diego, 11-145.
 - Steinberg, P.D. y M.C. Rillig. 2003. Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 191–194.
 - Stoscheck, C.M. 1990. Quantitation of Protein, en *Deutscher MP (Eds.) Method in Enzymology, Guide to Protein Purification*. New York, Academic Press, vol. 182, 50-68.
 - Suñer, L., Galantini, J., 2014. Importancia del equilibrio de las formas de fósforo edáfico, en Galantini, J. (Ed.), *Ciencia y experiencia para una siembra directa sustentables en los ambientes frágiles del S y SO Bonaerense*. 52-56.
 - Taylor, T.N., W. Remy, H. Haas, and H. Kerp. 1995. Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia* 87, 560-573.
 - Treseder, K.K., Turner, K.M., 2007. Glomalin in Ecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71, 1257-1266.
 - Tunlid, A. & White, D.C. 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status and metabolic activity of microbial communities in soil, en: Stotzky, G., Bollag, J.M. (Eds.). *Soil Biochemistry*, Vol. 7., Marcel Dekker, New York, 229–262.
 - Voroney, R.P., Heck, R.J., 2014. The soil habitat, en: Eldor Paul (Eds.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Colorado State University, Ft. Collins, Academic Press, 4 ed., 15-40.

-
- Wall, L.G., 2011. The BIOSPAS consortium: soil biology and agricultural production, in: De Bruijn, F. (Ed.), *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*. John Wiley and Sons Inc., 299-306.
 - Walker, C., Mize, C.W., McNabb Jr, H.S., 1982. Populations of endogonaceous fungi at two locations in central Iowa. *Canadian Journal of Botany* 60, 2518-2529.
 -
 - Whiffen, L.K., Midgley, D.J., McGee, P.A., 2007. Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 691–694.
 - Wright S. F. 2000. A fluorescent antibody assay for hyphae and glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226, 171–177.
 - Wright, S.F., Anderson, R.L., 2000. Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central Great Plains. *Biol Fertil Soils*, 31, 249-253.
 - Wright, S.F., Franke-Snyder, M., Morton, J.B., Upadhyaya, A. 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant Soil* 181, 193–203.
 - Wright, S., Green, V. S., Cavigelli, M. A., 2007. Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. *Soil & Tillage Research* 94, 546-549.
 - Wright, S.F., Nichols, K.A., Schmidt, W.F., 2006. Comparison of efficacy of three extractants to solubilize glomalin on hyphae and in soil. *Chemosphere* 64, 1219–1224.
 - Wright, S.F., Starr, J.L., Paltineanu, I.C., 1999. Changes in Aggregate Stability and Concentration of Glomalin during Tillage Management Transition. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 1825-1829.
 - Wright, S.F. y A. Upadhyaya. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science* 161, 575-586.
 - Wright, S.F. y A. Upadhyaya. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198, 97–107.

- Zech, W., Senesi, N., Guggenberger, G., Kaiser, K., Lehmann, J., Miano, T.M., Miltner, A., Schroth, G., 1997. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma* 79, 117 - 161.
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N., Saveliev, A.A., Smith, G.M., 2009. *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*, first ed. Springer Science BusinessMedia LLC, New York.