RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Frene, Juan Pablo

Estudio fisiológico del suelo bajo diferentes tratamientos agrícolas.

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:
Frene, J. P. (2019). Estudio fisiológico del suelo bajo diferentes tratamientos agrícolas. (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/20.500.11807/967

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

Universidad
Nacional
de Quilmes

Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Frene, Juan Pablo, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Agosto de 2017, 230 pp.,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Estudio fisiológico del suelo bajo diferentes tratamientos agrícolas.

TESIS DOCTORAL

Juan Pablo Frene

juanpifrene@hotmail.com

Resumen

En este trabajo nos hemos propuesto estudiar la fisiología del suelo a través de métodos bioquímicos que caracterizan funciones biológicas a nivel de comunidades microbianas. Parametrizamos las respuestas fisiológicas de modo de transformar en datos cuantitativos las diferencias cualitativas que observamos entre diferentes muestras de suelo y poder compararlas cuantitativamente. Los perfiles fisiológicos a nivel de comunidades (CLPP por su siglas en inglés), medidos como consumos de oxigeno inducido por diferentes fuentes de carbono, mostraron variaciones estacionales. En verano, los CLPP de los suelos agrícolas, sin importar su manejo, se diferenciaban de los CLPP de los ambientes naturales. Mientras que en invierno los CLPP permitieron diferenciar suelos manejados con diferentes prácticas agrícolas a nivel de rotación de cultivos. Los CLPP permitieron también distinguir claramente entre suelos con diferente labranza y seguir la dinámica de un cambio de manejo de suelo entre siembra directa y labranza convencional. Complementando el análisis de los CLPP con la determinación de perfiles enzimáticos de los suelos en estudio pudimos mostrar que, luego de tres años de cambio de labranza, los suelos ya expresan un perfil fisiológico correspondiente al de su nuevo manejo. Con el objeto de ajustar la escala de estudio al análisis microbiológico, separamos el suelo en diferentes fracciones de agregados por tamaño utilizando tamizado en húmedo: 2000-63 µm, 63-20 µm, 20-2 µm y 2-0,1 µm. Los perfiles fisiológicos de las diferentes fracciones resultaron propios del tipo de agregado según su tamaño y no del manejo del suelo del cual provienen. De este modo, el perfil fisiológico global del suelo se establecería por la composición porcentual de sus diferentes tamaños de agregados. La siembra directa promueve un aumento en las proporciones de los agregados 2000-63 µm mientras que la labranza aumenta la proporción de los agregados 63-20 µm. Finalmente se analizó el cambio de manejo de labranza a nivel de las fracciones de agregados. A nivel funcional, cuando se analizó el perfil enzimático o el CLPP, no se encontraron diferencias entre los tratamientos agrícolas. Se

analizó la estructura microbiana a nivel de los diferentes tamaños de agregados por medio de la cuantificación por qPCR de los principales grupos microbianos: bacteria, hongos y arqueas. También se midieron grupos taxonómicos bacterianos de relevancia conocida en la biología del suelo. Los principales grupos microbianos fueron capaces de distinguir entre labranzas en la fracción de agregados 20-2 µm. La relación hongos: bacterias mostró que las fracciones 2000-250 y 250-63, se agrupan por sus sistemas de labranza actuales, sucediendo de de esta manera en la fracción de agregados 20-2 µm para las relaciones arqueas: bacterias y hongos: arqueas. Los grupos taxonómicos bacterianos en la LC, presentan una mayor abundancia relativa de los grupos de crecimiento rápido, en comparación con la SD para la fracción de agregados 2000-250 µm. Además se observa que las fracciones de agregados presentan una dinámica de cambio producto de la presión de selección tanto de las fracciones de agregados como de los manejos agrícolas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA, MICROBIOLOGÍA E INTERACCIONES BIOLÓGICAS EN EL SUELO (LBMIBS)

Estudio fisiológico del suelo bajo diferentes tratamientos agrícolas.

Tesis de Doctorado en Ciencia y Tecnología

Lic. Juan Pablo Frene

Director: Dr. Luis Gabriel Wall

“Science is more than a body of knowledge; it is a way of thinking”

Carl Sagan

“Look deep into nature, and the you will understand everything better”

Albert Einstein

A mi viejo, que es un viento que lo empuja todo, y a mi vieja, que es una persona de amor, que me han impulsado siempre a ser mejor persona.

Índice de contenidos

Agradecimientos……vii

Abreviaturas……xi

Organización de la tesis……xiii

Capítulo 1: Introducción general

1.1) Biología del suelo……3

1.1.1) Características del suelo……3

1.1.2) Definición y breve historia de la ecología……5

1.1.3) Biología del suelo……7

1.1.4) Ciclos de los elementos……11

1.1.4.1) Ciclo del carbono……12

1.1.4.2) Ciclo del nitrógeno……13

1.2) Los manejos agrícolas del suelo. ……15

1.2.1) De la Labranza Convencional a la Siembra Directa……15

1.2.2) Manejos agrícolas……16

1.2.3) Efecto de los manejos agrícolas sobre las comunidades microbianas del suelo……19

1.3) Introducción a los agregados del suelo……20

1.3.1) Definición y Formación. ……20

1.3.2) Distribución cuantitativa y cualitativa de los agregados……22

1.3.3) Distribución de la actividad de las enzimas extracelulares en los agregados del suelo……24

1.3.4) Influencia de los manejos agrícolas sobre los agregados del suelo……25

1.4) Métodos para el análisis del suelo……..27

1.4.1) Definición de calidad de suelo y técnicas para su estudio……..…27

1.4.2) Uso de los perfiles fisiológicos como herramienta para el estudio del suelo……..30

1.5) Objetivos e Hipótesis……34

Capítulos 2: Estudio de los Perfiles Fisiológicos a nivel de comunidades en la caracterización de manejos agrícolas en suelos en Siembra Directa

2.1) Introducción……37

2.2) Materiales y Métodos……..…39

2.2.1) Sitios de estudios y muestreo del suelo. ……..39

2.2.2) Preparación, inoculación y lectura de BDOBS……41

2.2.3) Análisis de la información de la fluorescencia……42

2.2.4) Análisis estadístico……...43

2.3) Resultados y discusión……44

2.3.1) Perfiles fisiológicos a nivel de comunidades de acuerdo a las prácticas agrícolas en suelos en Siembra Directa -Análisis ANOVAM de los CLPP por fuente de Carbono-……44

2.3.2) Análisis integral multivariado de los CLPP por tratamiento……...47

2.3.3) Análisis de los CLPP basados en muestras de suelos secos……...50

2.4) Conclusiones……53

Capítulo 3: Dinámica de un cambio en el manejo del suelo, de la Siembra directa a la Labranza Convencional y viceversa.

3.1) Introducción……57

3.2) Materiales y Métodos……59

3.2.1) Sitio de estudio y muestreo de los suelos. ……..57

3.2.2) Análisis de los Perfiles Fisiológicos a Nivel de las Comunidades (CLPP) de suelo. ……58

3.2.3) Análisis de la actividad de enzimas extracelulares (EAA)…….61

3.2.4) Cuantificación de la biomasa microbiana (Cmic)..……..61

3.2.5) Cuantificación de las fracciones de agregados. ..……...62

3.2.6) Mediciones de las variables químicas...…….....62

3.2.7) Análisis Estadístico……...…63

3.3) Resultados y discusión……....64

3.3.1) Caracterización química de las muestras…….64

3.3.2) Caracterización Física de las muestras……68

3.3.3) Caracterización fisiológica: análisis de las EEA. ……71

3.3.4) Análisis de los Perfiles Fisiológicos a Nivel de Comunidades (CLPP)…81

3.3.5) Análisis de correlaciones ……84

3.4) Conclusiones……...88

Capitulo 4: Estudios bioquímicos del suelo a nivel de fracciones de agregados.

4.1) Introducción……93

4.2) Materiales y métodos……95

4.2.1) Descripción de los sitios……..95

4.2.2) Fraccionamiento del suelo. ……96

4.2.3) Extracción de ADN……...97

4.2.4) Cuantificación de los grupos microbianos principales por qPCR…….97

4.2.5) Análisis de los Perfiles Fisiológicos a Nivel de las Comunidades (CLPP) de suelo……..……98

4.2.6) Análisis de la actividad de enzimas extracelulares (EAA). ……...98

4.2.7) Análisis Estadístico. ……99

4.3) Resultados y discusión……..101

4.3.1) Resultados de los suelos de Funke……101

4.3.1.1) Análisis del suelo sin fraccionar. ……101

4.3.1.2) Distribución de las fracciones de agregados……102

4.3.1.3) Cuantificación del ADN extraído. ……103

4.3.1.4) Cuantificación de los grupos microbianos principales……..…104

4.3.1.5) Análisis de las actividades de las enzimas extracelulares (EEA)……..105

4.3.1.6) Análisis de las comunidades fisiológicas a nivel de comunidades (CLPP)……110

4.3.2) Resultados de los suelos de Las Matreras……114

4.3.2.1) Análisis del suelo sin fraccionar. ……114

4.3.2.2) Distribución de las fracciones de agregados……..115

4.3.2.3) Cuantificación del ADN extraído……..117

4.3.2.4) Cuantificación de los grupos microbianos principales……..118

4.3.2.5) Análisis de la actividad de las enzimas extracelulares

(EEA)……...119

4.3.2.6) Análisis de las comunidades fisiológicas a nivel de comunidades (CLPP)……122

4.4) Conclusiones....……..125

Capítulo 5: Estudios de la dinámica de cambio de las prácticas agrícolas a nivel de fracciones de agregados

5.1) Introducción…….129

5.2) Materiales y métodos…….131

5.2.1) Descripción del sitio……131

5.2.2) Fraccionamiento del suelo. ……...131

5.2.3) Extracción de ADN……132

5.2.4) Cuantificación de grupos y filos microbianos por qPCR……..133

5.2.5) Análisis de los Perfiles Fisiológicos a Nivel de las Comunidades (CLPP) de suelo……134

5.2.6) Análisis de la actividad de enzimas extracelulares (EAA)……...135

5.2.7) Análisis Estadístico……135

5.3) Resultados y discusión……..…137

5.3.1) Distribución de las fracciones de agregados……137

5.3.2) Análisis de la actividad de las enzimas extracelulares. ……..138

5.3.3) Análisis de los perfiles fisiológicos a nivel de comunidades (CLPP)….142

5.3.4) Análisis cuantitativo de la estructura de las comunidades microbianas……..……..144

5.3.5) Relación entre los grupos bacterianos y las actividades bioquímicas...163

5.4) Conclusiones……...168

Capítulo 6: Conclusiones general…...……171

Anexo I: Diseño y puesta a punto del Sistema Biosensor de Oxígeno basado en PtTFPP.

A.1) Introducción…….181

A.2) Materiales y Métodos……183

A.2.1) Protocolo de diseño del OBS. ……183

A2.2) Ensayo de centrifugación con cloroformo. ……183

A2.3) Ensayo con diferentes concentraciones de PtFTPP……183

A2.4) Ensayo con diferentes concentraciones de Oxido de Titanio (IV)……..184

A2.5) Caracterización del PtFTPP en la placa……..184

A2.6) Comparación entre las placas OBS y BDOBS. ……184

A2.7) Métodos de esterilización……185

A.2.8) Análisis de la información de la fluorescencia. ……185

A2.9) Análisis estadístico…….....185

A.3 Resultados y discusión……187

A3.1) Aspectos físicos del sistema OBS……187

A3.2) Ensayo con diferentes concentraciones de PtFTPP……188

A3.3) Ensayo con diferentes concentraciones de Oxido de Titanio (IV)…..…189

A.3.4) Caracterización de la microplaca sensible a O2……..189

A.3.5) Comparación entre las placas OBS y BDOBS……190

A.3.6) Métodos de esterilización……192

A.4 Conclusiones……193

Bibliografía……195

Agradecimientos

Quiero agradecer al Estado Nacional, al CONICET y a la Universidad Nacional de Quilmes que me permitieron realizar esta tesis de doctorado.

A Luis Wall, mi director. Por su apoyo y paciencia.

A Luciano Gabbarini que me introdujo en este mundo científico y a Beti Agaras por guiarme en un mundo desconocido para mí; a ambos gracias por sus aportes tanto personales como científicos. A Bel y Juli que me dejaron compartir con ellas los últimos años.

A mis compañeros e integrantes del Laboratorio de Bioquímica, Microbiología e Interacciones Biológicas en el Suelos: Anto, Ger, Ale, Pato, Lean, Leo, Indra, Flor, Mel, Tomas, Claudio, Juli, Dali y Andi.

A Bruno, a Mary y a todo el resto del personal de universidad.

A Ivana mi compañera, consejera y por sobre todas las cosas mi amiga desde que la conocí en nuestros comienzos universitarios.

A Nicolas, el hermano que me dio la vida.

A la gente de Quilmes que siempre me hizo sentir bien. A mis mamás de acá, Silvia y Mirto. A Carlos y María Silvia que me abrieron las puertas de su casa como un hijo más. A Ale esa persona especial que siempre está. A Agus, por las charlas, los diseños, por las charlas y las comidas. A Romi. A Anas por todo el apoyo en el momento más difícil y el silencio más largo.

Al Circulo Universitarios de Quilmes, y a toda la celeste. A Mauro, Juan, Joacos, Sasa y demás personas que hicieron del club mi segundo hogar.

A mis hermanos, dos personas increíbles como son Ema y Gabi.

A mis abuelas y abuelo. A mis tíos Andrés, Juan y Jorge. Mis primos.

A Berna, por su amor incondicional, transmitirme la curiosidad por la lectura y los mimos de una madre a un hijo.

A Carlos por guiarme, apoyarme y empujarme en todo.

Abreviaturas

AAPRESID Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa

ACoP Análisis de coordenadas principales

AN Ambiente Natural

ANOVA Análisis de la varianza

ANOVAM Análisis de la varianza multivariado

AUC8 Área bajo la curva a las 8 horas

AUC24 Área bajo la curva a las 24 horas

BG β-Glucosidasa

BIOSPAS Biología del Suelo y Producción Agropecuaria Sustentable

BPA Buenas Prácticas Agrícolas

Bt horizonte B textural

C Carbono

CEL Celobiohidrolasa

CFE Coeficiente de fumigación-extracción

CLPP community level physiological profile. Perfil fisiológico a nivel de comunidades

Cmic Carbono de la Biomasa microbiana

CO_2dióxido de carbono

CONICET Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

COPg carbono orgánico particulado grueso

COT carbono orgánico total.

EEA Extracelular enzymes activities. Actividad de las enzimas extracelulares.

EE.UU. Estados unidos.

Fmax Pico máximo de actividad.

H horas

Hs hectáreas

H_2Od agua desionizada

HMA hongos micorrícicos arbusculares

H_2SO_4 ácido sulfúrico

LSD sigla en inglés, Least Significant Difference Mínima diferencia significativa

LBMIBS Laboratorio de Bioquímica, Microbiología e Interacciones Biológicas en el suelo

MES 2-(N-morpholino)-ethanesulfonicacid. Acido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico

MUB Metilumbeliferona

MPA Malas Prácticas Agrícolas

Min Minutos

Ml Mililitros

mM Milimolar

N nitrógeno

NAG N-acetil-glocosaminidasa

N-LC Nueva labranza convencional

N-SD Nueva siembra directa

O_2 Oxigeno

P Fósforo

Pext Fósforo extraíble

pH Potencial de hidrogeno

PLFA Phospholipid-derived fatty acids. ácidos grasos derivados de fosfolípidos

PME Phosphatase, Fosfatasa acida

% Porcentaje

Rpm Revoluciones por minuto

S Azufre

SD siembra directa

SUL Arilsulfatasa

TMR Tiempo de respuesta máximo

µg microgramo

µl microlitro

µm micrómetro

Organización de la tesis.

En este trabajo doctoral se analizan los cambios en el suelo producidos por los manejos agrícolas diferentes, siembra directa (SD) y labranza convencional (LC) Y además, la influencia de prácticas con diferentes rotaciones de cultivos en SD. Este trabajo comienza con introducción general a los temas estudiados (Capitulo 1). El análisis se dividió, primero, en establecer un método de caracterización de las prácticas agrícolas a través de los CLPP (Capitulo 2); a continuación una comparación entre la SD y la LC, y la dinámica de cambio a lo largo de 3 años cuando estos manejos son intercambiados (Capitulo 3); posteriormente, se comparo entre la SD y LC a nivel de las fracciones de agregados que componen el suelo (Capitulo 4); finalmente como impactan estos cambios de manejos a nivel de fracciones de agregados (Capitulo 5). En forma de conclusiones generales, se presentan las contribuciones y conclusiones de este trabajo (Capitulo 6).

En el Anexo I se describe el desarrollo y puesta a punto de la fabricación de un sistema biosensor de oxigeno (OBS) basado en el flouróforo PtTFPP.

La estructura de cada capítulo se divide en: introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, y conclusiones.

Capítulo 1

Introducción

1.1) Biología del suelo.

1.1.1) Características del suelo.

El suelo es algo fundamental e irremplazable para el mantenimiento de la vida, es el sostén de la fauna y la flora y donde se encuentran una gran parte de los microorganismos que llevan a cabo los ciclos biogeoquímicos de nuestro planeta. El suelo es un sistema vivo. Los microbios y las enzimas (tanto provenientes de los microorganismos como de las plantas), transforman la materia orgánica de los ecosistemas terrestres y liberan la energía almacenada en el suelo o utilizan la energía aportada por la fotosíntesis de las plantas que crecen en el mismo, a través de los exudados radiculares que liberan a su entorno. Dada su increíble capacidad para descomponer casi todo lo que se ponga en su camino, los habitantes del suelo en su conjunto constituyen una fábrica recicladora que toma el carbono de la materia orgánica, y lo transforman tanto en biomasa microbiana como en dióxido de carbono (CO_2) que devuelven a la atmósfera por el proceso de respiración. Las bacterias también producen, además de enzimas extracelulares, metabolitos secundarios involucrados en la humificación y agregación del suelo como los polisacáridos. Se ha acuñado el término de respiración del suelo para describir el consumo de oxigeno o exhalación de CO_2 colectiva de la comunidad viva del suelo e incluye el intercambios de gases producto del metabolismo aeróbico y anaeróbico, dado que el dióxido de carbono es un producto de desecho genérico del metabolismo celular (Anderson, 1982).

El suelo tiene algunas características que lo hacen especial y distintivo (Figura 1.1). Inicialmente el suelo es un sistema que se encuentra estructurado, heterogéneo y discontinuo. Generalmente pobre en nutrientes y fuentes de energía, los microorganismos suelen vivir en microhábitats discretos (*hotspots*). Las características químicas, físicas y biológicas de los *hotspots* difieren en tiempo y espacio. Y las escalas de estas zonas de mayor actividad biológica dependen principalmente del tipo de organismo: unos pocos micrómetros (μm) para las bacterias; menos de 100 μm para los hongos, entre 100 μm y 2 milímetros (mm) para la mesofauna y entre 2 y 20 mm para la macrofauna. El espacio ocupado por los microorganismos representa una pequeña proporción de suelo, generalmente es menor al 5% de todo el espacio disponible (Ingham et al., 1985). Otra particularidad de los *hotspots* es que pueden tener diferentes orígenes y propiedades fisicoquímicas, como lo son los microporos de los agregados, la rizósfera, los agregados biogénicos o los desechos de animales (Nannipieri et al., 2003). Además de las fuentes de carbono y energía, existen una

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

infinidad de factores ambientales que influyen sobre los *hotspots*, como pueden ser los nutrientes minerales, factores de crecimiento, composición iónica, disponibilidad de agua, temperatura, presión y potencial de aire. Estos componentes y otros más pueden afectar la estructura, actividad y dinámica de población de los habitantes del suelo. Asimismo pueden cambiar drásticamente, por lo cual los microhábitats del suelo son necesariamente, sistemas dinámicos (Tilman, 1994).

La población microbiana del suelo es muy diversa, se calcula que en un solo gramo de suelo hay más de 10.000 genomas bacterianos diferentes. Y la biomasa de la población microbiana es más grande aun, con cerca de 1.000 millones de bacterias, más de 200 metros de hifas fúngicas, y un amplio rango de ácaros, nematodos, lombrices y artrópodos (Wagg et al., 2014).

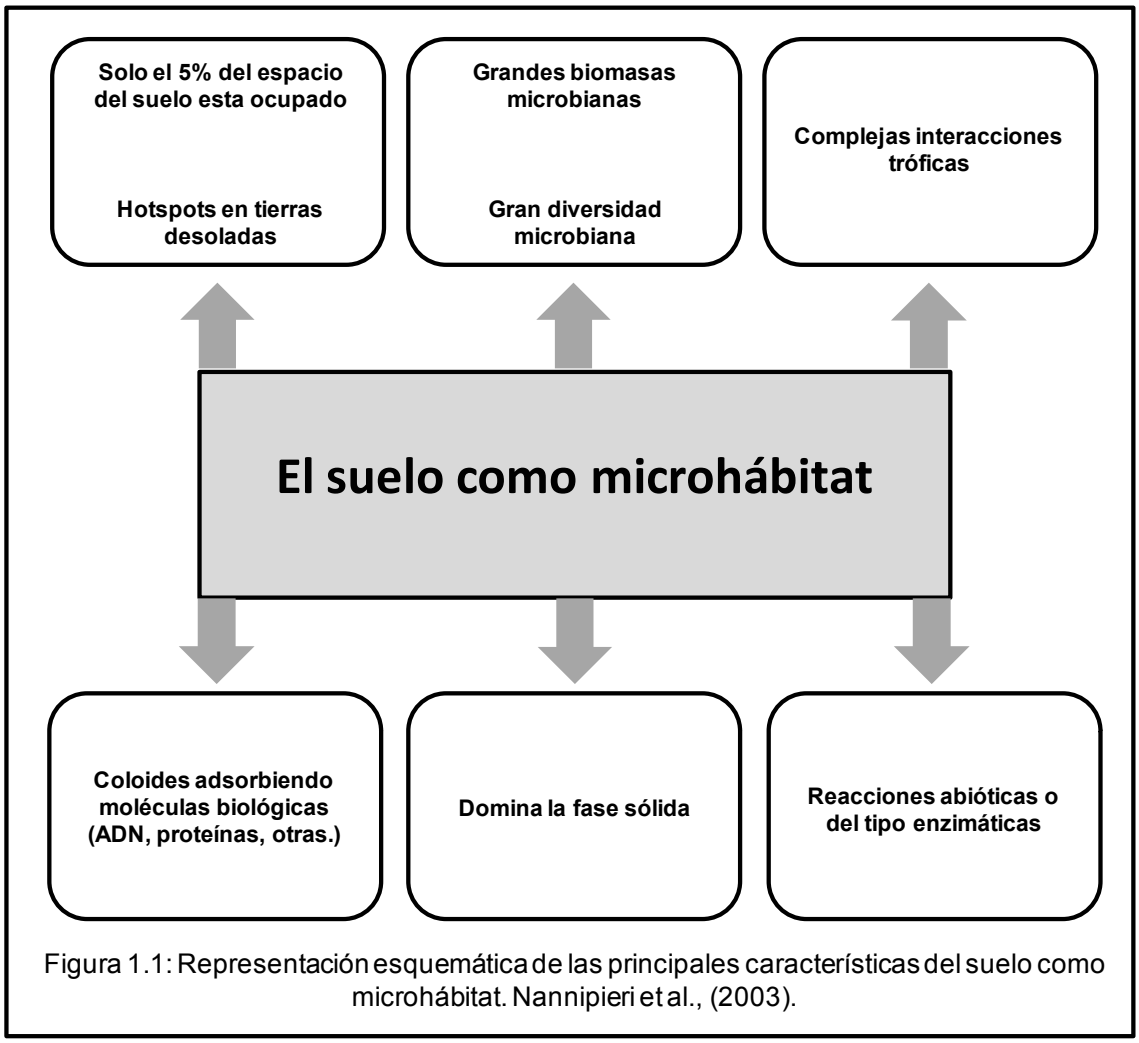

Figura 1.1: Representación esquemática de las principales características del suelo como microhábitat. Nannipieri et al., (2003).

Otra característica distintiva del suelo, es la capacidad de adsorber en la fase sólida del suelo importantes moléculas biológicas como lo son las proteínas o el material genético. De esta forma, las enzimas extracelulares adsorbidas en las arcillas y ácidos

húmicos pueden mantener su actividad, siendo protegidas contra la proteólisis, o contra la desnaturalización térmica o la desnaturalización por pH. Las moléculas de los Ácidos Desoxirribonucleicos (ADN) adsorbidas o unidas a moléculas húmicas también quedarían protegidas evitando la degradación por nucleasas, e incluso podrían ser tomadas por bacterias e incorporadas a su ADN genómico, en un procesos de transformación vital para la evolución. Cerca del 40% del ADN extraído del suelo utilizado para realizar estudios por medio de PCR se cree que podría ser ADN de organismos muertos (Carini et al., 2016).

1.1.2) Definición y breve historia de la ecología.

La ecología analiza los seres vivos y el entorno que los rodea, entendiendo al sistema como la combinación de los factores abióticos (el clima y la composición del suelo) y los factores bióticos (organismos que comparten el hábitat). La *Ökologiees* es un concepto que data de 1860 y fue acuñado por el biólogo y filósofo de origen alemán Ernst Haeckel. Esta palabra está compuesta por dos vocablos griegos: *oikos* (que significa “casa”, “residencia” u “hogares”) y *logos* (termino que se entiende como “estudio”). Por eso, la ecología se define con precisión como “el estudio de los hogares”. Haeckel fue un ferviente evolucionista y popularizo los trabajos de Darwin en Alemania, así como también acuño el término phylum o filo (Haeckel et al., 1892).

La ecología microbiana del suelo es el campo de la ciencia que estudia las relaciones entre los microorganismos y sus hábitats bióticos y abióticos en el suelo (Paul, 2014). Desde su fundación en el siglo XIX con los trabajos de Beijerinck y Winogradsky, la microbiología ambiental ha estado enfocada en como los microorganismos en los ambientes terrestres y acuáticos cambian nuestro mundo. Estos científicos enfocaron sus trabajos en examinar las transformaciones microbianas del azufre y el nitrógeno en los suelos. Aclararon las reacciones del ciclado biogeoquímico global y las aportaciones de los microorganismos a la fertilidad del suelo.

Desde la década del 60´ del siglo XX, la ecología microbiana comenzó a desarrollarse y especialmente durante la década del 70´, se afianzó como una rama estable de la ciencia. Durante todo el desarrollo de la ecología microbiana, se buscó comprender la fisiología fundamental de los microbios y sus consecuencias ambientales. La búsqueda de microorganismos en la naturaleza y la determinación de sus actividades metabólicas con significado funcional en los ecosistemas fue el centro de interés científico en el estudio de la ecología microbiana durante la primera parte del siglo XX.

En la segunda parte del siglo pasado, el gran paso fue el descubrimiento de la doble hélice de ADN publicado por Watson y Crick en 1953, y en combinación con el desarrollo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, de ***P**olimerase **C**hain **R**eaction*) por Mullis en 1986, dieron lugar al avance de técnicas moleculares basadas en el análisis de los ácidos nucleícos (Bartlett & Stirling, 2003). Lo que permitió acceder a lugares desconocidos hasta el momento. Uno de los desarrollos más recientes es la secuenciación metagenómica, basada en el análisis masivo de las secuencias de ADN extraídas de una muestra, ha proporcionado una oportunidad única para explorar en mayor profundidad los ambientes de nuestro planeta (Janssen, 2006). Esta nueva expansión de la frontera tecnológica posibilita dar un paso hacia la respuesta de las preguntas más comunes en la microbiología ¿Cuáles especies habitan tal ambiente?; ¿Qué están ellos haciendo ahí y cómo lo están haciendo? (Prakash & Taylor, 2012).

El estudio de la distribución espacial de las comunidades microbianas del suelo está impulsado por el interés en tener una mejor interpretación de las funciones microbianas (Figura 1.2) pero también para identificar los factores que regulan las funciones y dinámicas de las comunidades, y en consecuencia, del suelo mismo (Nunan et al., 2007). La ciencia actual busca, a través de sus análisis e interpretaciones, construir modelos de los procesos ecológicos a partir de la parametrización de las propiedades fisiológicas de las comunidades microbianas tales como la tolerancia a la sequía (Manzoni et al., 2014), la eficiencia del crecimiento microbiano (Hagerty et al., 2014), la latencia microbiana (Wang et al., 2015), y la taza de ciclado de los nutrientes (Wieder et al., 2013). Otros estudios han demostrado que el patrón global de la estructura de las comunidades microbianas estaría direccionada por los factores ambientales abióticos en estos casos, como la salinidad (Auguet & Casamayor, 2013), el pH (Lauber et al., 2009) y el tipo de hábitat (Fierer et al., 2012).

Figura 1.2 :Diagrama de la organización habitantes-ecosistema.

Con el fin de obtener mejores predicciones de las variaciones en los procesos ecosistémicos, se busca relacionar la estructura de la comunidades microbianas con sus funciones ecosistémicas (Graham et al., 2016). Sin embargo, estos modelos aún no pueden

predecir de manera acertada los vínculos entre la estructura y función de los ecosistemas.

1.1.3) Biología del suelo.

Las plantas, los animales y los microorganismos han co-evolucionado por varios cientos de millones de años en el suelo. Esto ha dado como resultado una serie de interacciones muy complejas e íntimas, que forman un sistema auto-organizado que regula los flujos de los diferentes servicios del ecosistema. Las plantas u otros organismos fotosintéticos proveen substratos orgánicos necesarios para el funcionamiento de los sistemas, en particular para los organismos asociados a las raíces. La composición de las comunidades vegetales influencian principalmente las comunidades biológicas del suelo alrededor de sus raíces y también a través de sus restos cuando mueren (Wardle et al., 2004).

Las poblaciones que habitan el suelo comprenden a los microorganismos (hongos, arqueas, bacterias, protozoos) y a los invertebrados. Los invertebrados son un grupo biológico muy diverso y pueden clasificarse en tres subgrupos de acuerdo al rango de su tamaño (Figura 1.3). 1) La **macrofauna**, que incluyen a aquellos con un tamaño mayor a 2 mm, como son por ejemplo los formícidos (hormigas), quilópodos (ciempiés), isópodos (bichos bolitas), isóptera (termitas), los artrópodos (insectos, miriápodos, crustáceos y arácnidos), oligoquetos (lombrices) y moluscos (caracoles y babosas); 2) la **mesofauna**, comprende organismos de menor tamaño que los anteriores, de 2 a 0,2 mm de diámetro, la cual incluye: ácaros (Acari), colémbolos (Collembola), sínfilos (Symphyla), proturos (Protura), dipluros (Diplura), paurópodos (Pauropoda), tisanópteros (Thysanoptera), socópteros (Psocoptera), enquitreidos (Enchytraeidae) y polixénidos (Polixenida); 3) la **Microfauna** incluye los organismos menores a 0,2 mm, que comprenden principalmente a los protozoos y a los nematodos (Postma-Blaauw et al., 2010). En suelos con ausencia de macro y microfauna, se detectaron cambios en la biomasa microbiana y en la descomposición de la materia orgánica, resultando en dinámicas de nutrientes alteradas (Bradford et al., 2002)

La **microflora** está compuesta principalmente por las bacterias, los hongos y las arqueas, y un sinfín de otros integrantes como lo son los virus y bacteroidetes, pudiendo llegar a representar cerca del 80% de la biomasa del suelo (Nannipieri et al., 2003). Las comunidades microbianas del suelo pueden ser definidas como

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ensamblajes multi-especies, en la cual los organismos viven de manera conjunta en un ambiente contiguo e interactúan entre sí (Konopka, 2009).

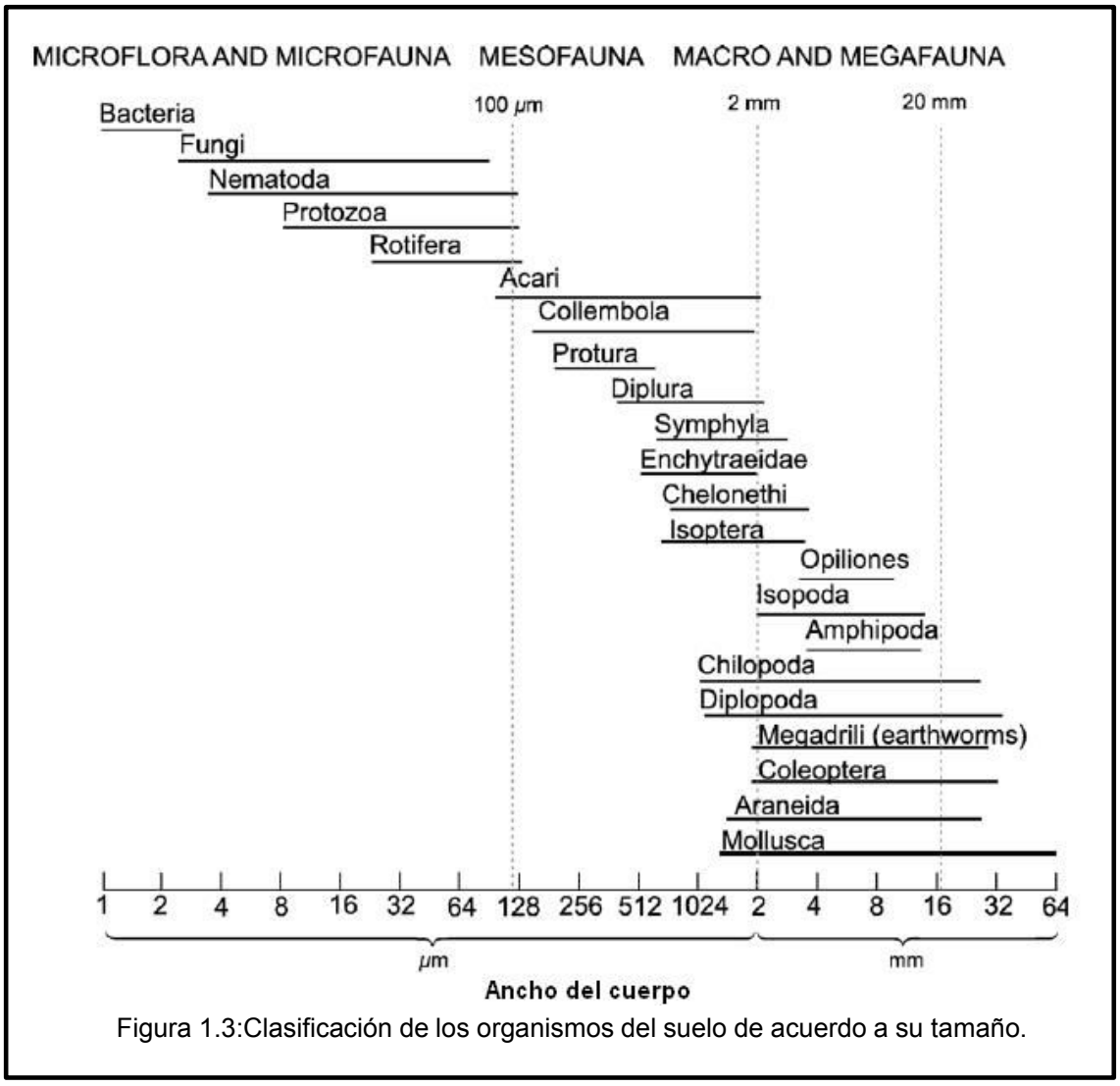

Figura 1.3:Clasificación de los organismos del suelo de acuerdo a su tamaño.

Tres tipos de organismos dominan las comunidades microbianas del suelo: los hongos, las bacterias y las arqueas. Las bacterias son responsables primarios en la descomposición de sustratos simples (Jones et al., 2009) como las moléculas orgánicas de bajo peso molecular presentes en los exudados de los raíces. Los hongos también se alimentan de los exudados de raíces (Waldrop & Firestone, 2006). Diferencias fundamentales en la fisiología de las bacterias y los hongos sugieren que la distribución de cada grupo es controlada por factores edáficos diferentes, como una mayor cantidad de carbono (C), una relación mayor de carbono/nitrógeno (N) y un menor pH (Rousk & Bääth, 2011, 2007; van der Wal et al., 2006). Por otro lado, a las arqueas se les reconoce cada vez mayor importancia en los ciclos bioquímicos del N (Figura 1.4, Fierer et al., 2007).

Los **hongos** tienen un rol importante de la descomposición de moléculas orgánicas complejas o de mayor tamaño, como lo son los materiales derivados de plantas, la celulosa y la lignina. Los hongos son un grupo muy diverso de organismos, que abarca un amplio rango de formas desde células unicelulares microscópicas hasta grandes estructuras reproductivas macroscópicas como son los hongos de sombrero. Se estima que existen más de 1,5 millones de especies (pero solo el 15% aproximadamente puede ser cultivado en un laboratorio) y la gran mayoría de las especies de los hongos tienen parte de su ciclo celular asociado directamente o indirectamente con el ecosistema del suelo. Su rol en el suelo es extremadamente complejo y sería fundamental para el mismo (Bridge & Spooner, 2001). La composición o estructura de las comunidades fúngicas en el suelo está determinada por la disponibilidad de nutrientes, principalmente la relación C/N y el fósforo (P). Cambios en la calidad de los sustratos, en la relación C/N, y la disponibilidad de P han sido conectados con los cambios en la abundancia y diversidad de los hongos (Lauber et al., 2008). Los Ascomicotas y Basidiomicotas son importantes especies fúngicas en la mayoría de los suelos. Chen et al., (2014) encuentran estos dos grupos de hongos como predominantes de todas las fracciones de agregados del suelo al separar el suelo por tamizado en húmedo, lo que sugiere la amplia dispersión de estas especies y su importante rol en los sistemas agroecológicos. Los Basidiomicotas producen polisacáridos que están involucrados en la agregación de los suelos, jugando un rol importante en la estabilidad de la estructura del suelo (Caesar-Tonthat, 2002). Los Glomeromicotas, los cuales son conocidos por formar hifas y contribuir a la estabilidad de los agregados, también se han encontrado en todas las fracciones de agregados (Chen et al., 2014).

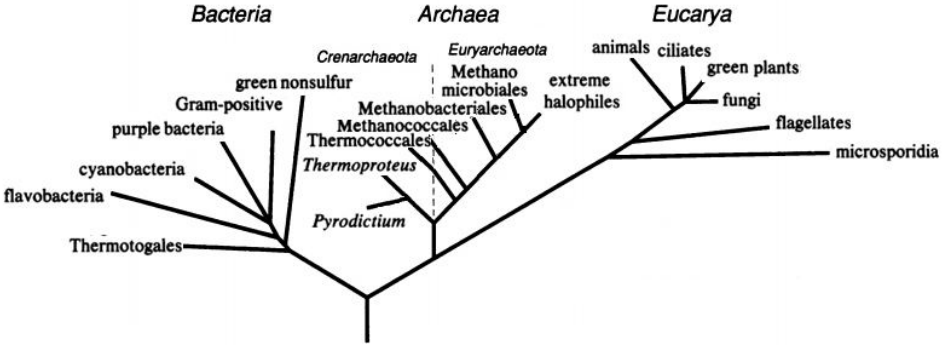

Figura 1.4: Primer árbol filogenético universal mostrando los tres dominios. Las ramificaciones del árbol están basadas en la comparación de secuencias conocidas Woese et al., (1990).

Las **arqueas** fueron reconocidas como un dominio independiente de las bacterias a principio de la década de 1990 (figura 1.4). Originalmente, se las consideraba

bacterias extremófilas, que vivían en ambientes de características abióticas extremas en términos de pH, temperatura o salinidad. Con el uso de técnicas moleculares y el estudio de muy diversos ambientes hoy se sabe que las arqueas se encuentran presentes en un amplio rango de sitios, como aguas marinas, fuentes hidrotermales, sedimentos hipersalinos y todo tipo de suelos (Bates et al., 2011). Recientemente se ha llegado a una serie de conclusiones acerca de la variables ambientales que influencian la abundancia y diversidad de este dominio (Angel et al., 2010; Nicol et al., 2008; Zhang et al., 2009). Por otro lado, varios investigadores plantean que hay evidencia que sugiere que las arqueas podrían tener una función importante en el ciclo del N, donde se ha postulado que las arqueas que oxidan amonio son más abundantes en el suelo que las bacterias que cumplen el mismo rol (Leininger et al., 2006).

Los avances recientes en la cuantificación y visualización de la diversidad microbiana en sus ambientes naturales por medio del desarrollo de técnicas de secuenciación masiva de ADN han dado origen a nueva era en la exploración microbiológica. Ha cambiado radicalmente la forma tradicional de ver la taxonomía de las bacterias (Green et al., 2008). La aplicación de estas técnicas permite explorar, y caracterizar los más diversos ecosistemas (McGrath et al., 2008) mostrando grandes diferencias entre los mismos. La figura 1.5 muestra, por ejemplo, las diferencias de composición bacteriana de sistemas como el suelo, el agua de lago y residuales, y la cavidad bucal de los mamíferos. En los ecosistemas terrestres, existe una mayor heterogeneidad espacial que en las columnas de agua, y pueden desarrollarse miles de diferentes nichos ecológicos y patrones espaciales de las comunidades microbianas a mucha menor escala (Philippot et al., 2010).

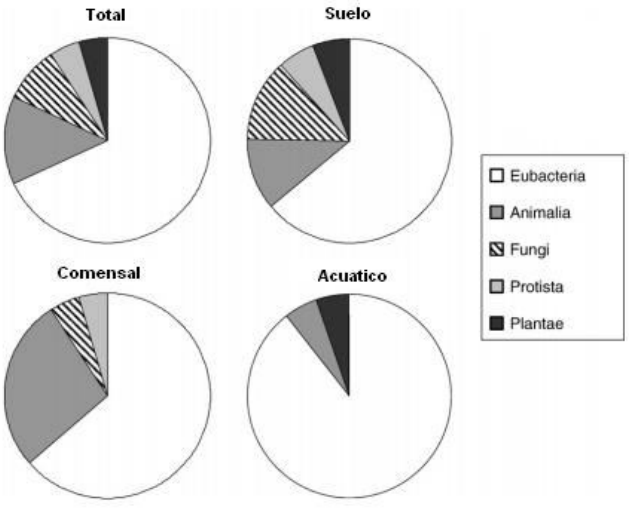

Figura 1.5 :Distribución de las secuencias de cDNA obtenidos de diferentes comunidades microbianas ambientales basada en dominio taxonómicos. *Suelo*: suelos con caña de azúcar, suelo de jardín y compost; *acuático*: agua de lago y agua residuales; *comensal*: rumen de vaca, muestras bucales humanas y materia fecal humanas McGrath et al., 2008.

La diversidad de las comunidades bacterianas puede analizarse de diferentes maneras. El uso de la teoría de la estrategia

de crecimiento puede resultar útil en algunos casos. Según esta teoría los organismos se agrupan en estrategas R o estrategas K (Winogradsky, 1924). En general, los estrategas R son especies que están adaptadas a maximizar su tasa de crecimiento cuando los recursos son abundantes mientras que los estrategas K están adaptados a competir y sobrevivir cuando los recursos son limitados y las poblaciones están cerca del límite de la capacidad de carga del ecosistema. También es posible llamar a los estrategas R como organismos copiotróficos, y a los estrategas K como oligotróficos (Tate et al., 2000). Por medio de esta teoría simplificada es posible caracterizar los diferentes filos bacterianos. Por ejemplo, las Betaproteobacterias y los Bacteroidetes son considerados estrategas copiotróficos, en cambio, las Acidobacterias y Actinobacterias pertenecen a los estrategas oligotróficos. Como lo sugiere el nombre de este filo, varios subgrupos del filo Acidobacterias tienen una preferencia por los suelos con pH acido, por lo cual la abundancia relativa de las Acidobacterias en el total de las bacterias correlaciona negativamente con el pH del suelo (Fierer et al., 2007a). La estructura de las comunidades bacterianas del suelo ha sido correlacionada con el pH y la textura del suelo (Fierer et al., 2012). El pH del suelo podría ejercer un estrés directo sobre las células bacterianas con ciertos pH seleccionando algunos filos sobre otros, como las Acidobacterias (Rousk et al., 2010). Por otro lado, los suelos con misma textura tienen casi idénticas comunidades bacterianas basados en análisis de ADN (Lauber et al., 2008).

Hay evidencia de que los niveles taxonómicos más altos de las bacterias como los filos o clases presentan "coherencia ecológica". Esto significa que los miembros de un taxón comparten estrategias de vida similares o rasgos que los distinguen a ellos de los miembros de otros grupos taxonómicos (Philippot et al., 2010).

1.1.4) Ciclos de los elementos.

Los diferentes hábitats de la tierra presentan un complejo gradiente de condiciones ambientales que incluyen variaciones extremas de temperatura, luz, pH, salinidad y componentes orgánicos e inorgánicos. Cada ambiente geoquímico contiene su propio conjunto de recursos que pueden ser explotados fisiológicamente por los microorganismos. Los microorganismos son los agentes primarios del cambio, debido a sus capacidades metabólicas que los hacen únicos para llevar a cabo los procesos biogeoquímicos. Su diversidad nutricional/enzimática los posiciona en un rol fundamental como agentes direccionadores de los ciclos de los nutrientes. Muchos

procesos biogeoquímicos no son catalizados por microorganismos individuales, sino por poblaciones cooperativas que conforman consorcios microbianos (Madsen, 2005).

1.1.4.1) Ciclo del carbono

Globalmente, la cantidad de **carbono** almacenada en el suelo es la segunda mayor detrás de los océanos. Aproximadamente 2344 Gt de carbono orgánico se encuentra almacenado en el suelo, de los cuales 620 Gt está almacenado en los primeros 20 cm de profundidad. En el ciclo del carbono, el balance entre la producción primaria (fotosíntesis), la descomposición y la transferencia lateral de la materia orgánica del suelo (MOS) determina la cantidad de carbono orgánico secuestrado en el suelo (Figura 1.6; Causarano et al., 2007). Durante la fotosíntesis, los compuestos orgánicos son generados como resultados de la fijación del dióxido de carbono en moléculas de glucosa para luego utilizarlas para construir moléculas orgánicas más complejas. Las plantas y microbios fotosintéticos son los productores primarios de compuestos orgánicos de carbono y estos proveen nutrientes para otros organismos. Este segundo grupo de microorganismos actúa como consumidores de carbono orgánico y transforman estos compuestos de carbono a través de los procesos de la fermentación y la respiración para utilizarlos en la producción de biomasa microbiana. Los microbios *quimiorganotroficos*, como son la mayoría de las bacterias, degradan los compuestos orgánicos de carbono a partir de donde obtienen substratos y energía, y liberan CO_2 como producto final. A su vez, las bacterias *quimiolitotroficas*, como son las del género *Nitrobacter*, pueden asimilar carbono inorgánico en materia orgánica en ausencia de luz, tomando la energía necesaria de la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos. Ciertas bacterias son capaces de realizar el ciclado del carbono en anaerobiosis, a través de la fermentación.

Figura 1.6 : Vía metabólica principal del flujo de los nutrientes. Buchkowski et al., 2017

Este proceso es muy común en bacterias que se encuentran en agua o en zonas del suelo anaeróbicas y son responsables de la ruptura de compuestos orgánicos en CO_2 y metano. El metano puede actuar por si solo como fuente de carbono y energía para otras bacterias, las llamadas *oxidadoras de metano*. Estas bacterias generan azucares y aminoácidos desde las fuentes de metano en sus ambientes, ayudando con el ciclado de los compuestos de carbono. Una parte importante del ciclo del carbono en el suelo es llevado a cabo por los microorganismos en la degradación de polímeros de las plantas, celulosa, hemicelulosa, quitina y lignina, que se incorporan al suelo como rastrojos, y que es llevada a cabo por los microorganismos.

1.1.4.2) Ciclo del nitrógeno.

El ciclo del **nitrógeno** es central en la biogeoquímica de la tierra, con grandes flujos de nitrógeno desde la atmosfera hacia los ecosistemas terrestres y marinos a través de la fijación biológica del nitrógeno (FBN), en la cual el N_2 gaseoso de la atmósfera es reducido a compuestos de amonio por acción de la enzima *nitrogenasa*. Las bacterias y las arqueas son las únicas formas vivientes capaces de realizar la FBN (Figura 1.7), por ello tienen un rol importante en el proceso de la vida en nuestro planeta. Los genes que determinan la fijación del nitrógeno, como los genes *nif* que codifican la nitrogenasa, están sometidos a una rigurosa regulación génica (Nelson et al., 2016).

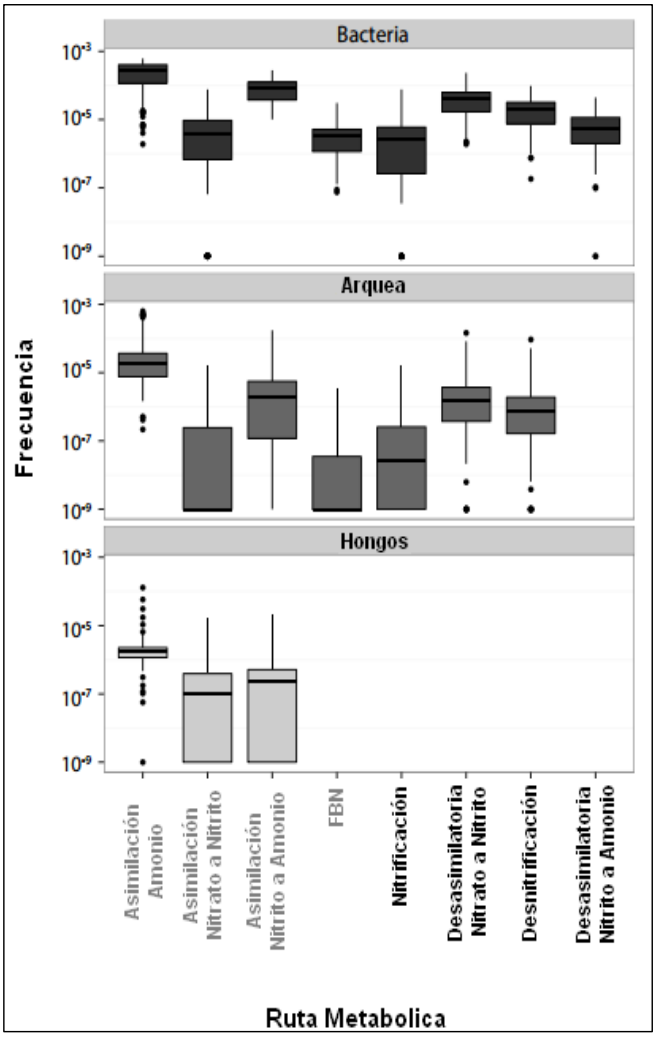

Figura 1.7: Frecuencia de aparición de los genes involucrados en la rutas metabólicas del N por Bacterias, arqueas y hongos. Nelson et al., (2016).

Las plantas verdes son los principales productores de materia orgánica en la biosfera y para ello requieren un flujo constante de N para

llevar a cabo este proceso. El nitrógeno orgánico puede obtenerse a través de la muerte y lisis de los organismos de vida libre que fijan. Sin embargo, las bacterias fijadoras de nitrógeno frecuentemente forman asociaciones cercanas con las plantas, por medio de relaciones *simbióticas*. En algunos casos, la relación es tan íntima que las bacterias viven como *endosimbiontes* dentro de los tejidos de las plantas. Las bacterias suplementan a las plantas con todo el nitrógeno que necesitan. A cambio las bacterias reciben compuestos orgánicos de carbono. Los compuestos inorgánicos de nitrógeno como los nitratos, nitritos y amonio son convertidos en compuestos orgánicos de nitrógeno como proteínas y ácidos nucleícos en el proceso de *asimilación del nitrógeno*. Las formas oxidadas del N se reducen primero a amonio y luego el amonio es asimilado por la vía de los aminoácidos como glutamato y la glutamina. A partir de estos aminoácidos se generan otros compuestos nitrogenados. Diferentes especies de bacterias y arqueas participan en estos pasos del ciclo del N (Figura 1.7; Falkowski et al., 2008).

Para cerrar el ciclo, los compuestos orgánicos del N deben ser degradados para liberar el amonio. Las bacterias nitrificantes son las responsables de la *oxidación biológica del amonio* (Kraft et al., 2011). Este tipo de bacterias involucradas son quimiolitotrofas. La energía obtenida en los procesos oxídativos se utiliza para elaborar compuestos desde el CO_2. Las bacterias nitrificantes tales como las pertenecientes al género *Nitrosomas* producen iones nitrito a partir de la oxidación del amonio. Otras bacterias pertenecientes al género *Nitrobacter* y algunos otros géneros pueden oxidar nitritos a nitratos (Bru et al., 2011).

Algunas bacterias pueden usar nitratos en vez de oxígeno para un tipo de respiración que se llama *reducción disimilar del nitrato*. Durante este proceso, el nitrato es reducido a nitrito y de ahí a amonio. No todas las bacterias siguen esta vía, sin embargo, bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Micrococcus* y *Thiobacillus* pueden reducir nitrato para liberar nitrógeno gaseoso en el ambiente. Las bacterias que pueden generar nitrógeno gaseoso de la reducción de nitratos en el proceso de desnitrificación, son comúnmente encontradas en suelos ricos en materia orgánica, compost y plantas industriales de tratamiento (Rütting et al., 2011).

No toda la fijación de nitrógeno ocurre como resultado de procesos biológicos. Los fertilizantes nitrogenados son producidos en grandes cantidades por la industria agroquímica a partir de N atmosférico por medio del proceso de Harber-Bosch (Fowler et al., 2013). La radiación ultravioleta y lumínica facilita la oxidación del nitrógeno gaseoso, particularmente en la atmosfera.

Si los diversos pasos de los ciclos de los elementos son conducidos por microorganismos, los cambios en la biodiversidad del suelo y la composición de sus comunidades microbianas van a influenciar necesariamente los procesos relacionados con el ciclado de los nutrientes. Resultan de particular interés en los suelos agrícolas los procesos de la descomposición del material vegetal muerto y la reincorporación del C y N a la materia orgánica del suelo.

1.2) Los manejos agrícolas del suelo.

1.2.1) De la Labranza Convencional a la Siembra Directa.

Los procesos actuales como la perdida de la calidad de los suelos, la necesidad de producir más y de mejor forma, y sobretodo el cambio climático plantean la necesidad de que se lleven a cabo cambios en la manera de trabajar y hacer producir al suelo. El cambio de la labranza convencional (LC) a la siembra directa (SD) como sistema de cultivo tiene el propósito de evitar la degradación de los suelos y mejorar la calidad del mismo. Además, aumentar el C secuestrado en el suelo con el fin de que disminuir el efecto invernadero (Crowther et al., 2016). Existe una variedad de estudios sobre el cambio de la SD a la LC a nivel del contenido de carbono orgánico del suelo (Du et al., 2014; Alvarez & Steinbach, 2009; Díaz-Zorita et al., 2002; West and Post, 2002; Franzluebbers & Arshad, 1996), a nivel de cambios en las comunidades microbianas por análisis de PLFA (Feng et al., 2003; Jiang et al., 2011b; Simmons and Coleman, 2008; Wortmann et al., 2008) y a nivel funcional por medio de análisis de actividades de enzimas extracelulares (EAA) para sistemas de cultivos mixtos arroz-trigo (Pandey et al., 2014). Sin embargo, no existen muchos estudios que analicen lo que sucede con las comunidades microbianas del suelo a nivel funcional durante el cambio de manejo agrícola. Entender los efectos durante el periodo de transición o adaptación al nuevo sistema agrícola es clave para un manejo efectivo del suelo.

La transición de la LC a la SD no es inmediata. Se ha reportado que durante los primeros años, el suelo sufre un retardo en la respuesta frente a la siembra directa como un aumento del carbono del suelo, impacto en el rendimiento de los cultivos o eficiencia en el ciclado de los nutrientes (Phatak et al., 1999). Lal (1998) establece que de los 2 a los 5 primeros años posteriores al cambio de labranza puede ocurrir un leve o nulo aumento del carbono orgánico secuestrado en el suelo y posteriormente, entre los 5 a los 10 años se verifica un gran aumento en la acumulación de carbono.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Feng et al., (2003) encontró cambios en la composición de las comunidades microbianas en suelo donde se cultiva algodón. Sin embargo, otros estudios muestran que los cambios por tipo de labranza son menos significativos que los efectos producidos por el tipo de cultivo y el tipo de residuo dejado por los mismos (Diaz-Zorita et al., 2002). A su vez, otros autores analizan la siembra directa, la labranza convencional y la combinación de ambas labranzas de manera secuencial, en estudios llevados a cabo en suelos con cultivo de arroz seguido por un cultivo de trigo. Donde se ha encontrado que la siembra directa presenta mayores actividades enzimáticas respecto a la labranza convencional con valores intermedios en la combinación de ambos tratamientos (Pandey et al., 2014).

Sin embargo, debido a algunos efectos negativos de la siembra directa que se presentan en muchos casos como por ejemplo la compactación de los suelos, la disminución de la aireación y la disponibilidad de oxígeno, y un incremento de la incidencia de algunas enfermedades que afectan a los cultivos, hace inviable el pasaje total (Pandey et al., 2012). O por lo menos, no solo se debe hacer de forma aislada, sino en combinación con otras prácticas lo que en conjunto recibe el nombre de **agricultura de conservación**.

1.2.2) Manejos agrícolas.

La historia de la labranza tiene sus comienzos miles de años atrás cuando los seres humanos cambiaron la caza y la recolección para volverse sedentarios empezaron a cultivar la tierra y a utilizar la labranza como técnica de control de malezas. Con la llegada de la revolución industrial, en el siglo XIX, el poder mecánico y los tractores facilitaron la labranza del suelo. Hoy existe un conjunto muy diverso de herramientas disponibles para la producción agrícola.

La **labranza convencional** es una práctica en la que se trazan surcos de una determinada profundidad en la superficie del suelo, a partir de la cual el suelo pierde su estructura original y se mezcla. La labranza tiene dos objetivos principales: por un lado el control de la estructura, y por el otro la incorporación de los residuos orgánicos en el suelo (Balesdent et al., 2000). Esta técnica es utilizada a menudo para fomentar la mineralización de la materia orgánica, suavizar el suelo y preparar una zona adecuada para las semillas, que serán depositadas usando una sembradora o un equipamiento manual. La agricultura basada en la disrupción del suelo ha exacerbado los problemas de la degradación del suelo por el agua y el viento, la oxidación de la

materia orgánica y una disminución de la capa cultivable y de la estructura (agregación) del suelo (Six et al., 1999).

En contraste con el avance de la labranza convencional, a mediados del siglo pasado surgió el interés en el desarrollo de una agricultura sin laboreo con la posibilidad de disminuir el impacto sobre el suelo y el ambiente. La **siembra directa** surge así en respuesta a los problemas de erosión producidos por la labranza continua (Figura 1.8). Popularizándose a gran escala durante la década del 40´ y el 50´ en el cinturón maicero ("Corn Belt") de los Estados Unidos, en la siembra directa, el suelo permanece completamente imperturbable antes de la siembra excepto por el pequeño surco producido para depositar la semilla, y donde el control de las malezas se hace por medio de herbicidas y otros cultivos (Albertengo et al., 2013). Cuando comparamos entre la labranza convencional y la siembra directa o labranza mínima vemos que estos sistemas pueden reducir la erosión y la pérdida del suelo debido al viento y al agua, incrementar el carbono secuestrado en él, y mejorar las propiedad físicas, químicas y biológicas de los suelos en un numero de formas que incluyen el aumento de la capacidad de retención de agua, mayor contenido de materia orgánica y la reducción de la compactación del suelo (Derpsch et al., 2010). Sumado a los menores costos que tiene la siembra directa (Lal, 2004). En un análisis de metadatos donde se analizan una gran cantidad de estudios, se ha propuesto que la siembra directa *per se* tiene un impacto negativo en el rendimiento de los cultivos, con una disminución cercana al 6%, principalmente en regiones húmedas del planeta (Pittelkow et al., 2015a) pero ensayos que analizan otras variables a parte del rendimiento muestras los amplios beneficios de la SD (Zhao et al., 2017). Sin embargo, el incremento que produce la siembra directa en el carbono orgánico secuestrado en el suelo puede perderse debido a la inclusión del barbecho como cultivo de rotación (Peterson et al., 1998).

La siembra directa es solo el primer paso hacia una agricultura totalmente conservativa. Por lo cual es necesario e importante considerar una serie de principios conservativos complementarios. La **agricultura de conservación** se define como un sistema de cultivo que consiste en dejar los residuos de los cultivos de cobertura en superficie (mayor al 30% de la superficie cubierta), un manejo integral de nutrientes y las técnicas de siembra directa, en un ciclo de rotación de cultivos para la conservación efectiva del suelo y el agua, aumentar el secuestro de carbono en el suelo, la intensificación sustentable y una adaptación al cambio climático. El objetivo no es producir el mayor rendimiento posible de los cultivos, sino obtener un

rendimiento óptimo sustentable, especialmente durante épocas malas como las sequias (Lal, 2015a).

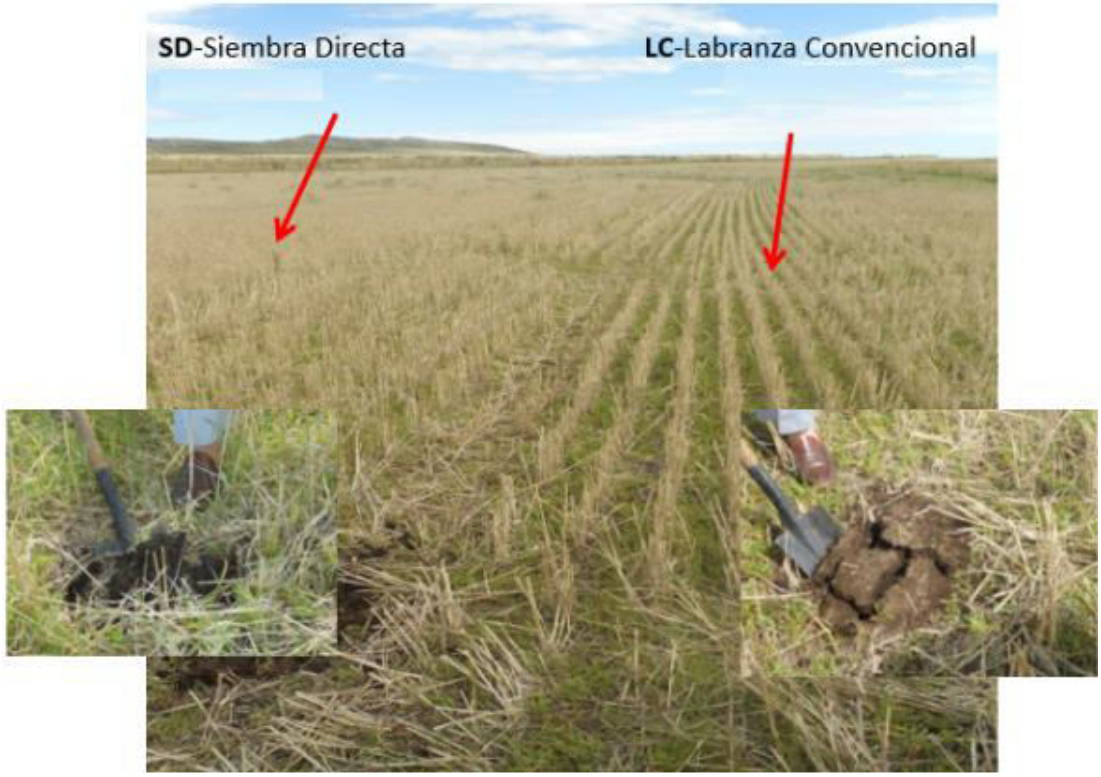

Figura 1.8: parcela en siembra directa (izquierda) junto a una parcela en labranza convencional (derecha) en el establecimiento Hogar Funke bajo el mismo sistema de cultivo por 30 años. Fotografías de Kornelia Smalla.

El objetivo del **manejo integral de los nutrientes** o principalmente del nitrógeno, es reducir las pérdidas por aire o agua de las sustancias que es aplicada por la fertilización o el abono. El nitrógeno en forma de nitrato es soluble en el agua y puede perderse con el agua superficial o subterránea. También puede perderse a la atmosfera en forma de óxido nitroso (N_2O). El manejo del nitrógeno involucra la aplicación del mismo en formar de fertilizante elaborado químicamente o abono de animales, y el manejo de la FBN por medio de la utilización de inoculantes que generan una relación simbiótica con los cultivos en el caso de las leguminosas o con el uso de cultivos de cobertura a base de leguminosas (Pittelkow et al., 2015b).

La fertilización química se maneja: 1) en grandes cantidades para los cultivos en crecimiento y las condiciones del campo; 2) en el momento correspondiente y con las necesidades de nitrógeno de los cultivos, el cual varia de una época a otra; y 3) utilizando métodos que reduzcan las pérdidas. Las tasas de aplicación de nitrógeno óptimas son aquellas donde sólo se aplica la cantidad necesaria para la planta, por lo cual se incrementa la eficiencia del uso del nitrógeno y se minimizan las pérdidas al

ambiente (Ribaudo et al., 2011). Los beneficios de la tasa de aplicación de nitrógeno varían dependiendo de la región, de los cultivos y las características de los suelos.

Los **cultivos de cobertura** juegan un rol fundamental en la mejora de la calidad de suelo. Típicamente estos cultivos son incluidos en las rotaciones, pero no son cosechados. Los cultivos de cobertura reducen la erosión del suelo, atrapan el nitrógeno y otros nutrientes que de otra manera podrían estar perdiéndose del ambiente, incrementando la biomasa microbiana, reduciendo las malezas, evitando que el suelo se compacte y mejorando la infiltración del agua (Snapp et al., 2005). Además se reducen las oscilaciones en la temperatura del suelo, manteniéndolo cálido y conservando la humedad durante las épocas cálidas y frías (Souza Andrade et al., 2002). Los cultivos de cobertura podrían no incrementar los rendimientos de los subsiguientes cultivos, pero incrementan el carbono a largo plazo, lo que se traduce con el tiempo en una mejora de las propiedades del suelo (Blanco-Canqui et al., 2013).

1.2.3) Efecto de los manejos agrícolas sobre las comunidades microbianas del suelo.

Los manejos agrícolas influyen en los microorganismos del suelo a través de los cambios en la cantidad y calidad de residuos de las plantas superiores, su distribución estacional y espacial, la relación del aporte por sobre la superficie y por debajo de la misma como el que hacen las raíces y a través de los cambios en la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Christensen, 1996). Esto regula la heterogeneidad física y química del suelo, y consecuentemente la distribución de las comunidades microbianas y su actividad en los agregados de mayor tamaño (Vos et al., 2013). Sin embargo, la respuesta de los microorganismos a los disturbios podría depender de las características de cada tipo de suelo. Lupwayi et al., (2001) demuestran que la biomasa y la diversidad microbiana para suelos ácidos y con bajo contenido de materia orgánica, es menor en la labranza convencional en comparación con la SD, pero la labranza no afectó significativamente la biomasa y la diversidad en suelos con pH cercanos a la neutralidad y un alto contenido de materia orgánica.

Frey y colaboradores demostraron quelas diferentes prácticas agrícolas afectan fuertemente la abundancia y biomasa de los microorganismos ((J. Six et al., 2006). En este estudio se encontró que la biomasa fúngica se incrementa en la superficie (0-5 cm) en respuesta a la SD. Sin embargo, solo se presentaron diferencias significativas en la biomasa microbiana entre SD y LC en tres de los seis sitios ensayados. Los

hongos podrían estar favorecidos en los sistemas de SD porque: 1) la siembra directa reduce el disturbio del suelo, lo cual permite el establecimiento y mantiene la extensiva red de hifas (Wardle et al., 1995); 2) los hongos, con su crecimiento de forma micelial, puede unir la interface de suelo-residuo y utilizar las fuentes de C y N espacialmente separadas por translocación de N desde los depósitos de N inorgánico en los residuos ricos de C en la superficie (Holland & Coleman, 1987) y 3) los hongos, a diferencia de las bacterias, pueden mantener actividades en la superficie seca en descomposición en los sistemas de siembra directa (Beare et al., 1992).

Las bacterias del suelo generalmente son menos impactadas por la labranza que los hongos, y la población bacteriana podría ser mayor en la labranza convencional que en la SD, aunque su diversidad y composición se modifica (Jangid et al., 2008). La labranza incrementa los fragmentos de residuos orgánicos y su área de superficie, mezclándolos con el suelo. En general, los suelos bajo labranza convencional tienen mayores tazas de nitrificación y mineralización en comparación con la SD (Rosa et al., 2014). Los suelos en siembra directa presentan un mayor contenido de agua, debido a una mayor cantidad de residuos orgánicos retenidos en la superficie, y esto favorece un mayor desarrollo de sitios anaeróbicos. Lo cual favorece los procesos de desnitrificación (Whalen & Hamel, 2004)

1.3) Introducción a los agregados del suelo.

En los estudios de los procesos del suelo conducidos por microorganismos no se ha tenido en cuenta, en líneas generales, la escala de trabajo. Comúnmente se trabaja con muestras de suelo homogenizadas que tratan de representar un lote. Es decir, por lo general se ha pensado en escala humana y no en escala microbiológica. La escala microbiana en el suelo nos obliga a pensar en términos de los microagregados de partículas que en su conjunto constituyen la estructura del suelo. La incorporación del concepto de estructura del suelo es esencial debido a las profundas influencias que tienen el hábitat microbiano y sus actividades en dirigir los ciclos del carbono y de los nutrientes, como el nitrógeno y el fósforo, que luego se expresan a escala de suelo completa en el ecosistema (Philippot et al., 2009; Ettema and Wardle, 2002).

1.3.1) Definición y Formación.

Los agregados del suelo son conjuntos heterogéneos de partículas secundarias formadas por la combinación de partículas minerales con sustancias orgánicas e

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

inorgánicas, arbitrariamente distinguidas por tamaño como macro- (> 250 µm de diámetro) y microagregados (< 250 µm de diámetro; Bronick and Lal, 2005a). El proceso de agregación es visto como un sistema dinámico, con microagregados unidos entre sí por raíces de plantas, hongos, polímeros orgánicos y residuos con orígenes distintos (Tisdall & Oades, 1982). En las diferentes fracciones de agregados del suelo definidos por su rango de tamaño, las regiones internas y externas de los agregados pueden diferir en la edad de la materia orgánica, y en el contenido de carbono y de nitrógeno orgánico, fosforo, cationes y nitrógeno inorgánico (Smucker et al., 2007). Los microbios encuentran refugio en los agregados respecto de la acción de los predadores, como los nematodos y los protozoos, ya que no acceden al interior de los agregados (Sessitsch et al., 2001; Elliott & Coleman, 1988).

La teoría jerárquica de la formación de los agregados, postulada por Tisdall y Oades en 1982, propone que los microagregados se unen entre sí para formar macroagregados. Los microagregados están formados por moléculas orgánicas unidos a arenas y a cationes polivalentes conformando partículas compuestas, las cuales se unen a otras partículas compuestas para formar macroagregados o agregados de tamaños crecientes. Alternativamente, los macroagregados pueden formarse alrededor de la materia orgánica particulada (MOP), que se define como la materia orgánica del suelo con un tamaño de entre 52 y 2000 µm (Beare et al., 1994). Cuando la MOP se descompone y se liberan los exudados microbianos, los macroagregados se vuelven más estables, disminuye la relación C/N, y los microagregados se forman dentro de los mismos (Figura 1.9). Los microagregados formados internamente contienen más depósitos de carbono recalcitrante, que es aquel carbono más difícil de ser degradado por los microorganismos, en comparación con los macroagregados exteriores (Plante & McGill, 2002). Cuando los depósitos de carbono lábiles son utilizados, la actividad microbiana disminuye y los macroagregados pierden estabilidad, eventualmente se rompen y liberan los microagregados más estables (Six et al., 1999). Las raíces e hifas fúngicas se enredan y liberan compuestos orgánicos, como las proteínas asociadas a la glomalina, que actúan como pegamento para mantener las partículas unidas (Reyna & Wall, 2014; Rillig, 2004). Hipotéticamente, las bacterias forman colonias unidas por una cápsula de polisacáridos alrededor de la cuales las partículas de arcillas se pueden alinear y atraer por su desecación y contracción. De este modo, las partículas de arcilla forman una capa protectora para las colonias bacterianas inhibiendo la descomposición del carbono orgánico en su interior (Balesdent et al., 2000). La teoría concéntrica de la agregación sugiere que la capa externa se construye sobre la superficie externa de los agregados, con el

carbono más joven en las capas exteriores de los agregados (Gupta and Germida, 2015; Santos et al., 1997).

Posiblemente los agregados finales se formen por una combinación de estos procesos (Bronick & Lal, 2005b). Los agregados pueden romperse por una variedad de mecanismos dependiendo de la naturaleza de los agentes que actúa sobre ellos. La disrupción de los macroagregados es afectada por los organismos del suelo, las propiedades del suelo y factores ambientales como la temperatura, concentración gaseosa, disponibilidad de nutrientes y gradientes de humedad (Christensen, 2001a).

1.3.2) Distribución cuantitativa y cualitativa de los agregados.

Los agregados del suelo constituyen un nicho ecológico donde sus propiedades físico-químicas podrían seleccionar la distribución de los microorganismos entre los diferentes tamaños de agregados (Mummey et al., 2006). La preferencia de un grupo microbiano para una locación especifica en la matriz del suelo para crecer y utilizar substratos puede estar relacionado con la accesibilidad de los mismos, pero también, y tal vez más importante, las condiciones físico-químicas únicas en ese hábitat de suelo (Kong et al., 2011). Un análisis metagenómico de la biogeografía microbiana encontró que aproximadamente la mitad de la variación en la composición de la comunidad puede ser descripta por la distancia geográfica y los efectos del hábitat (Davinic et al., 2012). Miller & Dick, (1995) detectan una diferencia cualitativa entre las comunidades microbianas de los macro y microagregados, presentado las primeras una mayor eficiencia metabólica.

La cuantificación de la densidad microbiana en los agregados de diferentes tamaños, desde los más grandes de varios mm hasta las menores a 2 μm, han mostrado una distribución heterogénea de las bacterias en el suelo. A pesar de que existen varios trabajos que analicen esto, son difíciles de comparar porque varía la técnica de separación y tamaño de agregados, así como también el método de cuantificación utilizado (Ladd et al., 1996). Pero en general, se observa que la locación preferencial, o lugares de mayor densidad microbiana, son los agregados con un tamaño menor a 20 μm. Entre el 40 y el 70% del total de las bacterias del suelo se encuentran localizadas en las fracciones 20-2 y 2-0,1 μm, que consisten en los microagregados estables y partículas de arcilla que se desprenden de las estructuras agregadas durante el paso de dispersión en el fraccionamiento físico (Constancias et al., 2014;

Hemkemeyer et al., 2014, 2015; Kandeler et al., 1999b; Monrozier et al., 1991; Neumann et al., 2013; Sessitsch et al., 2001; Stemmer et al., 1998).

La materia orgánica del suelo es la única fuente endógena de substrato y energía para los microorganismos heterogéneos del suelo. Las fracciones de microagregados menores a 20 µm en donde las bacterias son más abundantes es donde se encuentran los mayores niveles de materia orgánica, posiblemente entre el 50 y el 80% del carbono orgánico del suelo (Christensen, 2001). Por otro lado, la depredación por los protozoos es un mecanismo que contribuye a regular la población de bacterias en el suelo. Sin embargo, la intensidad de la depredación depende de la textura del suelo. Existe menos depredación en los suelos de textura fina que en los arenosos. Posiblemente debido a que la porosidad de los suelos de textura fina es accesible para las bacterias pero inaccesible para los nematodos. Por lo cual las bacterias dentro de los microporos se encuentran protegidas contra la depredación (Sessitsch et al., 2003).

Se ha propuesto que existiría una separación de nichos en las comunidades microbianas a nivel taxonómico entre los diferentes agregados de suelo, probablemente basados en el hábitat y en la calidad nutricional de los mismos (Trivedi et al., 2015, 2017), que a su vez es diferente del suelo completo sin fraccionar (Mummey et al., 2006). Sin embargo, existen resultados opuestos acerca de la distribución de ciertos grupos bacterianos en los agregados de mayor tamaño en comparación con los de menor tamaño. Mummey et al., (2006) reporta que la mayor abundancia relativa de las Acidobacterias se encuentra en la fracción de agregados de tamaño comprendidos entre 53 y 250 µm, mientras que Davinic et al., (2012) propone que se encuentran en igual proporción el todas las fracciones de agregados mayores de 53 µm. El mismo tipo de diferencias se presenta para otros grupos taxonómicos como las Actinobacterias. Por otro lado, la proporciones de hongos en los agregados de menor tamaño parecen ser menor a la reportada en los agregados de mayor tamaño, estableciendo un índices hongo: bacteria que disminuye cuanto menor es el tamaño del agregado (Kong et al., 2013; Neumann et al., 2013). Sin embargos, otros estudios no muestran tal patrón en la relación hongos: bacteria (Jiang et al., 2011b).

A nivel funcional, se ha reportado un patrón de actividad catabólica que revela una mayor actividad en los agregados de menor tamaño (menor 50 µm; Hattori, 1988). Esto se correlaciona a su vez con los estudios de la distribución de la biomasa microbiana y el carbono orgánico disponible en las diferentes fracciones de agregados (Lagomarsino et al., 2012). Hemkemayer et al., (2015) encuentra distribuciones

similares cuando analiza la tasa de degradación del fenol por las comunidades microbianas en las diferentes fracciones de agregados; observando que ésta se incrementa a medida que disminuye el tamaño de partícula. Sin embargo, la tasa de mineralización por número de célula fue mayor en los agregados de mayor tamaño, lo cual indicaría sutiles diferencias en las actividades de mineralización según el tamaño de agregado.

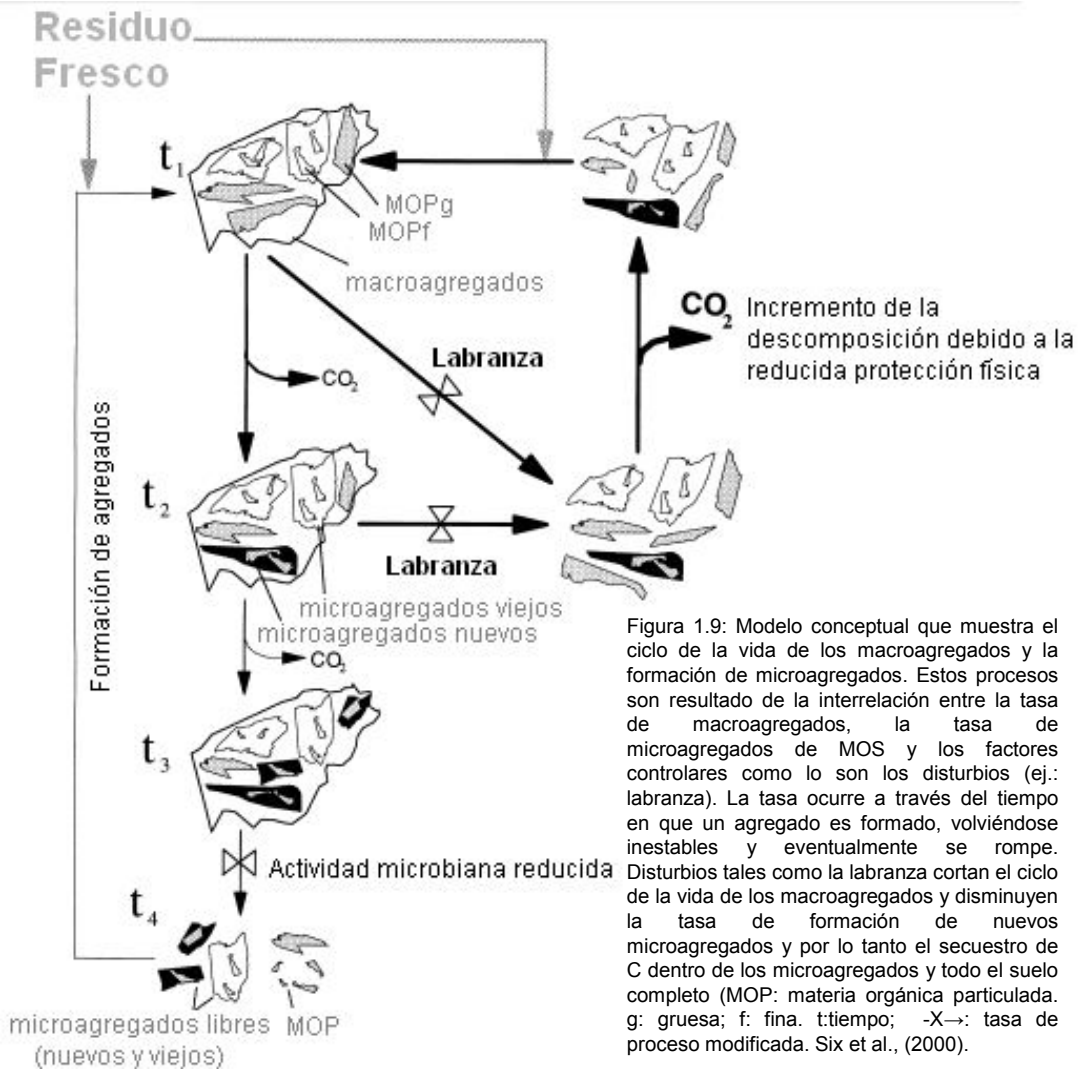

Figura 1.9: Modelo conceptual que muestra el ciclo de la vida de los macroagregados y la formación de microagregados. Estos procesos son resultado de la interrelación entre la tasa de macroagregados, la tasa de microagregados de MOS y los factores controlares como lo son los disturbios (ej.: labranza). La tasa ocurre a través del tiempo en que un agregado es formado, volviéndose inestables y eventualmente se rompe. Disturbios tales como la labranza cortan el ciclo de la vida de los macroagregados y disminuyen la tasa de formación de nuevos microagregados y por lo tanto el secuestro de C dentro de los microagregados y todo el suelo completo (MOP: materia orgánica particulada. g: gruesa; f: fina. t:tiempo; -X→: tasa de proceso modificada. Six et al., (2000).

1.3.3) Distribución de la actividad de las enzimas extracelulares en los agregados del suelo.

Las enzimas extracelulares en el suelo juegan un rol importante en la degradación de materiales poliméricos (como celulosa, quitina o proteínas) y aportan sustratos de bajo peso molecular a los microorganismos. Normalmente las enzimas extracelulares

tienen una vida media corta de actividad porque pueden ser rápidamente desnaturalizadas, degradadas o inhibidas de manera irreversible (Sarkar, 1989). Sin embargo, una cierta cantidad de las enzimas extracelulares del suelo, de diferentes orígenes, está estabilizada al estar adsorbida en las partículas minerales o incorporada en el material húmico (Nannipieri et al., 1996). El estado adsorbido probablemente afecta su potencial catalítico, pero hace que la actividad de las enzimas extracelulares pueda persistir en el tiempo (Busto & Perez-Mateos, 2000). La locación específica de las enzimas extracelulares dentro de la matriz del suelo ha sido especialmente estudiada en relación a la calidad de la materia orgánica de suelo (Kandeler et al., 1999a) y su recambio en el suelo (Stemmer et al., 1998a). La predominancia de las actividades enzimáticas en las fracciones de agregados de suelo parece depender tanto de la locación de los microorganismos así como también de los mecanismos de unión y adsorción a las partículas minerales u orgánicas (Kandeler et al., 1999b; Lagomarsino et al., 2012). Otros factores a tener en cuenta son cuáles enzimas extracelulares son investigadas y los procedimientos de fraccionamiento usados para la separación de la fracciones de agregados (Ladd, 1996). Todas las actividades enzimáticas relacionadas con la descomposición del carbono se incrementan cuando disminuye el tamaño de agregados (Trivedis, 2013). De acuerdo a lo publicado por Kandeler et al., (1999a) la xilanasa, una enzima encargada de degradar la hemicelulosa producida principalmente por los hongos saprofitos, se encontró mayormente en los agregados de mayor tamaño. En cambio la ureasa, de origen mayoritariamente bacteriano, fue localizada principalmente en los agregados de menor tamaño. Por otro lado, Nicolas y compañía demostraron que la actividad enzimática en las fracciones de agregados más grande crece cuando hay disponibilidad de sustratos lábiles y posteriormente decaen cuando esta se agota este (Nicolás et al., 2012).

1.3.4) Influencia de los manejos agrícolas sobre los agregados del suelo.

Los manejos agrícolas tienen como principal objetivo incrementar la producción agropecuaria y más recientemente, en los casos de SD, aumentar la cantidad de carbono secuestrado en el suelo al incrementar la agregación (figura 1.10), disminuir el disturbio del suelo, y prevenir los procesos de erosión y la descomposición del suelo (Bronick & Lal, 2005a).

La labranza convencional conduce a la fragmentación de los agregados del suelo, compactando el suelo y rompiendo las comunidades de plantas y animales (meso y

macrofauna) que contribuyen a la agregación. La siembra directa en cambio puede resultar en la generación de mayores macroporos y biocanales que facilitan el movimiento de agua y su disponibilidad (Albertengo et al., 2013). Además cambia la distribución del carbono particulado en el perfil del suelo. La adición de rastrojo (o los restos post-cosecha) a la superficie del suelo disminuye la erosión, reduce la evaporación e incrementa estabilidad de los agregados (Layton et al., 1993). De este modo también se incrementan los depósitos de carbono orgánico, al estar protegidos dentro de los macroagregados (Lal, 2015a). El incremento del carbono disponible aumenta la actividad biológica, que a su vez resulta en un incremento en la porosidad y en la estabilidad de los agregados. (Martens & Frankenberger, 1994).

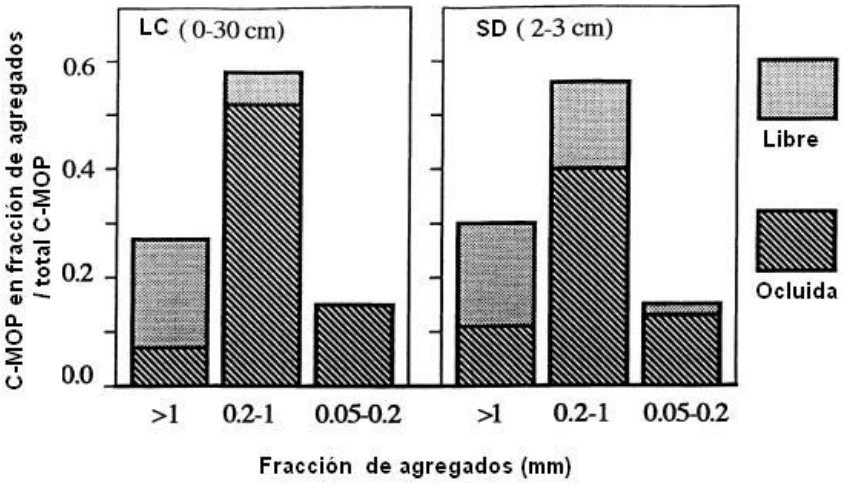

Figura 1.10: Comparación de la distribución del carbono de la materia orgánica particulada (C-MOP) gruesa mayor a 50 µm en las fracciones de agregados de suelos con labranza convencional (LC) en los 30 cm de profundidad y la siembra directa (SD) en los 2-3 cm iníciales, presentando la misma relación de C-MOP Puget et al., (1996).

La rotación de cultivos mejora la estructura del suelo en comparación con el monocultivo continuo, particularmente con la inclusión de pasturas, y la incorporación de leguminosas en las rotaciones mejora la estabilidad de los agregados especialmente la de los microagregados en comparación con la producción continua de maíz (Mendes et al., 1999). Sin embargo, algunos estudios muestran que la rotación soja-maíz no siempre incrementa la cantidad de carbono secuestrado en el suelo en comparación con el monocultivo de maíz (Bronick & Lal, 2005b).

El uso de fertilizantes generalmente mejora la agregación del suelo. Sin embargo, en algunas condiciones pueden también disminuir las concentraciones de carbono, reducir la agregación y las comunidades microbianas respecto a otro tipo de aplicación de nitrógeno, como el caso del abono (Craine et al., 2007). Los fertilizantes pueden alterar el pH del suelo y la cantidad de electrolitos, lo cual puede producir un efecto

adverso en la estructura del suelo (Haynes & Naidu, 1998). A pesar de todo, usar fertilizantes químicos a menudo mejora la estructura de los suelos en comparación de aquellos sin fertilizar (Munkholm & Hansen, 2012).

Las prácticas agrícolas pueden afectar los hábitats de los microorganismos de suelo (agregados) y actividades potenciales, y los cambios a escala microbiana pueden producir cambios a largo plazo en los parámetros abióticos de los ecosistemas, como el carbono total del suelo. Simpson et al., (2004) atribuyen la mayor estabilidad del carbono derivado de microorganismos en los tratamientos en SD a la mayor acumulación de carbono derivado de hongos dentro de los microagregados que conforman los macroagregados en comparación con la LC donde hay una menor presencia de hongos. Sin embargo, Kong et al. (2011) no encuentra efectos significativos de los sistemas de cultivo en las comunidades microbianas, pero la interacción entre los microambientes del suelo y los manejos de cultivos parecen tener un gran impacto en el ciclo del carbono dentro de las comunidades microbianas.

1.4) Métodos para el análisis del suelo.

1.4.1) Definición de calidad de suelo y técnicas para su estudio.

La calidad de los suelos agrícolas se asocia, por lo general, a la productividad de los mismos. Dentro de esta idea, la **calidad** de los suelos ha sido definida como la capacidad de los suelos para funcionar dentro de los límites del ecosistema, manteniendo la productividad biológica y la calidad ambiental, promoviendo la salud de las plantas, animales y los seres humanos (Doran & Parkin, 1994). A su vez, Dick, (1997) define a la **salud** del suelo como la habilidad del suelo para llevar acabo funciones que son requeridas por los componentes de un ecosistema dentro de las limitaciones de los factores ambientales locales. Los límites que son nombrados en cada definición (factores ambientales locales o los límites del ecosistema) son cruciales, dado que no todos los suelos pueden responder de la misma forma a demandas similares, aún si ellos se caracterizan como suelos buenos o saludables. Dependiendo de las características de cada suelo, como la composición mineral, la cantidad de materia orgánica o las temperaturas y precipitaciones en ese lugar, la definición de calidad va a cambiar.

No se debe limitar la calidad del suelo solo a la productividad. Enfatizarla de sobremanera en el pasado pudo haber llevado a la degradación del suelo (Lal & Pierce, 1997). Por décadas se ha buscado definir la calidad del suelo en términos numéricos para lograr consenso y permitir que el concepto sea incorporado en la línea

central del pensamiento respecto de los usos y regulaciones del suelo (Turbé et al., 2010). Esta definición cuantitativa de la calidad del suelo puede estar basada en diferentes indicadores del tipo biológico, físico o químico. En el presente hay una fuerte demanda de bioindicadores que sean capaces de caracterizar la dinámica y la sustentabilidad de la calidad del suelo (Wall, 2011). Los factores que describen la calidad del suelo podrían ser un solo indicador, un grupo de indicadores o un índice basado en las mediciones y descripciones modeladas del suelo.

Hay varios requisitos que se deben tener en cuenta para construir un indicador biológico o índices basados en diferentes indicadores. Como presentar la información de manera comprimida reduce el número de medidas y parámetros necesarios para describir una situación compleja y proveer ayuda decisiva con el objetivo de tomar decisiones acertadas en pos de la calidad de los suelos (Beinat & Nijkamp, 1998; Karlen & Stott, 1994). El indicador debe responder de manera sensible, cuantitativa y de manera predecible a las perturbaciones del suelo, debidas a su uso y manejo por parte del hombre. Además debe ser insensible al clima, o en consecuencia, los efectos ambientales deben ser bien conocidos (Romaniuk et al., 2014). El desafío es encontrar un balance adecuado entre simpleza y complejidad que permita, sobre la base del valor del supuesto indicador, tomar una decisión adecuada sobre las prácticas agrícolas que se aplican en el suelo analizado (Turbé et al., 2010; Andrews et al., 2002).

La materia orgánica del suelo (MOS) es la propiedad de suelo más utilizada para caracterizar la calidad del suelo y refleja las propiedades físicas, químicas y biológicas de la matriz de suelo (Elliott et al., 1996). Es simple de medir y las mediciones no requieren equipamiento especial. La fracción más importante y más grande de la MOS, en términos de productividad y calidad del suelo, es la fracción de fácil descomposición con una tasa de recambio alta. La tasa de recambio, sin embargo, varia ampliamente, desde cortos periodos a cientos de años (Allison & Jastrow, 2006). Sin embargo, la MOS total no es un parámetro suficientemente sensible a los cambios que sufre el suelo debido a modificaciones en su manejo, ya que diferentes tipos de materia orgánica incluidos en el total responde de manera variable con los tratamientos (Farrar et al., 2012).

Otra manera de examinar el suelo es por medio del análisis de la composición de los ácidos grasos fosfolipidicos en muestras de suelo (PLFA, **p**hospho**l**ipid **f**atty **a**cid, Frostegärd et al., 1993). Como los organismos tienen diferente composición de PLFA, la composición de las comunidades puede ser, en cierta manera, caracterizada por la

naturaleza y proporción de PLFA identificables (Feng et al., 2003). Además, la cantidad total de PLFA en el suelo puede ser utilizado para estimar la biomasa microbiana total, o subgrupos de PLFA con el fin de describir la cantidad y el tipo de biomasa bacteriana (Kandeler et al., 2002; Marschner et al., 2003) o biomasa fúngica (Frostegärd & Bääth, 1996).

Para indicar los cambios en los ambientes del suelo, la medición de las actividades de las enzimas extracelulares (EEA, ***e**xtracelular **e**nzyme **a**ctivities*) puede dar lugar a una imagen aproximada de los efectos de la actividad de los microorganismos en ciertos ciclos elementales (Dick, 1997). La EEA es de particular interés porque catalizan la ruptura de las moléculas y hacen disponibles los nutrientes para las plantas y los microorganismos del suelo. Se ha observado que cada enzima se comporta de manera heterogénea frente a los diferentes tratamientos, como por ejemplo la β-glucosidasa que se comporta de una determinada manera frente a los distintos cultivos de cobertura (Bandick & Dick, 1999). Además se ha visto que las enzimas pueden responder de manera más rápida que otras mediciones biológicas (Kandeler et al., 1999c). Sin embargo y a pesar de numerosos estudios, es dificultoso interpretar los cambios en las actividades de las enzimas extracelulares del suelo (Turbé et al., 2010).

Los métodos basados en ADN han sido desarrollados para estimar la diversidad taxonómica en forma independiente al cultivo de microorganismos y cuantificar diferencias en la composición de comunidades microbianas (Torsvik & Øvreäs, 2002). La diversidad taxonómica es importante cuando se estudia la calidad del suelo porque se asume que una comunidad microbiana más diversa está relacionada con una mejor calidad de suelo. Existen diversos tipos de métodos disponibles para analizar las comunidades microbianas usando ADN extraído directamente del suelo: 1) técnicas que se centran en la secuencia de algunos genes en particular, que amplificados por PCR permiten realizar análisis parciales de las comunidades por su comportamiento diferencial en geles según las diferencias de secuencia que conllevan los genes de diferentes taxones (DGGE, TGGE, ARDRA, T-RFLP, etc.). Por otro lado la cuantificación de las comunidades a nivel taxonómico por medio de ensayos de PCR es una herramienta muy útil a la hora de estudiar las comunidades microbianas de modo rápido (Fierer et al., 2005). 2) Técnicas metagenómicas, en las cuales se trata de investigar toda la información genética a partir de todo el ADN extraído, son los llamados análisis de la comunidad completa. Una herramienta poderosa es la pirosecuenciación de la subunidad chica (16S) del ARN ribosomal (Maron et al., 2011), el cual se ha convertido en un método muy popular. Otro método utilizado es la

secuenciación “High-throughput” de comunidades microbianas, utilizado para analizar los efectos del uso del suelo agrícola en selvas tropicales u el pasaje de bosques prístinos a suelos agrícolas (Carbonetto et al., 2014; Montecchia et al., 2015).

No existe un método perfecto, todos ellos tienen ventajas y desventajas. El aspecto más importante, para un científico que elige un método, es entender los inconvenientes y limitaciones de cada técnica, el segundo es enfatizar el potencial de la técnica.

1.4.2) Uso de los perfiles fisiológicos como herramienta para el estudio del suelo

La mayoría de las reacciones medibles en cualquier ambiente son procesos llevados a cabo a nivel de comunidades microbianas. Por ello, es razonable examinar la variabilidad entre hábitats o ecosistemas a nivel de las comunidades microbianas completas y no analizando la respuesta de una población particular, por ejemplo analizando una respuesta fisiológica del suelo a partir de aislamientos microbiológicos cultivables. Esto implica suponer que todas las actividades a nivel de comunidades resultan de la sumatoria de reacciones llevadas a cabo por las diferentes poblaciones que componen la comunidad del suelo. El rol de una comunidad microbiana en el ciclo de los nutrientes y el intercambio gaseoso con la atmosfera depende en gran medida de su habilidad para metabolizar un amplio rango de compuestos de carbono orgánico. Cada especie que compone una comunidad microbiana del suelo tiene una capacidad diferencial para respirar una determinada fuente de carbono, por lo cual con la adición de diferentes sustratos es posible la medición de una respuesta global denominada Perfil Fisiológico a Nivel de Comunidades (CLPP, ***C****ommunity* ***L****evel* ***P****hysiological* ***P****rofile*). El estudio de la habilidad de degradar diferentes fuentes de carbono puede ser considerado una opción para definir grupos funcionales basados en características tróficas y describir el estatus fisiológico de la comunidad (Garland, 1997). Los ensayos con CLPP son un medio sensible, simple y rápido para discriminar entre muestras ambientales que tengan diferentes comunidades microbianas (Lladó & Baldrian, 2017).

En 1991, Garland y Mills introducen una metodología rápida para la exploración a nivel de las comunidades microbianas por medio del análisis del perfil catabólico de toda la comunidad heterótrofa. Este enfoque del CLPP fue inicialmente ensayado usando fuentes de carbono y la medición estaba basada en la reacción redox de un colorante (Violeta de Tetrazolium) dentro de las placas BIOLOG, la cual se inoculaba con una solución concentrada de células, seguida por una incubación de 6 horas. Allí las células consumen las fuentes de carbono diferentes para las cuales tienen la

capacidad de degradar. El perfil de la formación de los colores es utilizado para caracterizar como un todo a las comunidades comprendidas en la muestra de suelo analizada.

Otros métodos de estimación de los CLPP utilizan la medición del CO_2 liberado por la respiración de un sustrato (Anderson, 1982; Degens & Harris, 1997). El CO_2 puede ser medido mediante soluciones alcalinas (NaOH), cromatografía gaseosa o espectroscopia infrarroja (IR). Campbell y colaboradores desarrollaron otra técnica micro-respirométrica que se realiza con dos placas de 96 pocillos puestas una sobre la otra, con la parte superior de los pocillos enfrentadas (Campbell et al., 2003). Una de ellas tiene una capacidad 1,2 ml, que es donde se deposita el suelo. En cambio la otra placa contiene el sistema de detección. Esta técnica tiene la ventaja de poseer dos sistemas para medir el CO_2 liberado: uno basado en atrapar el CO_2 en un gel alcalino, con un indicador de pH, el cual produce una reacción colorimétrica posible de medir; otro es basado en la utilización de sustratos radioactivos que liberan $^{14}CO_2$, el cual es medido luego utilizando un contador de centelleo.

Un medio alternativo para estimar los CLPP es por medio del análisis del sustrato consumido (como por ejemplo el O_2) en lugar de medir el producto liberado (CO_2). La detección del O_2 disuelto permite un aumento de la sensibilidad, dado su menor solubilidad. El Sistema Biosensor de Oxigeno (OBS, ***O**xygen **B**iosensor **S**ystem*) es una plataforma en microplaca de 96 pocillos basada en un flouróforo sensible al O_2, que se encuentra depositado en una matriz de poliestireno en el fondo del pocillo, permitiendo un análisis rápido de un gran número de sustratos diferentes. El flouróforo al ser sensible al O_2 disminuye la fluorescencia emitida por él a medida que aumenta la concentración de O_2 disuelta en el pocillo. Con este diseño experimental, la señal del flourosforo se incrementa en respuesta a la respiración de la muestra, inducida o no por el agregado de un sustrato (Garland et al., 2003; Figura 1.11).

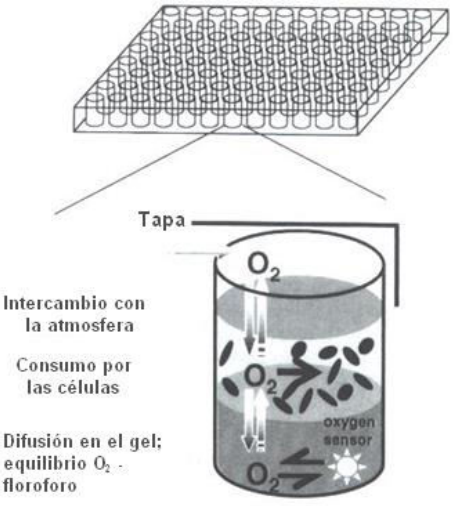

Figura 1.11: Diseño de un pocillo perteneciente a una placa BDOBS u OBS (Garland, 2012).

Este sistema ofrece significativas ventajas sobre el sistema BIOLOG y los sistemas de monitoreo de CO_2:

- Para obtener una buena respuesta se necesitan concentraciones menores de

sustrato (10-100 veces menores) y disminuyen los tiempos de incubación, resultando en un menor enriquecimiento selectivo de la muestra por crecimiento diferencial de los componentes de la comunidad microbiana.

- La respiración se mide en forma directa por consumo de O2, lo que no ocurre en otros sistemas que se realiza mediante una reacción redox indirecta.

- Permite definir y manipular la mayoría de los factores físicos y químicos de la suspensión del suelo que se coloca en el pocillo y en la que se mide el consumo del O_2 disuelto.

Se han llevado a cabo diversos estudios donde se analizan distintas características del sistema con el fin de mejorar la puesta a punto de la medición del OBS. A bajas concentraciones de sustrato, hasta 10 $mg.l^{-1}$, puede detectarse actividad cuando se usan grandes volúmenes en cada pocillo (240 µl), posiblemente debido a que un mayor espesor de la película disminuye la re-aireación de la matriz de poliestireno en cada pocillo. Con este nivel de sensibilidad, esta técnica sería capaz de detectar los niveles basales de respiración de las muestras analizadas (Zabaloy et al., 2008). También se han examinados otros factores como es el agregado de nitrógeno o fósforo a la mezcla de incubación, mostrando que el sistema OBS es suficientemente sensible como para detectar estos cambios y enriquecer el análisis de la respuesta fisiológica (Garland et al., 2012).

Los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas generados por esta técnica pueden ser descriptos a partir de parámetros cuantitativos. Estos parámetros incluyen la cuantificación de la fase *lag* o tiempo mínimo para iniciar la respuesta de la respiración (TMR) y la cuantificación del pico máximo de la respiración observada (Fmax). El TMR para un sustrato dado variaría en forma inversa con la cantidad de biomasa microbiana activa capaz de respirar este sustrato. Las diferencias sustrato-especificas en el TMR son mayores cuando se evalúan con sustratos de menor disponibilidad o de mayor complejidad química, es decir, correspondientes a vías degradativas menos frecuentes o escasamente distribuidas en la diversidad biológica. En contraste, el Fmax revela las diferencias funcionales de las comunidades microbianas, ya que un pico de un mayor valor estaría mostrando que hay una mayor capacidad de consumo del sustrato particular, así como también refleja la magnitud de la utilización del sustrato (Garland et al., 2010). Otro factor que claramente influyente en el pico máximo de fluorescencia es la disponibilidad de N; para analizar este parámetro se propuso el indicador Ndiff, el cual se basa en la diferencia del pico

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

máximo de fluorescencia con y sin nitrógeno agregado. Este valor indicaría la limitación en el suelo de nitrógeno orgánico disponible (Garland et al., 2012).

La cuantificación de las respuestas individuales que comprenden el CLPP puede permitir el desarrollo de: 1) medidas de diversidad basados en índice de riqueza y diversidad de las respuestas. Lo que más a menudo se utiliza son los índices de diversidad y de Shannon-Weiner, que son referidos como índices de "diversidad funcional" (Zak et al., 1994) o "diversidad/riqueza catabólica" (Degens et al., 2000).

2) los perfiles que pueden ser comparados mediante el uso de métodos de ordenación. El uso de técnicas de ordenación multivariadas como son el ACP o ACoP, permitiendo la construcción de gráficos simples, usando una combinación de variables que se encuentran asociadas con la gran cantidad de variaciones en las muestras (Väisänen et al., 2005).

1.5) Objetivos e Hipótesis.

Esta tesis de doctorado tuvo como **objetivo** principal de estudiar los efectos en las respuestas bioquímicas del suelo cuando el mismo es afectado por cambios en sus manejos agrícolas, como la agricultura en siembra directa (SD), o también la comparación de manejos agrícolas como la SD y la labranza convencional (LC), y la dinámica de cambio cuando estas pasan de un manejo al otro. Las respuestas fisiológicas se estudiaron en suelo completo y se comparó esta respuesta con el estudio a escala de microagregados buscando comprender como funcionan los sistemas microbiológicos y bioquímicos a estas diferentes escalas en respuesta a los cambios de manejo que operan en el suelo a nivel global.

A partir del conocimiento desarrollado en la introducción, nuestras **hipótesis** de trabajo son:

1) Las respuestas fisiológicas del suelo medidas como CLPP son afectadas por el manejo agrícola.

2) Los CLPP de las muestras tomadas en verano difieren de los CLPP de las muestras tomadas en invierno para una misma práctica o manejo del suelo.

3) El cambio de labranza modifica las respuestas fisiológicas del suelo en mayor medida cuando se pasa de SD a LC que a la inversa.

4) Las respuestas fisiológicas de las fracciones de agregados de diferentes tamaños serán propias del tamaño de la fracción de agregado.

5) Las respuestas fisiológicas de las fracciones de agregados son independientes del manejo agrícola.

6) La composición microbiana de las fracciones de agregados variaran con los manejos agrícolas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Capítulo 2

Estudio de los Perfiles Fisiológicos a nivel de Comunidades en la caracterización de manejos agrícolas en suelos en Siembra Directa

2.1) Introducción

La fertilidad del suelo está altamente relacionada con el procesamiento adecuado de los sustratos orgánicos a través del ciclo de los nutrientes, como del carbono o del nitrógeno. El mantenimiento de la calidad y cantidad de sustratos orgánicos es clave para las comunidades de microorganismos (Clapperton et al., 2007). A pesar de que el nivel de actividad microbiana del suelo depende del tipo de suelo (Kuramae et al., 2012), también depende, en los suelos agrícolas, de las prácticas de manejos usados en ellos (Bronick & Lal, 2005a; Wagg et al., 2014; Zhang et al., 2014).

En Argentina, un 78.5% (27Mha) del área cultivada ocurre en SD, debido a la adopción de paquetes biotecnológicos en la agricultura desde los años 90 (Albertengo et al., 2013). Estos valores varían entre campañas y dependiendo de la expansión de la frontera agrícola, pero más allá de la exactitud del número, son enormes superficies de suelos manejadas sin labranza. La SD combinada con la rotación de cultivos minimiza las pérdidas de MOS(Sheehy et al., 2015), incrementa los stocks de C y N, reduce la mineralización de la biomasa microbiana (Martens, 2000), incrementa la agregación del suelo, y resulta en mayores macroporos y biocanales que favorecen el movimiento del agua y su disponibilidad (Rosa et al., 2014). Sin embargo, por cuestiones de presión de mercado, la mayor parte de las hectáreas sembradas se manejan en forma de monocultivo, es decir, que año tras años se siembra el mismo cultivo. Esto hace que los beneficios de la SD no se traduzcan en un aumento de la calidad del suelo (Derpsch et al., 2010). Además de los problemas físicos de compactación del suelo y el desarrollo de enfermedades a causa del monocultivo, recientemente se ha mostrado que el monocultivo de soja en siembra directa resulta en la disminución de la diversidad bacteriana β, promoviendo la homogenización de las comunidades bacterianas a nivel regional (Figuerola et al., 2014). Por el otro lado, la rotación de cultivos incrementa la diversidad microbiana a un nivel similar a los ambientes naturales a escala regional y mantiene niveles bajos de organismos patógenos (Locke et al., 2008). La intensificación de la rotación y la cobertura permanente del suelo, como lo son los cultivos de cobertura y la cobertura muerta, protegen al suelo contra el impacto de las gotas de lluvia, reduce la evaporación e incrementa las estabilidad de los agregados y la MOS (Roldán et al., 2005).

Los Perfiles Fisiológicos a Nivel de Comunidades (CLPP; Garland et al., 2003) buscan medir la capacidad de toda la comunidad microbiana, como un todo, para metabolizar una variedad de diferentes fuentes de carbono (San Miguel et al., 2007). Los CLPP basados en el consumo de O_2 han sido utilizado para estudiar la estructura microbiana

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

(Brown et al., 2009; Garland et al., 2003), agregados de diferentes tamaños (Vaisanen et al., 2005) y los efectos de la labranza (Gomez & Garland, 2012), los cultivo de cobertura (Chavarría et al., 2016), el efecto de los herbicidas (Allegrini et al., 2015; Zabaloy et al., 2012) y la disponibilidad de N (Zabaloy et al., 2016). En todos los estudios mencionados se han reportado perfiles distintivos basados en el consumo de diferentes sustratos entre una variedad de comunidades microbianas. Sin embargo, no hemos encontrado trabajos que estudien comparativamente suelos manejados en siembra directa con diferente intensidad en las rotaciones.

El sistema de microplacas de 96 pocillos BD *Oxygen Biosensor System* (BDOBS, BD Biosciences, E.E.U.U) es una plataforma de análisis sobre la base de una microplaca que contiene un flourosforo sensible al oxigeno inmovilizado en el fondo de sus celdas, que permite hacer mediciones de consumo de O_2 en soluciones de suelo y de esta forma determinar los CLPP (Garland et al., 2003). Este sistema de medición es suficientemente sensible para detectar cambios en la composición de nutrientes del suelo, enriqueciendo el análisis de la respuesta fisiológica (Gomez & Garland, 2012). Con la posibilidad de medir las propiedades fisiológicas del suelo también surge la incertidumbre de cuándo y en qué condiciones del suelo hacerlo.

Con el objetivo de tener un mejor entendimiento de la fisiología del suelo usando CLPP, en este capítulo redefinimos un método rápido para analizar en profundidad los perfiles fisiológicos a nivel de comunidades. Con los CLPP se estudiaron suelos con diferentes manejos que permitieron la comparación entre Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y Malas Prácticas Agrícolas (MPA) en siembra directa y un ambiente naturales (AN) como sitio de referencia. El estudio se llevó a cabo en dos épocas de año diferentes (Verano/Invierno) en cuatro establecimientos agrícolas diferentes, a modo de replicas (Bengolea, Monte Buey, Pergamino, Viale) en la zona núcleo de la Pampa Húmeda. Luego del análisis por métodos multivariados proponemos algunos parámetros que podrían ser utilizados como indicadores de manejo.

Objetivos: diferenciar suelos con prácticas agrícolas contrastantes por medio de los CLPP.

Hipótesis: 1) Las respuestas fisiológicas de los CLPP del suelo son afectadas por el manejo agrícola.

2) Los CLPP de las muestras tomadas en verano difieren de los CLPP de las muestras tomadas en invierno para una misma práctica o manejo del suelo.

2.2) Materiales y Métodos.

2.2.1) Sitios de estudios y muestreo del suelo.

Los sitios donde se realizaron los muestreos para este estudio son establecimientos agropecuarios en producción, seleccionados luego de una intensa discusión entre científicos y productores participantes en el proyecto BIOPAS (Wall, 2011). Los tratamientos fueron elegidos teniendo en cuenta una serie de definiciones de buenas prácticas agrícolas según la FAO y los enunciados de Agricultura Certificada de Aappresid (Albertengo et al., 2013). Los tratamientos fueron definidos como: 1) Buenas Prácticas Agrícolas (BPA): son manejos agrícolas que tienden a ser sustentables bajo siembra directa, con rotación de cultivos intensiva, manejo adecuado de nutrientes y mínimo uso de agroquímicos (herbicidas, insecticidas y fungicidas); 2) Malas Prácticas Agrícolas (MAP): son manejos agrícolas que tienden a ser no sustentables bajo siembra directa, se caracterizan por las ausencias de las Buenas Prácticas y básicamente se trata de monocultivo con mínima rotación agrícola, mínimo aporte de nutrientes, alto uso de agroquímicos. Los suelos con historia de MPA muestran un menor rendimiento de granos comparado con los suelos del mismo ambiente que se manejan con BPA; 3) Ambientes Naturales (AN): suelos no cultivados que se utilizaron como sitios de referencia, cercanos a las zonas de cultivos. Todos los establecimientos agropecuarios fueron certificados que estuvieran manejados en siembra directa por más de 15 años anteriores al momento del primer muestreo, con excepción de las MPA de Pergamino que tienen 5 años, previos al muestreo.

Los tres tratamientos fueron replicados en cuatro establecimientos agrícolas diferentes en una transecta de oeste este a lo largo de 400 km en la región más productiva de la Pampa argentina. Los sitios de muestreo se encuentran cerca de las siguientes localidades (Figura 2.1): Bengolea (33º01´31´´S; 63º37´53´´W); Monte Buey (32º58´14´´S; 86 62º27´06´´W); Pergamino (33º56´36´´S; 60º33´57´´W); Viale (31º52´59.6´´S; 59º40´07´´W). Brevemente, los suelos de Pergamino son Argiudoles Típicos con un con un horizonte superficial franco limoso y una capa más profunda franco arcillo limosa, con un horizonte Bt bien desarrollado de la Pampa circundante. Los suelos cercanos a Monte Buey son representativos de Argiudoles Típicos con un horizonte Bt moderadamente desarrollado y una incrementada proporción de la fracción limosa en el límite entre la Pampa circundante y la Pampa piedemonte. Los suelos de Bengolea son Haplustoléntico localizado en la Pampa Piedemonte con una textura franco arenoso en el horizonte superficial y una superficie arcillosa, siendo limitada por el clima y una capacidad de campo baja debido a una textura gruesa. Los

suelos de Viale son Hapludent típico cuya textura superficial arcillo limosa y franco arcillosa en la superficie del suelo, siendo caracterizado por un pobre drenaje. La mineralogía de las arcillas de los horizontes superficiales de Bengolea, Monte Buey y Pergamino es muy similar, consistiendo en 2:1 de arcilla, principalmente illita con una pequeña proporción de minerales de illita-smectita irregularmente inter-estratificada y trazas de kaolinita. Contrariamente, el suelo de Viale es caracterizado por una considerable proporción de esméctica conjuntamente por una baja proporción de arcillas minerales (Rosa et al., 2014; Castiglioni et al., 2013). Los detalles se encuentran en la tabla 2.1, incluyendo algunas propiedades químicas y los cultivos en cada sitio; para más datos de los sitios agropecuarios se pueden buscar los trabajos: Figuerola et al., (2012) y Rosa et al., (2014).

Estación	Localidad	Tratamiento	Cultivos	TOC ($g\ kg^{-1}$)	Nt ($g\ kg^{-1}$)	Pe ($mg\ kg^{-1}$)	COT/Nt	pH (1:2.5 w/w)
Verano	Bengolea	AN	Pastura natural	1.71	0.12	13.80	13.23	6.03
Verano	Bengolea	BPA	Maiz (*Zea Mays L.*)	1.45	0.11	7.07	12.90	5.80
Verano	Bengolea	MPA	Soja (*Glicine max L.*)	1.28	0.12	9.63	11.69	5.70
Verano	Monte Buey	AN	Pastura natural	3.84	0.21	345.6	12.53	5.47
Verano	Monte Buey	BPA	Maiz (*Zea Mays L.*)	2.37	0.21	71.33	12.88	5.60
Verano	Monte Buey	MPA	Soja (*Glicine max L.*)	1.91	0.23	6.27	13.84	6.10
Verano	Pergamino	AN	Pastura natural	2.98	0.19	4.30	12.01	5.73
Verano	Pergamino	BPA	Soja (*Glicine max L.*)	1.77	0.18	11.17	11.78	5.60
Verano	Pergamino	MPA	Soja (*Glicine max L.*)	1.91	0.19	5.13	13.03	6.10
Verano	Viale	AN	Pastura natural	3.57	0.20	5.73	12.88	6.43
Verano	Viale	BPA	Corn (*Zea Mays L.*)	3.58	0.29	27.37	13.29	6.83
Verano	Viale	MPA	Soja (*Glicine max L.*)	2.65	0.29	33.33	12.87	5.67
Invierno	Bengolea	AN	Pastura natural	1.66	0.12	24.33	17.25	7.03
Invierno	Bengolea	BPA	Trigo (*Triticum Aestivum*)	1.73	0.15	50.37	14.95	6.90
Invierno	Bengolea	MPA	Barbecho	1.03	0.15	43.17	15.89	6.67
Invierno	Monte Buey	AN	Pastura natural	3.86	0.23	16.60	13.12	6.60
Invierno	Monte Buey	BPA	Vicia (*Vicia villosa*)	2.26	0.22	25.23	12.30	6.43
Invierno	Monte Buey	MPA	Barbecho	1.81	0.26	22.03	12.20	6.57
Invierno	Pergamino	AN	Pastura natural	2.93	0.20	395.07	11.17	6.37
Invierno	Pergamino	BPA	Trigo (*Triticum Aestivum*)	1.86	0.18	122.33	10.38	6.53
Invierno	Pergamino	MPA	Barbecho	1.79	0.19	17.27	12.20	6.60
Invierno	Viale	AN	Pastura natural	3.65	0.22	43.10	11.93	6.70
Invierno	Viale	BPA	Barbecho	3.49	0.28	37.20	11.18	6.50
Invierno	Viale	MPA	Barbecho	2.58	0.29	26.17	10.55	6.57

Tabla 2.1: Propiedades físicas y químicas y los cultivos presentes en los suelos analizados. n=3.

Las muestras de suelo fueron tomadas en febrero del 2011 (Verano) y septiembre de 2011 (Invierno). Tres submuestras fueron tomadas por cada tratamiento en cada sitio. Cada submuestra estaba compuesta por 16-20 piques seleccionados de manera azarosa de los primeros 10 cm superficiales del suelo dentro de un área de $5m^2$. Las

muestras compuestas fueron homogenizadas en el campo y llegadas en frio al laboratorio. Las submuestras se tomaron separadas por al menos 50m entre sí, sin seguir la línea de siembra en el campo. Por lo cual, un total de 36 muestras de suelo (3 tratamientos agrícolas x 4 locaciones (réplicas de tratamiento) x 3 submuestras = 36) fueron analizadas para cada época del año. Al llegar al laboratorio las muestras de suelo fueron pasadas a través de un tamiz de 2 mm. Una fracción de aproximadamente 50 g demuestra fue almacenada a 4º C, mientras que los cerca de 200 g restantes fueron secados por exposición al aire en un ambiente cerrado. En el caso de las muestras secas, éstas fueron hidratadas 1:3 e incubadas 15 horas a 30º C previo a ser ensayadas.

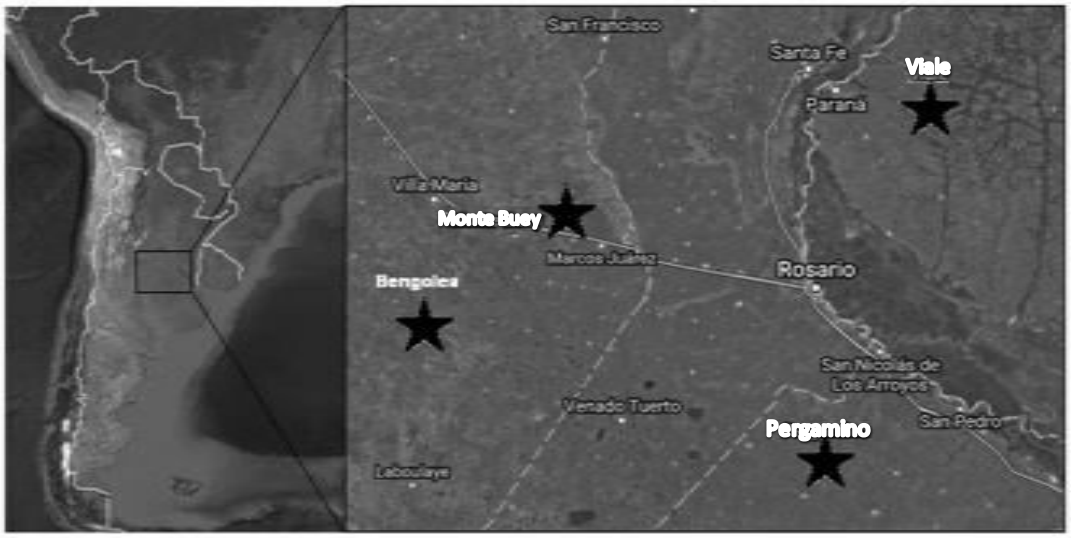

Figura 2.1: Mapa de los establecimientos agropecuarios utilizados en este capitulo para la medición de los CLPP

2.2.2) Preparación, inoculación y lectura de BDOBS

El sistema de microplacas de 96 pocillos BD Oxygen Biosensor System (BDOBS; BD Biosciences, E.E.U.U.) fue cargado con 40 µl de la solución de fuente de C en cada pocillo para determinar la respiración inducida por cada sustrato. Para ensayar la respiración basal, se agregaron 40 µl de agua destilada en cada pocillo en vez de las soluciones con la fuente de C. Además, se agregaron 40 µl con la solución de N, o agua destilada como control, para ensayar los efectos adicionales del N en la respiración (Garland et al., 2012). 160 µl de las soluciones de suelo fueron pipeteadas en cada pocillo, resultando en un volumen final de 240 µl en cada pocillo.

Las suspensiones de suelo fueron preparadas mezclando 5 g de suelos con 12,5 ml de agua destilada estéril en un tubo Falcon de 50 ml *BD* conteniendo

aproximadamente 5 ml de perlitas de vidrio de 2 mm, y agitados a mano de manera vigorosa durante un minuto. Para las soluciones de suelo seco, se diluyó 1 g de suelo pre-incubado en 10 ml de agua destilada en un tubo de 15 ml conteniendo aproximadamente 5 ml de perlitas de metal de 2 mm para mezclado y homogenizado mediante ULTRA TURRAX Tube Drive (IKA, Alemania) durante 1min. Las soluciones madre de las fuentes de C (300 µg/L) y de N (60 µg/L) fueron preparadas para obtener una concentración final de 50 mg/L de C y 10 mg/L de N, respectivamente. Las fuentes de C seleccionadas para el análisis de los CLPP fueron el Ácido p-Cumárico, Ácido Propiónico y Ácido Vaníllico (Sigma, E.E.U.U.). Todas las soluciones stocks y el agua destilada fueron esterilizadas utilizando filtros (< 0,22 µm, Sartor, E.E.U.U.) y almacenados a 4º C previos a ser ensayadas en las microplacas. Las fuentes de C fueron seleccionadas basados en los trabajos Garland et al., (2012) y Gómez & Garland, (2012), eligiendo aquellas fuentes de carbono que produjeron los CLPP con mayores diferencias en trabajos preliminares (resultados no mostrados).

2.2.3) Análisis de la información de la fluorescencia.

Los datos de las cinéticas fluorescentes se informan como unidades fluorescentes relativas normalizadas (NRFU, ***n**ormalized **r**elative **f**luorescence **u**nits*) al dividir el dato de fluorescencia de cada tiempo por el dato a 1 h de haber comenzado el ensayo (Garland et al., 2003). El tiempo de respuesta mínima (TMR) fue definido como el tiempo que requiere la NRFU para incrementarse en un 10% o alcanzar el valor de 1.1. La respuesta fluorescente suele mostrar un pico máximo de actividad, el cual corresponde al punto de menor concentración de oxígeno disuelto en la matriz (Fmax). Se determinó el área integrada bajo la curva a las 8 horas (AUC8) de haber comenzado la cinética y el área integrada bajo la curva a las 24 horas (AUC24) por medio del método de cuadrados mínimos [Formula:$(F_2+F_1)x(T_2-T_1)x0,5$].

Con el objetivo de estimar el efecto de la disponibilidad de nitrógeno en la respuesta de los suelos, se llevo a cabo el mismo ensayo con el agregado suplementario de nitrógeno inorgánico como sulfato de amonio a las suspensiones de suelo. La diferencia de consumo de oxigeno medida como Fmax, AUC8 y AUC24 entre los pocillos con el agregado de N o sin él, para una fuente de carbono determinada, fue denominado como Ndiff y calculada para todos los sustratos testeados (Garland et al., 2012).

2.2.4) Análisis estadístico

Las diferencias entre los tratamientos agrícolas fueron estudiadas con el análisis de la varianza multivariado (ANOVAM), y aplicando el test de Hostelling ($P < 0,05$) para buscar las diferencias significativas entre tratamientos para cada fuente de carbono. Cada parámetro de los CLPP determinado para cada fuente de carbono y nitrógeno adicionados fue analizados utilizando los modelos lineales mixtos (MLMX), con los tratamientos (BPA, MPA, AN) y las épocas (Verano e Invierno) como factores fijos, y los sitios (replicas) y las submuestras como factores aleatorios. Las diferencias entre los tratamientos fueron estimados por medio del Test de Fisher ´s LSD ($P < 0,05$). La relación entre los tratamientos fue visualizada aplicando Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) y cuantificamos estimando la distancia Euclidea entre dos tratamientos. El Análisis de Discriminante Lineal (ADL) se aplico para los valores cada época y cada condición de N. Los valores de los centroides para cada tratamiento fueron utilizados en conjunto con los valores de cada parámetro para una mejor visualización de los resultados y así establecer los potenciales indicadores de manejo en las diferentes épocas y condiciones de N, entre los valores con mayor peso en la función discriminante. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2013) .

2.3) Resultados y discusión

2.3.1) Perfiles fisiológicos a nivel de comunidades de acuerdo a las prácticas agrícolas en suelos en Siembra Directa -Análisis ANOVAM de los CLPP por fuente de C-.

Los CLPP de los suelos con diferentes prácticas agrícolas mostraron ligeras diferencias en las respuestas. Por ejemplo la curva de consumo de O_2 para los suelos de Pergamino con el agregado de ácido propiónico mostró que el Fmax disminuye desde los Ambientes Naturales (AN) hacia las Malas Prácticas Agrícolas (MPA). También disminuye la pendiente inicial de las curvas de consumo de O_2 en el mismo sentido (Figura 2.2).

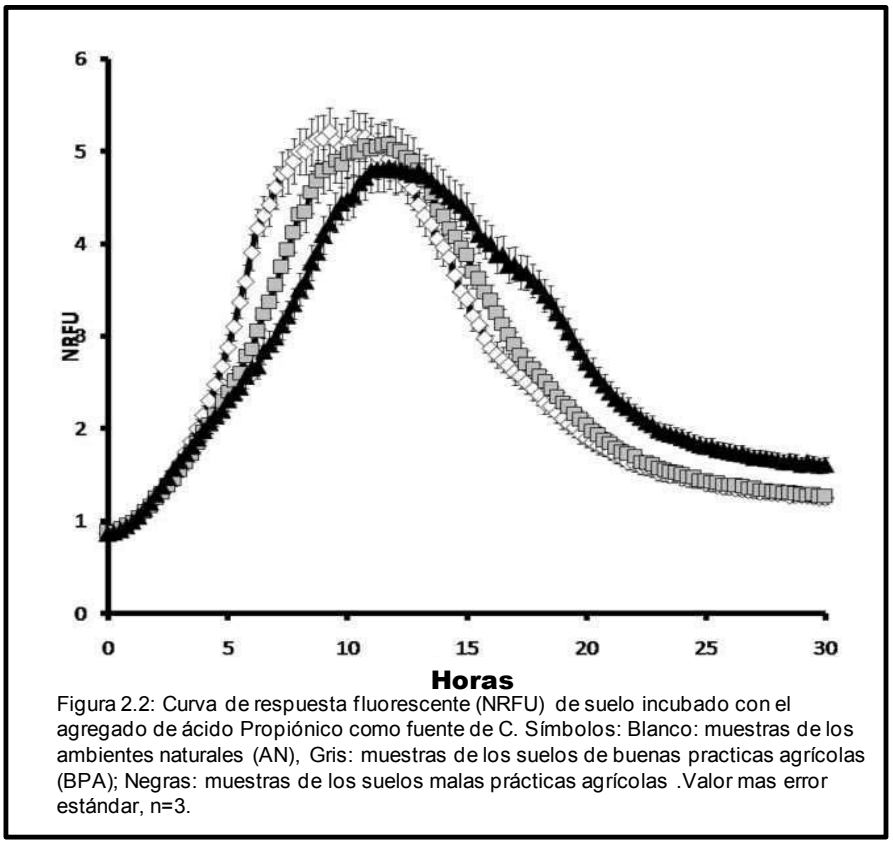

Figura 2.2: Curva de respuesta fluorescente (NRFU) de suelo incubado con el agregado de ácido Propiónico como fuente de C. Símbolos: Blanco: muestras de los ambientes naturales (AN), Gris: muestras de los suelos de buenas practicas agrícolas (BPA); Negras: muestras de los suelos malas prácticas agrícolas .Valor mas error estándar, n=3.

Con el fin de cuantificar y caracterizar esas diferencias, se construyeron una colección de parámetros derivados de cada curva-respuesta para cada muestra de suelo en las diferentes condiciones de C o N, y para cada época del año. Asimismo, para mejorar la descripción de los CLPP como respuesta a la consumo de O_2, hemos definido e incluido dos parámetros en los análisis llevados a cabo, AUC8 y AUC24, adicionales a los ya descriptos por Garland et al., (2010). Ambos parámetros integran el área bajo la curva de consumo de O_2 a diferentes tiempos. El área bajo la curva de fluorescencia a las 8 h busca representar la respuesta inicial en forma complementaria al TMR. El área

bajo la curva de fluorescencia a las 24 h, luego de que el pico de fluorescencia máxima transcurrió, representando la respiración total acumulada. Estos dos parámetros complementan el Fmax y el TMR con el fin de tener una mejor descripción de los CLPP y ayudar en la parametrización de los mismos.

Los CLPP así parámetrizados fueron luego analizados en forma multivariada. Dado que encontramos una importante interacción entre tratamiento y época (P = 0,0001), se llevaron a cabo los análisis para cada época por separado.

En un primer análisis global de las respuestas se pudo observar que cada parámetro muestra una respuesta diferencial de acuerdo a la época. Mientras que en verano, 1 de los 16 parámetros muestran diferencias significativas entre los tratamientos agrícolas (BPA y MPA), en cambio en invierno, 9 de los 16 parámetros se diferenciaron entre las prácticas agrícolas. A medida que los valores de TMR son menores, mayor será la cantidad de la biomasa activa con la capacidad de respirar una fuente de carbono particular (Garland et al., 2010; Zabaloy et al., 2008). Los resultados muestran en los valores de los TMR una clara tendencia AN > BPA > MPA para la gran mayoría de los casos ensayados. El incremento de los valores de TMR de acuerdo al uso agrícola y prácticas de monocultivo sugieren una reducción en las comunidades microbianas activas en el suelo con malas prácticas agrícolas.

En estos ensayos se utilizaron cuatro condiciones diferentes de sustrato: la respiración basal y tres fuentes de carbono diferentes en los CLPP, basándonos en el trabajo de Banning et al., (2012) donde hacen hincapié en la importancia de cuales sustratos utilizar, más que en la cantidad y diversidad de los mismos. Otros autores muestran que un grupo de 6 sustratos fue capaz de diferenciar la respuesta catabólica microbiana entre suelos de pasturas naturales y suelos de bosques (Stevenson et al., 2004). Hitzl et al., (1997) proponen el uso de ANOVAM para reducir el uso de fuentes de carbono en los ensayos con BIOLOG y utilizar la combinación reducida de sustratos que mejor diferencie los tratamientos. Continuando esta línea de pensamiento, pero con idea de utilizar ya un set pequeño de fuentes de C, la información obtenida de las curvas de fluorescencia fue analizada de manera multivarial aplicando el ANOVAM para cada fuente de C y utilizando los diferentes parámetros como variables.

Cuando analizamos los parámetros de cada CLPP por medio del ANOVAM, vimos que para las muestras de verano los suelos de AN fueron diferentes de manera significativas solo de los suelos de MPA, pero no de los tratamientos de BPA en los casos de la respiración basal y con el adicionado de ácido propiónico como fuente de

C extra. Solo los CLPP inducidos con ácido cumárico y vaníllico diferenciaron los suelos de AN de ambas prácticas agrícolas (Tabla 2.2). Mientras que en las muestras de invierno se encontraron mayores diferencias significativas entre los tratamientos. El CLPP inducido por el agregado de ácido cumárico fue capaz de diferenciar significativamente los tres tratamientos. Además, las BPA pudieron ser diferenciadas de manera significativa de las MPA cuando la respiración fue inducida por el agregado de ácido propiónico. La respiración basal (RB) muestra diferencias significativas entre AN y MPA, siendo las BPA iguales a los dos tratamientos. Finalmente, el ácido vaníllico diferenció a los AN de ambas prácticas agrícolas (Tabla 2.2). Se ha demostrado previamente que para estos mismos suelos, las diferencias entre las prácticas agrícolas modifican la diversidad bacteriana a nivel regional. El monocultivo de las MPA se ha identificado con la homogenización de la diversidad bacteriana a nivel regional por la pérdida de los grupos bacterianos endémicos (Figuerola et al., 2014). También se detectaron grupos taxonómicos bacterianos que fueron característicos o indicadores de las diferentes prácticas agrícolas (Figuerola et al., 2012). Estos ensayos acerca de las diferencias en la diversidad bacteriana de acuerdo a las prácticas agrícolas y las diferencias en los perfiles lipiditos de los fosfolípidos y lípidos neutros en estos suelos (Ferrari et al., 2015) respaldan las diferencias obtenidas por medio de estos CLPP. Otros argumentos cuantitativos a nivel de niveles de materia orgánica (Duval et al., 2013) y biomasa microbiana (Gabbarini et al., 2017) también están en sintonía con las diferencias en los CLPP de las prácticas agrícolas presentadas aquí.

Fuentes de Carbono	Muestras					
	Verano	Invierno	Verano con N	Invierno con N	Verano Ndiff	Invierno Ndiff
Respiración Basal	AN≠MPA	AN≠MPA	n.s.	AN≠MPA	n.s.	n.s.
Acido Cumarico	AN≠(BPA=MPA)	AN≠BPA≠MPA	AN≠MPA	AN≠MPA	n.s.	n.s.
Acido Propionico	AN≠MPA	AN≠(BPA=MPA)	AN≠MPA	(AN=BPA)≠MPA	n.s.	n.s
Acido Vanillico	AN≠(BPA=MPA)	AN≠(BPA=MPA)	AN≠MPA	(AN=BPA)≠MPA	n.s.	n.s

Tabla 2.2: Comparación entre las diferencias significativas de los tratamientos analizados por medio del ANOVAM con Hostelling Test ($P < 0,05$). ≠ indica diferencias significativas entre los tratamientos.

Cuando se agrega el N a las suspensiones de suelo de las muestras de verano, los CLPP inducidos por el agregado adicional de las fuentes de C mostraron diferencias significativas entre AN y MPA, no pudiendo diferenciar a las BPA de los otros dos

tratamientos. El CLPP de las respiración basal con el adicionado de N no presentó diferencias significativas entre los tratamiento. Cuando el N es adicionado a las suspensiones de suelo con las muestras de invierno, los AN se diferenciaron de las MPA, siendo las BPA iguales a los otros dos tratamientos para los CLPP inducidos por la respiración basal y por el agregado del ácido cumárico. Por otro lado, los CLPP inducidos por los ácidos propiónico y vanilico mostraron diferencias significativas entre las muestras de las BPA y las MPA (Tabla 2.2). Figuerola y compañía presentaron que la concentración de N total en los tratamientos disminuye desde AN > BPA > MPA, con lo cual el agregado de N a las soluciones de suelo podría estar suplementando un factor limitante o deficiente, disminuyendo así las diferencias entre los tratamientos agrícolas (Figuerola et al., 2012). El análisis de las respuestas diferenciales de los Ndiff, que es producto de la diferencia entre las soluciones con el agregado de N o sin N para el parámetro Fmax, no muestran diferencias significativas entre tratamientos para ninguna fuente de carbono (Tabla 2.2).

2.3.2) Análisis integral multivariado de los CLPP por tratamiento.

El ACoP basado en los 16 parámetros evaluados de manera conjunta para cada muestra de suelo sin N adicionado para ambas épocas, explicó el 58,0% y el 28,4% de la varianza para los PC1 y PC2, respectivamente (Figura 2.2A). Las muestras de verano agruparon los suelos agrícolas independientemente de su manejo, mostrando que los suelos de las BPA y las MPA tienen CLPP similares y que se separan de los suelos de AN (Figura 2.2A, círculos). Las muestras de inviernos, en cambio, agruparon los suelos de AN y de BPA cercanos entre sí, de acuerdo al CP1, que se diferencian de las MPA. (Figura 2.2A, cuadrados). Los efectos estacionales de los CLPP son separados a lo largo del CP2, estando las muestras de verano hacia el lado positivo del CP2 y las muestras de invierno hacia el lado negativo del CP2. Podemos ver los TMR se orientaron hacia donde se ubican las MPA y en cambio los AUC8 hacia el lado de las AN principalmente. Esto podría deberse principalmente a que cuando los TMR presenten mayores valores, mayor fue el tiempo necesario para que iniciara el consumo de O_2 y la fluorescencia aumente. Como muestra Gabbarini y colaboradores, la biomasa microbiana disminuye desde los AN hacia las MPA (Gabbarini et al., 2017). Por otro lado los Fmax y los AUC24 se orientaron hacia los valores positivos del CP2 donde se encuentran las muestras de verano. Estas observaciones están corroboradas por las distancias euclidianas entre los tratamientos (Tabla 2.4). Las distancias entre las prácticas agrícolas es de 1,97 para las muestras de verano y 3,98

para las muestras de invierno. La adición de N a las suspensiones de suelo no modifica la substancialmente la distancia de separación entre los tratamientos y la distribución de las muestras en el grafico (Figura 2.2B, Tabla 2.4).

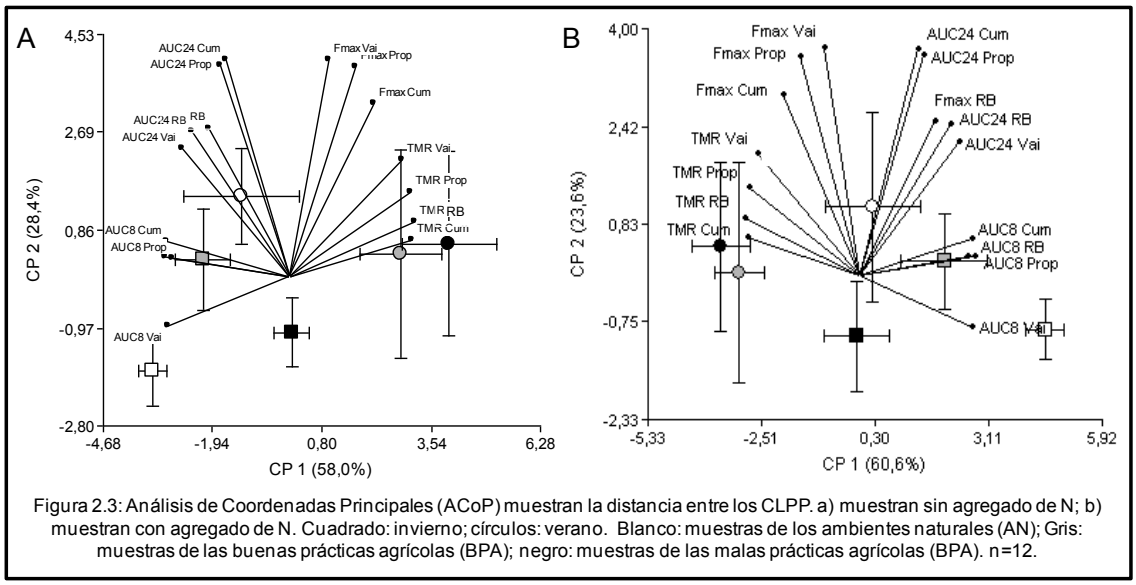

Figura 2.3: Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) muestran la distancia entre los CLPP. a) muestran sin agregado de N; b) muestran con agregado de N. Cuadrado: invierno; círculos: verano. Blanco: muestras de los ambientes naturales (AN); Gris: muestras de las buenas prácticas agrícolas (BPA); negro: muestras de las malas prácticas agrícolas (BPA). n=12.

De este modo podemos concluir que la fisiología del suelo estimada por los CLPP muestra un efecto estacional diferencial para con las prácticas agrícolas. Los CLPP de invierno parecen ser más apropiados que los del verano para hacer una distinción entre suelos con diferentes manejos agrícolas. El clima puede jugar un rol mayor, debido a que la temperatura del suelo podría estar parcialmente influenciando la humedad y la actividad del suelo (Davidson & Janssens, 2006), pero también existe un factor importante que es el efecto de los cultivos, en estado avanzado de madurez, sobre las comunidades microbianas del suelo, ya que influencian la actividad del suelo muestreado en la capa superior del suelo (McDaniel et al., 2014). Estudios recientes demuestran que la respiración de los suelos esta principalmente regulada por la humedad de los suelos (Bailey et al., 2017; Hawkes et al., 2017). Spedding et al., (2004) encontró una mayor variación en la dinámica estacional en las comunidades microbianas debido a los cambios en las comunidades fúngicas. La medición cuantitativa de hongos y bacterias en estas mismos suelos por medio de los perfiles de ácidos grasos de las fracciones lipídicas mostró una disminución de verano a invierno para ambos grupos, pero los hongos sufrieron una disminución mayor en sus valores (Ferrari et al., 2015).

Con el fin de identificar cuales parámetros podrían contribuir en mayor proporción a agrupar y separa las muestras de acuerdo a su uso y manejo (Tabla 2.5), se llevó a cabo un análisis Discriminante Lineal (ADL) para las muestras de verano y de invierno,

con y sin el adicionado de N (Figura 2.3). La discriminación de las muestras de acuerdo al uso y al manejo del suelo fue posible para las muestras para ambas la época del año sin el adicionado de N (Figuras 2.3A y 2.3B) mientras que el agregado de N produce CLPP con menores diferencias entre los tratamientos. Las muestras no presentan ningún patrón de agrupamiento distintivo (Figuras 2.3C y 2.3D). La mejor discriminación se produce para las muestras de inviernos sin la adición de N (Figura 2.3B). El ADL nos permitió seleccionar las variables o parámetros de los CLPP que tienen mayor en la función discriminante. Los parámetros seleccionados fueron: el AUC24 para ácido Cumárico. Este parámetro permitió discriminar los AN en ambas épocas del año, el Fmax con los ácidos cumárico y propiónico y el AUC24 con el ácido vaníllico podrían son parámetros discriminativos de las MPA; el TMR de las respiración basal fue también discriminante de los AN. Finalmente el TMR con ácido cumárico resulto un parámetro discriminante de las BPA en las muestras de invierno (Tabla 2.5).

Tratamiento	Verano	Invierno	Verano con N	Invierno con N
AN-BPA	5,79	7,85	5,49	3,64
AN-MPA	6,94	8,98	5,16	5,66
BPA-MPA	1,97	3,98	1,87	4,01

Tabla 2.3: Distancias Euclidianas entre los tratamientos derivados los Análisis Coordenadas Principales.

La respiración inducida por los ácidos cumárico y vaníllico podrían estar reflejando el funcionamiento diferencial y particular de grupos microbianos responsables de las diferencias fisiológicas de los suelos a nivel de comunidades microbianas. Esta idea se encontraría apoyada en el hecho de que los parámetros derivados de las curvas de consumo de oxigeno muestras que los mayores valores de los parámetros en el análisis de ADL diferencian entre las prácticas agrícolas. Estos ácidos son compuestos de la degradación de la lignina y su ruta metabólica es considerada relevante en el funcionamiento del suelo y su ciclo de C (Zabaloy et al., 2010; Martens, 2002; Lin & Brooks, 1999). Los ácidos fenólicos tales como el cumárico pueden ser encontrados también en los exudados de las raíces. El maíz o la vegetación de las praderas contienen 15 y 5 veces más ácidos fenólicos en comparación con la soja, respectivamente (Martens, 2000).esto permitiría interpretar que una habilidad de respirar el ácido cumárico se encontraría estimulada por selección en función del sustrato disponible en los suelos de AN y las BPA dado que las BPA incluyen maíz y cereales en sus rotaciones, en cambio las MPA están principalmente basadas en el monocultivo de soja. Esta hipótesis debería ser puesta a prueba en un futuro

analizando los efectos de intensificación y diversificación de los regímenes de la rotación de cultivos

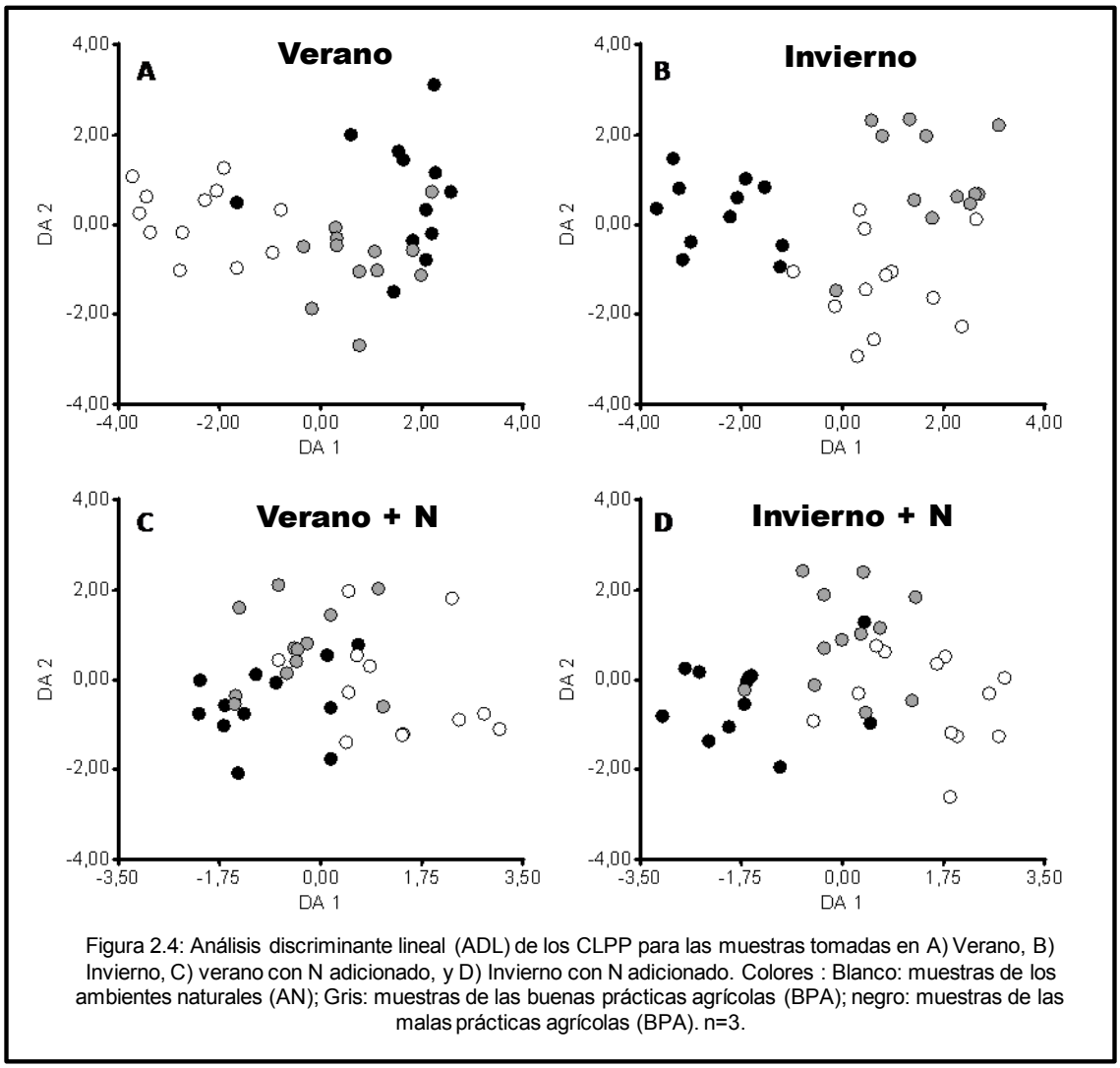

Figura 2.4: Análisis discriminante lineal (ADL) de los CLPP para las muestras tomadas en A) Verano, B) Invierno, C) verano con N adicionado, y D) Invierno con N adicionado. Colores : Blanco: muestras de los ambientes naturales (AN); Gris: muestras de las buenas prácticas agrícolas (BPA); negro: muestras de las malas prácticas agrícolas (BPA). n=3.

2.3.3) Análisis de los CLPP basados en muestras de suelos secos.

Si bien nuestro primer objetivo fue analizar las diferencias entre los suelos con diferentes manejos agrícolas por medio del uso de los CLPP en muestras de suelos frescas o conservadas a 4º C, también los cambios de los CLPP fueron comparados en muestras secas procesadas previamente para su conservación. El secado de las muestras de suelo es una metodología muy común de preservación de muestras de suelo, y permitiría analizar y comparar muestras obtenidas en diferentes momentos. En estos casos, las muestras de suelo son rehumedecidas antes de su ensayo

biológico de acuerdo al método utilizado en el laboratorio para la cuantificación de la biomasa microbiana (Widmer et al., 1989).

Fuentes de Carbono	Muestras		
	Invierno	Invierno con N	Invierno Ndiff
Respiración Basal	AN≠MPA	AN≠MPA	n.s.
Acido Cumarico	AN≠(BPA=MPA)	AN≠MPA	AN≠MPA
Acido Propionico	n.s	(AN=BPA)≠MPA	n.s
Acido Vanillico	AN≠MPA	(AN=BPA)≠MPA	n.s

Tabla 2.4: Comparación entre las diferencias significativas de los tratamientos para las muestras secas tomadas en invierno, analizados por medio del ANOVAM con Hostelling Test ($P < 0,05$).

En líneas generales, los suelos secos mostraron una demora en la respuesta (mayores valores de TMR) y curvas más simples con menores AUC24 y curvas con menor grado de complejidad (picos simples; Figura 2.4). Sin embargo, cuando utilizamos ANOVAM sobre el conjunto de parámetros obtenidos de las muestras secas, los CLPP de la respiración basal y con el adicionado de los ácidos cumárico y vaníllico mostraron diferencias entre las muestras de los AN y las MPA (Gráficos no mostrados). La respiración basal y el ácido vaníllico mostraron a las BPA con respuestas intermedias en comparación con los AN y las MPA. En cambio, el ácido cumárico mostró diferencias significativas entre los AN y las prácticas agrícolas. Finalmente el ácido propiónico no mostro diferencias significativas (Tabla 2.4).

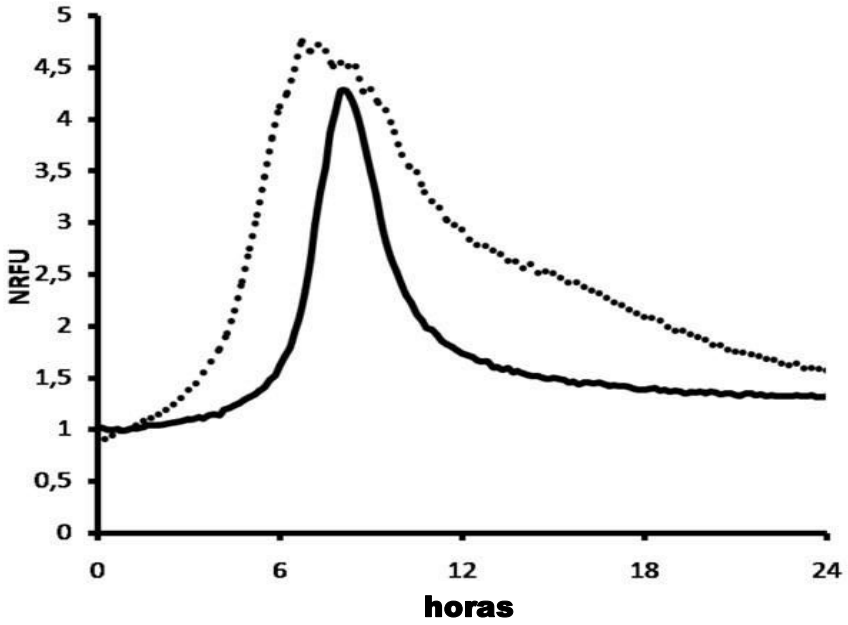

Figura 2.4: Curva de fluorescencia comparativa (NRFU) entre suelos secos y suelos frescos. Línea continua: suelo fresco; línea de puntos suelo seco.

2.4) Conclusiones

Los resultados descriptos en este capítulo muestran que los **CLPP poseen el potencial para discriminar entre dos manejos agrícolas** en siembra directa substancialmente muy similares por ser ambas tratamientos del suelo manejados en Siembra Directa. Sin embargo, las diferentes prácticas agrícolas modifican los CLPP y los agrupan según el tratamiento a pesar de que las réplicas de los tratamientos se realizaron en suelos con diferentes texturas y pertenecientes a diferentes ambientes distanciados por cientos de kilómetros. El análisis multivariado nos permitió reducir un set con muchos parámetros obtenidos a partir de las curvas de consumo de O_2 a solo un par de mediciones y comparaciones.

Pudimos observar que las muestras de suelo se agruparon principalmente de acuerdo a las prácticas agrícolas del suelo más que por el origen geográfico de las muestras. Además observamos una diferencia estacional entre las épocas de muestreo. **Invierno parece ser la época del año más adecuada para muestrear** y llevar a cabo el análisis que maximice las diferencias en la historia de uso y los tratamientos llevados a cabo en los últimos tiempos. Por otro lado hemos presentado una serie de posibles indicadores de prácticas agrícolas.

El CLPP provee un enfoque simple para evaluar simultáneamente múltiples atributos funcionales de las comunidades microbianas y tener un potencial para proveer una herramienta de monitoreo efectivo para respaldar la adopción de prácticas agrícolas sustentables en los suelos.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Capítulo 3

Dinámica de un cambio en el manejo del suelo, de la Siembra Directa a la Labranza Convencional y viceversa

3.1) Introducción

Los diferentes manejos de suelos y prácticas agrícolas modifican y direccionan la estructura y las funciones de los ecosistemas agrícolas. Los manejos del suelo más utilizados en nuestro país son la labranza convencional y la siembra directa. La **labranza convencional** (LC) es el manejo del suelo donde los residuos de los cultivos son incorporados al mismo a través de la ruptura del suelo por medio del arado y la rastra. La labranza se utiliza con el fin de introducir la materia orgánica, airear el suelo, reducir la compactación y controlar las plagas que afectan a los cultivos, lo que incrementa la germinación de las semillas y el rendimiento de los cultivos (Raper et al., 2000). Sin embargo, también se sabe que la labranza produce la erosión del suelo por perdida de materia orgánica, disminución de la infiltración del agua y perdida de la estructura, disminuyendo la calidad del suelo debido a la destrucción de los agregados del suelo y por ende su estructura (Allmaras et al., 2000). En contraposición a la labranza, la **siembra directa** (SD) es utilizada como técnica conservacionista al incrementar los nutrientes y la estructura del suelo, incrementando los stocks de carbono, y proporcionando un mejor hábitat y sustrato para la biota (Holland, 2004).

Cuando se pasa de la labranza convencional a la siembra directa se ha documentando la existencia de un retardo en la respuesta de los suelos (West & Post, 2002). Esta demora se verifica, cuando se analizan los parámetros como el incremento del carbono, la utilización eficiente de los nutrientes o el impacto en el rendimiento de los cultivos (Pittelkow et al., 2015a), todo ello asociado con el nuevo equilibrio de las redes tróficas (Phatak et al., 1999). Una correcta comprensión de la dinámica del suelo es importante para poder identificar qué cambios en los parámetros medibles se puede esperar y cuán rápido estos cambios aparecerán.

En este capítulo como primer objetivo se busco comparar a nivel químico, físico y bioquímico las diferencias entre la LC y la SD. Y en segundo término, se comparó la dinámica de cambio entre ambos tratamientos (de SD a LC y LC a SD) durante los primeros tres años. De acuerdo con algunos autores, se podría pensar que durante la primavera y el verano las comunidades microbianas del suelo son mayores o más activas y se verían más impactadas por los diferentes tratamientos del suelo, lo cual aumentaría la sensibilidad de encontrar diferencias entre los tratamientos (Griffiths et al., 2003; Jangid et al., 2008). Asumiendo esa hipótesis de trabajo, se tomaron muestras de los suelos en estudio durante tres primaveras tardías de manera consecutiva (2013-2015). Los suelos se analizaron en términos de su contenido de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

materia orgánica, composición de agregados y comportamientos fisiológicos en términos de CLPP y perfiles de actividades enzimáticas.

Objetivos de este capítulo: estudiar las diferencias entre los manejos agrícolas y posteriormente la dinámica de cambio de manejo cuando se cambia de una labranza convencional a una siembra directa y viceversa, cuando la siembra directa pasa a labranza convencional.

Hipótesis: 1) El cambio de manejo no producirá respuestas fisiológicas con valores cercanos a los presentados por sus controles actuales en un plazo relativamente corto de tiempo (1-2 años).

2) Las respuestas fisiológicas tendrán diferente dinámica según la dirección del cambio de manejo del suelo. Por lo que no será equivalente el pasaje de siembra directa a labranza convencional que el pasaje de labranza convencional a siembra directa.

3.2) Materiales y Métodos

3.2.1) Sitio de estudio y muestreo de los suelos.

El sitio de estudio corresponde a un ensayo localizado en el Establecimiento Hogar Funke, (Tornquist, Provincia de Buenos Aires, Argentina; 38°09′S 61°57′O). El suelo es Argiudoll Típico y es representativo de la región pampeana central-sudeste semiárida. El clima es una temperatura continental semiárida. La temperatura anual promedio y las precipitaciones son 15 ºC y 799 mm, respectivamente.

El experimento fue establecido originalmente en 1986 en dos parcelas linderas de 8 Ha, con el propósito de contrastar los dos sistemas de labranza: siembra directa y la labranza convencional. La LC fue llevada adelante utilizando cincel y rastra de disco con una profundidad de 7-20 cm. Exceptuando el laboreo del suelo, todas las otras prácticas agrícolas siempre fueron similares entre ambas parcelas, cultivos, aplicaciones de agroquímicos, etc. Más detalles se pueden encontrar en Galantini et al., (2006) y Galantini & Keine, (2013), incluyendo las prácticas de laboreo, secuencia de cultivos y detalles de las propiedades físicas y químicas del suelo en cada tratamiento.

Sobre la base del ensayo de más de 30 años de antigüedad, se realizó un cruzamiento de manejos de laboreo del suelo. En junio del 2013 se subdividieron una parte de las parcelas originales y a partir de ese momento se realizaron los laboreos en forma cruzada, manteniendo un amplio sector con el laboreo original como control, es decir, la parcela de la siembra directa queda subdividida en un sector que continuó en siembra directa (SD) y otro sector que se convirtió en un nuevo tratamiento de labranza convencional (N-LC). El mismo tipo de cambio se realizó en la parcela de labranza convencional original, donde queda divida en la labranza convencional y en una franja donde se realiza la nueva siembra directa (N-SD).

Los muestreos sucesivos se realizaron en puntos geolocalizados durante la primavera tardía en los primeros días de Diciembre de 2013, 2014 y 2015. Dado que el cambio de labranza o manejo del suelo se realizó en los primeros días de junio 2013, las fechas de muestreo representan 6, 18 y 30 meses posteriores al cambio de manejo.

Las muestras fueron tomadas por quintuplicado para cada tratamiento en un área de 5 m^2 para cada submuestra compuesta por 25 piques de barreno, de 2 cm de diámetro, que fueron puestas juntas en una bolsa y mezcladas para formar una muestra compuesta. Se tomaron muestras a dos profundidades 0-5 y 5-10 cm. Las muestras

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

fueron conservada en frio y llevadas al laboratorio, donde fueron almacenadas en heladera a 4º C previa preparación de las mismas por pasaje por un tamiz de 2 mm.

3.2.2) Análisis de los Perfiles Fisiológicos a Nivel de las Comunidades (CLPP) de suelo.

SE utilizaron las microplacas de 96 pocillos con el sistema biosensor de oxigeno (OBS) para los análisis fisiológicos de suelo como ya fue descrito en el capítulo 2. Por interrupción de comercialización de las placas BD, las placas OBS utilizadas en esta parte del trabajo fueron diseñadas y manufacturas de acuerdo al trabajo (McLamore et al., 2014). Para más detalles ver Anexo. En cada pocillo se agregaron 40 µl por de las soluciones de las fuentes de carbono o agua desionizada estéril para determinar la respiración inducida por sustrato o la respiración basal, respectivamente. Las suspensiones de suelo (160 µl) fueron pipeteadas en cada pocillo, resultando en un volumen final de 240 µl con el agregado de 40 µl de agua desionizada estéril.

Las suspensiones de suelo fueron preparadas mezclando 1 g de suelos con 5 ml de agua destilada estéril en un tubo de 15 ml conteniendo aproximadamente 5 ml de perlitas de metal de 2 mm para mezclado y homogenizado mediante ULTRA TURRAX Tube Drive (IKA, Alemania) durante 2 min. Las soluciones madre de fuente de C (300 µg/L) y de N (60 µg/L) fueron preparadas para obtener una concentración final de 50 mg/L de C. Las fuentes de C seleccionadas para el análisis de los CLPP fueron el Ácido p-Cumárico, Ácido Propiónico y Ácido Vaníllico (Sigma, E.E.U.U.). Todas las soluciones stocks y el agua destilada fueron esterilizadas utilizando filtros (< 0,22 µm, Sartor, E.E.U.U.) y almacenados a 4º C previos a ser ensayadas en las microplacas.

Los datos de las cinéticas fluorescentes del consumo de oxigeno fueron reportados como unidades de fluorescencia relativa normalizados (NFRU), al dividir el valor de fluorescencia en cada punto por el valor de 1 h después de haber comenzado el ensayo. El tiempo minino de respuesta (TMR) fue definido como el tiempo necesario para que se alcance un valor de 1.1 de NRFU. La cinética de fluorescencia muestra un pico, donde la concentración de oxigeno disuelto es mínima, y como luego la actividad respiratoria declina debido al agotamiento de la sustrato fácilmente disponible, y la continua difusión del O_2 regenera la matriz. El pico de la respuesta fluorescente (Fmax) fue calculado para todas las muestras como otro parámetro de la actividad respiratoria, asumiendo una tasa de difusión constante.

3.2.3) Análisis de la actividad de enzimas extracelulares (EAA).

La Actividad de las Enzimas Extracelulares (EEA) del suelo fue determinado de acuerdo a Marx et al., (2001), utilizando microplacas de 96 pocillos y substratos unidos a 4-metilumbelliferona (MUB) fluorescente; también se hicieron los controles correspondientes (MUB más suelo (quenching), Buffer MES más sustratos, Buffer MES más suelo). Las muestras de los suelos de referencia (SD, LC) y los correspondientes a los cambios de manejo (N-LC, N-SD) fueron analizadas para las siguientes actividades enzimáticas: β-cellobiohidrolasa, N-acetil-β-glucosaminidasa, β-glucosidasa, fosfatasa acida, y sulfatasa usando 4-metilumbelliferona-β-D-celobiosa, 4-metilumbelliferona-N-acetil-β-D-glucosamina, 4-metilumbelliferona-β-D-glucopiranosa, 4-metilumbelliferona-fosfato, y 4-metilumbelliferona-sulfato como sustrato, respectivamente. La suspensión de suelo se realizó mezclando un 1 g de suelo fresco con 100 ml de buffer MES 0,1 M pH 6,1. Las suspensiones de suelo fueron obtenidas por el mezclado vigoroso durante 2 min por medio del sistema ULTRA TURRAX Tube Drive (IKA, Alemania). Para la determinación de cada actividad enzimática, en cada pocillo se agregaron 200 µl de la suspensión de suelo y 50 µl de la solución de los sustratos (200 µM). Las placas cargadas fueron incubadas 5 min a 30º C y luego se midió la intensidad de la fluorescencia en el lector de fluorescencia en microplacas (POLARstar Omega, BMG LABTECH, Alemania) utilizando una longitud de onda de 355 nm para la excitación y de 460 nm para la emisión. El equipo se programó para que realice 25 ciclos de 60 segundos a 30° C. Los datos obtenidos en unidades relativas de fluorescencia por min fueron convertidos en nM MUB [g Suelo]$^{-1}$ h^{-1} de acuerdo a estándares específicos, que fueron preparados en submuestras de varias suspensiones de suelo (Marx et al., 2001)

3.2.4) Cuantificación de la biomasa microbiana (Cmic).

La medición de la biomasa microbiana fue cuanquificada a través de la medición del carbono de la biomasa microbiana (Cmic) se realizó por el método de extracción-fumigación (Vance et al., 1987). Brevemente, las muestras del suelo fueron divididas en cuatro submuestras de 7,5 g y cada submuestra fue puesta en un tubo Falcon de 50 ml. A dos de los tubos, se le agrego 0,4 ml de cloroformo libre de etanol (Research, Argentina), y fueron incubadas durante 30 min, estas muestras son las muestras fumigadas, y las submuestras no fumigadas (aquellas que no recibieron cloroformo) fueron los controles. Posteriormente se agregó 30 ml de K_2SO_4 0,5 M, y se agito durante una hora a una velocidad de 200 rpm. A continuación se centrifugó a 800 g (Thermo Electro Corporation, rotor R 8947, Reino Unido) durante 15 min y finalmente

se filtró el extracto a través de papeles filtro de line azul FP0859 (Hahnemühle, Alemania).

El carbono de la biomasa microbiana (Cmic) fue estimado por la oxidación de bicromato (Joergensen & Mueller, 1996). Donde se tomaron 4 ml de la extracción filtrada y se le agregó 1 ml de $K_2Cr_2O_7$ 0,199 M y 4 ml de H_2SO_4. Se llevo al horno a 180º C durante 30 min. Posteriormente se le agrego 1 ml de H_2O_d y se midieron en el espectrofotómetro a 590 nm las muestras fumigadas y las no fumigadas. Los valores obtenidos fueron expresados como valores promedios basados en una curva estándar con glucosa y biftalato de potasio (0.015 – 0.075 mg/ml). El Cmic fue expresado como microgramo de C oxidable por gramo de suelo seco calculado como la diferencia entre las submuestras del suelo fumigado y el suelo no fumigado. Finalmente a la diferencia se la dividió por el coeficiente de extracción de 0,45.

3.2.5) Cuantificación de las fracciones de agregados.

El fraccionamiento granulométrico del suelo fue hecho mediante tamizado en húmedo (Galantini et al., 2005; Elliott & Cambardella, 1991). Brevemente, 20 g de suelo previamente secado tamizado por 2 mm, fue dispersado en tubos Falcon de 50 ml con 50 ml de agua desionizada conteniendo 10 bolitas de metal (5 mm de diámetro) para facilitar la dispersión de los agregados y reducir los posibles problemas creados por las diferencias en los contenidos de arena (Elliot & Cambardella, 1991). Las muestras fueron sometidas a dispersión mecánica en un agitador orbital por aproximadamente 16 horas (40 rpm) para liberar los agregados. El tamizado fue hecho con un par de tamices con mallas de 63 µm y 105 µm de tamaño de poro de la red, hasta que el agua que salía del tamiz más pequeño era trasparente a ojo desnudo.

De este modo se obtuvieron tres fracciones de diferente tamaño, la fracción gruesa (2000-105 µm), fracción media (105-63 µm) y la fracción fina (<63 µm). El líquido conteniendo la fracción < 63 µm fue centrifugado a 2000 rpm y transferido a una placa de Petri. El material retenido en cada tamiz fue también transferido a placas de Petri de vidrio, secado a 105 ºC durante 24 horas para posteriormente pesarlo.

3.2.6) Mediciones de las variables químicas

Las mediciones de carbono orgánico total (COT) fueron hechas por medio de combustión seca (LECO Carbonanalyzer). Las mediciones de Fosforo Extraíble fueron hechas por medio del método de Fosforo Bray. El pH fue medido en solución acuosa 1:2,5. Estas mediciones fueron llevadas a cabo en el laboratorio del Dr. Juan Galantini, en la Universidad Nacional de Sur.

3.2.7) Análisis Estadístico

Las comparaciones entre las muestras de los diferentes tratamientos o manejos del suelo fueron realizadas con el Análisis de la Varianza (ANOVA) y el test Fisher´s con LSD 0.5 ($P < 0,05$). Cada parámetro de los CLPP determinados en diferentes condiciones de fuente de C y se realizo el ANOVAM seguido por una Prueba de Hostiling para cada fuente de C. Las relaciones entre tratamiento fue visualizado por medio Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) por medio de la distancia Euclidea. El análisis de correlaciones fue realizado por medio de Coeficientes de Correlaciones por Pearsons. Todo el análisis estadístico fue realizado con el software INFOSTAT (Di Rienzo et al.; 2013). Los gráficos radiales de las EAA fueron llevados a cabo con la normalización de las actividades enzimáticas, en la que al valor de la actividad de la actividad extracelular se le resto el promedio de todos los valores de esa actividad y posteriormente al resultado se lo divido por el desvió estándar para todos los valores de esa actividad enzimática. Los gráficos fueron realizados en Excel (versión 2010).

3.3) Resultados y discusión.

3.3.1) Caracterización química de las muestras

Carbono Orgánico Total (COT)

Como se observa en la Tabla 3.1, la Siembra Directa (SD) mostró siempre valores mayores de COT que la Labranza Convencional (LC), para los tres muestreos y ambas profundidades. Se observa que los valores de ambos cambios de tratamientos caen respecto a su tratamiento control anterior para todos los muestreos y profundidades con excepción del muestreo a los 30 meses en la profundidad de 5-10 cm.

Para facilitar el análisis de la dinámica de cambio, se graficaron las proporciones de cambio de los nuevos tratamientos respecto al tratamiento original, que se obtienen a partir de dividir los valores de los nuevos tratamientos (N-SD o N-LC) por el valor del tratamiento control original (LC o SD, respectivamente). En la figura (3.1A) se observa la tendencia a aumentar del COT en la relación N-SD/LC, y la tendencia a bajar de la N-LC/SD. En el ANOVA por muestreo para los primeros 5 cm de profundidad, las proporciones presentan diferencias significativas para el segundo ($P = 0,0057$) y tercer muestreo ($P = 0,003$), a los 18 y 30 meses posterior al cambio, respectivamente. Para la profundidad de 5-10 cm, las relaciones se comportan de manera similar entre los muestreos a los 6 y 18 meses posteriores al cambio. Recién en el tercer muestreo la relación N-SD/LC tiende a subir y la relación N-LC/SD a bajar y se observa diferencias significativas ($P = 0,0001$; Figura 3.1B).

Existe una gran cantidad de trabajos donde observan que la SD presentan mayores valores de COT en comparación con la LC (Díaz-Zorita et al., 2002b; Spedding et al., 2004; West & Post, 2002; Zhang et al., 2014). Respecto del efecto del cambio de labranza, Franzluebbers & Arshad, (1996) presentaron que el cambio de suelos labrados hacia practicas conservativas como la SD tuvo poco efecto sobre los valores de materia orgánica del suelo en los primeros 6 años. Sin embargo, Simmons & Coleman, (2008) encontraron que el pasaje de la LC a la SD a los 5 años siempre presentó menores valores de C que a los 30 años posteriores al cambio mostrando el efecto beneficioso del cambio y, varios otros estudios mostraron mayores incrementos de COT después de la conversión de la LC a la SD para medidas realizadas al cabo de 3 y 7 años, respectivamente (Muñoz et al., 2007; Pandey et al., 2014). La disminución del COT a corto plazo en los casos de los cambios de manejo podría estar relacionado con un cambio en la actividad metabólica de las comunidades microbianas

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

del suelo (Parhust et al., 1997). En este sentido, Díaz-Zorita et al., (2002) llevo a cabo ensayos donde se intercambian las labranzas con cuatro composiciones de cultivos diferentes y al cabo de cuatro años muestran que la acumulación de C dependió de la secuencia de cultivos, y que esta se incrementaba si se usaba maíz de manera reiterada.

Fósforo extraíble

Cuando analizamos el fosforo extraíble (Pext, Tabla 3.1), se observó tendencias similares a las que sucede con el COT, donde la SD presentó los mayores valores en comparación con la LC en los tres muestreos para la profundidad 0-5 cm, en cambio en los 5-10 cm de profundidad, la LC presento mayores valores que la SD. La N-LC y N-SD presentaron una disminución en los valores respecto a los controles.

TRAT.	AÑO	PROF.	COT (Mg/ha)	Pext (mg/kg)	Cmic (µg/g suelo)	Cmic/Ctoc (%)	> 105 (%)	105-63 (%)	< 63 (%)
LC	2013	0-5	1,96±0,08	64±3	521±110	2,74±0,68	15±2,3	27±2	54±4
N-LC	2013	0-5	2,47±0,6	53±8	351±77	1,63±0,48	25,5±1,5	30±1	43,5±1,6
N-SD	2013	0-5	1,65±0,02	38±5	342±38	2,08±0,23	20±1,6	35±2	43±1,3
SD	2013	0-5	2,47±0,08	81±3	522±102	2,15±0,46	29±2	23±1,2	46±0,8
LC	2013	5-10	1,85±0,06	57±5	418±67	2,23±0,32	17,6±1,6	30,6±1,5	50,1±1,5
N-LC	2013	5-10	1,54±0,03	13±4	378±105	2,45±0,69	25,2±0,8	34,7±0,45	38,8±1,1
N-SD	2013	5-10	1,56±0,03	29±3	343±84	2,17±0,51	16±0,88	36,4±1,4	45±3
SD	2013	5-10	1,94±0,08	51±4	394±51	2,05±0,28	33±3	24,4±1,8	39±1
LC	2014	0-5	1,85±0,05	51±3	464±135	2,53±0,74	12,8±0,7	25±1	59,6±0,7
N-LC	2014	0-5	1,83±0,06	40±5	550±70	3,03±0,44	20±1,6	31±0,62	47±1
N-SD	2014	0-5	1,68±0,05	41±2	458±87	2,69±0,48	18±1,7	29,3±1,8	49,7±1,2
SD	2014	0-5	2,39±0,09	66±3	553±74	2,32±0,3	24,3±2,4	23,2±1,2	52±2
LC	2014	5-10	1,86±0,06	46±4	810±122	4,42±0,75	13±2	27±1,2	58,2±1,6
N-LC	2014	5-10	1,73±0,06	36±2	825±32	4,81±0,32	18,7±3,7	32,4±1,1	46,7±3,5
N-SD	2014	5-10	1,62±0,06	25±2	854±63	5,32±0,52	17,7±1,3	34,5±1,9	52,4±1,4
SD	2014	5-10	1,9±0,07	53±8	698±76	3,67±0,35	26,5±1,6	25,7±1,7	49,6±3
LC	2015	0-5	2,51±0,09	48±2	543±8	2,18±0,09	22,2±1,5	24,7±1,1	51±2
N-LC	2015	0-5	2,06±0,13	36±4	564±83	2,7±0,4	31,9±2,1	31,9±0,6	34,2±0,9
N-SD	2015	0-5	2,32±0,04	40,9±6	487±28	2,1±0,1	30,4±1,5	34,8±1,1	35,8±2,7
SD	2015	0-5	3,14±0,07	70±2	560±8	1,79±0,05	39,4±1,2	27,9±0,9	30±0,9
LC	2015	5-10	1,97±0,07	49±4	394±16	2,01±0,11	10,78±0,5	29±1	58,5±1,6
N-LC	2015	5-10	1,77±0,06	26±3	323±44	1,81±0,21	14,5±0,8	32,4±1,2	50±2
N-SD	2015	5-10	2,04±0,05	24±3	328±24	1,62±0,13	14,7±0,9	31,9±1,3	50,4±1,4
SD	2015	5-10	2,36±0,08	49±3	304±33	1,29±0,15	22,6±0,7	29,1±1,5	46,1±1,4

Tabla 3.2: Variables químicas y físicas de los tratamientos agrícolas. n=5.

Cuando se analizó las proporciones de cambio en los primeros 5 cm de profundidad se observó una leve tendencia al alza en la relación N-SD/LC y lo opuesto para la relación N-LC/SD, sin que se presenten diferencias significativas (Figura 3.1C). En cambio, para la profundidad de 5-10 cm, no se observa ninguna tendencia (Fig. 3.1D). Existe una correlación positiva entre la cantidad de COT y Pext para ambas profundidades (0-5: P = 0.01, 0.32; 5-10: P = 0.0005, 0.52; Tabla 3.3), lo que podría estar relacionado con que una gran proporción de Pext se encuentra secuestrado en la materia orgánica (Sinsabaugh et al., 2008; Weil et al., 1988). En sintonía con nuestros resultados, Zibilske y colaboradores encontraron que el P orgánico es menor en la LC en comparación con la SD en los primeros 8 cm de profundidad, y en mayores profundidades la cantidad de fosforo aumenta en LC en comparación con la SD, atribuyéndolo a una re-distribución del fosforo en la LC (Zibilske et al., 2002).

Carbono de la Biomasa Microbiana (Cmic)

El carbono de la biomasa microbiana (Cmic) mostró que la SD presentó los mayores valores para la profundidad de 0-5 cm, pero para la profundidad 5-10 cm, la LC presentó mayores valores que la SD (Tabla 3.1). Cuando se compararon por medio del ANOVA, no se encontraron diferencias significativas para ningún tratamiento, independientemente del muestreo o la profundidad. Cuando analizamos las proporciones de cambio, observamos que no hay una tendencia de cambio definida (Figura 3.1E y 3.1F). La acumulación de biomasa microbiana en superficie de suelos en SD ha sido demostrada en una gran cantidad de trabajos (Zhang et al., 2014; Spending et al., 2004, Franzluebbers et al., 1996). Sin embargo, este fenómeno no ha sido observado de manera concluyente en otros trabajos (Carpenter-Boggs et al., 2003; Jiang et al., 2011a), indicando que no solo podría variar la cantidad sino también la composición del Cmic.

No se presentaron correlaciones entre los valores del COT y los valores de Cmic (P > 0,05; tabla 3.3), a diferencia de lo que se observa en otros ensayos donde si existe esta correlación. Sin embargo, esta correlación podría ser más propia del Cmic con el carbono activo que con el COT en suelos arenosos (Reeve et al., 2010; Weil et al., 2003). Posiblemente esta correlación se manifieste principalmente en suelos arcillosos, donde hay típicamente mayores concentraciones de biomasa microbiana respecto a los suelos arenosos, como los estudiados en Funke (Franzluebber et al., 1996).

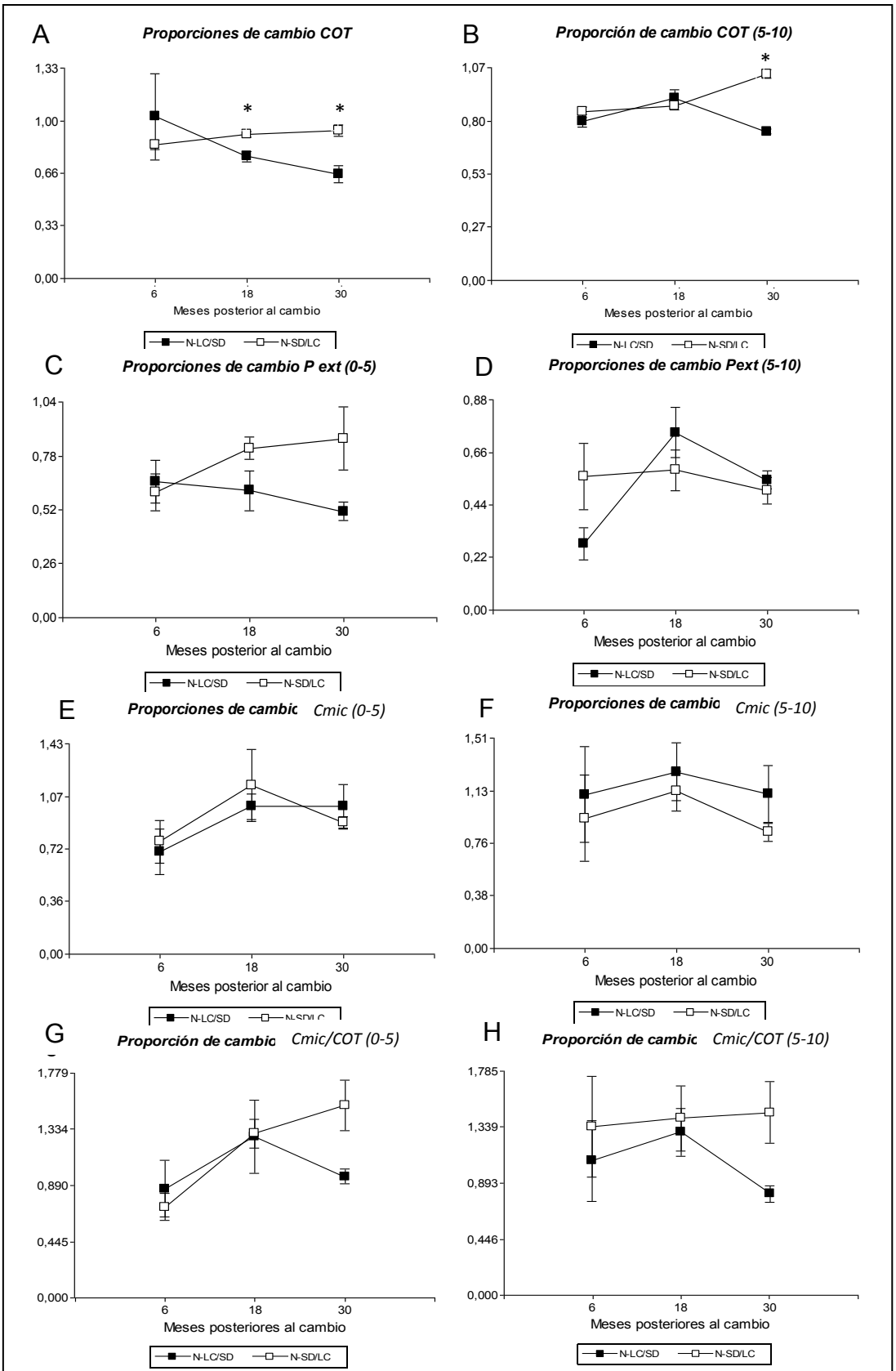

Figura 3.1: Gráficos de proporciones de cambio para N-LC/SD y N-SD/LC para los parámetros químicos. a) Carbono Orgánico Total (0-5); b) Carbono Orgánico Total (5-10); c) Fosforo extraible (Pext; 0-5) ; d) Fosforo extraible (5-10); e) Carbono de Biomasa Microbiana (0-5); e) Carbono de Biomasa Microbiana (5-10; g) relación CBM/COT (0-5); h) relación CBM/COT (5-10). n=5. El asterico muestra diferencias significativas en entre las relaciones (p>0,05).

Nosotros utilizamos el método de medición de la biomasa microbiana por medio de la técnica de fumigación-extracción (CFE, ***c**hloroform **f**umigation–**e**xtraction*; (Vance et al., 1987) ya que este es uno de los métodos más utilizados y debería proveer un índice total de la biomasa microbiana en suelo (incluyendo tanto bacterias como hongos). La técnica CFE está sujeta a ciertas limitaciones y puede sub- o sobreestimar el Cmic con baja porosidad y/o altas concentraciones de materia orgánica. Sin embargo, no existe un método de medición de la biomasa microbiana que esté libre de error (Fierer et al., 2009).

Cuando observamos la relación Cmic/COT, que representa el porcentaje de Cmic en el COT, vimos que para ambas profundidades la LC presentó mayores valores que la SD. Además observamos que los nuevos tratamientos presentaron mayores valores que los controles (Tabla 3.1). En 0-5 cm, se observó que a los 6 meses posteriores del cambio, la N-SD presentó mayores valores que la N-LC, sin embargo estas diferencias no fueron significativas. En cambio a los 18 y 30 meses, se observó que N-LC presenta mayores valores que N-SD. Cuando analizamos las proporciones de cambio, vimos que N-SD/LC crece a lo largo de los tres muestreos para ambas profundidades, en cambio, la N-LC/SD aumentó a los 18 pero bajó a los 30 meses posteriores al cambio, para ambos muestreos (Figura 3.1G y H). Se ha sugerido que la relación Cmic/COT refleja el potencial de mineralización de la materia orgánica de los suelos (García-Orenes et al., 2010). La SD produce un aumento de los agregados de mayor tamaño del suelo, lo que conllevaría a una mayor protección y estabilización de la materia orgánica (Six et al., 2000). Además otro aspecto involucrado sería la concentración de O_2 disuelto en el suelo, la cual es menor en SD y afecta la tasa de descomposición así como también podría afectar la distribución de los microbios aerobios y anaerobios (Zibilske et al., 2002).

3.3.2) Caracterización Física de las muestras

Entre las diferentes caracterizaciones físicas que se pueden realizar de los suelos, nos interesaba mirar la composición de las proporciones de las fracciones de agregados del suelo, pues esta mirada nos lleva a una nueva escala de análisis más propia de la escala microbiológica. Donde los diferentes tamaños o tipo de microagregados son a la vez pequeños nichos microbiológicos cuya funcionalidad y composición es en general desconocida.

Fracción > 105

En el análisis de la cuantificación de las tres fracciones de agregados de diferente tamaño, entre que se separaron las muestras de suelo, se observó que la SD presentó los mayores valores de la fracción de mayor tamaño (> 105 µm), y en cambio la LC presenta los menores valores, para ambas profundidades (Tabla 3.1). Los cambios de tratamientos presentan una cantidad intermedia de agregados > 105 µm, la cuales no presentaron diferencias significativas (P > 0,05). Cuando analizamos las proporciones de cambio de la fracción > 105 µm en la profundidad 0-5 cm se observa que la relación N-LC/SD es menor a uno. En cambio, la relación N-SD/LC presenta valores cercanos a 1,5. Lo que sugeriría que existe una manifestación temprana del efecto del cambio de labranza a nivel de la proporción de microagregados de mayor tamaño. Ambas relaciones muestras diferencias significativas para los tres muestreos y una tendencia a bajar (Figura 3.2A). Cuando analizamos las proporciones de cambio en 5-10 cm (Figura 3.2B), vemos que ambas relaciones tienen valores similares a los 6 meses posteriores al cambio. Y a los 18 y 30 meses posteriores al cambio la N-SD/LC aumento y se diferenció de manera significativa de la relación N-LC/SD (P = 0.0034 y P = 0,0009).

Fracción 105-63 µm.

Cuando observamos lo que sucede con la fracción media (105-63 µm), vimos que los nuevos tratamientos (N-LC y N-SD) son los que presentaron los mayores valores de esta fracción para todos los nuestros y en ambas profundidades (Tabla 3.1). A su vez, la LC presento mayores valores que la SD para los primeros dos muestreos, en cambio, en el tercero se presentaron iguales o levemente mayores en la SD. Cuando analizamos las proporciones de cambio, vimos que para 0-5 cm de profundida las relaciones N-LC/SD y N-SD/LC se comportaron de manera opuesta. Entre el primer y segundo muestreos la primera relación sube y la segunda baja, y entre el segundo y el tercer muestreo, se dieron los movimientos opuestos (Figura 3.2C). En cambio, en 5-10 cm de profundidad ambas relaciones bajaron (Figura 3.2D).

Fracción < 63 µm.

En la fracción más chica (< 63 µm) se observó que las muestras de la LC presentaron los mayores valores para todos los muestreos y en ambas profundidades. No se

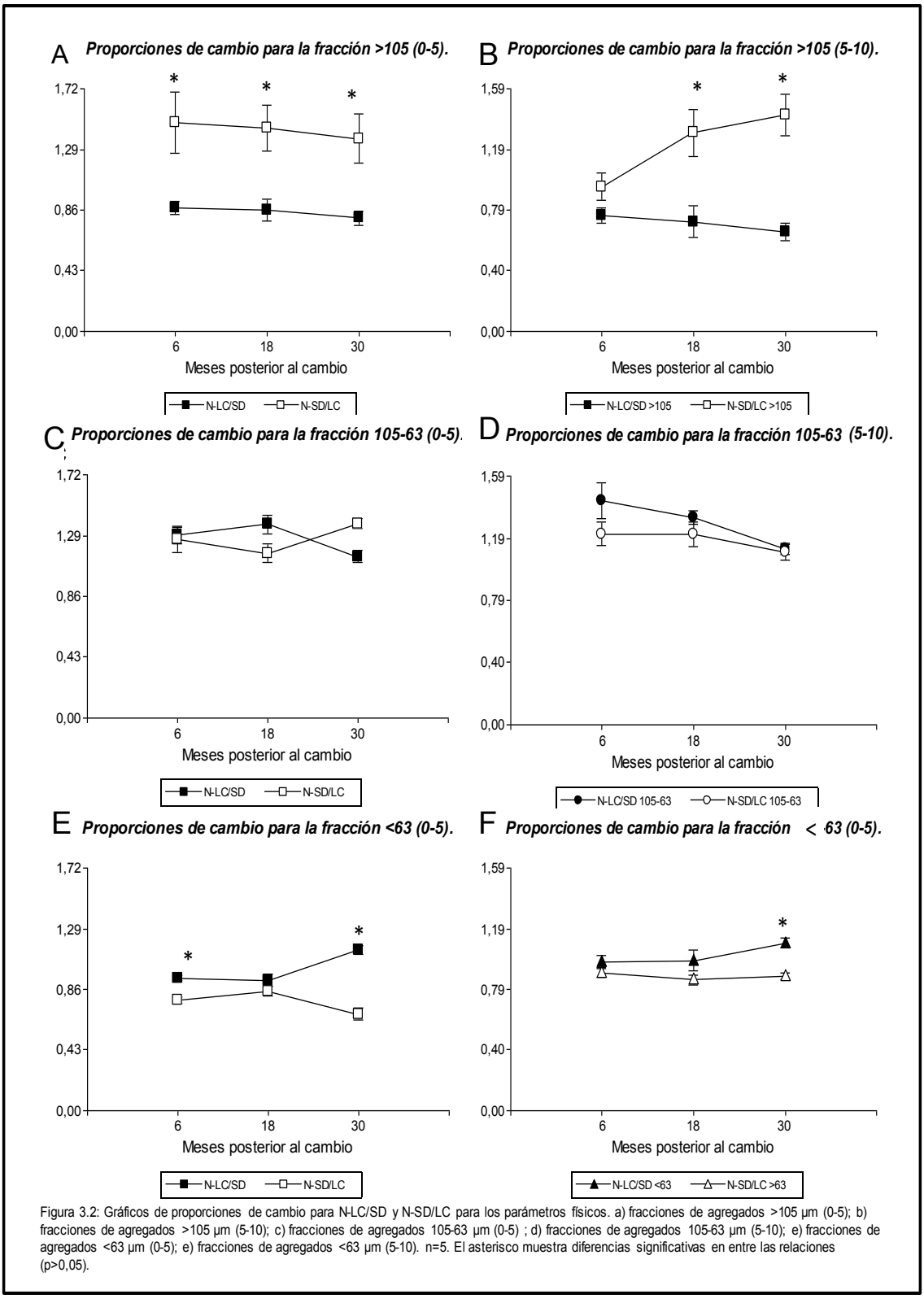

Figura 3.2: Gráficos de proporciones de cambio para N-LC/SD y N-SD/LC para los parámetros físicos. a) fracciones de agregados >105 µm (0-5); b) fracciones de agregados >105 µm (5-10); c) fracciones de agregados 105-63 µm (0-5) ; d) fracciones de agregados 105-63 µm (5-10); e) fracciones de agregados <63 µm (0-5); e) fracciones de agregados <63 µm (5-10). n=5. El asterisco muestra diferencias significativas en entre las relaciones (p>0,05).

observó una tendencia definida para los tratamientos que sufrieron el cambio de labranza (Tabla 3.1). Las proporciones de cambio para la profundidad 0-5 cm mostraron que a los 30 meses posteriores al cambio de manejo la relación N-LC/SD tiende a subir y en cambio la relación N-SD/LC bajó y mostró diferencias significativas

(Figura 3.2 E). Para la profundidad 5-10 cm, las proporciones de cambio mostraron que la relación N-LC/SD tuvo un leve incremento y en cambio la relación N-SD/LC se mantuvo constante (Figura 3.2 F).

En un análisis integral de las variaciones en las proporciones de las diferentes fracciones se observa que los valores de la fracción >105 µm se correlaciona inversamente con los valores de la fracción < 63 µm, por lo que se puede presuponer que cuando una fracción aumenta lo hace a costa de una agregación a partir de las fracciones menores, pues la otra disminuye (P < 0,0001; -0,74; Tabla 3.3). También sufren una correlación similar la fracción media con la fracción < 63 µm pero en menor medida (P =0,0266, -0,29; Tabla 3.3).

Cuando se correlacionan las fracciones de agregados con las variables química (Tabla 3.3) se vio que existe una correlación positiva entre la fracción > 105 µm con el COT (P < 0,0001; 0,56; Tabla 3.3) y en cambio de manera negativa para las fracciones restantes (P = 0,02; -0,29 y P = 0,01; -0,34; respectivamente; Tabla 3.3) para la profundidad de 0-5 cm. Por otro lado para la profundidad de 5-10 cm, se presentaron correlaciones negativas entre la fracción media con el COT y con el Pext (P = 0,0004; -0,42 y P <0,0001; -0,54; respectivamente; Tabla 3.3). Mayores concentraciones de COT almacenados en la SD podría ser atribuido a una mayor concentración de MOP secuestrado en la capa superior del suelo, interviniendo en la estabilización de los macroagregados y contribuyendo en que la tasa de recambio se más lenta en la SD que en la LC (Fernández et al., 2010; Six et al., 2000).

3.3.3) Caracterización fisiológica: análisis de las EEA.

La SD presentó valores, en promedio, 30% mayores que la LC para todas las enzimas en la profundidad de 0-5 cm, en cambio en la profundidad de 5-10 cm se observó una disminución de la SD con respecto a la LC en un 5% para la PME y NAG, un 20% para las enzimas involucradas en el ciclo del C, pero la SUL mostró un aumento en la SD de 30% con respecto a la LC. El efecto positivo de la SD en las propiedades del suelo ha sido sugerido en varios estudios (Alvear et al., 2005; E. Kandeler et al., 1999; Roldán et al., 2005; Six et al., 2000), principalmente basado en la formación y estabilización de la materia orgánica dentro de los microagregados y macroagregados (Six et al., 1999), por el incremento de la cantidad de residuos de los cultivos que quedan en superficie (Deng & Tabatabai, 1996) y un aumento de la biomasa microbiana (Sinsabaugh et al., 2008).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

β-glucosidasa.

Cuando analizamos la β-glucosidasa (BG) para la profundidad de 0-5 cm (Figura 3.4) observamos que los mayores valores se presentaron en la SD en comparación con la LC. Los nuevos tratamientos sufrieron una caída respecto a los tratamientos originales, en los primeros 6 meses posteriores al cambio. A los 30 meses observamos que la N-SD presento valores similares a la SD y lo mismo sucede con la N-LC con respecto a la LC. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas (P > 0,05). Cuando analizamos los tratamientos de 5-10 cm, vimos que la LC presentó valores mayores que la SD. No fue posible identificar ningún patrón de cambio, ya que a los 6 meses los nuevos tratamientos fueron muy similares a la SD. A los 18 meses, la LC y N-LC convencional presentaron valores muy similares entre sí, y mayores a los valores de la SD y la N-SD, que se diferenciaron entre si y de las labranzas (P < 0,05). Pero a los 30 meses no se presentaron diferencias significativa entre ningún tratamiento.

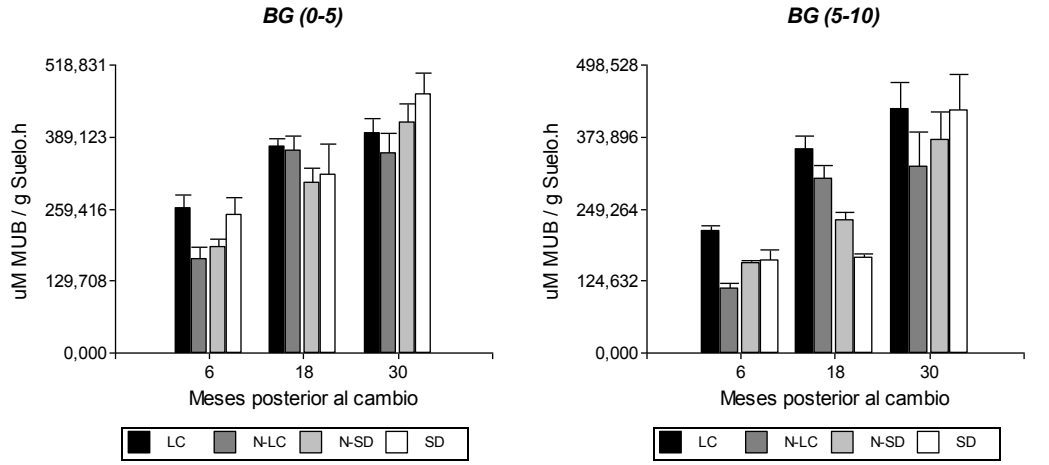

Figura 3.4: Gráficos de la actividad de la β-Glucosidasa para la profundidad a) 0-5 cm y b) 5-10. n=5. (uM MUB / g Suelo.h)

Por otro lado, cuando analizamos las relaciones de cambio para la profundidad de 0-5 cm, vimos entre los 6 y 18 meses posteriores al cambio ambas relaciones aumentaron, sin embargo hacia los 30 meses se observó que la relación N-SD/LC siguió aumentando y, en cambio, la relación N-LC/SD disminuyo, presentándose diferencias significativas entre ambas proporciones (Figura 3.3A). Cuando analizamos las proporciones de cambio para la profundidad 5-10 cm, se vio que las relaciones solo se diferencian entre los 6 y los 18 meses, la relación N-LC/SD aumentó para luego caer hacia los 30 meses, en cambio la N-SD/LC se mantuvo constante (Figura 3.3B). Solo se presentaron diferencias significativas en las relaciones de cambio a los 18 meses posteriores al cambio (P = 0,024).

La β-glucosidasa es una enzima extracelular que contribuye a la degradación de la celulosa y otros β-1,4 glucanos. Su principal función es la degradación de la celulosa a glucosa. La BG es presentada como indicador útil de la calidad del suelo para los efectos de los manejos agrícolas, la estabilización de la materia orgánica y los cambios fisicoquímicos (Bandick & Dick, 1999; Mendes et al., 1999; Ndiaye et al., 2000). Se ha reportado de manera reiterada que la mayoría de las enzimas hidrolíticas, entre las que se incluye a la BG, se incrementan cuando se reduce la intensidad de la labranza mejorando el contenido de materia orgánica y biomasa microbiana (Lagomarsino et al., 2009; Roldán et al., 2005). La presencia de residuos de cultivos previos pueden incrementar la actividad de la BG (Allison and Vitousek, 2005), lo cual se ve altamente relacionado con la SD para los primeros 0-5 cm debido a los residuos que se encuentran en superficie. En cambio en la LC, se podría estar dando un efecto de redistribución de las enzimas en todo el perfil del suelo similar a que mencionamos cuando hablamos de las variables químicas. La BG correlaciona significativamente de manera positiva con el COT, tanto para 0-5 y 5-10 cm de profundidad (0-5 cm: $P = 0,02$, 0,26; 5-10 cm: $P > 0,0001$, 0,76; Tabla 3.3), esta correlación lo hace un buen indicador del carbono de suelo. Esto se relaciona probablemente a que los polímeros de celulosa y los β-1,4-glucanos dominan los agregados de materia orgánica en los ecosistemas agrícolas (Sinsabaugh et al., 2008).

Cellobiohidrolasa.

La Cellobiohidrolasa (CEL), en la fracción 0-5 cm de profundidad, las muestras de la LC presentaron mayores valores que la SD en el primer muestreo, en cambio la SD presentó mayores valores que la LC para los muestreos a los 18 y 30 meses posteriores al cambio. Los tratamientos que sufrieron el cambio de manejo presentaron una caída en la actividad de esta enzima a los 6 meses posteriores. A los 18 meses la N-LC y la N-SD presentan valores intermedios entre la LC y la SD; y a los 30 meses los nuevos tratamientos ya presentaron valores muy similares a su tratamiento actual, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas (Figura 3.5).

Cuando analizamos las proporciones de cambio (Figura 3.3C), se vio que la relación N-SD/LC aumenta en ambos periodos de tiempo, y en cambio, la N-LC/SD primero cae levemente y luego aumenta. A los 18 y a los 30 meses posteriores al cambio se presentan diferencias significativas entre ambas relaciones ($P < 0,05$).

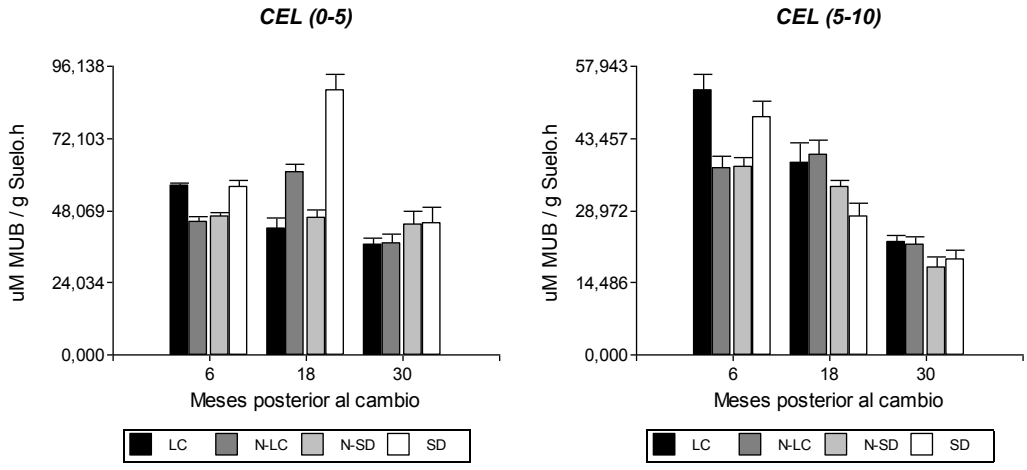

Figura 3.5: Gráficos de la actividad de la Celobiohidrolasa para la profundidad a) 0-5 cm y b) 5-10. n=5. (uM MUB / g Suelo.h)

Cuando analizamos lo que sucede con la CEL para la profundidad de 5-10 cm, se vio que la LC presentó mayores valores que la SD (Figura 3.5). Cuando analizamos las proporciones de cambio en la profundidad de 5-10 cm, se observa que ambas relaciones se comportan de manera similar y no se presentan diferencias significativas entre las proporciones (Figura 3.3D).

La CEL es una enzima que hidroliza los dímeros de celobiosa desde terminales no reducidos de moléculas de celulosa (Sinsabugh et al., 2008). Tanto la BG como la CEL actúan como fuerte reflector de la mineralización del carbono (Kong et al., 2005). Y como estas enzimas participan en la degradación de la celulosa, es probable que la biomasa microbiana produzca la secreción de ambas enzimas en conjunto (Pandey et al., 2014).

N-acetil-glucosaminidasa.

Cuando analizamos la N-acetil-glucosaminidasa (NAG) observamos que para la profundidad de 0-5 cm, la SD presentó los mayores valores para los tres muestreos sin que se presentaran diferencias significativas entre los tratamientos. En 5-10 cm de profundidad, el tratamiento que presento la mayor actividad no fue siempre el mismo, sin que hayan presentado diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 3.6). Cuando analizamos las proporciones de cambio vimos que para la profundidad 0-5 cm ambas relaciones se comportaron de manera similar, en cambio para 5-10 cm, solo fueron similares en los primeros dos muestreos y a los 30 meses se diferenciaron, aumentando la N-LC/SD y manteniéndose constante la N-SD/LC (Figura 3.3D).

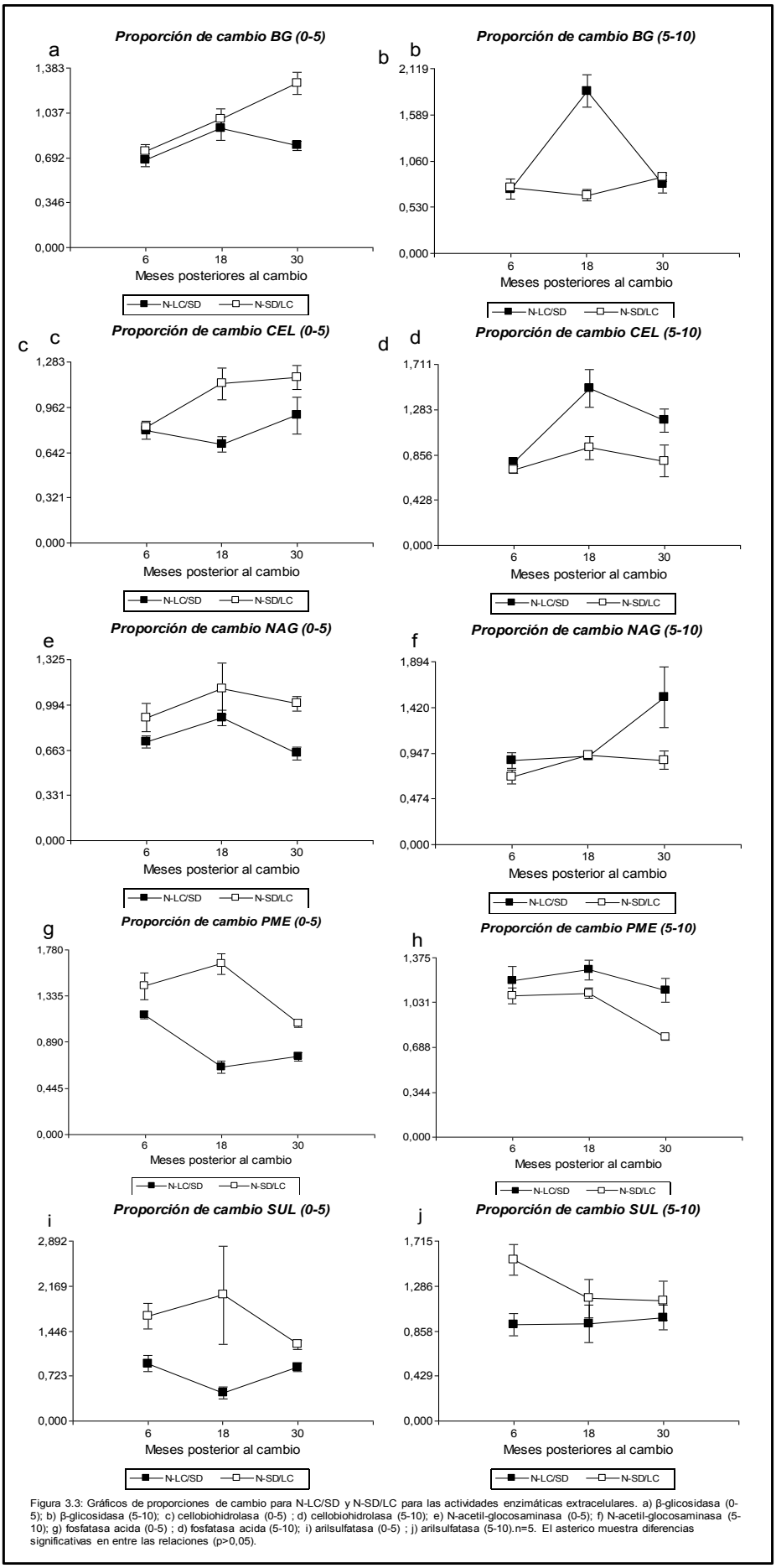

Figura 3.3: Gráficos de proporciones de cambio para N-LC/SD y N-SD/LC para las actividades enzimáticas extracelulares. a) β-glicosidasa (0-5); b) β-glicosidasa (5-10); c) cellobiohidrolasa (0-5) ; d) cellobiohidrolasa (5-10); e) N-acetil-glocosaminasa (0-5); f) N-acetil-glocosaminasa (5-10); g) fosfatasa acida (0-5) ; d) fosfatasa acida (5-10); i) arilsulfatasa (0-5) ; j) arilsulfatasa (5-10).n=5. El asterico muestra diferencias significativas en entre las relaciones (p>0,05).

La NAG juega un rol fundamental en la degradación de la quitina, un compuesto abundante en N en todos los suelos, y otros enlaces β-1,4-unidos a polímeros de glucosamina (Sinsabugh et al., 2008). La presencia de quitina se origina por la presencia de hongos y de insectos en el suelo, ya que la quitina es el componente principal de la pared celular de hongos y del citoesqueleto de insectos. Tanto los hongos como los insectos aumentan en los suelos agrícolas manejados en SD en comparación con la LC (Domínguez & Bedano, 2016; Frey et al., 2006). Teniendo estos conceptos como hipótesis de trabajo es posible pensar que en la N-SD los valores de la NAG tiendan a aumentar con el tiempo mientras que bajen a niveles mínimos en la N-LC. La actividad de la NAG es importante porque participa en el proceso donde la quitina es convertido en amino azucares, lo cuales son uno de las principales fuentes de N mineralizables en los suelos (Ekenler & Tabatabai, 2002). Altas concentraciones de N total en la superficies de los suelos con SD en comparación con dos tipos de labranza del suelo ha sido asociado con mayores actividades de NAG (Ekenler & Tabatabai, 2002; Muruganandam et al., 2009) y ha sido correlacionado de manera positiva con biomarcadores fúngico (PLFA). Pudimos ver que la actividad de la NAG cae de manera abrupta en la N-LC, lo que podría estar relacionado con una caída en la biomasa fúngica. En nuestro ensayos carecemos de datos de N, pero podríamos incidir que se presentan mayores valores en la SD que en la LC, lo cual ha sido corroborado por dato previos (Galantini et al., 2006; Galantini et al., 2013).

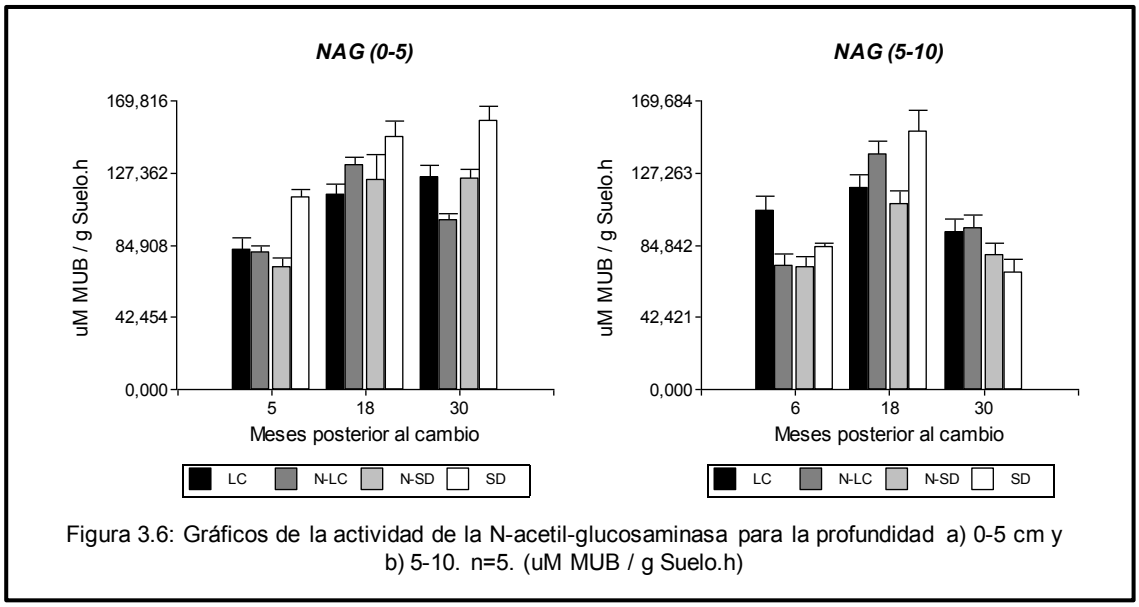

Figura 3.6: Gráficos de la actividad de la N-acetil-glucosaminasa para la profundidad a) 0-5 cm y b) 5-10. n=5. (uM MUB / g Suelo.h)

Fosfatasa.

Cuando analizamos la fosfatasa (PME; Figura 3.7A) observamos que en la profundidad de 0-5 cm, a los 6 meses posteriores al cambio se observa que los nuevos tratamientos presentan mayores valores que los tratamientos que no sufrieron cambios. A los 18 meses, se observó que la SD y la N-SD mostraron mayores valores en comparaciones con la LC y la N-LC, siendo valores significativamente diferentes. A los 30 meses, la SD presenta valores por encima de los otros tres tratamientos. Cuando observamos las proporciones de cambio vemos que la relación N-SD/LC aumenta a los 18 meses y cae a los 30 meses posteriores al cambio. En cambio la N-LC/SD tuvo una tendencia opuesta (Figura 3.3G).

En la profundidad 5-10 cm (Figura 3.7B), la PME mostró valores similares para ambos cambio de tratamientos, con excepción de N-LC a los 18 meses posteriores al cambio donde aumentó en comparación con el resto de los tratamientos. Cuando vemos las proporciones de cambio se observa que ambas relaciones se comportaron de manera similar (Figura 3.3H).

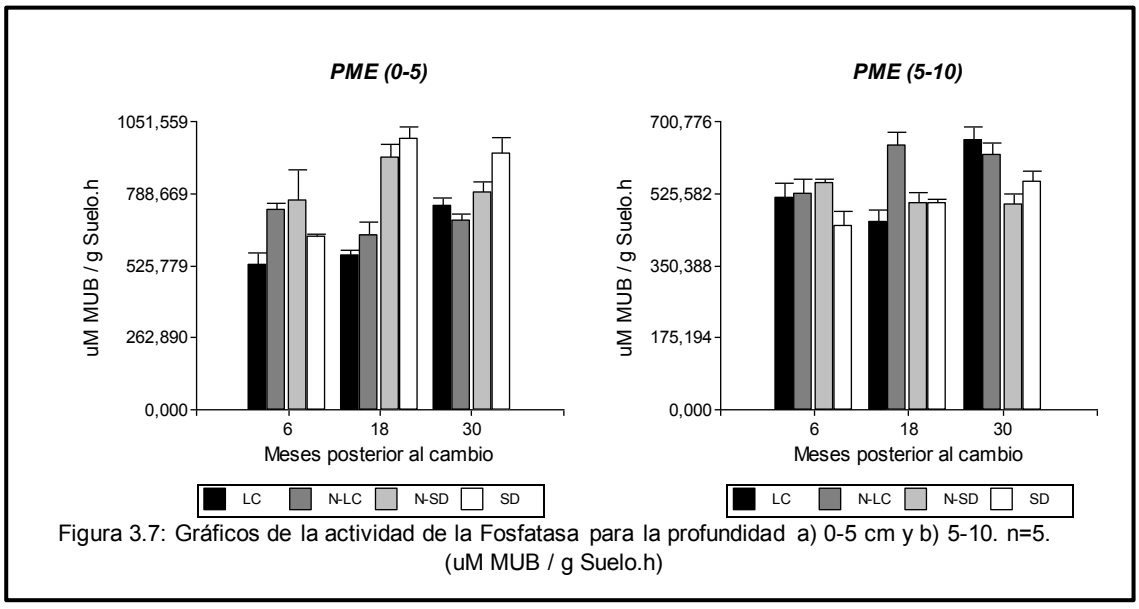

Figura 3.7: Gráficos de la actividad de la Fosfatasa para la profundidad a) 0-5 cm y b) 5-10. n=5. (uM MUB / g Suelo.h)

La PME hidroliza fosfomonoesteres, y en algunos casos fosfodiesteres, liberando fosfato (Sinsabugh et al., 2008). Los suelos con cobertura natural muestran mayores valores de actividad fosfatasa, por lo cual se esperaría que haya mayores valores en SD que en LC. Es posible que esto ocurra debido a que ésta enzima es mayormente secretada por las raíces de las plantas, y hongos y micorrizas asociadas (Joner et al., 2000). Por otro lado, se observa una mayor actividad en los nuevos tratamientos, que podría estar relacionado con la caída de la concentración fosforo producida en los

nuevos tratamientos posterior al cambio de manejo (ver valores de Pext en Tabla 3.1). Algunos autores mostraron una relación inversa entre la actividad fosfatasa y disponibilidad de P en el ambiente (Sinsabaugh & Shah, 2012). Sin embargo, no hay una correlación significativa entre ambos parámetros en nuestro estudio (P > 0,05; Tabla 3.3).

Arilsulfatasa

Cuando analizamos la arilsulfatasa (SUL; Figura 3.8) observamos que los valores más altos se presentaron en la N-SD, con excepción a los 18 meses posteriores al cambio para la profundidad de 0-5 cm donde la mayor actividad perteneció a la SD. La SD presento mayores valores que la LC para ambos muestreos, lo que está en concordancia con lo publicado por otros autores (Deng & Tabatai, 1997). Cuando analizamos la proporción de cambio vemos que en la profundidad de 0-5 cm no presentan una tendencia definida ni grandes cambios para ninguna de las dos relaciones (figura 3.3I). En cambio en la profundidad de 5-10 cm, se observó que la relación N-LC/SD tiende a subir y la relación N-SD/LC a bajar hacia el muestreo de los 18 meses y lo hace de manera más lenta para el muestreo a los 30 meses posteriores al cambio (figura 3.3J).

La SUL es una enzima que cataliza la hidrolisis del arilsulfato por ruptura del enlace O-S, y se cree que en el suelo se encuentra involucrada en la mineralización de los esteres sulfatos (Deng & Tabatai, 1997) y que además la correlacionan de manera positiva con el COT.

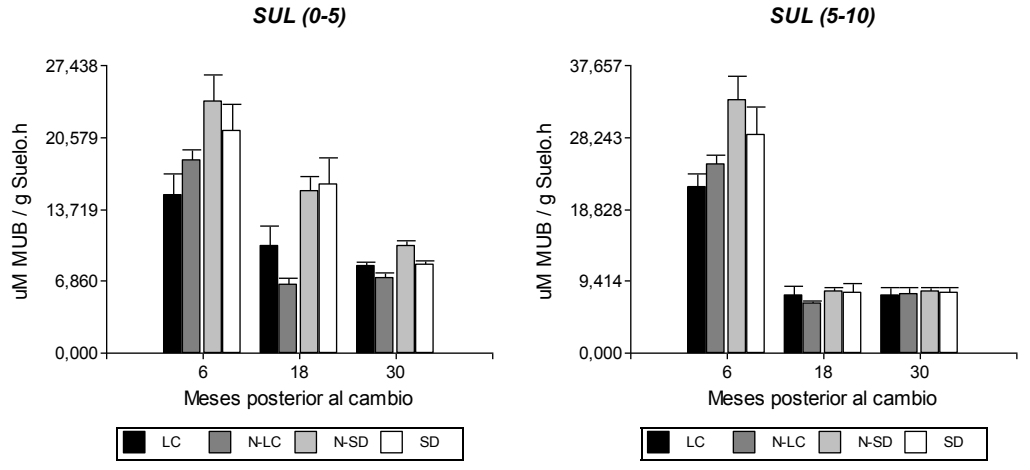

Figura 3.8: Gráficos de la actividad de la Arilsulfatasa para la profundidad a) 0-5 cm y b) 5-10. n=5. (uM MUB / g Suelo.h)

Gráficos radiales de las actividades enzimáticas

Cuando se analiza el conjunto de las actividades enzimáticas como un perfil fisiológico se observan comportamientos integrales de los suelos analizados permiten ver como los cambios de manejo en el tiempo se van asemejando fisiológicamente al nuevo manejo alejándose del perfil del manejo histórico del suelo previo al cambio.

En primer lugar cuando observamos los gráficos radiales (Figura 3.9) tomando el área del polígono generado por los valores relativos de las diferentes actividades enzimáticas en el perfil 0-5 cm al comparar entre SD y LC observamos que para la profundidad de 0-5 cm (3.9 A, B y C), la SD presenta una mayor superficie de los pentágonos que la LC para los tres muestreos. En cambio para la profundidad de 5-10 cm (3.9 D, E y F) sucede exactamente el efecto opuesto.

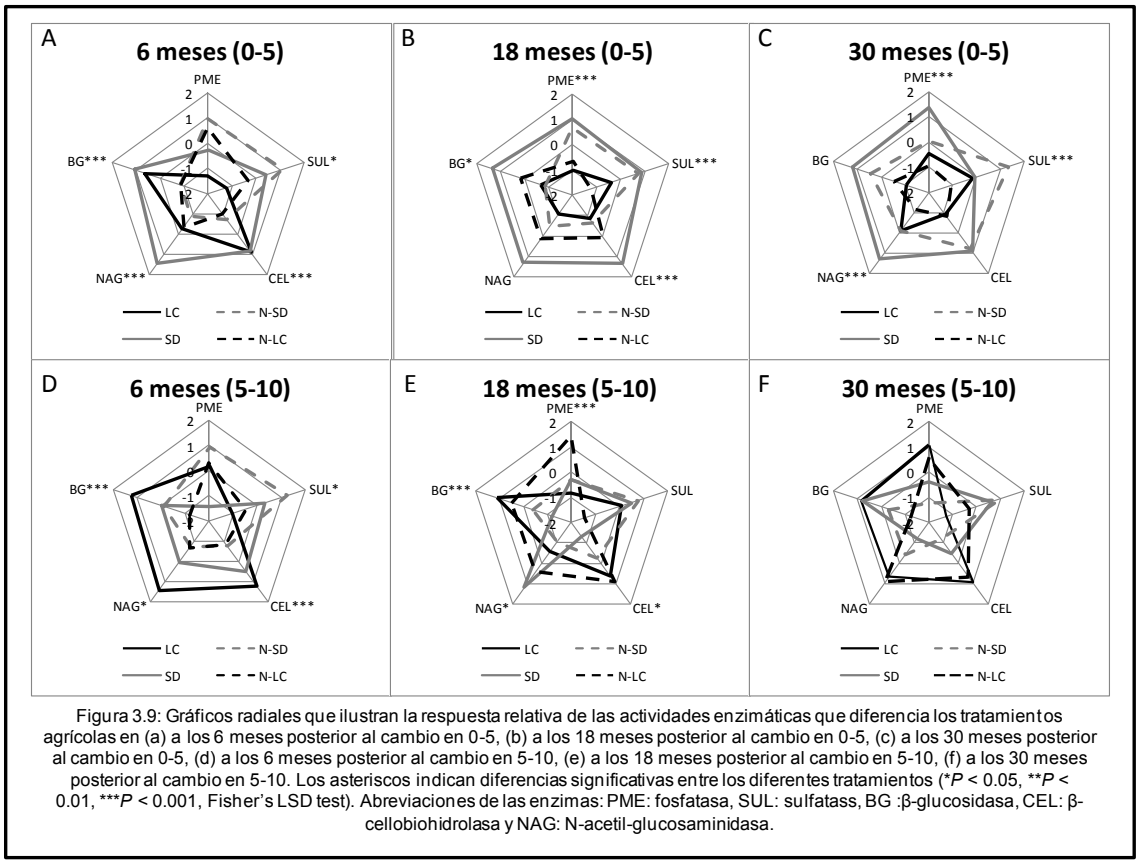

Figura 3.9: Gráficos radiales que ilustran la respuesta relativa de las actividades enzimáticas que diferencia los tratamientos agrícolas en (a) a los 6 meses posterior al cambio en 0-5, (b) a los 18 meses posterior al cambio en 0-5, (c) a los 30 meses posterior al cambio en 0-5, (d) a los 6 meses posterior al cambio en 5-10, (e) a los 18 meses posterior al cambio en 5-10, (f) a los 30 meses posterior al cambio en 5-10. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, Fisher's LSD test). Abreviaciones de las enzimas: PME: fosfatasa, SUL: sulfatass, BG :β-glucosidasa, CEL: β-cellobiohidrolasa y NAG: N-acetil-glucosaminidasa.

Por otro lado, los gráficos radiales ilustran la respuesta relativa de las actividades enzimáticas a medida que pasa el tiempo desde el momento del cambio de manejo, tanto para los perfiles enzimáticos del suelo en 0-5 cm (3.4 A, B y C), como en el perfil 5-10 (3.9 D, E y F). Se observa como en los suelos con cambio de manejo las áreas aumentan en el tiempo en los casos de N-SD y disminuyen en los casos de N-LC. En

cambio, para la profundidad 5-10 cm se observa el efecto opuesto, la N-LC tiende a aumentar y la N-SD a disminuir.

Análisis multivariados de las EEA.

Otra forma de analizar los perfiles enzimáticos de las muestras es a través de los análisis multivariales, viendo como se distribuyen las muestras. El análisis de Coordenadas Principales de los perfiles enzimáticos a lo largo del tiempo (Figura 3.10) mostró como las muestras de suelo se separan de acuerdo a la labranza histórica al principio mientras que las muestras correspondientes a los cambios de manejo se diferencian de ambos manejos históricos previos al cambio (Figura 3.10 A y 3.10 D)

Con el paso del tiempo, las muestras correspondientes a los suelos con cambio de manejo expresan perfiles enzimáticos que en el análisis multivarial se van pareciendo cada vez más al nuevo tratamiento y no al histórico previo al cambio de manejo (figuras 3.5 B, C, E y F). Analizando con un poco más de detalle, en el perfil enzimático, en 0-5 cm, a 6 los meses posteriores al cambio se observa el estado de transición que se encuentran las muestras N-LC y N-SD, y como para los 18 y 30 meses se van asemejando más con los tratamientos actuales. Un patrón exactamente similar se observa para la profundidad 5-10 cm. Todos estos cambios ocurren principalmente a lo largo del eje del CP1 para el nivel de 0-5 cm y del eje del CP2 para el nivel de 5-10 cm, con mayor eficacia en el muestreo a los 30 meses post cambio de manejo. Cuando analizamos los parámetros de las EEA vimos que en general para la profundidad 0-5 cm se asociaron con la SD principalmente. En cambio, en la profundidad de 5-10 cm, vimos que para el muestreo a los 6 meses posteriores al cambio la BG, NAG y CEL se asociaron con la LC y al contrario la SUL y la PME parecería que se orientan hacia los cambios de manejo. A los 18 meses posteriores al cambio la SUL se orienta hacia la SD, y la BG y CEL lo hacía el lado de la LC y la N-LC. Finalmente a los 30 meses posteriores al cambio vemos que las actividades de las CEL, NAG y PME, y en menor medida la BG y la SUL se asociaron con la LC y la N-LC.

El tiempo de respuesta de las enzimas ha sido estimado en el orden de horas a días (Allison et al., 2013) con lo cual parecería lógica la respuesta encontrada en los ACoP referidos. Sumado que a la estabilidad de las enzimas inmovilizadas en la fase mineral puede llegar a persistir de meses a años (Tabatabai & Dick, 2002). Por otro lado, el tipo manejo agrícola influencia la biomasa y la actividad microbiana, y la actividad

enzimática a través de los cambios en la cantidad y calidad del aporte de los residuos vegetales (Ekenler & Tabatai, 2002), y modifica la estructura física, principalmente en la estabilización de los macro y microagregados (Six et al., 2000). La disminución de algunos parámetros en los nuevos tratamientos, que se produce principalmente a los 6 meses posteriores al cambio, o incluso a los 18 y 30 meses para algunos parámetros podría estar relacionada con el stress fisiológico producido por el cambio de tratamiento. Este efecto que ha sido descripto parapara la actividad enzimática (Pandey et al., 2014; Simmons & Coleman, 2008) o en la acumulación de la materia orgánica (West & Post, 2002). Kandeler et al., (1999c) al investigar la influencia de las prácticas agrícolas durante 10 años, presentó que los cambios en la actividad enzimática de la Xilanasa y PME son muy tempranos en comparación con otras mediciones físicas o químicas.

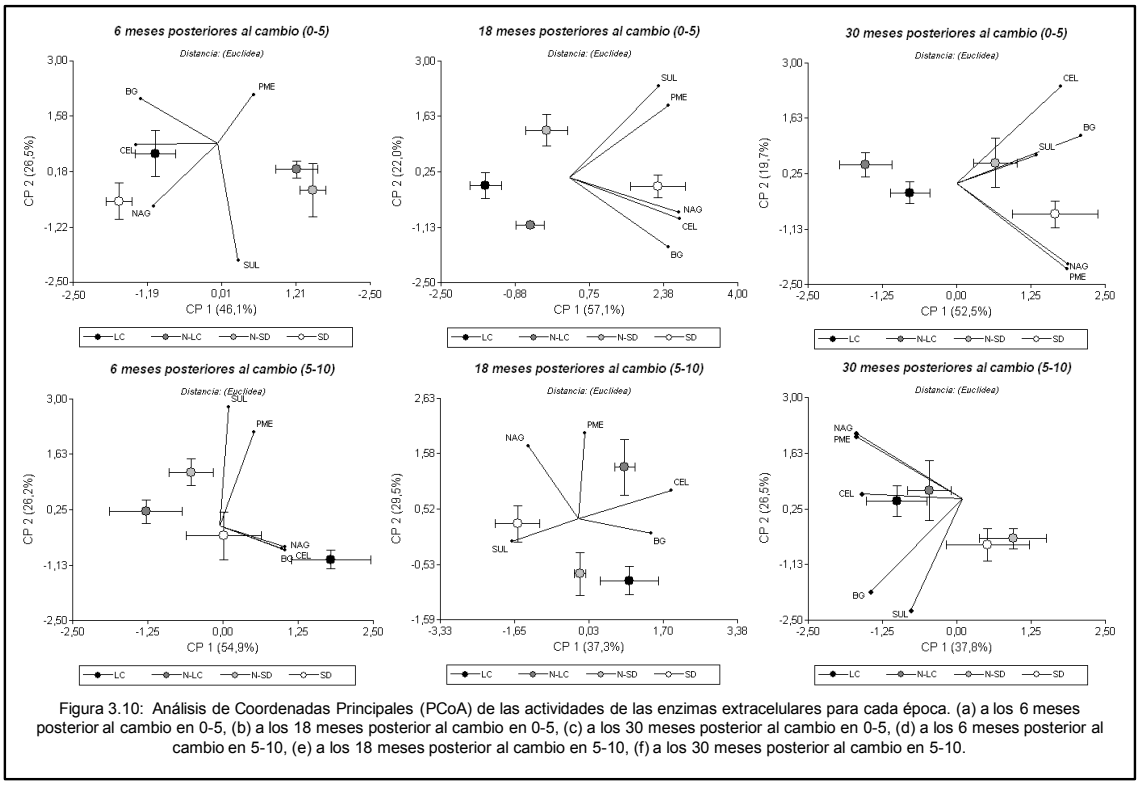

Figura 3.10: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de las actividades de las enzimas extracelulares para cada época. (a) a los 6 meses posterior al cambio en 0-5, (b) a los 18 meses posterior al cambio en 0-5, (c) a los 30 meses posterior al cambio en 0-5, (d) a los 6 meses posterior al cambio en 5-10, (e) a los 18 meses posterior al cambio en 5-10, (f) a los 30 meses posterior al cambio en 5-10.

3.3.4) Análisis de los Perfiles Fisiológicos a Nivel de Comunidades (CLPP).

Con el objetivo de ver si los CLPP son capaces de discriminar entre los suelos con diferentes manejos, y también entre aquellos que han sufrido los cambios de manejos, se realizó un análisis mutivariados del tipo ANOVAM para cada fuente de C (Tabla 3.2). En estos análisis se pudo corroborar que, en la profundidad 0-5 cm, a los 6 meses posteriores al cambio el agregado de los ácidos propiónico y vaníllico

presentaron diferencias entre la LC y los tratamientos que sufrieron cambios (P < 0,05), a los 18 meses posteriores al cambio la respiración basal y el ácido propiónico diferenció a la LC del resto de los tratamientos (P < 0,01) y a los 30 meses en la respiración basal la LC y la N-LC se diferenciaron de ambos tratamientos en SD para la respiración basal (P = 0,001), el ácido cumárico presento diferencias entre la LC y los nuevos tratamientos (P = 0,001); el ácido propiónico diferencio a la LC de la SD y a la N-LC de la N-SD (P = 0,002); el ácido vaníllico presentó diferencias entre la N-LC del resto de los tratamientos y la LC de la N-SD (P = 0,001).

Fuentes de Carbono	0-5 cm			5-10 cm		
	6	18	30	6	18	30
Respiración Basal	n.s.	LC≠SD/N-LC/N-SD	LC/N-LC≠SD/N-SD	n.s.	N-SD≠SD/LC	n.s.
Acido Cumárico	n.s.	n.s.	LC≠N-LC/N-SD	n.s.	LC≠SD	n.s.
Acido propionico	LC≠N-LC/N-SD	LC≠SD/N-LC/N-SD	N-LC≠N-SD//LC≠SD	N-SD≠SD/LC	n.s.	n.s
Acido vaníllico	LC≠N-LC/N-SD	n.s.	N-LC≠(SD=(LC≠N-SD)	LC≠SD/N-LC/N-SD	LC≠SD≠(N-LC/N-SD)	n.s

Tabla 3.2: Diferencias significativas entre los tratamientos. **≠**: se diferencian de manera significativa entre los tratamientos; **=**: no se diferencian de manera significativa; **n.s.**: no presentan diferencias significativas para ningún tratamiento. n=5

El CLPP para la profundidad de 5-10 cm, se observo que a los 6 meses posteriores al cambio de manejo vimos que la N-SD se diferenció de la SD y LC (P = 0,006), cuando agregamos el ácido propiónico y con el ácido vanillico la LC se diferenció del resto de los tratamientos (P = 0,013). A los 18 meses vimos que para la respiración basal la N-SD se diferencio de la LC y SD (P = 0,045); por otro lado, la LC se diferenció de la SD y también del resto de los tratamientos cuando agregamos de los ácidos cumárico y vanillico, respectivamente (P < 0,05). Finamente a los 30 meses no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos.

El análisis de los CLPP a través de otro análisis multivarial como es el Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) mostró una dinámica de cambio que no llega a que los nuevos tratamientos se agrupen con tratamientos controles, diferencias de agrupamiento menos claras que las que observamos en los perfiles enzimáticos (Figura 3.11).

Cuando analizamos las diferencias entre las muestras de SD y LC, vimos que presentaron las mayores distancias, con la excepción del muestreo realizados a los 6 meses posteriores al cambio. Donde los nuevos tratamientos presentan un estado similar entre si y se diferencian de la LC y la SD. Por otro lado cambios de tratamientos mostraron que paso el tiempo posterior al cambio se presentaron muy

cercanos y a medida que transcurrió el tiempo se fueron distanciando. Sin embargo, en el tiempo analizado no se alcanza a ver que las muestras de los suelos con cambio generen CLPP que se parezcan cada vez más a los correspondientes a su nuevo manejo.

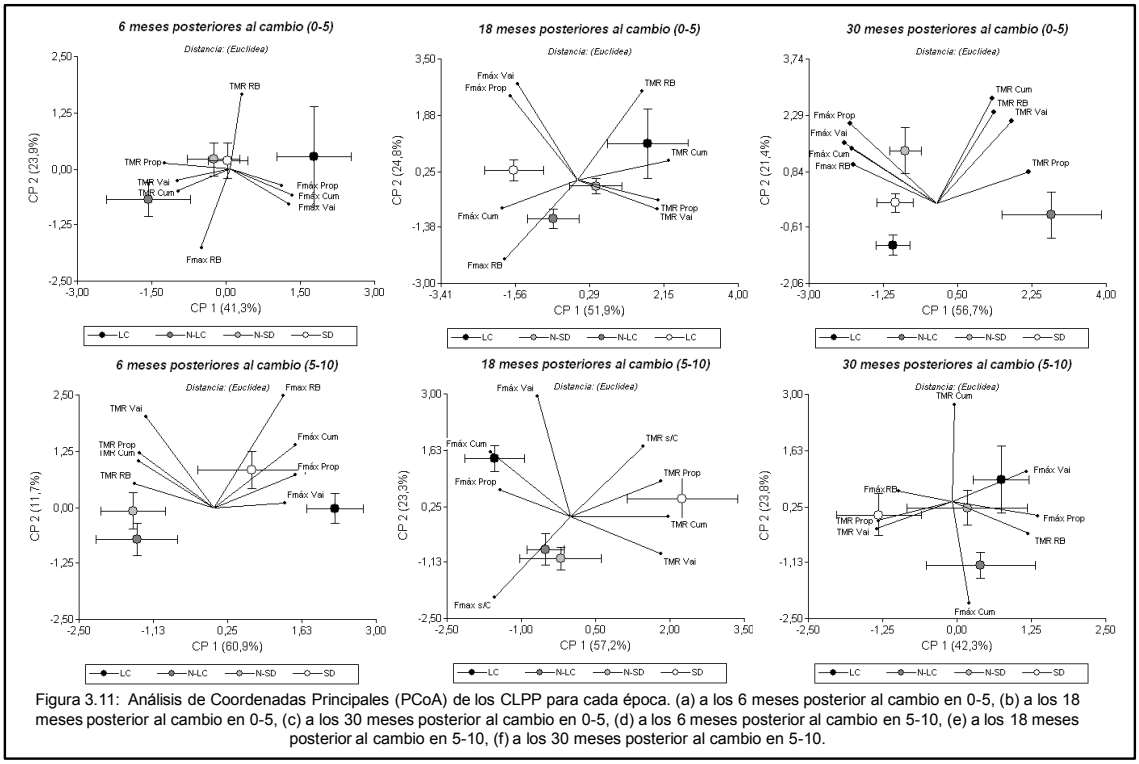

Figura 3.11: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de los CLPP para cada época. (a) a los 6 meses posterior al cambio en 0-5, (b) a los 18 meses posterior al cambio en 0-5, (c) a los 30 meses posterior al cambio en 0-5, (d) a los 6 meses posterior al cambio en 5-10, (e) a los 18 meses posterior al cambio en 5-10, (f) a los 30 meses posterior al cambio en 5-10.

Podemos ver que para la profundidad de 0-5 cm, a los 6 meses posteriores al cambio los parámetros de Fmax con las fuentes de C agregadas se orientaron hacia el lado de la LC, en cambio los TMR se orientan hacia el lado de la N-LC. A los 18 meses posteriores al cambio vemos que los Fmax se orientan hacia el lado de los Fmax y en cambio los TMR hacia el lado de la LC. Finalmente, vimos que los Fmax se orientan hacia la N-SD y en cambio los TMR hacia la N-LC. Para la profundidad de 5-10 cm, vimos que a los 6 meses posteriores al cambio los Fmax se asocian con principalmente con la LC y en menor medida con la SD, por otro lado, los TMR se asociarían con los nuevos tratamientos. A los 18 meses con las fuentes de C agregadas se orientaron hacia el lado de la LC, en cambio los TMR se orientan hacia el lado de la SD. Finalmente a los 30 meses la LC se asocia con los Fmax con el agregado de los ácidos vanillico y propiónico y el TMR de la RB. Por otro lado, la SD se orientó hacia el lado de los TMR con el agregado de los ácidos vanillico y propiónico y el Fmax de la RB. Podemos observa en ambos análisis mutivariados, que la LC presentó las mayores diferencias con el resto de los tratamientos tanto para 0-5 cm de profundidad como en 5-10 cm.

La labranza rompe e incorpora los residuos de los cultivos en las capas superficiales de suelo. Se cree que los CLPP están marcados principalmente por microorganismos copiotróficos, ya que consumen rápidamente los sustratos agregados en este tipo de ensayos (Lladó and Baldrian, 2017). Estudios metagenómicos comparando SD y la LC muestran que las bacterias copiotróficas como los Firmicutes y las Betaproteobacterias se encuentran en mayor abundancia en la LC en comparación con la SD (Dai et al., 2017; Silva et al., 2013). Lo que conlleva a que la descomposición y mineralización estén aceleradas, resultando en un incremento en la actividad microbiana. Seguido por una disminución del carbono microbiano y el contenido de N (Souza et al., 2013). Por lo cual, la LC aumenta el consumo de oxigeno de las comunidades microbianas, principalmente cuando se agrega fuentes de C y estos es consistentes con estudios previos que muestran una promoción general de la mineralización de la materia orgánica (Al-Kaisi, 2001; Gomez and Garland, 2012; Pikul et al., 2001), posiblemente por el aumento de la aireación del suelo y la disminución de los macroagregados que protegen la materia orgánica. Además se encuentra en sintonía con la relación Cmic/COT, que presenta mayores valores en la LC (Tabla 3.3).

3.3.5) Análisis de correlaciones

A continuación intentamos poder correlacionar todas la mediciones realizadas en este capítulo, tanto químicas, físicas y bioquímicas, con el fin de poder comprender un poco mejor el sistema del suelo como un todo. Para poder observar de manera más claras las relaciones se puede observar la figura 3.12 y la tabla 3.3.

Cuando analizamos las correlaciones en 0-5 cm de profundidad (Figura 3.12A), el COT presentó una correlación positiva con la fracción de agregados de mayor tamaño (> 105 µm, $P = 0,0001$), y una correlación negativa con las fracciones restantes (105-63 y < 63 µm, $P < 0,05$ para ambos casos). Lo cual nos sugeriría que el COT se encontraría presente en mayores cantidades en las fracción > 105 µm, lo cual se encuentra en sintonía con trabajos previos (Six et al., 2000) donde se hipotétiza que el COT se estabiliza en los macroagregados mayormente. Por otro lado, vimos que la actividad de las enzimas BG, NAG y PME se correlacionó de manera positiva con la fracción > 105 µm ($P < 0,05$). A su vez, la BG ($P < 0,05$) y la NAG ($P < 0,05$) correlacionan con el COT de manera positiva. Marx et al., (2005) estudiaron la actividad enzimática y su distribución en las diferentes fracciones del suelo y encontró que la actividad de las carbohidrolasas disminuye desde la fracción 2000-200 µm hasta la fracción de 2-0,1 µm siguiendo la distribución del C orgánico así como

también el incremento de la bioestabilidad de la materia orgánica. Por otro lado, los Fmax (Cum, Prop y Vai) se correlacionaron de manera negativa con la fracción > 105 µm ($P < 0,05$ para todos los casos) y de manera positiva con la fracción < 63 µm ($P < 0,01$), pero no se correlacionaron con el COT ($P > 0,05$). Lo cual nos sugeriría que la mayor cantidad de la biomasa microbiana que respira o biomasa activa, se encuentra en la fracción de menor tamaño al igual que en los primeros 5 cm de suelo (Sessitsch et al., 2001). Finalmente cuando correlacionamos las actividades enzimáticas de BG, NAG y PME con los Fmax (RB, Cum y Prop), vemos que correlacionan de manera negativa. Los cual nos podría sugerir que la actividad enzimática es independiente de la biomasa microbiana activa, es decir, serían enzimas extracelulares estabilizadas en las fracciones de mayor tamaño donde ocurre la transformación de las materia orgánica, pues la actividad enzimática se alojaría en las fracciones de mayor tamaño, donde habría mayores cantidades de COT y la biomasa microbiana estaría en la fracción más pequeña.

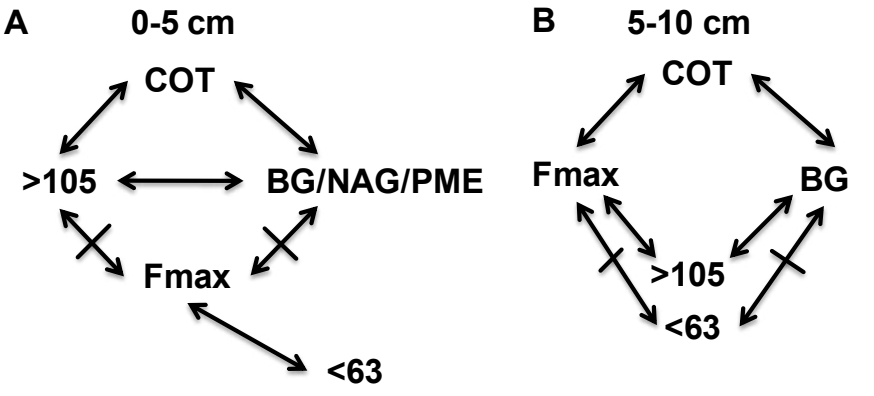

Figura 3.12: Grafico de correlaciones para las profundidades a) 0-5 cm y b) 5-10 cm. ⟷ : correlación positiva, ⟷ : correlaciones negativas. Correlación de Pearsons.

El pH correlaciona de manera negativa con el parámetro Fmax de la RB ($P = 0,0031$). Lo cual podría estar indicando que la relación hongos/bacteria influenciaría la respiración basal en los CLPP para la profundidad de 0-5 cm.

Por otro lado, en 5-10 cm de profundidad, las correlaciones entre Fmax y la BG no variaron respecto a la profundidad 0-5 cm, se continuaron correlacionando de manera negativa ($P < 0,001$). Pero NAG y PME no se correlacionan de manera significativa con el Fmax pero si muestran una tendencia similar a BG. El COT correlacionó de manera negativa con los Fmax (RB, Cum, Prop; $P < 0,01$) y de manera positiva con la BG ($P < 0,0001$). Sin embargo, vemos que el COT no se correlacionó con las

fracciones de mayor o menor tamaño de agregados, lo cual podría estar mostrando una distribución diferente a la observada en 0-5 cm. Por otro lado, las correlaciones de BG y los Fmax se correlacionaron de manera positiva con la fracción > 105 µm y de manera negativa con la fracción < 63 µm, presentando tendencias opuestas a las vistas en 0-5 cm en el caso del Fmax. Esta diferencia entre 0-5 y 5-10 cm de profundidad podría estar evidenciando el aporte significativo de los rastrojos a la actividad microbiana y enzimática en los primeros 5 cm de suelo y otros mecanismos imperantes sobre el COT en los siguientes 5 cm de profundidad. Hasta el momento por lo que nosotros sabemos sean realizados muy pocos estudios donde se intenta entender el funcionamiento del suelo para dos profundidades diferentes.

Correlación de Pearson

0-5

	Cmic	COT	Pext	pH	>105	105-63	<63	BG	CEL	NAG	PME	SUL	Fmax RB	Fmáx Cum	Fmáx Prop	Fmáx Vai
Cmic	1															
COT	0,12	1														
Pext	-0,003	0,32*	1													
pH	-0,005	0,43	-0,06	1												
>105	0,15	**0,56*** **	0,21	0,27	1											
105-63	-0,11	**-0,29***	**-0,59*** **	-0,55	0,05	1										
<63	-0,07	**-0,34***	0,13	-0,01	**-0,84*** **	**-0,49*** **	1									
BG	**0,27***	**0,26***	0,12	-0,05	**0,31***	-0,11	-0,22	1								
CEL	0,11	0,02	**0,35***	-0,45	-0,07	**-0,3***	0,3*	**0,29***	1							
NAG	0,14	**0,35***	0,23	0,34	**0,3***	**-0,35***	-0,11	**0,72*** **	**0,31***	1						
PME	0,01	0,19	0,0043	-0,16	**0,32***	0,0048	-0,29*	**0,4** **	0,23	**0,4** **	1					
SUL	**-0,39***	-0,11	0,22	-0,42	-0,11	-0,02	0,14	**-0,52*** **	0,22	**-0,27***	-0,02	1				
Fmax RB	-0,22	-0,19	0,18	**-0,77** **	-0,19	0,04	0,2	**-0,4** **	**0,29***	**-0,27***	-0,02	0,44***	1			
Fmáx Cum	-0,17	-0,12	0,18	-0,43	**-0,41** **	-0,12	0,41***	**-0,53*** **	0,24	**-0,41*** **	**-0,29***	0,45***	0,53***	1		
Fmáx Prop	-0,09	-0,07	**0,45*** **	-0,37	**-0,38** **	**-0,28***	0,48***	**-0,39** **	**0,32***	**-0,28***	-0,26	0,45***	0,51***	0,81***	1	
Fmáx Vai	-0,11	0,09	**0,43*** **	0,04	**-0,32***	**-0,33***	0,44***	-0,25	**0,4** **	-0,12	-0,26	0,43***	0,44***	0,67***	0,86***	1

5-10

	Cmic	COT	Pext	pH	>105	105-63	<63	BG	CEL	NAG	PME	SUL	Fmax RB	Fmáx Cum	Fmáx Prop	Fmáx Vai
Cmic	1															
COT	-0,2	1														
Pext	0,14	**0,52*** **	1													
pH	-0,55	-0,02	-0,21	1												
>105	-0,07	0,1	0,12	-0,001	1											
105-63	-0,09	**-0,42*** **	**-0,54*** **	0,1	**-0,41** **	1										
<63	0,2	0,06	0,25	-0,11	**-0,68*** **	-0,07	1									
BG	-0,03	**0,61*** **	0,21	-0,39	**-0,43*** **	0,03	**0,4** **	1								
CEL	0,24	**-0,33***	0,23	-0,57	**0,29***	-0,04	**-0,27***	**-0,42*** **	1							
NAG	**0,55*** **	-0,01	0,25	-0,36	0,11	**-0,32***	0,19	-0,01	0,2	1						
PME	-0,09	0,09	-0,0015	0,41	-0,24	0,12	0,11	**0,33***	-0,16	0,21						
SUL	**-0,34**	**-0,29***	-0,03	0,12	**0,36** **	0,07	**-0,51*** **	**-0,54*** **	**0,56*** **	**-0,33***	-0,14	1				
Fmax RB	-0,14	**-0,44*** **	-0,08	-0,2	0,25	0,24	**-0,45*** **	**-0,6*** **	**0,69*** **	-0,23	-0,25	**0,76*** **	1			
Fmáx Cum	-0,02	**-0,36***	0,07	-0,17	0,25	0,12	**-0,34***	**-0,54*** **	**0,73*** **	-0,12	**-0,38** **	**0,6*** **	**0,89*** **	1		
Fmáx Prop	-0,16	**-0,34***	0,02	-0,07	**0,31***	0,11	**-0,4** **	**-0,57*** **	**0,74*** **	-0,2	-0,26	**0,76*** **	**0,93*** **	**0,9*** **	1	
Fmáx Vai	-0,13	-0,22	**0,26***	-1E-04	0,14	-0,01	-0,23	**-0,44*** **	**0,68*** **	-0,12	-0,23	**0,65*** **	**0,79*** **	**0,81*** **	**0,85*** **	1

Tabla 3.3: Tabla de correlaciones de Pearson para las profundidades 0-5 y 5-10 cm. *: p<0,5; **: p<0.01; ***: p<0.001.

3.4) Conclusiones

En este capítulo realizamos el análisis de los datos desde dos puntos de vista, primero nos centramos en ver las diferencias entre la siembra directa y la labranza convencional. Podemos concluir que **la labranza convencional se diferencia de la siembra directa** para los suelos estudiados pertenecientes a la región del sudeste de la provincia de Buenos Aires. Posteriormente nos centramos en que sucede cuando se llevan a cabo cambios en los manejos agrícolas y se intercambian los manejos agrícolas, pasando de la LC a la SD y viceversa, pudiendo corroborar que **los nuevos tratamientos comienzan a parecerse a su nuevo sistema de manejo al cabo de tres años**. Los cambios de manejos agrícolas del suelo son una ocurrencia muy común en los establecimientos agrícolas de nuestro país y sus efectos desencadenan una serie de procesos químicos, físicos y biológicos. Hasta el momento pocos ensayos han sido llevados a cabo en los cuales se estudien ambas direcciones del cambio de manera simultánea. Los diferentes manejos agrícolas alteran significativamente las propiedades del suelo a nivel físico, químico y biológico.

Cuando comparamos la siembra directa con la labranza convencional vimos que a nivel químico **la SD presento mayores valores de COT, Pext y Cmic** (estos dos últimos solo para la profundidad 0-5 cm, los que nos estaría mostrando una distribución diferencial de acuerdo a la profundidad analizada), en cambio la LC presentó mayores valores del a relación Cmic/COT, posiblemente relacionado con una mayor mineralización en la labranza convencional. A nivel físico con la cuantificación de fracciones de agregados vimos que la SD presento mayores valores de la fracción más grande (> 105 μm) que la LC, en cambio con las otros dos tamaños de fracciones sucedió lo opuesto, la LC fue mayor a la SD. La actividad enzimática de los primeros cinco centímetros de los suelos en siembra directa es un 30% mayor que la misma capa de los suelos labrados, en cambio ocurre lo opuesto en las capas más profundas para varias actividades enzimáticas, lo cual está en sintonía con trabajos ya publicados (Bandick & Dick, 1999; Mangalassery et al., 2015). Cuando las diferencias entre la SD y la LC por medio del CLPP, vemos que ambos manejos agrícolas se diferencian para los muestreos a los 18 y 30 meses posteriores al cambio de manejo para la profundidad 0-5 cm y en los muestreos a los 6 y 18 meses en la profundidad 5-10 cm.

En cambio, cuando comparamos los cambios de tratamientos vimos que a nivel químico que los valores del COT y Pext para los tratamientos que sufrieron los cambios de tratamientos caen posteriores al cambio respecto a los controles y en los

tres años analizados no vemos que la N-SD recupere niveles similares a la SD. Por otro lado, las relaciones de cambio de estos dos parámetros y el Cmic/TOC muestran que la relación N-SD tiende a aumentar con respecto a la LC y en cambio la N-LC tiende a disminuir con respecto a la SD. A nivel físico vimos que para la fracción > 105 µm a los 6 meses posteriores al cambio para la profundidad 0-5 cm, y entre los 6 y 18 meses para la profundidad de 5-10 cm ya presentaban valores similares a sus nuevos controles. En la fracción 105-63 µm vimos que los nuevos tratamientos presentaron los mayores valores, lo cual la podría estar situando a esta fracción como fracción buffer. En la fracción < 63 µm que la relación N-SD tiende a disminuir con respecto a la LC y, en cambio, la N-LC tiende a aumentar con respecto a la SD.

Por medio de las EEA fue posible ver la evolución de los cambios de tratamientos agrícolas, tanto desde la LC hacia la SD como de la SD a la LC, de manera muy clara. Por medio de los CLPP no fue posible ver que los suelos que sufrieron el cambio de manejo se asemejen a sus nuevos controles, debido a que los cambios se probablemente se produzcan en un plazo de tiempo mayor a los 3 años, que fue el plazo que nosotros estudiamos.

Por lo tanto, creemos que las EEA son más propicias para analizar y monitorear los procesos llevados a cabo por los cambios de manejos en el suelo. Consecuentemente, estudios más en profundidad de los mecanismos de estabilización de los suelos agrícolas son necesarios para dilucidar los procesos y el rol de las enzimas extracelulares en el suelo y de las comunidades microbianas analizadas por medio de los CLPP.

Capítulo 4

Estudios bioquímicos del suelo a nivel de fracciones de agregados

4.1) Introducción.

A pesar de los recientes estudios que han permitido incrementar el conocimiento acerca de como los manejos agrícolas influencian las comunidades microbianas del suelo a gran escala, poco se sabe de lo que sucede con las comunidades microbianas y sus distribución estructural y funcional a una escala menor, a una escala de los más apropiada para los microorganismos (Ettema & Wardle, 2002). Los microambientes del suelo presentan un nicho único para las distintas comunidades microbianas (Kong et al., 2011). Los cambios en los manejos agrícolas alteran las propiedades estructurales del suelo y con ello modifican los microambientes, incluyendo la distribución de las fracciones de agregados del suelo y la de los sustratos disponibles (Six et al., 1999; Tiemann et al., 2015).

Las fracciones de agregados del suelo de diferentes tamaños constituyen los bloques constitutivos de un sistema altamente heterogéneo de micro y macroagregados presentes en el suelo intacto (Hemkemeyer et al., 2015). Las fracciones de agregados difieren en la composición mineralógica y a su vez en la composición y densidad de la materia orgánica (Christensen, 2001b), por esto contribuyen a que se generen diferentes microambientes selectivos para los microorganismos del suelo. Sin embargo, el conocimiento de las comunidades microbianas y su actividad dentro de las diferentes fracciones de agregados no está dilucidado totalmente hasta el momento. Comprender la distribución de los microorganismos del suelo y la actividad enzimática en las fracciones de agregados permitiría determinar mejor cómo los sistemas de labranza pueden influenciar el suelo a esta escala. Este conocimiento podría ser utilizados para saber que manejos agrícolas incrementan el secuestro de carbono y nitrógeno en el suelo y a su vez, incrementar la productividad del suelo a largo plazo (Kandeler et al., 1999c; Salinas-Garcia et al., 1997). Además, esta nueva información a nivel de las fracciones de agregados nos permitiría ir comprendiendo mejor el impacto de las actividades antropogénicas en el suelo, tanto en su funcionamiento como en su estructura (Gupta & Germida, 2015).

En este capítulo se analizó el impacto de los manejos agrícolas, la SD y la LC, sobre las fracciones de agregados del suelo en las muestras pertenecientes al establecimiento agrícola Hogar Funke. Posteriormente estos resultados fueron contrastados con las muestras de otro establecimiento, como lo es Las Matreras. Y además, se buscó caracterizar como las fracciones de agregados estarían afectando las abundancias microbianas y sus funciones. Para ello se tamizo en húmedo las muestras de suelo correspondiente a los dos manejos agrícolas en comparación y

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

posteriormente se cuantifico la población de los dos grupos microbianos principales (bacterias y hongos). Para comprender alguna de las actividades biológicas que ocurren a nivel de las fracciones de agregados se llevaron a cabo medidas bioquímicas que nos permitieron construir el perfil enzimático y el CLPP de cada fracción de agregados bajo su correspondiente tratamiento.

Para buscar estimar el aporte que realiza cada fracción de agregados en cada prestación bioquímica, se calcularon la actividad relativa de cada fracción con respecto a su proporción en el suelo sin fraccionar.

Objetivos de este capítulo: identificar si las prácticas agrícolas influencian la distribución cuantitativa y algunas actividades bioquímicas de las comunidades microbianas del suelo en las diferentes fracciones de agregados medidas.

Hipótesis: 1) Las respuestas fisiológicas de las fracciones de agregados de diferentes tamaños serán propias del tamaño de la fracción de agregados.

2) Los manejos agrícolas no influencian las respuestas fisiológicas de las fracciones de agregados.

4.2) Materiales y métodos

4.2.1) Descripción de los sitios

Para este estudio se utilizaron muestras de dos establecimientos agrícolas en producción. El primer establecimiento de cual se tomaron muestra fue el Hogar Funke, el mismo sitio que se utilizó en el capítulo 3. El segundo sitio elegido, a modo de comparación dada las particularidades del suelo de Hogar Funke, fue el establecimiento agrícola Las Matreras.

El primer sitio muestreado está localizado en el Hogar Funke (Tornquist, Provincia de Buenos Aires, Argentina; 38°09′S 61°57′O). El suelo es Argiudoll Típico y es representativo de región pampeana central-sudeste semiárida. El clima es una temperatura continental semiárida. La temperatura anual promedio y las precipitaciones son 15 ºC y 799 mm, respectivamente.

El experimento fue establecido en 1986 en dos parcelas de 8 hs adyacentes. Donde se realizaron dos sistemas de labranza: siembra directa (SD) y la labranza convencional (LC). La LC fue llevada adelante utilizando cincel y rastra de disco con una profundidad de 7-20 cm.

Más detalles fueron dados en el capítulo 3. Pero brevemente, los suelos de Funke con SD presentaron 2,14 mg/ha de COT en comparación con 1,86 mg/ha en la LC. Los valores de Pext en las muestras de la SD fueron 66,13 mg/kg suelo en comparación con 56,67 mg/kg suelo en la LC. Los valores de Cmic fueron 614,85 y 662,62 µg/g suelo en la SD y en la LC, respectivamente. Y el pH en ambos manejos agrícolas fue 6.

El segundo sitio de muestreo se encuentra localizado en el establecimiento de Las Matreras (Irineo Portela, Provincia de Buenos Aires; 33º58´S 59º40´N). El suelo es un Argiudoll Típico, del tipo franco arcilloso limoso. El suelo de la zona constituye una unidad fisiográfica (Pampa ondulada) caracterizada por un relieve predominantemente ondulado y recortado en parte por cañadas, arroyos y ríos, donde sobresalen una serie de elevaciones divisorias de aguas, interfluvios y áreas de nacientes. La temperatura anual promedio y las precipitaciones son 17,1 ºC y 1070 mm, respectivamente. Los suelos de las matreras presentaron valores similares, siendo 4,24 mg/ha de COT, 66,8 mg/kg suelo y un pH de 5,8.

Las muestras fueron recolectadas de los primeros cinco centímetros de suelo (0-5 cm) en julio de 2014 para las muestras de Funke y en mayo de 2015 para las muestras de

Las Matreras. Las muestras fueron tomadas por quintuplicado para cada tratamiento en un área de 5 m^2 y estuvo compuesta por 25 piques de barreno, de 2 cm de diámetro, que se mezclaron para formar una muestra compuesta. La muestra fue llevada al laboratorio en frio, donde una parte de la muestra fue secada a 40 ºC y la otra fue almacenada en heladera a 4 ºC hasta su uso dentro de los dos primeros meses posteriores al muestreo.

4.2.2) Fraccionamiento del suelo.

El procedimiento fue descripto por Stemmer et al., 1998a y modificado posteriormente por Neumann et al., (2013). El suelo finalmente queda separado en cuatro fracciones de agregados (2000-63, 63-20, 20-2, 2-0,1 µm). Brevemente, un total de 20 g de suelo seco se suspende en agua desionizada (suelo/agua: 1:5 p/v) y se ultrasónica con una energía de 30 J/mL. El sonicado fue llevado a cabo por medio de un ultrasonicador de baño “UltrasonicCleaner” (Testlab S.R.L., Quilmes, Argentina). La fracción de 2000-63 µm (arena) fue separada del resto de las fracciones por medio del tamizado de la suspensión de suelo con un tamiz con una malla de 63 µm. El líquido filtrado por la malla del tamiz, arrastrando todas las partículas menores a 63 µm, fue centrifugado a 50 g durante 15 min a 4º C (Centrifuga Refrigerada Multi-RF; Thermo Fischer Scientific, EEUU). Para separar las fracción de 2-0,1 µm (arcillas) de la fracción 63-2 µm (limosa), el sobrenadante de la centrifugación conteniendo la fracción 2-0,1 µm fue descartado en un vaso de precipitado y el precipitado fue re-suspendido en agua desionizada y vuelto a centrifugar. La centrifugación y re-suspensión del precipitado fue repetido siete veces más con tiempos de centrifugación decrecientes, 15, 13, 12 y 11 min por duplicado cada uno de ellos, respectivamente, siguiendo el protocolo de. Posterior a la última re-suspensión, el precipitado fue tamizado en húmedo con un tamiz con una malla de 20 µm, separando así la fracción de agregados 20-2 µm (limosa fina) que atraviesa el tamiz, de la fracción 63-20 µm (limosa gruesa) que queda retenida. Para aumentar la floculación de las partículas menores a 2 µm, se agregó Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) -con una concentración final de 3,3 mM- a los vasos de precipitados donde se recogieron todos los sobrenadantes de los procesos de re-suspensión-centrifugación y se incubo a 4ºC durante toda la noche. Posteriormente a la decantación, las partículas < 2 µm fueron concentradas por medio de la centrifugación durante 10 min a 2400 g. Todas las fracciones fueron secadas a 40 ºC y luego almacenadas a 4º C en heladera hasta su uso.

La distribución en tamaño de las fracciones de agregados obtenidas fue: 2000-63 µm (Fracción arenosa), 63-20 µm (Fracción Limo grueso), 20-2 µm (Fracción Limo fino) y

2-0,1 µm (Fracción arcillosa). Se estableció el peso total recuperado de cada fracción y el rendimiento total del fraccionamiento

4.2.3) Extracción de ADN.

EL ADN microbiano del suelo fue extraído y purificado desde las muestras de suelo (0,25 g) usando el kit de extracción ZR Soil Microbe DNA MiniPrep ™ (Zymo Research Corporation, E.E.U.U.) de acuerdo al protocolo de extracción del fabricante. La cantidad y la calidad (por medio de las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 230/260 nm) de ADN extraído se determinó por medio de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, E.E.U.U.).

4.2.4) Cuantificación de los grupos microbianos principales por qPCR.

La abundancia relativa de las copias de la subunidad pequeña de gen ribosomal del ARN de bacterias y hongos fueron cuantificados usando el método y los oligonucleótidos descripto por Fierer et al., (2005). Para hongos, el oligonucleótido usado fue 5.8s (5´-CGTTGCGTTCTTCATCG-3´) combinado con el oligonucleótido ITS1f (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´), mientras que para bacterias se usaron los oligonucleótidos Eub338 (5´-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3´) y Eub518 (5´-ATTACCGCGGCTGCTGG-3´). Para estimar la abundancia de los genes ribosomales del ARN de hongos y bacterias, se generaron curvas patrón usando diluciones seriadas a partir de una muestra donde se sabe el número de copias por gramo de ADN de la *Pseudomona protegens CHAØ* o del *Fusarium oxysporum*. El volumen final de la reacción de real time-PCR fue 25 µl conteniendo 12,5 µl Master MixqPCR SYBR (PB-L, Quilmes, BA, Argentina), 0,75 µl de cada primer de una concentración de 10 µM, y 6 µl agua estéril y libre de ADN. Se agregó 5 µl en cada reacción de las muestras de ADN de suelo o el ADN utilizado como curva de calibración. La reacción fue llevada a cabo en un ciclador Smart Cycler (Cepheid, E.E.U.U.) usando el programa 94 °C por 15 min seguido por 40 ciclos of 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s and 72 °C por 30 s. Las curvas de hibridación y los geles electroforéticos fueron llevados a cabo para confirmar que los productos amplificados fueron del tamaño adecuado. El número de copias de cada gen bacteriano o fúngico fue generado usando una ecuación de regresión para cada ensayo relacionando el valor del ciclo umbral (Ct) para conocer el número de copias en los patrones con una concentración conocida de ADN por medio del programa Lin-RegPCR (Ruijter et al., 2015). Todas reacciones de real time-PCR fueron corridas por triplicados para cada ADN extraído de las muestras de suelo.

4.2.5) Análisis de los Perfiles Fisiológicos a Nivel de las Comunidades (CLPP) de suelo.

Se utilizaron las microplacas de 96 pocillos con el sistema biosensor de oxigeno (OBS) para los análisis fisiológicos de suelo como ya fue descrito en el capítulo 2. Por interrupción de comercialización de las placas originales de la empresa BD, las placas OBS utilizadas en esta parte del trabajo fueron diseñadas y manufacturas en nuestro laboratorio de acuerdo al trabajo McLamore et al., (2014). Para más detalles ver Anexo 1. En forma similar a como se explicó en capítulos anteriores, las suspensiones de suelo fueron preparadas mezclando 1 g de suelos con 5 ml de agua destilada estéril en un tubo de 15 ml conteniendo aproximadamente 5 ml de perlitas de metal de 2 mm para mezclado y homogenizado mediante ULTRA TURRAX Tube Drive (IKA, Alemania) durante 2 min. Las soluciones madre de fuente de C (300 µg/L) fueron preparadas para obtener una concentración final de 50 mg/L de C. Las fuentes de C seleccionadas para el análisis de los CLPP fueron el Ácido p-Cumárico, Ácido Propiónico y Ácido Vaníllico (Sigma, E.E.U.U.). Todas las soluciones stocks y el agua destilada fueron esterilizadas utilizando filtros (<0,22 µm, Sartor, E.E.U.U.) y almacenados a 4º C previos a ser ensayadas en las microplacas. En cada pocillo se agregaron 40 µl de las soluciones de las fuentes de carbono o agua desionizada estéril para determinar la respiración inducida por sustrato o la respiración basal, respectivamente. Las suspensiones de suelo (160 µl) fueron pipeteadas en cada pocillo y con el agregado de 40 µl de agua desionizada estéril se llego a un volumen final de 240 µl.

Los datos de las cinéticas de fluorescencia de los consumos de oxigeno fueron expresados como unidades de fluorescencia relativa normalizados (NFRU), al dividir el valor de fluorescencia en cada punto por el valor de fluorescencia medido a 1 h después de haber comenzado el ensayo. El tiempo minino de respuesta (TMR) fue definido como el tiempo necesario para que se alcance un valor de 1,1 de NRFU. La cinética de fluorescencia muestra un pico, donde la concentración de oxigeno disuelto es mínima, y como luego la actividad respiratoria declina debido al agotamiento de la sustrato fácilmente disponible y la continua difusión del O_2 que regenera la matriz. El pico de la respuesta fluorescente (Fmax) fue calculado para todas las muestras como otro parámetro de la actividad respiratoria, asumiendo una tasa de difusión constante.

4.2.6) Análisis de la actividad de enzimas extracelulares (EAA).

La Actividad de las Enzimas Extracelulares (EEA) del suelo fue determinado de acuerdo a Marx et al., (2001), utilizando microplacas de 96 pocillos y sustratos unidos

a 4-metilumbelliferona (MUB) fluorescente; también se hicieron los controles correspondientes (MUB más suelo (quenching), Buffer MES más sustratos, Buffer MES más suelo). Las muestras de suelo sin fraccionar y las fracciones de agregados fueron ensayadas para las siguientes actividades enzimáticas: β-cellobiohidrolasa, N-acetil-β-glucosaminidasa, β-glucosidasa, fosfomonoesterasa, y sulfatasa usando 4-metilumbelliferona-β-D-celobiosa, 4-metilumbelliferona-N-acetil-β-D-glucosamina, 4-metilumbelliferona-β-D-glucopiranosa, 4-metilumbelliferona-fosfato, y 4-metilumbelliferona-sulfato como sustrato, respectivamente. La suspensión de suelo sin fraccionar y de las fracciones de agregados analizadas se realizó mezclando un 1g de suelo fresco con 100 ml de buffer MES 0,1 M pH 6,1. Las suspensiones fueron obtenidas por el mezclado vigoroso durante 2 min por medio del sistema ULTRA TURRAX Tube Drive (IKA, Alemania).

Para la determinación de cada actividad enzimática, en cada pocillo se agregaron 200 µl de la suspensión de suelo sin fraccionar y las fracciones de agregados y 50 µl de la solución de los sustratos (200 µM). Las placas cargadas fueron incubadas 5 min a 30º C y luego se midió la intensidad de la fluorescencia en un lector de fluorescencia en microplacas (POLARstar Omega, BMG LABTECH, Alemania) utilizando una longitud de onda de 355 nm para la excitación y de 460 nm para la emisión. El equipo se programó para que realice 25 ciclos de 60 segundos a 30°C. La fluorescencia fue convertida en una cantidad de MUB (nM MUB [g Suelo]$^{-1}$ h^{-1}), de acuerdo a estándares específicos, tomando en cuenta la cantidad del grado de la disminución de la fluorescencia, a través de la materia orgánica y las partículas de suelo, en cada suspensión (Marx et al., 2001).

4.2.7) Análisis Estadístico

Las diferencias entre los sitios agrícolas fueron caracterizadas con un análisis de la varianza multivariado (ANOVAM), y usando el test de Hostelling ($P < 0,05$) para mirar las diferencias significativas. También se utilizó esta herramienta para caracterizar los CLPP. Los parámetros calculados para los tratamientos y las fracciones de agregados del suelo fueron analizadas por medio del test o ensayo de análisis de la varianza (ANOVA) con el test Fisher´s LSD0.5 ($P < 0,05$) utilizado para mirar diferencias entre los tratamientos. Las relaciones entre tratamientos caracterizados por medio del perfil enzimático o con el CLPP fue visualizado por medio Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) de acuerdo a las distancias euclideas entre las muestras. Además, las variables fueron agregadas a partir de cálculos del Análisis de Componentes

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Principales (ACP) que presentaron la misma distribución. Todo el análisis estadístico fueron realizados con el software INFOSTAT (Di Rienzo et al.; 2013).

4.3) Resultados y discusión

4.3.1) Resultados de los suelos de Funke.

4.3.1.1) Análisis del suelo sin fraccionar.

Para poner en contexto los resultados que se obtuvieron a partir del análisis de las fracciones de agregados del suelo, comenzamos describiendo el comportamiento de los suelos sin fraccionar (SSF) con el fin de observar como los manejos agrícolas afectan a las propiedades bioquímicas del suelo (EEA y CLPP) como punto de partida inicial.

CLPP

Cuando estudiamos por medio del Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) basados en los parámetros del CLPP (Figura 4.1) se observó que el CP1 explicó cerca del 44% de la varianza y el CP2 el 22,2% de la varianza. Se observó una distribución por tratamientos agrícolas, sin que las submuestras de cada manejo se mezclen. Pudimos observar que los parámetros de Fmax con el agregado de ácido Cumárico, y los TMR de la respiración basal y con el agregado de ácido Vanillico se asocian con las muestras de la SD hacia el lado negativo del CP1. En cambio, los Fmax de la respiración basal y con el agregado de ácido vanillico y el TMR con ácido cumárico se asocian con las muestras de la LC hacia el lado positivo del CP1.

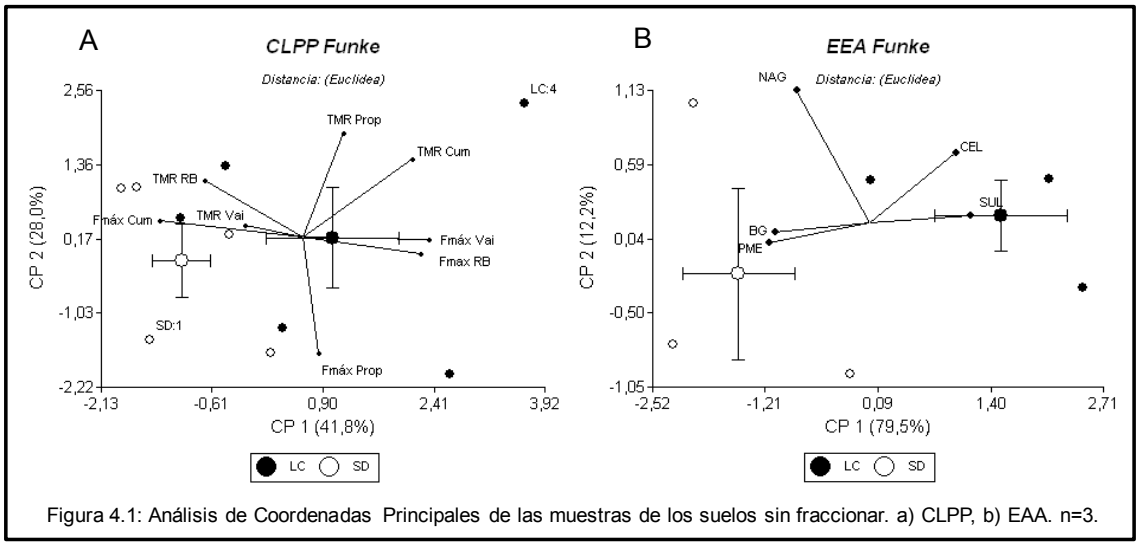

Figura 4.1: Análisis de Coordenadas Principales de las muestras de los suelos sin fraccionar. a) CLPP, b) EAA. n=3.

Perfil enzimático.

De forma similar cuando se observó el ACoP del perfil enzimático (Figura 4.1B), los CP1 explicó el 79,5% de la varianza y el CP2 el 12,2% de la varianza. Se pudo observar que las muestras se separan por tipo de manejos agrícola al igual que en el CLPP, donde las muestras de la SD se ubicaron hacia el lado negativo del CP1 y se asociaron con las enzimas BG y PME y las muestras de la LC se orientaron hacia el lado positivo del mismo eje agrupándose con las enzimas CEL y SUL.

Los efectos benéficos de cada sistema de labranza está relacionado con las características de los suelos, como el contenido de arcilla, y de las condiciones ambientales, así como también la temperatura y las precipitaciones de los sitios donde se encuentran ubicados estos suelos (Zhao et al., 2017; Rusinamhodzi et al., 2011).

4.3.1.2) Distribución de las fracciones de agregados

La distribución de las fracciones de agregados obtenidas a partir del fraccionamiento en húmedo de los manejos agrícolas es mostrada en la Tabla 4.1. Los suelos de Funke presentaron la mayor proporción de agregados en la fracción 2000-63 µm (arenosa), siendo en las muestras de la SD un 20% mayor, y estadísticamente diferente (P = 0,0186). Posteriormente seguido por la fracción 63-20 µm, donde las muestras de la LC fue un 25% mayor, y estadísticamente diferente, a las muestras de la SD (P = 0,0279). Finalmente las fracciones 20-2 y 2-0,1 µm presentaron mayores valores en las muestras de la LC con respecto a las muestras de la SD pero no presentaron diferencias significativas.

Trat.	2000-63 µm	63-20 µm	20-2 µm	2-0,1 µm	Recuperado
LC	48,8±1,1	36,5±1,8	6,1±1,7	3±0,45	94±22
SD	61,4±1	27,7±1,9	4,7±0,7	2,0±0,1	96±27

Tabla 4.1: Distribución de las fracciones de agregados de los suelos utilizados. Media Error Estándar. n=5. (%). Trat. = tratamiento; LC = labranza convencional; SD = siembra directa

Se observa que estos resultados son similares a los observados en el capítulo 3, donde las muestras de la SD presento mayores cantidades de las fracciones grandes (> 105 µm) en comparación con la LC (sección 3.3.2). Sin embargo, varió las distribución de cada fracción ya que para este capítulo se llevo a cabo un tamizado en húmedo menos agresivo con el fin de preservar las comunidades microbianas del suelo. Por lo cual la fracción más grande es más abundante en contraste con lo observado en el capitulo anterior. Estudios previos evidencia que los manejos

agrícolas influencia la distribución de las fracciones de agregados (Helgason et al., 2010; Schutter & Dick, 2001; Zhang et al., 2016).

4.3.1.3) Cuantificación del ADN extraído.

Cuando analizamos las extracciones de ADN de las muestras de Funke (tabla 4.2) se vio que las mayores cantidades en las muestras de la SD fueron en la fracción 20-2 µm y en las muestras de la LC fue en la fracción 2000-63 µm. Las muestras de la SD presentaron mayores valores en todas las fracciones y en el SSF en comparación con las muestras de la LC, con excepción de la fracción de agregados 2000-63 µm que fueron menores. Solo fueron capaces de ser diferenciadas de manera significativa en la fracción de agregados 20-2 µm (P = 0,0228), para las restantes no hubo diferencias significativas.

Trat.	2000-63 µm	63-20 µm	20-2 µm	2-0,1 µm	SSF
LC	22,5±2,5	13,9±0,9	12,8±1,4	14,3±1,8	16,8±5
SD	22,1±1,3	17,5±1,5	23,9±2,7	17,7±1,8	20,8±1,4

Tabla 4.2: Cantidad de ADN extraído de cada fracción de agregados. Media Error Estándar. n=5. (µg ADN/g Fracción). Trat. = tratamiento; LC = labranza convencional; SD = siembra directa

Valores publicados por otros autores son similares a nuestros resultados (Hemkemeyer et al., 2015; Neumann et al., 2013). Nuestros valores no presentan relación entre tamaño y cantidad de ADN extraído de las fracciones de agregados.

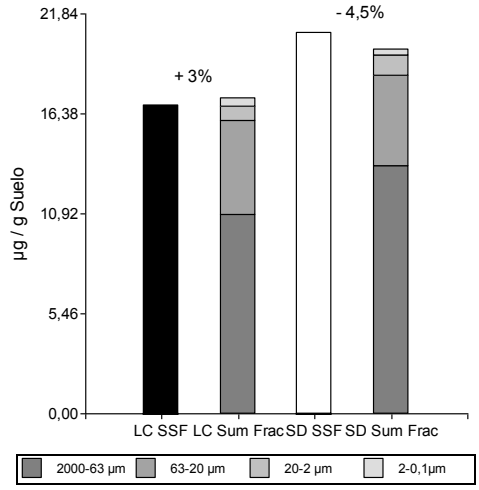

Figura 4.2: Gráfico que muestra la sumatoria de las fracciones de agregados relativizado a su contribución en el suelo total (Sum Frac) en comparación con el suelo sin fraccionar. (µg ADN/g Suelo). n=3. El numero arriba de las columnas muestra la diferencia entre el suelo sin fraccionar y la sumatoria de las fracciones. LC = labranza convencional; SD = siembra directa.

Cuando analizamos lo que representa el porcentaje de cada fracción de agregados en el suelo sin fraccionar, el ADN extraído en cada fracción de agregados por gramo de suelo vimos que la contribución de cada fracción de agregados disminuye a medida que disminuye el tamaño de fracción (Figura 4.2). Además, la recuperación estuvo cercana al 100%. Estos resultados se encuentran en oposición a lo observado por otros autores, donde el aporte al

suelo sin fraccionar aumenta a medida que disminuye el tamaño de fracción de agregados (Hemkemeyer et al., 2015; Neumann et al., 2013). Esto puede deberse al gran porcentaje de suelo que representa las fracciones de mayor tamaño, en comparación con otros estudios realizados donde la distribución de las fracciones de agregados es más homogénea.

4.3.1.4) Cuantificación de los grupos microbianos principales.

Cuando analizamos la abundancia relativa de las bacterias y los hongos, cuantificados por medio de qPCR, vimos que no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, ni entre las fracciones de agregados ($P > 0,05$). Cuando analizamos la abundancia relativa de las bacterias vimos que para ambos tratamientos la fracción que presento la mayor abundancia relativa fue la fracción de agregados 20-2 µm. En el SFF y en la fracción 2000-63 µm, la SD presenta una mayor abundancia relativa, aproximadamente un 80%, en cambio, para las fracciones restantes la abundancia relativa fue mayor en la LC.

Cuando observamos que sucede con los hongos en Funke, vimos que la abundancia relativa en las muestras de la LC fue mayor en la fracción de agregados 63-20 µm y en las muestras de la SD la fracción 20-2 µm. Además vimos que las muestras de la SD presentaron mayores valores en todas las fracciones de agregados. Por otro lado, las muestras de la LC presentaron una mayor abundancia relativa en el SSF.

Cuantificación	Trat.	2000-63 µm	63-20 µm	20-2 µm	2-0,1 µm	SSF	% recup
Bacterias	LC	1,89	9,85	25,90	2,88	3,62	171
	SD	10,16	6,92	25,60	2,61	4,46	211
Hongos	LC	0,54	0,83	0,72	0,05	0,31	198
	SD	1,74	1,66	3,06	0,28	0,12	1321
Relación H/B	LC	0,29	0,08	0,03	0,02	0,09	
	SD	0,17	0,24	0,12	0,11	0,03	

Tabla 4.3: Abundancias relativas bacterias y hongos para cada tratamiento, y la relación H/B. SSF: Suelos sin fraccionar n=3. (nº Copias. $x10^8$ / g Fracción). %recup = porcentaje de recuperación de cada fracción de agregados respecto a lo que contribuye en el SSF. Trat = tratamiento; H/B = hongos/bacterias SSF = suelo sin fraccionar; LC = labranza convencional; SD = siembra directa

Se ha demostrado que cerca del 75% de las bacterias se encuentran ubicadas en las fracciones de menor tamaño (Vos et al., 2013). Algunos autores sugieren que el aumento de la abundancia relativa a medida que disminuye el tamaño de la fracción de agregados está relacionado con la perdida de carbono y nitrógeno orgánico debido a la intensificación de los tratamientos (Kandeler et al., 1999c). Además se ha sugerido que el aumento de la abundancia con la disminución del tamaño de fracción de

agregados también se encontraría relacionado con el aumento de la sumatoria del área de superficie de las partículas más pequeñas de suelo (Hattori, 1988).

Varios estudios han demostrado que la abundancia relativa de los hongos cuantificados por medio del número de copias de gen ribosomal 18S aumenta a medida que disminuye el tamaño de la fracciones de agregados (Hemkemeyer et al., 2015; Neumann et al 2013). Otros autores utilizando otro tipos de técnicas como los PLFA o el ergosterol han mostrado la situación contraria, donde la abundancia de los hongos disminuye con la disminución de las fracciones de agregados (Jiang et al., 2011b); Helganson et al., 2010; Six et al., 2006). No podríamos establecer que los hongos sean dominadores de las fracciones de agregados de mayor tamaño ya que en nuestros resultados no se presentaron diferencias significativas entre las fracciones de agregados ($P > 0,05$). Por lo cual alguno autores sugieren que los hongos filamentosos podrían estar interactuando de manera simultáneamente con las diferentes fracciones de agregados (Henkemeyer et al., 2014).

Posteriormente cuando analizamos la relación hongos/bacteria vimos que tanto para la LC como para la SD la relación disminuye a medida que disminuye el tamaño de las fracciones de agregados. Lo cual nos estaría sugiriendo que la abundancia relativa de los hongos en relación a la abundancia relativa de las bacterias disminuye desde las partículas más grandes a las más pequeñas.

Varios estudios han demostrado que la relación de hongos/bacterias disminuye a medida que lo hace el tamaño de agregados, tal cual lo hacen aquí nuestras muestras lo que podría estar evidenciando una mayor dominancia de los hongos en las fracciones mas grandes (Helgason et al., 2010; Hemkemeyer et al., 2015; Kandeler et al., 2000; Neumann et al., 2013; Poll et al., 2003)

4.3.1.5) Análisis de las actividades de las enzimas extracelulares (EEA).

Cuando analizamos las actividades de las cinco enzimas extracelulares del suelo en las muestras de Funke vimos que para el SSF las enzimas BG, NAG y PME fueron mayores en las muestras de la SD, en cambio, lo contrario sucedió con las enzimas CEL y SUL.

Los valores de las EEA de las fracciones de agregados son mostrados de acuerdo al tratamiento en la Tabla 4.5. En las muestras de la SD la actividad enzimática de la BG y la NAG presentaron los mayores valores en la fracción de agregados 2000-63 µm y

la PME en la fracción 63-20 µm. Para estas enzimas se observo que la actividad disminuye a medida que lo hace el tamaño de fracción. La actividades enzimáticas de la CEL y la SUL presentaron los mayores valores en la fracción de agregados 2-0.1 µm para ambos tratamientos. La actividad de la CEL presento una disminución desde la fracción 2000-63 µm hasta la fracción 20-2 µm, y aumenta en la fracción 2-0,1 µm siendo mayor que las fracciones de agregados de mayor tamaño.

Trat.	Fracción de agregados	β-glicosidasa	N-acetil-glucosamina	Fosfatasa	Celo-biohidrolasa	Sulfatasa
LC	SSF	22±12	2±1	81,9±58	7,3±1,8	1,4±0,3
	2000-63	46,4±14	9±3,6	154±41	10,7±2,5	1±0,7
	63-20	41±17	5,3±1,3	125±63	8,2±1,9	1,7±0,8
	20-2	36,4±10	6,9±2	204,2±82	10,3±1,5	7,1±0,8
	2-0,1	23,8±5	14,4±2	178,8±19	22,6±6	11,3±4
SD	SSF	77±8	12,1±4	336,7±62	4,2±1,9	0,45±0,29
	2000-63	111,6±17	16,78±0,14	325,7±51	11,5±6,4	5,2±2,3
	63-20	95,3±14	10,5±1,7	393,4±90	4,12±0,4	1,04±0,1
	20-2	57,3±16	5,7±1,3	340,1±114	5±2,8	4,6±1,6
	2-0,1	27,3±15	12,9±6	106,4±67	20,7±1,8	26,8±1,4

Tabla 4.4: actividad de las enzimas extracelulares en las muestras de Funke para tratamiento y fracción de agregados. Media Error Estándar. n=3.

Por otro lado, en las muestras de la LC la actividad de las enzimas NAG, CEL y SUL presentaron los mayores valores en la fracción de agregados 2-0.1 µm y la PME en la fracción 20-2 µm. Por último, la actividad de la enzima BG fue mayor en la fracción 2000-63 µm. Cuando vemos estas actividades se observa que la actividad de gran parte de las enzimas extracelulares se encuentra en las fracciones de agregados más pequeñas. O en caso de la BG la actividad estuvo distribuida en todas las fracciones de agregados.

El mecanismo primario por el que los sistemas de labranzas influyen sobre las comunidades microbianas del suelo es a través de la transformación de la estructura del suelo y la disponibilidad de substratos (Elliot & Coleman, 1998). En sintonía con esto, el patrón general de las actividades enzimáticas está gobernado por la cantidad y calidad de los sustratos orgánicos así como también por los diferentes mecanismos de protección física. Además, las diferentes enzimas se encuentran asociadas de manera diferencial con las arcillas o con los residuos de las plantas, dependiendo del mecanismo de estabilización físico-químico y las disponibilidades de los sustratos (Lagomarsino et al., 2012; Allison & Jarstrow, 2005; Kandeler et al., 1999). En el presente trabajo se observó una distribución diferencial para las EEA, de acuerdo a tratamiento y a las fracciones de agregados. Las actividades de las enzimas BG, NAG y PME que se encuentran presente en la SD presentaron los mayores valores en las

fracciones más grandes y la actividad fue disminuyendo desde las fracciones más grandes a las de menor tamaño. En cambio en las muestras de la LC presentaron que la EEA era mayor en las fracciones de agregados de menor tamaño, o presentaban valores similares en las fracciones de agregados como fue el caso de BG. Probablemente en la LC, la actividad de las enzimas extracelulares se estaría distribuyendo en todas las fracciones de agregados a lo largo del perfil del suelo que sufre la ruptura y el mezclado por medio de la labranza. En cambio, en la SD, la actividad de las enzimas extracelulares se concentraría en los primeros centímetros de la capa superior del suelo y los sustratos serían disponibles principalmente en los agregados de mayor tamaño, y la disponibilidad iría disminuyendo en conjunto con el tamaño de las fracciones de agregados. Ha sido demostrado que en la SD el carbono orgánico (fresco o lábil) derivados de los residuos de los cultivos es primero incorporado en las fracciones de arena gruesa (2000-200 μm) durante la descomposición inicial y con la subsiguiente acumulación al volverse estable en los suelos (Six et al., 2000; Stemmer et al., 1998a). Nicolás et al., (2012) demuestra que la aplicación de abonos orgánicos incrementa significativamente la concentración y la cantidad de carbono orgánico en las fracciones arenosas (2000-250 y 250-63 μm) lo que se traduce una mayor actividad de las enzimas extracelulares, y que al cabo de 9 meses la actividad decrece en conjunto con la respiración microbiana. Consecuentemente, esto se traduce en un alto contenido de C y N lábil en las fracciones de mayor tamaño, lo que podría estar estimulando una mayor producción de enzimas extracelulares. En cambio en las fracciones finas, el C está protegido por las partículas minerales y consecuentemente tiene una baja disponibilidad microbiana (Qin et al., 2010). Allison & Jarstrow (2005) observaron que la mayor actividad de las enzimas BG, CEL, PME y NAG se encuentra en las fracciones mayores a 250 μm (material orgánico particulado grueso, POMg) y sugieren que la actividad de los microorganismos del suelo presentes en esta fracción producen mayores cantidades de enzimas hidrolíticas, con el fin de degradar los materiales derivados de las plantas.

Este resultado, de que las mayores actividades enzimáticas se encuentran presentes en la fracción de agregados de mayor tamaño en la SD principalmente, se encuentran en concordancia con lo observado en el capítulo 3, donde la distribución de las actividades enzimáticas del suelo, en la de profundidad 0-5 cm, tiene una correlación positiva con la cantidad de agregados > 105 μm y el COT. Sin embargo, debido que no tenemos resultados de la concentración de valores de C y N, no es posible afirmar completamente lo observado previamente.

Cuando analizamos los ACoP de la información obtenida a partir de los perfiles enzimáticos para las muestras de Funke (Figura 4.3) vimos que el CP1 explicó cerca del 57% de la variación. Mientras que el CP2 explicó cerca del 19,9% de la variación. Clasificados por tratamientos y fracciones de agregados, vemos que las muestras tienden a separarse por tratamiento principalmente, y luego por tamaño de fracción. Con excepción de la fracción de agregados 2-0,1 µm tiende a separarse del resto de las fracciones de agregados. Podemos ver que los parámetros de las actividades de la CEL y la SUL se orientan hacia las fracciones de menor tamaño. Por otro lado, las actividades de la BG y la PME se orientan hacia las muestras de la SD.

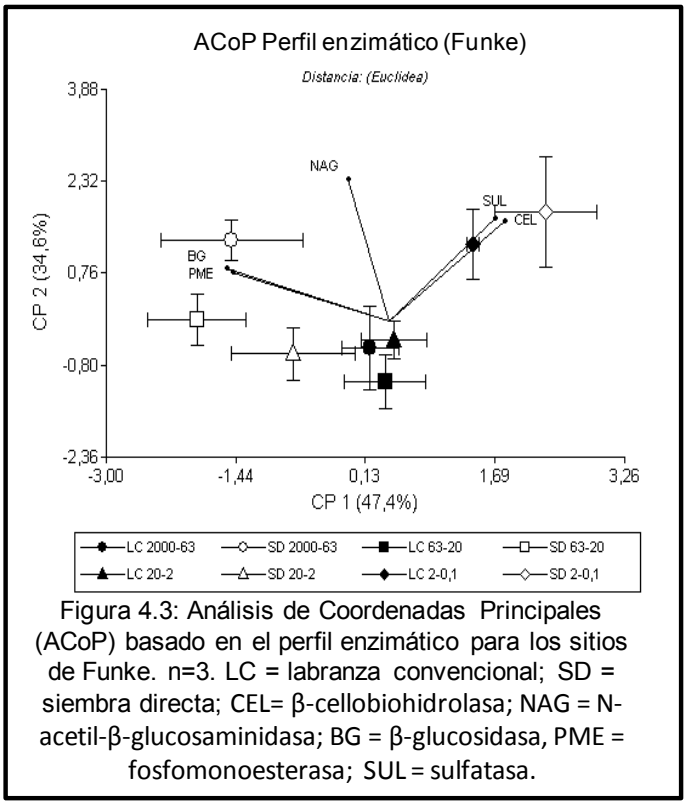

Figura 4.3: Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) basado en el perfil enzimático para los sitios de Funke. n=3. LC = labranza convencional; SD = siembra directa; CEL= β-cellobiohidrolasa; NAG = N-acetil-β-glucosaminidasa; BG = β-glucosidasa, PME = fosfomonoesterasa; SUL = sulfatasa.

Actividad relativa de enzimas extracelulares

La actividad relativa refleja el porcentaje de contribución de cada fracción de agregados a la actividad total del suelo sin fraccionar. Considerando las proporciones de cada fracción de agregados y el valor de la actividad de la enzima extracelular absoluta en la misma y en el suelo completo sin fraccionar, se pudo calcular el porcentaje de contribución (Figura 4.4) de cada fracción al suelo total.

La sumatoria de las actividades relativas de las fracciones de agregado produjo un aumento en la actividad de las enzimas con respecto a suelo sin fraccionar en la SD de 236% y el aumento en las muestras de la LC fue de un 97,8%.

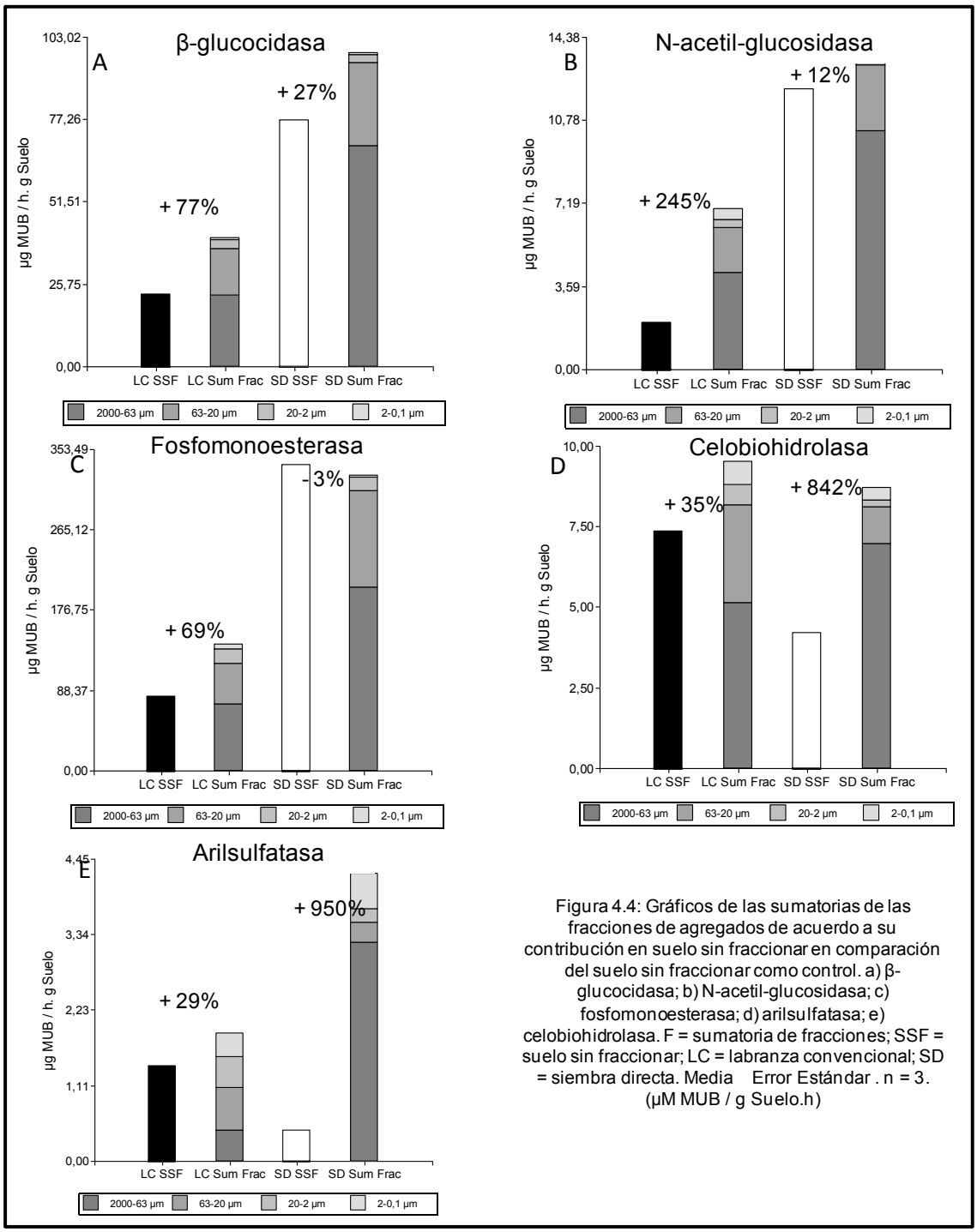

Figura 4.4: Gráficos de las sumatorias de las fracciones de agregados de acuerdo a su contribución en suelo sin fraccionar en comparación del suelo sin fraccionar como control. a) β-glucocidasa; b) N-acetil-glucosidasa; c) fosfomonoesterasa; d) arilsulfatasa; e) celobiohidrolasa. F = sumatoria de fracciones; SSF = suelo sin fraccionar; LC = labranza convencional; SD = siembra directa. Media Error Estándar . n = 3. (µM MUB / g Suelo.h)

En términos de contribución de cada fracción de agregados al suelo total, las fracciones de agregados mostraron que la mayor actividad fue aportada por la fracción 2000-63 µm, que aportaron cerca del 60% de la actividad. Mientras que la fracción 63-

20 µm aportó el 30%. Finalmente la fracciones 20-2 y 2-0,1 µm aportaron aproximadamente 6,5% y 3,5% de la actividad, respectivamente.

Este aumento en la sumatoria de las contribuciones de cada fracción de agregados proporcional a su masa en el suelo cuando se lo compara con el suelo sin fraccionar puede estar relacionado con varias razones. Como primera idea puede deberse a que cuando las fracciones de agregados son separadas, depósitos de enzimas adsorbidas sobre la superficie de los agregados quedan expuestas a los sustratos, donde antes se encontraban ocluidas por otras partículas e incapaces de unirse a un sustrato (Allison & Jastrow, 2006).

Estudios previos mostraron que cuando las muestras de suelo son puestas en solución se produce un aumento de la actividad extracelular (Halverson et al., 2000). Además cuando a esto se le suma posteriormente un paso de dispersión como puede ser la sonicación podría estar solubilizando y disponibilizandose nutrientes, como C y N, depositados en el suelo. Las bacterias responden de manera muy rápida, en aproximadamente 15 minutos, y producen enzimas extracelulares, principalmente β-glucosidasa y celobiohidrolasa, que podrían estar adicionándose a las ya existentes (Bach & Hofmockel, 2014). Esto podría estar explicando los elevados aumentos que suceden por ejemplo con la celobiohidrolasa y la arilsulfatasa, donde la actividad reconstituida fue mucho mayor a la del SSF.

Cuando se compararon la distribución de los porcentajes de recuperación vemos que presentan una distribución opuesta a la que presentan otros investigadores, donde se presentaron los mayores valores en las fracciones más pequeñas (Bach & Hofmockel, 2014; Marx et al.; 2005). Pero teniendo en cuenta que ni el tamaño de los tamices utilizados en el fraccionamiento utilizados por estos autores es similar a la que nosotros utilizamos ni el tipo de suelo es similar, no sería lo más adecuado comparar con nuestros resultados.

4.3.1.6) Análisis de las comunidades fisiológicas a nivel de comunidades (CLPP)

Los análisis de los perfiles fisiológicos a nivel de comunidades (CLPP) fueron realizados en las fracciones de agregados del suelo para estudiar como varía el consumo de O_2 basado en la respiración basal y con diferentes fuentes de C. Cuando se llevo a cabo el análisis del ANOVAM por cada sustrato de C, no fue posible diferenciar a los manejos agrícolas en ninguna de las fracciones de agregados ($P > 0,05$).

Trat.	Fracción de agregados	Fmax RB	Fmax Cum	Fmax Prop	Fmax Vai	TMR RB	TMR Cum	TMR Prop	TMR Vai
LC	SSF	1,93±0,17	2,4±0,3	2,36±0,3	2,37±0,5	1,56±0,06	1,56±0,03	1,5±0,05	1,45±0,03
	2000-63	1,7±0,2	1,85±0,2	1,75±0,1	1,92±0,16	1,75±0,1	1,5±0,13	2±0,2	1,8±0,2
	63-20	1,5±0,16	1,6±0,25	1,52±0,15	1,64±0,24	2,03±0,05	4,23±2,2	2,36±0,36	2,44±0,42
	20-2	4,1±1,8	2,3±0,2	2,22±0,1	2,51±0,34	1,61±0,16	4,1±1,3	1,56±0,1	1,47±0,1
	2-0,1	1,7±0,1	1,65±0,04	1,7±0,03	1,64±0,03	5,2±0,5	7,84±2,2	6,4±0,6	5,2±0,5
SD	SSF	2,3±0,6	2,1±0,26	2,14±0,22	1,85±0,2	1,64±0,1	1,72±0,16	1,5±0,1	1,6±0,1
	2000-63	2±0,4	1,84±0,25	1,9±0,26	1,74±0,2	1,86±0,16	2,14±0,4	1,75±0,13	1,75±0,1
	63-20	1,53±0,15	1,56±0,15	1,5±0,1	1,51±0,14	2,4±0,1	3±0,26	2,8±0,15	2,3±0,1
	20-2	2,25±0,2	2,2±0,17	2,2±0,1	2,13±0,15	1,53±0,1	1,5±0,1	1,5±0,03	1,64±0,05
	2-0,1	1,67±0,1	1,74±0,1	1,76±0,1	1,71±0,05	5,36±1,2	5,17±1,33	5±1,4	4,1±0,5

Tabla 4.5: actividad de los parámetros del CLPP en Funke para cada tratamiento y fracciones de agregados. Media Error Estándar. n=3.

Por lo cual decidimos estudiar qué sucede con cada parámetro en solitario en las fracciones de agregados (Tabla 4.5). El volumen de la respiración medida a través del Fmax mostró los mayores valores en la fracción de agregados 20-2 µm para ambos manejos agrícolas. A su vez, los parámetros TRM presentaron los mayores valores para la fracción de agregados 2-0,1 µm para la muestras de los dos tratamientos. Esto es consistente con estudios previos (Lagomarsino et al., 2012; Väisänen et al., 2005)

El Fmax refleja el tamaño de la población microbiana activa, que sigue patrones similares a los observados en las qPCR, ya que se refleja una mayor actividad microbiana en la fracciones de agregados 20-2 µm y 2-0,1 µm (Neumann et al., 2013; Lagomarsino et al., 2009; Poll et al., 2003; Sessitch et al., 2001; Kandeler et al., 1999a). Las fracciones más pequeñas (20-2 y 2-0,1 µm) ofrecen una mayor protección física a las comunidades microbianas, permitiendo una mayor actividad microbiana (Nicolas et al., 2012; Sessitch et al., 2002). Este resultado es consistente con lo reportado por Gerzabek et al., (2002), en el cual la abundancia y la diversidad bacteriana se incrementan a medida que se disminuye el tamaño de partícula.

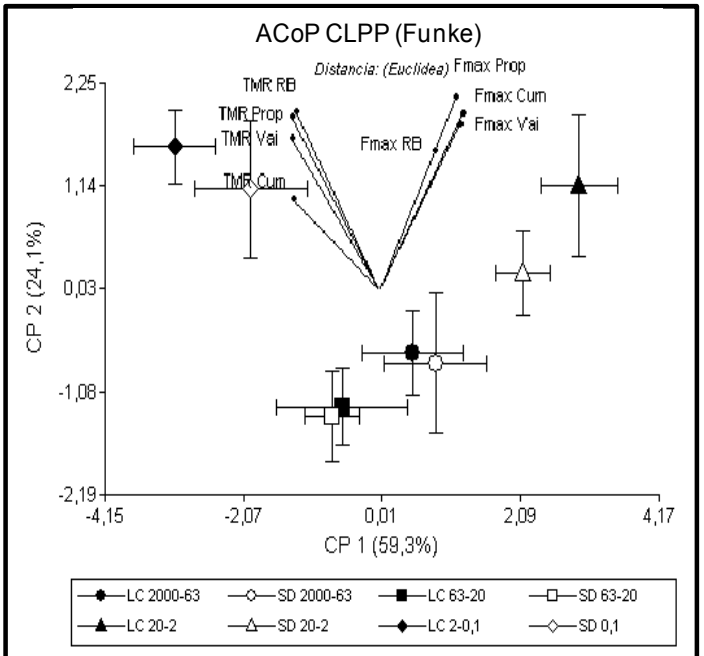

Figura 4.5: Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) basado en el CLPP para el sitio de Funke. n=3. LC = labranza convencional; SD = siembra directa; RB = respiración basal; Cum = Ác. cumárico; Prop = Ác. propiónico; Vai = Ác. vainillico

Cuando analizamos los ACoP de la información obtenida a

partir de los CLPP para las muestras de Funke (Figura 4.5), el CP1 y el CP2 explicaron cerca del 59,3% y el 24,1% de las varianza, respectivamente. Clasificados por tratamientos y fracciones de agregados, vimos que las muestras tienden a separarse por tamaño de fracción de agregados principalmente, y luego por tratamiento. Además, se observó que las fracciones de agregados 2000-63 µm y 63-20 µm son las que menos se separan por tratamiento (LC vs. SD). En comparación con las fracciones de agregados 20-2 y 2-0,1 µm que presentaron la mayor distancia entre los tratamientos agrícolas, sin embargo, la distancia entre los tratamientos agrícolas no es mayor que las diferentes fracciones de agregados en la fracción 20-2 µm. Por otro lado, la fracción 2-0,1 µm de ambos tratamientos se separa del resto de las fracciones de agregados del suelo al igual que sucedía en el ACoP de los perfiles enzimáticos. El análisis de los parámetros de la respiración reveló que las fracciones de agregados 2-0,1 µm se asocian con los mayores valores de TMR. En este sentido, Jiang y colaboradores han demostrado que el tamaño de agregados determina el patrón de distribución de la actividad microbiana en el suelo, donde el efecto de la labranza no fue significativo a escala de fracciones de agregados (Jiang et al., 2011a).

Actividad relativa del Fmax.

Cuando analizamos la actividad relativa y se pudo calcular el porcentaje de contribución de la actividad respiratoria inducida de cada fracción de agregados al suelo total (Figura 4.6) vimos que en Funke se produce, en promedio, un descenso del 26 y 17% en las muestras de la LC y SD, respectivamente.

En general, la contribución de cada fracción de agregados disminuyó a medida que disminuye el tamaño de agregados. Se observó que la fracción de agregados 2000-63 µm aportó 53% y 67,5% de la actividad relativa en las muestras de la LC y la SD, respectivamente. Por otro lado la contribución de la fracción de agregados 63-20 µm fue del 35% en las muestras de la LC y del 24,5% en las muestras de la SD. En la fracción 20-2 µm fue del 9% en las muestras de la LC y del 6% en las muestras de la SD. Finalmente en la fracción de agregados 2-0,1 µm estuvo entre el 2 y el 3% para ambos manejos agrícolas.

Hasta el momento no existen datos previos que certifiquen lo observado en la actividad relativa de la respiración medida a través del Fmax. Solo dos trabajos han sido publicados llevando a cabo estudios de respiración inducida en las fracciones de

agregados, y en ambos caso el proceso de fraccionamiento es diferente al realizado en nuestro trabajo (Lagomarsino et al., 2012; Väisänen et al., 2005).

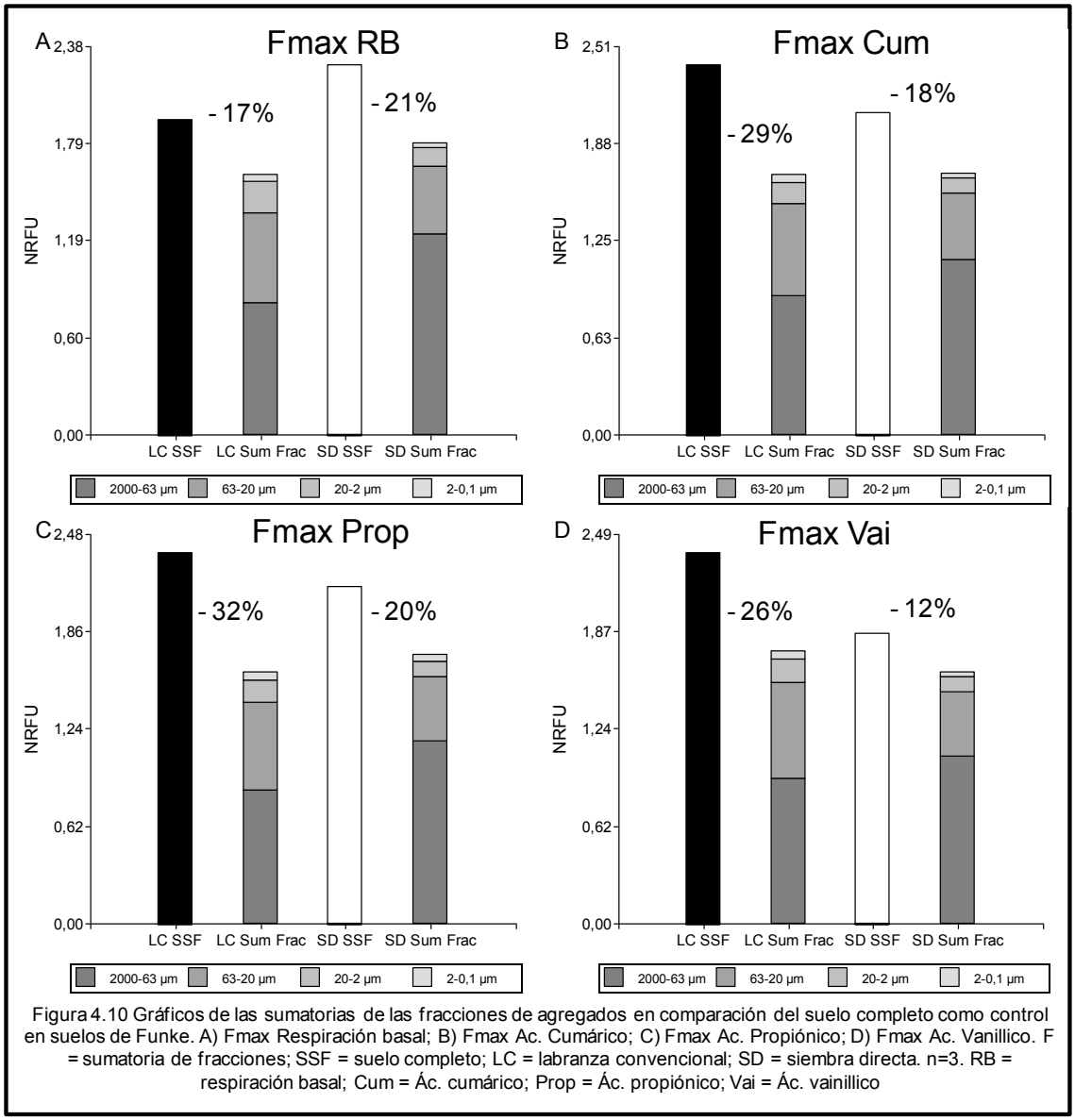

Figura 4.10 Gráficos de las sumatorias de las fracciones de agregados en comparación del suelo completo como control en suelos de Funke. A) Fmax Respiración basal; B) Fmax Ac. Cumárico; C) Fmax Ac. Propiónico; D) Fmax Ac. Vanillico. F = sumatoria de fracciones; SSF = suelo completo; LC = labranza convencional; SD = siembra directa. n=3. RB = respiración basal; Cum = Ác. cumárico; Prop = Ác. propiónico; Vai = Ác. vainillico

4.3.2) Resultados de los suelos de Las Matreras

Los ensayos realizados en esta tesis fueron realizados principalmente en los suelos agrícolas del Hogar Funke, en las cercanías de la ciudad de Torquinst. Debido a las particularidades de estos suelos entre las que se encuentra terreno sistematizado con curvas de nivel sin gradiente, una zona con lluvias escasas (< 800 mm de precipitaciones media anual) y erráticas lo cual hace al agua un factor limitante y suelo no tan ricos en términos de carbono y nitrógeno (Galantini et al., 2006), se decidió utilizar otro suelo con características diferentes con el objetivo de corroborar los

resultados obtenidos. Para ellos se utilizaron muestras de suelo obtenidas en el establecimiento agropecuario Las Matreras, ubicado en las cercanías de Irineo Portela. A continuación se describimos los resultados obtenidos en este sitio y la comparación con las muestras de Funke.

4.3.2.1) Análisis del suelo sin fraccionar.

Como hicimos en las muestras de Funke, comenzamos analizando el suelo sin fraccionar, tanto para el CLPP como para el perfil enzimático.

CLPP

Cuando analizamos el ACoP basado en el CLPP de las muestras de Las Matreras (Figura 4.7A) se observó que el CP1 explica el 44% de la varianza y el CP2 el 26,1% de la varianza. Vemos que al igual que sucede con las muestras de Funke, las muestras de las Matreras se agruparon de acuerdo a su manejo agrícola, las muestras de la SD se orientan hacia el lado positivo del CP1 en conjunto con el TMR de la respiración basal y los TMR con el agregado de los ácidos propiónico y vaníllico, y el Fmax con el agregado de ácido cumárico. Por otro lado, las muestras de la LC se agruparon hacia los valores negativos del CP1 con los mayores valores del Fmax de la respiración basal y el TMR con el agregado de ácido cumárico. Esta distribución a lo largo del CP1 es opuesta a la observada en el CLPP de las muestras de Funke.

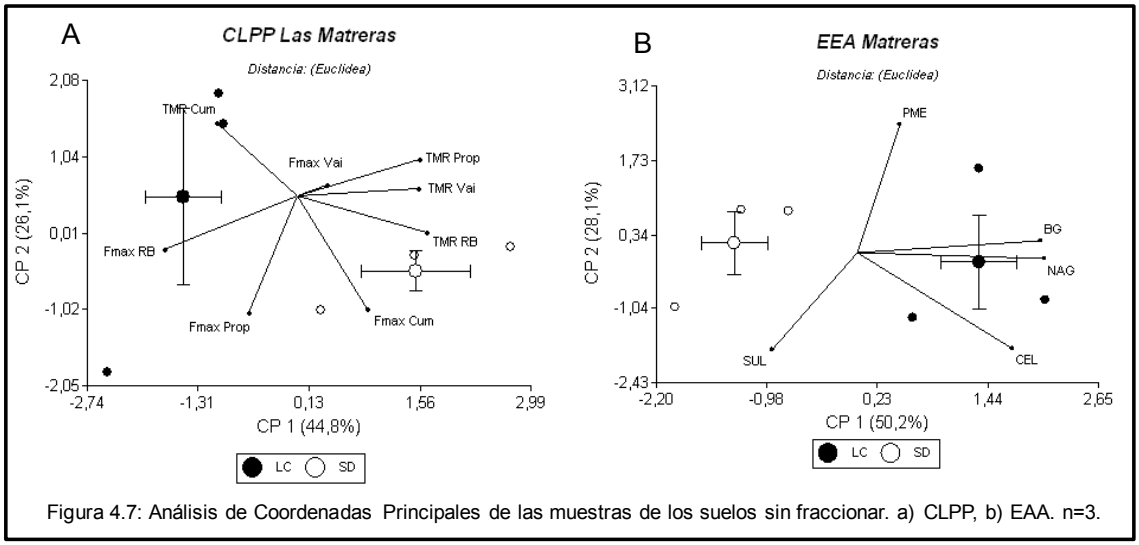

Figura 4.7: Análisis de Coordenadas Principales de las muestras de los suelos sin fraccionar. a) CLPP, b) EAA. n=3.

Perfil Enzimático

Cuando analizamos el ACoP basado en el perfil enzimático (Figura 4.7B) vimos que el CP1 explicó el 50% y el CP2 el 28,1% de la varianza. También, las muestras se agruparon por manejos agrícolas. Las muestras pertenecientes a la LC se agruparon hacia los valores positivos del CP1 con los mayores valores de las enzimas BG, NAG y CEL, en cambio, la muestras de la SD se orientaron hacia los valores negativos del CP1 con la SUL como enzima distintiva.

Con el fin de comparar las muestras de suelo de diferente origen se llevo a cabo un ANOVAM basado en los parámetros del CLPP y otro en la EAA del SSF (Tabla 4.6). Vimos que ambos sitios, Funke y Las Matreras, son considerados diferentes ($P < 0,05$) para ambos set de variables.

	Sitio	Fmax RB	Fmax Cum	Fmax Prop	Fmax Vai	TMR RB	TMR Cum	TMR Prop	TMR Vai	
CLPP	Funke	2,1	2,24	2,25	2,11	1,6	1,64	1,49	1,53	A
	Las Matreras	1,56	1,46	1,65	1,54	2,99	3,21	2,54	2,88	B
	Sitio	β-glicosidasa	N-acetil-glucosamina		Fosfomonoesterasa		Celobiohidrolasa		Sulfatasa	
EEA	Funke	49,86	7,06		209,31		5,77		0,93	A
	Las Matreras	26,34	87,69		594,36		29,59		6,17	B

Tabla 4.6: ANOVAM y Prueba de Hostelling ($P < 0,05$) basado en los parámetros del CLPP y del perfil enzimático.

Ya se ha demostrados en trabajos previos que el tipo de suelo es en un factor determinante de la actividad y la diversidad microbiana cuando se lo compara con los manejos agrícola (Girvan et al., 2003; Reeve et al., 2010). Los suelos con alto contenido de arcilla protegen mejor la biomasa microbiana (Six et al., 2006), forman más y mayor tamaño de macroagregados (Angers & Caron, 1998) y tienen una mayor capacidad de campo (Bailey et al., 2017). Las suelos arcillosos soportan generalmente comunidades microbianas de mayor tamaño que los suelos arenosos, que están dominadas por hongos (Bach & Hofmockel, 2015; Sessitsch et al., 2001).

Además, la LC de los suelos de Las Matreras tienen una historia que desconocemos. Solo sabemos que actualmente presentaban LC, por lo que una de las posibles razones de que la LC tenga una mayor actividad que la SD puede deberse a que previamente haya sido una SD.

4.3.2.2) Distribución de las fracciones de agregados

En comparación con las muestras de Funke, en los suelos de Las Matreras el fraccionamiento en húmedo mostró que las fracciones 2000-63 y 63-20 µm presentaron valores similares, rondando el 40% del total para cada fracción de

agregados, y siendo un 7% mayor las muestras de la SD en la fracción arenosa e iguales en la fracción limosa gruesa. En la fracción 20-2 µm, las muestras de la LC fue aproximadamente un 40% mayor a las muestras de la SD, presentando diferencias significativas (P = 0,0252). Y la fracción 2-0,1 µm presentó que las muestras de la SD fueron un 5% mayor a las muestras de la LC.

Trat.	2000-63 µm	63-20 µm	20-2 µm	2-0,1 µm	Recuperado
LC	34,3±2,3	40±5	16,6±1,8	7,1±1	98±15
SD	36,8±2,6	39,8±1,6	10±0,4	7,5±0,4	94±17

Tabla 4.7: Distribución de las fracciones de agregados de los suelos utilizados. Media Error Estándar. n=5. (%). Trat. = tratamiento; LC = labranza convencional; SD = siembra directa

Cuando comparamos entre ambos sitios vimos que en Funke la fracción de agregados que presentó la mayor proporción de agregados fue la fracción 2000-63 µm, en cambio, los suelos de Las Matreras mostraron que las fracciones 2000-63 y 63-20 µm presentan valores similares. Estos no estarían hablando que son suelos con texturas diferentes, siendo una textura más gruesa el suelo de Funke en comparación con el suelo de Las Matreras.

En trabajos previos donde se compararon diferentes manejos agrícolas se han encontrado que los estos pueden influenciar o no la distribución de fracciones de agregados. Por un lado, como ya vimos anteriormente en este capítulo algunos autores presentaron que los manejos agrícolas si influencian la distribución de fracciones de agregados (Helgason et al., 2010; Schutter and Dick, 2001; Zhang et al., 2016) como sucede en este trabajo para las muestras de Funke, donde si se encontraron diferencias significativas. Por el otro lado, otros estudios mostraron que no se presentan diferencias significativas en el fraccionamiento del suelo, como lo que sucede con las muestras de Las Matreras (Kandeler et al., 1999b; Lagomarsino et al., 2009). Esto puede deberse a que el suelo de Las Matreras tendrían una mayor proporción de agregados de menor tamaño que los suelos de Funke, y los agregados de menor tamaño se vuelven más estables frente a la ruptura producida por la labranza. Otra razón puede ser el contenido de agua de los suelos, ya que en un estudio en el cual se analiza la variación estacional de los agregados han observado que las muestras de suelo que contienen una mayor proporción de agua son más insensibles a los manejos agrícolas en comparación con muestras con un menor contenido de agua (Panettieri et al., 2015).

4.3.2.3) Cuantificación del ADN extraído

Cuando analizamos las extracciones de ADN de las muestras de Las Matreras vimos que se presentaron los mayores valores en la fracción de agregados 20-2 µm para ambos manejos agrícolas (Tabla 4.8).

Trat.	2000-63 µm	63-20 µm	20-2 µm	2-0,1 µm	SSF
LC	28,6±5,9	28,8±7,5	29,1±5,7	28,3±3,7	29,9±4,5
SD	24,3±6,6	20,6±3,8	29,43±4,7	25,53±1,7	32±8

Tabla 4.8: Cantidad de ADN extraído de cada fracción de agregados. Media Error Estándar. n=5. (µg ADN/g Fracción). Trat. = tratamiento; LC = labranza convencional; SD = siembra directa

Se presentaron mayores valores en las muestras de la LC para las fracciones de agregados 2000-63 (+15%), 63-20 (+30%) y 2-0,1 µm (+18%) y valores similares en la fracción 20-2 µm. El SSF mostró que las muestras de la SD presentaron valores, un 7% mayor.

Cuando comparamos entre sitios vimos que las extracciones de ADN presentaron diferencias significativas entre los sitios agrícolas ($P < 0,0001$), mostrando una mayor abundancia en las muestras de Las Matreras.

Cuando comparamos entre lo recuperado en el SSF y la sumatoria de las fracciones vimos que se presentan valores de recuperación muy similares, con excepción de la SD de Las Matreras que mostró una disminución del 42% respecto al SSF. Cuando analizamos lo que representa en el suelo sin fraccionar el ADN extraído en cada fracción de agregados vimos que en Las Matreras para las muestras de la SD la fracción que más aporta es la fracción 2000-63 µm, al igual que sucede en Funke. En cambio, en las muestras de la LC, la fracción de agregados que más aporta fue la fracción 63-20 µm, seguido por la fracción 2000-63 µm y finalmente las de menor tamaño.

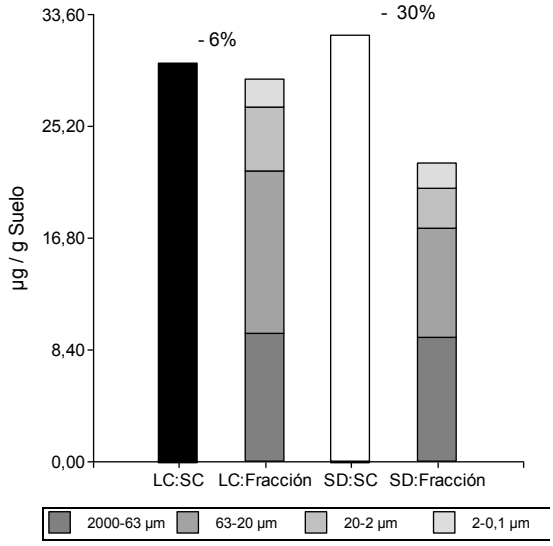

Figura 4.8: Gráfico que muestra la sumatoria de las fracciones de agregados relativizado a su contribución en el suelo total (Sum Frac) en comparación con el suelo sin fraccionar. (µg ADN/g Suelo). n=3. El numero arriba de las columnas muestra la diferencia entre el suelo sin fraccionar y la sumatoria de las fracciones. LC = labranza convencional; SD = siembra directa.

4.3.2.4) Cuantificación de los grupos microbianos principales.

Cuando analizamos la abundancia relativa de las bacterias y los hongos cuantificados por medio de qPCR, vimos que en las muestras de las Matreras la mayor abundancia relativa de las bacterias se presentó en la fracción de agregados 20-2 µm para la LC y en la fracción 2-0,1 µm para la SD. Por otro lado en todas las fracciones de agregados y en la SSF, la SD presento mayores valores que la LC. Constancias et al., (2014) mostró un patrón similar de la abundancia relativa de las bacterias a las observadas en los tratamientos agrícolas de Las Matreras, donde se presentaron la mayor abundancia relativa en la SD en la fracción de agregados 2-0,1 µm y en cambio, en la LC se presentan en la fracción de agregados 20-2 µm. Observamos no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, ni entre las fracciones de agregados ($P > 0,05$), algo que ya habíamos observado en las muestras de Funke.

Cuando analizamos la abundancia relativa de los hongos vimos que para las muestras de la LC, las mayores abundancias se presentaron en la fracción 63-20 µm y para las muestras de la SD en la fracción 2000-63 µm. Cuando comparamos entre manejos agrícolas vimos que la SD presenta mayores abundancias relativas en las fracciones 2000-63 y en 2-0,1 µm, no así para las fracciones restantes 63-20 y 20-2 µm, y ni en el SSF. Cuando observamos la relación hongos/bacterias vimos en la SD sigue una tendencia que disminuye con la disminución del tamaño de las fracciones de agregados, al igual que en Funke. En cambio, en las muestras de la LC la relación tiene valores muy altos y no presenta ninguna tendencia.

Cuantificación	Trat.	2000-63 µm	63-20 µm	20-2 µm	2-0,1 µm	SSF	% recup
Bacterias	LC	6,37	6,32	17,70	5,39	5,95	135
	SD	28,80	28,75	30,70	138,00	34,50	103
Hongos	LC	3,26	3,37	3,14	2,56	3,16	100
	SD	3,08	2,48	2,23	2,73	2,85	89
Relación H/B	LC	0,51	0,53	0,18	0,47	0,53	
	SD	0,11	0,09	0,07	0,02	0,08	

Tabla 4.9: Abundancias relativas bacterias y hongos para cada tratamiento, y la relación H/B. SSF: Suelos sin fraccionar n=3. (nº Copias. $x10^8$ / g Fracción). %recup = porcentaje de recuperación de cada fracción de agregados respecto a lo que contribuye en el SSF. Trat = tratamiento; H/B = hongos/bacterias SSF = suelo sin fraccionar; LC = labranza convencional; SD = siembra directa

Cuando comparamos entre los sitios agrícolas vimos que Las Matreras presenta mayores abundancias tanto para bacterias como para hongos. Además observamos que para ambos sitios y manejos, con la excepción de los hongos en las muestras de la LC de Las Matreras, las mayores abundancias se presentan en las fracciones más pequeñas, menores a 20 µm. Las muestras de Las Matreras posiblemente presenten una mayor humedad del suelo que intervendría en los valores de las abundancias

relativas de las fracciones de agregados observadas, que estimula el crecimiento microbiano (Jiang et al., 2011b).

4.3.2.5) Análisis de las actividades de las enzimas extracelulares (EEA).

Cuando se analizó la actividad de las enzimas extracelulares en las muestras de Las Matreras (Tabla 4.10) se observo que el SSF de las muestras de la LC presentó mayores actividades de las enzimas BG, NAG, PME y CEL, en cambio la SD presento una actividad enzimática mayor en la SUL. Esto se encuentra en oposición a lo observado en las muestras de Funke, donde los mayores valores enzimáticos se presentaban en la SD.

Cuando analizamos la distribución de las fracciones de agregados de las muestras de la SD vimos que los valores máximos de las cinco actividades enzimáticas fue en la fracción de mayor tamaño, 2000-63 µm. Y que al igual que sucede en Funke la actividad enzimática disminuye cuando lo hace el tamaño de fracción de agregados. Con excepción de la SUL que al igual que en Funke presenta un patrón diferente y crece con la disminución de las fracciones de agregados.

Cuando analizamos la distribución de las actividades enzimáticas en las fracciones de agregados de las muestras de la LC mostraron que la BG, la NAG y la PME fueron mayores en la fracción de agregados 20-2 µm, La actividad de la CEL fue mayor en la fracción de agregados 2000-63 µm. Finalmente la SUL mostró que para las muestras de la LC la mayor actividad enzimática se presento en la fracción 2-0,1 µm, Los resultados observados en la actividad de las enzimas extracelulares a nivel de las fracciones de agregados, principalmente para BG, NAG y PME, se encuentra en plena concordancia con lo observado en Funke.

Trat.	Fracción de agregados	β-glicosidasa	N-acetil-glucosamina	Fosfatasa	Celo-biohidrolasa	Sulfatasa
LC	SSF	31,6±2,2	155,7±30	607,9±67	32,3±2,1	5,14±0,3
	2000-63	259,9±91	60,9±18	856±404	46,3±3	6±2,2
	63-20	206,7±43	41,9±16	533,7±231	39,6±13	2,6±1,4
	20-2	352,5±107	67,2±22	1726±589	43,7±11	7,88±1
	2-0,1	79,6±16	19,1±3,2	785±400	6,8±2,7	17,6±5
SD	SSF	21,1±3,7	19,7±4,2	580,8±20	26,8±3,1	7,2±1,1
	2000-63	351,9±64	63,2±14	905,5±228	47,0±13	12,9±2,8
	63-20	210,7±22	38±1	687,8±105	29,25±10	5,6±2,8
	20-2	137,8±22	27,4±3,4	680,2±198	16,1±3,8	11±3,1
	2-0,1	61±20	15,4±3,7	509,2±379	3,2±0,5	12,8±7

Tabla 4.10: actividad de las enzimas extracelulares para cada sitio, tratamiento y fracción de agregados. Media Error Estándar. n=3.

Cuando analizamos el ACoP de la información obtenida a partir de los perfiles enzimáticos para las muestras de Las Matreras (Figura 4.9), vimos que el CP1 explicó el 47% y el CP2 cerca del 33% de la varianza. Clasificados por tratamientos y fracciones de agregados, vimos que las muestras no demuestran una separación tan clara por tratamiento como lo hacen las muestras de Funke, pero tenderían a agruparse por tratamiento. Sin embargo algunas fracciones de agregados de distinto tratamiento quedaron muy cerca entre sí como los son 63-20 y 2000-63 µm. Además vimos que la fracción de agregados 2-0,1 µm tiende a separarse del resto de las fracciones de agregados en ambos sitios. Las actividades enzimáticas graficadas vemos que BG, NAG y PME se orientan hacia la fracciones de agregados 2-0,1 µm, y en parte también hacia la muestra de la fracciones de agregados 20-2 µm perteneciente a la SD.

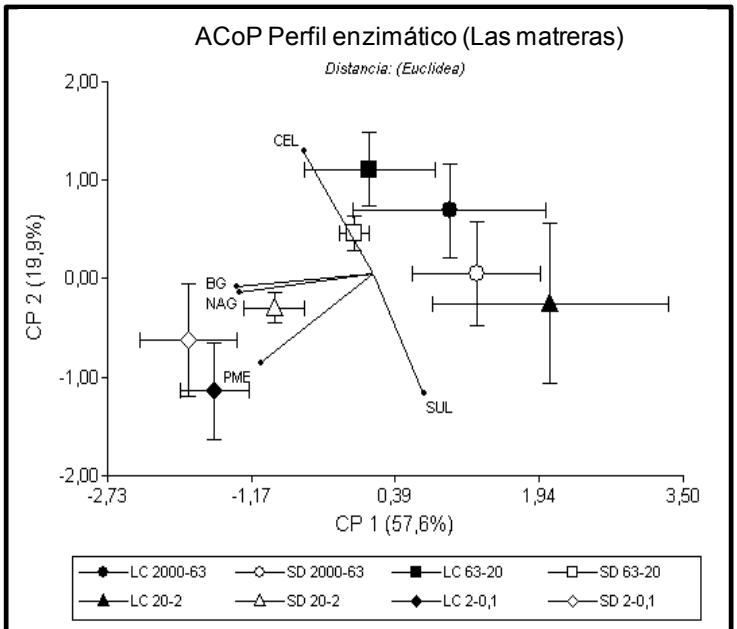

Figura 4.9: Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) basado en el perfil enzimático para los sitios de Las Matreras. n=3. LC = labranza convencional; SD = siembra directa CEL= β-cellobiohidrolasa; NAG = N-acetil-β-glucosaminidasa; BG = β-glucosidasa, PME = fosfomonoesterasa; SUL = sulfatasa.

Actividad relativa enzimática

La actividad relativa refleja el porcentaje de contribución de cada fracción de agregados a la actividad total del suelo sin fraccionar. Considerando las proporciones de cada fracción de agregados, el valor de la actividad de la enzima extracelular absoluta en la misma y en el suelo completo sin fraccionar, se pudo calcular el porcentaje de contribución (Figura 4.10) de cada fracción al suelo total. La sumatoria de las actividades relativas de las fracciones de agregado produjo un aumento en la actividad de las enzimas con respecto a suelo sin fraccionar en la SD de 236% (al igual que en Funke) y en las muestras de la LC fue de un 177%.

En términos de contribución de cada fracción de agregados al suelo total para las muestras de Las Matreras, la fracción 2000-63 µm aportó cerca del 45% de la

actividad enzimática, a su vez la fracción 63-20 µm aportó el 30%. Por últimos, el aporte de las fracciones 20-2 y 2-0,1 µm fue del 15% y 8%, respectivamente.

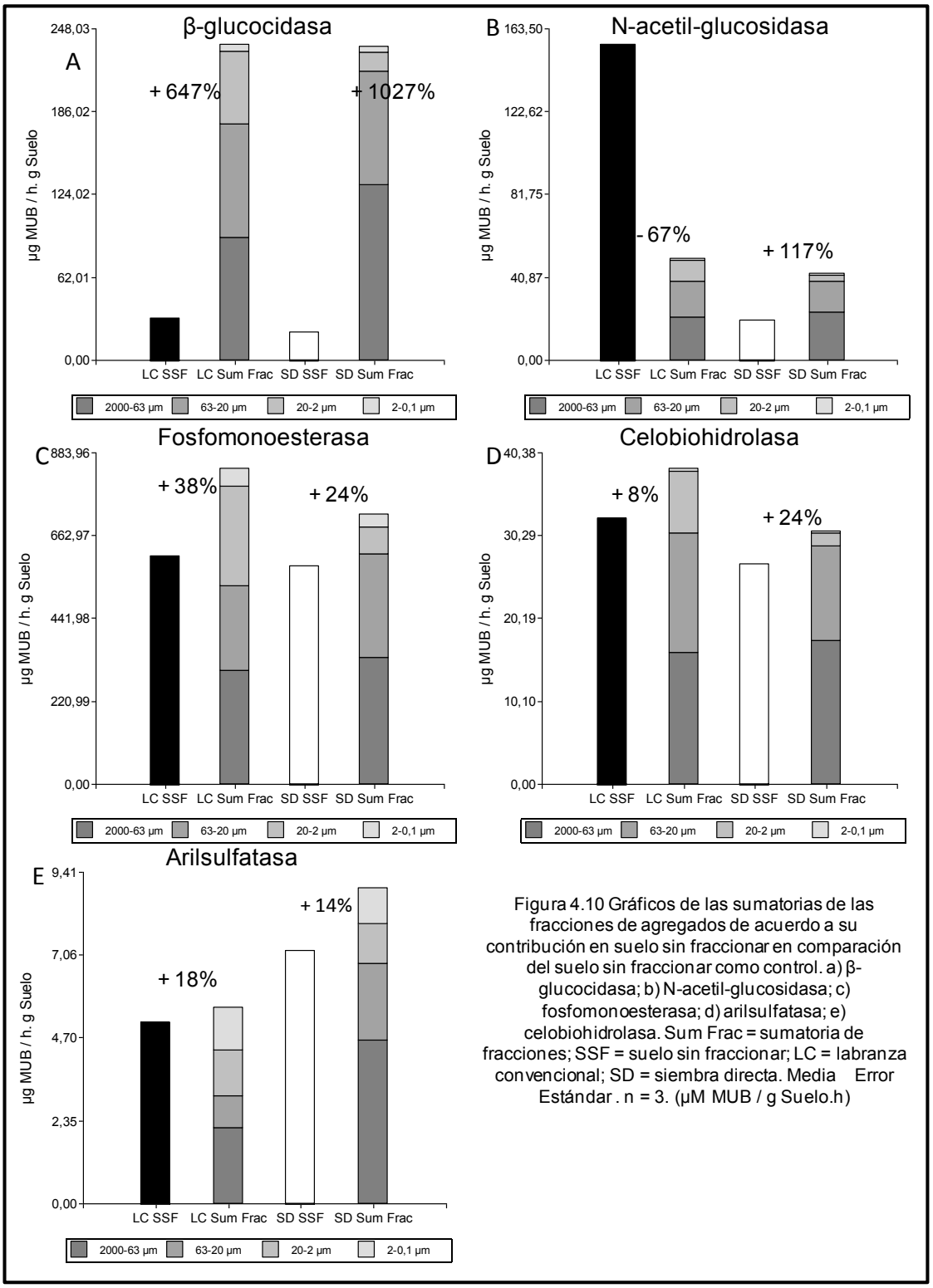

Figura 4.10 Gráficos de las sumatorias de las fracciones de agregados de acuerdo a su contribución en suelo sin fraccionar en comparación del suelo sin fraccionar como control. a) β-glucocidasa; b) N-acetil-glucosidasa; c) fosfomonoesterasa; d) arilsulfatasa; e) celobiohidrolasa. Sum Frac = sumatoria de fracciones; SSF = suelo sin fraccionar; LC = labranza convencional; SD = siembra directa. Media Error Estándar . n = 3. (µM MUB / g Suelo.h)

4.3.2.6) Análisis de las comunidades fisiológicas a nivel de comunidades (CLPP)

Los análisis de los perfiles fisiológicos a nivel de comunidades (CLPP) fueron realizados en las muestras de Las Matreras en primera forma a través del ANOVAM por condición de carbono. Aquí sucede lo mismo que con las muestras de Funke, donde no se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos para ninguna fracción de agregados.

Trat.	Fracción de agregados	Fmax RB	Fmax Cum	Fmax Prop	Fmax Vai	TMR RB	TMR Cum	TMR Prop	TMR Vai
LC	SSF	1,72±0,15	1,34±0,1	1,64±0,17	1,52±0,01	2,28±0,15	4±0,76	2,33±0,2	2,72±0,05
	2000-63	2,9±0,3	3,04±0,17	3,01±0,2	2,97±0,26	1,48±0,06	1,56±0,03	1,5±0,05	1,7±0,13
	63-20	1,6±0,05	1,71±0,04	1,58±0,02	1,74±0,01	1,86±0,07	1,84±0,1	2,53±0,1	2,1±0,01
	20-2	2,61±0,12	2,75±0,1	2,2±0,1	2,94±0,04	1,33±0	1,42±0	1,6±0,1	1,45±0,03
	2-0,1	2,36±0,3	2,17±0,25	2,23±0,3	2,44±0,3	2,22±0,5	2,76±0,7	3,03±0,35	2,45±0,3
SD	SSF	1,4±0,06	1,57±0,03	1,66±0,05	1,55±0,05	3,7±0,6	2,42±0,1	2,75±0,05	3,03±0,24
	2000-63	2,31±0,23	2,85±0,33	2,52±0,03	2,9±0,2	1,78±0,2	1,61±0,1	1,6±0,1	1,6±0,05
	63-20	1,61±0,14	1,68±0,1	1,55±0,06	1,67±0,08	1,89±0,24	2±0,1	2±0,2	1,92±0,13
	20-2	2,13±0,23	2,19±0,32	2,05±0,2	2,03±0,3	1,36±0,03	1,5±0	1,5±0,1	1,56±0,07
	2-0,1	2,6±0,5	2,66±0,3	2,7±0,3	2,53±0,27	1,78±0,22	1,9±0,2	1,9±0,35	1,92±0,2

Tabla 4.11: actividad de los parámetros del CLPP en Las Matreras para cada tratamiento y fracciones de agregados. Media Error Estándar. n=3.

Al igual que sucedió en Funke, cuando observamos las muestras de Las Matreras, los parámetros de manera individual vimos que las muestras de la LC presentaron los mayores valores de Fmax en la fracción 20-2 µm (con excepción del parámetro Fmax Vai que encontraron en la fracción 2000-63 µm). A su vez, en las muestras de la SD la mayor actividad respiratoria se presentó en la fracción más pequeña, la fracción de agregados 2-0,1 µm para todas condiciones de carbono. En cambio, los parámetros TRM presentaron los mayores valores para la fracción de agregados 2-0,1 µm para las muestras de los dos tratamientos y todas las condiciones de carbono. Cuando comparamos con los parámetros de las muestras de Las Matreras con las muestras de Funke vimos que los valores máximos de Fmax y TMR siguen el mismo patrón, siendo mayores en las fracciones de agregados menores a 20 µm.

Cuando analizamos los ACoP de la información obtenida a partir de los CLPP para las muestras de Las Matreras (Figura 4.11), vimos que el CP1 explicó el 61,6% y el CP2 cerca del 23.8% de la varianza. Clasificados por tratamientos y fracciones de agregados, vimos que las muestras tienden a separarse por tamaño de fracción de agregados en menor medida de lo que sucede en Funke, y solo la fracción 2-0,1 µm perteneciente a la LC se separa del resto. Cuando analizamos los parámetros vemos que los Fmax se asocian con las fracciones más grandes (2000-63 µm) y con la fracción 2-0,1 µm de la SD. En cambio, los TMR se asocian con la fracción de agregados 2-0,1 µm de la LC.

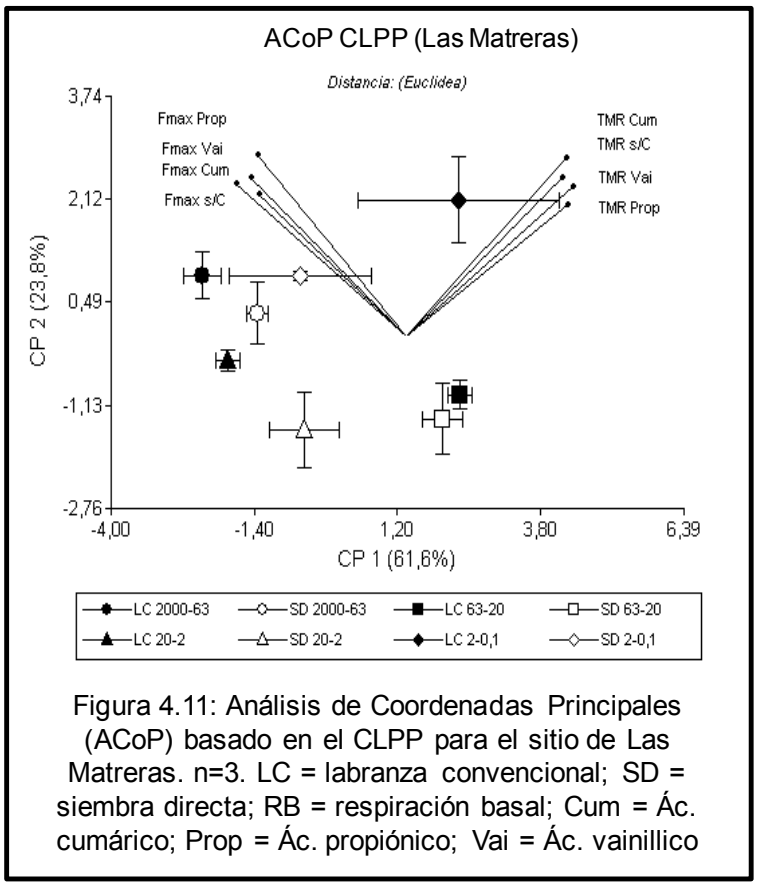

Figura 4.11: Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) basado en el CLPP para el sitio de Las Matreras. n=3. LC = labranza convencional; SD = siembra directa; RB = respiración basal; Cum = Ác. cumárico; Prop = Ác. propiónico; Vai = Ác. vainillico

Actividad relativa del Fmax

Cuando analizamos la actividad relativa del Fmax de cada fracción de agregados (Figura 4.12) vimos que en las muestras de Las Matreras la sumatoria de las fracciones de agregados dio como resultado un incremento respecto al suelo sin fraccionar del 48% y 31% en la LC y SD, respectivamente. Y al igual que en Funke, la contribución de cada fracción de agregados al suelo sin fraccionar disminuye con el tamaño de fracción de agregados.

En Las Matreras se observó que la fracción de agregados 2000-63 µm aportó 45% y 49% de la actividad relativa en las muestras de la LC y la SD, respectivamente. Por otro lado la contribución de la fracción de agregados 63-20 µm fue del 29% en las muestras de la LC y del 32% en las muestras de la SD. En la fracción 20-2 µm fue del 18,5% en las muestras de la LC y del 11% en las muestras de la SD. Finalmente en la fracción de agregados 2-0,1 µm estuvo entre el 7,5 y el 9,5% para ambos manejos agrícolas.

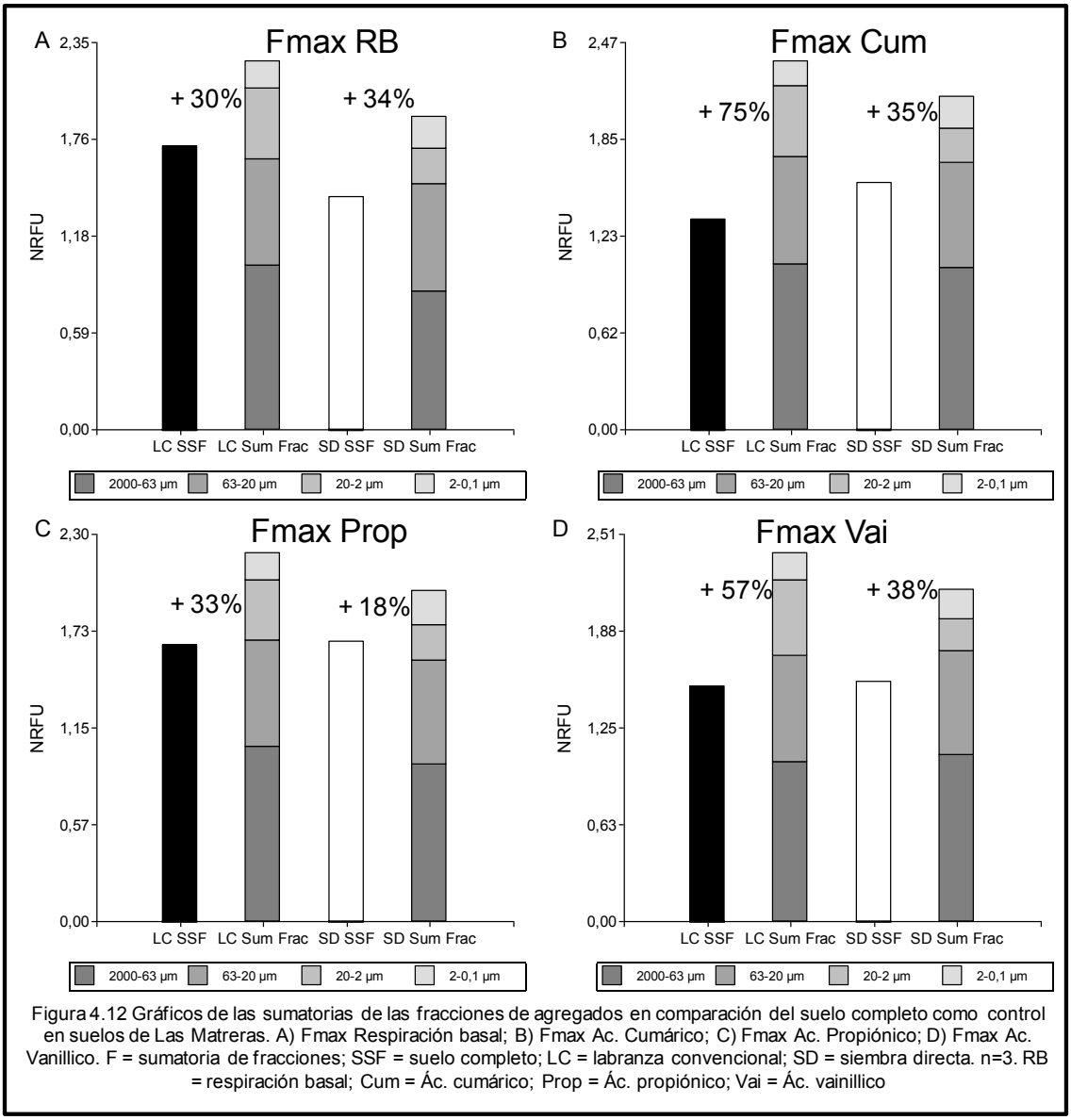

Figura 4.12 Gráficos de las sumatorias de las fracciones de agregados en comparación del suelo completo como control en suelos de Las Matreras. A) Fmax Respiración basal; B) Fmax Ac. Cumárico; C) Fmax Ac. Propiónico; D) Fmax Ac. Vanillico. F = sumatoria de fracciones; SSF = suelo completo; LC = labranza convencional; SD = siembra directa. n=3. RB = respiración basal; Cum = Ác. cumárico; Prop = Ác. propiónico; Vai = Ác. vainillico

4.4) Conclusiones

Los manejos agrícolas como la labranza modifican la estructura física del suelo así como también la distribución de la materia orgánica. En este capítulo se analizó como afectan los manejos a cada fracción de agregados, medido principalmente por análisis bioquímicos. Comenzamos mostrando y comparando que sucede en el suelo sin fraccionar como punto de partida. Donde observamos que **los dos sistemas de labranzas presentan diferentes perfiles enzimáticos y CLPP**.

Cuando comenzamos a ver qué sucede en el suelo a niveles de las fracciones de agregados y **analizamos los CLPP por medio del ACoP vimos que cada fracción de agregados presentó un perfil que se diferencia de las otras fracciones de agregados, principalmente para las muestras de Funke**. Tanto para la LC como para la SD, la respiración fue mayor en las fracciones más pequeñas, menores a 20 µm. Esto probablemente es debido a que las partículas pequeñas ofrecen una mayor protección física para los microbios (Lagomarsino et al., 2012; Sessitsch et al., 2001). Además estos valores concordaron con las mayores abundancias relativas de hongos y bacterias medidas por qPCR que encontramos en las fracciones menores a 20 µm. A su vez podemos decir que la proporción de hongos disminuye desde las fracciones más grandes hacia las más chicas.

Cuando observamos **las EEA del suelo vimos que se encuentran distribuidas de manera heterogénea en las fracciones de agregados de acuerdo a su manejo agrícola**, siendo en las muestras de la SD mayores en los agregados más grandes y disminuyendo a medida que lo hacían el tamaño de las fracciones de agregados. Esto sucedió principalmente con las actividades de las enzimas BG, NAG y PME. Por otro lado, en las muestras donde se practica la LC la actividad enzimática máxima se encontró en las fracciones de agregados de menor tamaño (20-2 µm) o en caso que no sea así, se presentaron valores altos y similares en las tres fracciones de agregados de mayor tamaño (2000-63, 63-20 y 20-2 µm). Probablemente, los sustratos necesarios para la actividad de las enzimas extracelulares en las muestras de la LC se estarían distribuyendo en todas las fracciones de agregados a lo largo de todo el perfil de suelo, el cual sufre la ruptura y la homogenización por medio de la labranza. En cambio, los sustratos de las enzimas extracelulares en las muestras de la SD se encuentran disponibles primero en los agregados de mayor tamaño, y su disponibilidad iría disminuyendo hacia los de menor tamaño. Algo que varios autores han descripto (Allison and Jastrow, 2006; Nicolás et al., 2012; Poll et al., 2003). Esto sucede para las muestras de ambos sitios a pesar de que la actividad enzimática de

los suelos sin fraccionar se comportan de manera diferentes en cada sitio agrícola, siendo mayor la actividad de las muestras de la SD en comparación con la LC para las muestras de Funke y en cambio en Las Matreras sucede lo opuesto.

Cuando comparamos entre sitios, observamos que a pesar de que la comparación entre las muestras de suelo sin fraccionar de Funke y de Las Matreras mostró que los sitios son diferentes, **los resultados hallados en las fracciones de agregados en Funke son corroborados en las fracciones de Las Matreras**. Tanto para la EEA como para los CLPP y las abundancias relativas de los hongos y bacterias.

Los resultados observados en este capítulo confirman lo que insinuaban las observaciones del capítulo 3, donde las actividades enzimáticas correlacionaban con la cantidad de agregados con un tamaño mayor a 105 µm y el carbono de la biomasa microbiana con las fracciones menores a 63 µm.

Finalmente, las mediciones bioquímicas permiten caracterizar los suelos a nivel de fracciones de agregados, y de esta manera comenzar a comprender como ser organiza el funcionamiento del suelo a partir de sus componentes.

Capítulo 5

Dinámica de cambio de los manejos agrícolas a nivel de las fracciones de agregados

5.1) Introducción.

El suelo provee un ambiente heterogéneo para los microorganismos, con una distribución no uniforme de la materia orgánica, el nitrógeno y otros substratos (Six et al., 2000). Las partículas del suelo determinan el tipo de suelo y afectan la agregación del suelo, y con ello la distribución de los nutrientes y el agua (Stemmer et al., 1998a). La dinámica de las fracciones de agregados juega un rol vital en el mantenimiento de la calidad del suelo debido a la protección física de la materia orgánica, regula los procesos de adsorción/desorción de los nutrientes, limita la difusión del oxígeno, y reduce la erosión (Dai et al., 2017). Como ya hemos visto en los capítulos anteriores, los manejos agrícolas, como la siembra directa (SD) y la labranza convencional (LC), modifican físicamente al suelo al modificar las dinámica de las fracciones de agregados (Kandeler et al., 1999) y químicamente al modificar las disponibilidades de los nutrientes. Los manejos agrícolas son también definidos por la cantidad de residuos dejados en el suelo por los cultivos posteriores a que estos fueron cosechados (Sengupta & Dick, 2015). Se observado que estas modificaciones físicas se expresan también como modificaciones en las prestaciones funcionales bioquímicas. Las prestaciones funcionales del suelo están en consecuencia determinadas, en gran medida, por su estructura, la cual se cree que es un factor determinante de la regulación de la descomposición microbiana del carbono (Mummey et al., 2006). El carbono puede ser protegido y absorbido en los macroagregados y partículas arcillosas del suelo, lo cual favorece su secuestro y lo vuelve inaccesible para que sea degradado por los microbios y las enzimas extracelulares (Schimel & Schaeffer, 2015). Consecuentemente, el secuestro del carbono modifica la distribución de las comunidades microbianas del suelo y su actividad en las diferentes fracciones de agregados del suelo.

Cuando el suelo se maneja con LC, los residuos son incorporados cada año al suelo y el área de contacto del suelo con la materia orgánica se incrementa. Esto lleva a que los residuos se descompongan a una tasa más alta en la capa superior del suelo y lo podría resultar en una disminución de los nutrientes almacenados en los microagregados. Lo que afecta el crecimiento y la supervivencia de las comunidades bacterianas que requieren fuentes de energía suficientes para producir componentes extracelulares actuando como agente unificador del suelo (Caesar-Tonthat, 2002).Estas cuestiones estarían al menos parcialmente controladas en un manejo del suelo en SD, sin labranza.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La conservación y un mejor aprovechamiento del suelo por medio de las estrategias de manejo agrícola se aprovecharían con el conocimiento de las comunidades microbianas del suelo para incluirlas en las estrategias de manejo de las prestaciones funcionales del suelo (Ettema & Wardle, 2002). A pequeña escala como esta, la estructura de las comunidades microbianas es un factor dominante en el control de los procesos ecológicos, pero a medida que nos movemos hacia escalas mayores en los ecosistemas y estos se integran a través de muchas comunidades diferentes, y la influencia de las estructuras microbianas individuales disminuye (Schimel & Schaeffer, 2015). Comprender como los tratamientos agrícolas afectan la distribución de los grupos microbianos y sus funciones entre las fracciones de agregados llevara a un mejor entendimiento de los procesos microbianos incluyendo el secuestro de C en el suelo y el ciclado de los nutrientes.

En este capítulo analizamos los cambios de tratamientos desde la LC hacia la SD (N-SD) y desde la SD a la LC (N-LC) desde el punto de vista de las fracciones de agregados para las muestras recolectadas a los 30 meses posteriores al cambio de manejos agrícolas (Diciembre 2015). Las fracciones de agregados fueron separadas por medio un tamizado en húmedo y posteriormente se caracterizaron bioquímicamente (EEA, CLPP) y molecularmente a nivel de las comunidades microbianas del suelo (qPCR).

Objetivos de este capítulo: identificar la respuesta a los cambios de manejos agrícolas en la estructura y función de las comunidades microbianas del suelo a nivel de fracciones de agregados.

Hipótesis: a) Las características bioquímicas a nivel de fracciones de agregados serían propias del tamaño de agregado y no diferenciarían los manejos agrícolas nuevos entre sí y de los respectivos controles.

b) Los grupos bacterianos en los suelos con cambio de manejo se asemejaran a la situación control correspondiente al nuevo manejo y no a la situación control del manejo histórico previo al cambio.

5.2) Materiales y métodos

5.2.1) Descripción del sitio

Para este estudio se tomaron muestras en el mismo establecimiento del cual se tomaron las muestras que se utilizaron en los capítulos 3 y 4, el Hogar Funke. El sitio de muestreo está localizado en el partido de Tornquist, Provincia de Buenos Aires, Argentina (38°09′S 61°57′O). El suelo es Argiudoll Típico y es representativo de región pampeana central-sudeste semiárida. El clima es una temperatura continental semiárida. La temperatura anual promedio y las precipitaciones son 15ºC y 799 mm, respectivamente Algunos datos químicos de los tratamientos del suelo sin fraccionar se muestran en el capítulo 3.

Como se describió anteriormente, el experimento fue establecido en 1986 en dos parcelas de 8 has, una al lado de la otra. Donde se realizaron dos sistemas de labranza: siembra directa (SD) y la labranza convencional (LC). La LC fue llevada adelante utilizando cincel y rastra de disco con una profundidad de 7-20 cm.

Sobre la base del ensayo de más de 30 años de antigüedad, se realizó un cruzamiento de manejos de laboreo del suelo. En junio del 2013 se subdividieron una parte de las parcelas originales y a partir de ese momento se realizaron los manejos agrícolas en forma cruzada, manteniendo un amplio sector con la labranza original como control, es decir, la parcela de la siembra directa queda subdividida en un sector que continuó en siembra directa (SD) y otro sector que se convirtió en un nuevo tratamiento de labranza convencional (N-LC). El mismo tipo de cambio se realizó en la parcela de labranza convencional original, donde queda divida en la labranza convencional y en una franja donde se realiza la nueva siembra directa (N-SD).

Las muestras fueron recolectadas de los primeros cinco centímetros de suelo (0-5 cm) en diciembre de 2015. Las muestras fueron tomadas por quintuplicado para cada tratamiento en un área de 5 m^2. Para cada muestra se tomaron 25 piques de barreno, de 2 cm de diámetro, que fueron mezclados en una bolsa y mezcladas para formar la muestra compuesta. La muestra fue llevada al laboratorio en una heladera enfriada para preserva la humedad y las condiciones al momento de la recolección, donde una parte de la muestra fue almacenada en heladera a 4º C y la otra fue secada a 40º C.

5.2.2) Fraccionamiento del suelo.

El procedimiento es descripto por Amelung et al., (1986) y modificado posteriormente por Neumann et al., (2013), donde se separa el suelo en cinco fracciones de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

agregados (ej., 2000-250, 250-63, 63-20, 20-2, 2-0,1 µm). Brevemente, un total de 20 g de suelo seco se suspende en agua desionizada (suelo/agua: 1:5 p/v) y se ultrasónica con una energía de 30 J/mL. El sonicado fue llevado a cabo por medio de un ultrasonicador de baño "UltrasonicCleaner" (Testlab S.R.L., Quilmes, Argentina). La fracciones 2000-250 y 250-63 µm fueron separadas del resto de las fracciones por medio del tamizado en húmedo. El líquido pasante arrastraba todas las partículas menores a 63 µm fue distribuido en cuatro tubos de 50 ml y centrifugado a 50 g durante 15 min a 4 ºC. (Centrifuga Refrigerada Multi-RF; Thermo Fischer Scientific, Waltham, E.E.U.U.). Para separar las fracción de 2-0,1 µm (arcillas) de la fracción 63-2 µm (limosa), el sobrenadante de la centrifugación conteniendo la fracción 2-0,1 µm fue decantado en un vaso de precipitado, y este precipitado fue re-suspendido en agua desionizada y vuelto a centrifugar. La pasos de centrifugación y re-suspendido del precipitado fueron repetidos siete veces más con tiempos decrecientes de centrifugación, 15, 13, 12 y 11 min por duplicado, respectivamente, siguiendo el protocolo de bibliografía. Posterior a la última re-suspensión, el precipitado fue tamizado en húmedo con un tamiz de 20 µm, separando la fracción 20-2 µm (limosa fina) de la fracción 63-20 µm (limosa gruesa). Para aumenta la floculación de las partículas menores a 2 µm presente en la sumatoria de los volúmenes de sobrenadante previamente separados, se agregó $MgCl_2$ (con una concentración final de 3.3 mM) a los vaso de precipitados y se incubo a 4º C durante 16 h. Posteriormente a la decantación, las partículas menores a 2 µm fueron concentradas por medio de la centrifugación durante 10 min a 2400 g. Todas las fracciones fueron secadas a 40º C y almacenadas a 4º C en heladera hasta su uso.

De este modo, las fracciones de agregados quedaron determinadas: 2000-250 µm (fracción arena gruesa), 250-63 µm (fracción arena fina), 63-20 µm (fracción Limo grueso), 20-2 µm (fracción Limo fino) y 2-0,1 µm (fracción arcillosa).

5.2.3) Extracción de ADN.

EL ADN microbiano del suelo fue extraído y purificado desde las muestras de suelo (0,25 g) usando el kit de extracción ZR Soil Microbe DNA MiniPrep ™ (Zymo Research Corporation, E.E.U.U.) de acuerdo al protocolo de extracción del fabricante. La cantidad y la calidad (por medio de las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 230/260 nm) de ADN extraído se determinó por medio de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, E.E.U.U.).

5.2.4) Cuantificación de grupos y filos microbianos por qPCR

Para determinar la abundancia relativa de las copias del de la subunidad pequeña del gen ribosomal (16S o 18S) del ARN de los grupos microbianos, los mismos fueron cuantificados usando el método descripto por Fierer et al., (2005). Los pares de oligonucleótidos utilizados en cada reacción de qPCR se encuentra listados en la tabla 5.1, y fueron tomados como referencia del trabajo nombrado anteriormente, Fierer et al., (2005) con excepción de los oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de las Arqueas, que fueron tomados como referencia del trabajo realizado por Wessen y colaboradores (Wessén et al., 2010). Para estimar la abundancia de los genes ribosomales del ARN, se generaron curvas patrón usando diluciones seriadas de un numero de copias conocidas por gramo de ADN extraído de *Pseudomona protegens CHAØ o de Fusarium oxysporum,* para las bacterias y los hongos. Por otro lado, se generaron construcciones de plásmidos con la subunidad ribosomal 16S insertado en un plásmido PUC19 de los filos bacterianos y las arqueas para calibrar las qPCR de estos grupos. El número de copias de cada gen fue generado a partir de una regresión lineal usando el valor del ciclo umbral (Ct) para conocer el número de copias para cada ensayo por medio del programa Lin-RegPCR (Ruijter et al., 2015). Se calculó el número de copias por gramos de fracciones de agregados (nº Copias / g fracción de agregados).

Dominio	Grupo analizado	Secuencia cebador (5′-3′)	Nombre del oligonucleotido	Temperatua Anealing (º C)
Bacteria	Todos los grupos	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	Eub338	53
	Todos los grupos	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Eub518	60
	α-Proteobacteria	TCT ACG RAT TTC ACC YCT AC	Alf685	60
	β-Proteobacteria	TCA CTG CTA CAC GYG	Bet680	60
	Actinobacteria	CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG	Actino235	60
	Firmicutes	GCA GTA GGG AAT CTT CCG	Lgc353	60
	Acidobacteria	GAT CCT GGC TCA GAA TC	Acid31	50
Arquea	Todos los grupos	CGG GGY GCA SCA GGC GCG AA	a364Af	66
	Todos los grupos	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	A934b	66
Hongos	Todos los grupos	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	ITS1f	53
	Todos los grupos	CGC TGC GTT CTT CAT CG	5.8s	53

Tabla 5.1: Tabla con listado de los oligonucleótidos utilizados para la cuantificación por medio de qPCR.

El volumen final de la reacción de qPCR fue 10 µl conteniendo 5 µl SensiFAST SYBR Hi-ROX (Bioline, R.U.), 0,3 µl de cada oligonucleótido de una concentración de 10 µM, y 2,4 µl agua estéril y libre de ADN. Se agregó 1 µl en cada reacción de las muestras de ADN de suelo o el ADN utilizado para la curva de calibración. La reacción fue

llevada a cabo en ciclador OneStep (Life, E.E.U.U.) usando el programa 95° C por 3 min seguido por 40 ciclos of 94° C por 5 seg, ver temperatura de hibridación en la tabla 5.1 por 10 seg and 72 °C por 20 seg. Las curvas de hibridación y los geles electroforéticos fueron llevados a cabo para confirmar que los productos amplificados fueron del tamaño adecuado. Todas reacciones de real time-PCR fueron corridas por triplicados para cada muestra de ADN extraído del suelo.

5.2.5) Análisis de los Perfiles Fisiológicos a Nivel de las Comunidades (CLPP) de suelo.

Para determinar los perfiles fisiológicos a nivel de comunidades (CLPP) se utilizaron las microplacas de 96 pocillos con el sistema biosensor de oxigeno (OBS) como ya fue descrito en el capítulo 2. Por interrupción de comercialización de las placas BD, las placas OBS utilizadas en esta parte del trabajo fueron fabricada en nuestro laboratorio como parte de este trabajo de tesis, siguiendo el diseño y protocolo descripto en el trabajo de McLamore et al., (2014)-ver Anexo 1 para más detalles de su construcción-. Las suspensiones de suelo fueron preparadas mezclando 1g de suelos con 5 ml de agua destilada estéril en un tubo de 15 ml conteniendo aproximadamente 5 ml de perlitas de metal de 2 mm para mezclado y homogenizado mediante ULTRA TURRAX Tube Drive (IKA, Alemania) durante 2 min. Las soluciones madre de fuente de C (300 µg/L) y de N (60 µg/L) fueron preparadas para obtener una concentración final de 50 mg/L de C. Las fuentes de C seleccionadas para el análisis de los CLPP fueron el Ácido p-Cumárico, Ácido Propiónico y Ácido Vaníllico (Sigma, St Louis, MO, E.E.U.U.) como en capítulos anteriores. Todas las soluciones stocks y el agua destilada fueron esterilizadas utilizando filtros (<0,22 µm, Sartor, E.E.U.U.) y almacenados a 4º C previos a ser ensayadas en las microplacas.

En cada pocillo se agregaron 40 µl de las soluciones de las fuentes de carbono o agua desionizada estéril para determinar la respiración inducida por sustrato o la respiración basal, respectivamente. Las suspensiones de suelo (160 µl) fueron pipeteadas en cada pocillo, resultando en un volumen final de 240 µl con el agregado de 40 µl de agua desionizada estéril.

Los datos de las cinéticas fluorescentes del consumo de oxigeno fueron graficados como unidades de fluorescencia relativa normalizados (NFRU), al dividir el valor de fluorescencia en cada punto por el valor que se observa a 1 h después de haber comenzado el ensayo (Garland et al., 2010). El tiempo minino de respuesta (TMR) fue definido como el tiempo necesario para que se alcance un valor de 1,1 de NRFU. La cinética de fluorescencia muestra un pico, donde la concentración de oxigeno disuelto

es mínima. Luego la actividad respiratoria declina debido al agotamiento del sustrato disponible, y la continua difusión del O_2 regenera la matriz. El pico de la respuesta fluorescente (Fmax) fue calculado para todas las muestras como otro parámetro de la actividad respiratoria, asumiendo una tasa de difusión constante.

5.2.6) Análisis de la actividad de enzimas extracelulares (EAA).

La actividad de las enzimas extracelulares (EEA) del suelo fue determinado de acuerdo a Marx et al., (2001), utilizando microplacas de 96 pocillos y sustratos unidos a 4-metilumbelliferona (MUB) fluorescente; también se hicieron los controles correspondientes (MUB más suelo (quenching), Buffer MES más sustratos, Buffer más suelo). Las muestras de los suelos de referencia (SD, LC) y los correspondientes a los cambios de manejo (N-LC, N-SD) fueron analizadas para las siguientes actividades enzimáticas: β-cellobiohidrolasa, N-acetil-β-glucosaminidasa, β-glucosidasa, fosfatasa acida, y sulfatasa usando 4-metilumbelliferona-β-D-celobiosa, 4-metilumbelliferona-N-acetil-β-D-glucosamina, 4-metilumbelliferona-β-D-glucopiranosa, 4-metilumbelliferona-fosfato, y 4-metilumbelliferona-sulfato como sustrato, respectivamente. La suspensión de suelo se realizó mezclando un 1 g de suelo fresco con 100 ml de buffer MES 0,1 M pH 6,1. Las suspensiones de suelo fueron obtenidas por el mezclado vigoroso durante 2 min por medio del sistema ULTRA TURRAX Tube Drive (IKA, Alemania). Para la determinación de cada actividad enzimática, en cada pocillo se agregaron 200 µl de la suspensión de suelo y 50 µl de la solución de los sustratos (200 µM). Las placas cargadas fueron incubadas 5 min a 30º C y luego se midió la intensidad de la fluorescencia en el lector de fluorescencia en microplacas (POLARstar Omega, BMG LABTECH, Alemania) utilizando una longitud de onda de 355 nm para la excitación y de 460 nm para la emisión. El equipo se programó para que realice 25 ciclos de 60 segundos a 30° C. La fluorescencia fue convertida en una cantidad de MUB (metilumbelliferona), de acuerdo a estándares específicos, teniendo en cuenta el grado de disminución de la fluorescencia, debido de la materia orgánica y las partículas de suelo, en cada suspensión (Marx et al., 2001)

5.2.7) Análisis Estadístico

Las diferencias entre los tratamientos agrícolas fueron estudiadas con el análisis de la varianza multivariado (ANOVAM), y usando el test de Hostelling ($P < 0,05$) para determinar las diferencias significativas en los CLPP. Diferencias entre los manejos agrícolas en las fracciones de agregados de suelo fueron testeadas con el análisis de la varianza (ANOVA) con el test Fisher´s LSD0.5 ($P < 0,05$). Las relaciones entre

tratamiento fue visualizado por medio Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) por medio de la distancia Euclidea.

El cálculo de las relaciones de cambio proviene de las diferencias entre los nuevos manejos agrícolas (N-LC y N-SD) con sus manejos predecesores (SD y LC). A esta diferencia entre el nuevo manejo con su tratamiento control predecesor, se lo dividido por el manejo control predecesor y a este resultado se lo multiplica por 100 para obtener el porcentaje de variación. Y fue simbolizado como ΔN-LC para relación de la N-LC con su tratamiento control predecesor SD; y ΔN-SD para relación de la N-SD con su tratamiento control predecesor, la LC.

$$\Delta N\text{-}LC = [(N\text{-}LC)\text{-}(SD)/(SD)] \text{ Y } \Delta N\text{-}SD = [(N\text{-}SD)\text{-}(LC)/(LC)]$$

Todo el análisis estadístico fueron realizados con el software INFOSTAT (Di Rienzo et al.; 2013).

5.3) Resultados y discusión.

5.3.1) Distribución de las fracciones de agregados

La distribución de las fracciones de agregados obtenidas a partir del tamizado en húmedo de las muestras de los manejos agrícolas presentó algunas diferencias según el manejo (Tabla 5.2). La proporción de las fracciones de agregados fue mayor en la fracción de agregados 250-63 µm, seguidas por las fracciones limosas (63-20 y 20-2 µm, respectivamente) y por último las fracciones de agregados 2000-250 y 2-0,1µm ($P < 0,0001$).

Tratamiento	2000-250 µm	250-63 µm	63-20 µm	20-2 µm	2-0,1 µm	Recuperado
LC	9,82±3,71	37,27±7,43	22,72±2,76	21,64±1,31	3,62±1,3	95,07
N-LC	18,76±3,88	36,13±6,88	21,43±2,15	18,37±2,16	4,37±1,4	99,05
N-SD	13,07±2,52	39,32±3,39	20,43±3,76	21,75±4,5	3,89±0,87	98,46
SD	22,02±5,59	30,1±4,4	19,74±1,76	17,9±4,13	3,52±1,06	93,29

Tabla 5.2: Distribución de las fracciones de agregados de los suelos utilizados. Media Error Estándar. (%). LC = Labranza convencional; N-LC = nueva labranza convencional; N-SD = nueva siembra directa; SD = siembra directa

Cuando comparamos los manejos, analizados por medio de un ANOVA simple, solo se encontraron diferencias significativas para la fracción de agregados 2000-250 µm, donde las muestras de los tratamientos de SD y N-LC se diferenciaron de las muestras de las muestras de la LC y la N-SD ($P = 0,001$). El resto de las fracciones no presentaron diferencias significativas (Tabla 5.2, Figura 5.1). Este resultado estarían indicando que la proporción en esta fracción de mayor tamaño sigue respondiendo a los manejos históricos.

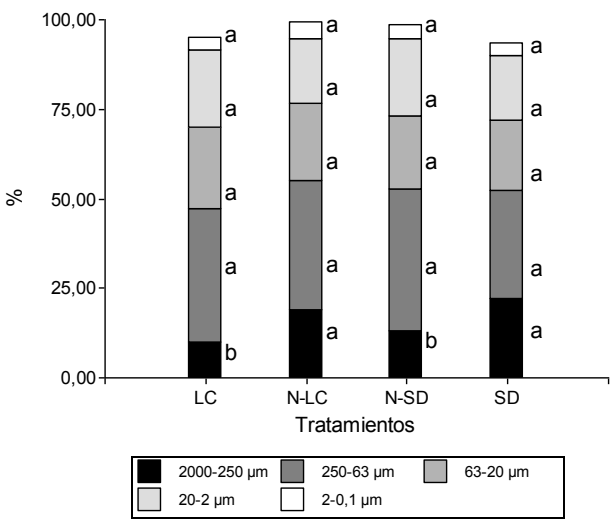

Figura 5.1: Sumatoria de las fracciones de agregados para cada tratamiento. LC = Labranza convencional; N-LC = nueva labranza convencional; N-SD = nueva siembra directa; SD = siembra directa. Las letras representan el ANOVA con Test de Fisher LSD 0.5 $p < 0,05$ en la comparación entre los tratamientos por fracción de agregados.

Con el objeto de buscar si existe alguna evidencia del efecto del cambio de manejo en las proporciones de las fracciones de agregados luego de 30 meses de realizado el cambio, a pesar de los resultados negativos del ANOVA al comparar la distribución de las fracciones en términos absolutos, se analizaron la

relaciones de los valores de cada una de las fracciones en los suelos con cambio de manejo comparando el valor actual con el valor en el manejo histórico utilizado como control, en forma de cociente. De esta manera pudimos encontrar que la relación de valores N-SD/LC presentó un aumento del 33% en la fracción 2000-250 µm y un 5% en la fracción 250-63 µm. A su vez, la fracción de agregados 63-20 µm presentó una disminución del 11%. En comparación, las relaciones de valores N-LC/SD mostraron una disminución del 15% en la fracción 2000-250 µm mientras que las fracciones 250-63 y 63-20 µm presentaron un aumento del 20% y del 8%, respectivamente.

Cuando se analizaron las correlaciones entre las fracciones de agregados se evidencia que existe una correlación negativa entre las fracciones de agregados de 250-63 y 63-20 µm con la fracción 2000-250 µm (-0,47, P = 0,04 y -0,45, P = 0,04, respectivamente). De esta forma se pondría en evidencia la dinámica que sufren las fracciones de agregados producto del cambio de manejo. Se puede interpretar que el aumento de las fracciones de mayor tamaño se relaciona con la disminución de las de menor tamaño y viceversa.

	2000-250 µm	250-63 µm	63-20 µm	20-2 µm	2-0,1 µm
2000-250 µm	1				
250-63 µm	-0,47*	1			
63-20 µm	-0,45*	0,3	1		
20-2 µm	-0,24	0,19	0,26	1	
2-0,1 µm	-0,08	0,05	0,26	0,22	1

Tabla 5.3: Correlaciones de Pearson entre las fracciones de agregados. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001

En conclusión, podemos decir que el patrón de cambio de las fracciones de agregados posiblemente debido al cambio de manejo indicaría que en la N-LC la fracción de agregados más grande disminuye con un consiguiente aumento de las dos fracciones consecutivas de menor tamaño. De manera opuesta, en la N-SD se produce un aumento de las dos fracciones de agregados más grandes, pero principalmente 2000-250 µm, posiblemente a costa de una disminución de la fracción de agregados 63-20 µm.

5.3.2) Análisis de la actividad de las enzimas extracelulares.

El efecto de los cambios de manejo en la actividad funcional a nivel de las fracciones de agregados medidos como actividades de las enzimas extracelulares (EAA) se muestra en la tabla 5.4. No se encontraron diferencias significativas entre los manejos

agrícolas por medio del ANOVA para cada fracción de agregados. La distribución de las EAA indicó que las enzimas BG, PME y CEL presentan los mayores valores en las muestras de las labranzas convencionales (tanto sea la LC como la N-LC) para las fracciones de agregados 2000-63, 20-2 y 2-0,1 µm. En las dos fracciones restantes 250-63 y 63-20 µm los mayores valores se presentaron en las muestras de la SD.

La NAG mostró los mayores valores en la LC y la N-LC para todas las fracciones de agregados con excepción de la fracción 250-63 µm que presentó los mayores valores en las muestras de la SD. La SUL mostró la mayor actividad en la SD en todas las fracciones de agregados.

Tratamiento	Fracción de agregados	β-Glicosidasa	N-acetil-glucosaminasa	Fosfatasa acida	Arilsulfatasa	β- Celobio-hidrolasa
LC	2000-250 µm	1074,52±169	915,72±208	1016,16±105	14,84±1,48	170,1±21
	250-63 µm	562,35±145	281,01±132	522,3±98	5,67±1,33	272,01±60
	63-20 µm	509,41±72	160,23±68	409,44±130	7,09±0,82	192,84±40
	20-2 µm	1109,18±164	959,16±281	1294,36±135	11,04±1,49	130,65±27
	2-0,1 µm	2702,5±912	3609,53±1087	2753,53±1063	22,32±4,03	337,02±99
N-LC	2000-250 µm	720,19±153	1037,47±217	1108,72±173	9,95±2,52	139,66±16
	250-63 µm	448,94±118	213,91±118	326,77±94	6,7±1,8	187,29±40
	63-20 µm	493,45±61	161,13±63	405,67±111	4,64±1,03	183,19±79
	20-2 µm	1546,5±392	1396,55±465	1643,38±479	13,76±2,14	176,72±36
	2-0,1 µm	2845,79±951	3150,34±1040	2611,23±1135	27,14±7,85	299,74±86
N-SD	2000-250 µm	753,18±154	979,12±202	961,55±132	14,14±3,09	152,3±23
	250-63 µm	409,75±82	158,46±65	277,75±64	5,12±0,61	171,74±35
	63-20 µm	331,03±90	149,12±42	266,25±74	4,62±1,13	162,02±45
	20-2 µm	1371,49±337	1135,62±260	1200,93±215	10,51±1,97	132,88±24
	2-0,1 µm	2417,64±772	2969,89±816	2431,4±919	19,2±4,49	275,33±20
SD	2000-250 µm	927,66±198	943,94±211	965,97±118	17,96±3,7	153,62±18
	250-63 µm	736,52±137	419,52±180	642,56±159	21,03±10	311,87±93
	63-20 µm	541,66±85	131,73±40	450,77±132	11,88±5,16	205,06±42
	20-2 µm	1403,18±474	1323,81±449	1380,31±259	14,84±2,95	170,19±34
	2-0,1 µm	2459,9±755	3159,82±838	2375,11±944	29,62±6,73	240,41±63

Tabla 5.4: actividad de las enzimas extracelulares para cada tratamiento y fracción de agregados. Media Error Estándar.(µM MUB / g Suelo.h). n=5. LC = labranza convencional; N-LC = nueva labranza convencional; N-SD = nueva siembra directa; SD = siembra directa.

Que en la fracciones de agregados 2000-250 y 2-0,1 µm las EAA sean máximas en la LC y en la N-LC puede deberse a una menor estabilidad de los microagregados > 250 µm. Como ya se dijo estos agregados se fracturan y al romperse favorecen el acceso de los microbios y las enzimas a los depósitos de carbono produciendo la degradación del mismo y favoreciendo así la actividad enzimática (Bach & Hofmockel, 2015). Por el contrario, en la SD y en N-SD al no fragmentarse los microagregados, la actividad

enzimática se encuentra ocluido e inaccesible, y por lo tanto es menor. Se demostrado que la SD no incrementa el carbono orgánico del suelo en todas las fracciones de agregados de manera homogénea, sino que lo hace principalmente en la fracciones de agregados 250-50 y 2-0,1 µm (Dai et al., 2017). Lo cual se encuentra en relación con los resultados aquí mostrados donde en las fracciones de agregados 250-63 y 63-20 µm de las muestras de la SD se presentaron las mayores actividades.

Los mayores valores de las actividades especificas de las enzimas medidas, se encuentran en la fracción de menor tamaño (2-0,1 µm), seguida por la fracción 20-2 µm y posteriormente la fracción 2000-250 µm ($P < 0,001$). Esto observación resulta opuesta a la que describimos en el capítulo 4, sin embargo, se debe tener en cuenta que estas muestras fueron tomadas en una época del año diferente, en la primavera durante la etapa final del ciclo del cultivo del trigo en comparación con las muestras del capítulo 4 que fueron tomadas durante el invierno donde sé que interpreta que ocurren los mayores aportes de C lábiles proveniente de los residuos de los cultivos. Sin embargo, estos resultados se encuentran en concordancia con otros trabajos observados donde también presentan la mayores actividades especificas de las enzimas en las fracciones de agregados de menor tamaño (Lagomarsino et al., 2012; Poll et al., 2003; Trivedi et al., 2015). Nicolás et al., (2012) estudiaron la aplicación de abonos orgánicos, lo cual incrementa significativamente la concentración y la cantidad de C orgánico en las fracciones arenosas. Después de 9 meses como la materia orgánica decrece, la actividad microbiana también desciende. Es decir, podríamos estar viendo efectos estacionales que modifican las relaciones de actividades entre muestreos.

Análisis mutivariados de los EEA

El análisis de las enzimas en forma individual, si bien muestras algunas tendencias importantes, no nos permite alcanzar o elaborar explicaciones claras respecto del efecto del cambio de manejo sobre las prestaciones funcionales de los suelos a nivel de las fracciones de agregados. Si consideramos al suelo como un organismo complejo, podría ser que el perfil de actividades enzimáticas como un todo muestre mejor las modificaciones en las actividades biológicas debidas el cambio de manejo en el suelo.

Cuando analizamos por medio de métodos multivariados el perfil enzimático, por medio del Análisis de Coordenadas Principales (ACoP, Figura 5.2) vemos que CP1 y

el CP2 representa el 81,9% y el 12,9% del total de la varianza, respectivamente. Clasificados por tratamientos y también fracciones de agregados vimos que las fracciones de agregados se separan en tres grupos, las fracciones 2000-250 µm y las 20-2 µm, por otro lado 250-63 µm y 63-20 µm, y finalmente la fracción 2-0,1 µm. Vemos que en las fracciones 2-0,1 µm, las muestras se agruparon por tratamiento histórico y las actividades enzimáticas, SUL, GLU, NAG y PME, se orientaron hacia estas fracciones. Por otro lado, el subgrupo de las 20-2 µm se agrupó por tratamiento actual. Para el resto de las fracciones no encontramos un patrón de agrupamiento claro de los perfiles.

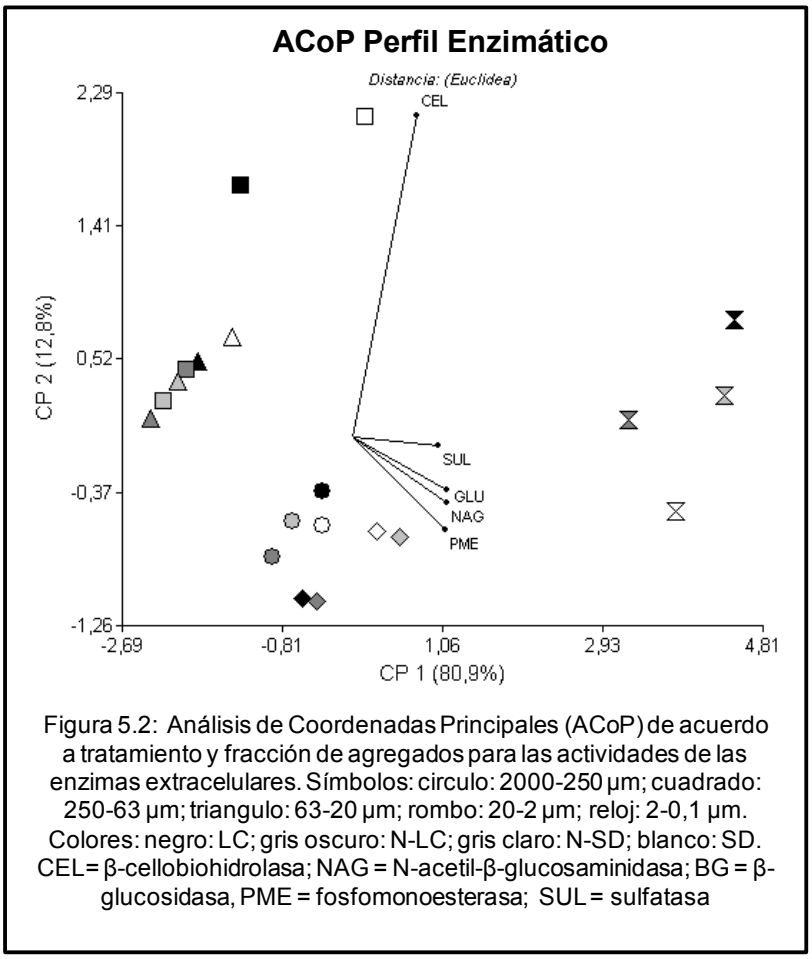

Figura 5.2: Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) de acuerdo a tratamiento y fracción de agregados para las actividades de las enzimas extracelulares. Símbolos: circulo: 2000-250 µm; cuadrado: 250-63 µm; triangulo: 63-20 µm; rombo: 20-2 µm; reloj: 2-0,1 µm. Colores: negro: LC; gris oscuro: N-LC; gris claro: N-SD; blanco: SD. CEL = β-cellobiohidrolasa; NAG = N-acetil-β-glucosaminidasa; BG = β-glucosidasa, PME = fosfomonoesterasa; SUL = sulfatasa

Podemos concluir que las muestras clasificadas por tratamientos agrícolas y por fracciones de agregados, se agruparon principalmente por fracciones de agregados donde se clasificaron en tres grupos. Jiang y colaboradores encontraron que el patrón de distribución de la actividad microbiana del suelo está gobernado por el tamaño de agregados, donde el efecto de la labranza no fue significativo a tamaño de la escala de las fracciones de agregados (Jiang et al., 2011). Y dentro de las fracciones de agregados se clasificaron por tratamientos, sin embargo, esta clasificación de todas

las fracciones de igual forma. Cabiendo señalar que la única fracción de agregados que se clasifico por los manejos agrícolas actuales fue la 20-2 µm.

5.3.3) Análisis de los perfiles fisiológicos a nivel de comunidades (CLPP).

Fuentes de Carbono	2000-250 µm	250-63 µm	63-20 µm	20-2 µm	2-0,1 µm
Respiración Basal	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	LC≠SD/N-LC/N-SD
Acido Cumárico	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	LC/SD≠N-LC/N-SD
Acido propionico	N-SD≠N-LC	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Acido vaníllico	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	LC≠SD/N-LC/N-SD

Tabla 5.5: ANOVAM de los parámetros del CLPP. n=5.

Cuando se analizó por medio del ANOVAM (Tabla 5.5) los CLPP de las muestras de los diferentes tratamientos a nivel de cada fracción de agregados se observaron diferencias significativas en la fracción de agregados 2-0,1 µm, donde la LC se separó del resto de los tratamientos para la respiración basal y ácido vaníllico ($P < 0,05$).

Para el acido cumárico también se presentan diferencias significativas entre los tratamientos actuales y los que sufrieron el cambio de manejo ($P = 0,004$). Esta diferencia de la LC con el resto de los tratamientos puede estar asociada a una distribución diferente del C y por lo tanto a un mayor acceso al carbono lábil por parte de los microorganismos, que principalmente se encuentran ubicados en las fracciones de menor tamaño (2-0,1 y 20-2 µm).

Cuando se analizaron los parámetros que conforman el CLPP se observó que la mayor actividad respiratoria medida a través del Fmax se ubicó en las fracciones de agregados menores a 20 µm para las cuatro condiciones de fuente de carbono ensayadas ($P < 0,001$). La tasa relativa de utilización de los diferentes sustratos puede variar dependiendo de la localización de los grupos microbianos y capacidades metabólicas apropiadas (Jiang et al., 2011a). Kong et al., (2011) por medio de la medición de los ácidos grasos a través del análisis de los PLFA, encontraron una mayor concentración de ácidos grasos en la fracción de limo y arcilla (53-0,1 µm) en comparación con la de los microagregados (250-53 µm).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tratamiento	Fracción de agregados	Fmax RB	Fmax Cum	Fmax Prop	Fmax Vai
LC	2000-250 µm	1,53±0,17	1,52±0,1	1,42±0,12	1,57±0,15
	250-63 µm	1,2±0,25	1,19±0,13	1,19±0,16	1,34±0,18
	63-20 µm	1,34±0,2	1,31±0,07	1,31±0,11	1,32±0,09
	20-2 µm	1,42±0,13	1,3±0,04	1,27±0,04	1,35±0,08
	2-0,1 µm	1,99±0,14	2,02±0,23	1,99±0,25	2,07±0,03
N-LC	2000-250 µm	1,33±0,07	1,27±0,03	1,17±0,04	1,18±0,06
	250-63 µm	1,2±0,08	1,15±0,02	1,13±0,04	1,16±0,07
	63-20 µm	1,25±0,06	1,21±0,04	1,2±0,05	1,19±0,08
	20-2 µm	1,38±0,08	1,32±0,08	1,29±0,04	1,24±0,04
	2-0,1 µm	1,28±0,09	1,2±0,05	1,25±0,06	1,16±0,03
N-SD	2000-250 µm	1,62±0,2	1,54±0,11	1,3±0,08	1,48±0,08
	250-63 µm	1,32±0,14	2±0,02	1,12±0,03	1,19±0,03
	63-20 µm	1,34±0,13	1,23±0,03	1,17±0,04	1,17±0,06
	20-2 µm	1,48±0,13	1,37±0,09	1,29±0,08	1,37±0,09
	2-0,1 µm	1,48±0,14	1,34±0,1	1,32±0,07	1,33±0,1
SD	2000-250 µm	1,46±0,11	1,39±0,06	1,31±0,07	1,35±0,07
	250-63 µm	1,26±0,09	1,2±0,03	1,16±0,04	1,18±0,05
	63-20 µm	1,31±0,1	1,2±0,06	1,15±0,03	1,15±0,04
	20-2 µm	1,32±0,07	1,32±0,05	1,27±0,07	1,28±0,08
	2-0,1 µm	1,5±0,09	1,61±0,07	1,45±0,08	1,42±0,06

Tabla 5.3.: parámetros fisiológicos en los cuales están basados los CLPP para cada tratamiento y fracción de agregados. Media Error Estándar. n=5. (NRFU)

Análisis mutivariados del CLPP

Cuando analizamos los CLPP de las diferentes fracciones y tratamientos por medio del Análisis de Coordenadas Principales (ACoP, Figura 5.3) los ejes CP1 y el CP2 representaron el 57,7% y el 25,4% del total de la varianza, respectivamente. Se observaron que la distribución de las muestras clasificadas por fracciones de agregados y tratamiento se vio que las muestras no se agrupan ni por tratamiento ni por fracción de agregados. Sin embargo, parecería que los tratamientos agrícolas se clasifican a lo largo del eje CP2, donde las muestras de la SD parecerían que se asocian hacia el lado positivo de este eje, y en cambio, las muestras de la LC hacia el lado negativo. A su vez, los nuevos tratamientos agrícolas parecería que se orientan a lo largo del eje CP1, estando las muestras de la N-LC hacia el lado negativo del CP1 y las muestras de la N-SD hacia el lado positivo. Los parámetros de la TMR se podrían asociar con las muestras de la LC, en cambio, los Fmax con las muestras de la N-SD. Sin embargo, en todos los casos las muestras se encuentran muy cercanas entre si y superpuestas en muchos casos.

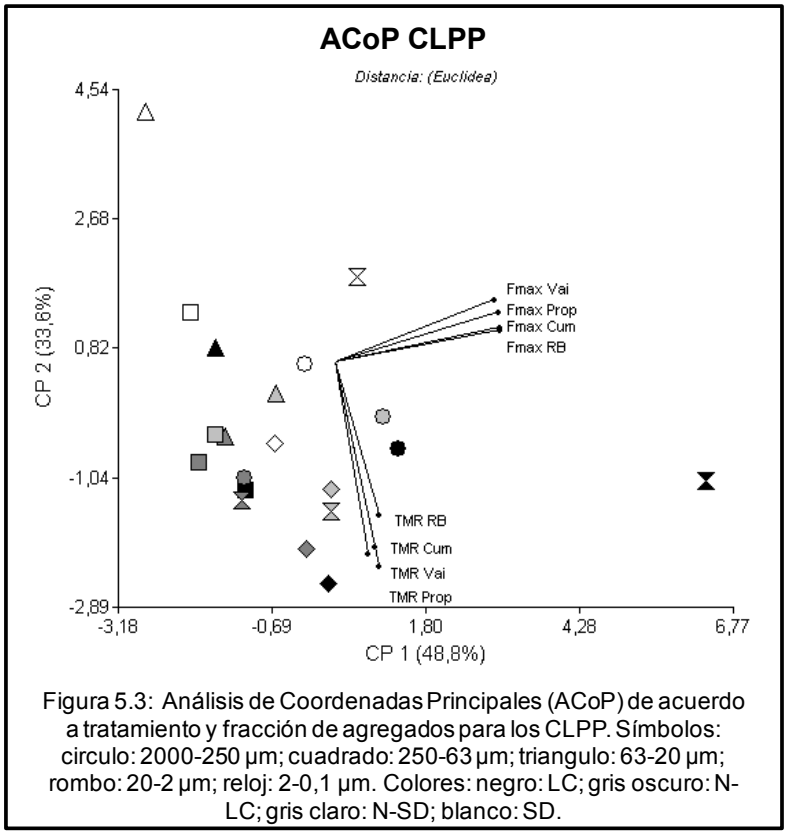

Figura 5.3: Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) de acuerdo a tratamiento y fracción de agregados para los CLPP. Símbolos: circulo: 2000-250 µm; cuadrado: 250-63 µm; triangulo: 63-20 µm; rombo: 20-2 µm; reloj: 2-0,1 µm. Colores: negro: LC; gris oscuro: N-LC; gris claro: N-SD; blanco: SD.

5.3.4) Análisis cuantitativo de la estructura de las comunidades microbianas

Distribución de las abundancias relativas de los grupos microbianos principales a nivel de las fracciones de agregados y según manejo agrícola.

Los cambios en los manejos agrícolas del suelo, como los tratamientos de cultivo o la fertilización, podrían generar diferencias en las abundancias de muchos filos y clases de microorganismos en los suelos (Carbonetto et al., 2014; Finn et al., 2017; Trivedi et al., 2015). También se han observados variaciones estacionales en las abundancias de las líneas bacterianas principales en los suelos (Phillipot et al., 2010). Varios estudios han demostrado que las diferentes fracciones de agregados del suelo pueden seleccionar diferentes comunidades bacterianas (Blaud et al., 2014; Trivedi et al., 2017). A partir de este contexto se analizaron por qPCR los grandes grupos microbianos en las muestras de cambio de manejo por labranza y sus controles. Los resultados indican que las abundancias relativas de los tres grupos microbianos fueron influenciadas por las fracciones de agregados ($P < 0,0001$), no así por los tratamientos de los suelos ($P > 0,05$).

Estos resultados ponen en evidencia que las estructuras de las comunidades microbianas (bacterias, hongos y arqueas) varían dentro de cada fracción de agregados, y la mayor proporción de las bacterias se encuentra asociada con las fracciones de agregados de menor tamaño y en menor proporción en los agregados de mayor tamaño ($P < 0,0001$, para los tres grupos microbianos).

Cuando analizamos las diferencias entre los tratamientos para cada fracción de agregados encontramos diferentes tendencias de variación de los grupos microbianos según la fracción de agregados que se analice.

Cuando analizamos las abundancias relativas dentro de cada fracción de agregados, se vio que en la fracción 2000-250 µm (figura 5.4) la mayor abundancia se presentó en la N-SD para los tres grupos de microorganismos del suelo, y sin presentarse diferencias significativas entre los tratamientos agrícolas. Si de todos modos analizamos las tendencias de los datos, en todos los casos las muestras de la LC presentaron mayores abundancias que las muestras de la SD. Además se observo que la abundancia relativa de las Arqueas disminuyó cuando paso de la SD a la LC, en cambio, el resto de las abundancias aumentaron cuando sufrieron el cambio de manejo. Esta disminución podría estar relacionada con una mayor sensibilidad de las arqueas hacia la perturbación del suelo producto de la labranza.

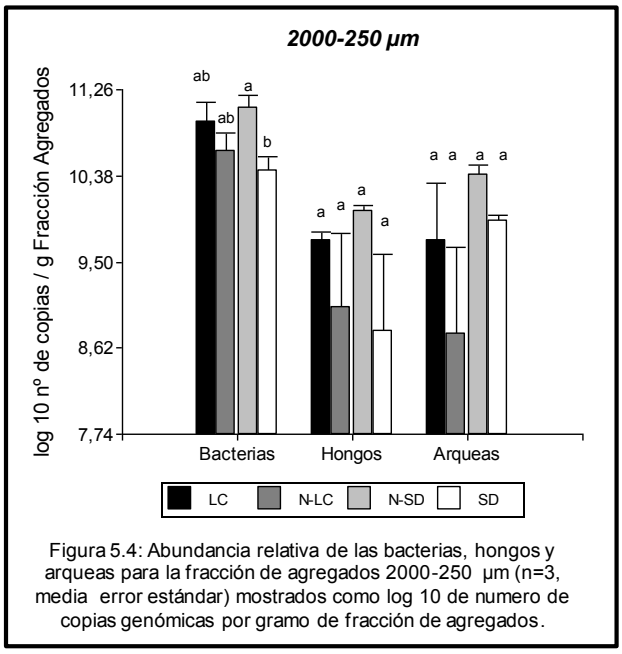

Figura 5.4: Abundancia relativa de las bacterias, hongos y arqueas para la fracción de agregados 2000-250 µm (n=3, media error estándar) mostrados como log 10 de numero de copias genómicas por gramo de fracción de agregados.

En la fracción de agregados 250-63 µm (figura 5.5) las bacterias mostraron la mayor abundancia se presentó en la SD, y esta aumentó desde la LC hacia la SD. Los hongos presentaron una tendencia opuesta,

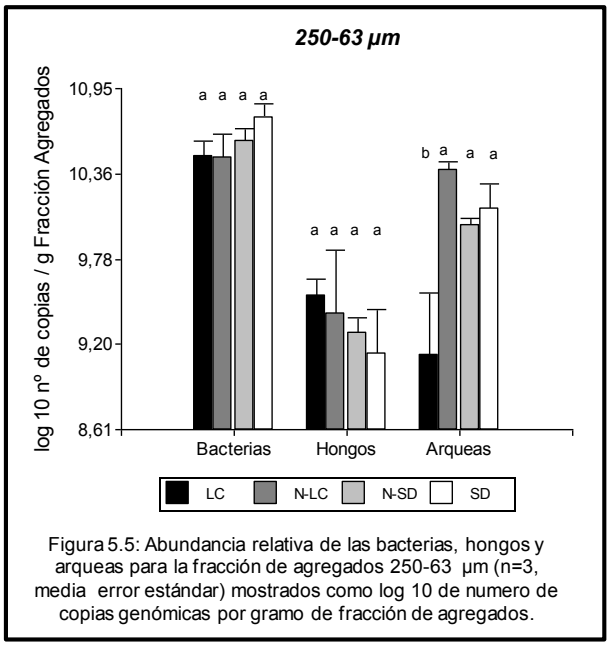

Figura 5.5: Abundancia relativa de las bacterias, hongos y arqueas para la fracción de agregados 250-63 µm (n=3, media error estándar) mostrados como log 10 de numero de copias genómicas por gramo de fracción de agregados.

donde las abundancias disminuyen hacia las muestras de la SD. Para ambos grupos microbianos no se presentaron diferencias significativas. Por otro lado, las arqueas exhibieron las mayores abundancias en la N-LC, presentándose diferencias significativas entre la LC y el resto de los tratamientos (P = 0,0213), donde se encontraron valores menores que en el resto de los tratamientos. También se observa un gran aumento de las arqueas en la N-SD, en comparación con la LC.

En la fracción 63-20 µm (figura 5.6), la mayor abundancia relativa se presentó en la N-LC para los tres grupos microbianos. Se observó que los cambios de manejos presentaron mayores valores que las muestras de los manejos que no sufrieron cambios. Además, no existen grandes diferencias entre tratamientos o manejos históricos ni en los casos de cambio de manejo, de todos modos, en ningún caso encontramos diferencias significativas.

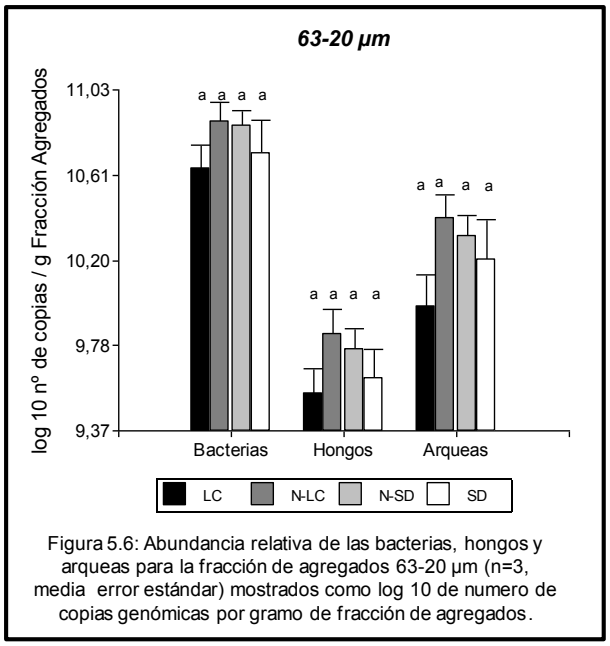

Figura 5.6: Abundancia relativa de las bacterias, hongos y arqueas para la fracción de agregados 63-20 µm (n=3, media error estándar) mostrados como log 10 de numero de copias genómicas por gramo de fracción de agregados.

En la fracción de agregados 20-2 µm (figura 5.7), la mayor abundancia relativa se presentó en la N-SD. Para las bacterias y los hongos, que son los grupos que mejor responden a los cambios de manejos agrícolas, las muestras de la SD presentaron mayores valores que las muestras de la LC, caso contrario sucede en las arqueas. Se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos para los tres grupos microbianos: en las bacterias, la N-SD se diferencia del resto de los tratamientos (P = 0,0067), en los hongos, la SD y N-SD se diferenciaron de la LC y N-LC (P = 0,001); y en las arqueas la N-SD se diferenció de la SD y la N-LC (P = 0,0067).

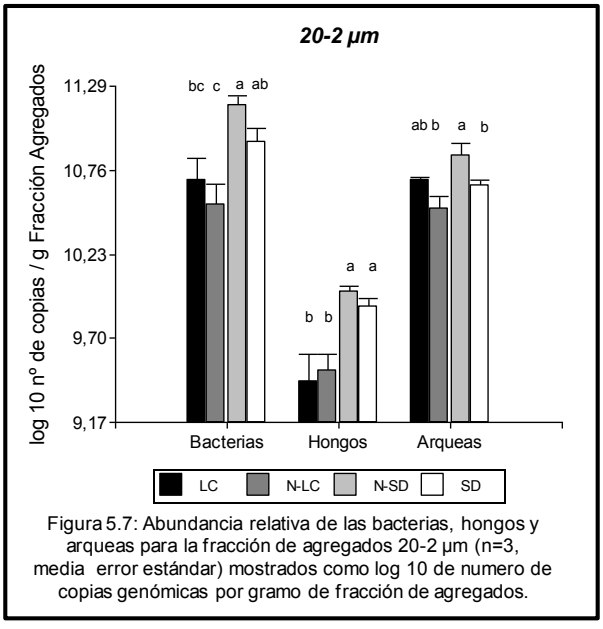

Figura 5.7: Abundancia relativa de las bacterias, hongos y arqueas para la fracción de agregados 20-2 µm (n=3, media error estándar) mostrados como log 10 de numero de copias genómicas por gramo de fracción de agregados.

Los hongos serían, de acuerdo a la bibliografía, el grupo que responde de manera más rápida a los cambios de

tratamiento (Jiang et al., 2011; Frey et al., 2006) y son mas influenciados por los manejos agrícolas que por las características de los suelos (Wakelin et al., 2008). A su vez, las bacterias y las arqueas responde de manera diferencial frente a los cambios en las prácticas de manejo de suelo (Wessen et al., 2010). Nuestros resultados son coherentes con estas observaciones y señalan que el cambio de manejo de labranza ya se expresa a nivel microbiológico en un lapso de tres años posterior al cambio.

Finalmente en la fracción de agregados 2-0,1 µm (figura 5.8), la mayor abundancia relativa se encontró en la SD para todos los grupos microbianos. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Se producen tendencias similares a lo observado en la fracción de agregados 65-20 µm, pero con la diferencia que las muestras de los cambios de manejo presentaron una disminución respecto a las muestras que no sufrieron cambios.

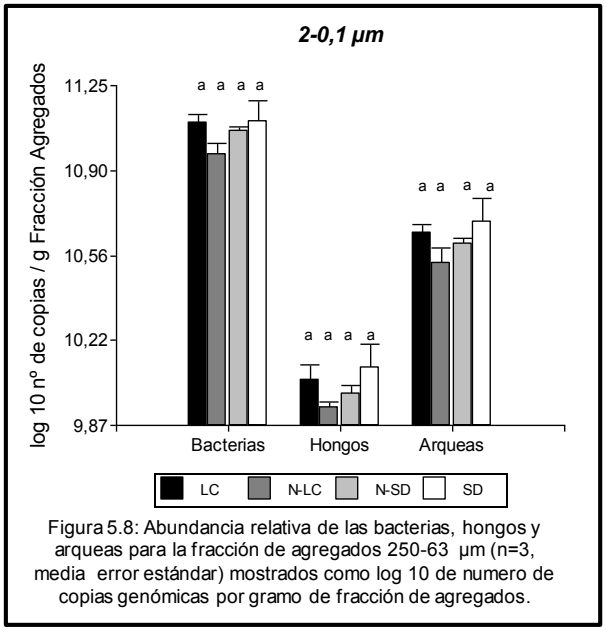

Figura 5.8: Abundancia relativa de las bacterias, hongos y arqueas para la fracción de agregados 250-63 µm (n=3, media error estándar) mostrados como log 10 de numero de copias genómicas por gramo de fracción de agregados.

La abundancia relativa de los hongos fue mayor en la LC o en la N-LC que en la SD en las fracciones 2000-250 µm y 250-63 µm. Esto podría estar relacionado con que los oligonucleótidos cebadores utilizados en la qPCR cuantifican mayormente hongos saprofitos y en mucha menor medida a los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) que son más sensibles a la labranza convencional. Por otro lado, otros investigadores han demostrado que la LC no modifica la abundancia total o relativa de los marcadores de hongos luego de la labranza, en cambio muestran que los indicadores de HMA disminuyen de manera drástica e incluso sin recuperación luego de 5 años en SD (Helganson et al., 2010; Wortmann et al., 2007). Hu et al., (2013) calcula la relación HMA con los hongos totales por medio de mediciones con qPCR y encuentra que las micorrizas representan cerca del 5% del total de los hongos en el suelo. Por lo cual una disminución de este grupo no se vería reflejada en la variación total de los hongos. Otros estudios por medio de un análisis metagenómicos han demostrado una mayor abundancia relativa de los hongos en la LC en comparación con la SD (Sousa et al., 2014).

Relaciones de cambio de los nuevos tratamientos agrícolas con los manejos históricos para los grupos microbianos principales.

En forma similar a como analizamos las variaciones en parámetros anteriores, donde la comparación de valores absolutos no muestra una imagen clara de los cambios de manejos a nivel de los parámetros medidos, decidimos analizar las variaciones en los suelos con cambio de manejo, en relación al valor del suelo de manejo histórico como control.

De esta manera pudimos observar que cada fracción de agregados presentó una dinámica de cambio particular para cada grupo microbiano.

Cuando se analizaron las variaciones de las abundancias de las bacterias (Figura 5.9A) en relación a los nuevos manejos agrícolas con respectos a sus tratamientos históricos predecesores (ΔN-LC y ΔN-SD) se vio que ambas relaciones se comportaron de manera similar para las fracciones de agregados 2000-250, 63-20 y 2-0,1 µm. Por otro lado, las fracciones de agregados restantes, 250-63 y 20-2 µm, mostraron valores opuestos habiendo aumentado en la relación ΔN-SD y disminuyendo en la relación ΔN-LC.

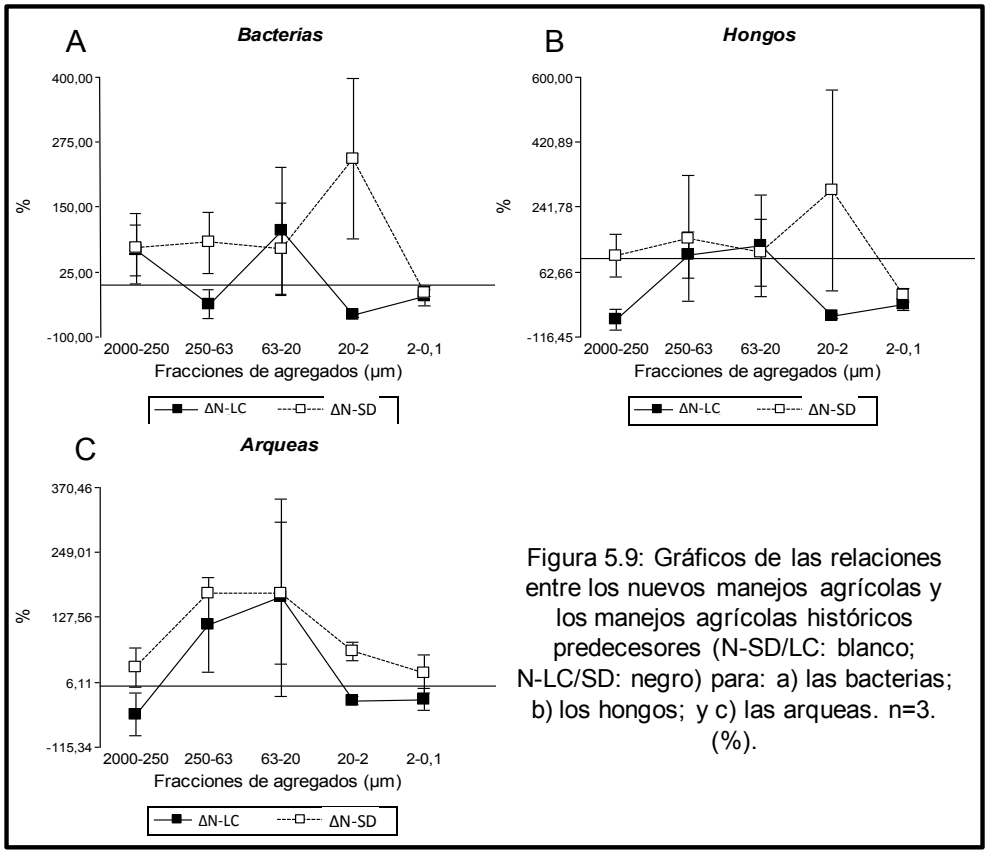

Figura 5.9: Gráficos de las relaciones entre los nuevos manejos agrícolas y los manejos agrícolas históricos predecesores (N-SD/LC: blanco; N-LC/SD: negro) para: a) las bacterias; b) los hongos; y c) las arqueas. n=3. (%).

Cuando se analizó como se modificó la abundancia de las hongos (Figura 5.9B) vio que las relaciones ΔN-LC y ΔN-SD se comportaron de manera similar para las fracciones de agregados 250-63, 63-20 y 2-0,1 μm siendo valores positivos en estas primeras dos fracciones y valores negativos en la de menor tamaño. Las fracciones de agregados restantes, 2000-250 y 20-2 μm, mostraron valores opuestos habiendo aumentado en la relación ΔN-SD y disminuyendo en la relación ΔN-LC.

Cuando se analizó como cambió la abundancia de las arqueas (Figura 5.9C) se vio que las relaciones ΔN-LC y ΔN-SD se comportaron de manera opuesta en 2000-250, 20-2 y 2-0,1 μm siendo positivo la relación ΔN-SD, en cambio, la relación ΔN-LC presentaron valores negativos. En las fracciones restantes ambas relaciones se comportaron de manera similar y positiva.

La relación ΔN-SD presentó, en general, siempre valores positivos, es decir, que el tratamiento agrícola N-SD aumento posterior al cambio de manejo al cabo de los 3 años. Este aumento en la biomasa microbiana fue documentando por varios estudios previos (Carpenter-Boggs et al., 2003; Guggenberger et al., 1999; Helgason et al., 2010). En cambio, la relación ΔN-LC presento una amplia variedad de respuestas y siempre disminuyo en la fracción de agregados 20-2 μm. Lo cual estaría sugiriendo que esta fracción de agregados como la más sensible a los cambios de manejos. Solo la fracción de agregados 2-0,1 μm presento valores negativos, pero en esta fracción ambas relaciones se comportaron de manera similar.

Relaciones entre grupos microbianos principales

La relación hongos/bacteria (Figura 5.10A) no se presentaron diferencias significativas para ninguna fracción de agregados. En las fracciones de 2000-250 y 250-63 μm, los suelos con cambios de manejos agrícolas muestran valores que se asemejan de acuerdo a los corresponden a los valores históricos de la nuevo manejo agrícola que se práctica desde el momento del cambio. En la fracción de agregados 250-63 μm los valores de los nuevos tratamientos se asemejan a sus nuevos controles, disminuyendo la relación hongos/bacterias desde la LC hacia la SD. En el restos de la fracciones de agregados, los nuevos tratamientos se asemejan más a los tratamiento históricos, es decir, que las muestras de la N-SD se asemejan más a las muestras de la LC y lo mismo sucede con las muestras de la SD y la N-LC. En general se presentaron valores muy similares entre los diferentes tratamientos. La distribución de la relación hongos/bacterias no disminuye en el mismo sentido que lo hacen las fracciones de

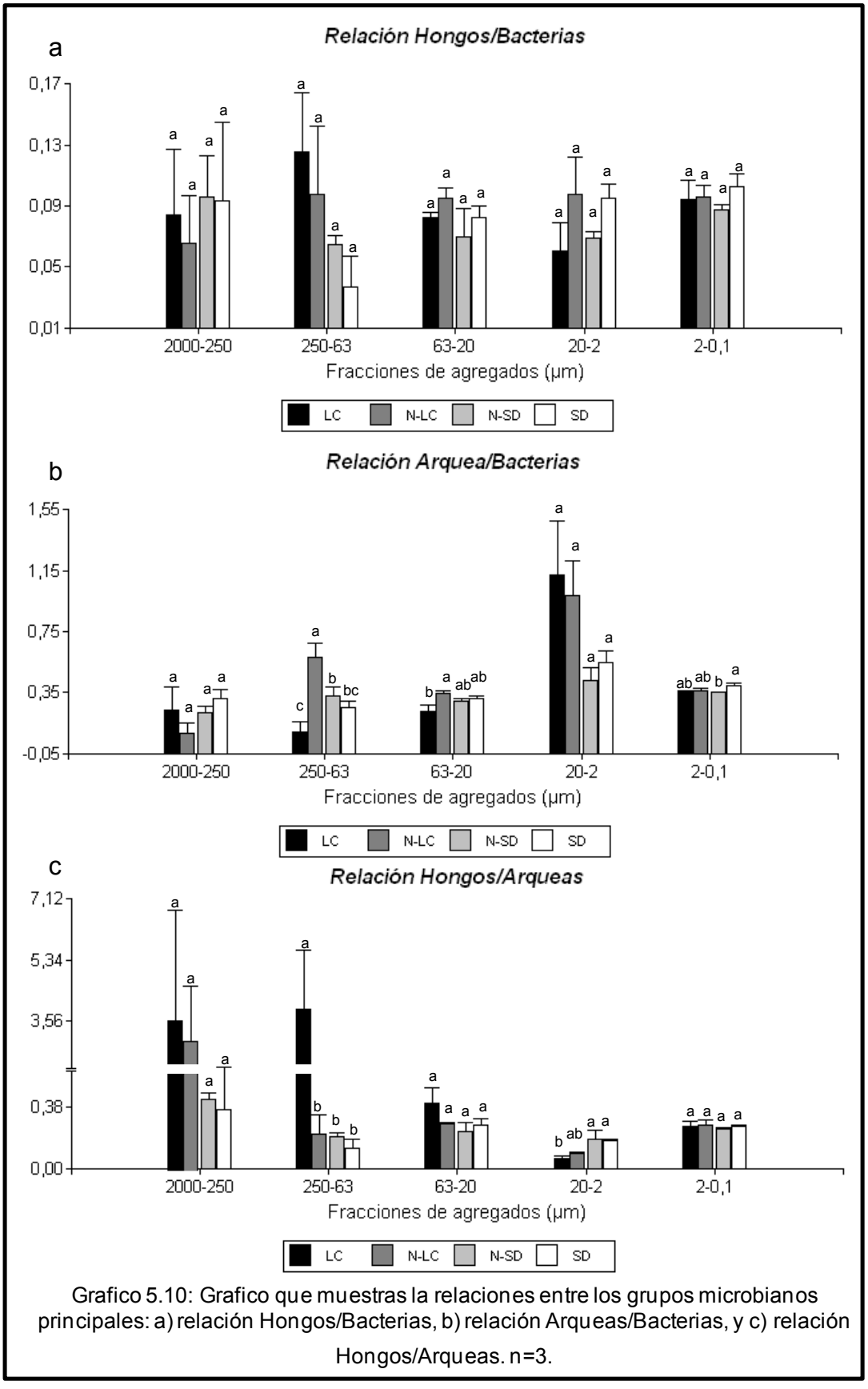

Grafico 5.10: Grafico que muestras la relaciones entre los grupos microbianos principales: a) relación Hongos/Bacterias, b) relación Arqueas/Bacterias, y c) relación Hongos/Arqueas. n=3.

agregados, lo cual no es similar a lo observado en el capítulo 4 y ha sido documentado por varios autores (Hemkemeyer et al., 2015; Ellen Kandeler et al., 1999c). Sin embargo, Zhang et al., (2016) presentó resultados similares a lo aquí mostrado en este capítulo, donde lo atribuyen a la mayor influencia de las bacterias en esos suelos y restándole importancia a la relación hongos/bacteria.

Cuando se analizó la relación arqueas/bacterias (Figura 5.9B) se vio que las muestras de la SD presentaron mayores valores que en las muestras de la LC sin llegar a ser diferencias significativas para todas las fracciones de agregados, con excepción de la fracción de agregados 20-2 µm. Para esta fracción, ambas muestras con labranza presentaron valores similares y mayores que la SD, sin presentarse diferencias significativas entre los sistemas de cultivo. Finalmente se observó que la relación arquea/bacterias aumentó hacia las fracciones de agregados de menor tamaño. En estudios genómicos, la relación arquea/bacterias se encuentra alrededor del 2% en el suelo completo sin fraccionar, sin embargo, hasta el momento los datos existentes que relacionen estas proporciones a nivel de fracciones de agregados son muy escasos. Hemkemeyer et al., (2015) presentó que la relación arquea/bacterias aumenta desde las fracciones más grandes hacia las mas de menor tamaño, de manera similar a lo que ocurre aquí, pero presenta valores entre el 1 y 3% para ambas relaciones. Otros estudios mostraron una relación que varía entre 3 y 15 % (Bates et al., 2011; Soule et al., 2009; Wessén et al., 2010). El aumento de los valores de esta relación hacia las fracciones de agregados más chicas podría estar relacionado con que se asocia las arqueas con sitios con menores aportes de carbono fácilmente disponibles, como sucede en las fracciones de agregados de menor tamaño (Karlsson et al., 2012).

La relación hongos/arqueas (tabla 5.9C) mostró que en las fracciones de agregados 250-63 y 20-2 µm las muestras de la LC presentaron diferencias significativas con las muestras de las SD, siendo estas últimas mayores en las fracción de agregados de menor tamaño.

En general, se observó que la relación hongos/arqueas disminuyó desde la LC hacia las muestras de la SD. También para las muestras que sufrieron los cambios de labranza se observo que son similares a los nuevos controles, sin presentar diferencias significativas entres las muestras que están actualmente en LC o SD. Karlsson et al., (2012) proponen que las arqueas están acostumbradas al estrés crónicos provocados por la falta de nutrientes y presentan una relación negativa con el carbono fácilmente disponible. Lo cual podría estar sucediendo que los hongos se

encuentren favorecido frente a las arqueas en las muestras donde se lleva a cabo la labranza.

Análisis multivariado de los grupos microbianos principales.

Cuando se analizó en conjunto los tres grupos microbianos principales por medio de un análisis multivariado, como lo es el ACoP (figura 5.11) vimos que el CP1 y el CP2 comprende el 81,3% y el 15% de la varianza total, respectivamente. La distribución de las fracciones de agregados presentó tres agrupamientos de acuerdo a tamaño de las fracciones de agregados. Por un lado, es notoria la separación de la fracción de agregados 20-2 µm del resto de las fracciones, que se ubico hacia el lado positivo del eje CP2. A su vez dentro de esta fracción de agregados las muestras se agrupan por manejo actual, agrupándose a lo largo del eje CP1, las muestras de la SD con las muestras de la N-SD hacia el lado negativo y lo mismo sucede con las muestras de la LC y la N-LC, hacia el lado positivo. Es decir, esta fracción de agregados responde de manera dinámica al cambio de manejo en la composición microbiana de los grupos microbianos. El otro grupo que se separa es la fracción de menor tamaño 2-0,1 µm, dentro de la cual sus tratamientos se distribuyen en línea a lo largo del CP1 sin tener en cuenta los manejos históricos o actuales. El tercer grupo que muestra una separación bastante clara en tanto fracción por tamaño es el de las fracciones más grandes 2000-250 µm sin un ordenamiento que refleje los tratamientos. Las fracciones intermedias, 250-63 y 63-20 µm se agrupan separadas del resto, y más entremezcladas en una forma que en su conjunto parece mostrar un agrupamiento de acuerdo al manejo independientemente

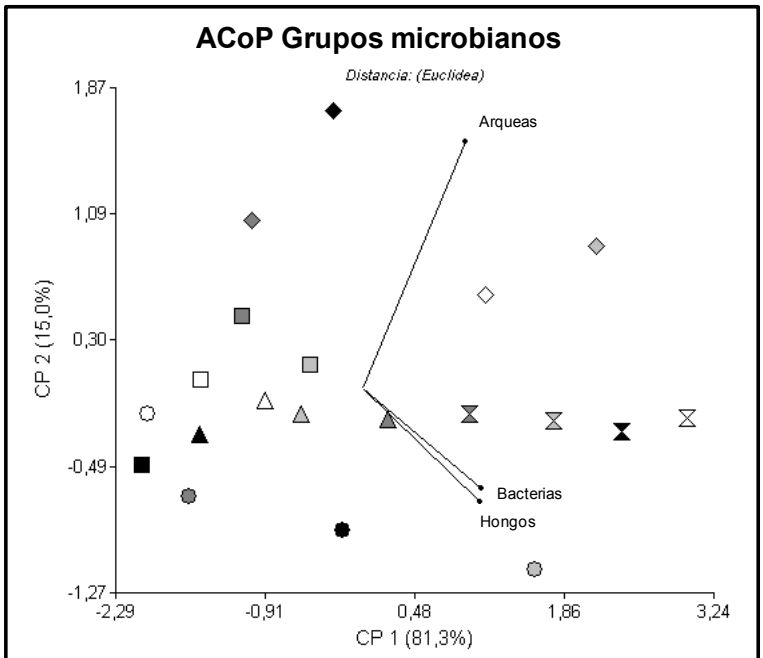

Figura 5.11: Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) de acuerdo a tratamiento y fracción de agregados para los grupos microbianos que incluyen a las bacterias, hongos y arqueas. Símbolos: circulo: 2000-250 µm; cuadrado: 250-63 µm; triangulo: 63-20 µm; rombo: 20-2 µm; reloj: 2-0,1 µm. Colores: negro: LC; gris oscuro: N-LC; gris claro: N-SD; blanco: SD

del tamaño entre estas dos fracciones. El parámetro de las arqueas se orientó hacia las fracciones de agregados 2-0,1 µm, y los hongos y las bacterias hacia el lado de las fracciones de agregados 20-2 µm y las muestras de la N-SD de la fracción 2000-250 µm.

Abundancias relativas de los filos y clases bacterianos.

Cuando analizamos las abundancias relativas de algunos filos y clases bacterianos de mayor abundancia en las muestras de suelo -de acuerdo a los estudios de metagenómica de la última década (Carbonetto et al., 2014; da Silva et al., 2014; Davinic et al., 2012; Trivedi et al., 2017)- se observó que las abundancias relativas de los filos y clases bacterianas presentaron diferencias significativas entre las fracciones de agregados ($P < 0,001$). El único grupo que no fue influenciado por las fracciones de agregados fueron las Acidobacterias ($P = 0,0996$). Por el contrario, las abundancias relativas de los grupos bacterianos no fueron influenciadas por los tratamientos agrícolas cuando las observamos como un todo ($P > 0,05$).

Buscando profundizar el análisis, se calcularon las abundancias de cada grupo para cada fracción de agregados. En la fracción de agregados 2000-250 µm (figura 5.12) se pudo apreciar, en general, valores levemente superiores para las muestras de la LC que para la SD y no se observan grandes cambios de acuerdo a los cambios de manejo, es decir, los valores de los suelos con nuevos tratamientos se asemejan a los valores de los tratamientos históricos. Esto es así para los filos Acidobacterias, Actinobacterias, Alfaproteobacterias y Betaproteobacterias. El grupo de los Firmicutes

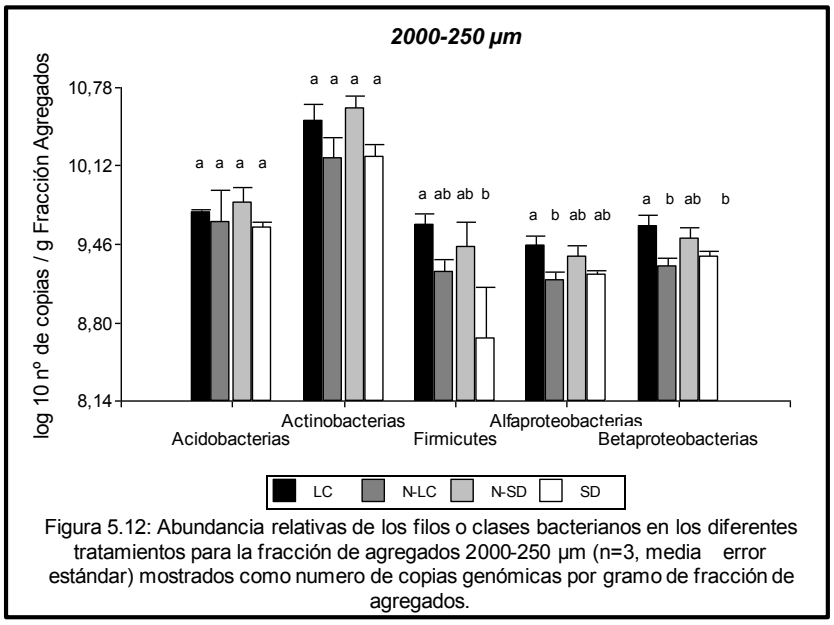

Figura 5.12: Abundancia relativas de los filos o clases bacterianos en los diferentes tratamientos para la fracción de agregados 2000-250 µm (n=3, media error estándar) mostrados como numero de copias genómicas por gramo de fracción de agregados.

muestra un comportamiento singular en el sentido que los valores en las muestras de la LC al igual que los suelos con nuevos tratamientos son mayores que las muestras de la SD.

En la fracción de agregados 250-63 µm (figura 5.13) se observó un panorama diferente en cuanto a la distribución de los filos bacterianos, que se contrasta con lo observado en la fracción de agregados más grande. Las Actinobacterias y en particular las Acidobacterias presentaron la mayor abundancia relativa en la SD en comparación con la LC, y lo mismo sucede con los otros tres grupos bacterianos aunque en una menor proporción. En este tamaño de microagregados el efecto del cambio de manejo se manifestó de manera diferente. Por un lado, los grupos de los oligotróficos (Firmicutes, Alfaproteobacterias y Betaproteobacterias) muestran valores de abundancia que se corresponden con el tratamiento histórico. En cambio, en los grupos copiotróficos de Actinobacterias y Acidobacterias los nuevos manejos se reflejan en abundancias relativas diferentes a los manejos históricos, principalmente en las Actinobacterias que sufren una caída en la abundancia en la N-LC respecto al resto de los tratamientos.

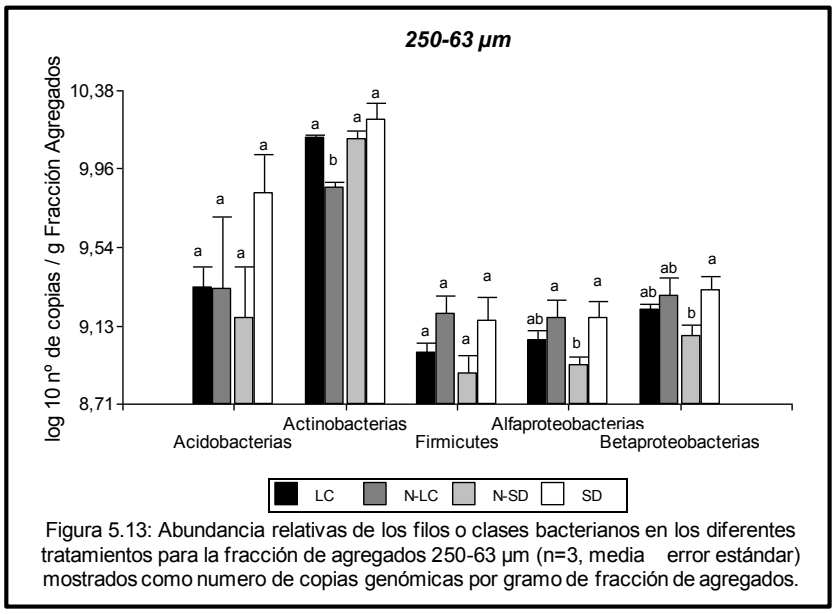

Figura 5.13: Abundancia relativas de los filos o clases bacterianos en los diferentes tratamientos para la fracción de agregados 250-63 µm (n=3, media error estándar) mostrados como numero de copias genómicas por gramo de fracción de agregados.

En la fracción de agregados 63-20 µm (figura 5.14) también aparecen particularidades que reflejan el efecto del manejo del suelo. Esto se da con el filo de las Actinobacterias que presentan una diferencia sustancial entre las muestras de la SD y la LC y donde los valores de los tratamientos con cambio de manejo aparecen en ambos casos aumentados al nivel del control histórico de las muestras de la SD. Esto muestra que la práctica de N-LC no disminuye desde la SD histórica con el cambio de manejo a la LC al cabo de tres años, mientras que la N-SD luego de este tiempo muestra valores

equivalentes a la SD. El otro grupo que en esta fracción de agregados muestra diferencias que reflejan el manejo son los Firmicutes donde se observan mayores valores en las muestras de la SD respecto de LC y donde las muestras de los suelos con cambios de manejo reflejan los valores del manejo histórico y no del nuevo. Es decir a nivel de esta fracción los Firmicutes se mantienen en valores estables determinados por al manejo histórico aún luego de tres años de cambio de manejo. Los grupos de Acidobacterias, Alfaproteobacterias y Betaproteobacterias no muestran diferencias significativas entre los tratamientos. Dado el carácter exploratorio de este ensayo cabe señalar la consistencia de mayores valores absolutos para todos los grupos en el tratamiento de N-LC.

En estas últimas dos fracciones de agregados analizadas, 250-63 y 63-20 µm, se nota que la mayor abundancia se encuentra en la N-LC, que es la SD que pasó a la LC. Este es el tratamiento donde se produjo una disminución del carbono en el suelo sin fraccionar (Ver capítulo 3). Lo que podría haberse traducido en un aumento de la biomasa microbiana del suelo producto de la mineralización de los nuevos substratos disponibles. Además debemos tener en cuenta que estas dos fracciones son las que más aumentaron en sentido opuesto a la disminución de la fracción de agregados de mayor tamaño 2000-250 µm.

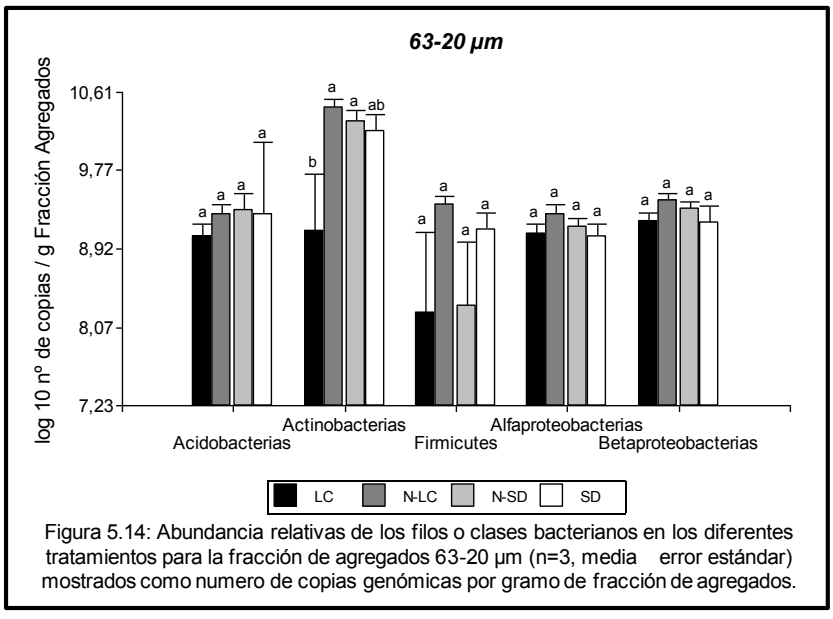

Figura 5.14: Abundancia relativas de los filos o clases bacterianos en los diferentes tratamientos para la fracción de agregados 63-20 µm (n=3, media error estándar) mostrados como numero de copias genómicas por gramo de fracción de agregados.

En la fracción de agregados 20-2 µm (figura 5.15) se observan varias particularidades respecto de los manejos históricos y los cambios de manejo en los diferentes grupos bacterianos. El grupo de Acidobacterias mostró valores significativamente mayores en las muestras de la SD que en la LC, y esta impronta dada por la SD en este grupo bacteriano se mantiene y expresa aún en mayores valores de unidades genómicas en

los suelos con cambio de manejo, es decir, la N-SD en 3 años modifica estos valores a valores comparables a los del manejo histórico, y en el caso de la N-LC el resultado sugiere que los valores de Acidobacterias en esta fracción no se han modificados luego de tres años de LC, sugiriendo un valor resistente para este grupo en esta fracción de agregados del suelo.

Los otros tres grupos bacterianos muestran una estructura de valores de las abundancias relativas similares entre las muestras de la SD y la LC pero se expresan valores opuestos en las muestras de la N-SD y la N-LC con efectos de estimulo en el desarrollo de unidades genómicas en este tamaño de fracción dado por el nuevo manejo de SD en tres años. Por el contrario, en la N-LC los valores de estos grupos bajan a valores aún menores que los históricos de la LC, sugiriendo que aún no se han alcanzado a estabilizar las nuevas comunidades microbianas de acuerdo al nuevo manejo.

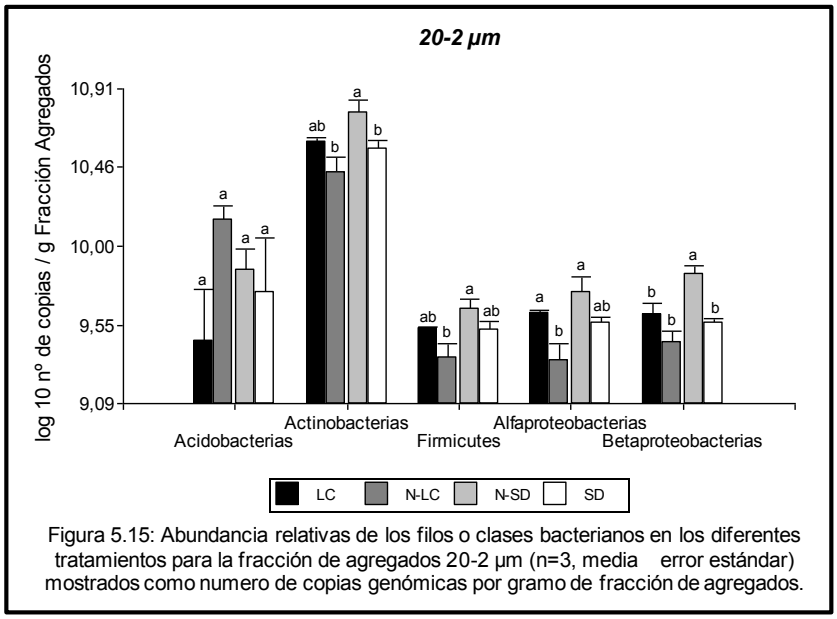

Figura 5.15: Abundancia relativas de los filos o clases bacterianos en los diferentes tratamientos para la fracción de agregados 20-2 µm (n=3, media error estándar) mostrados como numero de copias genómicas por gramo de fracción de agregados.

Finalmente, en el caso de la fracción de arcillas 2-0,1 µm (figura 5.16), se observa comportamientos particulares de las abundancias relativas en el caso de las Acidobacterias que muestran mayores valores en las muestras de la SD que en las muestras de la LC, y esto se mantiene en los suelos con cambio de manejo de acuerdo al valor del manejo histórico, es decir, tres años de cambio de labranza no han alterado los valores de abundancia relativas de Acidobacterias en esta fracción del suelo. Los otros grupos de Actinobacterias, Firmicutes, Alfaproteobacterias y Betaproteobacterias muestran una tendencia similar: valores equivalentes entre SD y LC histórica, donde los nuevos manejos producen una aparente disminución de los valores de estos grupos en esta fracción de agregados.

Varios autores han descripto a la fracción de agregados 20-2 μm con una alta relación C/N, lo que podría ser provocado por el alto potencial de estas fracciones para acumular C orgánico (Smucker et al., 2007; Nicolas et al., 2013). Davinic et al., (2012) sugieren que las abundancias relativas de las bacterias dentro de las fracciones de agregados del suelo son direccionados por los cambios en la composición química del C orgánico más que por la cantidad. En estas dos fracciones de agregados de menor tamaño, 20-2 y 2-0,1 μm se presentaron los mayores valores de abundancia relativa como así como también los mayores valores de EEA para todos los tratamientos. La importancia de las características químicas de los substratos presente en las fracciones de agregados de menor tamaño en conjunto con los mecanismos de protección física de los depredadores producen visibles efectos sobre estas fracciones de agregados (Sessitsch et al., 2003)

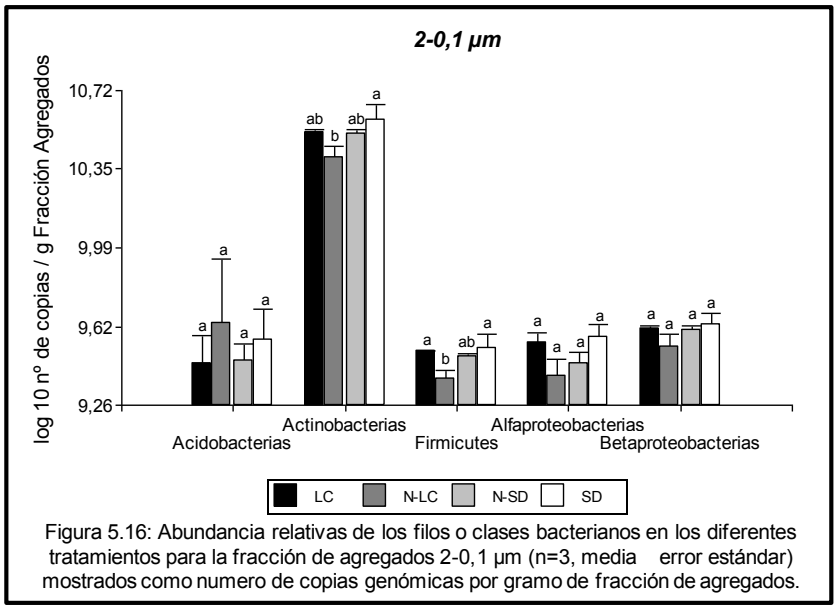

Figura 5.16: Abundancia relativas de los filos o clases bacterianos en los diferentes tratamientos para la fracción de agregados 2-0,1 µm (n=3, media error estándar) mostrados como numero de copias genómicas por gramo de fracción de agregados.

Una posible lectura complementaría de estos datos muestra que los distintos grupos bacterianos podrían separarse en dos categorías, por un lado los grupos bacterianos de mayor abundancia en nuestro estudio, las Actinobacterias y las Acidobacterias, y por el otro lado encontramos a los Firmicutes y las Proteobacterias. Cabe destacar que los primeros son conocidos como Copiotróficos, de crecimiento lento, y la segunda categoría son conocidos como Oligotróficos, que crecen rápidamente en presencia de substratos fácilmente disponibles (Philippot et al., 2010). Souza et al., (2013) por medio de análisis metagenómicos revelaron una mayor presencia de estos tres grupos copiotróficos en la LC que en la SD.

La labranza modifica la distribución de la materia orgánica, no solo en el perfil del suelo al romper e incorporar los residuos de los cultivos que se encuentran en la

superficie del suelo (Kandeler et al., 1999b; Six et al., 2002) sino que también en las fracciones de agregados al romper la estructura de los micro- y macroagregados, que juegan un rol clave en la protección del carbono secuestrado en el suelo (Dungait et al., 2012). La manera más común de que los procesos abióticos regulen la dinámica de la materia orgánica es a través de mecanismos físicos, ya que limitan el acceso microbiano y/o enzimático a los sustratos. Al perturbar la estructura del suelo en los sistemas de la labranza convencional, los microagregados (mayores a 250 μm) se rompen y permiten el acceso a la materia orgánica que se encontraba ocluida en ellos. De esta manera la vuelven accesible para los microorganismos y favoreciendo aquellos microorganismos que crecen mejor en condiciones de abundancia de substrato. Esta mayor mineralización en los sistemas de labranza convencional se expresa también en las actividades de las EAA que presentan mayores actividades en la LC (β-Glucosidasa y Celobiohidrolasa) y N-LC (fosfoestearasa y N-acetil-glucosamina).

Un segundo mecanismo que puede dar como resultado un contenido menor de carbono en los agregados de las muestras de la LC aparece como resultado de una menor difusión del C orgánico hacia el interior de los agregados. La LC continua reduce los porosidad intra-agregados un 17%, lo cual hace que el carbono lábil que llega a los macroagregados se encuentre disponible para ser utilizado en la superficie de los agregados de la LC dentro de los primeros 5 días (Smucker et al., 2007). Lo cual favorece una menor cantidad de C almacenado en el interior de los agregados de las muestras de la LC en comparación con los agregados de la SD. Además, los grupos copiotróficos correlacionan significativamente de manera negativa con la cantidad de agregados en esta fracción de agregados ($P = 0,02$), por lo cual a menor cantidad de agregados mayor abundancia relativa. Estos dos clases de Proteobacterias (alfa y beta) se encuentran funcionalmente relacionados con la descomposición de la materia orgánica, el ciclado del C y N y la degradación de xenobióticos (Fierer et al., 2007). Por otro lado, los Firmicutes producen esporas para sobreponerse a los periodos de escases nutritiva y condiciones ambientales extremas como son la baja concentración de oxígeno y agua (Davinic et al., 2013).

Nuestros resultados muestran que las diferentes fracciones de agregados proveen diferentes hábitats microbianos, favoreciendo comunidades microbianas con diferentes proporciones de sus grupos integrantes (Davinic et al., 2012; Trivedi et al., 2015). Hasta el momento se han llevado a cabo pocos estudios donde se analizan las diferentes comunidades microbianas a nivel de fracciones de agregados. En particular,

no encontramos referencias bibliográficas en la que se comparen a este nivel los manejos agrícolas como la siembra directa o la labranza convencional.

Relaciones de cambio de los nuevos tratamientos agrícolas respecto a los manejos históricos.

Cuando se analizó como varia la abundancia de las Actinobacterias (Figura 5.17A) en relación a los nuevos manejos agrícolas con respectos a sus tratamientos históricos predecesores (ΔN-LC y ΔN-SD) se vio que ambas relaciones se comportaron de manera similar para las fracciones de agregados 2000-250, 63-20 y 2-0,1 µm. Las fracciones de agregados restantes, 250-63 y 20-2 µm, mostraron valores opuestos habiendo aumentado en la relación ΔN-SD y disminuyendo en la relación ΔN-LC.

La cambios en las abundancia de las Acidobacterias (Figura 5.17B) se observó que ambas relaciones se comportaron de manera similar solo en las fracción de agregados 2000-250 µm; en el resto presentaron tendencias opuestas, donde la relación ΔN-LC presento valores negativos en las fracciones de agregados 250-63 y 63-20 µm y con valores positivos en las fracciones 20-2 y 2-0,1 µm; siendo los valores opuestos o similares a cero en la relación ΔN-SD.

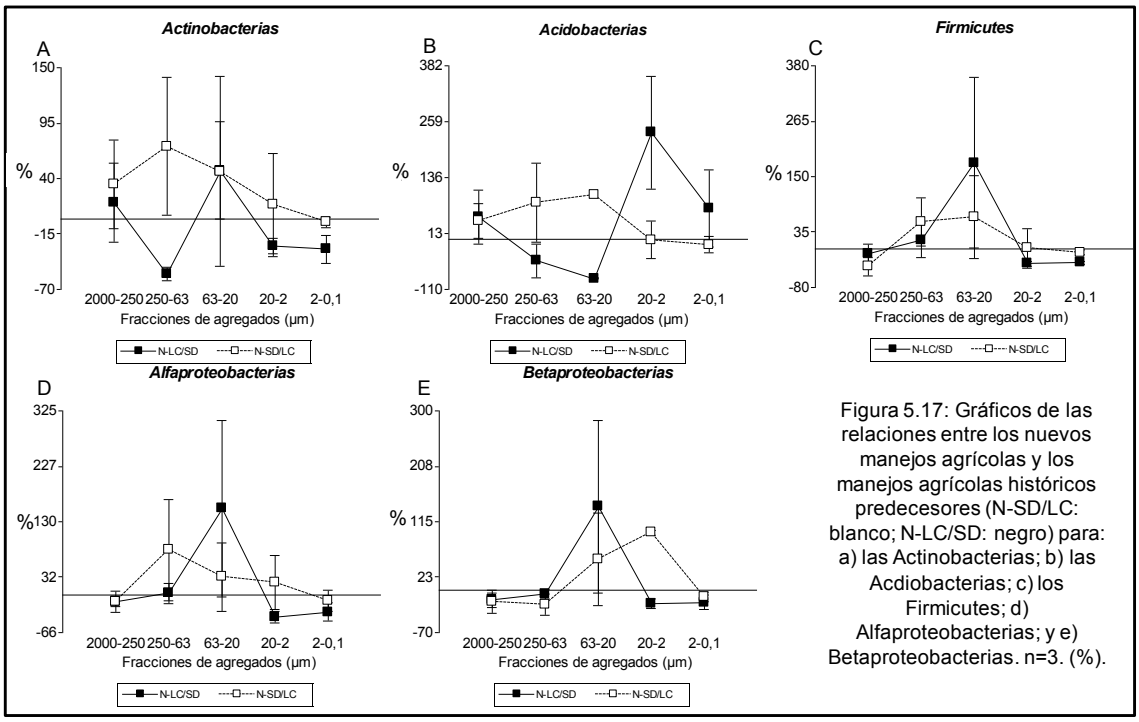

Figura 5.17: Gráficos de las relaciones entre los nuevos manejos agrícolas y los manejos agrícolas históricos predecesores (N-SD/LC: blanco; N-LC/SD: negro) para: a) las Actinobacterias; b) las Acdiobacterias; c) los Firmicutes; d) Alfaproteobacterias; y e) Betaproteobacterias. n=3. (%).

La cambios en las abundancia de los Firmicutes (Figura 5.17C) mostraron que solo se presentaron comportamientos diferentes en la fracción de agregados 63-20 µm donde ambas relaciones fueron positivas, pero la relación ΔN-LC presentó mayores valores que en la relación ΔN-SD, en el resto de las fracciones de agregados ambas relaciones se comportaron de manera similar. Lo cual podría estar indicando que este filo bacteriano, responde al stress producido por un cambio de manejo independientemente de manejos agrícola que sea.

Los cambios en las abundancia de los Alfaproteobacterias (Figura 5.17D) mostraron un comportamiento comparable al de los Firmicutes. Los cambios en las fracciones de agregados 2000-250 y 2-0,1 µm fueron en ambas relaciones negativas. En las fracciones de agregados 250-63 y 20-2 µm, la relación ΔN-SD presento valores positivos y mayores que la relación ΔN-LC. En la fracción de agregados 63-20 µm ambas relaciones fueron positivas pero la relación N-LC presentó los mayores valores.

Finalmente, los cambios en las abundancias de las Betaproteobacterias (Figura 5.17E) presentaron que tendencias opuestas en las relaciones de cambio en la fracción de agregados 20-2 µm, donde la relación ΔN-SD fue positiva en comparación con la relación ΔN-LC que presento valores negativos. En el resto de las fracciones de agregados ambas relaciones se comportaron de manera similar.

La relación ΔN-SD presentó para la fracción de agregados 250-63 µm los mayores valores de cambio, y siempre fuero valores positivos. Esto se encuentra en concordancia con los valores de las abundancias de los filos y clases bacterianos que fueron mayores en esta fracción para las muestras de la SD o la N-LC. En el caso de la relación ΔN-LC vimos que presentaron los mayores valores de cambio en la fracción de agregados 63-20 µm. En esta última fracción de agregados, en general, se presentaron los mayores valores de abundancias bacterianas en las muestras de la N-LC.

Finalmente en las fracciones de agregados de agregados 2000-250 y 2-0,1 µm ambas relaciones se comportaron de manera similar, aumentado o disminuyendo en el mismo sentido. Pero se observa que en la fracción de agregados 2000-250 µm la abundancia de las Acidobacterias y los Actinobacterias se comportaron de manera similar siendo ambas relaciones positivas, en cambio, las abundancias de los Firmicutes y las Proteobacterias (Alfa y Beta) sufrieron una caída.

Estos resultados muestran que las diferentes fracciones de agregados favorecen diferentes dinámicas cambio como resultado del intercambio de manejos agrícolas en

las abundancias de los filos y clases bacterianos. Los efectos se produjeron de acuerdo al tipo de manejo y al tipo de estrategia de vida de los microorganismos. En la relación ΔN-LC observamos como los "copiotróficos" tienden a presentar una disminución pequeña, aproximadamente del 20% (Figura 5.17C, D, E) en todas las fracciones de agregados con excepción de la fracción de agregados 63-20 µm. Por el contrario, los "oligotróficos" presentaron un aumento en la fracción más grande, seguido por una disminución en la fracción de agregados 250-63 µm para la N-LC/SD y en cambio, un aumento para la ΔN-SD.

Análisis multivariado de los filos y clases bacterianos.

Cuando analizamos en conjunto los cinco filos bacterianos por medio de un análisis multivariados como lo es el ACoP (figura 5.18) se observó que el CP1 y el CP2 representaron el 73,7% y el 19,9% de la varianza total, respectivamente. Las muestras clasificadas por fracción de agregados y por tratamiento no se agruparon de manera distintiva por ninguna de estas características. Los parámetros principales se asociaron con las fracciones de agregados más pequeñas como lo son las muestras de las fracciones 20-2 y 2-0,1 µm, y las muestras de la LC y N-SD de la fracción de agregados 2000-250 µm.

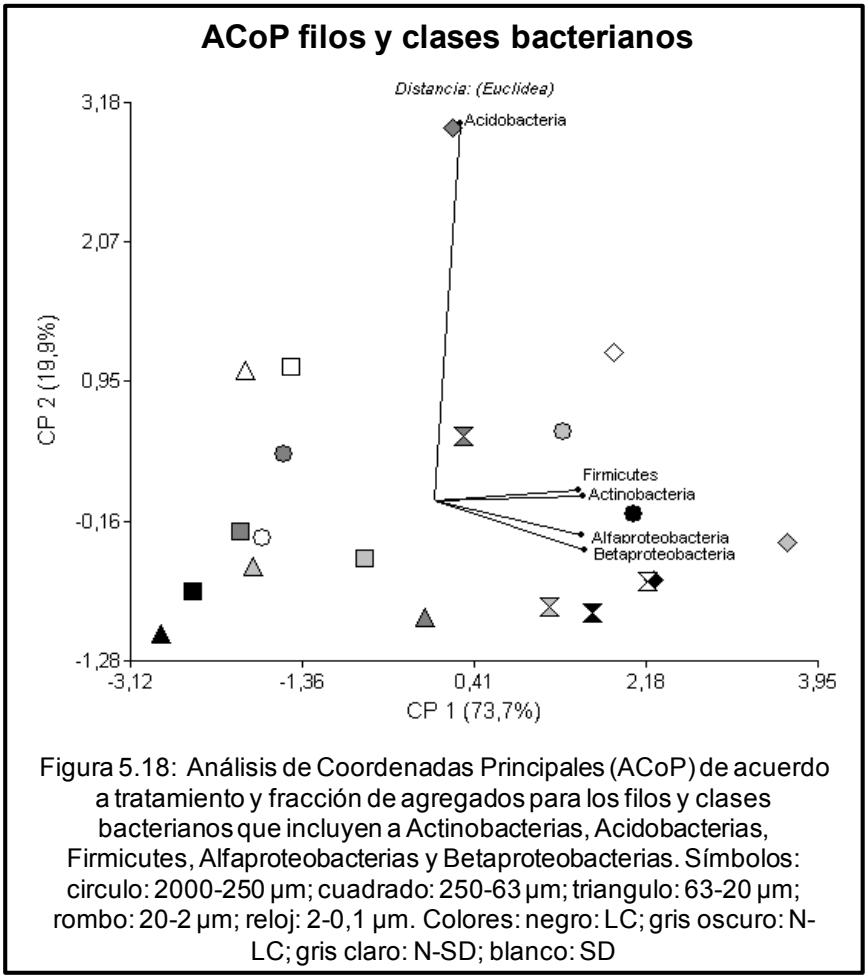

Figura 5.18: Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) de acuerdo a tratamiento y fracción de agregados para los filos y clases bacterianos que incluyen a Actinobacterias, Acidobacterias, Firmicutes, Alfaproteobacterias y Betaproteobacterias. Símbolos: circulo: 2000-250 µm; cuadrado: 250-63 µm; triangulo: 63-20 µm; rombo: 20-2 µm; reloj: 2-0,1 µm. Colores: negro: LC; gris oscuro: N-LC; gris claro: N-SD; blanco: SD

Contribución de cada fracción de agregados a la estructura del suelo completo.

Cuando analizamos los perfiles de cada tratamiento agrícola que surgieron de la sumatoria de grupos microbianos principales por el aporte de cada fracción de agregados de acuerdo a cuanto representa en el suelo sin fraccionar se vio que los mayores valores se presentan en la N-SD, seguidos por la N-LC, la SD y finalmente la LC (Figura 5.19). Estudios previos presentaron de manera similar un aumento de la biomasa microbiana debido al pasaje de la LC a la SD (Wardle et al., 1995). Además análisis realizados por el grupo de Kornelia Smalla sobre las mismas muestras de suelo sin fraccionar mostraron resultados similares (comunicación personal). Cuando analizamos la proporción de cada grupo microbiano vimos que las bacterias fue el grupo que más aporto, seguido por las arqueas y finalmente los hongos.

Los perfiles de cada tratamiento agrícola que surgieron de la sumatoria de los filos y clases bacterianas por el aporte de cada fracción de agregados de acuerdo a cuanto representa en el suelo sin fraccionar se vio que los mayores valores se presentan al igual que con los grupos principales, en la N-SD, seguidos por la N-LC, la SD y finalmente la LC (Figura 5.20). El filo de Acidobacterias representaron el 11,9% y 12.2% en la SD y en la N-LC, y alrededor del 5,4% y el 4.7% en la LC y la N-SD del total de las bacterias cuantificadas. Lo cual nos podría indicar que este grupo bacteriano, que justamente es oligotrófico de crecimiento lento, no sufrió cambios en el tiempo transcurrido desde el cambio de manejo. En las Actinobacterias representaron 34,8% y 34,9% para la SD y la N-SD respectivamente, siendo levemente más altas en las labranzas con un 39,6% y 37,5% para la LC y la N-LC, respectivamente. En otros estudios donde se analiza la estructura microbiana por medio de la pirosecuenciación del gen ribosomal pequeño (16S) se presentó que las Actinobacterias son el segundo mayor filo bacteriano detrás de todas las clases de Proteobacterias agrupadas (α-, β-, λ-, δ-proteobacterias) y representan entre el 25-35% en todas las fracciones de agregados analizadas. Por el contrario, los Firmicutes, Alfaproteobacterias y Betaproteobacterias, que se puede clasificar como grupos copiotróficos, mostraron que su proporción fue mayor en las muestras de ambas LC. Sengupta & Dick, (2015) presentaron que las Acidobacterias presentaron una mayor abundancia relativa en la SD (36%) en comparación con la LC (26%), lo cual fue atribuido a la diferencia de pH del suelo y además encontraron que las Actinobacterias y las Proteobacterias fueron más abundantes en la LC en comparación con la SD. Lo cual se encuentra en sintonía con lo visto por otros autores (Wessén et al., 2010; Carbonetto et al., 2014; Souza et al., 2013; Trivedi et al., 2015). En uno de estos trabajos publicados, la sumatoria total

los grupos que nosotros cuantificamos por qPCR suman alrededor del 60% del total de filos y clases bacterianos que ellos analizan (Davinic et al., 2012; Souza et al., 2013).

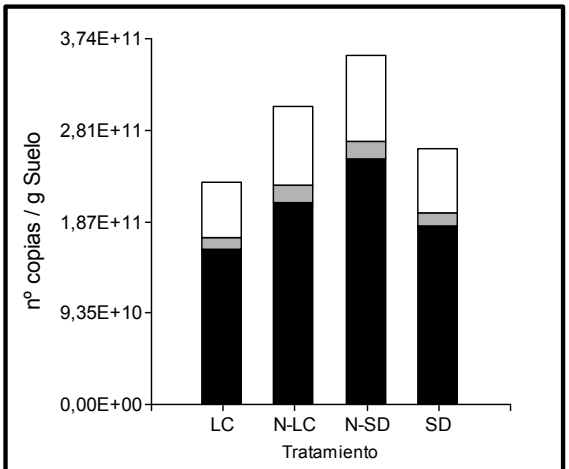

Figura 5.19: gráfico que representa la proporción de cada grupo microbiano cuantificados por qPCR en cada fracción de agregados de acuerdo a su proporción en el suelo total. Negro=bacterias, gris=hongos y blanco=arqueas. n=3.

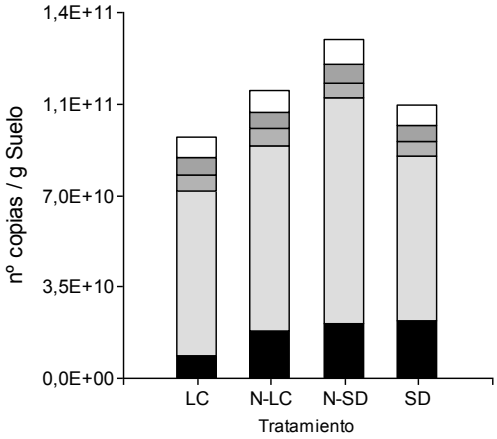

Figura 5.20: gráfico que representa la proporción de cada filo bacteriano cuantificados por qPCR en cada fracción de agregados de acuerdo a su proporción en el suelo total. Negro = Acidobacteria, gris claro = Actinobacterias, gris = Firmicutes, gris oscuro = Alfaproteobacterias y blanco = Betaproteobacterias. n = 3.

5.3.5) Relación entre los grupos bacterianos y las actividades bioquímicas.

Por medio del Análisis de Cuadrados Parciales Mínimos (PLS, **P**artial **L**east **S**quares, el cual es un análisis estadístico multivariado donde se busca la relación lineal entre las variables predictivas, las actividades enzimáticas aquí, y las variables dependientes, los grupos microbianos o bacterianos) se buscó relacionar las actividades de las enzimas extracelulares con los grupos microbianos principales por cada fracción de agregados (Figura 5.21). El PLS de la fracción de agregados 2000-250 µm (Figura 5.21A) mostró que el Factor 1 explica el 33,8% de la varianza. Se observa que las bacterias se presentan la mayor correlación positiva con la CEL, y en menor media con la PME y la GLU. Los hongos presentan una menor correlación con estos parámetros enzimáticos.

El PLS de la fracción de agregados 250-63 µm (Figura 5.21B) mostró que el Factor 1 explica el 54,3% de la varianza. La abundancia relativa de los hongos presentan una correlación lineal con la GLU y se presento una relación inversa entre la abundancia de los arqueas con la PME y las bacterias con la NAG.

El PLS de la fracción de agregados 63-20 µm (Figura 5.21C) mostró que el Factor 1 explica el 59,0% de la varianza. Se presentaría una correlación lineal entre la abundancia relativa de los hongos con la NAG.

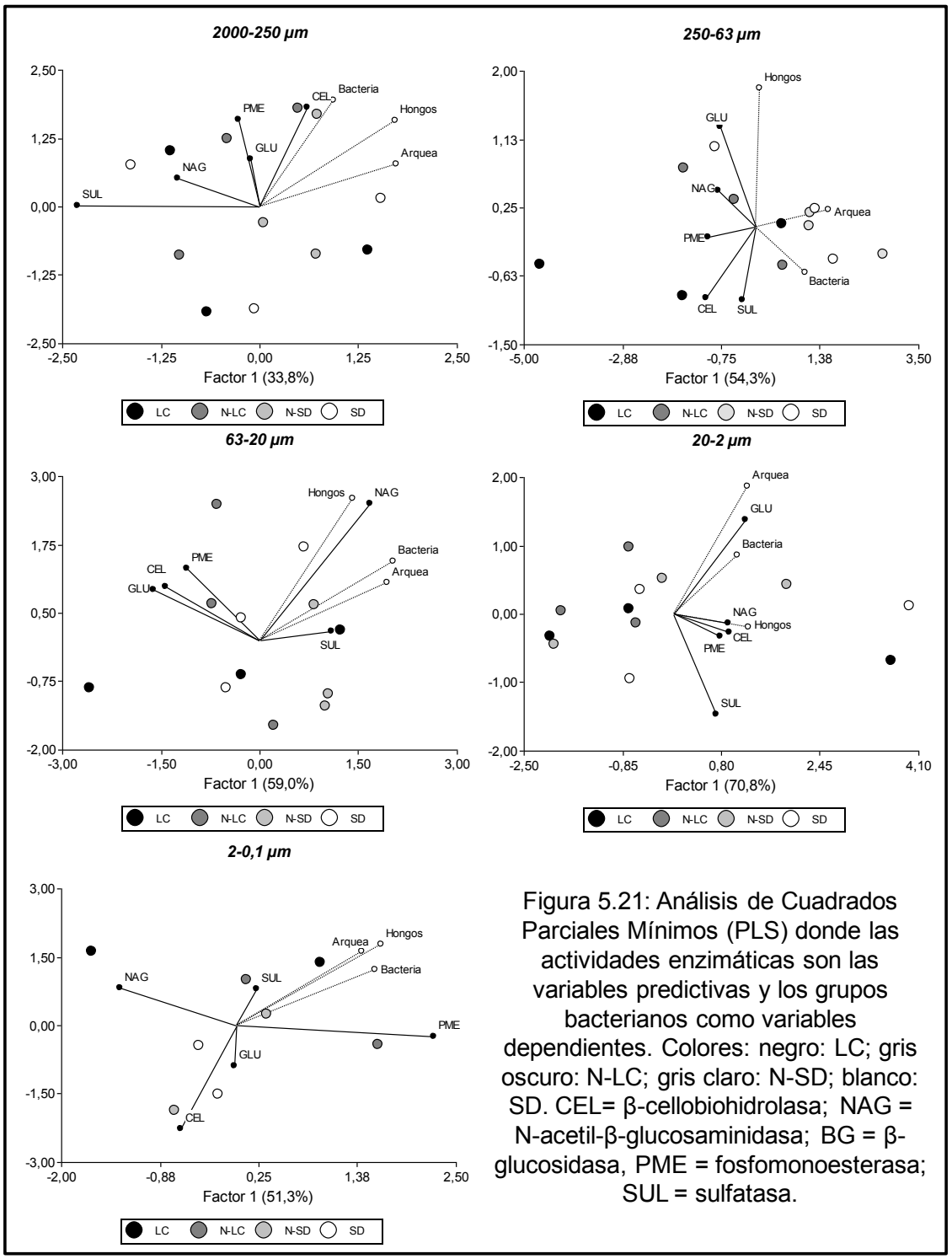

Figura 5.21: Análisis de Cuadrados Parciales Mínimos (PLS) donde las actividades enzimáticas son las variables predictivas y los grupos bacterianos como variables dependientes. Colores: negro: LC; gris oscuro: N-LC; gris claro: N-SD; blanco: SD. CEL= β-cellobiohidrolasa; NAG = N-acetil-β-glucosaminidasa; BG = β-glucosidasa, PME = fosfomonoesterasa; SUL = sulfatasa.

El PLS de la fracción de agregados 20-2 µm (Figura 5.21C) mostró que el Factor 1 explica el 70,8% de la varianza. Las arqueas y las bacterias correlacionaron con la

GLU. Por otro lado, los hongos se correlacionaron con las actividades de las enzimas NAG, CEL y PME.

Finalmente el PLS de la fracción de agregados 2-0,1 µm (Figura 5.21E) mostró que el Factor 1 explica el 51,3% de la varianza. No se encontraría una relación lineal entre las actividades enzimáticas y las abundancias relativas.

Las fracciones de agregados 2000-250 y 20-2 µm presentaron una distribución similar, donde las bacterias se correlacionan con las enzimas involucradas en el ciclo del carbono (CEL y GLU). Como ya vimos en capitulo 3, las GLU se encuentra fuertemente correlacionada con el COT, por lo cual se podría suponer que las bacterias se ubicaron mayormente en los sitios donde hay mayores depósitos de carbono. Esto ha sido corroborado por varios autores previamente (Hemkemeyer et al., 2015; Kandeler et al., 1999a; Lagomarsino et al., 2012; Neumann et al., 2013; Poll et al., 2003). En las fracciones 250-63, 63-20 y 20-2 µm se presentan correlaciones lineales que estarían relacionando principalmente la abundancia relativa de los hongos con varias actividades enzimáticas en las fracciones intermedias principalmente (250-63, 63-20 y 20-2 µm). Lo cual podría estar hablando que en estas fracciones intermedias los hongos tienen una mayor influencia sobre las actividades enzimáticas. Bach y colaboradores (2014) encontraron que los hongos en los macroagregados menores a 250 µm presentan una mayor diversidad de especies que en las macroagregados mayores a 250 µm. Finalmente las arqueas parecía ser el grupo que menor se correlaciona con las EEA, esto podría estar relacionado con la teoría de que las arqueas estas acostumbradas a crecer continuamente en situaciones stress nutritivo crónicos por lo cual podrían presentar una baja actividad en las fracciones del suelo (Bengtson et al., 2012; Karlsson et al., 2012).

El PLS muestra la relación lineal existente entre las EEA y los filos y clases bacterianos en las diferentes fracciones de agregados. De esta manera se pudo observar en la fracción de agregados 2000-250 µm (Figura 5.22A), la abundancia relativa de los filos Firmicutes y Actinobacterias y las clases Betaproteobacterias y Alfaproteobacterias se correlacionan con la GLU y la CEL. Además las Acidobacterias correlacionan de manera negativa con la PME, SUL y la NAG.

En la fracción de agregados 250-63 µm (Figura 5.22B), el PLS mostró que se correlacionan de manera positiva la abundancia relativa de las Acidobacterias con las actividades de las enzimas GLU y NAG. Por el contrario, la abundancia relativa de los Firmicutes presentaron una correlación negativa con las actividades enzimáticas de la SUL y la PME, a su vez se presento una correlación negativa entre las

Betaproteobacterias y la Actinobacterias con la actividad de las enzimas GLU y la NAG.

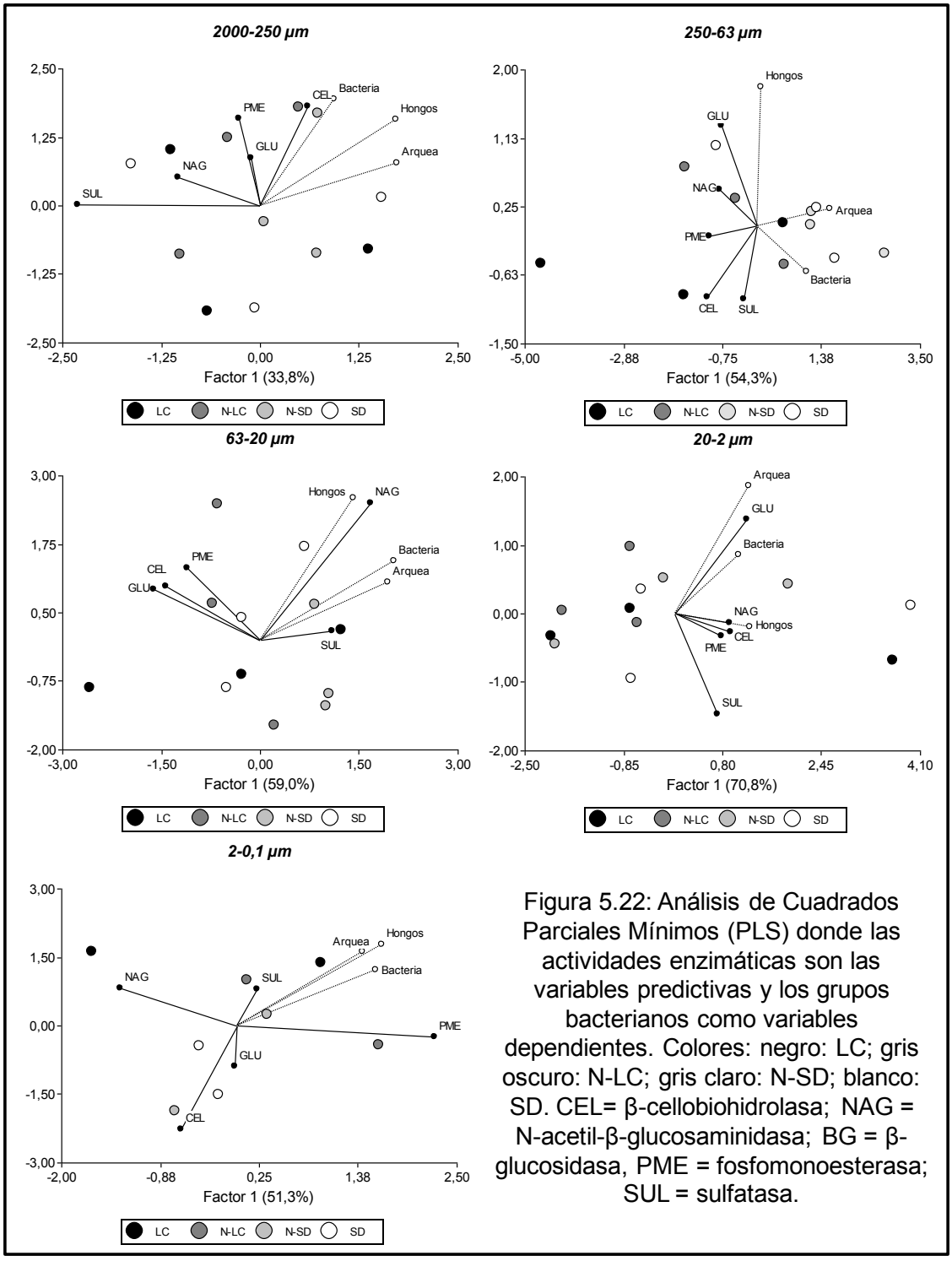

Figura 5.22: Análisis de Cuadrados Parciales Mínimos (PLS) donde las actividades enzimáticas son las variables predictivas y los grupos bacterianos como variables dependientes. Colores: negro: LC; gris oscuro: N-LC; gris claro: N-SD; blanco: SD. CEL= β-cellobiohidrolasa; NAG = N-acetil-β-glucosaminidasa; BG = β-glucosidasa, PME = fosfomonoesterasa; SUL = sulfatasa.

En la fracción de agregados 63-20 µm (Figura 5.22C) se observó que la abundancia relativa de las Proteobacterias se correlacionan de manera positiva con la actividad de la NAG y la abundancia relativa de las Acidobacterias con la SUL. De manera opuesta,

se presento una correlación negativa entre la abundancia relativa de los Firmicutes con la actividad de la GLU y la CEL.

En la fracción de agregados 20-2 µm (Figura 5.22D) la abundancia relativa de los Firmicutes, las Actinobacterias, las Betaproteobacterias y las Alfaproteobacterias se correlacionaron de manera positiva con la actividad de la GLU. A su vez la abundancia de las Acidobacterias se correlacionó de manera positiva con las enzimas NAG, PME y CEL.

Finalmente en la fracción de agregados 2-0,1 µm (Figura 5.22E) la abundancia de las Acidobacterias correlacionó de manera positiva con la actividad de SUL y las Actinobacterias con la PME. Por otro lado, las Alfaproteobacterias, las Betaproteobacterias y los Firmicutes correlacionaron de manera negativa con las enzimas CEL y GLU.

Observamos que en las fracciones de agregados 2000-250 y 20-2 µm las abundancias relativas de las bacterias correlacionan con las enzimas involucradas en el ciclo del carbono, sucediendo lo mismo con los filos y clases bacterianos de los Firmicutes, las Actinobacterias, las Betaproteobacterias y las Alfaproteobacterias. Al igual que sucede con las bacterias en general, nos estaría demostrando que la distribución de los grupos bacterianos se encuentran altamente relacionada con la distribución del carbono. La distribución del carbono como también los diferentes sustratos modifican la distribución y la actividad enzimática (Allison & Jastrow, 2006; Lagomarsino et al., 2012; Nannipieri et al., 2003) así como también la distribución y la biomasa microbiana (Chen et al., 2014; Christensen, 2001b; Weil et al., 2003). Algunos autores han propuesto que la composición y la dinámica de las comunidades microbianas contribuyen de manera determinante a la tasa de degradación de los bioproductos (Zhang et al., 2014).

Por otro lado, observamos que las Acidobacterias se comportan de manera diferente al resto de los grupos bacterianos. Esto puede deberse a que las Acidobacterias crecen mejor que otros grupos bacterianos en ausencia de carbono, por lo cual se las considera como bacterias oligotróficas. Así como también se ha visto que la adición de carbono al suelo puede producir una disminución de la biomasa total de las Acidobacterias (Eichorst et al., 2011).

5.4) Conclusiones

En este capítulo se analizó como el cambio de manejos agrícolas del suelo afectan la actividad funcional a nivel de las fracciones de agregados que componen el mismo, además de su impacto sobre la estructura de las comunidades microbianas del suelos.

Por medio del tamizado en húmedo encontramos que la distribución de las fracciones de agregados se modifica levemente en el curso de tres años de cambio de manejo agrícola. **Se pudo observar que la fracción de agregados 2000-250 µm aumentó en la N-SD y disminuyó en la N-LC**. En cambio en la fracción de agregados 63-20 µm sucede lo opuesto. Además estas dos fracciones correlacionaron de manera negativa, lo cual indica que los cambios en fracción lo hacen a costa de la otra.

Cuando analizamos funcionalmente por medio de análisis bioquímicos las fracciones de agregados se vio que **la mayor actividad de las enzimas extracelulares se presento en las fracciones de agregados 2-0,1 µm, seguidas por las fracciones 20-2 y 2000-250 µm**. No se presentan diferencias significativas entre los tratamientos dentro cada fracción de agregados. Las actividades de las enzimas extracelulares en **la fracción de agregados 2000-250 µm presentaron la mayor actividad en la LC (BG y CEL) y en la N-LC (PME y NAG)**. En cambio, en **las fracciones intermedias (250-63 y 63-20 µm) la mayor actividad se ubico en la SD**. Lo que estaría relacionado con una mayor disponibilidad de substratos en esta fracción de agregados más grande en las labranzas. Posiblemente debido a la ruptura de los macroagregados que protegen los depósitos de carbono. Los CLPP presentaron principalmente una diferencia entre la entre la LC y el resto de los tratamientos, y esto sucedió sobretodo en la fracción de agregados 2-0,1 µm.

Por otro lado, pudimos poner en evidencia que **los manejos agrícolas modifican la estructura de las comunidades microbianas**. Las mayores abundancias de las bacterias, los hongos y las arqueas siguió una distribución similar a la de las EEA, encontrándose los mayores valores en las fracciones de agregados de menor tamaño, 2-0,1 µm, seguidas por las fracciones 20-2 y 2000-250 µm. **Las diferencias entre tratamientos sobresalieron en la fracción de agregados 20-2 µm**. La abundancia relativa de los hongos fue capaz de separar de manera significativa los tratamientos de acuerdo al sistema de cultivo actual, y además las bacterias y las arqueas diferenciaron a la N-SD del resto de los tratamientos. Cuando se analizó como varían las relaciones entre los tratamientos agrícolas que sufrieron cambios de manejos respectos a sus tratamientos históricos, observamos que estas mismas fracciones son las que se comportan de manera diferente. En la fracción de agregados 2000-250 µm

se vio que los hongos y las arqueas disminuyen en la relación ΔN-LC y en cambio aumentan la relación ΔN-SD. Finalmente, en la fracción 20-2 µm, los tres grupos se comportan de maneras opuestas con las tendencias antes descriptas.

Cuando se analizaron las abundancias relativas de los grupos bacterianos se observó que se presentaron mayores valores hacia las fracciones de agregados de menor de tamaño y el grupo más abundante fue las Actinobacterias. En las fracciones de mayor tamaño, 2000-250 µm, las abundancias de los filos y clases bacterianos se asociaron por manejos agrícolas históricos y las muestras de la LC fueron superiores a las de la SD. En el resto de las fracciones de agregados se presentaron diferentes variaciones de los valores de los grupos bacterianos por fracción de agregados y por tratamiento agrícola. **Las dinámicas de cambio observadas a través de las relaciones de cambio (ΔN-LC y ΔN-SD) se adecuan a la teoría de estrategias de crecimiento**. Cuando se correlacionaron a través de los PLS, las EEA con los grupos microbianos observamos que la abundancia de las bacterias como los grupos Actinobacterias, Firmicutes, Alfaproteobacterias y Betaproteobacterias se correlacionaron con las actividades de las enzimas CEL y GLU para las fracciones de agregados 2000-250 y 20-2 µm.

Nuestros resultados muestran que los cambios de manejos agrícolas modifican tanto la actividad bioquímica como así también la estructura de las comunidades microbianas del suelo. Además, como se había observado previamente de que las fracciones de agregados presentan nichos heterogéneos para las comunidades microbianas del suelo. Por lo tanto, cada comunidad microbiana del suelo en las fracciones de agregados sería producto de la presión de selección ejercida tanto por las fracciones de agregados como por las prácticas agrícolas.

Capítulo 6

Conclusiones Generales

Conclusiones Generales

El suelo es el principal reservorio biológico del planeta donde ocurre la transformación de la materia y el ciclado de los elementos químicos. Las prestaciones funcionales del suelo sientan sus bases en los organismos vivos que lo habitan, desde las plantas pasando por la macro y microfauna hasta las comunidades microbianas. Los diferentes manejos y usos del suelo modifican los parámetros químicos y físicos del mismo, y esto condiciona la estructura de las comunidades microbianas que lo habita. En este trabajo tuvo el objetivo de estudiar las respuestas bioquímicas del suelo cuando el mismo es afectado por cambios en sus manejos agrícolas, como la agricultura con diferentes niveles de rotación de cultivos en siembra directa (SD), o la comparación de manejos agrícolas de labranzas como la SD y la labranza convencional (LC) y la dinámica de cambio cuando estas pasan de un manejo al otro.

En una primer parte del trabajo analizamos la parametrización de los Perfiles Fisiológicos a Nivel Comunidades (CLPP) de modo de transformar en datos cuantitativos las diferencias cualitativas de las respuestas fisiológicas en diferentes muestras de suelo. Una vez parametrizados los CLPP, pudimos llevar a cabo un análisis estadístico de comparación de los casos de estudio. Por medio de esta metodología pudimos analizar los efectos de diferentes prácticas agrícolas a nivel de suelo completo y a nivel de sus fracciones de agregados. Para llevar a cabo las determinaciones de los CLPP se utilizó una plataforma en microplaca con un flouróforo sensible al oxigeno. De este modo pudimos definir un método de interpretación basado en el análisis multivariado de las cinéticas de las curvas de consumo de oxigeno obtenidos con cuatro condiciones de carbono diferentes.

A continuación, utilizamos la metodología de los CLPP para discriminar suelos con diferentes historias de uso agrícola, pudiendo distinguir entre dos manejos agrícolas en siembra directa con diferente significado para la conservación del recurso suelo y analizamos el efecto estacional de verano e invierno: Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) basadas en la rotación de cultivos y el uso de cultivos de cobertura en invierno, y por otro lado las Malas Prácticas Agrícolas (MPA), basadas principalmente en el monocultivo. Utilizamos un suelo no cultivado (Ambiente Natural, AN) cercano a los sitios agrícolas como referencia. Los CLPP mostraron variaciones estacionales. En las muestras de verano, los CLPP de los suelos agrícolas se diferenciaron de los CLPP de los ambientes naturales pero no se diferenciaron entre sí. Sin embargo en los muestreos de invierno los CLPP de las BPA se diferenciaron de las MPA, asemejándose los suelos de BPA a los suelos de ambientes naturales. Además fue

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

posible seleccionar una serie de parámetros del CLPP que tenían valor de para discriminar entre los manejos agrícolas y que en ambas épocas del año. Estos resultados nos permiten concluir que los CLPP son una técnica útil y válida a la hora de caracterizar suelos con diferentes historias de uso y con la capacidad de distinguir entre prácticas agrícolas bastante similares como las aquí ensayadas.

Una vez establecida la potencia de los CLPP para discriminar diferentes prácticas agrícolas en siembra directa, se decidió estudiar si los CLPP junto con las actividades enzimáticas, permitirían analizar, desde un punto de vista fisiológico, la dinámica de cambio de manejos agrícolas entre SD y LC. Para ello se estudiaron los suelos de un ensayo con suelos con 30 años de historia de manejo paralelo en SD o en LC, en un establecimiento en la localidad de Torquinst, Provincia de Buenos Aires. Una vez caracterizados ambos manejos pudimos complejizar el ensayo realizando un cruce de manejos de SD a LC (N-LC) y de LC a SD (N-SD), manteniendo parte de los lotes como controles a los manejos originales sin modificar. Pudimos estudiara sí la dinámica de las propiedades del suelo a lo largo de tres años consecutivos posterior al cambio. En este estudio del suelo, se llevo a cabo un análisis integral que incluyo mediciones químicas, físicas y bioquímicas.

Para comparar la dinámica del cambio primero se analizo la diferencias entre la SD y la LC, viendo que a nivel químico la SD presento mayores valores de carbono, fosforo y biomasa microbiana (estos dos últimos solo para la profundidad 0-5 cm, los que nos estaría mostrando una distribución diferencial de acuerdo a la profundidad analizada), en cambio la LC presentó mayores valores de la relación biomasa microbiana y carbono total, posiblemente relacionado con una mayor mineralización en la LC. La siembra directa ha sido reconocida como una práctica efectiva para conservar y mejorar la calidad del suelo (Lal, 2004), aumentando el carbono y otros nutrientes frente a la LC (Pandey et al., 2014; West and Post, 2002). A nivel físico, la SD presento mayores valores de la fracción más grande (> 105 μm) que la LC, en cambio con las fracciones de menor tamaño sucedió lo opuesto, siendo la LC mayor a la SD. En consonancia con estos resultados, gran variedad de estudios han mostrado que la labranza rompe los macroagregados del suelo (Beare et al., 1994; Jiang et al., 2011; Kandeler et al., 1999c; Six et al., 2002).

Pudimos observar un incremento en la actividad enzimática en la SD, posiblemente atribuido aun mayor aporte de nutrientes por los cultivos de cobertura (Roldán et al., 2005; Zhang et al., 2014) o a una mayor estabilidad de las enzimas adsorbidas en matriz de los suelos debido a ser un ambiente menos oxidativo producto de un menor

disturbio y una menor disponibilidad de oxigeno(Acosta-Martínez et al., 2008). Por otro lado, fue posible diferenciar por medio de los CLPP entre la LC y la SD, siendo el consumos de oxígeno diferencial en la LC a la SD, posiblemente por la mayor mineralización (Gomez & Garland, 2012).

Ya avanzado el trabajo nos propusimos ajustar la escala de estudio a una escala más apropiada para el nivel microbiano. Para ello separamos el suelo en diferentes fracciones de agregados que lo componen por medio del tamizado en húmedo sumado a la sonicación y a la centrifugación de las muestras (Neumann et al., 2013; Stemmer et al., 1998). Las fracciones de agregados analizadas fueron 2000-63 µm, 63-20 µm, 20-2 µm y 2-0,1 µm. Las muestras de la SD presentaron mayores cantidades de las fracciones de agregados de mayor tamaño, con diferencias significativas entre los manejos. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo observado por otros autores (Helgason et al., 2010; Schutter & Dick, 2001; Zhang et al., 2016).

La distribución de la biomasa microbiana fue heterogénea, encontrándose la mayor abundancia de las bacterias y los hongos en las fracciones de agregados más pequeñas (< 20 µm) en ambos manejos agrícolas. De esta forma pudimos corroborar que en nuestras muestras la composición microbiológica del suelo a escala de microagregados es heterogénea, cada fracción de agregados es un hábitat que ejerce una presión de selección diferente sobre los microorganismos que encuentran allí (Kandeler et al., 1999a; Neumann et al., 2013; Sessitsch et al., 2001; Vos et al., 2013).Esta heterogeneidad microbiológica podría explicar las diferencias fisiológicas encontradas a nivel de los CLPP que se diferenciaron de acuerdo al tamaño de las fracciones de agregados independientemente de los manejos agrícolas de los suelos originales. Esta observación se encuentra en sintonía con lo hipotetizado por otros autores que plantean que los CLPP son producidos por microorganismos copiotróficos presentes en las muestras de suelo (Lladó &Baldrian, 2017).

Por el contrario, cuando se observa las actividades de las enzimas extracelulares del suelo en las fracciones de agregados, éstas presentaron una distribución heterogénea de acuerdo al manejo agrícola del suelo original, siendo mayores en los agregados más grandes de las muestras de suelos en SD y disminuyendo a medida que lo hace el tamaño de las fracciones de agregados. Esto sucedió principalmente con las actividades de las enzimas *β-glucosidasa, N-acetil-glucosidasa* y *fosfatasa*. Por otro lado, en las muestras de suelo bajo LC la actividad enzimática máxima se encontró en las fracciones de agregados de menor tamaño (20-2 µm) o en algunos casos se

presentaron valores similares en las tres fracciones de agregados de mayor tamaño (2000-63, 63-20 y 20-2 μm). Posiblemente esto se deba a que la LC redistribuye las fracciones de agregados a lo largo de todo el perfil del suelo, en cambio, en la SD el suelo se mantiene sin disturbios y los depósitos de carbono mas lábiles se encuentran en las fracciones de agregados más grandes lo cual favorece la producción de enzimas en esas fracciones (Tiemann et al., 2015; Tiemann & Grandy, 2015; Trivedi et al., 2017).

Una vez establecidas las diferencias entre la SD y la LC, analizamos la dinámica de cambio de los manejos agrícolas de SD a LC y viceversa. El monitoreo fue realizado durante tres años consecutivos en la primavera tardía. A nivel químico, los cambios de manejos mostraron una disminución en los valores del COT y Pext posteriores al cambio respecto a los controles, y en los tres años analizados no se observó que la N-SD recuperase niveles similares de estos parámetros comparables al control en SD. Esta disminución en ciertos parámetros químicos ha sido ampliamente descripta por otros autores (Lal, 2015; West & Post, 2002), asociada a la adaptación al nuevo equilibrio en las redes tróficas del suelo (Simmons & Coleman, 2008). En cambio, pudimos detectar algunos cambios físicos a nivel de distribución de microagregados. En el curso de los tres años de análisis pudimos medir la disminución de las fracciones de agregados de mayor tamaño en los casos de suelos con nueva labranza convencional. La fracción mayor a 105 μm a los 6 meses posteriores al cambio para la profundidad 0-5 cm, y entre los 6 y 18 meses para la profundidad de 5-10 cm ya presentaban valores similares a sus nuevos controles. Para las fracciones de menor tamaño los cambios fueron más lentos.

A nivel bioquímico los cambios fueron aún más evidentes y fue posible seguir la dinámica de cambio de los manejos agrícolas por medio de la actividad enzimática, aunque esto no fue reflejado en los CLPP. Las actividades enzimáticas responderían a los efectos acumulativos de la disponibilidad de los sustratos, la demanda de los nutrientes, la actividad microbiana y las condiciones ambientas (Allison et al., 2010). Al representar un equilibrio tan dinámico, es posible que las actividades enzimáticas sean la mejor elección para estudiar el suelo al ser más sensible que el resto de los parámetros a cambios de manejos. Por ejemplo, Kandeler et al., (1999c) observaron en un estudio de largo plazo de que la actividad enzimática de la fosfatasa acida era una de las mediciones que primero mostraba signos de cambio de la LC hacia la SD.

Para profundizar aun más el análisis del cambio de manejo, decidimos ver que sucedía a escala de microagregados. Para ello, realizamos el fraccionamiento de las

muestras a los tres años posteriores al cambio de manejo y se compararon entre sí, y con los valores de los controles históricos de manejo. Se llevó a cabo un tamizado en húmedo similar al realizado previamente, pero con el agregado de una malla adicional de 250 µm (Stemmer et al., 1998). La distribución de las fracciones de agregados mostró un aumento de las fracciones de mayor tamaño 2000-250 µm en la N-SD y en cambio una disminución en las N-LC respecto a sus manejos predecesores. Sucediendo lo opuesto en las fracciones de agregados 250-63 y 63-20 µm. Esto sugiere cambios sutiles producidos por los nuevos manejos al cabo de tres años medidos a través de este sistema de tamizado. Cuando analizamos las actividades enzimáticas encontramos que éstas no muestran diferencias de acuerdo a los manejos de labranza del suelo original pero sí de acuerdo al tamaño de las fracciones de agregados. Los mayores valores de actividad fueron detectados en las fracciones de agregados menores a 20 µm y luego en la fracción de agregados de mayor tamaño. Este resultado es consistente con lo observado por otros autores, donde las actividades de las enzimas involucradas en el ciclado de los nutrientes son mayores en los agregados más pequeños, probablemente como consecuencia de que la concentración de carbono es mayor en estas fracciones de agregados comparados con agregados de mayor tamaño (Qin et al., 2010; Tiemann et al., 2015; Trivedi et al., 2015).

Para buscar razones microbiológicas que pudiesen explicar las diferencias bioquímicas detectadas, se estudió la estructura microbiana por medio de la cuantificación del gen ribosomal 16S (o 18S) por medio de las qPCR para los principales grupos microbianos (bacteria, hongos y arqueas) y para los principales filos bacterianos de suelo (Acidobacterias, Actinobacterias, Alfaproteobacterias, Betaproteobacterias y Firmicutes). En general, las abundancias máximas de los grupos microbianos presentaron una distribución similar a la observada en las actividades de las enzimas extracelulares, donde se presentaron diferencias entre las fracciones de agregados. Las mayores diferencias entre los tratamientos agrícolas se presentaron para los tres grupos microbianos en la fracción 20-2 µm, pero siendo mayores en los hongos. Posiblemente debido a que los hongos han resultado ser mucho más sensibles a la labranza que los otros grupos (Wakelin et al., 2008; Six et al., 2006). Cuando comparamos entre los tratamientos con cambio de manejo se observó una dinámica de cambio diferente que pudo ser detectada a través de las relaciones de cambio entre los nuevos tratamientos y los controles con los tratamientos previos, y con variaciones de acuerdo al tamaño de cada fracción de agregados. En la fracción 2000-250 µm se observó que las arqueas y los hongos

fueron sensibles a la labranza. Lo mismo sucede en la fracción de agregados 20-2 µm para los tres grupos microbianos principales.

Profundizando aún más el análisis dentro del grupo de las Bacterias, cuantificamos algunos de los principales filos y clases bacterianos como las Acidobacterias, Actinobacterias, Alfaproteobacterias, Betaproteobacterias y Firmicutes. Nuestros resultados se adaptan a la hipótesis de estrategias de vida copiotróficos/oligotróficos entre las bacterias del suelo. En la fracciones de mayor tamaño los grupos copiotróficos (Alfaproteobacteria, Betaproteobacterias y Firmicutes) presentaron las mayores abundancias en la LC, en cambio, los oligotróficos (Acidobacterias y Actinobacterias) lo hicieron en la N-SD. Cuando analizamos la dinámica de cambio a través de las relaciones de cambio respecto del suelo con el manejo original, ΔN-SD y ΔN-LC en esta fracción se observa que se comportan de manera similar, aumentando con el cambio las bacterias oligotróficas y en cambio, las bacterias copiotróficas disminuyen. Cuando vemos la dinámica de cambio en la fracción 250-63 µm vemos que las relaciones se comportan de manera opuesta para los oligotróficos, aumentando en la ΔN-SD y disminuyendo en la ΔN-LC; en cambio las bacterias copiotróficas ambas relaciones presentan la misma tendencia pero los cambios son mayores en la ΔN-SD y cercanos a cero en la ΔN-LC. En las fracciones 20-2 µm, los filos y clases bacterianos de ambas relaciones se comportan de manera opuesta al igual que sucede con los grupos microbianos principales. Esto nos reafirma la sensibilidad de esta fracción de agregados frente a los cambios de manejos. Estas observaciones sugieren que el ensamblaje de las comunidades microbianas del suelo serían el resultado de las influencias de los manejos agrícolas que modifican la distribución y composición de sus microagregados, muy probablemente como producto de la actividad biológica de las comunidades microbiológicas que se ensamblan. Es decir, los cambios de manejos tendrían efectos directos e indirectos sobre las comunidades microbianas, resultando un nuevo desafío para la ciencia elucidar los mecanismos de respuesta de las comunidades microbianas.

Anexo I

Desarrollo y puesta a punto del Sistema Biosensor de Oxígeno basado en PtTFPP

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

A.1) Introducción

Garland y Mills desarrollaron un ensayo rápido y barato para caracterizar comunidades microbianas conocido como Perfil fisiológica a nivel de comunidades (CLPP, por sus siglas en ingles; Garland & Mills, 1991). El CLPP es una técnica en micro-placa que mide la respiración aeróbica heterotrófica de los microbios del suelo en respuesta a la presencia o ausencia de fuentes de carbono y nitrógeno suplementadas. Estos análisis aportan una gran cantidad de información fisiológica que describe a las comunidades microbianas, que se obtiene en un periodo breve de tiempo (24 - 48 hs).

Este anexo comenzó a desarrollarse cuando recién se comenzó esta tesis de doctorado. En 2003, se publicó el trabajo "*Community-Level Physiological Profile perfomed with an Oxygen-sensitive flourophore in microtiter plate*" de Garland, Roberts, Leveni y Mills, en el cual establecían que las micro-placas BD Oxygen Biosensor System (BDOBS) eran capaces de producir respuestas fluorescentes a partir comunidad rizosferica expuesta a dos tipos diferentes de detergentes surfactantes (Garland et al., 2003).

En el 2011, cuando comenzamos a idear este camino, la idea original era estudiar la respiración inducida por sustrato en profundidad. Qué efecto tienen las diferentes fuentes de carbono, quienes las consumen, que pasa cuando se agrega diferentes macro y micro nutrientes como nitrógeno, fosforo, azufre o elementos traza.

La historia cambio cuando en 2012 la empresa BD dejo de fabricar las placas BDOBS. Por lo cual nos encontramos con un problema. Por lo cual decidimos fabricarlos nosotros. En los últimos años se desarrollado una serie de sensores basados en un flourosforo orgánicos foto-luminiscentes que en presencia de O_2 con el fin de medir este gas en superficies solidas. Muchos sensores de O_2 ópticos están compuestos por colorantes orgánicos como hidrocarburos policíclicos aromáticos, complejos metales transitivos y metaloporfirinas inmovilizadas en polímeros permeables al O_2 como matriz (Papkovsky & Dmitriev, 2013; Amao et al., 2001).

En esta sección se describe el desarrollo y puesta a punto de la fabricación de un sistema biosensor de oxigeno (OBS, ***o**xygen **b**iosensor **s**ystem*). Para lo cual se utilizó el flourosforo PtTFPP, o mejor conocido como *5,10, 15, 20-Tetrakis-(2, 3, 4, 5, 6-pentafenilflourofenil)-porfirina-Pt(II)*, que tiene la capacidad de ser sensible al O_2, es decir, que mientras más oxigeno haya presente en pocillo menor será la fluorescencia que emita esta molécula. El PtTFPP fue encapsulado en micro gotas de poliestireno, es cual es disuelto por medio del cloroformo.

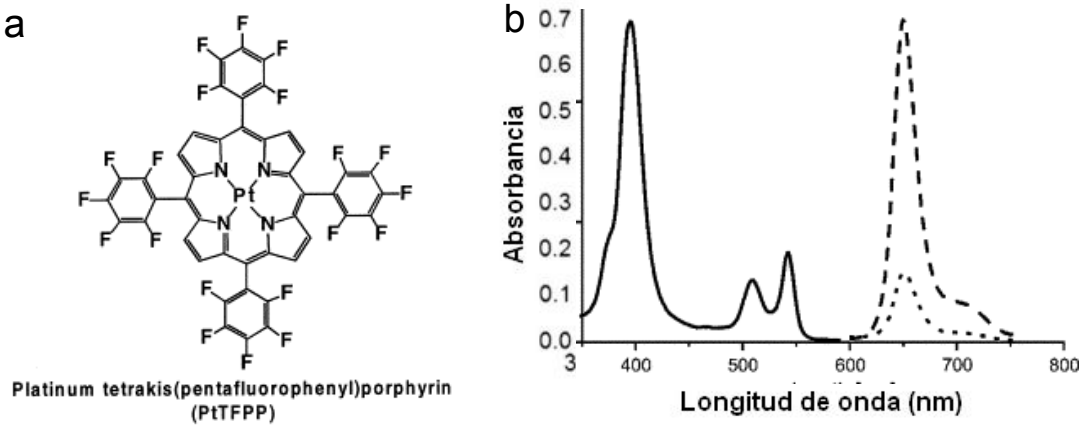

Figura A.1: Estructura (a) y espectro de absorción (b) del PtTFPP inmovilizado en una microplaca de 96 pocillos. Amao et al., (2001) y Schmälzlin et al., (2005).

El poliestireno es hidrofóbico e de naturaleza inerte lo que lo hace compatible con las células vivas. EL PtTFPP fue elegido por su alta estabilidad fotoquímica y su completa insolubilidad en agua (Schmälzlin et al., 2005).

A.2) Materiales y Métodos

A.2.1) Protocolo de diseño del OBS.

Para preparar las microplacas de 96 pocillos sensibles al oxígeno se siguió el protocolo de McLaramore et al., (2010), se pesaron 570 mg de poliestireno (Sigma, E.E.U.U.) disueltos en 7,5 g de cloroformo (Anendra, Argentina). La solución fue mezclada en un vortex hasta que el poliestireno estuvo totalmente disuelto. Posteriormente se agregó 0,03 g (0,4 %) de PtTFPP (5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafenilflourofenil)-porfirina-Pt(II), TriPorTech GmbH, Alemania) y fue disuelto en las soluciones. Los viales fueron inmediatamente mezclados con el vortex durante 30 segundos. Posteriormente, 1125 mg de óxido de titanio (IV) fueron agregados a la solución con el flourosforo y se mezcló en el vortex. Se alicuotó 50 µl de la solución en cada pocillo, y las placas fueron inmediatamente centrifugadas a 2000 rpm durante 30 min para asegurar una homogénea distribución de las membrana sensible al O_2 en el fondo de la placa y evitar que se quiebren. Posteriormente se dejo evaporar el cloroformo a 4º C para evitar el surgimiento de burbujas.

A2.2) Ensayo de centrifugación con cloroformo.

Se probó con dos tipos de placa de dos marcas diferentes. Se utilizó una microplaca de 96 pocillos marca Garmin (Italia) y una placa marca Costar (E.E.U.U.).

Se preparó una solución de poliestireno disuelto en cloroformo según las especificaciones de la sección A2.1 y se agregó 50 µl de la solución en cada pocillo. Posteriormente se centrifugo las placas a 2000 rpm durante tres tiempos distintos: 20, 25 y 30 min buscando ver el tiempo posible de centrifugación antes de que la placa se dañe producto del efecto del cloroformo sobre la placa.

A2.3) Ensayo con diferentes concentraciones de PtFTPP.

Se construyeron placas llevando a cabo el protocolo de la sección A2.1, con tres concentraciones diferentes de PtFTPP: 0,1, 0,2 y 0,4%. Se hicieron mediciones con el agregado de 240 µl agua y con la misma cantidad de sulfito de sodio (Na_2SO_3; Carlos Erba, Argentina) como único agregado en los pocillos.

Posteriormente se realizaron mediciones con el agregado de 160 µl de cultivo bacteriano de *Pseudomona Protegens* saturado en tres diluciones diferentes: 10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5} y 80 µl de H_20_d.

Posteriormente se llevaron a cabo mediciones con soluciones de suelo. En cada pocillo se agregó 160 µl de una solución de suelo (1g de suelo en 10 ml de H_20_d) 80 µl de H_20_d.

A2.4) Ensayo con diferentes concentraciones de Oxido de Titanio (IV).

Se construyeron placas llevando a cabo el protocolo de la sección A2.1, con tres concentraciones diferentes de TiO_2 (IV): 0, 1,5, 3 y 4,5%. Además se construyó una placa con 1,5% de TiO_2 en las columnas 1 a 6 y de la 7 a 12 no se agregó el TiO_2.

Posteriormente se llevaron a cabo mediciones con soluciones de suelo. En cada pocillo se agregó 160 µl de una solución de suelo (1g de suelo en 10 ml de H_20_d) 80 µl de H_20_d.

A2.5) Caracterización del PtFTPP en la placa.

Para llevar a cabo una caracterización de la placa se realizó un espectro completo de absorbancia (PolarStar Omega, BgmH, Alemania).

Se construyeron placas llevando a cabo el protocolo de la sección A2.1 y se hicieron mediciones con el agregado de 240 µl agua y con la misma cantidad de sulfito de sodio (Na_2SO_3; Carlos Erba, Argentina) como único agregado en los pocillos. Se realizaron medidas independientes durante una hora a las siguientes temperaturas: 25º, 26º, 27º, 28º, 29º y 30º C.

A2.6) Comparación entre las placas OBS y BDOBS.

Se utilizaron placas BDOBS (capitulo 2) para comparar con las placas OBS de fabricación propia. La microplaca BDOBS se midió desde arriba y desde abajo, para comparar como la solución de suelo altera la lectura del flouróforo.

Para ello se prepararon dos soluciones con dos muestras de suelo diferentes, una pertenecientes a muestras de suelo en siembra directa y otra en labranza convencional de las muestras de Funke de 2014. Se prepararon una solución de 1 g de suelo y 5 ml de H_2O_d estéril. En cada pocillo se agregó 160 µl de la solución de suelo y 80 µl de H_2O_d estéril.

Posteriormente se analizaron los perfiles obtenidos por medio de métodos multivariados (Capítulo 2).

A2.7) Métodos de esterilización.

Se compararon diferentes métodos de esterilización por medio del agregado de medio NYB, y posterior lectura. Se compararon los métodos: oxido de etileno; alcohol 70% y radiación UV.

A.2.8) Análisis de la información de la fluorescencia.

Para la medición del PtFTPP se utilizó la "fluorescencia resuelta en el tiempo" (TRF, ***t**ime **r**esolved **f**lourescence*) los filtros de 544 nm de excitación y 620±20 nm de emisión con 12 µseg de integración. El TRF nos permite monitorear una muestra durante un periodo de tiempo, que consta de microsegundos posteriormente a excitarla. En cambio para el sistema BDOBS se excito a 485 nm y se utilizó el mismo filtro 620±20 nm de emisión.

Los datos de las cinéticas fluorescentes son reportados como unidades fluorescentes relativas normalizadas (NRFU) al dividir el dato en cada tiempo por el dato a 1 hora de haber comenzado (Garland et al., 2003). El tiempo de respuesta mínima (TMR) fue definido como el tiempo que requiere la NRFU para incrementarse en un 10% o alcanzar el valor de 1.1. La respuesta fluorescente suele mostrar un pico máximo de actividad, el cual corresponde al punto de menor concentración de oxígeno disuelto en matriz, debido a que la actividad respiratoria declina posteriormente ya que se agota el sustrato fácilmente disponible, y la continua difusión del oxígeno hacia la solución regenera la concentración del mismo en la matriz. Este pico de la respuesta fluorescente (Fmax) en cada muestra es utilizado como otro indicador de la actividad respiratoria; ya que asumiendo una tasa de difusión constante, la mínima concentración de O_2 disuelto debería reflejar la cantidad máxima de consumo de O_2. Para estimar la respuesta temprana, se determinó el área integrada bajo la curva a las 8 horas (AUC8) de haber comenzado la cinética. Y para evaluar la actividad completa de las comunidades microbianas, se determinó el área integrada bajo la curva a las 24 horas (AUC24), cuando el pico máximo paso y la actividad está en clara declinación.

A2.9) Análisis estadístico.

Las diferencias entre los tratamientos agrícolas fueron testeados con análisis múltiple de la varianza (MANOVA), y usando el test de Hostelling ($P < 0,05$) para mirar las diferencias significativas para cada fuente de carbono entre los diferentes sistemas de medición de O_2. La relación entre los tratamientos fue visualizada utilizando Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) para cada distancia (Distancia Euclidea) entre dos

tratamientos. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo usando el programa INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2015).

A.3 Resultados y discusión.

A3.1 Aspectos físicos del sistema OBS

El primer aspecto que se observó cuando se comenzó a diseñar el sistema OBS fue la microplaca. Debido a que la matriz de poliestireno que contiene el PtTFPP se disuelve en cloroformo, lo primero que se tenía que probar era que la microplaca soportara la centrifugación con el material corrosivo para ella misma. Dos tipos de placas se utilizaron, la placa Garmin sufrió un gran deterioro e incluso pérdida de material para todos los tiempos analizados. En cambio, la placa Costar no sufrió daños dentro de los 20 o 25 min de centrifugación (Figura A.2). A los 30 min ambas placas sufrían deterioros.

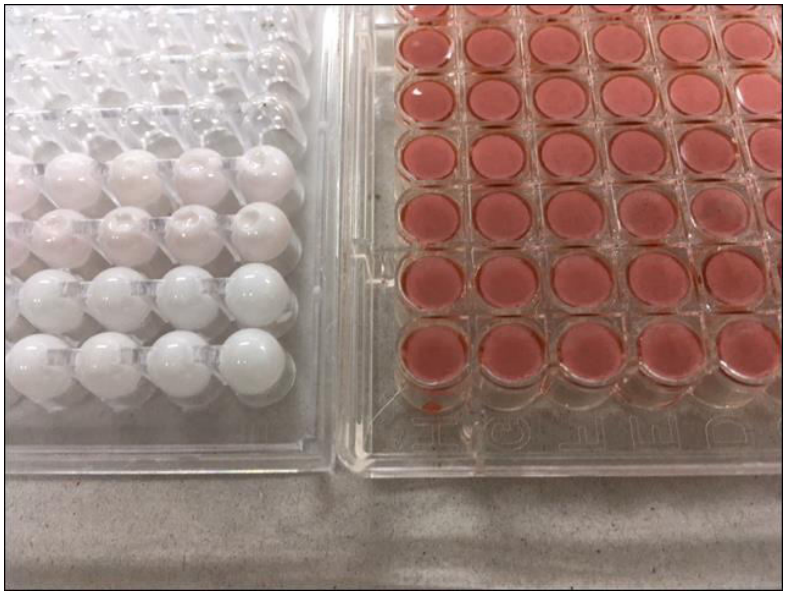

Figura A.2: placas con poliestireno centrifugadas durante 25 min. Izq: Placa Garmin; der: Placa Costar.

Además se comparó la posterior formación de burbujas en la matriz de poliestireno si se dejaba secar a temperatura ambiente o a 4º C. Y se encontró que si las placas con el poliestireno disuelto en cloroformo se la dejaban secar a menor temperatura, el tamaño y la cantidad de burbujas era menor en comparación con las placas que se dejaban airear a temperatura ambiente. Esto fue observado a ojo por medio de una lupa.

A3.2 Ensayo con diferentes concentraciones de PtFTPP.

Se prepararon matrices sensibles al O_2 con diferentes concentraciones de PtTFPP (mientras se mantuvo la concentración de poliestireno y cloroformo constante). El incremento promedio entre el flourosforo depositado en la matriz con una solución acuosa y con una solución de Na_2SO_3, que tiene la capacidad de absorber todo el oxígeno disuelto en la solución acuosa, es cerca del doble (Figura A.3).

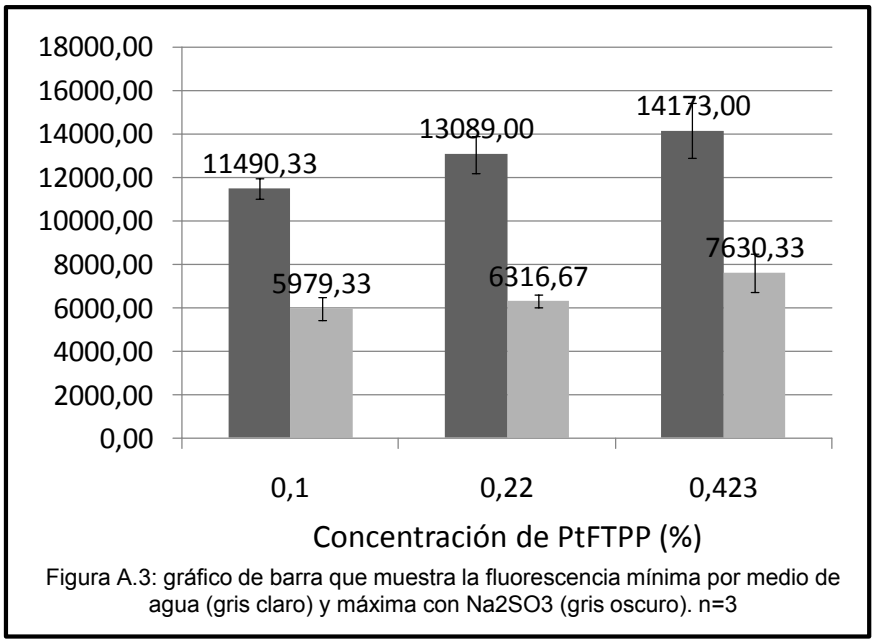

Figura A.3: gráfico de barra que muestra la fluorescencia mínima por medio de agua (gris claro) y máxima con Na2SO3 (gris oscuro). n=3

Posteriormente se realizaron perfiles fisiológicos con tres concentraciones diferentes de bacterias *Pseudomas Protegens,* con el fin de ver la respuesta máxima normalizada a NRFU (Figura A.4). Se observó que las tres concentraciones de bacterias $1x10^3$, $1x10^4$ y $1x10^5$, responden de manera similar a las tres concentraciones de PtTFPP, e incluso no se presentan diferencias significativas entre las curvas con diferentes concentraciones de PtTFPP (P = 0,71) cuando se analiza por medio de ANOVAM.

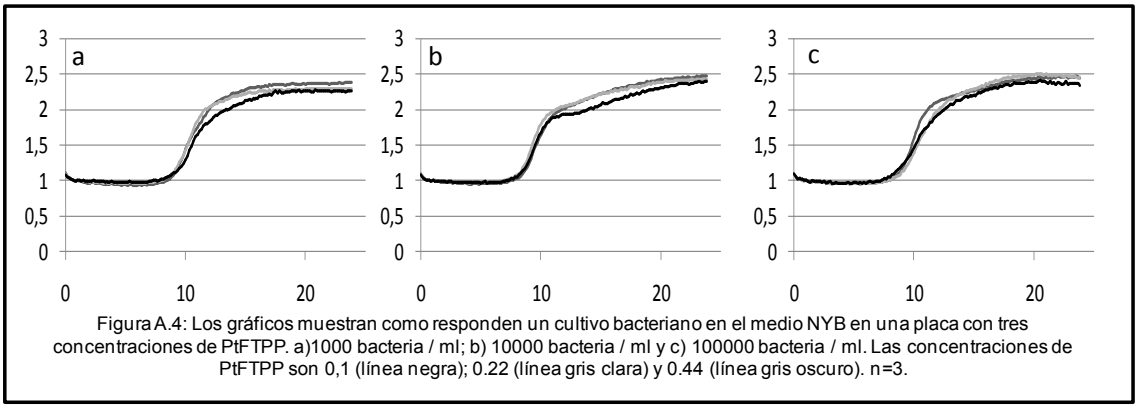

Figura A.4: Los gráficos muestran como responden un cultivo bacteriano en el medio NYB en una placa con tres concentraciones de PtFTPP. a)1000 bacteria / ml; b) 10000 bacteria / ml y c) 100000 bacteria / ml. Las concentraciones de PtFTPP son 0,1 (línea negra); 0.22 (línea gris clara) y 0.44 (línea gris oscuro). n=3.

Dado que las tres concentraciones de PtTFPP muestran una respuesta similar se decidió optar por la concentración de bibliografía (McLamore et al., 2014).

A3.3) Ensayo con diferentes concentraciones de Oxido de Titanio (IV).

Cuando comparamos los trabajos publicados McLamore et al., (2010) con el posterior trabajo del mismo autor del 2014, observamos que en el primero se debía agregar TiO_2 y en el segundo protocolo ya no estaba. Por lo cual se decidió probar con diferentes concentraciones de TiO_2 manteniendo la concentración del resto de reactivos constante: 0%, 1,5%, 3% y 4,5%. La mayor fluorescencia se obtuvo con el agregado 1,5 %, posteriormente sin TiO_2 y el agregado de un 3% emitieron señales similares y finalmente el 4,5% emitió una cantidad sensiblemente menor que el resto de las curva (Figura A.5a). Esto probablemente se deba a que a concentraciones bajas el TiO_2facilite la difusión del oxígeno y a medida que aumenta su concentración opaca la señal de PtTFPP (). Posteriormente se fabricó una placa donde la mitad de la misma no contenía el agregado de TiO_2y en la otra mitad se le había agregado 1,5% del óxido. Cuando se utilizó esta microplaca con una solución de suelo para obtener un CPP para comparar, observamos que la forma de las curvas de fluorescencia eran muy similares, sin embargo, con el agregado de TiO_2 aumentaba la señal (Figura A.5b).

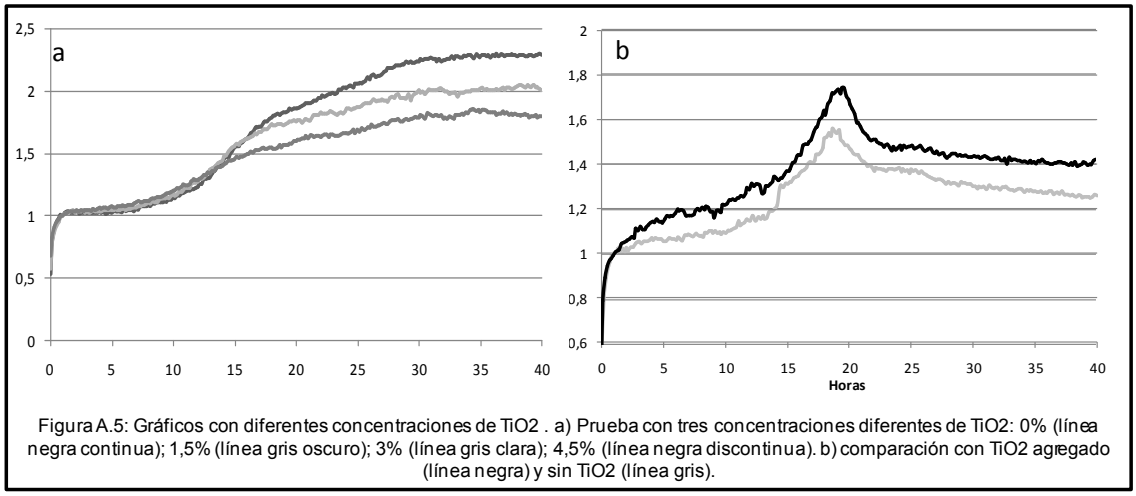

Figura A.5: Gráficos con diferentes concentraciones de TiO2 . a) Prueba con tres concentraciones diferentes de TiO2: 0% (línea negra continua); 1,5% (línea gris oscuro); 3% (línea gris clara); 4,5% (línea negra discontinua). b) comparación con TiO2 agregado (línea negra) y sin TiO2 (línea gris).

A.3.4) Caracterización de la microplaca sensible a O_2.

Como primera medida para caracterizar la matriz con el PtTFPP fue realizar un espectro de absorbancia completo el cual dio de manera similar al de bibliografía

(Figura A.1). Posteriormente se realizó un ensayo con Na2SO3 para analizar como varia el flourosforo con la temperatura. Y se observó que la fluorescencia del PtTFPP disminuye a medida que aumenta la temperatura (Figura A.6).

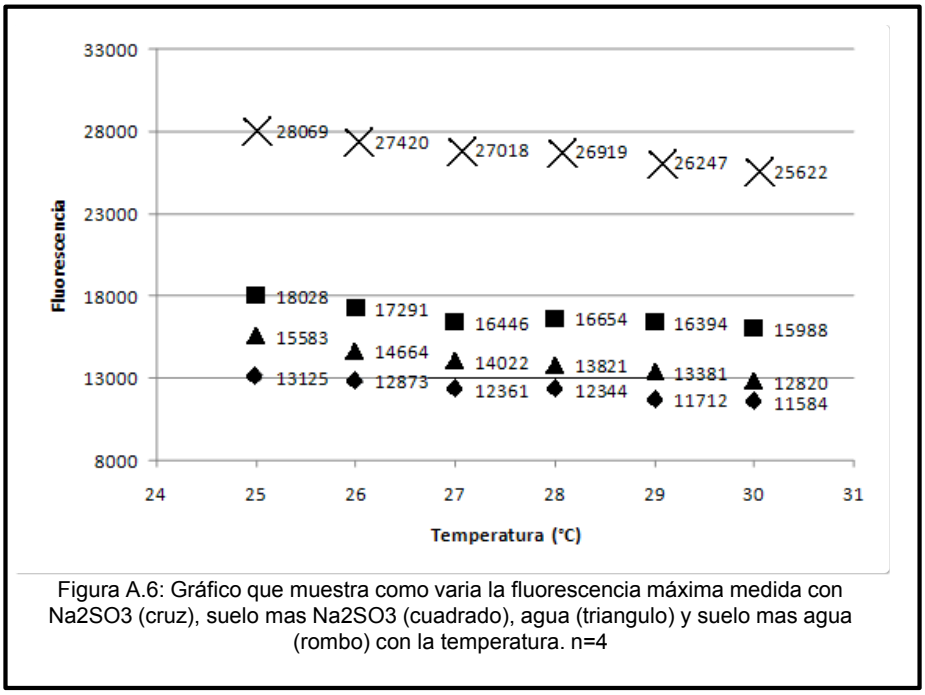

Figura A.6: Gráfico que muestra como varia la fluorescencia máxima medida con Na2SO3 (cruz), suelo mas Na2SO3 (cuadrado), agua (triangulo) y suelo mas agua (rombo) con la temperatura. n=4

Para finalizar la caracterización de la temperatura se realizaron CLPP a 24º y 30º C. Se observó que la a 24º C la curvas de respuesta de la fluorescencia no presenta actividad o lo hacen de manera muy baja, probablemente debido a que los microorganismos del suelo presentes en el pocillo de la microplaca tenga una actividad muy baja a esa temperatura, en comparación con la actividad a 30ºC (información no mostrada).

A.3.5) Comparación entre las placas OBS y BDOBS.

Una vez definido el protocolo de diseño de las microplacas sensible a O_2 y con un mínimo de conocimientos se decidió comparar con las tradicionales placas BDOBS. Para ello se utilizaron muestras de suelo de dos sistemas de cultivos diferentes, la siembra directa y la labranza convencional. Cuando se analizaron los parámetros medidos para el sistema OBS y para BDOBD medido de manera tradicional (desde abajo) por medio del ANOVA, se observó que todos los parámetros son significativamente diferentes. En cambio cuando comparamos el sistema OBS con el sistema BDOBS pero ahora con la lectura desde arriba se observó que las diferencias entre los sistemas disminuían. Por lo cual se pudo incidir en que la gran diferencia entre los sistemas está en la forma de medición más que en el flourosforo. Debido a

que el suelo interfiere en la lectura cuando se lo hace desde arriba, lo cual hace que se pierda intensidad (figura A.7).

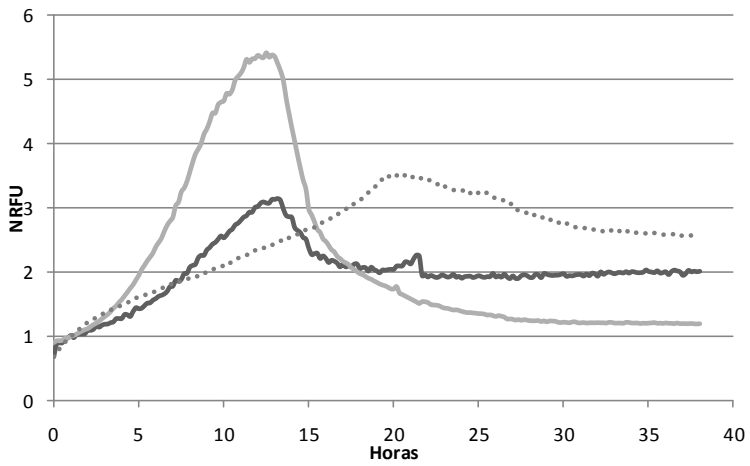

Figura A.7: Curvas de fluorescencia comparando las placas BDOBS medida desde arriba (línea oscura); BDOBS medida desde abajo (línea clara); OBS de fabricación propia (línea punteada) .

Además se analizó por un método multivariado los CLPP producidos por cada sistema sensible al O_2 y se observo que el sistema OBS presenta niveles similares a los producidos por el BDOBS medido desde debajo de manera tradicional. El ACoP explica una variación de 58,5 y 24,5% para los CP1 y CP2, respectivamente (figura A.8). La distribución de las muestras presenta que los sistemas que miden desde arriba se encuentran hacia el negativo del CP1 y la muestras producidas por el sistema BDOBS medida por la parte inferior de la placa se localizan hacia el lado positivo. Cuando comparamos las dos muestras vemos que la mayor distancia se encuentra en los CLPPP medidos por el OBS de fabricación propia. Cuando se realizó en ANOVAM para comparar las muestras de los dos sistemas de cultivo se observa que el OBS separa los tratamientos en las cuatro fuentes de C, en cambio el BDOBS medido desde abajo lo hace para las tres fuentes de C

	$BDOBS_{abajo}$	$BDOBS_{arriba}$	OBS
RB	n.s.	n.s.	0,0293
C	0,0175	n.s.	0,0001
P	0,0042	n.s.	0,0108
V	0,0134	0,0093	0,0364

Tabla A.1: ANOVAM para los medidas con el biosensor BDOBS desde arriba (círculos) y desde abajo (cuadrados) y el sistema OBS (triángulos). Donde se compara las submuestras de SD y LC.

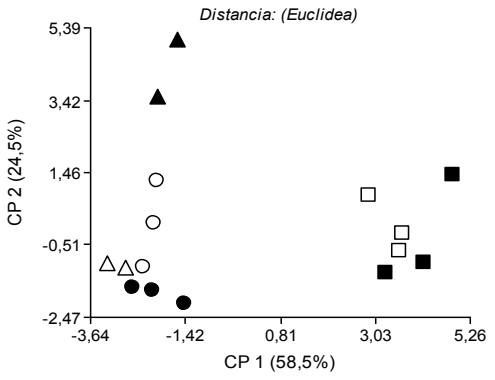

Figura A.8: ACoP. que muestra la distribución de las muestras medidas con el biosensor BDOBS desde arriba (círculos) y desde abajo (cuadrados) y el sistema OBS (triángulos). Donde se compara las submuestras de SD y LC

agregadas. Finalmente el DBOBS medidos desde arriba, solo separa una fuente de C.

A.3.6) Métodos de esterilización.

Finalmente se buscó el mejor método para descontaminar y poder reutilizar las microplacas OBS sensibles al O_2. Se realizaron pruebas con tres métodos diferentes: alcohol 70%, radiación UV y óxido de etileno.

Tanto el alcohol como la radiación UV probaron ser ineficientes a la hora de poder esterilizar las microplacas utilizadas cuando se agregaba medio rico como el NYB para ver si había respiración y/o crecimiento. Solo disminuían la carga microbiana, demorando el inicio de la curva de fluorescencia al menos 12 horas. Por el contrario, el óxido de etileno probó ser suficiente para esterilizar cada pocillo (Figura A.9) Estos resultados se encuentran en concordancia con los de otros autores (McLamore et al., 2014; Zajko & Klimant, 2013; Birmele et al., 2006).

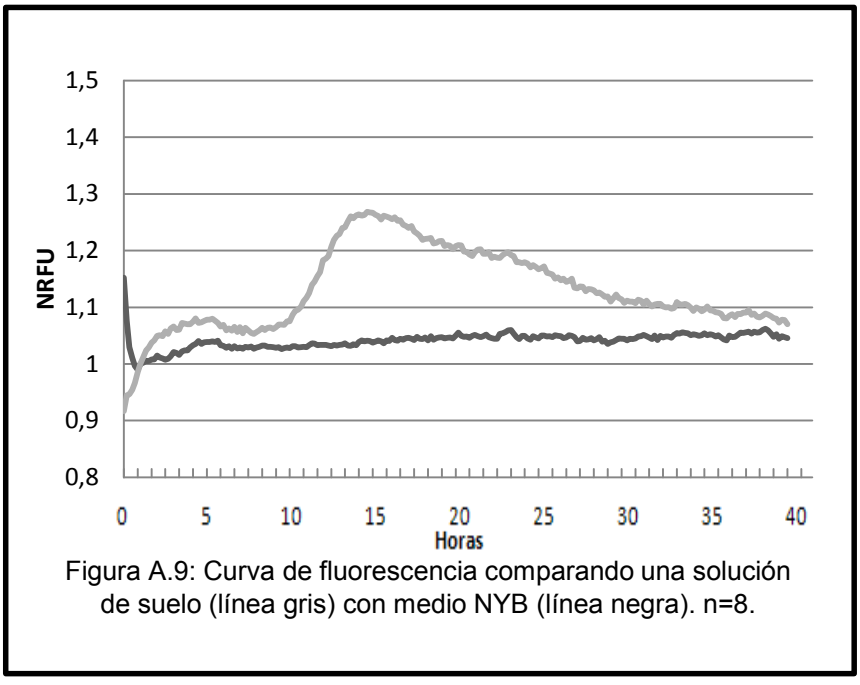

Figura A.9: Curva de fluorescencia comparando una solución de suelo (línea gris) con medio NYB (línea negra). n=8.

A.4 Conclusiones

Estudios previos han mostrado la utilidad de los sistemas sensibles a O_2 e incluso es utilizado a lo largo de toda esta tesis de doctorado con el fin de estudiar las comunidades microbianas del suelo e incidir en la fisiología de los suelos por medio de su capacidad metabólica. El estudio fisiológico es llevado a cabo en un corto periodo de tiempo (24 h) por medio del monitoreo de la actividad respiratoria aeróbica utilizando una microplaca con una matriz que contiene un material fluorescente sensible al O_2. Para esto desarrollamos un método propio basado en trabajos de otros investigadores (McLamore et al., 2014, 2010; Schmälzlin et al., 2005; Amao et al., 2001). Podemos concluir que **el sistema en microplaca sensible a O_2 llamado OBS es un método factible para realizar mediciones de consumo de O_2 y llevar a cabo CLPP, que además provee resultados robustos y altamente reproducibles.**

Bibliografía

Acosta-Martínez, V., Dowd, S., Sun, Y., Allen, V., 2008. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. Soil Biol. Biochem. 40, 2762–2770.

Albertengo, J., Belloso, C., Giraudo, M.B., Peiretti, R., Permingeat, H., Wall, L., 2013. 15 Conservation Agriculture in Argentina. Conserv. Agric. Glob. Prospects Chall. 352.

Al-Kaisi, M.M., 2001. Impact of tillage and crop rotation systems on soil carbon sequestration. Iowa State University, University Extension.

Allegrini, M., Zabaloy, M.C., Gómez, E. del V., 2015. Ecotoxicological assessment of soil microbial community tolerance to glyphosate. Sci. Total Environ. 533, 60–68.

Allison, S.D., Jastrow, J.D., 2006. Activities of extracellular enzymes in physically isolated fractions of restored grassland soils. Soil Biol. Biochem. 38, 3245–3256.

Allison, S.D., Lu, Y., Weihe, C., Goulden, M.L., Martiny, A.C., Treseder, K.K., Martiny, J.B., 2013. Microbial abundance and composition influence litter decomposition response to environmental change. Ecology 94, 714–725.

Allison, S.D., Vitousek, P.M., 2005. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. Soil Biol. Biochem. 37, 937–944.

Allison, S.D., Weintraub, M.N., Gartner, T.B., Waldrop, M.P., 2010. Evolutionary-economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function, in: Soil Enzymology. Springer, pp. 229–243.

Allmaras, R.R., Schomberg, H.H., Douglas, C.L., Dao, T.H., 2000. Soil organic carbon sequestration potential of adopting conservation tillage in US croplands. J. Soil Water Conserv. 55, 365–373.

Alvarez, R., Steinbach, H.S., 2009. A review of the effects of tillage systems on some soil physical properties, water content, nitrate availability and crops yield in the Argentine Pampas. Soil Tillage Res. 104, 1–15.

Alvear, M., Rosas, A., Rouanet, J.L., Borie, F., 2005. Effects of three soil tillage systems on some biological activities in an Ultisol from southern Chile. Soil Tillage Res. 82, 195–202.

Amao, Y., Miyashita, T., Okura, I., 2001. Platinum tetrakis (pentafluorophenyl) porphyrin immobilized in polytrifluoroethylmethacrylate film as a photostable optical oxygen detection material. J. Fluor. Chem. 107, 101–106.

Anderson, J.P., 1982. Soil respiration. Methods Soil Anal. Part 2 Chem. Microbiol. Prop. 831–871.

Andrews, S.S., Mitchell, J.P., Mancinelli, R., Karlen, D.L., 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. Agron. J. 94, 12–23.

Angel, R., Soares, M.I.M., Ungar, E.D., Gillor, O., 2010. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. ISME J. 4, 553–563.

Angers, D.A., Caron, J., 1998. Plant-induced changes in soil structure: processes and feedbacks, in: Plant-Induced Soil Changes: Processes and Feedbacks. Springer, pp. 55–72.

Auguet, J.-C., Casamayor, E.O., 2013. Partitioning of Thaumarchaeota populations along environmental gradients in high mountain lakes. FEMS Microbiol. Ecol. 84, 154–164.

Bach, E.M., Hofmockel, K.S., 2015. A time for every season: soil aggregate turnover stimulates decomposition and reduces carbon loss in grasslands managed for bioenergy. GCB Bioenergy n/a-n/a. doi:10.1111/gcbb.12267

Bach, E.M., Hofmockel, K.S., 2014. Soil aggregate isolation method affects measures of intra-aggregate extracellular enzyme activity. Soil Biol. Biochem. 69, 54–62.

Bailey, V.L., Smith, A.P., Tfaily, M., Fansler, S.J., Bond-Lamberty, B., 2017. Differences in soluble organic carbon chemistry in pore waters sampled from different pore size domains. Soil Biol. Biochem. 107, 133–143.

Balesdent, J., Chenu, C., Balabane, M., 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. Soil Tillage Res. 53, 215–230.

Bandick, A.K., Dick, R.P., 1999. Field management effects on soil enzyme activities. Soil Biol. Biochem. 31, 1471–1479.

Banning, N.C., Lalor, B.M., Cookson, W.R., Grigg, A.H., Murphy, D.V., 2012. Analysis of soil microbial community level physiological profiles in native and post-mining rehabilitation forest: Which substrates discriminate? Appl. Soil Ecol. 56, 27–34.

Bartlett, J.M., Stirling, D., 2003. A short history of the polymerase chain reaction. PCR Protoc. 3–6.

Bates, S.T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J.G., Walters, W.A., Knight, R., Fierer, N., 2011. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. ISME J. 5, 908–917.

Beare, M.H., Hendrix, P.F., Coleman, D.C., 1994. Water-stable aggregates and organic matter fractions in conventional-and no-tillage soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 58, 777–786.

Beare, M.H., Parmelee, R.W., Hendrix, P.F., Cheng, W., Coleman, D.C., Crossley, D.A., 1992. Microbial and faunal interactions and effects on litter nitrogen and decomposition in agroecosystems. Ecol. Monogr. 62, 569–591.

Beinat, E., Nijkamp, P., 1998. Multicriteria analysis for land-use management. Springer Science & Business Media.

Bengtson, P., Sterngren, A.E., Rousk, J., 2012. Archaeal abundance across a pH gradient in an arable soil and its relationship to bacterial and fungal growth rates. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5906–5911.

Birmele, M., Roberts, M., Garland, J., 2006. Characterization of methods for determining sterilization efficacy and reuse efficiency of oxygen biosensor multiwell plates. J. Microbiol. Methods 67, 619–623.

Blanco-Canqui, H., Shapiro, C.A., Wortmann, C.S., Drijber, R.A., Mamo, M., Shaver, T.M., Ferguson, R.B., 2013. Soil organic carbon: The value to soil properties. J. Soil Water Conserv. 68, 129A–134A.

Blaud, A., Chevallier, T., Virto, I., Pablo, A.-L., Chenu, C., Brauman, A., 2014. Bacterial community structure in soil microaggregates and on particulate organic matter fractions located outside or inside soil macroaggregates. Pedobiologia 57, 191–194.

Bradford, M.A., Jones, T.H., Bardgett, R.D., Black, H.I., Boag, B., Bonkowski, M., Cook, R., Eggers, T., Gange, A.C., Grayston, S.J., others, 2002. Impacts of soil faunal community composition on model grassland ecosystems. Science 298, 615–618.

Bridge, P., Spooner, B., 2001. Soil fungi: diversity and detection. Plant Soil 232, 147–154.

Bronick, Carol Jean, Lal, R., 2005. Soil structure and management: a review. Geoderma 124, 3–22.

Bronick, C. J., Lal, R., 2005. Manuring and rotation effects on soil organic carbon concentration for different aggregate size fractions on two soils in northeastern Ohio, USA. Soil Tillage Res. 81, 239–252.

Brown, A.L., Garland, J.L., Day, F.P., 2009. Physiological profiling of soil microbial communities in a Florida scrub-oak ecosystem: spatial distribution and nutrient limitations. Microb. Ecol. 57, 14–24.

Bru, D., Ramette, A., Saby, N.P.A., Dequiedt, S., Ranjard, L., Jolivet, C., Arrouays, D., Philippot, L., 2011. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. ISME J. 5, 532–542.

Busto, M.D., Perez-Mateos, M., 2000. Characterization of β-d-glucosidase extracted from soil fractions. Eur. J. Soil Sci. 51, 193–200.

Caesar-Tonthat, T.C., 2002. Soil binding properties of mucilage produced by a basidiomycete fungus in a model system. Mycol. Res. 106, 930–937.

Campbell, C.D., Chapman, S.J., Cameron, C.M., Davidson, M.S., Potts, J.M., 2003. A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3593–3599.

Carbonetto, B., Rascovan, N., Álvarez, R., Mentaberry, A., Vázquez, M.P., 2014. Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine Pampas. PloS One 9, e99949.

Carini, P., Marsden, P.J., Leff, J.W., Morgan, E.E., Strickland, M.S., Fierer, N., 2016. Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. bioRxiv 043372.

Carpenter-Boggs, L., Stahl, P.D., Lindstrom, M.J., Schumacher, T.E., 2003. Soil microbial properties under permanent grass, conventional tillage, and no-till management in South Dakota. Soil Tillage Res. 71, 15–23.

Castiglioni, M.G., KRAEMER, F.B., JOSÉ, H., MORRAS, M., 2013. Efecto de la secuencia de cultivos bajo siembra directa sobre la calidad de algunos suelos de la región Pampeana. Rev. Asoc. Argent. Cienc. Suelo 31.

Causarano, H.J., Shaw, J.N., Franzluebbers, A.J., Reeves, D.W., Raper, R.L., Balkcom, K.S., Norfleet, M.L., Izaurralde, R.C., 2007. Simulating field-scale soil organic carbon dynamics using EPIC. Soil Sci. Soc. Am. J. 71, 1174–1185.

Chavarría, D.N., Verdenelli, R.A., Muñoz, E.J., Conforto, C., Restovich, S.B., Andriulo, A.E., Meriles, J.M., Vargas-Gil, S., 2016. Soil microbial functionality in response to the inclusion of cover crop mixtures in agricultural systems. Span. J. Agric. Res. 14, 0304.

Chen, Y., Day, S.D., Wick, A.F., McGuire, K.J., 2014. Influence of urban land development and subsequent soil rehabilitation on soil aggregates, carbon, and hydraulic conductivity. Sci. Total Environ. 494, 329–336.

Christensen, B.T., 2001a. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. Eur. J. Soil Sci. 52, 345–353.

Christensen, B.T., 2001b. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. Eur. J. Soil Sci. 52, 345–353.

Christensen, B.T., 1996. Matching measurable soil organic matter fractions with conceptual pools in simulation models of carbon turnover: revision of model structure, in: Evaluation of Soil Organic Matter Models. Springer, pp. 143–159.

Clapperton, M.J., Chan, K.Y., Larney, F.J., 2007. Managing the Soil Habitat for Enhanced Biological Fertility, in: Abbott, L.K., Murphy, D.V. (Eds.), Soil Biological Fertility. Springer Netherlands, pp. 203–224.

Constancias, F., Prévost-Bouré, N.C., Terrat, S., Aussems, S., Nowak, V., Guillemin, J.-P., Bonnotte, A., Biju-Duval, L., Navel, A., Martins, J.M., others, 2014. Microscale evidence for a high decrease of soil bacterial density and diversity by cropping. Agron. Sustain. Dev. 34, 831–840.

Craine, J.M., Morrow, C., Fierer, N., 2007. Microbial nitrogen limitation increases decomposition. Ecology 88, 2105–2113.

Crowther, T.W., Todd-Brown, K.E.O., Rowe, C.W., Wieder, W.R., Carey, J.C., Machmuller, M.B., Snoek, B.L., Fang, S., Zhou, G., Allison, S.D., others, 2016. Quantifying global soil carbon losses in response to warming. Nature 540, 104–108.

da Silva, A.P., Babujia, L.C., Franchini, J.C., Ralisch, R., Hungria, M., de Fátima Guimarães, M., 2014. Soil structure and its influence on microbial biomass in different soil and crop management systems. Soil Tillage Res. 142, 42–53.

Dai, J., Hu, J., Zhu, A., Lin, X., 2017. No-tillage with half-amount residue retention enhances microbial functional diversity, enzyme activity and glomalin-related soil protein content within soil aggregates. Soil Use Manag.

Davidson, E.A., Janssens, I.A., 2006. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. Nature 440, 165–173.

Davinic, M., Fultz, L.M., Acosta-Martinez, V., Calderón, F.J., Cox, S.B., Dowd, S.E., Allen, V.G., Zak, J.C., Moore-Kucera, J., 2012. Pyrosequencing and mid-infrared spectroscopy reveal distinct aggregate stratification of soil bacterial communities and organic matter composition. Soil Biol. Biochem. 46, 63–72.

Degens, B.P., Harris, J.A., 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. Soil Biol. Biochem. 29, 1309–1320.

Degens, B.P., Schipper, L.A., Sparling, G.P., Vojvodic-Vukovic, M., 2000. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. Soil Biol. Biochem. 32, 189–196.

Deng, S.P., Tabatabai, M.A., 1996. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils. Biol. Fertil. Soils 22, 202–207.

Derpsch, R., Friedrich, T., Kassam, A., Li, H., 2010. Current status of adoption of no-till farming in the world and some of its main benefits. Int. J. Agric. Biol. Eng. 3, 1–25.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2013) InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, n.d.

Dick, R.P., 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health.

Díaz-Zorita, M., Duarte, G.A., Grove, J.H., 2002a. A review of no-till systems and soil management for sustainable crop production in the subhumid and semiarid Pampas of Argentina. Soil Tillage Res. 65, 1–18. doi:10.1016/S0167-1987(01)00274-4

Díaz-Zorita, M., Duarte, G.A., Grove, J.H., 2002b. A review of no-till systems and soil management for sustainable crop production in the subhumid and semiarid Pampas of Argentina. Soil Tillage Res. 65, 1–18.

Domínguez, A., Bedano, J.C., 2016. The adoption of no-till instead of reduced tillage does not improve some soil quality parameters in Argentinean Pampas. Appl. Soil Ecol. 98, 166–176.

Doran, J.W., Parkin, T.B., 1994. Defining and assessing soil quality. Defin. Soil Qual. Sustain. Environ. 1–21.

Dungait, J.A., Hopkins, D.W., Gregory, A.S., Whitmore, A.P., 2012. Soil organic matter turnover is governed by accessibility not recalcitrance. Glob. Change Biol. 18, 1781–1796.

Duval, M.E., Galantini, J.A., Iglesias, J.O., Canelo, S., Martinez, J.M., Wall, L., 2013. Analysis of organic fractions as indicators of soil quality under natural and cultivated systems. Soil Tillage Res. 131, 11–19.

Eichorst, S.A., Kuske, C.R., Schmidt, T.M., 2011. Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum Acidobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 77, 586–596.

Ekenler, M., Tabatabai, M., 2002. β-Glucosaminidase activity of soils: effect of cropping systems and its relationship to nitrogen mineralization. Biol. Fertil. Soils 36, 367–376.

Elliott, E.T., Cambardella, C.A., 1991. Physical separation of soil organic matter. Agric. Ecosyst. Environ. 34, 407–419.

Elliott, E.T., Coleman, D.C., 1988. Let the soil work for us. Ecol. Bull. 23–32.

Elliott, E.T., Paustian, K., Frey, S.D., 1996. Modeling the measurable or measuring the modelable: A hierarchical approach to isolating meaningful soil organic matter fractionations, in: Evaluation of Soil Organic Matter Models. Springer, pp. 161–179.

Ettema, C.H., Wardle, D.A., 2002. Spatial soil ecology. Trends Ecol. Evol. 17, 177–183.

Falkowski, P.G., Fenchel, T., Delong, E.F., 2008. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. science 320, 1034–1039.

Farrar, J., Boddy, E., Hill, P.W., Jones, D.L., 2012. Discrete functional pools of soil organic matter in a UK grassland soil are differentially affected by temperature and priming. Soil Biol. Biochem. 49, 52–60.

Feng, Y., Motta, A.C., Reeves, D.W., Burmester, C.H., Van Santen, E., Osborne, J.A., 2003. Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. Soil Biol. Biochem. 35, 1693–1703.

Fernández, R., Quiroga, A., Zorati, C., Noellemeyer, E., 2010. Carbon contents and respiration rates of aggregate size fractions under no-till and conventional tillage. Soil Tillage Res. 109, 103–109.

Ferrari, A.E., Ravnskov, S., Larsen, J., Tønnersen, 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 Manag. 31, 165–175.

Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007a. Toward an ecological classification of soil bacteria. Ecology 88, 1354–1364.

Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R., Robeson, M., Edwards, R.A., Felts, B., Rayhawk, S., others, 2007b. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. Appl. Environ. Microbiol. 73, 7059–7066.

Fierer, N., Jackson, J.A., Vilgalys, R., Jackson, R.B., 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4117–4120.

Fierer, N., Leff, J.W., Adams, B.J., Nielsen, U.N., Bates, S.T., Lauber, C.L., Owens, S., Gilbert, J.A., Wall, D.H., Caporaso, J.G., 2012. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 21390–21395.

Fierer, N., Strickland, M.S., Liptzin, D., Bradford, M.A., Cleveland, C.C., 2009. Global patterns in belowground communities. Ecol. Lett. 12, 1238–1249. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01360.x

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.

Figuerola, E.L., Guerrero, L.D., Türkowsky, D., Wall, L.G., Erijman, L., 2014. Crop monoculture rather than agriculture reduces the spatial turnover of soil bacterial communities at a regional scale. Environ. Microbiol.

Finn, D., Kopittke, P.M., Dennis, P.G., Dalal, R.C., 2017. Microbial energy and matter transformation in agricultural soils. Soil Biol. Biochem.

Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M.A., Cape, J.N., Reis, S., Sheppard, L.J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J.N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A.F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M., Voss, M., 2013. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. Phil Trans R Soc B 368, 20130164. doi:10.1098/rstb.2013.0164

Franzluebbers, A.J., Arshad, M.A., 1996. Soil organic matter pools during early adoption of conservation tillage in northwestern Canada. Soil Sci. Soc. Am. J. 60, 1422–1427.

Franzluebbers, A.J., Haney, R.L., Hons, F.M., Zuberer, D.A., 1996. Active fractions of organic matter in soils with different texture. Soil Biol. Biochem. 28, 1367–1372.

Frosteg\a ard, \AA, B\a a\a ath, E., 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. Biol. Fertil. Soils 22, 59–65.

Frosteg\a ard, \AAsa, Tunlid, A., B\a a\a ath, E., 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3605–3617.

Galantini, J.A., Duval, M., Iglesias, J., Martinez, J.M., 2013. Efectos de largo plazo de la siembra directa en el SO Bonaerense: Dinámica y balance de carbono. Cienc. Exp. Para Una Siembra Directa Sustentable En Los Ambient. Frágiles Bonaer. 27.

Galantini, J.A., Iglesias, J.O., Maneiro, C., Santiago, L., Kleine, C., others, 2006. Tillage systems in the SW of Buenos Aires Province. Long-term effects on soil organic fractions and porosity. RIA Rev. Investig. Agropecu. 35, 15–30.

Galantini, J.A., Keine, C., 2013. Efectos de largo plazo de la siembra directa en el SO Bonaerense: Producción de los cultivos y balance de nutrientes. Cienc. Exp. Para Una Siembra Directa Sustentable En Los Ambient. Frágiles Bonaer. 10.

Galantini, J.A., Marban, L., Ratto, S., 2005. Separación y análisis de las fracciones orgánicas. Tecnol. En Análisis Suelos Alcances Aboratorios Agropecu.

García-Orenes, F., Guerrero, C., Roldán, A., Mataix-Solera, J., Cerdà, A., Campoy, M., Zornoza, R., Bárcenas, G., Caravaca, F., 2010. Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. Soil Tillage Res. 109, 110–115.

Garland, J.L., 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. FEMS Microbiol. Ecol. 24, 289–300.

Garland, J.L., Mackowiak, C.L., Zabaloy, M.C., 2010. Organic waste amendment effects on soil microbial activity in a corn–rye rotation: Application of a new approach to community-level physiological profiling. Appl. Soil Ecol. 44, 262–269.

Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. Appl. Environ. Microbiol. 57, 2351–2359.

Garland, J.L., Roberts, M.S., Levine, L.H., Mills, A.L., 2003. Community-level physiological profiling performed with an oxygen-sensitive fluorophore in a microtiter plate. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2994–2998.

Garland, J.L., Zabaloy, M.C., Birmele, M., Mackowiak, C.L., Lehman, R.M., Frey, S.D., 2012. Examining N-limited soil microbial activity using community-level physiological profiling based on O< sub> 2</sub> consumption. Soil Biol. Biochem. 47, 46–52.

Gerzabek, M.H., Haberhauer, G., Kandeler, E., Sessitsch, A., Kirchmann, H., 2002. Response of organic matter pools and enzyme activities in particle size fractions to organic amendments in a long-term field experiment. Dev. Soil Sci. 28, 329–344.

Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M., Ball, A.S., 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1800–1809.

Gomez, E., Garland, J.L., 2012. Effects of tillage and fertilization on physiological profiles of soil microbial communities. Appl. Soil Ecol., Microorganisms and the Sustainable Management of Soil 61, 327–332. doi:10.1016/j.apsoil.2011.10.008

Graham, E.B., Knelman, J.E., Schindlbacher, A., Siciliano, S., Breulmann, M., Yannarell, A., Beman, J.M., Abell, G., Philippot, L., Prosser, J., others, 2016. Microbes as engines of ecosystem function: When does community structure enhance predictions of ecosystem processes? Front. Microbiol. 7.

Green, J.L., Bohannan, B.J., Whitaker, R.J., 2008. Microbial biogeography: from taxonomy to traits. science 320, 1039–1043.

Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., Bailey, M.J., 2003. Influence of depth and sampling time on bacterial community structure in an upland grassland soil. FEMS Microbiol. Ecol. 43, 35–43.

Guggenberger, G., Frey, S.D., Six, J., Paustian, K., Elliott, E.T., 1999. Bacterial and fungal cell-wall residues in conventional and no-tillage agroecosystems. Soil Sci. Soc. Am. J. 63, 1188–1198.

Gupta, V.V.S.R., Germida, J.J., 2015. Soil aggregation: Influence on microbial biomass and implications for biological processes. Soil Biol. Biochem. 80, A3–A9. doi:10.1016/j.soilbio.2014.09.002

Haeckel, E., Lankester, E.R., Schmitz, L.T., 1892. The History of Creation Or The Development of the Earth and Its Inhabitants by the Action of Natural Causes: A Popular Exposition of the Doctrine of Evolution in General, and of that of Darwin, Goethe, and Lamarck in Particular. From the 8. German Ed. of Ernst Haeckel... K. Paul, Trench, Trübner & Company, Limited.

Hagerty, S.B., Van Groenigen, K.J., Allison, S.D., Hungate, B.A., Schwartz, E., Koch, G.W., Kolka, R.K., Dijkstra, P., 2014. Accelerated microbial turnover but constant growth efficiency with warming in soil. Nat. Clim. Change 4, 903–906.

Halverson, L.J., Jones, T.M., Firestone, M.K., 2000. Release of intracellular solutes by four soil bacteria exposed to dilution stress. Soil Sci. Soc. Am. J. 64, 1630–1637.

Hattori, T., 1988. Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. Rep. Inst. Agric. Res. Tohoku Univ. 37, 23–36.

Hawkes, C.V., Waring, B.G., Rocca, J.D., Kivlin, S.N., 2017. Historical climate controls soil respiration responses to current soil moisture. Proc. Natl. Acad. Sci. 201620811.

Haynes, R.J., Naidu, R., 1998. Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: a review. Nutr. Cycl. Agroecosystems 51, 123–137.

Helgason, B.L., Walley, F.L., Germida, J.J., 2010. No-till soil management increases microbial biomass and alters community profiles in soil aggregates. Appl. Soil Ecol. 46, 390–397.

Hemkemeyer, M., Christensen, B.T., Martens, R., Tebbe, C.C., 2015. Soil particle size fractions harbour distinct microbial communities and differ in potential for microbial mineralisation of organic pollutants. Soil Biol. Biochem. 90, 255–265.

Hemkemeyer, M., Pronk, G.J., Heister, K., Kögel-Knabner, I., Martens, R., Tebbe, C.C., 2014. Artificial soil studies reveal domain-specific preferences of microorganisms for the colonisation of different soil minerals and particle size fractions. FEMS Microbiol. Ecol. 90, 770–782.

Hitzl, W., Henrich, M., Kessel, M., Insam, H., 1997. Application of multivariate analysis of variance and related techniques in soil studies with substrate utilization tests. J. Microbiol. Methods 30, 81–89.

Holland, E.A., Coleman, D.C., 1987. Litter placement effects on microbial and organic matter dynamics in an agroecosystem. Ecology 68, 425–433.

Holland, J.M., 2004. The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. Agric. Ecosyst. Environ. 103, 1–25.

Ingham, R.E., Trofymow, J.A., Ingham, E.R., Coleman, D.C., 1985. Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. Ecol. Monogr. 55, 119–140.

Jangid, K., Williams, M.A., Franzluebbers, A.J., Sanderlin, J.S., Reeves, J.H., Jenkins, M.B., Endale, D.M., Coleman, D.C., Whitman, W.B., 2008. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. Soil Biol. Biochem. 40, 2843–2853.

Janssen, P.H., 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1719–1728.

Jiang, X., Wright, A.L., Wang, J., Li, Z., 2011a. Long-term tillage effects on the distribution patterns of microbial biomass and activities within soil aggregates. Catena 87, 276–280.

Jiang, X., Wright, A.L., Wang, X., Liang, F., 2011b. Tillage-induced changes in fungal and bacterial biomass associated with soil aggregates: a long-term field study in a subtropical rice soil in China. Appl. Soil Ecol. 48, 168–173.

Joergensen, R.G., Mueller, T., 1996. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the k EN value. Soil Biol. Biochem. 28, 33–37.

Joner, E.J., Van Aarle, I.M., Vosatka, M., 2000. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: a review. Plant Soil 226, 199–210.

Jones, D.L., Kielland, K., Sinclair, F.L., Dahlgren, R.A., Newsham, K.K., Farrar, J.F., Murphy, D.V., 2009. Soil organic nitrogen mineralization across a global latitudinal gradient. Glob. Biogeochem. Cycles 23.

Kandeler, Ellen, Luxhøi, J., Tscherko, D., Magid, J., 1999a. Xylanase, invertase and protease at the soil–litter interface of a loamy sand. Soil Biol. Biochem. 31, 1171–1179.

Kandeler, E., Marschner, P., Tscherko, D., Singh Gahoonia, T., Nielsen, N.E., 2002. Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. Plant Soil 238, 301–312.

Kandeler, Ellen, Palli, S., Stemmer, M., Gerzabek, M.H., 1999b. Tillage changes microbial biomass and enzyme activities in particle-size fractions of a Haplic Chernozem. Soil Biol. Biochem. 31, 1253–1264.

Kandeler, Ellen, Stemmer, M., Klimanek, E.-M., 1999c. Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. Soil Biol. Biochem. 31, 261–273. doi:10.1016/S0038-0717(98)00115-1

Kandeler, E., Tscherko, D., Bruce, K.D., Stemmer, M., Hobbs, P.J., Bardgett, R.D., Amelung, W., 2000. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. Biol. Fertil. Soils 32, 390–400.

Kandeler, E., Tscherko, D., Spiegel, H., 1999. Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralisation and enzyme activities of a Chernozem under different tillage management. Biol. Fertil. Soils 28, 343–351.

Karlen, D.L., Stott, D.E., 1994. A framework for evaluating physical and chemical indicators of soil quality. Defin. Soil Qual. Sustain. Environ. 53–72.

Karlsson, A.E., Johansson, T., Bengtson, P., 2012. Archaeal abundance in relation to root and fungal exudation rates. FEMS Microbiol. Ecol. 80, 305–311.

Kong, A.Y., Scow, K.M., Córdova-Kreylos, A.L., Holmes, W.E., Six, J., 2011. Microbial community composition and carbon cycling within soil microenvironments of conventional, low-input, and organic cropping systems. Soil Biol. Biochem. 43, 0e30.

Kong, A.Y., Six, J., Bryant, D.C., Denison, R.F., Van Kessel, C., 2005. The relationship between carbon input, aggregation, and soil organic carbon stabilization in sustainable cropping systems. Soil Sci. Soc. Am. J. 69, 1078–1085.

Konopka, A., 2009. What is microbial community ecology? ISME J. 3, 1223–1230. doi:10.1038/ismej.2009.88

Kraft, B., Strous, M., Tegetmeyer, H.E., 2011. Microbial nitrate respiration–genes, enzymes and environmental distribution. J. Biotechnol. 155, 104–117.

Kuramae, E.E., Yergeau, E., Wong, L.C., Pijl, A.S., van Veen, J.A., Kowalchuk, G.A., 2012. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. FEMS Microbiol. Ecol. 79, 12–24.

Ladd, J.N., Foster, R.C., Nannipieri, P., Oades, J.M., 1996. Soil structure and biological activity. Soil Biochem. 9, 23–78.

Lagomarsino, A., Grego, S., Kandeler, E., 2012. Soil organic carbon distribution drives microbial activity and functional diversity in particle and aggregate-size fractions. Pedobiologia 55, 101–110.

Lagomarsino, A., Moscatelli, M.C., Di Tizio, A., Mancinelli, R., Grego, S., Marinari, S., 2009. Soil biochemical indicators as a tool to assess the short-term impact of agricultural management on changes in organic C in a Mediterranean environment. Ecol. Indic. 9, 518–527.

Lal, R., 2015a. Sequestering carbon and increasing productivity by conservation agriculture. J. Soil Water Conserv. 70, 55A–62A. doi:10.2489/jswc.70.3.55A

Lal, R., 2015b. Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. Sustainability 7, 5875–5895. doi:10.3390/su7055875

Lal, R., 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. science 304, 1623–1627.

Lal, R., 1998. Soil erosion impact on agronomic productivity and environment quality. Crit. Rev. Plant Sci. 17, 319–464.

Lal, R., Pierce, F.J., 1997. Soil management for sustainability. FUTURE Horiz. RECENT Lit. Sustain. Agric. 175.

Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5111–5120. doi:10.1128/AEM.00335-09

Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A., Fierer, N., 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. Soil Biol. Biochem. 40, 2407–2415.

Layton, J.B., Skidmore, E.L., Thompson, C.A., 1993. Winter-associated changes in dry-soil aggregation as influenced by management. Soil Sci. Soc. Am. J. 57, 1568–1572.

Leff, J.W., Jones, S.E., Prober, S.M., Barberán, A., Borer, E.T., Firn, J.L., Harpole, W.S., Hobbie, S.E., Hofmockel, K.S., Knops, J.M.H., McCulley, R.L., Pierre, K.L., Risch, A.C., Seabloom, E.W., Schütz, M., Steenbock, C., Stevens, C.J., Fierer, N., 2015. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, 10967–10972. doi:10.1073/pnas.1508382112

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.

Lladó, S., Baldrian, P., 2017. Community-level physiological profiling analyses show potential to identify the copiotrophic bacteria present in soil environments. PloS One 12, e0171638.

Locke, M.A., Zablotowicz, R.M., Reddy, K.N., 2008. Integrating soil conservation practices and glyphosate-resistant crops: impacts on soil. Pest Manag. Sci. 64, 457–469.

Lupwayi, N.Z., Arshad, M.A., Rice, W.A., Clayton, G.W., 2001. Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management. Appl. Soil Ecol. 16, 251–261.

Madsen, E.L., 2005. Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes. Nat. Rev. Microbiol. 3, 439–446.

Mangalassery, S., Mooney, S.J., Sparkes, D.L., Fraser, W.T., Sjögersten, S., 2015. Impacts of zero tillage on soil enzyme activities, microbial characteristics and organic matter functional chemistry in temperate soils. Eur. J. Soil Biol. 68, 9–17.

Manzoni, S., Schaeffer, S.M., Katul, G., Porporato, A., Schimel, J.P., 2014. A theoretical analysis of microbial eco-physiological and diffusion limitations to carbon cycling in drying soils. Soil Biol. Biochem. 73, 69–83.

Maron, P.-A., Mougel, C., Ranjard, L., 2011. Soil microbial diversity: methodological strategy, spatial overview and functional interest. C. R. Biol. 334, 403–411.

Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B., 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. Soil Biol. Biochem. 35, 453–461.

Martens, D.A., 2000. Management and crop residue influence soil aggregate stability. J. Environ. Qual. 29, 723–727.

Martens, D.A., Frankenberger, W.T., 1994. Assimilation of exogenous 2′-14 C-indole-3-acetic acid and 3′-14 C-tryptophan exposed to the roots of three wheat varieties. Plant Soil 166, 281–290.

Marx, M.-C., Kandeler, E., Wood, M., Wermbter, N., Jarvis, S.C., 2005. Exploring the enzymatic landscape: distribution and kinetics of hydrolytic enzymes in soil particle-size fractions. Soil Biol. Biochem. 37, 35–48.

Marx, M.-C., Wood, M., Jarvis, S.C., 2001. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. Soil Biol. Biochem. 33, 1633–1640.

McDaniel, M.D., Tiemann, L.K., Grandy, A.S., 2014. Does agricultural crop diversity enhance soil microbial biomass and organic matter dynamics? A meta-analysis. Ecol. Appl. 24, 560–570.

McGrath, K.C., Thomas-Hall, S.R., Cheng, C.T., Leo, L., Alexa, A., Schmidt, S., Schenk, P.M., 2008. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities. J. Microbiol. Methods 75, 172–176.

McLamore, E.S., Garland, J.L., Mackowiak, C., Desaunay, A., Garland, N., Chaturvedi, P., Taguchi, M., Dreaden, K., Catechis, J., Ullman, J.L., 2014. Development and validation

of an open source O< sub> 2</sub>-sensitive gel for physiological profiling of soil microbial communities. J. Microbiol. Methods 96, 62–67.
Mendes, I.C., Bandick, A.K., Dick, R.P., Bottomley, P.J., 1999. Microbial biomass and activities in soil aggregates affected by winter cover crops. Soil Sci. Soc. Am. J. 63, 873–881.
Miller, M., Dick, R.P., 1995. Dynamics of soil C and microbial biomass in whole soil and aggregates in two cropping systems. Appl. Soil Ecol. 2, 253–261.
Monrozier, L.J., Ladd, J.N., Fitzpatrick, R.W., Foster, R.C., Rapauch, M., 1991. Components and microbial biomass content of size fractions in soils of contrasting aggregation. Geoderma 50, 37–62.
Montecchia, M.S., Tosi, M., Soria, M.A., Vogrig, J.A., Sydorenko, O., Correa, O.S., 2015. Pyrosequencing reveals changes in soil bacterial communities after conversion of Yungas forests to agriculture. PloS One 10, e0119426.
Mummey, D., Holben, W., Six, J., Stahl, P., 2006. Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils. Microb. Ecol. 51, 404–411.
Munkholm, L.J., Hansen, E.M., 2012. Catch crop biomass production, nitrogen uptake and root development under different tillage systems. Soil Use Manag. 28, 517–529. doi:10.1111/sum.12001
Muñoz, A., López-Piñeiro, A., Ramírez, M., 2007. Soil quality attributes of conservation management regimes in a semi-arid region of south western Spain. Soil Tillage Res. 95, 255–265.
Muruganandam, S., Israel, D.W., Robarge, W.P., 2009. Activities of nitrogen-mineralization enzymes associated with soil aggregate size fractions of three tillage systems. Soil Sci. Soc. Am. J. 73, 751–759.
Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. Eur. J. Soil Sci. 54, 655–670.
Nannipieri, P., Sequi, P., Fusi, P., 1996. Humus and enzyme activity. Humic Subst. Terr. Ecosyst. Elsevier Amst. 293–328.
Ndiaye, E.L., Sandeno, J.M., McGrath, D., Dick, R.P., 2000. Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. Am. J. Altern. Agric. 15, 26–36.
Nelson, M.B., Martiny, A.C., Martiny, J.B., 2016. Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, 8033–8040.
Neumann, D., Heuer, A., Hemkemeyer, M., Martens, R., Tebbe, C.C., 2013. Response of microbial communities to long-term fertilization depends on their microhabitat. FEMS Microbiol. Ecol. 86, 71–84.
Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., Prosser, J.I., 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. Environ. Microbiol. 10, 2966–2978.
Nicolás, C., Hernández, T., García, C., 2012. Organic amendments as strategy to increase organic matter in particle-size fractions of a semi-arid soil. Appl. Soil Ecol. 57, 50–58.
Nunan, N., Young, I.M., Crawford, J.W., Ritz, K., 2007. Bacterial interactions at the microscale–linking habitat to function in soil, in: The Spatial Distribution of Microbes in the Environment. Springer, pp. 61–85.
Pandey, D., Agrawal, M., Bohra, J.S., 2014. Effects of conventional tillage and no tillage permutations on extracellular soil enzyme activities and microbial biomass under rice cultivation. Soil Tillage Res. 136, 51–60.
Pandey, D., Agrawal, M., Bohra, J.S., 2012. Greenhouse gas emissions from rice crop with different tillage permutations in rice–wheat system. Agric. Ecosyst. Environ. 159, 133–144.
Panettieri, M., Berns, A.E., Knicker, H., Murillo, J.M., Madejón, E., 2015. Evaluation of seasonal variability of soil biogeochemical properties in aggregate-size fractioned soil under different tillages. Soil Tillage Res. 151, 39–49.

Papkovsky, D.B., Dmitriev, R.I., 2013. Biological detection by optical oxygen sensing. Chem. Soc. Rev. 42, 8700–8732.

Paul, E.A., 2014. Soil microbiology, ecology and biochemistry. Academic press.

Peterson, G.A., Halvorson, A.D., Havlin, J.L., Jones, Or., Lyon, D.J., Tanaka, D.L., 1998. Reduced tillage and increasing cropping intensity in the Great Plains conserves soil C. Soil Tillage Res. 47, 207–218.

Phatak, S.C., Reed, R., Fussell, W., Lewis, W.J., Harris, G.H., 1999. Crimson clover cotton relay cropping with conservation tillage system, in: Proceedings of the 22nd Annual Southern Conservation Tillage Conference for Sustainable Agriculture, Tifton, GA. pp. 184–188.

Philippot, L., Andersson, S.G., Battin, T.J., Prosser, J.I., Schimel, J.P., Whitman, W.B., Hallin, S., 2010. The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. Nat. Rev. Microbiol. 8, 523–529.

Philippot, L., Bru, D., Saby, N., Čuhel, J., Arrouays, D., Šimek, M., Hallin, S., 2009. Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. Environ. Microbiol. 11, 3096–3104.

Pikul, J.L., Carpenter-Boggs, L., Vigil, M., Schumacher, T.E., Lindstrom, M.J., Riedell, W.E., 2001. Crop yield and soil condition under ridge and chisel-plow tillage in the northern Corn Belt, USA. Soil Tillage Res. 60, 21–33.

Pittelkow, C.M., Linquist, B.A., Lundy, M.E., Liang, X., Van Groenigen, K.J., Lee, J., Van Gestel, N., Six, J., Venterea, R.T., Van Kessel, C., 2015a. When does no-till yield more? A global meta-analysis. Field Crops Res. 183, 156–168.

Pittelkow, C.M., Linquist, B.A., Lundy, M.E., Liang, X., van Groenigen, K.J., Lee, J., van Gestel, N., Six, J., Venterea, R.T., van Kessel, C., 2015b. When does no-till yield more? A global meta-analysis. Field Crops Res. 183, 156–168.

Plante, A.F., McGill, W.B., 2002. Soil aggregate dynamics and the retention of organic matter in laboratory-incubated soil with differing simulated tillage frequencies. Soil Tillage Res. 66, 79–92.

Poll, C., Thiede, A., Wermbter, N., Sessitsch, A., Kandeler, E., 2003. Micro-scale distribution of microorganisms and microbial enzyme activities in a soil with long-term organic amendment. Eur. J. Soil Sci. 54, 715–724.

Postma-Blaauw, M.B., De Goede, R.G., Bloem, J., Faber, J.H., Brussaard, L., 2010. Soil biota community structure and abundance under agricultural intensification and extensification. Ecology 91, 460–473.

Prakash, T., Taylor, T.D., 2012. Functional assignment of metagenomic data: challenges and applications. Brief. Bioinform. 13, 711–727. doi:10.1093/bib/bbs033

Qin, S., Hu, C., He, X., Dong, W., Cui, J., Wang, Y., 2010. Soil organic carbon, nutrients and relevant enzyme activities in particle-size fractions under conservational versus traditional agricultural management. Appl. Soil Ecol. 45, 152–159.

Raper, R.L., Reeves, D.W., Burmester, C.H., Schwab, E.B., 2000. Tillage depth, tillage timing, and cover crop effects on cotton yield, soil strength, and tillage energy requirements. Appl. Eng. Agric. 16, 379.

Reeve, J.R., Schadt, C.W., Carpenter-Boggs, L., Kang, S., Zhou, J., Reganold, J.P., 2010. Effects of soil type and farm management on soil ecological functional genes and microbial activities. ISME J. 4, 1099–1107.

Reyna, D.L., Wall, L.G., 2014. Revision of two colorimetric methods to quantify glomalin-related compounds in soils subjected to different managements. Biol. Fertil. Soils 50, 395–400.

Ribaudo, M., Hansen, L., Livingston, M., Mosheim, R., Williamson, J., Delgado, J., 2011. Nitrogen in agricultural systems: Implications for conservation policy.

Rillig, M.C., 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. Can. J. Soil Sci. 84, 355–363.

Roldán, A., Salinas-García, J.R., Alguacil, M.M., Caravaca, F., 2005. Changes in soil enzyme activity, fertility, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. Appl. Soil Ecol. 30, 11–20.

Romaniuk, R., Giuffré, L., Costantini, A., Bartoloni, N., Nannipieri, P., 2014. A comparison of indexing methods to evaluate quality of horticultural soils. Part II. sensitivity of soil microbiological indicators. Soil Res. 52, 409–418.

Rosa, S.M., Behrends Kraemer, F., Soria, M.A., Guerrero, L.D., Morrás, H.J., Figuerola, E.L., 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. Appl. Soil Ecol. 75, 172–180.

Rousk, J., Bååth, E., 2011. Growth of saprotrophic fungi and bacteria in soil. FEMS Microbiol. Ecol. 78, 17–30.

Rousk, J., Bååth, E., 2007. Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios. FEMS Microbiol. Ecol. 62, 258–267.

Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N., 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. ISME J. 4, 1340–1351.

Ruijter, J.M., Lefever, S., Anckaert, J., Hellemans, J., Pfaffl, M.W., Benes, V., Bustin, S.A., Vandesompele, J., Untergasser, A., 2015. RDML-Ninja and RDMLdb for standardized exchange of qPCR data. BMC Bioinformatics 16, 197.

Rusinamhodzi, L., Corbeels, M., Van Wijk, M.T., Rufino, M.C., Nyamangara, J., Giller, K.E., 2011. A meta-analysis of long-term effects of conservation agriculture on maize grain yield under rain-fed conditions. Agron. Sustain. Dev. 31, 657.

Rütting, T., Boeckx, P., Müller, C., Klemedtsson, L., 2011. Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. Biogeosciences 8, 1779–1791.

Salinas-Garcia, J.R., Hons, F.M., Matocha, J.E., 1997. Long-term effects of tillage and fertilization on soil organic matter dynamics. Soil Sci. Soc. Am. J. 61, 152–159.

San Miguel, C., Dulinski, M., Tate, R.L., 2007. Direct comparison of individual substrate utilization from a CLPP study: a new analysis for metabolic diversity data. Soil Biol. Biochem. 39, 1870–1877.

Santos, D., Smucker, A.J.M., Murphy, S.L.S., Taubner, H., Horn, R., 1997. Uniform separation of concentric surface layers from soil aggregates. Soil Sci. Soc. Am. J. 61, 720–724.

Sarkar, A., 1989. Effect of coated and uncoated urea on the carry-over of nitrogen from jute to paddy rice in the humid sub-tropics. Exp. Agric. 25, 177–179.

Schimel, J.P., Schaeffer, S.M., 2015. Microbial control over carbon cycling in soil. Causes Consequences Microb. Community Struct. 155.

Schmälzlin, E., Van Dongen, J.T., Klimant, I., Marmodée, B., Steup, M., Fisahn, J., Geigenberger, P., Löhmannsröben, H.-G., 2005. An optical multifrequency phase-modulation method using microbeads for measuring intracellular oxygen concentrations in plants. Biophys. J. 89, 1339–1345.

Schutter, M., Dick, R., 2001. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. Soil Biol. Biochem. 33, 1481–1491.

Sengupta, A., Dick, W.A., 2015. Bacterial community diversity in soil under two tillage practices as determined by pyrosequencing. Microb. Ecol. 70, 853–859.

Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M.H., Kirchmann, H., Kandeler, E., 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4215–4224.

Sheehy, J., Regina, K., Alakukku, L., Six, J., 2015. Impact of no-till and reduced tillage on aggregation and aggregate-associated carbon in Northern European agroecosystems. Soil Tillage Res. 150, 107–113.

Silva, A.P., Babujia, L.C., Matsumoto, L.S., Guimarães, M.F., Hungria, M., 2013. Bacterial diversity under different tillage and crop rotation systems in an Oxisol of southern Brazil. Open Agric. J. 7, 40–47.

Simmons, B.L., Coleman, D.C., 2008. Microbial community response to transition from conventional to conservation tillage in cotton fields. Appl. Soil Ecol. 40, 518–528.

Simpson, R.T., Frey, S.D., Six, J., Thiet, R.K., 2004. Preferential accumulation of microbial carbon in aggregate structures of no-tillage soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 68, 1249–1255.

Sinsabaugh, R.L., Lauber, C.L., Weintraub, M.N., Ahmed, B., Allison, S.D., Crenshaw, C., Contosta, A.R., Cusack, D., Frey, S., Gallo, M.E., others, 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. Ecol. Lett. 11, 1252–1264.

Sinsabaugh, R.L., Shah, J.J.F., 2012. Ecoenzymatic Stoichiometry and Ecological Theory. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 43, 313–343. doi:10.1146/annurev-ecolsys-071112-124414

Six, J., Elliott, E.T., Paustian, K., 2000. Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. Soil Biol. Biochem. 32, 2099–2103.

Six, J., Elliott, E.T., Paustian, K., 1999. Aggregate and soil organic matter dynamics under conventional and no-tillage systems. Soil Sci. Soc. Am. J. 63, 1350–1358.

Six, J., Feller, C., Denef, K., Ogle, S., Sa, J.C.D.M., Albrecht, A., 2002. Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils-Effects of no-tillage. Agronomie 22, 755–775.

Six, J., Frey, S.D., Thiet, R.K., Batten, K.M., 2006. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. Soil Sci. Soc. Am. J. 70, 555–569.

Six, Johan, Frey, S.D., Thiet, R.K., Batten, K.M., 2006. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. Soil Sci. Soc. Am. J. 70, 555–569.

Smucker, A.J., Park, E.-J., Dorner, J., Horn, R., 2007. Soil micropore development and contributions to soluble carbon transport within macroaggregates. Vadose Zone J. 6, 282–290.

Snapp, S.S., Swinton, S.M., Labarta, R., Mutch, D., Black, J.R., Leep, R., Nyiraneza, J., O'Neil, K., 2005. Evaluating cover crops for benefits, costs and performance within cropping system niches. Agron. J. 97, 322–332.

Soule, T., Anderson, I.J., Johnson, S.L., Bates, S.T., Garcia-Pichel, F., 2009. Archaeal populations in biological soil crusts from arid lands in North America. Soil Biol. Biochem. 41, 2069–2074.

Souza Andrade, D., Colozzi-Filho, A., Giller, K.E., 2002. The soil microbial community and soil tillage, in: Soil Tillage in Agroecosystems. CRC Press.

Souza, R.C., Cantão, M.E., Vasconcelos, A.T.R., Nogueira, M.A., Hungria, M., 2013. Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. Appl. Soil Ecol. 72, 49–61.

Souza, R.C., Hungria, M., Cantão, M.E., Vasconcelos, A.T.R., Nogueira, M.A., Vicente, V.A., 2015. Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes. Appl. Soil Ecol. 86, 106–112.

Spedding, T.A., Hamel, C., Mehuys, G.R., Madramootoo, C.A., 2004. Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems. Soil Biol. Biochem. 36, 499–512.

Stemmer, M., Gerzabek, M.H., Kandeler, E., 1998a. Organic matter and enzyme activity in particle-size fractions of soils obtained after low-energy sonication. Soil Biol. Biochem. 30, 9–17.

Stemmer, M., Gerzabek, M.H., Kandeler, E., 1998b. Invertase and xylanase activity of bulk soil and particle-size fractions during maize straw decomposition. Soil Biol. Biochem. 31, 9–18.

Stevenson, B.A., Sparling, G.P., Schipper, L.A., Degens, B.P., Duncan, L.C., 2004. Pasture and forest soil microbial communities show distinct patterns in their catabolic respiration responses at a landscape scale. Soil Biol. Biochem. 36, 49–55.

Tabatabai, M.A., Dick, W.A., 2002. Enzymes in soil: research and developments in measuring activities. Enzym. Environ. Marcel Dekker N. Y. 567–596.

Tate, K.R., Scott, N.A., Parshotam, A., Brown, L., Wilde, R.H., Giltrap, D.J., Trustrum, N.A., Gomez, B., Ross, D.J., 2000. A multi-scale analysis of a terrestrial carbon budget: is New Zealand a source or sink of carbon? Agric. Ecosyst. Environ. 82, 229–246.

Tiemann, L.K., Grandy, A.S., 2015. Mechanisms of soil carbon accrual and storage in bioenergy cropping systems. Gcb Bioenergy 7, 161–174.

Tiemann, L.K., Grandy, A.S., Atkinson, E.E., Marin-Spiotta, E., McDaniel, M.D., 2015. Crop rotational diversity enhances belowground communities and functions in an agroecosystem. Ecol. Lett. 18, 761–771.

Tilman, D., 1994. Competition and biodiversity in spatially structured habitats. Ecology 75, 2–16.

Tisdall, J.M., Oades, J., 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. J. Soil Sci. 33, 141–163.

Torsvik, V., Øvre\a as, L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 5, 240–245.

Trivedi, P., Delgado-Baquerizo, M., Jeffries, T.C., Trivedi, C., Anderson, I.C., McNee, M., Flower, K., Pal Singh, B., Minkey, D., Singh, B.K., 2017. Soil aggregation and associated microbial communities modify the impact of agricultural management on carbon content. Environ. Microbiol.

Trivedi, P., Rochester, I.J., Trivedi, C., Van Nostrand, J.D., Zhou, J., Karunaratne, S., Anderson, I.C., Singh, B.K., 2015. Soil aggregate size mediates the impacts of cropping regimes on soil carbon and microbial communities. Soil Biol. Biochem. 91, 169–181.

Turbé, A., De Toni, A., Benito, P., Lavelle, Patrick, Lavelle, Perrine, Camacho, N.R., Van Der Putten, W.H., Labouze, E., Mudgal, S., 2010. Soil biodiversity: functions, threats and tools for policy makers.

Väisänen, R.K., Roberts, M.S., Garland, J.L., Frey, S.D., Dawson, L.A., 2005a. Physiological and molecular characterisation of microbial communities associated with different water-stable aggregate size classes. Soil Biol. Biochem. 37, 2007–2016.

Väisänen, R.K., Roberts, M.S., Garland, J.L., Frey, S.D., Dawson, L.A., 2005b. Physiological and molecular characterisation of microbial communities associated with different water-stable aggregate size classes. Soil Biol. Biochem. 37, 2007–2016.

van der Wal, A., van Veen, J.A., Smant, W., Boschker, H.T., Bloem, J., Kardol, P., van der Putten, W.H., de Boer, W., 2006. Fungal biomass development in a chronosequence of land abandonment. Soil Biol. Biochem. 38, 51–60.

Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biol. Biochem. 19, 703–707.

Vos, M., Wolf, A.B., Jennings, S.J., Kowalchuk, G.A., 2013. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. FEMS Microbiol. Rev. 37, 936–954.

Wagg, C., Bender, S.F., Widmer, F., van der Heijden, M.G., 2014. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, 5266–5270.

Wakelin, S.A., Macdonald, L.M., Rogers, S.L., Gregg, A.L., Bolger, T.P., Baldock, J.A., 2008. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. Soil Biol. Biochem. 40, 803–813.

Waldrop, M.P., Firestone, M.K., 2006. Response of microbial community composition and function to soil climate change. Microb. Ecol. 52, 716–724.

Wall, L.G., 2011. The BIOSPAS consortium: soil biology and agricultural production. Handb. Mol. Microb. Ecol. Metagenomics Complement. Approaches 299–306.

Wang, G., Jagadamma, S., Mayes, M.A., Schadt, C.W., Steinweg, J.M., Gu, L., Post, W.M., 2015. Microbial dormancy improves development and experimental validation of ecosystem model. ISME J. 9, 226–237.

Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., Van Der Putten, W.H., Wall, D.H., 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. Science 304, 1629–1633.

Wardle, D.A., Yeates, G.W., Watson, R.N., Nicholson, K.S., 1995. The detritus food-web and the diversity of soil fauna as indicators of disturbance regimes in agro-ecosystems, in: The Significance and Regulation of Soil Biodiversity. Springer, pp. 35–43.

Weil, R.R., Benedetto, P.W., Bandel, V.A., Sikora, L.J., 1988. Influence of tillage practices on phosphorus distribution and forms in three Ultisols. Agron. J. 80, 503–509.

Weil, R.R., Islam, K.R., Stine, M.A., Gruver, J.B., Samson-Liebig, S.E., 2003. Estimating active carbon for soil quality assessment: A simplified method for laboratory and field use. Am. J. Altern. Agric. 18, 3–17.

Wessén, E., Hallin, S., Philippot, L., 2010. Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. Soil Biol. Biochem. 42, 1759–1765.

West, T.O., Post, W.M., 2002. Soil organic carbon sequestration rates by tillage and crop rotation. Soil Sci. Soc. Am. J. 66, 1930–1946.

Whalen, J.K., Hamel, C., 2004. Effects of key soil organisms on nutrient dynamics in temperate agroecosystems. J. Crop Improv. 11, 175–207.

Widmer, P., Brookes, P.C., Parry, L.C., 1989. Microbial biomass nitrogen measurements in soils containing large amounts of inorganic nitrogen. Soil Biol. Biochem. 21, 865–867.

Wieder, W.R., Bonan, G.B., Allison, S.D., 2013. Global soil carbon projections are improved by modelling microbial processes. Nat. Clim. Change 3, 909–912.

Winogradsky, S., 1924. Sur la microflora autochtone de la terre arable. Comptes Rendus Hebd. SØances AcadØmie Sci. Paris D 178, 1236–1239.

Wortmann, C.S., Quincke, J.A., Drijber, R.A., Mamo, M., Franti, T., 2008. Soil microbial community change and recovery after one-time tillage of continuous no-till. Agron. J. 100, 1681–1686.

Zabaloy, M.C., Garland, J.L., Allegrini, M., del Valle Gomez, E., 2016. Soil microbial community-level physiological profiling as related to carbon and nitrogen availability under different land uses. Pedosphere 26, 216–225.

Zabaloy, M.C., Gómez, E., Garland, J.L., Gómez, M.A., 2012. Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. Appl. Soil Ecol. 61, 333–339.

Zabaloy, M.C., Lehman, R.M., Frey, S.D., Garland, J.L., 2008. Optimization of an oxygen-based approach for community-level physiological profiling of soils. Soil Biol. Biochem. 40, 2960–2969.

Zajko, Š., Klimant, I., 2013. The effects of different sterilization procedures on the optical polymer oxygen sensors. Sens. Actuators B Chem. 177, 86–93.

Zak, J.C., Willig, M.R., Moorhead, D.L., Wildman, H.G., 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. Soil Biol. Biochem. 26, 1101–1108.

Zhang, B., Li, Y., Ren, T., Tian, Z., Wang, G., He, X., Tian, C., 2014. Short-term effect of tillage and crop rotation on microbial community structure and enzyme activities of a clay loam soil. Biol. Fertil. Soils 50, 1077–1085.

Zhang, L.-M., Wang, M., Prosser, J.I., Zheng, Y.-M., He, J.-Z., 2009. Altitude ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils of Mount Everest. FEMS Microbiol. Ecol. 70, 208–217.

Zhang, Q., Liang, G., Zhou, W., Sun, J., Wang, X., He, P., 2016. Fatty-Acid Profiles and Enzyme Activities in Soil Particle-Size Fractions under Long-Term Fertilization. Soil Sci. Soc. Am. J. 80, 97–111.

Zhao, X., Liu, S.-L., Pu, C., Zhang, X.-Q., Xue, J.-F., Ren, Y.-X., Zhao, X.-L., Chen, F., Lal, R., Zhang, H.-L., 2017. Crop yields under no-till farming in China: A meta-analysis. Eur. J. Agron. 84, 67–75. doi:10.1016/j.eja.2016.11.009

Zibilske, L.M., Bradford, J.M., Smart, J.R., 2002. Conservation tillage induced changes in organic carbon, total nitrogen and available phosphorus in a semi-arid alkaline subtropical soil. Soil Tillage Res. 66, 153–163.